

ผลการวิจัย

1. การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการวัดปริมาณ

แอนติบอดีได้จาก 2 แหล่ง คือ

1.1 Anti - E₂ - 17^β - monohemisuccinate - human serum albumin
ให้ชื่อว่า S - 52[#]5 ได้จาก Dr. Abraham, G.E.

1.2 Anti - E₂ - 6 - BSA ให้ชื่อว่า A[#]0012 ได้จาก Dr. Mahajan, D.K.

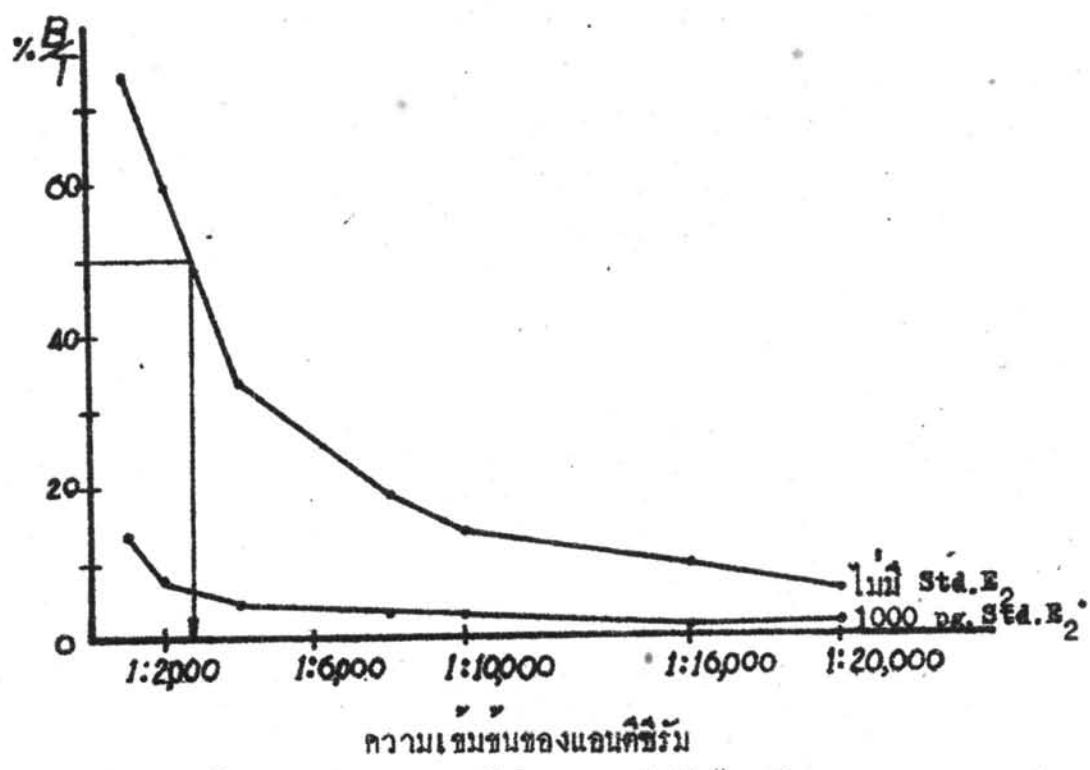
S - 52[#]5 บอกถึงวิธีละลายแอนติบอดีสำหรับใช้วัดปริมาณ จึงไม่ต้องการหาความเข้มข้นของแอนติบอดี คือใช้ 0.1 มล. ในข้อ 4.5 (หน้า 18) เติม buffer 50 มล.

ส่วน A[#]0012 ไม่ได้บอกรายละเอียดในการละลายแอนติบอดีเพื่อใช้ในการวัด จึงต้องการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้วัดปริมาณ ซึ่งสามารถทำได้ตามวิธี ข้อ 7.2 (หน้า 23) โดยเลือกใช้ E₂ มาตรฐาน 0 และ 1000 พิโคกรัมต่อ 0.5 มล. ความเข้มข้นของแอนติบอดีในหลอดทดลองแต่ละชุดเท่ากับ 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10000, 1:16000 และ 1:20000 อินคิวเบตที่ 4°ซ เป็นเวลา 18 ชม. (ค้างคืน)

นำผลการทดลองที่ได้ มาเขียนกราฟระหว่าง % B/T* กับความเข้มข้นของแอนติบอดี (รูปที่ 5)

*B = bound complex

T = จำนวนกัมมันตภาพรังสีที่เติมลงในหลอดปฏิบัติการ



รูปที่ 5 แสดงปฏิกิริยาการตอบสนองของความเข้มข้นของแอนติบอดีคือ $^3\text{H-E}_2$

ผลการทดลอง ความเข้มข้นของแอนติบอดีในหลอดทดลองสูง ปฏิกริยารวมตัวเป็น bound complex (B) ของแอนติบอดีกับ $^3\text{H-E}_2$ และ E_2 มาตรฐานที่สูงตามควย นั่นคือ B ขึ้นกับความเข้มข้นของแอนติบอดี การเลือกความเข้มข้นของแอนติบอดี โดยทั่ว ๆ ไป นิยมเลือกอัตราส่วน $\frac{B_0}{T}$ เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองนี้ เลือกแอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 1:2800 ซึ่งจะได้อัตราส่วน $\frac{B_0}{T}$ เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์

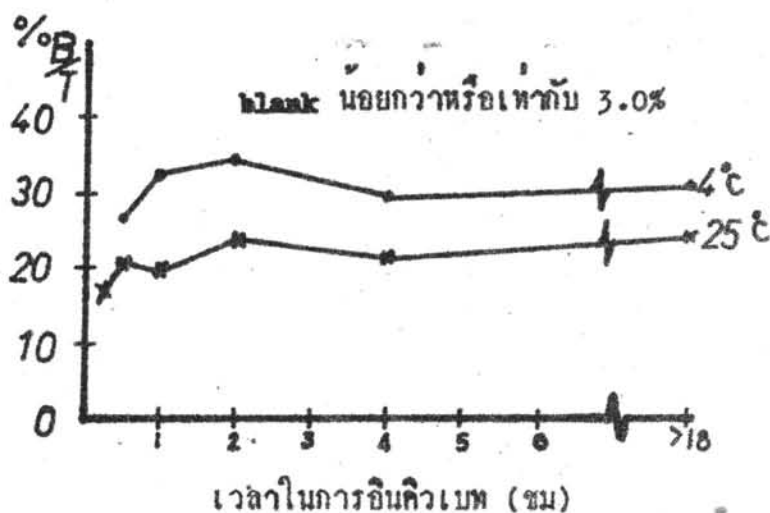
* B₀ = ปฏิกริยารวมกันเป็น bound complex ระหว่างแอนติบอดีกับ $^3\text{H-E}_2$ โดยไม่มี E_2 มาตรฐานในหลอดทดลอง

2. หาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา

ทำการทดลองตามวิธี 7.2 (หน้า 23) โดยไม่มีการเติม H_2 มาตรฐานในหลอดทดลอง อินคิวเบทไว้ที่ 4°C และ 25°C แล้วปรับเปลี่ยนเวลาในการอินคิวเบทดังนี้คือ 1/2, 1, 2, 4 ชม. และค้างคืน (>18 ชม.)

หลังการอินคิวเบทแล้วเติมผงถ่าน 1.25 มก. (สารละลายผงถ่าน 0.625% 0.2 มล.) ในแต่ละชุดของการทดลอง

เขียนกราฟระหว่าง % B/T กับเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบท (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงผลของเวลาที่มีต่อปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจน

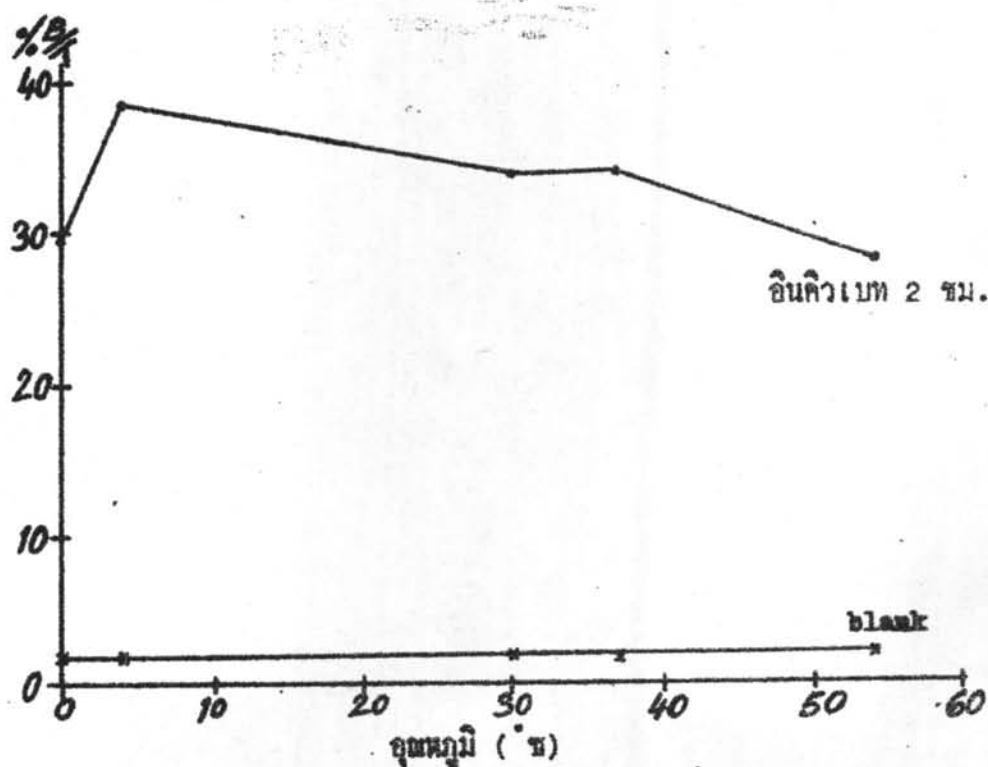
จากกราฟการทดลอง จะเห็นได้ว่าที่ 4°C มีปฏิกิริยาการจับตัวระหว่างแอนติบอดีและ $^3\text{H}-\text{H}_2$ สูงกว่าที่ 25°C ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับ $^3\text{H}-\text{H}_2$ เหมือนกันทั้งที่ 4°C และ 25°C เพราะว่าลักษณะของกราฟที่ใกล้เคียงกัน และต่างก็มีปฏิกิริยาจับตัวกันสูงสุดเมื่ออินคิวเบทเป็นเวลา 2 ชม. ลักษณะเช่นนี้แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากอุณหภูมิ

จากการทดลองนี้ เวลา 2 ชม. เหมาะที่สุดในการอินคิวเบต เพราะว่าปฏิกิริยาการจับตัวของแอนติบอดีกับ $^3\text{H}-\text{S}_2$ สูงสุด แต่ในการวิจัยนี้ เลือกอินคิวเบตค้างคืน เพราะว่า การอินคิวเบต 2 ชม. นั้นไม่สะดวกในทางปฏิบัติ

3. อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาการจับตัวระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน

ทำการทดลองตามข้อ 7.2 (หน้า ๑๖) เลือกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับ $^3\text{H}-\text{S}_2$ โดยไม่มี S_2 มาครฐานในหลอดทดลอง แล้วปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการอินคิวเบต 0°C (แช่ในน้ำแข็ง), 4°C (เก็บไว้ในตู้เย็น), 30°C , 37°C และ 54°C เป็นเวลา 2 ชม

นำผลการทดลองมาเขียนกราฟระหว่าง % B/P กับอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 7 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี

จากกราฟการทดลอง เมื่ออินทิวเบทที่ 4°ซ เป็นเวลา 2 ชม. ปฏิริยาการจับตัวของแอนติบอดีกับแอนติเจนจะสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ 2 (หน้า 28) และปฏิริยาการจับตัวของแอนติบอดีกับแอนติเจนลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการย่ำให้เห็นว่าคุณสมบัติของแอนติบอดีเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ

ในการวิจัยนี้ เลือกใช้อุณหภูมิ 4°ซ เพราะว่าปฏิริยาการจับตัวของแอนติบอดีกับแอนติเจนมีค่าสูงสุด นอกจากนี้ยังสะดวกในทางปฏิบัติอีกด้วย

การแยก Free steroid hormone (F) ออกจาก antibody bound steroid hormone (B)

เทคนิคการแยก F ออกจาก B มีหลายแบบ (Ratcliffe 1974) ในการวิจัยนี้ เลือกใช้ผงถ่านเป็นสารกักจับ F ออกจาก B

4. การหาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมสำหรับแยก F ออกจาก B

การทดลองนี้ศึกษาเปลี่ยนแปลงวิธีการของ Binoux และ Odell (1973)

วิธีดำเนินการทดลอง

เตรียมผงถ่านละลายใน 0.0625% Dextran T 70 (ข้อ 4.2 หน้า 17) ให้มีความเข้มข้นของผงถ่าน 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% และ 1.0% ตามลำดับ

ทำการทดลองตามข้อ 7.2 (หน้า 23) โดยแต่ละชุดประกอบด้วย

ก. blank ไม่มีแอนติบอดีในหลอดทดลอง

ข. ความเข้มข้นของ E_2 มาตรฐาน 0 พิโคกรัม

ค. ความเข้มข้นของ E_2 มาตรฐาน 1000 พิโคกรัม

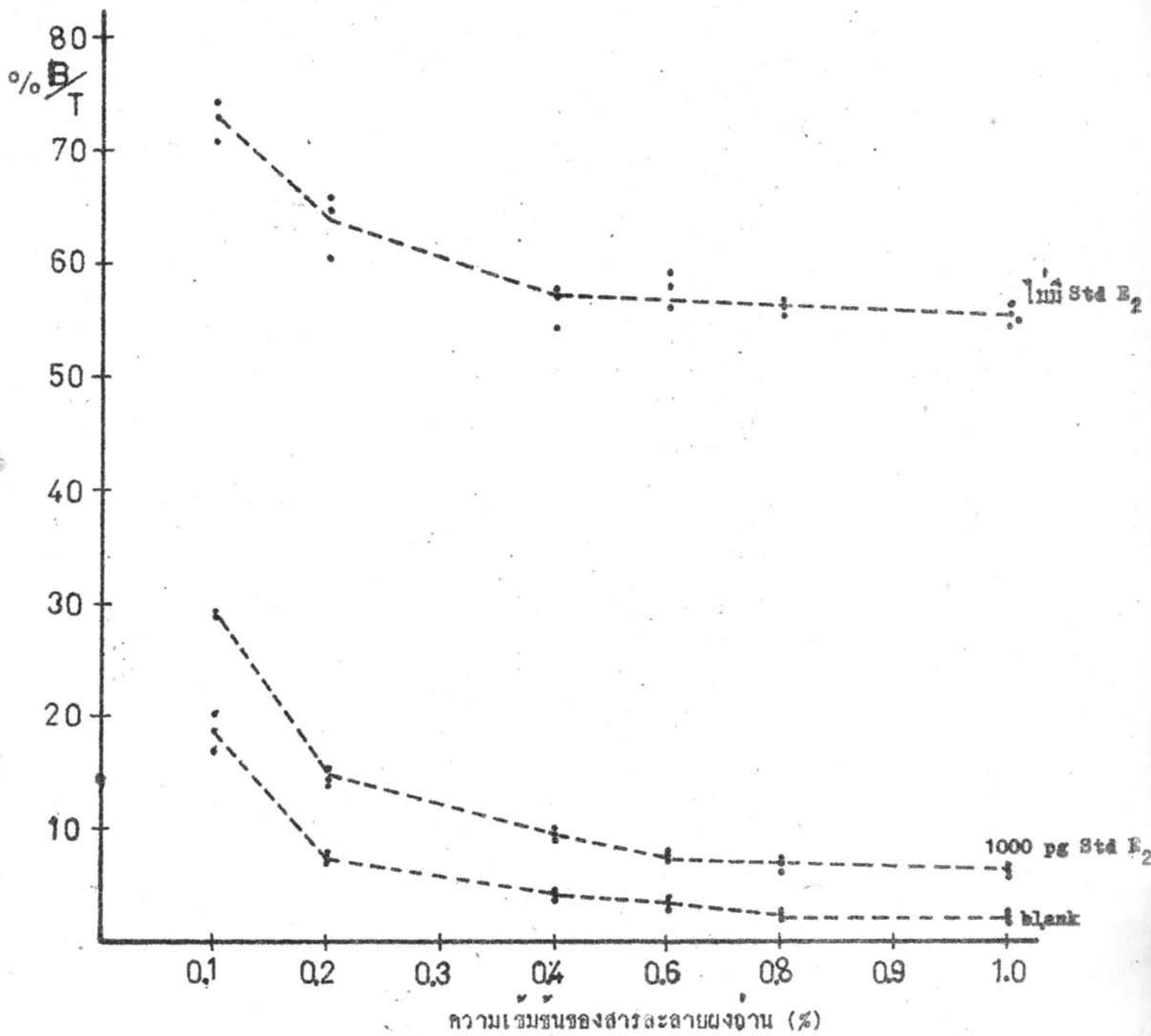
หลังอินคิวเบทที่ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 18 ชม. แล้วเติมผงถ่านซึ่งเคลือบด้วย Dextran และมีความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในแต่ละชุด จนครบทั้ง 6 ความเข้มข้น เขย่าให้ผงถ่านกระจายโดยทั่วถึงกัน ตั้งไว้ในภาคน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นแยกเอาน้ำใสไปวัดกัมมันตภาพรังสี

เขียนกราฟระหว่าง % B/T กับความเข้มข้นของผงถ่าน (รูป 8)

จากกราฟการทดลอง พบว่าการกักจับ F ขึ้นกับความเข้มข้นของผงถ่านคือความเข้มข้นของผงถ่านเพิ่มขึ้นการกักจับ F ก็เพิ่มขึ้น จะเห็นได้จาก blank ลดน้อยลงเมื่อปริมาณผงถ่านเพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของผงถ่าน 0.4% ขึ้นไป การกักจับ F จะไม่แตกต่างกัน ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า 0.4% เป็นความเข้มข้นของผงถ่านที่น้อยที่สุดซึ่งสามารถแยก

F ออกจาก B ไค้

ในการเลือกความเข้มข้นของผงถ่านที่เหมาะสม คือเอาจุดที่มี $\frac{B_0}{T}$ สูง เมื่อ blank ค่า (Binoux และ Odell 1973) ในการทดลองนี้คือจุดที่มีความเข้มข้นผงถ่าน 0.4% แต่ในการวิจัยนี้ ทำเป็นการหาปริมาณ E_2 ตามวิธี Abraham (1971) ซึ่งใช้ผงถ่านเคลือบควย 0.0625% Dextran มีความเข้มข้น 0.625% เมื่อผลของการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นจะสอดคล้องกับหลักการเลือกความเข้มข้นของผงถ่าน



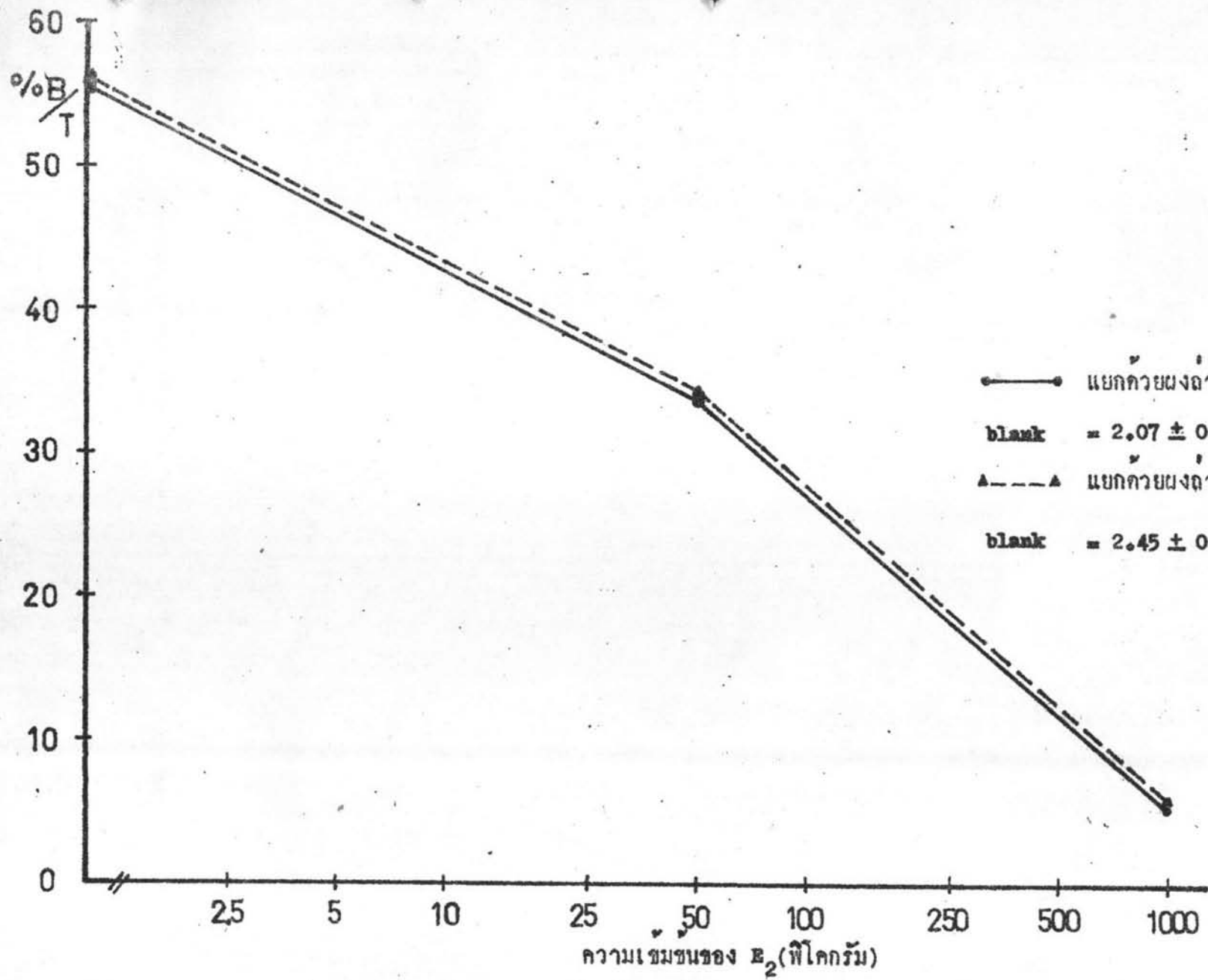
รูปที่ ๑ ความเข้มข้นสารละลายผงงานที่มีต่อการดูดซับ Free hormone

5. การทดลองแยก F ออกจาก B โดยใช้ผงถ่านของบริษัท Serva และ Matheson Coleman & Bell.

การทดลองทำเหมือนข้อ 4 (หน้า 31) ต่างแต่การเพิ่ม E_2 มาตรฐาน 50 พิโกรัม อีกหลอดหนึ่ง และใช้ผงถ่านเคลือบด้วย 0.0625% Dextran T 70 ความเข้มข้น 0.625% (ข้อ 4.2 หน้า 17) แยก F ออกจาก B หลังจากอินคิวเบชันที่ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 18 ชม.

นำผลการทดลองมาเขียนกราฟระหว่าง % B/T กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน E_2 (รูปที่ 9)

จากกราฟการทดลอง แสดงให้เห็นว่าผงถ่านจาก 2 บริษัท มีคุณสมบัติในการดูดซับ F เหมือนกัน กราฟที่ได้ขนานกัน แต่ละจุดมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ และค่า blank ที่ได้จากการแยก F โดยผงถ่านของ Matheson Coleman & Bell มีค่า 2.45 ± 0.33 (SD.) blank ของการแยกด้วยผงถ่าน Serva มีค่า 2.07 ± 0.34 (SD.) ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ถึงแม้ว่าการทดลองนี้จะใช้ผงถ่านเพียง 2 บริษัทเท่านั้น แต่ก็อาจประเมินผลได้ว่าการแยก F ออกจาก B ใน steroid RIA นี้ สามารถใช้ผงถ่านต่างบริษัทได้



รูปที่ 9 แสดงการดูดซับของผงถ่านต่างบริษัท

6. อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาที่มีการกุกซ์ของผงถ่าน

ทำการทดลองตามข้อ 7.2 (หน้า 23) โดยเลือกความเข้มข้นของ E_2 มาตรฐาน 0 พีโคกรัม/0.5 มล. อินคิวเบทที่ 4°C เป็นเวลา 18 ชม.

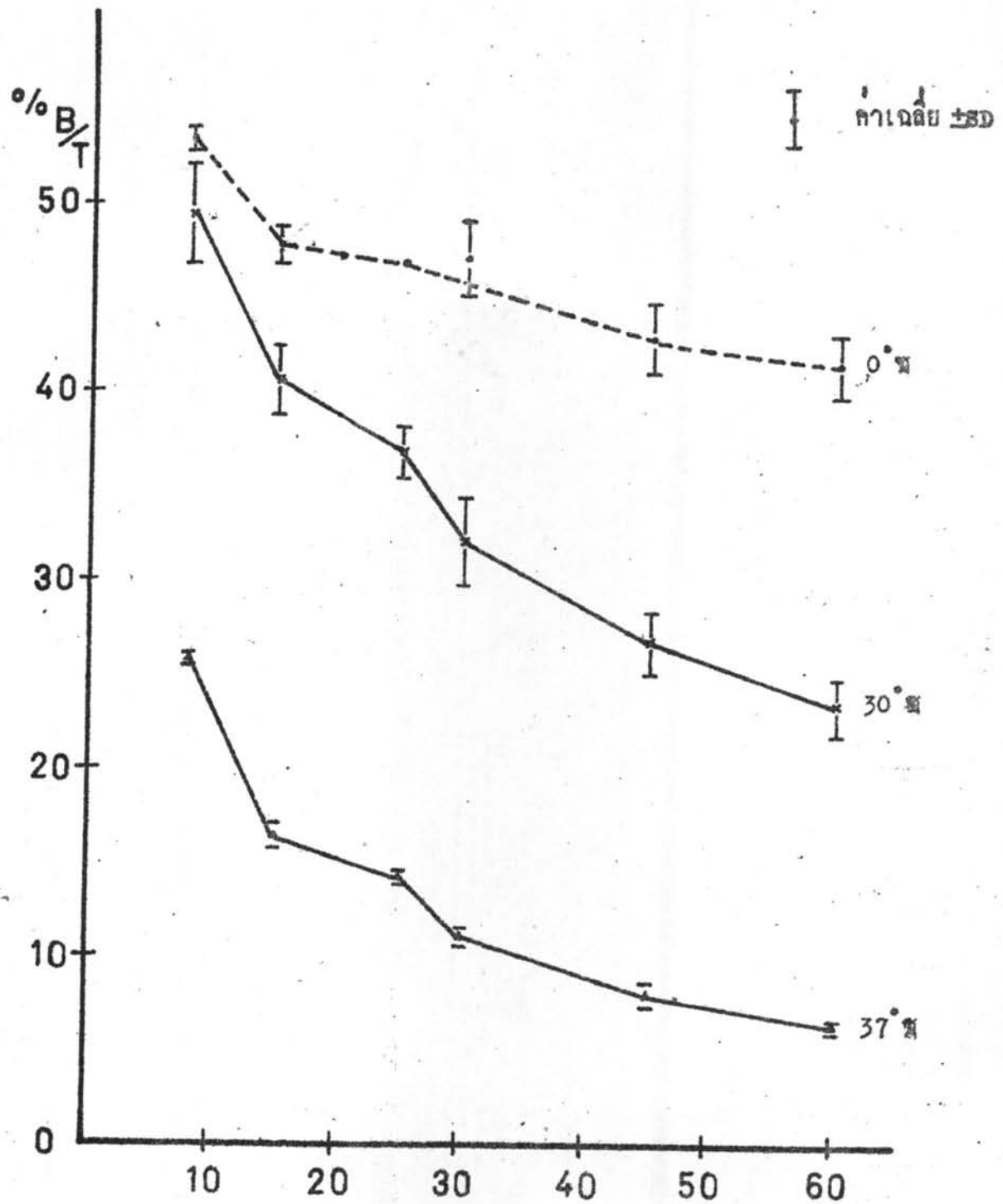
แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม

- กลุ่มที่ 1 เติมผงถ่าน (ข้อ 4.2 หน้า 17) แล้วแช่ไว้ในอ่างน้ำแข็ง (0°C)
 กลุ่มที่ 2 เติมผงถ่าน (ข้อ 4.2 หน้า 17) แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30°C)
 กลุ่มที่ 3 เติมผงถ่าน (ข้อ 4.2 หน้า 17) แล้วแช่ไว้ในอ่างน้ำอุ่น (37°C)

บันทึกเอาผงถ่านออกตามเวลาเกิดการกุกซ์ของผงถ่าน คือ 8, 15, 25, 30, 45 และ 60 นาที

เขียนกราฟการทดลองระหว่าง % B/T กับเวลาที่ใช้ในการกุกซ์ของผงถ่าน

จากกราฟการทดลอง การกุกซ์ของผงถ่านจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิและเวลา นั่นคือ ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้น percentage binding ลดลง โดยเฉพาะที่อุณหภูมิห้องและที่ 37°C การกุกซ์ของผงถ่านจะเพิ่มขึ้นตามเวลา ส่วนที่ 0°C การกุกซ์ของผงถ่านจะเพิ่มไม่มากนัก ในทางสถิติ เมื่อเวลาเกิดการกุกซ์ของผงถ่านเพิ่มขึ้น ดังนั้น การแยก F ออกจาก B ของการวิจัยนี้ จึงใช้วิธีแช่หลอด ซึ่งทำปฏิกิริยา (reaction mixture) ไว้ในอ่างน้ำแข็ง เมื่อเวลาเติมผงถ่าน

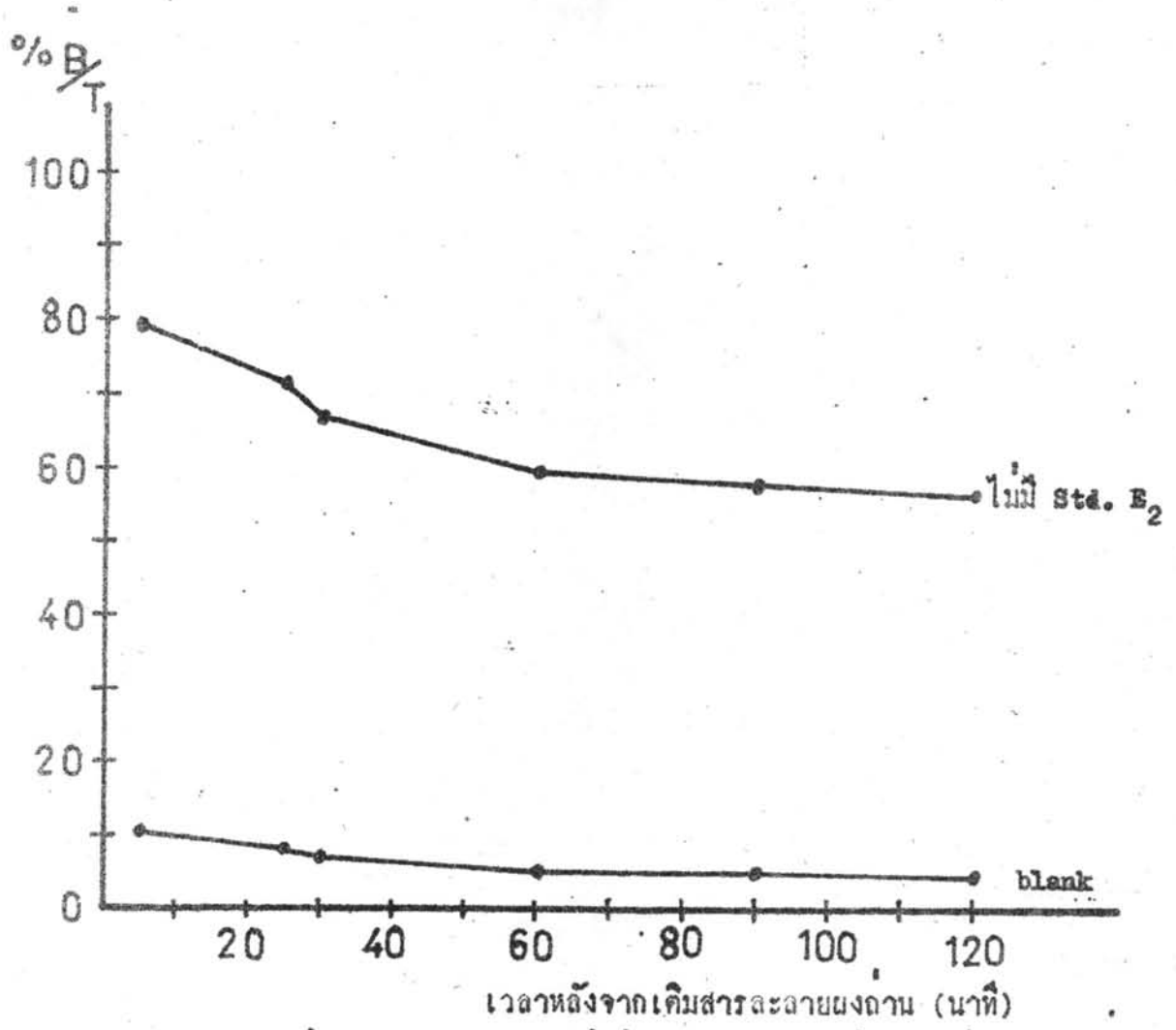


รูปที่ 10 อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการดูดซับของผงถ่าน

7. การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมหลังจากเติมผงถ่านลงใน reaction mixture

การทดลองเหมือน 6 (หน้า 36) แล้วเติมผงถ่าน (ข้อ 4.2 หน้า 17) ลงใน หลอดที่ทำปฏิกิริยาซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง ปั่นแยกเอาผงถ่านออกตามเวลา 5, 25, 30, 60, 90 และ 120 นาที หลังจากเติมผงถ่านลงในหลอดที่ทำปฏิกิริยา

เขียนกราฟระหว่าง % B/T กับเวลาหลังจากเติมผงถ่าน (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 อิทธิพลของเวลาที่มีต่อการดูดซับของผงถ่าน

จากกราฟการทดลอง ในช่วงแรกการดูดซับของผงถ่านจะเพิ่มขึ้นตามเวลา ซึ่งเห็นได้ชัดเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น % B จะลดลง จนกระทั่งเวลา 60 นาที ขึ้นไป การดูดซับของผงถ่านจึงไม่แตกต่างกันในทางสถิติ

เนื่องจากปฏิกิริยาการดูดซับของผงถ่านขึ้นกับเวลา ดังนั้น จึงจำเป็นต้องเลือกเวลาในการแยก F ออกจาก B ด้วยผงถ่านให้คงที่ การวิจัยนี้จึงเลือกเวลา 25 นาที ในการอินคิวเบตผงถ่านเพื่อแยก F ออกจาก B เหตุผลที่เลือกเวลา 25 นาที ก็เพราะว่าถ้าใช้เวลานานเกินไป % B จะลดลง ทำให้ความไวในการวัดลดลงด้วย

8. เสถียรภาพ (Stability) ของสารติดสลากรังสี E_2

โดยทั่ว ๆ ไปสารติดสลากรังสี (radioactive labelled compound) E_2 ที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ 2, 4, 6, 7 - $^3H - E_2$ และ 6, 7 - $^3H - E_2$

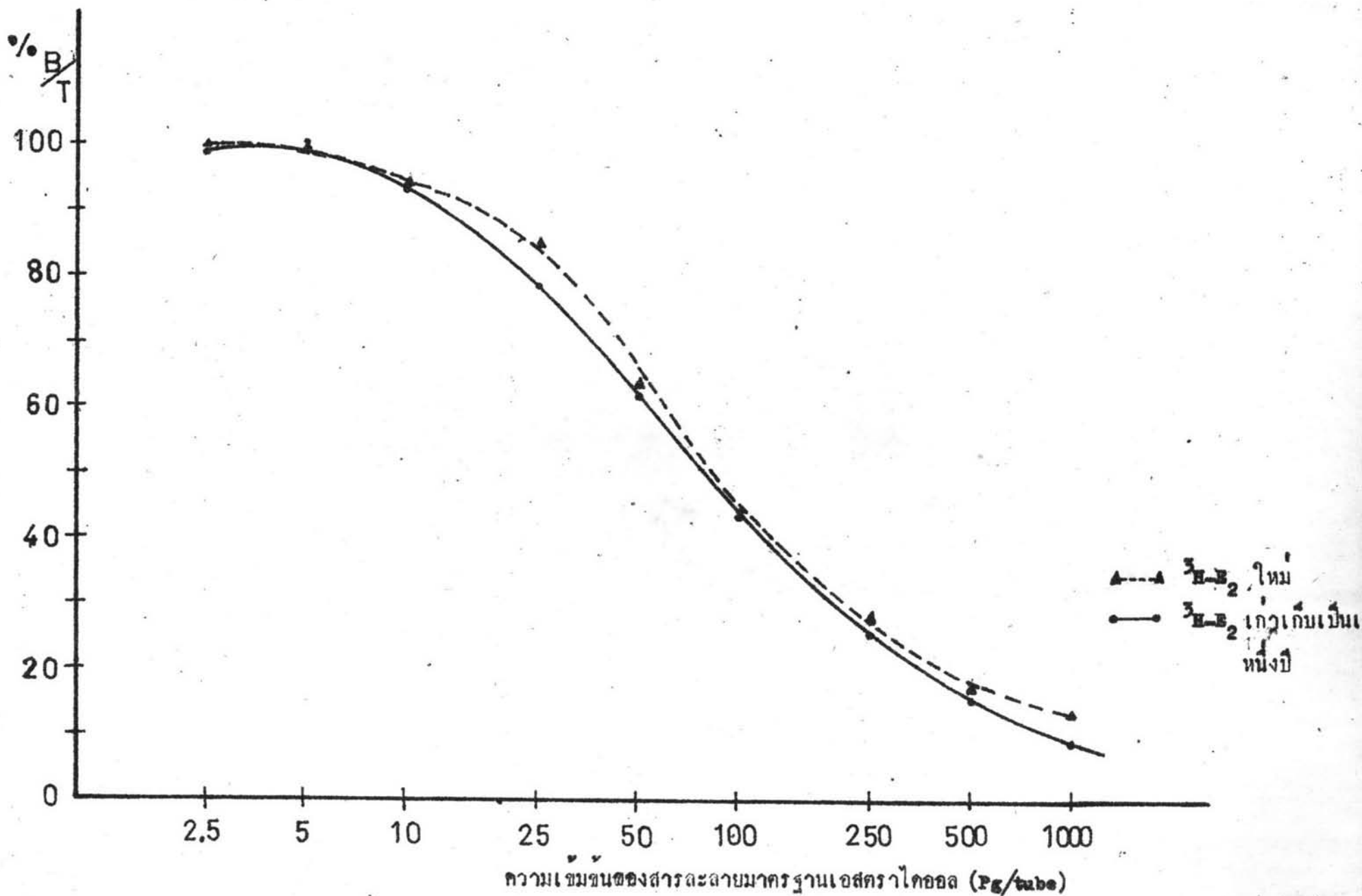
สารชนิดแรกจะมี specific activity (100 curies/mM) สูงกว่าสารชนิดหลัง (40-50 curies/mM) สารชนิดแรกมี 3H อยู่ที่ C_2 และ C_4 ของ E_2 โมเลกุล จะขัดขวางการจับของ $^3H - E_2$ กับแอนติบอดี ทำให้ binding affinity ต่ำ (Abraham และ Odell, 1970) ในการวิจัยนี้ จึงเลือกใช้สารติดสลากรังสีชนิดหลัง

ส่วนมากเชื่อว่า สารติดสลากรังสีนี้จะมีเสถียรภาพไม่ดีหรือมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเก็บไว้นานกว่า 6 เดือน เพราะว่าโมเลกุลของ E_2 ถูกติดสลากรังสีซึ่งเป็นสารที่มีพลังงาน และพลังงานของสารนี้อาจเป็นเหตุทำให้โมเลกุลของสารที่ถูกติดสลากรังสีนั้นสูญเสียเสถียรภาพ ดังนั้น เพื่อที่จะแสดงให้เห็นว่าสารติดสลากรังสี E_2 (6, 7 - $^3H - E_2$) มีเสถียรภาพดี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการจับกับแอนติบอดีเมื่อเปรียบเทียบกับ $^3H - E_2$ ซึ่งได้ใหม่

ทำการทดลองเหมือนกับข้อ 7.2 (หน้า 23) แต่ใช้ $^3H - E_2$ ที่เก็บไว้เป็นเวลา 1 ปี กับ $^3H - E_2$ ซึ่งได้มาใหม่ ๆ ความเข้มข้นของ $^3H - E_2$ ประมาณ 56 พิโคกรัม ต่อ 0.1 มล. เท่ากัน

เขียนกราฟการทดลอง ระหว่าง % B/B₀ กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน E_2 (รูปที่ 12)

จากกราฟการทดลอง ลักษณะของกราฟที่ได้สามารถประเมินได้ว่าขนานกัน นั่นคือ $^3H - E_2$ ใหม่กับ $^3H - E_2$ เก็บไว้เป็นเวลา 1 ปี ต่างก็ให้ปฏิกิริยาเหมือนกัน สารติดสลากรังสี E_2 (6, 7 - $^3H - E_2$) จึงมีเสถียรภาพก็สามารถเก็บไว้ใช้ได้นานถึง 1 ปี แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ไม่มี 2, 4, 6, 7 - $^3H - E_2$ ทดลอง เพราะว่าสารติดสลากรังสีมีราคาแพง



รูปที่ 12. เสด็จรภาพของสารติดสลากรังสีเอสตราไดโอด - 17 ปีคา ($^3\text{H-E}_2$)

9. ความจำเพาะ (Specificity) ของแอนติบอดี E₂

โดยทั่ว ๆ ไป สเตอรอยด์ที่จะนำมาทดสอบหา cross reaction มักจะเลือกจาก

9.1 สเตอรอยด์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับสารที่ต้องการวัดปริมาณ ส่วนใหญ่ได้แก่ เมตาโบไลต์ และสารต้นกำเนิด (precursor) ของสารที่ต้องการวัด ในที่นี้หมายถึง E₁, E₃ และเทสโทสเตอโรน (Testosterone) เป็นต้น

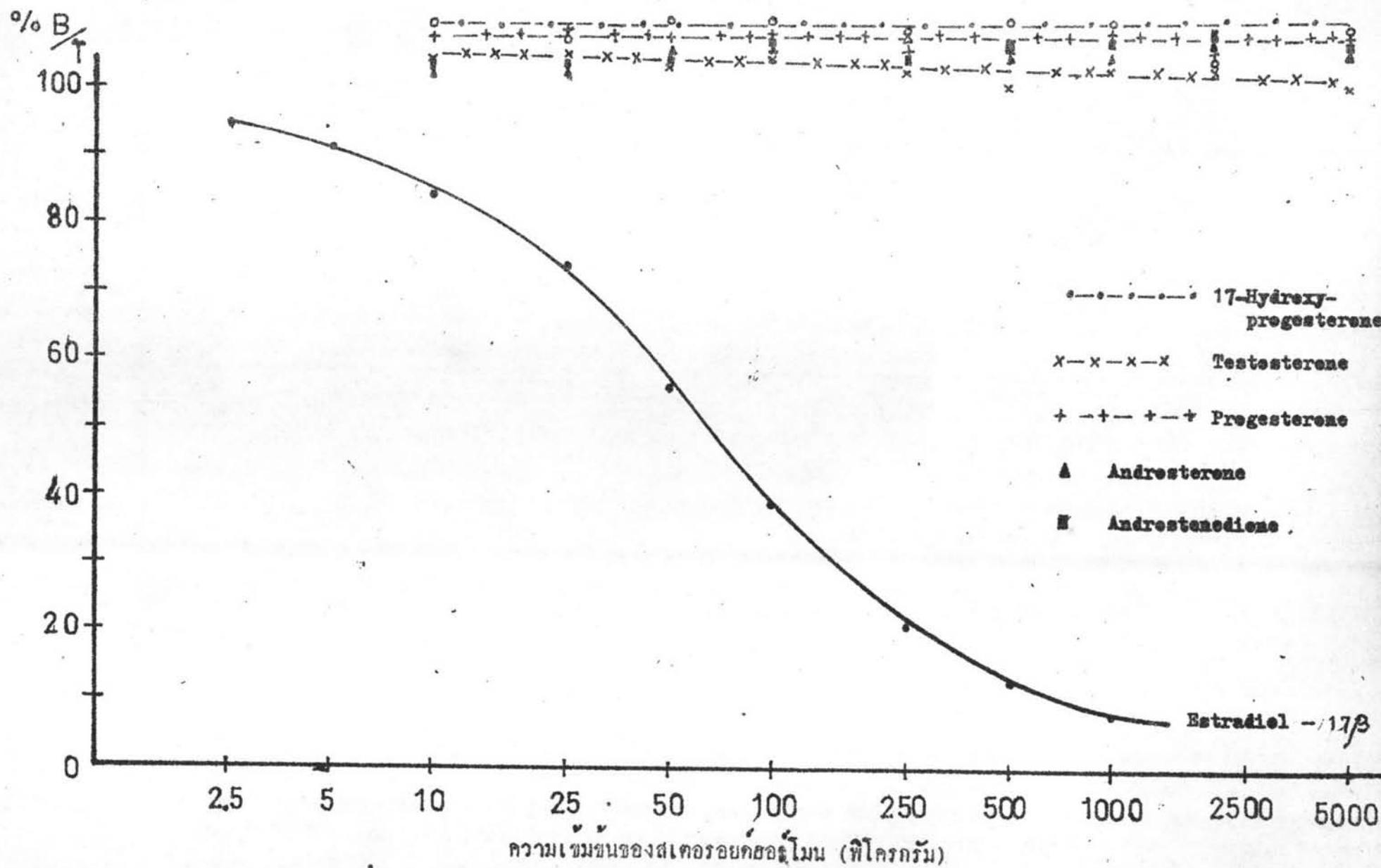
9.2 สเตอรอยด์ที่มีปริมาณมาก ๆ ในน้ำเหลือง

การทดลองนี้อาศัยหลักการข้อ 9.1 (หน้า 42) เพราะว่าตามหลักของ Immunology สารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันจะมีปฏิกิริยาต่อแอนติบอดีที่คล้ายคลึงกัน และอีกประการหนึ่ง สเตอรอยด์มาตรฐานมีราคาค่อนข้างแพง จึงไม่อาจทดลองได้ทุกชนิด จึงพิจารณาแต่ชนิดที่สำคัญเท่านั้น และการพิสูจน์ให้ได้ absolute specificity ทำได้ยาก (Odell และคณะ, 1971) เพราะว่าใน biological fluids มีสเตอรอยด์หลายชนิดซึ่งมีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกัน

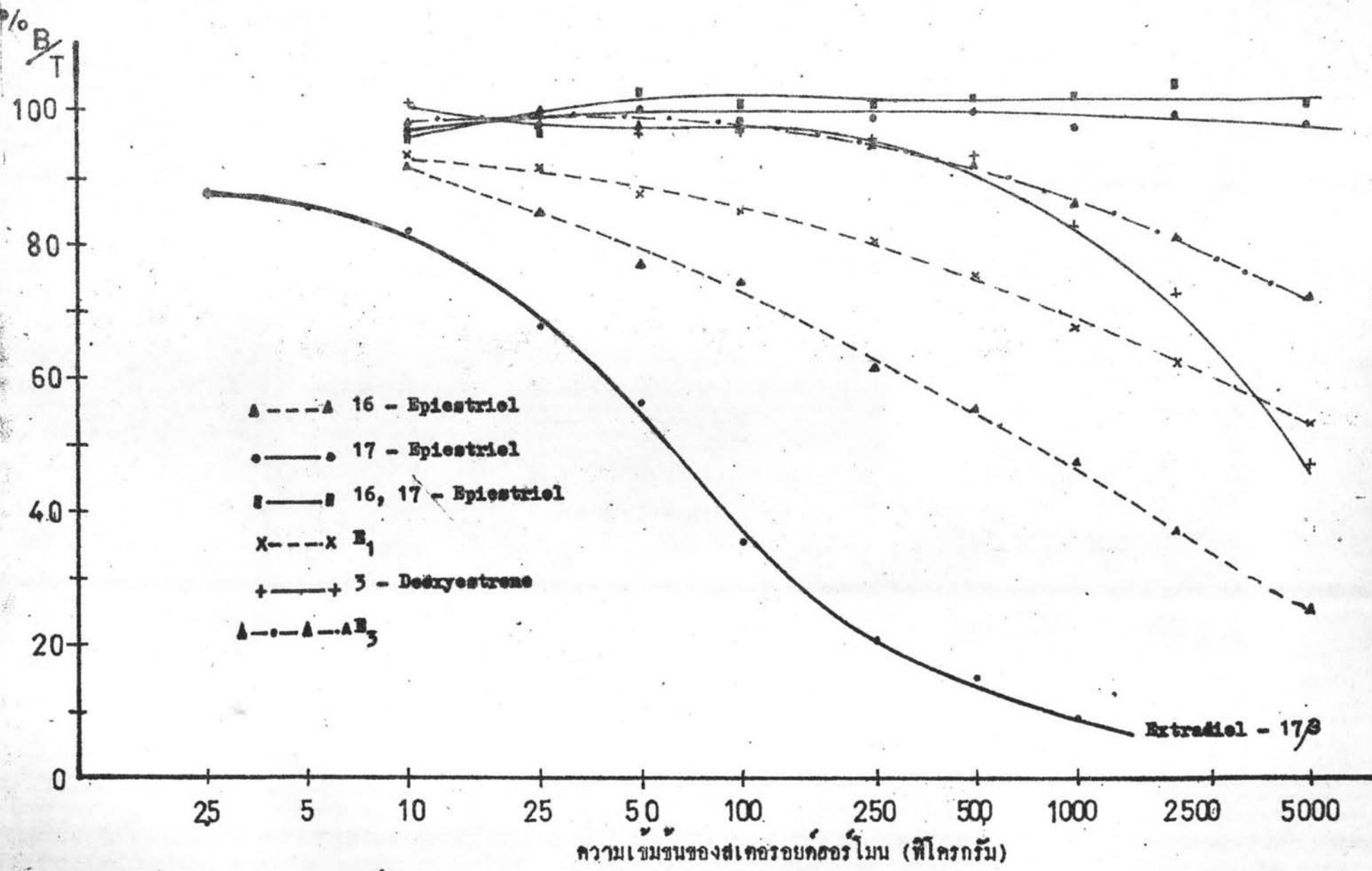
ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน (ข้อ 7.2 หน้า 29) แล้วใช้ สเตอรอยด์มาตรฐานที่ต้องการทดสอบ cross reaction แทน E₂ มาตรฐาน แอนติบอดี ใช้ A#0012 มีความเข้มข้นตามการทดลอง 1 (หน้า 26)

เขียนกราฟ % B/B₀ กับความเข้มข้นของสเตอรอยด์ที่ต้องการทดสอบ cross reaction (รูปที่ 13 และ 14)

จากกราฟรูปที่ 13 และ 14 เป็นการแสดง cross reaction ของสเตอรอยด์ กับแอนติบอดี (Anti - E₂ - 6 - BSA) ไม่ได้แสดง cross reaction ของ Anti - E₂ - monohemisuccinate - HSA (S - 52 # 5) เพราะว่าแอนติบอดีชนิดหลังนี้ได้จาก Abraham ซึ่งมีข้อมูลการทดสอบไว้แล้ว จึงไม่ทำการทดลองซ้ำ (ตารางที่ 2)



รูปที่ 13 ความจำเพาะของแอนติบอดี ($\Delta^{17}0012$)



รูปที่ 14 ความจำเพาะของแอนติบอดี (A#0012)

จากการทดลองนี้ สามารถเขียนเป็นตาราง แสดง cross reaction ได้ดังนี้
 ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 cross reaction ของสเตอรอยด์กับแอนติบอดี (Anti E₂-6-BSA)

Steroids	cross reaction (%)
C ₂₁ Steroids	
Progesterone	<0.01
17 α - Hydroxyprogesterone	<0.01
C ₁₉ Steroids	
Testosterone	<0.01
Δ^4 - Androstene 3, 17 - dione	<0.01
Androsterone	<0.01
C ₁₈ Steroids	
Estradiol - 17 β	100.00
Estrone	1.23
Estriol	0.43
16 - Epiestriol	12.50
17 - Epiestriol	<0.05
16, 17 - Epiestriol	<0.05
3 - Deoxyestrone	1.40

$$\% \text{ cross reaction} = \frac{\text{พิโคกรัม E}_2 \text{ ที่ } 50\% \text{ B/B}_0}{\text{พิโคกรัมของสเตอรอยด์ที่ } 50\% \text{ B/B}_0} \times 100 \text{ (Doerr และ คณะ, 1973a)}$$

ตารางที่ 2 Cross reaction ของสเตอรอยด์กับแอนติบอดี S - 52[#] 5 (Abraham 1969)

Steroids	Cross reaction (%)
Cholesterol	<0.01
C ₂₁ Steroids	
Cortisol	<0.01
11 - Deoxycortisol	<0.01
Aldosterone	<0.01
Corticosterone	<0.01
Progesterone	<0.01
Deoxycorticosterone	<0.01
Δ^5 - Pregnenolone	<0.01
C ₁₉ Steroids	
Testosterone	<0.01
5 α - Dihydrotestosterone	<0.01
Δ^4 - Androstenedione	<0.01
C ₁₈ Steroids	
Estradiol - 17 β	100.00
Estradiol - 17 α	40.0
Estrone	35.0
Estriol	8.0
Synthetic estrogens	
17 α - Ethynylestradiol - 17 β	0.32
Diethylstilbestrol	0.25
3 - Cyclopentylether - 17 α - ethynylestradiol - 17 β	<0.01

จากตารางข้างต้น แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดี A # 0012 มีความจำเพาะสูงกว่าแอนติบอดี S - 52 # 5 นั่นคือตำแหน่งของโปรตีนที่จับกับสเตอรอยด์โมเลกุลที่ใช้เป็นแอนติเจนฉีดเข้าไปในสัตว์ มีผลต่อความจำเพาะของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นในสัตว์ (Lindner และคณะ, 1972) จากตารางที่ 1 E₁ มี cross reaction 1.23% เท่านั้น ในขณะที่แอนติบอดี S - 52 # 5 มี cross reaction ถึง 35% ดังนั้น ถ้าใช้แอนติบอดี S-52 # 5 วัดปริมาณ E₂ จะต้องทำ chromatography ก่อนวัด แต่ถ้าใช้ A # 0012 เป็นแอนติบอดีก็อาจวัดได้เลย โดยไม่ต้องทำ chromatography แต่ถึงอย่างไรก็ดี ถ้าต้องการค่าของ E₂ ถูกต้องมากขึ้น ก็ควรทำ chromatography ก่อนวัด

10. การทำ Resolution ของ Celite microcolumn ในการแยกสเตอรอยด์ฮอร์โมน

ทำการทดลองตามข้อ 6 (หน้า 20)

จากการทดลอง (ตารางที่ 3) สรุปได้ว่า

ก. เมื่อใช้ $^3\text{H} - \text{E}_1$ อย่างเดียวใส่ลงใน column

จะพบว่า Isooctane fraction มี $^3\text{H} - \text{E}_1$ = 0.008%

15% Ethyl acetate in Isooctane มี $^3\text{H} - \text{E}_1$ = 71.81%

40% Ethyl acetate in Isooctane มี $^3\text{H} - \text{E}_1$ = 0.004%

ข. เมื่อใช้ $^3\text{H} - \text{E}_2$ ซึ่กเดียวใส่ลงใน column

พบว่า Isooctane fraction มี $^3\text{H} - \text{E}_2$ (นับได้น้อยมาก) \approx 0%

15% Ethyl acetate in Isooctane มี $^3\text{H} - \text{E}_2$ \approx 0%

40% Ethyl acetate in Isooctane มี $^3\text{H} - \text{E}_2$ = 60.15%

ค. เมื่อใช้ $^3\text{H} - \text{E}_1 + ^3\text{H} - \text{E}_2$ ผสมกัน

พบว่า Isooctane fraction = 0.013%

15% Ethyl acetate in Isooctane recovery เฉลี่ย = 82.93% E_1

40% Ethyl acetate in Isooctane recovery เฉลี่ย = 71.63% E_2

จะเห็นได้ว่า $^3\text{H} - \text{E}_1$ จะแยกอยู่ในชั้นของ 15% Ethyl acetate in Isooctane และ $^3\text{H} - \text{E}_2$ จะอยู่ในชั้นของ 40% Ethyl acetate in Isooctane จากตารางที่ 3 นี้ แสดงให้เห็นว่า $^3\text{H} - \text{E}_1$ แยกจาก $^3\text{H} - \text{E}_2$ อย่างชัดเจน

ในการทำ Celite microcolumn นี้ ใช้กาชไนโตรเจน ความดัน 1-2 ปอนด์ ต่อ 1 ตร.นิ้ว ผ่านลงไปนั้ column อัตราความเร็วของ mobile phase ที่ไหลผ่าน column 4-8 หยดคอนาที หรือ 7 มล. ต่อ 1 ชม. (โดยประมาณ) ดังนั้น การทำ chromatography นี้ จะต้องใช้เวลา 1 ชม. 30 นาที

ตารางที่ 3 แสดง resolution ของ celite microcolumn

mobile phase	ลำดับ เวลาที่	column 1 *E ₁ อย่าง เดียว (cpm)	column 2 *E ₂ อย่าง เดียว (cpm)	column 3 *E ₁ + *E ₂ (cpm)	column 4 *E ₁ + *E ₂ (cpm)	column 5 *E ₁ + *E ₂ (cpm)	หมายเหตุ
Isooctane 4 มล.		26	0	34	39	32	
15% Ethyl acetate in Isooctane 3.5 มล.	1	0		0	0	0	*E ₁ เต็มลง ใน column 1200 cpm
	2	0		0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	
	4	862		185	661	613	
	5	0		696	403	429	
	6	0		10	0	5	
	7	0		0	0	0	
40% Ethyl acetate in Isooctane 3.5 มล.	1		0	0	0	0	*E ₂ เต็มลง ใน column 1682 cpm
	2		48	844	0	4	
	3	3	939	189	1142	1019	
	4		25	2	219	203	
	5		0	0	15	17	
	6		5	0	0	0	
	7		0	0	0	0	
% recovery		*E ₁ =71.8	*E ₂ =60.2	*E ₁ =73.3 *E ₂ =61.4	*E ₁ =88.6 *E ₂ =80.9	*E ₁ =86.8 *E ₂ =72.6	\bar{X} *E ₁ =82.9 \bar{X} *E ₂ =71.6

* = สารที่ทดสอบกับมันตรังสี

11. การเปรียบเทียบ Immunological properties ของสารที่สกัดได้จาก
น้ำเหลืองสัตว์ตั้งครรภ์กับสารละลายมาตรฐาน E₂

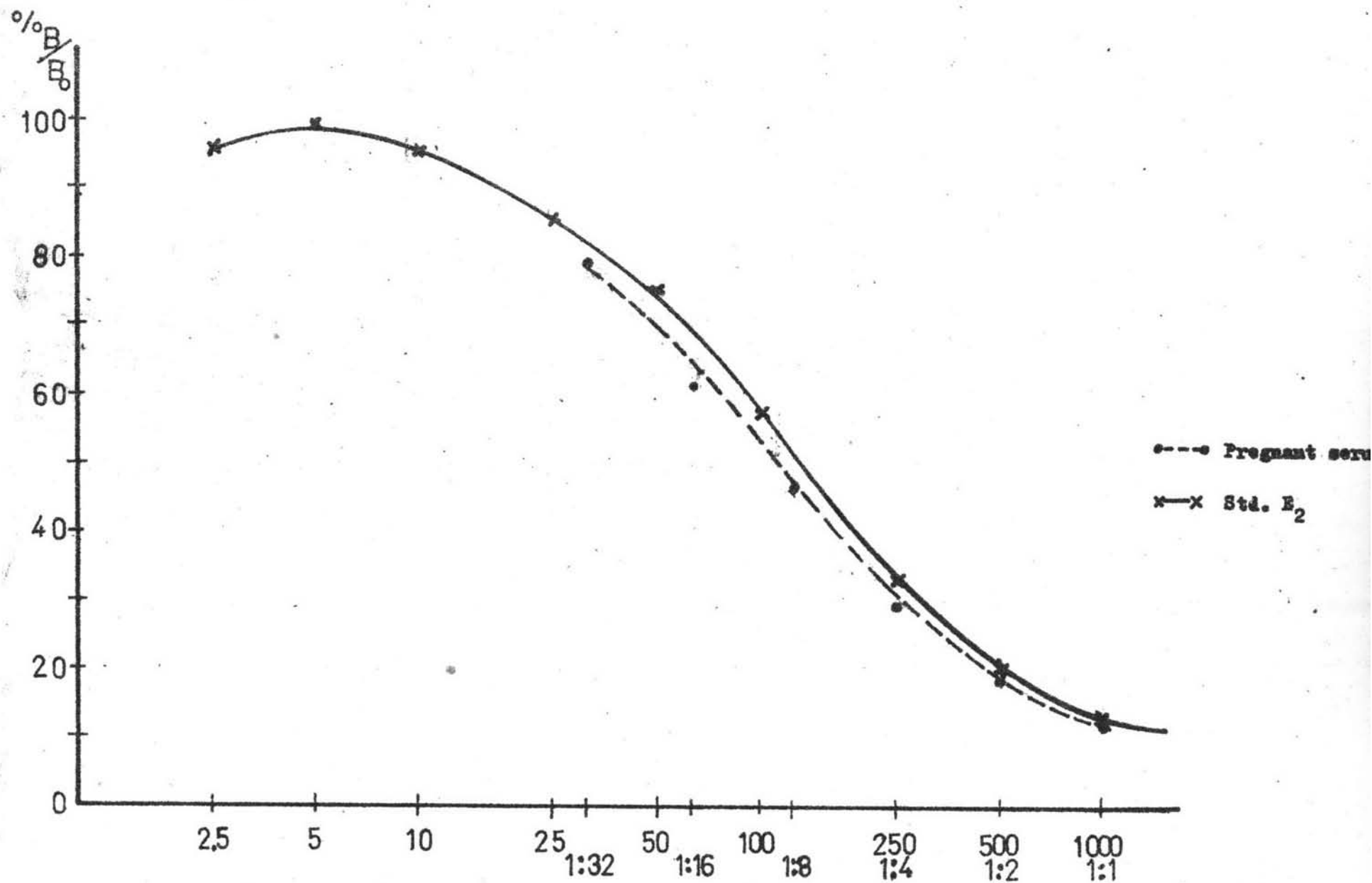
นำผลการทดลองตามข้อ 8. (หน้า 25)

นำผลที่ได้เขียนกราฟระหว่าง % B/B₀ กับความเข้มข้นของสารละลาย
มาตรฐาน E₂ หรือ dilution ของ E₂ ในน้ำเหลืองสัตว์ตั้งครรภ์ (รูปที่ 15 และ
16)

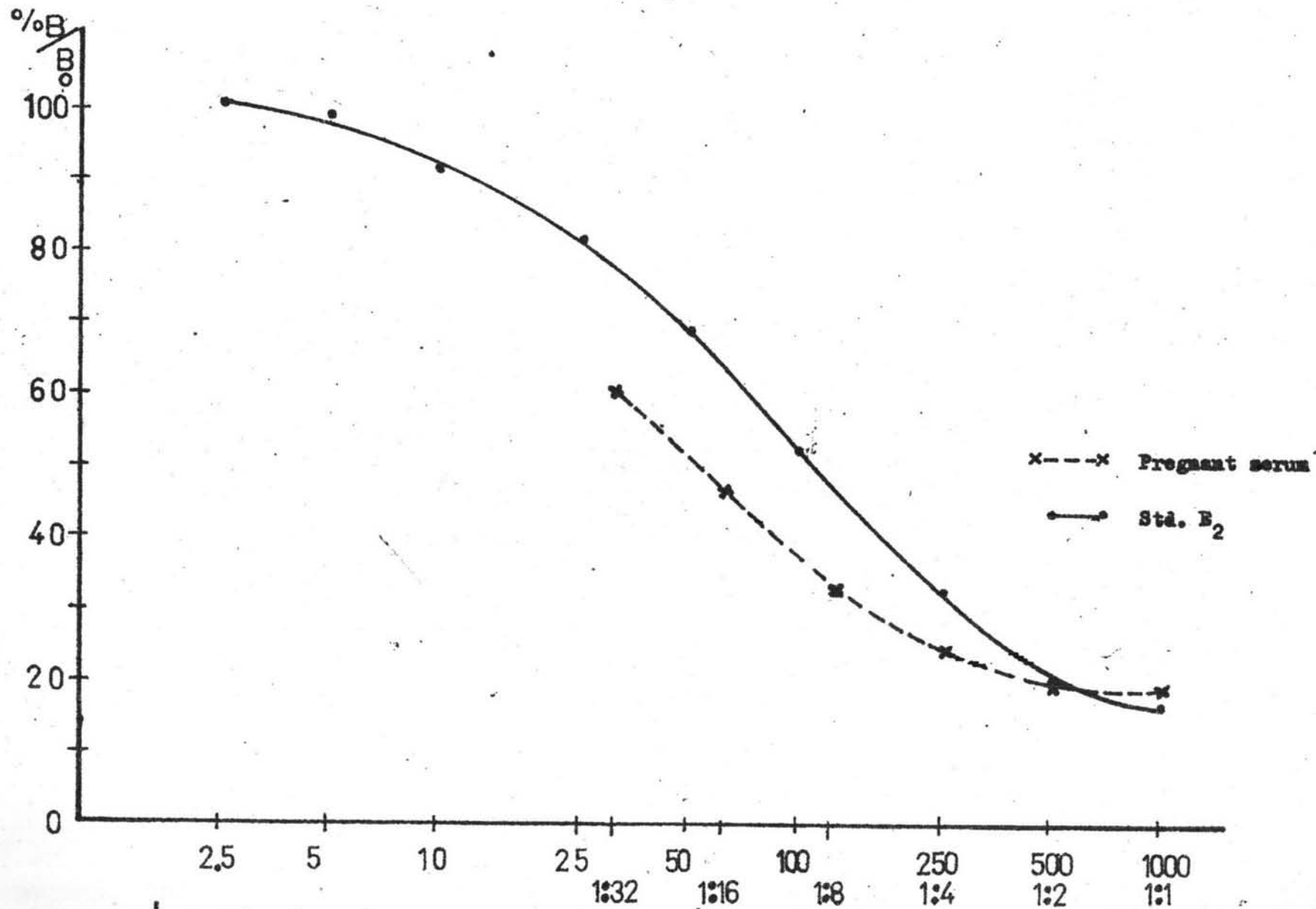
จากรูปที่ 15 ใช้น้ำเหลืองสัตว์ตั้งครรภ์ สกัด E₂ ด้วยอีเทอร์ แล้วทำให้
บริสุทธิ์ด้วย Celite column ก่อนวัดปริมาณ ทำ serial dilution แล้ววัด
ปริมาณเทียบกับสารละลายมาตรฐาน E₂ ปรากฏว่าสารละลายมาตรฐาน E₂ และ
สารในน้ำเหลืองมี immunological properties เหมือนกัน เส้นกราฟเกือบ
ขนานกันโดยตลอด คือ ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 250 พิโคกรัม เกือบจะไม่มี ความแตกต่าง
ในทางสถิติ แต่ที่มีความเข้มข้นต่ำจะเบนออกจากกราฟมาตรฐานเล็กน้อย ซึ่งถ้า
พิจารณาในทางสถิติจะไม่มีความแตกต่างตามนัยสำคัญ

จากรูปที่ 16 สกัดสารจากน้ำเหลืองของสัตว์ตั้งครรภ์ แล้ววัดปริมาณโดยไม่
ผ่าน chromatography เส้นกราฟที่ได้แยกห่างออกจากกันอย่างชัดเจน แต่จะเข้า
ใกล้กันที่จุดที่มีความเข้มข้นสูง 500 พิโคกรัมขึ้นไป แสดงให้เห็นชัดว่าสารที่สกัดได้
จากน้ำเหลือง เมื่อวัดปริมาณ E₂ โดยไม่ผ่าน chromatography ย่อมมีสารแปลก
ปลอม (contaminant) เข้าทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ถึงแม้แอนติบอดี (A⁰⁰¹²)
นี้ จะมีความจำเพาะสูงก็ตาม

การทดลองนี้เป็นข้อสนับสนุนว่า แอนติบอดีแม้ว่าจะมีความจำเพาะสูงเพียงใด
ก็ตาม แต่ก็ไม่มี ความจำเพาะสัมบูรณ์ (absolute specificity) ดังนั้นเพื่อให้
การวัด E₂ ได้จำเพาะ จึงต้องทำ chromatography ก่อนทำการวัดปริมาณ ใน
การวิจัยนี้ ใช้ Celite column ซึ่งให้ resolution ในการแยกสูงตามการทดลอง
10 (หน้า 48)



รูปที่ 15 แสดง **Immunochemical identity** ของสารที่สกัดจากซีรัมแฉวยาน **celum** เทียบกับสารละลาย
มาตรฐาน (Ab - E₂ ใช้ S - 52*5)



รูปที่ 16 เปรียบเทียบ Immunohemical identity ระหว่างสารละลายมาตรฐาน E₂ กับสารซึ่งสกัดได้จากน้ำเหลืองของสตรีมีครรภ์ (Ab - E₂ ใช้ A* 0012) ซึ่งไม่ผ่าน column chromatography

12. ความแม่นยำของการวัดปริมาณ E_2 ด้วยวิธี RIA

การวัดปริมาณของสารด้วยวิธีใด ๆ ก็ตาม จะเชื่อถือได้ต้องแสดงให้เห็นว่าวิธีนั้นมีความจำเพาะในสารวัด ความถูกต้อง และความแม่นยำในการวัด

การทดลอง เตรียม pool serum เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

12.1 ใช้ HFS จากข้อ 4.6 (หน้า 18) เรียกกลุ่มนี้ว่า pool A

12.2 เติมสารมาตรฐาน E_2 ลงใน HFS ให้มีความเข้มข้นของ E_2 100 พิโคกรัมต่อ 1 มล. เรียกว่า pool B

12.3 เติมสารมาตรฐาน E_2 ลงใน HFS ให้มีความเข้มข้นของ E_2 500 พิโคกรัมต่อ 1 มล. เรียกว่า pool C

ทำการวัดปริมาณ E_2 จากทั้ง 3 pool โดยวัด pool ละ 10 ตัวอย่างตามวิธีการวัดข้อ 7.2 (หน้า 23)

ผลการทดลอง (ตาราง 4 A, 4 B) แสดงให้เห็นว่าการวัดปริมาณ E_2 ในเวลาเดียวกันได้ผลใกล้เคียงกันมาก เมื่อค่าความเข้มข้นของ E_2 สูง คือ pool C ค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันมาก Coefficient of variation ($\frac{\text{mean}}{\text{SD}} \times 100$) ก็ใกล้เคียงกันด้วย (7.8 และ 9.5) ส่วนค่าของ pool B ค่าเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันประมาณ 30 และ Coefficient of variation (C.V.) ใกล้เคียงกัน คือ 15.6 และ 16.4 แสดงให้เห็นว่าวิธีการวัดมีความแม่นยำที่พอสมควร ค่า % Extraction recovery ซึ่งได้จากการเติม $^3\text{H} - E_2$ ลงในน้ำเหลือง ก่อนทำการสกัดด้วยอีเทอร์หา percentage recovery หลังจากผ่าน column แล้วได้ 57.8 - 77 ซึ่งเป็นช่วงที่ที่ยอมรับว่าเชื่อถือได้ pool A ในการหาปริมาณครั้งที่ 2 สามารถวัดได้ 33 พิโคกรัม/มล. อาจเนื่องจาก % Extraction recovery สูง ทำให้ sensitivity ในการวัดเพิ่มขึ้น (Abraham 1974) หรืออาจเนื่องมาจาก column blank

ซึ่งเกิดขึ้นในแต่ละครั้ง โดยปกติแล้ว column blank จะไม่เกิน 10 พิโคกรัม

เพื่อที่จะแสดงให้เห็นว่าวิธีการวัด E_2 โดย RIA มี reproducibility จะตองหาค่า Coefficient of variation ของการวัดต่างวัน (inter-assay) ในการหาค่า Coefficient of variation (C.V.) นี้ใช้สูตรดังนี้

$$C.V. = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}} \quad (\text{Abraham 1971 a})$$

n = จำนวนคู่ที่ใช้ในการวัดปริมาณ E_2

$$d = \left[\frac{\text{highest value of each duplicate} - 1}{\text{lowest value of same duplicate}} \right] \times 100$$

จากสูตรข้างต้น คำนวณค่า Coefficient of variation (ตาราง 4 C) ของการวัดต่างวัน (interassay) ได้เท่ากับ 17% ซึ่งไม่เกิน 20% ซึ่งอยู่ในขอบเขตที่ยอมรับ (Abraham 1974) แสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้มีความแม่นยำในการวัดคือพอเชื่อถือได้

ตารางที่ 4A ความแม่นยำในการวัดปริมาณ E_2 ในเวลาเดียวกัน (intraassay)

น้ำเหลืองตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	พิสัย (range) พิโคกรัม/มล.	ค่าเฉลี่ย \pm SD. พิโคกรัม/มล.	C.V. (%)	% extraction recovery ค่าเฉลี่ย \pm SD. (พิสัย)
pool A (hormone free serum)	10	-	12.0	-	69.4 \pm 2.12 (66.9 - 73.2)
pool B (pool A + 100 pg/ml)	10	97 - 165	137 \pm 22	16.4	67.0 \pm 1.79 (63.9 - 70.3)
pool C (pool A + 500 pg/ml)	10	435 - 591	495 \pm 47	9.5	66.7 \pm 4.59 (57.8 - 73.3)

ตารางที่ 4B ความแม่นยำในการวัดปริมาณ E_2 ในเวลาเดียวกันครั้งที่ 2

น้ำเหลืองตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	พิสัย (range) พิโคกรัม/มล.	ค่าเฉลี่ย \pm SD. พิโคกรัม/มล.	C.V. (%)	% extraction recovery ค่าเฉลี่ย \pm SD. (พิสัย)
pool A	10	13 - 65	33 \pm 16	48.4	71.5 \pm 5.1 (63.6 - 78.5)
pool B	10	79 - 131	106 \pm 16 *	15.6	67.3 \pm 4.67 (61.7 - 74.8)
pool C	10	432 - 560	496 \pm 38 *	7.8	70.5 \pm 3.45 (66.2 - 77)

* ค่าของ pool B และ pool C หักค่าของ pool A ออกแล้ว

ตารางที่ 40 แสดงการคำนวณหาค่า Percent difference

ปริมาณ E_2 ในวันแรก (พีโคกรัม/มล.)	ปริมาณ E_2 ในวันถัดมา (พีโคกรัม/มล.)	d = percent difference	d^2
96.58	79.2	21.95	481.8
135.57	110.6	22.58	509.85
105.89	90.0	17.66	311.87
143.37	123.1	16.47	271.26
164.69	131.1	25.63	656.89
163.23	126.6	28.94	837.52
140.30	99.9	40.44	1635.39
158.73	106.9	48.49	2351.28
137.75	98.8	39.43	1554.72
131.38	98.2	33.79	1141.76
516.48	483.7	6.78	45.97
590.95	432.5	36.64	1342.49
533.15	559.8	5.00	25.0
505.78	486.54	3.96	15.68
505.77	508.9	0.62	0.38
476.19	547.1	14.90	222.0
435.29	446.5	2.58	6.65
435.43	469.2	7.76	60.21
463.61	503.3	8.57	73.44
486.59	493.4	1.47	2.16
			Σd^2 11546.32

$$C.V. = \sqrt{\frac{11546.32}{2 \times 20}} = 17\%$$

13. ความถูกต้องในการวัดปริมาณ E_2 ด้วยวิธี RIA และการเปรียบเทียบผลของการใช้แอนติบอดี 2 ชนิด หาปริมาณ E_2

ได้กล่าวมาแล้วว่าความถูกต้องเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่จะแสดงให้เห็นว่าวิธีการที่ใช้เชื่อถือได้

13.1 ในการทดลองเพื่อแสดงว่าวิธีการนี้มีความถูกต้อง ทำได้ดังนี้

13.1.1 ใช้น้ำเหลืองของผู้ชาย

13.1.2 เติมสารละลายมาตรฐาน E_2 ลงในน้ำเหลืองของผู้ชายให้มีความเข้มข้นของ E_2 เท่ากับ 50, 100, 250, 500 และ 1000 พิโคกรัม/มล.

13.1.3 กำหนดการหาปริมาณ E_2 ตามข้อ 7.2 (หน้า 23)

ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 5

จากผลการทดลองน้ำเหลืองของผู้ชายมีค่าเท่ากับ 27 พิโคกรัม/มล. นั่นคือวิธีนี้สามารถวัดได้น้อยกว่า 10 พิโคกรัม ค่า C.V. ที่ได้เท่ากับ 12.8% ซึ่งเกิน 10 ไม่นัก แต่ก็ยังพอเชื่อถือได้ ถ้าต้องการความถูกต้องมากขึ้น ควรใช้น้ำเหลืองมากกว่า 1 มล. ขึ้นไป มาสกัดหาปริมาณ E_2 ดังนั้นปริมาตรน้ำเหลืองที่ใช้ในการสกัด จึงขึ้นกับปริมาณของ E_2 ที่มีอยู่ในน้ำเหลือง เมื่อเติมปริมาณ E_2 ลงไปในน้ำเหลือง 50 พิโคกรัม/มล. อ่านค่าได้ 72 พิโคกรัม/มล. ค่าที่ถูกต้องเท่ากับ 27 + 50 (77 พิโคกรัม/มล.) ค่า % recovery 88.9 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการวัดโดยวิธี RIA นี้ให้ความถูกต้องดี ทานองเดียวกันเมื่อเติมปริมาณ E_2 เพิ่มขึ้น % recovery อยู่ในช่วงระหว่าง 74.6 - 94.4 ค่าเฉลี่ย % recovery 84.8 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื่อถือได้ ดังนั้น RIA จึงเป็นวิธีที่มีความไวในการวัดเมื่อเทียบกับวิธีทางเคมีอื่น ๆ คือสามารถวัดได้ถึงพิโคกรัม และใช้ปริมาตรน้ำเหลืองน้อยเพียง 1 มล. เท่านั้น

13.2 ในการทดลองทำนองเดียวกัน แต่ใช้ฮีเทอรัสกันน้ำเหลืองจาก
 รางคน แล้วทำให้แห้ง ละลาย buffer นำไปวัด E_2 โดยไม่ผ่าน column
 chromatography แล้วใช้แอนติบอดีชนิด A[#] 0012 ซึ่งมีความจำเพาะสูงกว่า
 S - 52[#] 5 เป็น specific binding protein ผลการทดลอง (ตารางที่ 6)
 ค่า E_2 ในน้ำเหลืองผู้ชายวัดโดยวิธีนี้มีค่าสูงถึง 99 พิโคกรัมต่อ 1 มล. ในขณะที่ E_2
 ในน้ำเหลืองผู้ชายนี้วัดภายหลังทำ celite chromatography แล้วได้ค่า 27
 พิโคกรัมต่อ 1 มล. นั่นคือแอนติบอดีแม้จะมีความจำเพาะสูงเพียงใดก็ตาม ก็ยัง
 จำเป็นต้องทำ chromatography ก่อนวัด การทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลอง
 ที่ 11 (รูปที่ 16 หน้า 52) ถ้าวัดปริมาณ E_2 โดยไม่ผ่าน column ก่อน จะมีสาร
 แปลกปลอมรวมทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีด้วย ทำให้ค่าที่วัดได้มากกว่าความเป็นจริง
 การวัดโดยไม่ผ่าน column นี้ได้ค่า % recovery อยู่ในช่วงระหว่าง 80.2 -
 92.7 ค่าเฉลี่ย 83.8% ซึ่งไม่สูงกว่าค่า % recovery ที่ได้จากการวัดหลังทำ
 chromatography แต่วิธีหลังค่า % recovery อยู่ในช่วงใกล้เคียงกันกว่า
 วิธีแรก อาจเป็นเพราะว่าผ่านขั้นตอนในการวัดปริมาณน้อยกว่า แต่ถึงอย่างไรก็ดี
 การหาปริมาณแบบวิธีแรกให้ค่าถูกต้องกว่า และค่า % recovery ก็ไม่แตกต่างจาก
 วิธีหลังตามหลักสถิติ

ในการหาปริมาณ E_2 แต่ละครั้ง จะวัดปริมาณ pool serum (การ-
 ทดลอง 12 หน้า 53) เข็มทุกครั้ง และค่า pool ที่วัดได้จะอยู่ในช่วง 95%
 confidence limit ด้วย จึงจะยอมรับว่าการวัดนั้นเชื่อถือได้

ตารางที่ 5 วัคปริมาณ E_2 หลังจากผ่าน Celite column

ปริมาณ E_2 ที่เติม (พิโคกรัม/มล.)	ปริมาณ E_2 ที่วัคได้ (พิโคกรัม/มล.)	ค่าเฉลี่ย (พิโคกรัม/มล.)	S.D.	C.V. (%)	% recovery
น้ำเหลืองของผู้ชาย	25	27	.3	12.8	
	30				
	66				
+ 50	74	72	5	7.3	88.9
	76				
	107				
+100	103	112	12	10.9	84.4
	126				
	216				
+250	223	232	22	9.6	81.9
	258				
	374				
+500	412	400	23	5.7	74.6
	415				
	961				
+1000	937	971	40	4.1	94.4
	1016				
					ค่าเฉลี่ย 84.8

ตารางที่ 6 วัดปริมาณ E_2 โดยไม่ผ่าน Celite column

ปริมาณ E_2 ที่เติม (พิโคกรัม/มล.)	ปริมาณ E_2 ที่วัดได้ (พิโคกรัม/มล.)	ค่าเฉลี่ย (พิโคกรัม/มล.)	S.D.	C.V. (%)	% recovery
นำเหลืองของ ผู้ชาย	95				
	103	99	4	4	-
	99				
+ 50	128				
	139	139	11	7.9	80.2
	150				
+100	168				
	187	179	10	5.7	80.8
	184				
+250	295				
	286	306	28	9.1	83.0
	338				
+500	492				
	496	509	27	5.3	82.2
	541				
+1000	1022				
	990	1026	39	3.8	92.7
	1067				ค่าเฉลี่ย 83.8

pool A = 2.5 พิโคกรัม

pool C = 424 ± 45 พิโคกรัม/มล. (CV = 10.7%)

pool B = 89 ± 14 พิโคกรัม/มล. (CV = 16.1%) n = 5

n = 5

14. ผลการวัดปริมาณ E_2 ในน้ำเหลืองสตรีไทยปกติ

ระดับฮอร์โมนจากการเก็บตัวอย่าง ข้อ 3.1 (หน้า 16) นี้ ไม่อาจนำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงรูปลักษณะ (pattern) ของ E_2 เพราะว่าการเจาะเลือดในระยะกลางรอบเดือนน้อยครั้งเกินไป ระดับ E_2 สูงขึ้นเป็น peak แรกกลางรอบเดือน และยังไม่ได้ลดลงให้เห็นไค้ชัด จึงข้ามไปเจาะเลือดในระยะ luteal phase ทำให้ระดับ E_2 ที่ได้ไม่ปรากฏเป็น 2 peak ดังนั้น เพื่อที่จะแสดงให้เห็นลักษณะของ E_2 ปรากฏเป็น 2 peak จึงเจาะเลือดจากอาสาสมัครอีก 6 คน (ข้อ 3.2 หน้า 16) จากผลนี้สามารถแสดงรูปลักษณะการเปลี่ยนแปลงระดับ E_2 (รูป 17 - 22 หน้า 64)

อย่างไรก็ดี การเจาะเลือดจากอาสาสมัครตามข้อ 3.1 (หน้า 16) นี้ ให้ผลดีแก่อาสาสมัคร คือ การเจาะเลือดไม่มากกว่า 10 ตัวอย่าง ในขณะที่การเจาะเลือดอาสาสมัครตามข้อ 3.2 (หน้า 16) ต้องเจาะเลือดทุกวันในช่วงกลางรอบเดือน และเจาะเลือดวันเว้นวันใน luteal phase ซึ่งรวมแล้วไม่ต่ำกว่า 14 ตัวอย่าง

การหาระดับฮอร์โมนจากอาสาสมัครข้อ 3.1 (หน้า 16) เป็นผลงานส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยร่วมระหว่าง WHO กับแผนกสูติศาสตร์ - นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ภาคผนวกรูปที่ 23 หน้า 97) จากรูปที่ 23 นี้ แสดงให้เห็นว่าระดับโปรเจสเตอโรนเริ่มสูงขึ้นในวันที่ 15 ของรอบเดือน และมีระดับเพิ่มสูงมากในวันที่ 22 และ 24 ของรอบเดือน ส่วนระดับ E_2 จะเริ่มสูงขึ้นในวันที่ 13 ของรอบเดือน peak แรกจะมีค่ามากกว่า 150 พิโคกรัม/มล. และระดับ E_2 ในวันที่ 22 และ 24 ของรอบเดือนจะมีค่าประมาณ 150 พิโคกรัม/มล. จากการทดลองนี้พบว่า ระดับ E_2 200 พิโคกรัม/มล. ขึ้นไป สามารถกระตุ้นให้หลัง LH เพิ่มสูงขึ้นเป็น peak กลางรอบเดือนได้ จากรูป 23 หน้า 97 นี้ E_2 peak แรกจะขึ้นก่อน LH peak 1 - 2 วัน หรือขึ้นพร้อมกับ LH peak และโปรเจสเตอโรนจะเริ่มสูงขึ้นหลังจาก peak แรกของ E_2

ระดับ E_2 ในอาสาสมัครอีก 6 คน (ข้อ 3.2 หน้า 16) พบว่าระดับ E_2 ในช่วงแรก ๆ ของรอบเดือนมีค่าระหว่าง 25 - 226 พิโคกรัม/มล. ค่าเฉลี่ย 87 พิโคกรัม/มล.

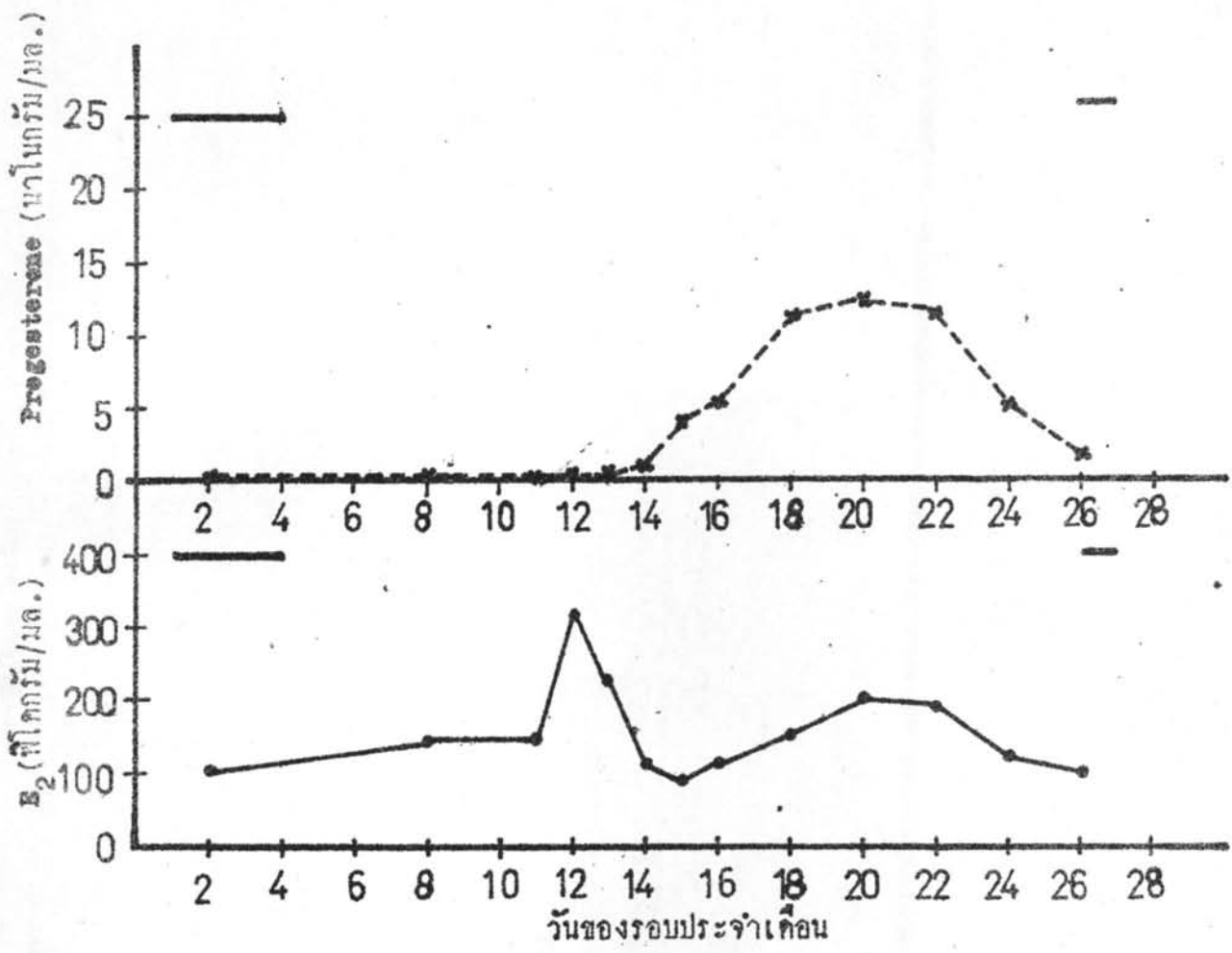
และจะเพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 12 - 15 ของรอบเดือน ระดับ E_2 จะสูงขึ้นเป็น peak แรก ซึ่งมีค่าระหว่าง 177 - 552 พิโคกรัม/มล. ค่าเฉลี่ย 431 พิโคกรัม/มล. จากนั้นจะลดลง และสูงขึ้นอีกในวันที่ 20 - 24 ของรอบเดือน มีค่าระหว่าง 77 - 326 พิโคกรัม/มล. ค่าเฉลี่ย 254 พิโคกรัม/มล. ค่า E_2 ใน peak หลังจะต่ำกว่า peak แรก อาสาสมัครทุกคนมีระดับโปรเจสเทอโรนมากกว่า 5 แนนโนกรัม/มล. ซึ่งแสดงว่ามีรอบเดือนปกติ (Abraham 1972) แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ไม่มีการวัดระดับ LH เทียบ เพราะว่ามีบุคคลลากรทำการวัดปริมาณ

ตารางที่ 7 (หน้า 63) แสดงให้เห็นว่า แต่ละวิธีมีเทคนิคในการวัดไม่เหมือนกัน ค่าที่ได้ย่อมแตกต่างกัน แม้แต่วิธีการเดียวกัน ทำต่างสถาบัน ค่าที่ได้ยังไม่เท่ากันเลย นั่นคือค่า E_2 ที่วัดได้ แต่ละแห่งจะเปรียบเทียบกันไม่ได้ แต่ถึงอย่างไรก็ดี รูปลักษณะการเปลี่ยนแปลงของระดับ E_2 จะมีลักษณะเหมือนกัน

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบ E_2 ในน้ำเหลืองของสตรีที่มีรอบเดือนปกติ

ช่วงเวลาของ รอบเดือน	ค่าเฉลี่ย E_2 (พิโคกรัม/มล.)	วิธีการวัด	บรรณานุกรม
Follicular phase	63	CPB	Corker & Exley (1970)
	62	CPB	Mayes & Nugent (1970)
	64	DID	Baird (1968)
	96	RIA	Abraham (1969)
	50	RIA	Abraham et al. (1972)
	87	RIA	การวิจัยนี้
Midcycle peak	260	Fluorometry	Ichii et al. (1963)
	513	RIA	Mikhail et al. (1970)
	250	RIA	Abraham et al. (1972)
	332	CPB	Corker & Exley (1970)
	380	CPB	Korenman et al. (1973)
	431	RIA	การวิจัยนี้
Luteal phase	196	DID	Baird (1968)
	143	CPB	Corker & Exley (1970)
	220	CPB	Mayes & Nugent (1970)
	137	CPB	Korenman et al. (1969)
	130	CPB	Korenman et al. (1973)
	470	CPB	Shutt (1969)
	224	RIA	Abraham (1969)
	120	RIA	Abraham et al. (1972)
254	RIA	การวิจัยนี้	

CPB = Competitive Protein Binding. DID = Double Isotope Dilution

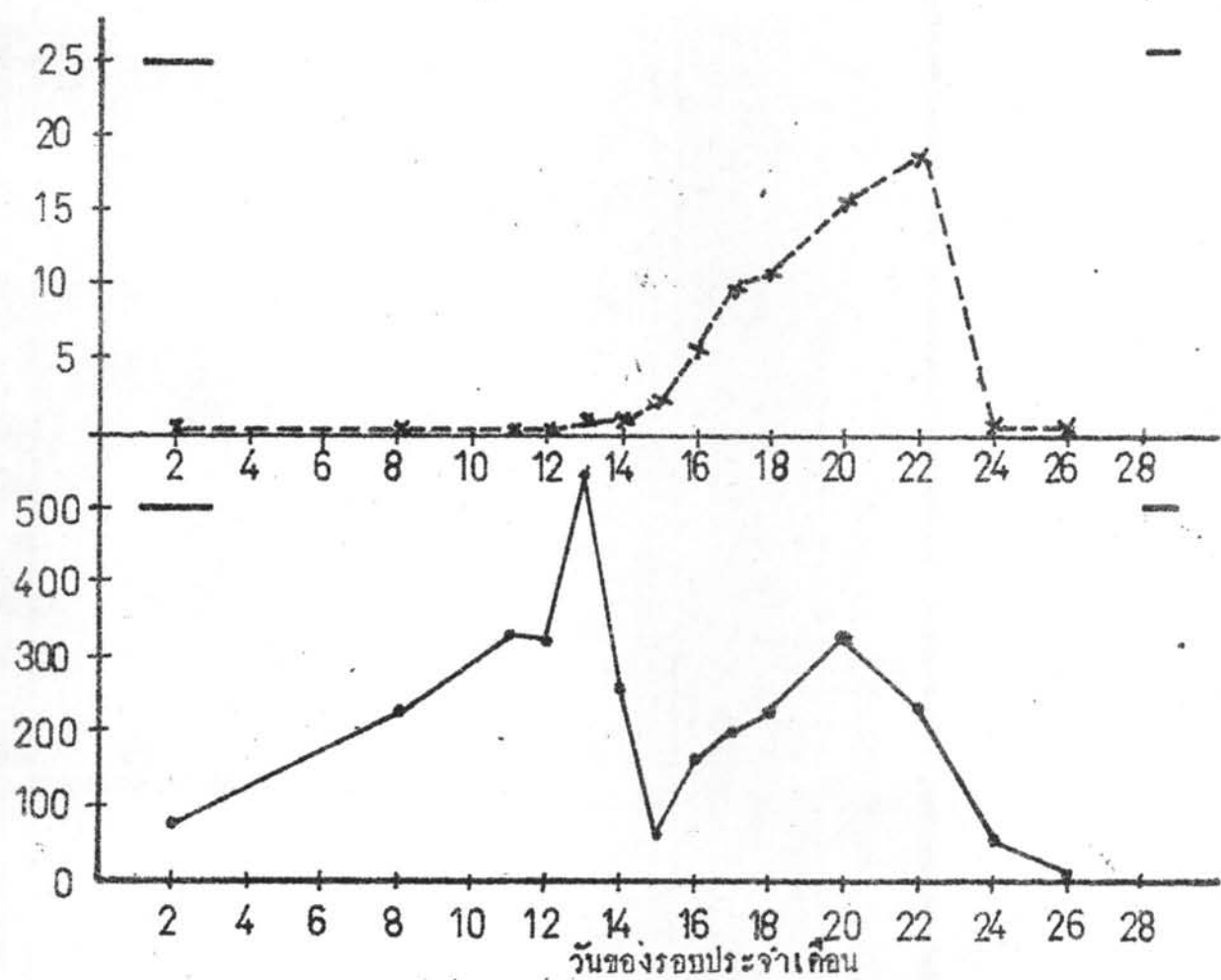


รูปที่ 17 ระดับโปรเจสเตอโรนและเอสตราไดโอด ในน้ำเหลืองของอาสาสมัคร รายที่ 1 (อายุ 26 ปี)

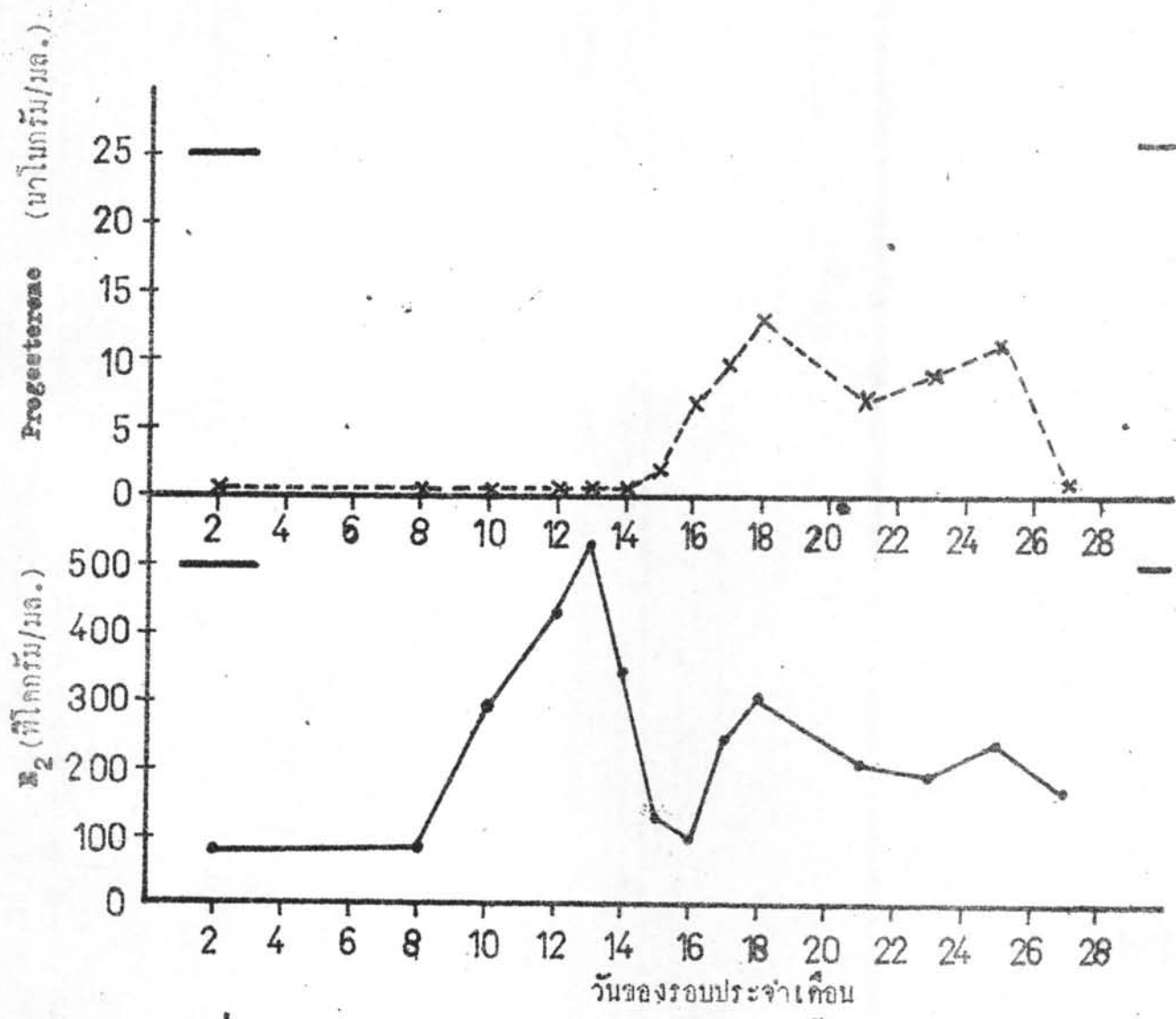
— วันที่มีระดู

Progesterone (นาโนกรัม/มล.)

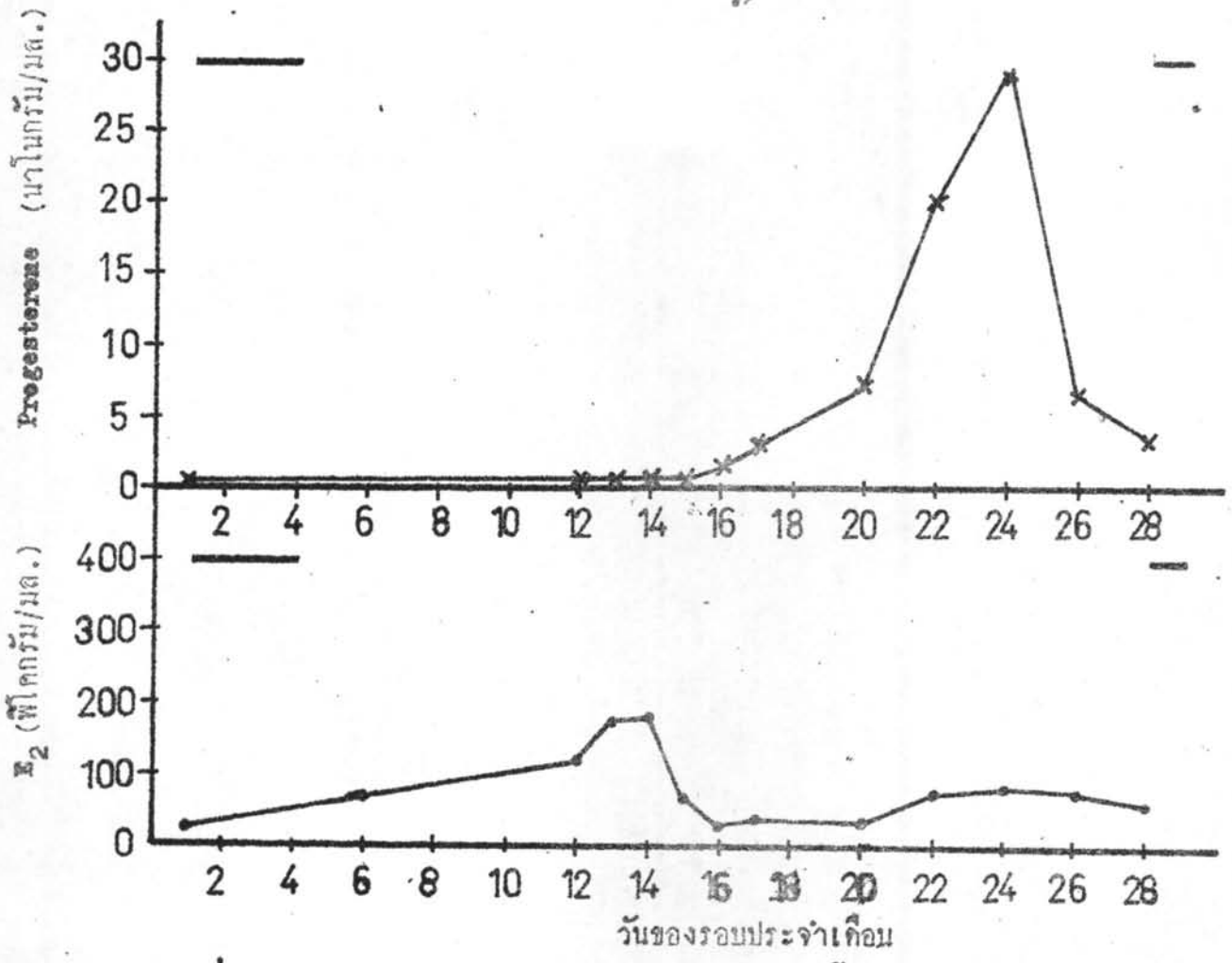
H_2 (พีโคกรัม/มล.)



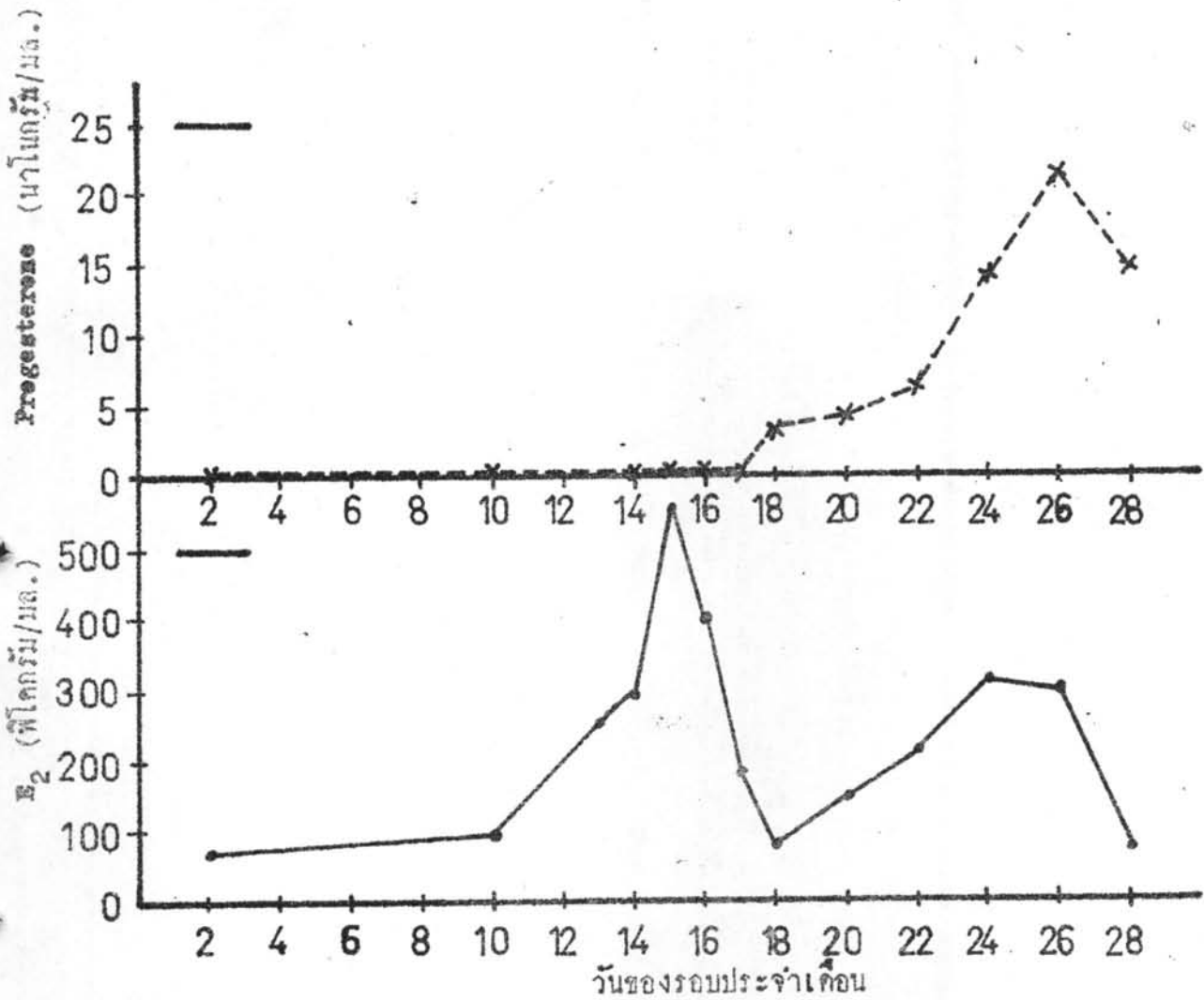
รูปที่ 18 ระดับโปรเจสเตอโรนและเฮสดราโคฮอลในซีรัมของอาสาสมัครรายที่ 2 (อายุ 16 ปี)



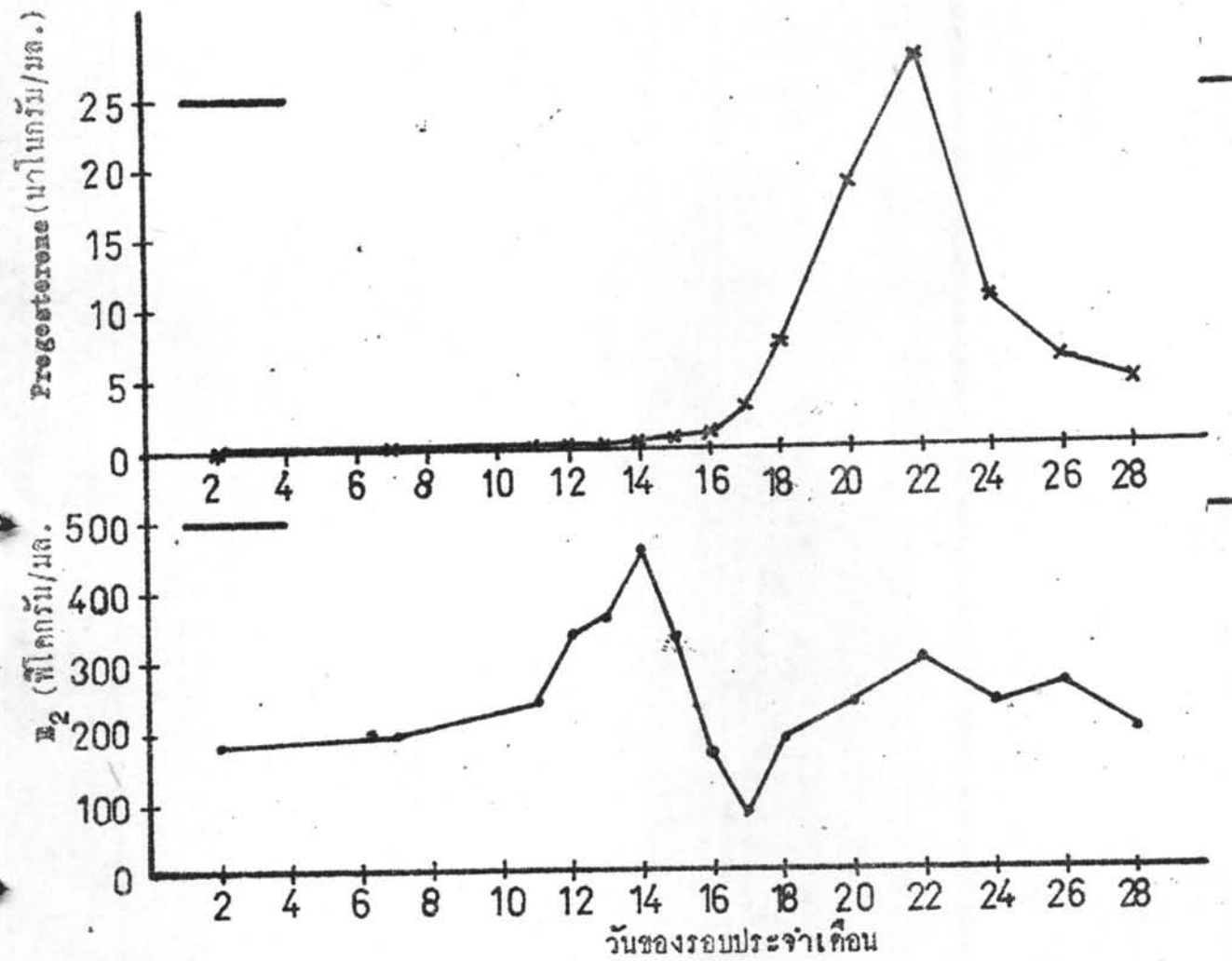
รูปที่ 19 ระดับโปรเจสเตอโรนและเอสตราไดออลในน้ำเหลืองของอาสาสมัครรายที่ 3 (อายุ 32 ปี)



รูปที่ 20 ระดับโปรเจสเตอโรนและเอสตราไดโอสในน้ำเหลืองของอาสาสมัครรายที่ 4 (อายุ 25 ปี)



รูปที่ 21 ระดับโปรเจสเตอโรนและเอสตราไดโอดในน้ำเหลืองของอาสาสมัครรายที่ 5 (อายุ 20 ปี)



รูปที่ 22 ระดับโปรเจสเตอโรนและเอสตราไดโอดลในน้ำเหลืองของอาสาสมัครรายที่ 6 (อายุ 30 ปี)