II. การทดลอง

1. สารเคมี

Dichloromethane (BDH Laboratory reagent)

Concentrated sulfuric acid (BDH Analar)

Sodium hydroxide (E.Merk A.G. Darmstadt, Germany Analar)

Andydrous sodium sulfate (BDH Analar)

Ethanol absolute (E.Merk A.G. Darmstadt, Germany Analar)

Hydrocortisone (Δ^4-pregnen - 11 β, 17 α, 21-triol-3, 20-dione, Kendall's compound F, Cortisol, Sigma)

2. เครื่องมือที่ใช้

Kober tubes glass stoppers B 19/26 Q/Q 150 mm.x 23 mm.

Kober tubes glass stoppers B 14/23 Q/Q 100 mm.x 18 mm. fused with fluorescence tubes.

Adams Cyclo-Mixer (Clay-Adams, Inc.)

เครื่องหมุนหลอดทดลองสำหรับผสมสาร (ดูรูปที่ 30 ในภาคผนวก)

Farrand Photoelectric Fluorometer Model A-2 (Farrand Optical Co., Inc. N.Y., U.S.A.) (ดูรูปที่ 31 ในภาคผนวก)

Ultraviolet Spectrophotometer UNICAM S.P.800 (UNICAM Instruments Ltd. Cambridge, England)

Aminco-Bowman Spectrophotofluorimeter (American Instrument Co, Inc. Maryland, U.S.A.)

3. ผู้ถูกทดลอง

ผู้ถูกทดลองแบ่งออกเป็น 2 พวก คือ

3.1 คนปกติ

เป็นคนไทยที่มีอาชีพต่าง ๆ กัน คือ อาจารย์ และ นิสิต จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย นักศึกษาแพทย์ นักเรียนพยาบาล และคนงานโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ นายทหารกรมรักษาดินแดน และ คนงานในโรงงานสหพัฒนพิบูลย์จำกัด สำหรับผู้ถูกทดลองที่เป็นเด็กนั้น เป็นคนไข้ในโรงพยาบาลเด็กและโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคเกี่ยวกับระบบเอนโดไครน์ ตับ ไต และคนไข้เหล่านี้ไม่ได้อยู่ในสภาวะเครียด

3.2 คนป่วย

เป็นคนไข้ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ถูกไฟลวก 5 ราย และคนไข้ที่สงสัยว่าเป็นโรค Cushing's syndrome 1 ราย

4. การเก็บเลือดและปัสสาวะ

4.1 การเก็บเลือด

ผู้ถูกทดลอง (ส่วนใหญ่งดอาหารเช้า) จะถูกเจาะเลือดทางเส้นเลือดจากแขน (venepuncture) ในตอนเช้าระหว่างเวลา 7.00-10.00 น. เลือดที่เจาะประมาณ 15 มล.จะถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 ประมาณ 6 มล. ใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ซึ่งบรรจุสารละลาย heparin ที่อบแห้งประมาณ 60 I.U. เขย่าให้เข้ากันเพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอนแยกออกจากชั้นพลาสม่า

ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดชั้นพลาสม่าซึ่งมีประมาณ 3 มล. เก็บใส่หลอดแก้วที่มีฝาเกลียวปิดสนิท แล้วนำไปแช่แข็งไว้ในตู้แช่แข็งซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -15 °ซ. สำหรับนำไปหาปริมาณคอร์ติซอล การหาปริมาณคอร์ติซอลกระทำได้ทันทีหลังจากแยกชั้นพลาสม่าออกจากเม็ดโลหิตแล้ว แต่สามารถเก็บไว้ในตู้แช่แข็งเพื่อทำการทดลองในเวลาที่สะดวกได้ในระยะเวลาไม่เกิน 1 เดือน

<u>ส่วนที่ 2</u> ประมาณ 3 มล. ใส่ขวดที่บรรจุสารละลายผสมของโซเดียมฟลูออไรด์ กับ โปตัสเซียมออกซาเลต 0.5 มล.ที่อบแห้ง (โซเดียมฟลูออไรด์ 6 กรัม ผสมกับโปตัสเซียมออกซาเลต 12 กรัม ในน้ำ 1000มล.) เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปหาปริมาณกลูโคสทันที

<u>ส่วนที่ 3</u> ประมาณ 3 มล. ใส่หลอดแก้วตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัวไม่เกิน 20 นาที แล้วปั่นแยกเอาซีรั่ม (ตามวิธีเดียวกับการแยกพลาสม่าออกจากเม็ดโลหิตในส่วนที่ 1) ซึ่งได้ประมาณ 1 มล. นำไปหาปริมาณอีเล็กโตรไลท์ทันที

นอกจากนี้ยังได้เก็บ pooled plasma คือพลาสม่าของคนปกติและคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคต่าง ๆ รวมทั้งโรคที่เกี่ยวกับระบบเอนโดไครน์ ตับ และ ไต ประมาณ 100 คน นำมารวมกันให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วแบ่งแยกใส่ไว้ในหลอดแก้วสะอาดที่มีฝาเกลียวปิดสนิท หลอดละประมาณ 2 มล. นำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

4.2 <u>การเก็บปัสสาวะ</u>

ผู้ถูกทดลองจะเริ่มเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 7.00 น.ของวันที่หนึ่ง ไปจนถึง 7.00 น. ของวันรุ่งขึ้น (การเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงนี้จะเริ่มเมื่อเวลาใดก็ได้ แล้วแต่ความสะดวกของผู้เก็บ เมื่อเริ่มเวลาใดก็สิ้นสุดการเก็บเวลาเดียวกันนั้นของวันถัดไป) โดยใส่กรดเกลือเข้มข้นลงไป10 หยด เป็นสารกันบูด (Meites and Faulkner, 1962)

5. วิธีวัดระดับกลูโคสและอีเล็กโตรไลท์ (โซเดียม โปตัสเซียม และ คลอไรด์) ในเลือด

5.1 วิธีวัดระดับกลูโคสในเลือด

ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Nelson (1944) โดยหน่วยงานเอนโดไครน์ และ เมตาโบลิซึม แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีหลักการดังนี้

ให้กลูโคสที่มีอยู่ในเลือดไปรีดิวซ์ทองแดงในสารละลายด่างที่ร้อน ทองแดงจะเปลี่ยนจากคิวปริก (cupric, Cu^{++}) ไปเป็นคิวปรัส (cuprous, Cu^{+}) แล้วรวมกับสารละลายอาร์ซีโนโมลิบเดท (arseno-molybdate) ให้สารประกอบสีน้ำเงิน วัดความเข้มของสีได้โดยเครื่องมือ colorimeter

5.2 วิธีวัดระดับอีเล็กโตรไลท์ในเลือด

ใช้วิธีอัตโนมัติด้วยเครื่องมือ auto-analyzer ดำเนินการทดลองโดยศูนย์วิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

6. วิธีวัดระดับ 17-ไฮดรอกซีคอร์ติโคสเตียรอยด์ และ 17-คีโตสเตียรอยด์ในปัสสาวะ

6.1 วิธีวัดระดับ 17-ไฮดรอกซีคอร์ติโคสเตียรอยด์ในปัสสาวะ

ดำเนินการทดลองโดยหน่วยงานเอนโดไครน์และเมตาโบลิซึม แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตามวิธีของ Patterson (1960) ซึ่งได้ดัดแปลงเล็กน้อย มีวิธีการโดยสังเขปดังนี้

นำปัสสาวะมาเติมเอนไซม์ β-glucuronidase เพื่อไฮโดรไลส์ 17 - ไฮดรอกซีคอร์ติโคสเตียรอยด์ที่เกาะอยู่กับกรดกลูเคียวโรนิคให้เป็นอิสระ แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ล้างสารละลายที่สกัดได้ด้วยด่าง ทำ

ให้แห้งโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน นำมาละลายใน อัลกอฮอล์ แล้วทำให้เกิดสีโดยสารละลายเฟนิลไฮดราซินในกรดกำมะถัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 18-20 ชั่วโมง วัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องมือ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 nm.

6.2 <u>วิธีวัดระดับ 17-คีโตสเตียรอยด์ในปัสสาวะ</u>

ดำเนินการทดลองโดยหน่วยเอนโดไครน์และเมตาโบลิซึม แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตามวิธีของ Callow and Emmens (1938) มีวิธีการโดยสังเขปดังนี้

นำปัสสาวะมาเติมกรดเกลือเข้มข้นเพื่อไฮโดรไลส์ 17-คีโตสเตียรอยด์ ที่เกาะอยู่กับซัลเฟตให้เป็นอิสระ แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์มล้างสารละลายที่สกัดได้ด้วยด่าง และ น้ำ แล้วทำให้แห้งโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน นำมาทำให้เกิดสีโดยเติมเมตาไดไนโตรเบนซีน และเบนซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เติม อัลกอฮอล์ลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดสีด้วยเครื่องมือ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm.

7. <u>วิธีวัดระดับคอร์ติซอลในพลาสม่า</u>

7.1 <u>การเตรียมสารที่ใช้</u>

ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Mattingly (1962) โดยเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 100 มล. ลงไปในไดคลอโรมีเทน 1,000 มล. ตั้งทิ้งไว้หลาย ๆ วัน และเขย่าบ้างเป็นครั้งคราว แล้วนำมาล้างด้วย

ก. กรดกำมะถันเข้มข้น 100 มล.

ข. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 <u>N</u> 100 มล.

ค. น้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 200 มล.

ใส่โซเดียมซัลเฟตที่แห้งลงไปดูดน้ำทิ้งไว้ค้างคืน กรองแล้วนำมากลั่นโดยใช้อีเทอร์คอนเดนเซอร์ เก็บสารละลายที่กลั่นออกมา ณ อุณหภูมิ 39-40 ° ซ. ในขวดสีน้ำตาลเพื่อป้องกันแสงสว่าง

อัลกอฮอล์ (absolute ethanol) ทำให้บริสุทธิ์โดยรีฟลักซ์ อัลกอฮอล์ 1,000 มล. กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม เป็นเวลา 2ชั่วโมง กลั่นธรรมดา เอา 50 มล.แรกทิ้ง ส่วนที่เหลือกลั่น (ที่ 78 ° ซ.) แล้วนำมาเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่แห้งเพื่อดูดน้ำ กรองแล้วกลั่นอีกครั้งโดยผ่าน **คอลัมน์** เอา 50 มล.แรกทิ้ง เก็บเฉพาะแต่ส่วนกลาง ๆ ที่ 78 ° ซ.มาใช้ (สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ,2512)

ฟลูออเรสเซนซ์รีเอเจนต์(fluorescence reagent) ผสมกรดกำมะถันเข้มข้น 7 ส่วน กับ **อ**ัลกอฮอล์ 3 ส่วน ในขวดคอแคบที่แช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง สารผสมที่ได้ควรไม่มีสี (Mattingly,1962) ฟลูออเรสเซนซ์ **รีเอเจนต์** นี้ควรเตรียมใช้ใหม่ ๆ เพื่อลดค่าแบลงค์

สารละลายมาตรฐานคอร์ติซอล เตรียมให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/**มล.** โดยละลายคอร์ติซอล 5 มิลลิกรัมในอัลกอฮอล์ 5 มล. แช่แข็ง **เก็บ**ไว้ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิประมาณ -15 ° ซ. สำหรับนำมาเตรียมสารละลายคอร์ติซอลเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มล. เพื่อใช้ในการทดลองซึ่งเตรียมได้โดยทำสารละลายมาตรฐานคอร์ติซอลเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มล. ให้เจือจางลง 10, 100 และ 1,000 เท่า ตามลำดับด้วยน้ำกลั่น สุดท้ายจะได้สารละลายมาตรฐานคอร์ติซอลเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มล. (ดัดแปลงจาก Mattingly, 1962)

7.2 <u>วิธีทดลอง</u>

ก. ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Mattingly (1962) ซึ่งได้ดัดแปลงเล็กน้อย หลักการมีอยู่ว่า สกัดคอร์ติซอลในพลาสม่าด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน ขจัดสิ่งเจือปนด้วยสารละลายด่าง และน้ำกลั่น นำไปทำให้เกิดการเรืองแสง กับสารละลายของกรดกำมะถันในอัลกอฮอล์ แล้ววัดความเรืองแสงด้วยเครื่อง fluorometer วิธีการทดลองโดยละเอียดมีดังต่อไปนี้

ปิเปตพลาสม่า (ที่ได้จากข้อ 4.1 ส่วนที่ 1) 1 มล.ใส่ลงไปใน Kober tube (B 19 / 26 Q/Q 150 mm.x 23 mm.) เติมสารละลายไดคลอโรมีเทนลงไป 7.5 มล. ปิดจุกแก้วโดยเขย่าลดความดันก่อนแล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนหลอดสำหรับผสมสารให้หมุนด้วยความเร็วประมาณ 50 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดชั้นน้ำทิ้งล้างสารละลายที่สกัดได้ด้วยสารละลาย NaOH 0.1 <u>N</u> 0.75 มล.(Wilkins,1965) นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที ดูดชั้นน้ำทิ้ง เติมน้ำกลั่นลงไป 1 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer อีก 15 วินาที ดูดชั้นน้ำทิ้งแล้วปิเปตสารละลายที่สกัดได้มา 5 มล.ผสมกับฟลูออเรสเซนซ์รีเอเจนต์ 2.5 มล. ในหลอดสำหรับวัดความเรืองแสง ซึ่งหลอมติดกับ Kober tube (B 14/23 Q/Q 100 mm.x18 mm.) ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัดความเรืองแสงด้วยเครื่อง Farrand photoelectric fluorometer ที่ excitation wavelength 428nm. (โดยใช้ mercury lamp เป็นดวงไฟสำหรับการ excitation) และ emission wavelength 538 nm. ที่ aperture 3 ใช้ฟิลเตอร์ของบริษัท Barr- Stroud No. X/MD 6/002 เป็น primary filter และฟิลเตอร์ของบริษัทG.K. Turner No.2A-15

& No.58 เป็น secondary filter สำหรับแบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทนพลาสม่า และ สารละลายมาตรฐานคอร์ติซอลเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/มล. 1 มล. ก็ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกัน และ พร้อมกันกับพลาสม่าทุกประการ

ข. ดำเนินการทดลองตามวิธีการในข้อ ก ทุกประการ แต่วัดความเรืองแสงด้วยเครื่อง Aminco-Bowman Spectrophotofluorometer ที่ excitation wavelength 470 nm. (โดยมี xenon arc lamp เป็นดวงไฟสำหรับการ excitation) และ emission wavelength 540 nm. ใช้ความกว้างของ slit เบอร์ 4 ความเรืองแสงที่วัดได้อยู่ในหน่วยของ percent transmittance (% T)

<u>ข้อควรระวัง</u> <u>ในการหาปริมาณคอร์ติซอลในพลาสม่าโดยวิธีวัดความเรืองแสง</u>

เนื่องจากการหาปริมาณคอร์ติซอลโดยวิธีวัดความเรืองแสงนี้เป็นวิธีที่ค่อนข้าง sensitive มาก จึงถูกรบกวนได้ง่าย โดยสิ่งเจือปนต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำ และสิ่งสกปรกที่เกาะอยู่ตามเครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง ดังนั้น น้ำกลั่นที่ใช้ในการทดลอง จึงต้องกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่นที่ประกอบด้วยแก้วทุกส่วน (all glass distillation) และเครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ต้องทำความสะอาดโดยแช่ใน cleaning solution (chromic acid) แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น การกระทำดังกล่าวนี้สามารถลดค่าแบลงค์ลงได้มาก

<u>การคำนวณหา standard deviation (SD.) และ standard error (SE.) ของค่าเฉลี่ย (mean)</u>

ความกระจายของค่าเฉลี่ยวัดเป็น variance $= s^2$

square root ของ variance = standard deviation

$$\text{mean } (\bar{X}) = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n}$$

X_i = ปริมาณคอร์ติซอลเป็นไมโครกรัม%

n = จำนวนพลาสมาตัวอย่าง

$$\text{deviation from mean (d)} = X_i - \bar{X}$$

$$\text{standard deviation (SD.)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i-\bar{X})^2}{n-1}}$$

$$\text{standard error (SE.)} = \frac{\text{SD.}}{\sqrt{n-1}}$$

หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การคำนวณ percentage recovery</u>

สมมติให้ปริมาณคอร์ติซอลใน pooled plasma มี = B ไมโครกรัม/มล.

ปริมาณคอร์ติซอลมาตรฐานที่เติมลงไป = A ไมโครกรัม/มล.

ปริมาณคอร์ติซอลที่สกัดออกมาได้ทั้งหมด = x ไมโครกรัม/ มล.

∴ ปริมาณคอร์ติซอลที่ recover ได้ = x-(A+B) ไมโครกรัม/มล.

หรือ = (A+B) -x ไมโครกรัม/มล.

$$\therefore \text{percentage recovery} = \frac{x-(A+B)}{A} \times 100$$

$$\text{หรือ} = \frac{(A+B)-x}{A} \times 100$$