

การหาปริมาณ คี - นอร์เกสตรีนในน้ำมันและซีรัมโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์



นางสาวฉัตรพร จีโรจจาตุรนต์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๑

000535

U 15383490

Determination of D-norgestrel in Milk and Serum by Radioimmunoassay

Miss Chatporn Jirojjaturont

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1978

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การหาปริมาณ ดี-นอร์เกสทรีลในน้ำนมและซีรัมโดยวิธี
เรดิโออิมมูโนแอสเสย์

ชื่อนิสิต นางสาว ฉัตรพร จิโรจจาตุรนต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราพรรณ คำนจตุรา

แผนกวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2520



บทคัดย่อ

การวัดปริมาณของ D-norgestrel ด้วยวิธี radioimmunoassay ในรายงานนี้ เสนอผลการพัฒนาวิธีการหาปริมาณของ D-norgestrel โดยใช้สารติดสลากรังสีคือ D-norgestrel-3-oxime/(¹²⁵I)-iodohistamine แอนติบอดีที่ใช้ได้จากการฉีดกระตุ้นด้วย D-norgestrel-3-oxime-BSA จากการศึกษาหาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา radioimmunoassay ของ D-norgestrel พบว่า ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของแอนติบอดีเป็น 1 : 160,000 และปริมาณของอนุพันธ์ที่ติดสลากเป็น 5,000 - 10,000 cpm/tube เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ incubate ประมาณ 18 - 24 ชั่วโมง ที่ 4°C การแยก D-norgestrel อนุพันธ์ออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดีใช้วิธีแยกด้วยผงถ่านปริมาณ 2.5 mg/tube ใน phosphate buffer PH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4°C ปฏิกิริยาการดูดซับของผงถ่านไม่แตกต่างกันไปจากเดิมเมื่อเติมและไม่เติม 100 μ l ของ 0.5% gelatin phosphate buffer ส่วน dextran T 70 ปริมาณตั้งแต่ 0.05 - 3.2 mg/tube พบว่ามีผลต่อการดูดซับของผงถ่าน แต่ไม่ทำให้ลักษณะของกราฟมาตรฐานเปลี่ยนแปลง การหาปริมาณของ D-norgestrel ในน้ำนมตัวอย่างทำโดยใช้วิธีสกัดด้วย ether แล้วกำจัดสารเจือปน โดยใช้ sephadex LH 20 column และชะด้วย isooctane : benzene : methanol 70 : 20 : 10 โดยปริมาตร ส่วนการหาปริมาณของสารนี้ในซีรัมนั้นใช้สกัดโดยวิธีเดียวกับน้ำนมแต่ไม่จำเป็นต้องผ่าน sephadex column

จากการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีทดลองนี้ พบว่า ความแม่นยำในการทำปฏิกิริยาเดียวกันและในระหว่างการทำปฏิกิริยาทั้งในน้ำมันและซีรัม มีสัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า 10% ความถูกต้องของการวัดจะเปลี่ยนแปลงได้บ้าง เมื่อปริมาณของ D-norgestrel ในสารตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้น ในการวัดปริมาณจากสารตัวอย่างทั้งในน้ำมันและซีรัมนั้น ได้เลือกใช้ปริมาณของสารตัวอย่างให้อยู่ในช่วงซึ่งความถูกต้องอยู่ระหว่าง $90 \pm 10\%$ ทุกครั้ง ความไวของการทดลองเป็น 5 pg/cm^3 แอนติบอดีที่ใช้มีความจำเพาะสูง กล่าวคือ มีปฏิกิริยาไม่เกิน 30% กับ metabolite บางชนิดของ D-norgestrel เท่านั้น

ผลการวัดปริมาณของสารนี้ในน้ำมันและซีรัมของสตรีอาสาสมัคร 6 ราย ที่กินยาคุมกำเนิด Microlut[®] ซึ่งประกอบด้วย D-norgestrel $30 \mu\text{g}$ /วัน ปรากฏว่า ปริมาณของสารที่วัดได้อยู่ระหว่าง $20 - 160 \text{ pg/cm}^3$ และ $0.2 - 1.5 \text{ ng/cm}^3$ ของน้ำมันและซีรัมตามลำดับ

The reliability of the method showed that coefficient of variation was less than 10% both for within and between assay. Since the accuracy of the assay varied with the concentration of the D-norgestrel in the reaction media, the final assay of the sample was carried out by adjusting the concentration to the level which the accuracy range fall within $90 \pm 10 \%$. A sensitivity of 5 pg/cm^3 was obtained. The antibody was considered to be highly specific showing cross reaction of not more than 30% with only some of D-norgestrel derivatives. Determination of this synthetic steroid in milk and serum from 6 subjects who used pill containing D-norgestrel 30 $\mu\text{g/day}$ showed significant amounts ranging from 20 - 160 pg/cm^3 in milk and 0.2 - 1.5 ng/cm^3 in serum.

กิติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณและขอขอบคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่ได้กรุณาให้
คำแนะนำและช่วยเหลือ ทำให้วิทยานิพนธ์ชิ้นสำเร็จโดยฉลุย

- | | |
|----------------------------------|----------------|
| ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราพรธ | คานอุตรา |
| รองศาสตราจารย์ ดร. กำจ็ค | มงคลกุล |
| รองศาสตราจารย์นายแพทย์วิชัย | โปษยะจินดา |
| ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์เทพ | หิมะทองคำ |
| รอง ศาสตราจารย์แพทย์หญิงมณฑิรา | คันท์เกยูร |
| ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประมวล | วีรุทมนเสน |
| อาจารย์ ดร. สุกัญญา | วีรวัชนะกุมพะ |
| คุณรัตนา | สินธุภัก |
| คุณอัญชลี | ประคัมทอง |
| คุณสมัย | ลีพิพชนไพบลุย |
| คุณวิฑูร | ชัยชาญวัฒนากุล |
| คุณวัฒนา | อุษณาจิตต |

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตึกนวมินทร์ราชินี แผนกเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และแผนกสูติศาสตร์ - นรีเวช
วิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ Tenovus Institute for Cancer Research, Welsh
National school of Medicine, Cardiff, U.K. ที่ได้กรุณาให้สารต่าง ๆ
ที่จำเป็นในการวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยและสภาวิจัยแห่งชาติ ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุน
การวิจัยในครั้งนี้



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิติกรรมประกาศ	ช
รายการตารางประกอบ	ฉ
รายการรูปประกอบ	ร
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วัสดุ เครื่องมือและวิธีการวิจัย	10
2.1 วัสดุที่ใช้	10
2.2 เครื่องมือที่ใช้	11
2.3 การเก็บสารตัวอย่าง	11
2.4 การเตรียมสาร	12
2.5 การศึกษาอิทธิพลของน้ำนม ชีรัมและตัวทำ ละลายอินทรีย์ต่อกราฟมาตรฐานของ Radioimmunoassay ของ D-norgestrel	21
2.6 การคำนวณหา Percentage recovery	29
2.7 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการทดลอง	30
3. ผลการวิจัย	37
3.1 การศึกษาลาก D-norgestrel	37
3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐาน ของ D-norgestrel	37

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนตี้บอดี 37

การหาปริมาณ D-norgestrel ที่ลดลงที่เหมาะสม
ในการทำปฏิกิริยา 41

อิทธิพลของปริมาณผงถ่านต่อการดูดซับ D-norgestrel 41

อิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อการดูดซับของผงถ่าน 41

อิทธิพลของ gelatin และ dextran T70 ต่อการดูด
ซับของผงถ่าน 41

อิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการ incubate ต่อการรวม
ตัวของ D-norgestrel กับแอนตี้บอดี 42

3.3 Reproducibility ของ Sephadex LH-20 column
Chromatography 50

3.4 ผลการหาวิธีการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการหา
ปริมาณ D-norgestrel ในน้ำมัน 50

อิทธิพลของน้ำมัน ether และ eluent จาก
Sephadex Column (benzene + methanol) 50

ผลการใช้กระบวนการ Saponification ในการ
สกัด saponifiable lipid 50

ผลการสกัดไขมันโดยใช้ Sephadex LH-20
column ที่มี isooctane, benzene และ methanol
เป็น eluent 51

3.5 ผลการหาวิธีการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณ
D-norgestrel ในซีรัม 51

อิทธิพลของซีรัมที่มีต่อกราฟมาตรฐาน	51
3.6 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีทดลอง	58
3.7 ผลการหาปริมาณ D-norgestrel ในน้ำนมและซีรัม	63
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	67
เอกสารอ้างอิง	74
ประวัติการศึกษา	81

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1. ส่วนประกอบของสารต่างๆในหลอดทดลองสำหรับกราฟมาตรฐาน	18
2. ส่วนประกอบของสารต่างๆในหลอดทดลอง เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารต่างๆต่อกราฟมาตรฐาน	23
3.(1)ความจำเพาะของ D-norgestrel antiserum	56
3.(2)ความจำเพาะของ D-norgestrel antiserum	57
4. ความแม่นยำและความถูกต้องของการวัดปริมาณ D-norgestrel ในน้ำนม	58
5. ความแม่นยำและความถูกต้องของการวัดปริมาณ D-norgestrel ในซีรัม	59
6. ปริมาณของ D-norgestrel ในน้ำนมและซีรัมของสตรีอาสาสมัครที่ใช้ Microlut [®] เป็นยาคุมกำเนิด	60

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1.	สูตรโครงสร้างของ D-norgestrel	3
2.	หลักการของ saturation analysis	8
3.	ขั้นตอนการทดสอบ D-norgestrel	14
4.	เครื่องมือที่ใช้สำหรับ elute ^{125}I -D-norgestrel ออก จากแผ่น alumina pre-coated sheet	17
5.	รูป sephadex LH-20 column ที่ใช้ในการทำให้สารบริสุทธิ์	21
6.	กราฟมาตรฐานของ D-norgestrel	30
7.	ความจำเพาะของ D-norgestrel antiserum	31
8.	ผลการทำให้ ^{125}I -D-norgestrel บริสุทธิ์ด้วย thin-layer chromatography	34
9.	Immunoreactivity ของ NG_1 และ NG_2 กับแอนติบอดี	35
10.	Antibody dilution curve	36
11.	กราฟมาตรฐานของ D-norgestrel เมื่อใช้สารทดสอบปริมาณ ต่างกัน	39
12.	อิทธิพลของผงถ่านในการดูดซับ D-norgestrel อิสระ	40
13.	อิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อการดูดซับของผงถ่าน	41
14.	อิทธิพลของ gelatin ในการดูดซับ D-norgestrel อิสระ	42
15.	อิทธิพลของ dextran ในการดูดซับ D-norgestrel อิสระ	43-44
16.	อิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการ incubate ต่อการรวมตัวของ D-norgestrel กับแอนติบอดี	45

รูปที่	๗๓ หน้า
17. อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการรวมตัวของ D-norgestrel กับ แอนติบอดี	46
18. Reproducibility ของ sephadex LH-20 ที่ใช้ benzene : methanol 85 : 15 โดยปริมาตรเป็น eluent	49
19. Reproducibility ของ sephadex LH-20 ที่ใช้ isooctane : benzene : methanol 70 : 20 : 10 โดยปริมาตรเป็น eluent	50
20. กราฟมาตรฐานของ D-norgestrel แสดงถึงอิทธิพลของ ether และน้ำนม เมื่อผ่านและไม่ผ่าน sephadex column	51
21. กราฟมาตรฐานของ D-norgestrel แสดงถึงอิทธิพลของน้ำนม สตรีหลังคลอดในวันต่างๆกัน ซึ่งผ่านกระบวนการ saponification ก่อนการสกัดและผ่าน sephadex column	52
22. ผลการใช้ sephadex LH-20 column ซึ่งมี eluent คือ isooctane : benzene : methanol 70 : 20 : 10 โดยปริมาตร	53
23. อิทธิพลของซีรัมต่อกราฟมาตรฐาน D-norgestrel เมื่อผ่านและไม่ผ่าน sephadex column	54