

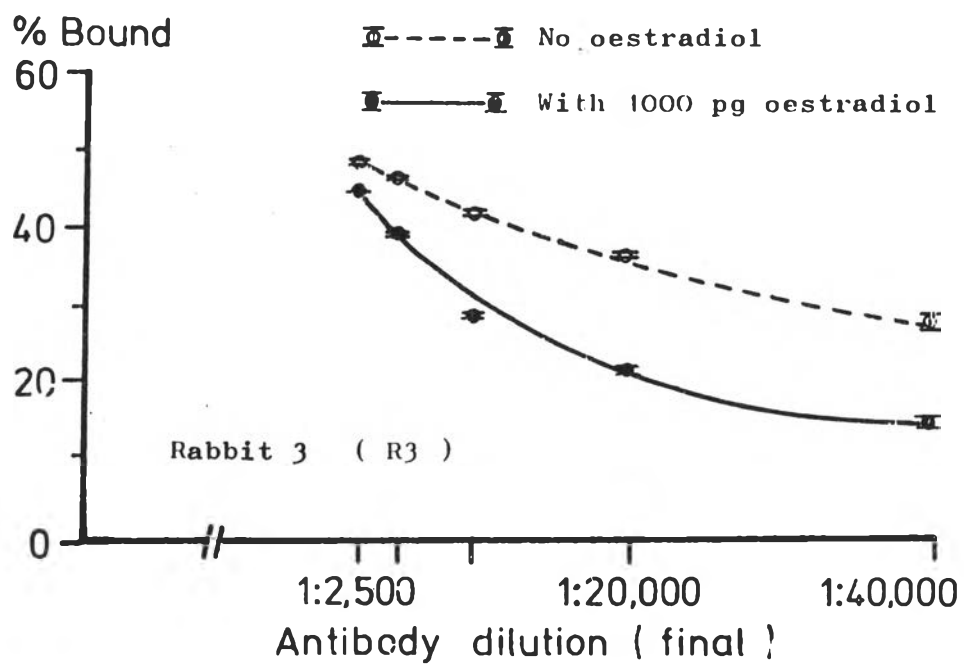
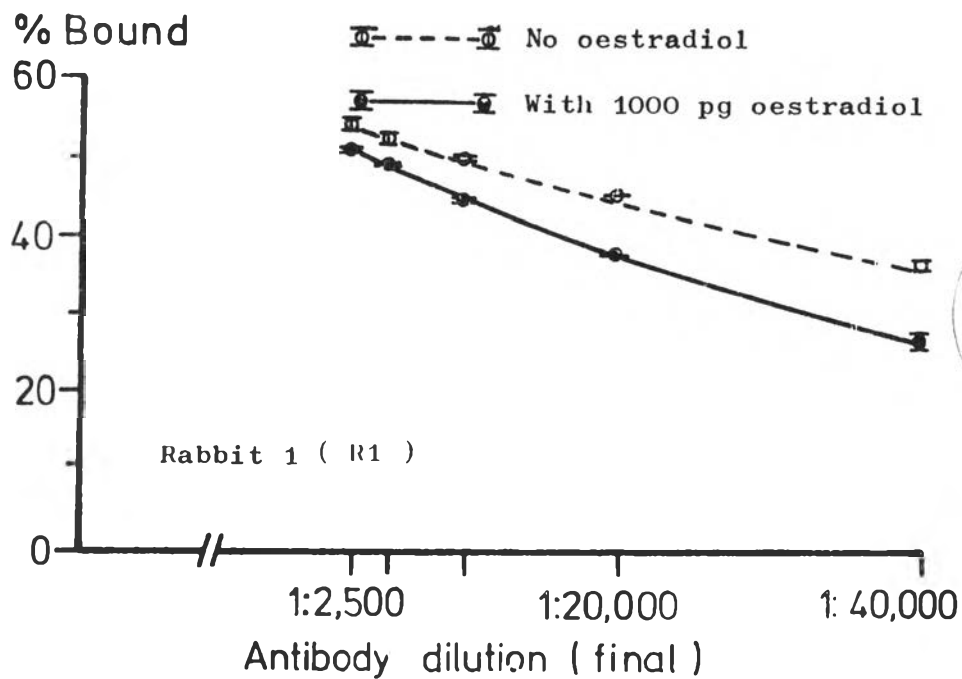
ผลการทดลอง

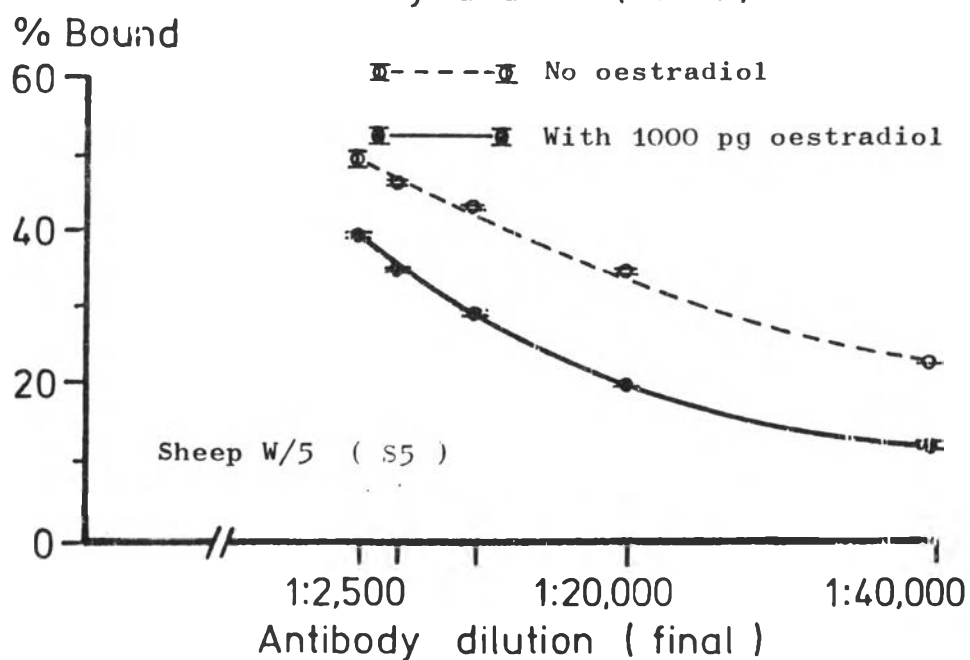
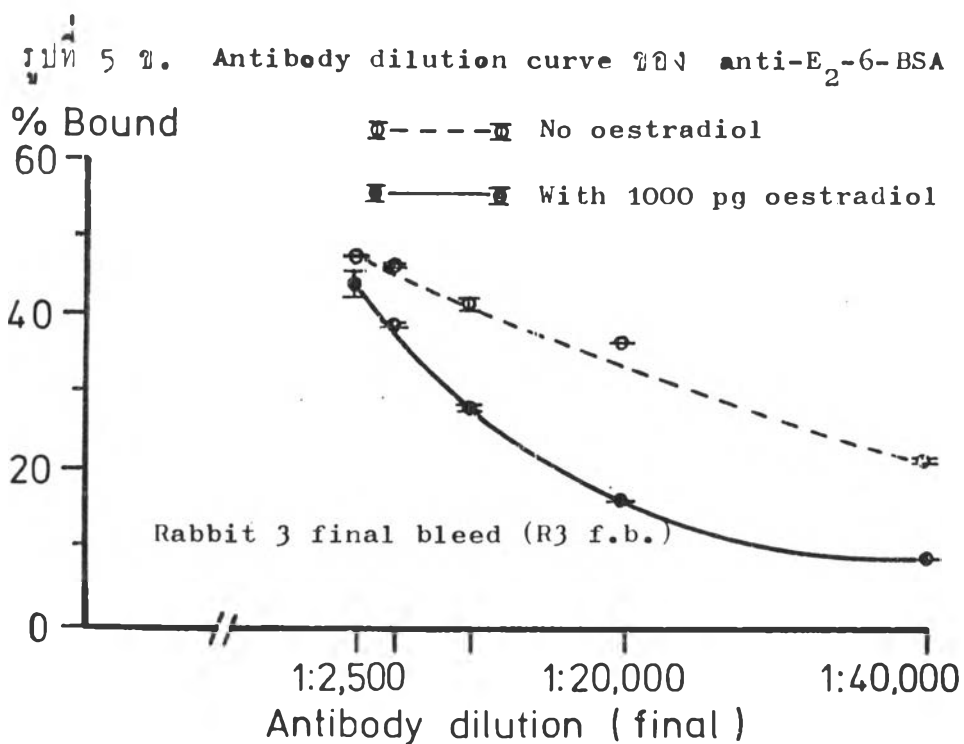
4.1 การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติแอนติบอดี

แอนติบอดีที่ใช้ศึกษาในรายงานนี้ได้มาจาก Tenovus Institute โดยการฉีด  $\text{S}_2-6-35\text{A}$  เข้าในกระต่ายทดลอง 2 ตัว และแกะ 1 ตัว แอนติบอดีที่ได้มี 4 ชุด และมีรหัส S1, S3, R3 f.b. และ S5 ตามลำดับ

จากการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติแอนติบอดีโดยการทำ antibody dilution curve ตามวิธีในข้อ 3.5 หน้า 19 เพื่อเลือกแอนติบอดีที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการวัดปริมาณเอสตราไดโอดอล พบว่าปฏิกิริยาการรวมตัวของสารติดฉลากกับแอนติบอดี (% bound) แต่ละชุดจะแตกต่างกัน (รูปที่ 5 ก. และ 5 ข.) และการแทนที่ด้วยสารมาตรฐาน 1,000 พิโคกรัมก็แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อคำนวณ % ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกิริยารวมตัว (ตารางที่ 5) พบว่า แอนติบอดีแต่ละชุดจะให้ค่า % ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวเมื่อใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีต่างกัน และแอนติบอดี R3 f.b. ให้ค่า % ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวมากกว่าแอนติบอดีชุดอื่น คือ 57% ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดีเป็น 1 : 20,000 นอกจากนี้ค่า nonspecific binding ในสถานะที่เื้อสำหรับการทดลองนี้ มีค่าประมาณ 10% และในการทดลองต่อไป ผู้ทดลองได้เลือกใช้แต่แอนติบอดี R3 f.b. เท่านั้น

Fig 5 n. Antibody dilution curve for anti-E<sub>2</sub>-6-BSA





#### Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1% gelatin	200 $\mu$ l
buffer or standard oestradiol	100 $\mu$ l
antibody	100 $\mu$ l
E <sub>2</sub> -6- <sup>125</sup> I (10,000 cpm)	100 $\mu$ l

incubated for 20 hours at 4°C

charcoal 10 mg/tube in 0.2 cm<sup>3</sup> 0.1% dextran T 70 assay buffer

ตารางที่ 5 ผลเปรียบเทียบคุณสมบัติในการรวมตัวกับสารติดฉลากของแอนติบอดีจากสัตว์ทดลอง

แอนติบอดี	nonspecific binding	แอนติบอดี (ความเข้มข้นสุดท้าย)	ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัว (%)**
Rabbit 1 (R1)	9.1	1:40,000	32
Rabbit 3 (R3)	9.9	1:20,000	41
Rabbit 3 final bleed (R3 f.b.)	9.7	1:20,000	37
Sheep W/5 (S5)	8.9	1:20,000	43

\* ผลการคำนวณจากรูปที่ 5 ก. และ 5 ข.

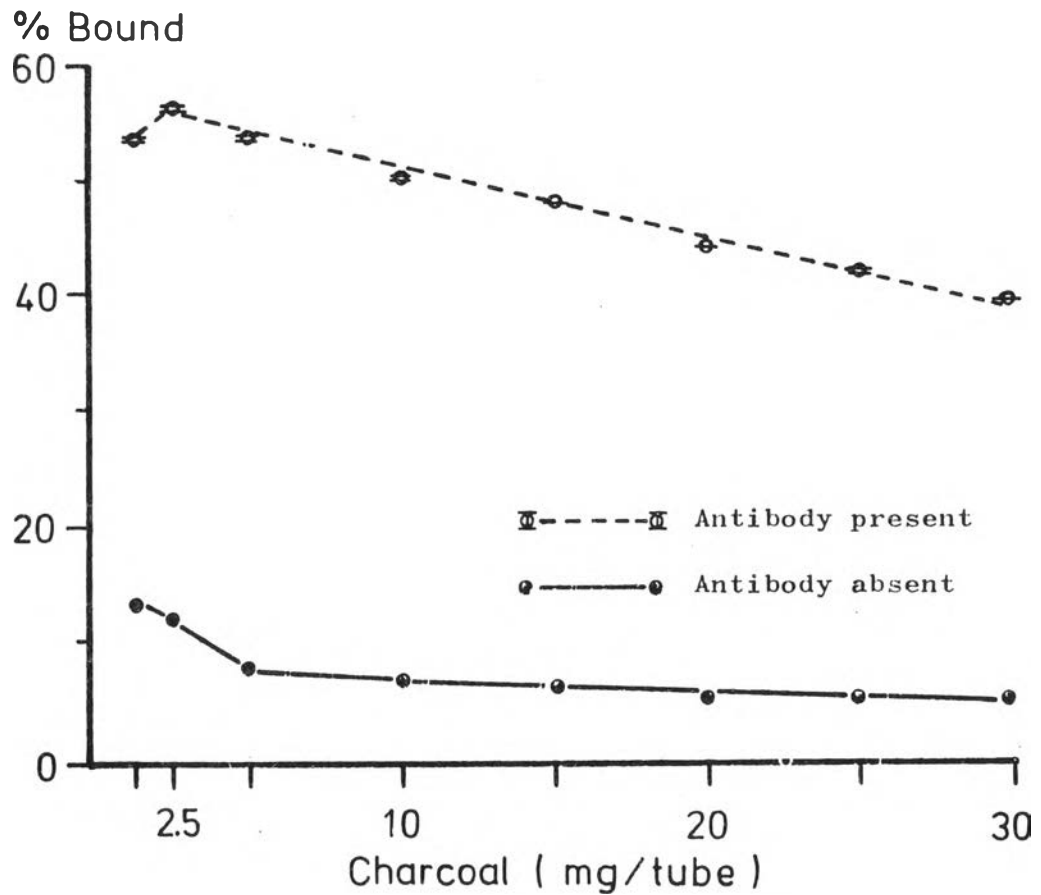
\*\*% ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัว

$$= \frac{\text{ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกิริยาการรวมตัวที่ 0 และ 1,000 พิโคกรัม}}{\text{ปฏิกิริยาการรวมตัวที่ 0 พิโคกรัม}} \times 100$$

#### 4.2 การหาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมสำหรับแยกออร์โมนรูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดี

การทดลองนี้ดัดแปลงจากวิธีการของ Zinoux กับ Odell (1973) โดยทดลองกับสารติดฉลากที่หาใหม่บริสุทธิ์ควยทินเลเซอร์โครมาโทกราฟี 10,000 cpm และแยกเอสเตอร์ไอโซครูปอิสระออกโดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณผงถ่านตั้งแต่ 1.25 - 3.0 มก. จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 6 พบว่า ถ้าเพิ่มปริมาณผงถ่านตั้งแต่ 5 มก. ขึ้นไป nonspecific binding จะมีค่าต่ำกว่า 10% แต่ปฏิกิริยาการรวมตัว (B<sub>0</sub>) จะลดลงเล็กน้อยเมื่อปริมาณผงถ่าน

รูปที่ 6 อิทธิพลของปริมาณผงถ่านต่อการดูดซับสารติดฉลาก ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย  
 หินเลเยอร์โครมาโตกราฟี



Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1% gelatin	300 $\mu$ l
buffer or antibody R3 f.b. (final dilution 1:2,500)	100 $\mu$ l
$E_2$ -6- $^{125}$ I (10,000 cpm)	100 $\mu$ l

incubated for 20 hours at 4°C

charcoal in 0.2 cm<sup>3</sup> 0.1% dextran T 70 assay buffer

เพิ่มขึ้น ในการทดลองต่อ ๆ ไป ผู้ทดลองได้เลือกใช้ปริมาณผงถ่าน 10 มก. ในการดูดซับเฮสเตราไลซอดรูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดี

#### 4.3 การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารกีดขวาง

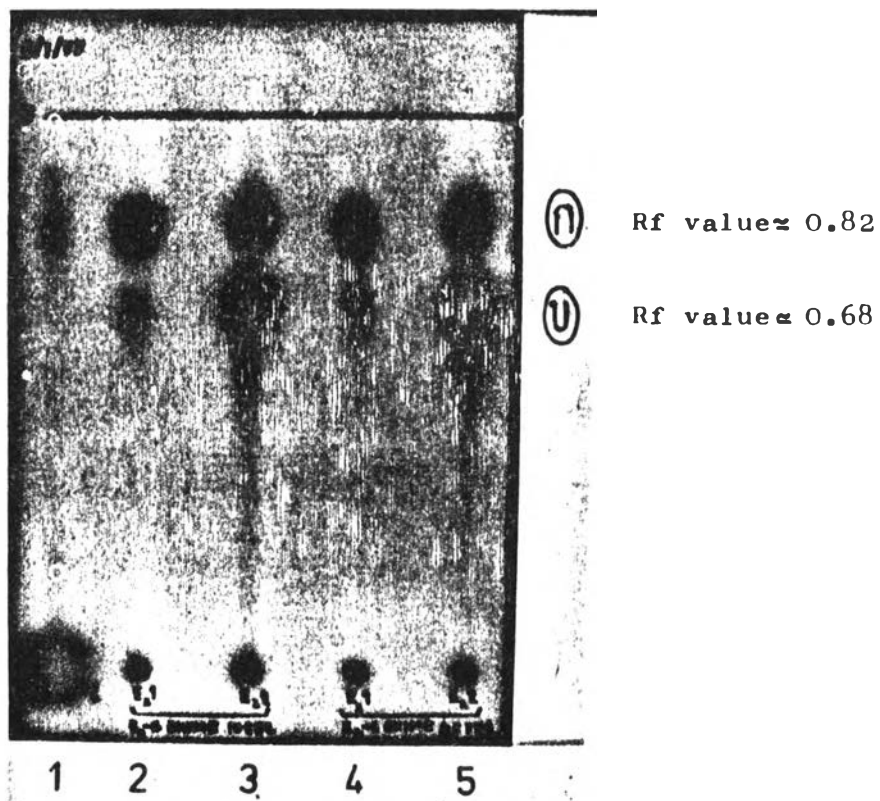
เมื่อนำสารกีดขวางที่เตรียมไว้ตามวิธีในข้อ 3.6 หน้า 20 ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีที่เห็นละเอียดโรมาโทกราฟี สารกีดขวางจะปรากฏบนภาชนะจากโรมาโทแกรมเป็น 2 ส่วน คือ ส่วน ก. มีค่า  $R_F$  ประมาณ 0.82 และส่วน ข. มีค่า  $R_F$  ประมาณ 0.68 (รูปที่ 7ก) และโรมาโทแกรมที่ไล่จะไม่แตกต่างกัน เมื่อกีดขวางอีสเตราไมนควายโซเดียมไอโอดีน-125 เป็นเวลา 10 หรือ 45 วินาที

เมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาการรวมตัวของแอนติบอดี R3 f.b. กับสารกีดขวางทั้ง 2 ส่วน โดยใช้ปริมาณสารกีดขวางประมาณ 10,000 cpm ทำปฏิกิริยากับควายโซเดียมไอโอดีนที่ตั้งแต่ 1:10,000 - 1:320,000 ปรากฏว่าสารกีดขวางส่วน ข. มีปฏิกิริยารวมตัวกับแอนติบอดีสูงกว่า และให้ค่า nonspecific binding ต่ำกว่าส่วน ก. นอกจากนี้สารกีดขวางส่วน ข. ยังมี ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวมากกว่าสารกีดขวางส่วน ก. อีกด้วย (รูปที่ 7 ข. และตารางที่ 6) ในการทดลองต่อไปจึงใช้แต่สารกีดขวางส่วน ข. อย่างเดียว

ตารางที่ 6 ผลเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารกีดขวางในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี R3 f.b.

สารกีดขวาง	%bound			แอนติบอดี (ความเข้มข้นสุดท้าย)	ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัว (%)*
	nonspecific binding	$E_2$ มาตรฐาน 0 พิโคกรัม	$E_2$ มาตรฐาน 1,000 พิโคกรัม		
ก	9.0	46.8	35.9	1:20,000	27.6
ข	6.7	51	31.1	1:80,000	39.0

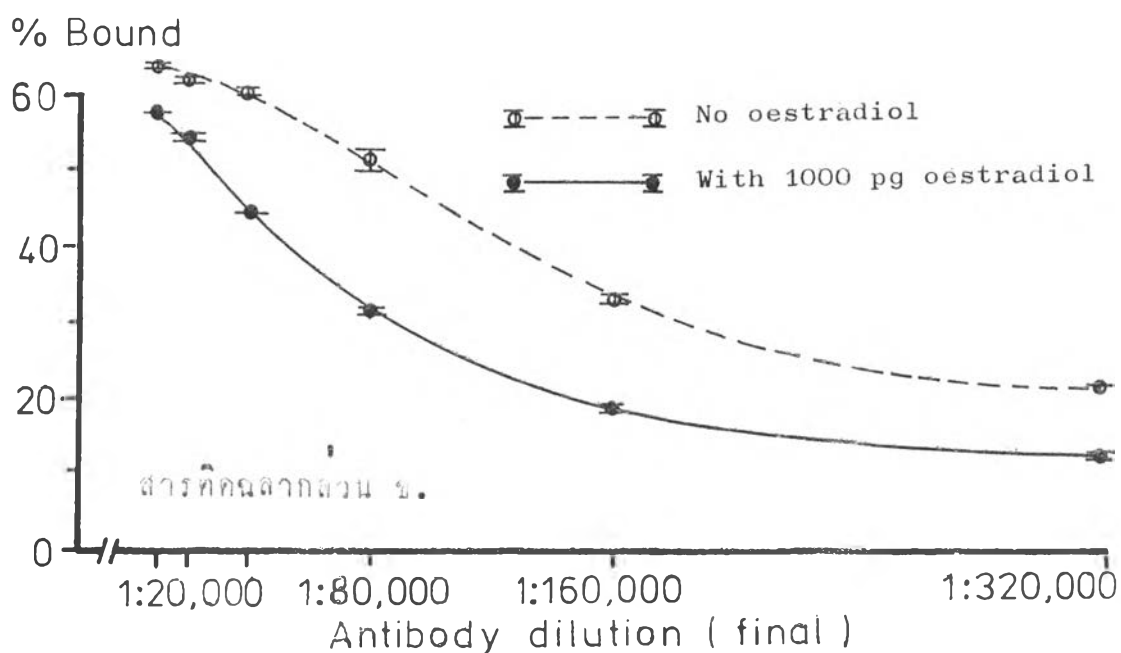
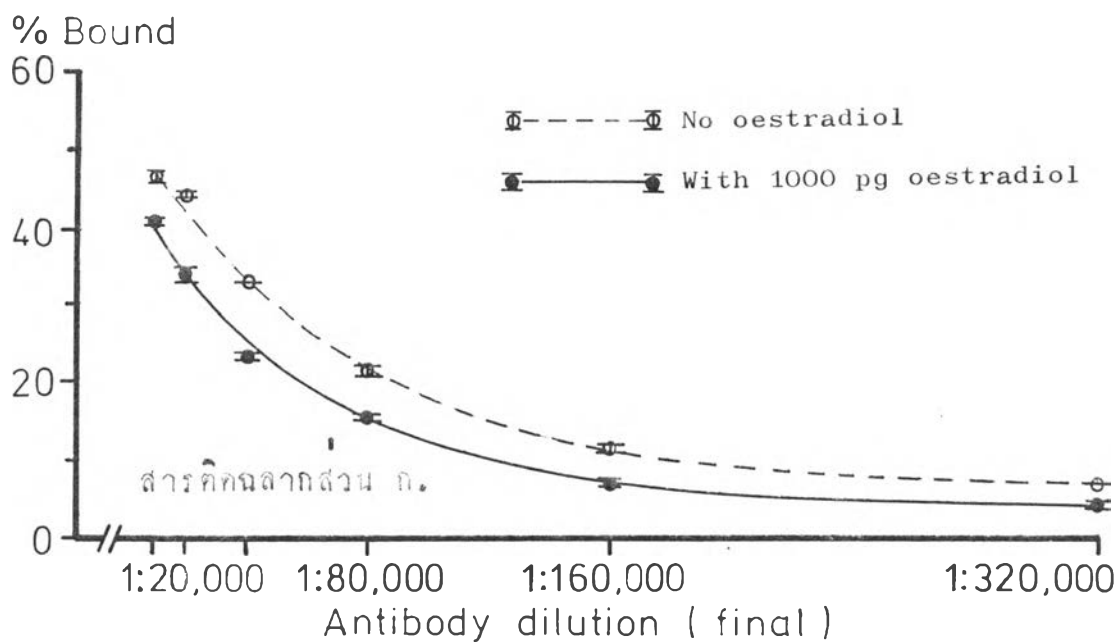
รูปที่ 7ก. ภาพถ่ายฟิล์มเอกซเรย์หลังรูดวาทินเดเซอร์ โครมาโทแกรมของสาร  
ที่คณดาก



1.  $\text{Na}^{125}\text{I}$

2. acid extraction	( $E_{21}$ )	} iodination of histamine 10 sec
3. neutral extraction	( $E_{22}$ )	
4. acid extraction	( $E_{21}$ )	} iodination of histamine 45 sec
5. neutral extraction	( $E_{22}$ )	

รูปที่ 7 ข. ปฏิกิริยาการรวมตัวของแอนติบอดี R3 f.b. กับสารที่กีดขวางจากส่วน ก. และส่วน ข.



#### Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1% gelatin	200 $\mu$ l
buffer or standard oestradiol	100 $\mu$ l
antibody R3 f.b.	100 $\mu$ l
$E_2$ -6- $^{125}$ I ( 10,000 cpm )	100 $\mu$ l

incubated for 20 hours at 4°C  
 charcoal 10 mg / tube in 0.2 cm<sup>3</sup> 0.1% dextran T 70 assay buffer

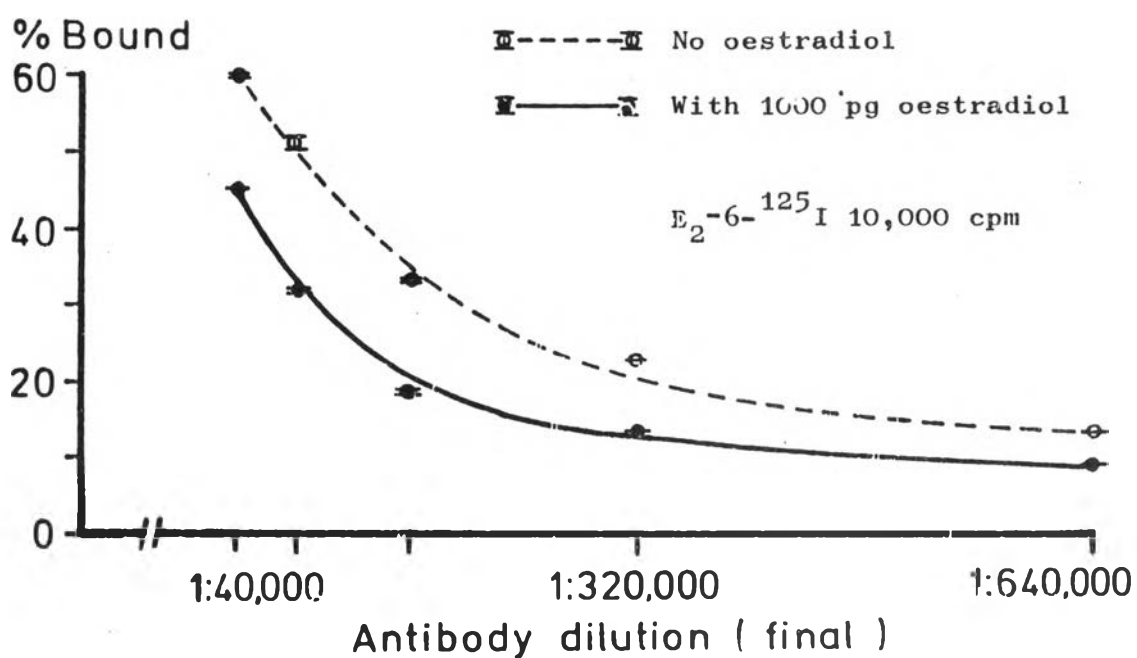
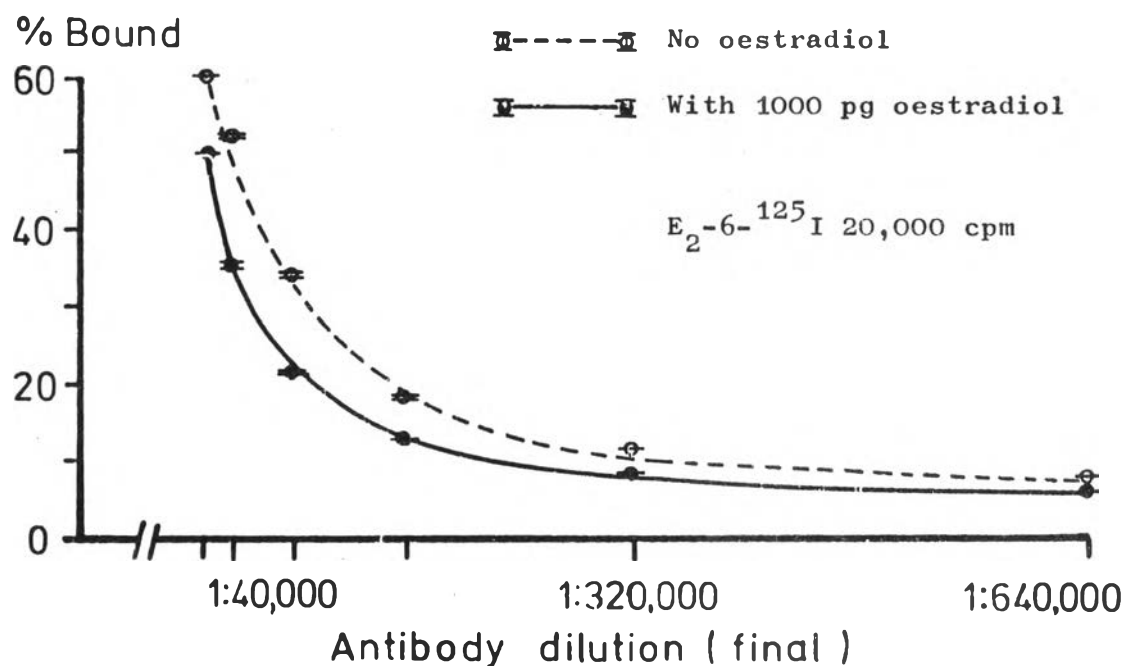


#### 4.4 การหาปริมาณสารติดเชื้อที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาทางเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

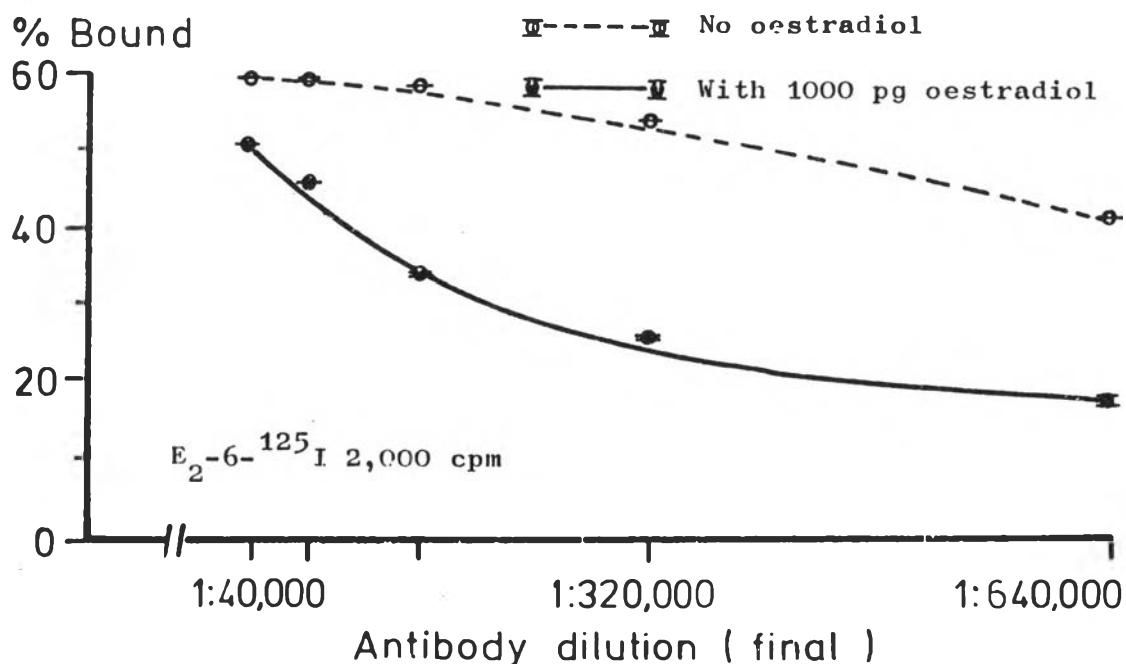
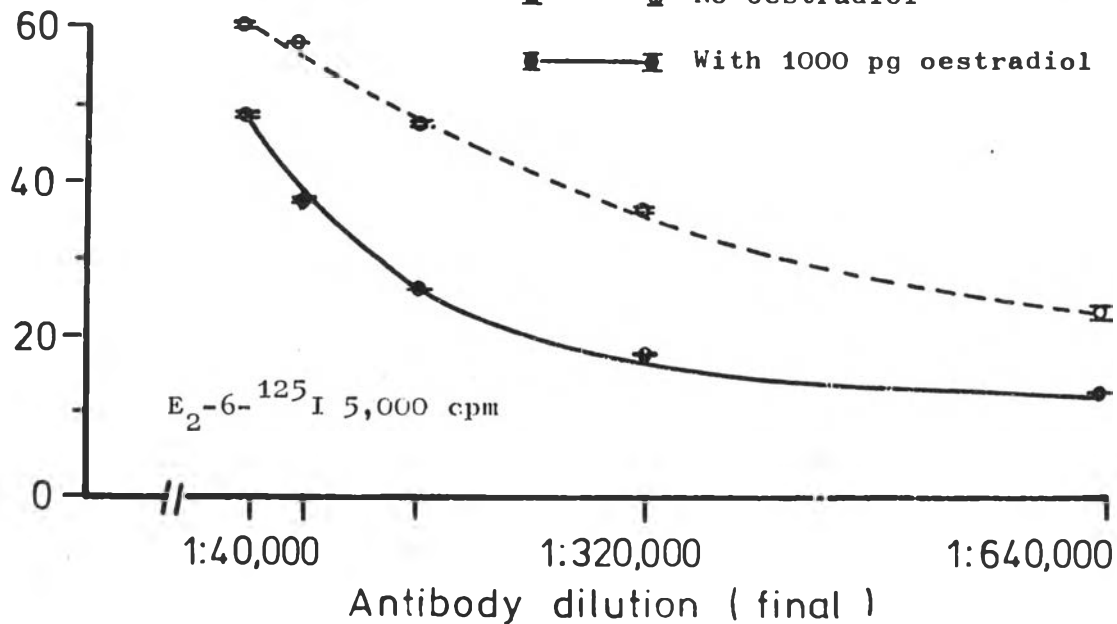
เนื่องจากปริมาณของสารติดเชื้อที่ใช้ในปฏิกิริยาเรดิโออิมมูโนแอสเสย์มีอิทธิพลอย่างมากต่อความเชื่อถือได้ของวิธีทดลอง ผู้ทดลองจึงได้ทดสอบปฏิกิริยาการรวมตัวของแอนติบอดีกับสารติดเชื้ออีกครั้งหนึ่ง โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณสารติดเชื้อที่ใช้ตั้งแต่ 20,000 - 2,000 cpm

จาก antibody dilution curve ที่แสดงในรูปที่ 6 ก. และ 8 ข. จะเห็นว่า รูปแบบของกราฟที่ 6 ก. จะเปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัด และค่าความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวในแต่ละสถานะ (ตารางที่ 7) จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ปริมาณสารติดเชื้อน้อยลง แต่ถ้าเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของการรวมตัว เมื่อใช้ปริมาณสารติดเชื้อต่างกัน จะเห็นว่าการใช้สารติดเชื้อ 2,000 cpm จะให้ค่าความแตกต่างสูงและเปลี่ยนแปลงน้อย เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของแอนติบอดี เมื่อคำนวณค่า  $\mu$  ความแตกต่างสูงสุดที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดีอยู่ระหว่าง 1:160,000 - 1:520,000 จากผลการทดลองในรูปที่ 8 ข. พบว่า ค่าความแตกต่างนี้จะไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก (ตารางที่ 8) ในการทดลองต่อไป ผู้ทดลองได้เลือกใช้สารติดเชื้อปริมาณ 2,000 cpm แต่ได้เปลี่ยนปริมาณของสารที่อินคิวเบทเป็น 700 ไมโครลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดีเป็น 1:420,000

รูปที่ 8 ก. ปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดี R3 f.b. กับสารตั้งต้นที่มีปริมาณต่างกัน



รูปที่ 8 ข. ปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดี R3 f.b. กับสารติดฉลากปริมาณต่างกัน



Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1% gelatin	200	μl
buffer or standard oestradiol	100	μl
antibody R3 f.b.	100	μl
E <sub>2</sub> -6- <sup>125</sup> I	100	μl

incubated for 20 hours at 4°C

charcoal 10 mg/tube in 0.2 cm<sup>3</sup> 0.1% dextran 170 assay buffer

ตารางที่ 7 ปฏิกริยารวมตัวของแอนติบอดี R3 f.บ. กับสารติดสากปริมาณ  
ต่างกัน

ปริมาณสารติดสาก (cpm)	nonspecific binding	แอนติบอดี (ความเข้มข้น สุดท้าย)	ความแตกต่างสูง สุดของการรวม ตัว (%)
20,000	6.3	1:40,000	31
10,000	6.6	1:80,000	39
5,000	6.6	1:160,000	43
2,000	7.0	1:320,000	52

\* ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัว

$$= \frac{\text{ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกริยาการรวมตัวที่ 0 และ 1,000 พิโคกรัม}}{\text{ปฏิกริยารวมตัวที่ 0 พิโคกรัม}} \times 100$$

ตารางที่ 6 % ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวจากการคำนวณที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดี R3 f.b. ทาง ๆ กัน\*

ปริมาณสารสกัดคลาก (cpm)	แอนติบอดี (ความเข้มข้นสุดท้าย)	ความแตกต่างสูงสุด ของการรวมตัว (%)**
2,000	1:160,000	43
2,000	1:220,000	47
2,000	1:320,000	52
2,000	1:420,000	57
2,000	1:520,000	59

\* จากรูปที่ 8 ข.

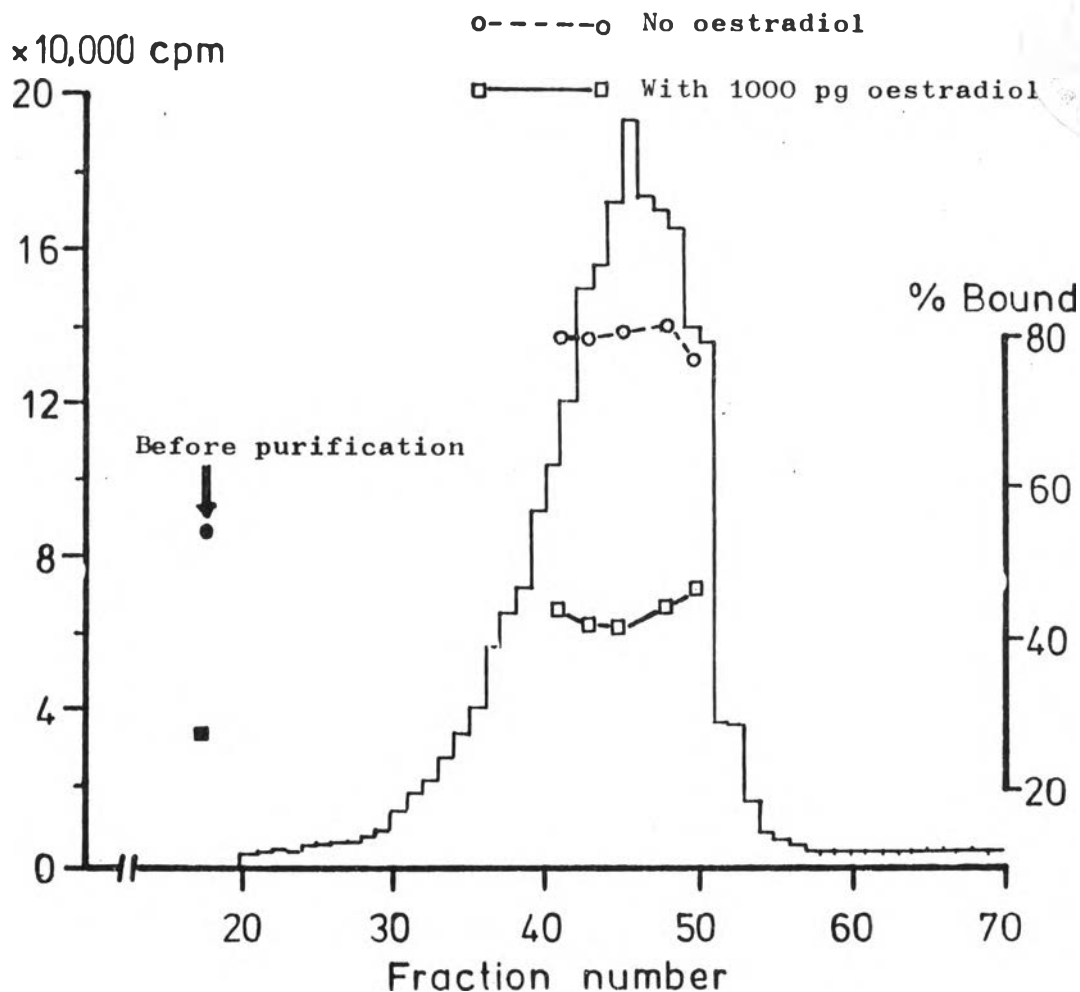
\*\*% ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัว

$$= \frac{\text{ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกิริยาการรวมตัวที่ 0 และ 1,000 พิโคกรัม}}{\text{ปฏิกิริยาการรวมตัวที่ 0 พิโคกรัม}} \times 100$$

#### 4.5 การทดสอบปฏิกิริยาทางอิมมูโนของสารสกัดคลากหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเซฟาแลกซ์ LH-20

เมื่อนำสารสกัดคลากที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโตกราฟีมาผ่านคอลัมน์เซฟาแลกซ์ LH-20 ตามวิธีในข้อ 3.7.2 หน้า 23 พบว่า ส่วนของสารสกัดคลากจะปรากฏอยู่ระหว่างหลอดที่ 35 ถึง 50 หลังจาก void volume (รูปที่ 9) แต่ละส่วนที่ชะออกมาจากคอลัมน์ (ส่วนที่ 41-50) มีปฏิกิริยาการรวมตัวกับแอนติบอดีไม่แตกต่างกันมากนัก และทุกส่วนมีปฏิกิริยาการรวมตัวสูงกว่าสารสกัดคลากที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยทีนเลเยอร์โครมาโตกราฟีเพียงอย่างเดียว สำหรับ % ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวระหว่างแอนติบอดีกับสารสกัดคลากที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงครั้งเดียวจะแตกต่างกันไม่มากเมื่อทดสอบกับแอนติบอดีที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1:420,000

รูปที่ 9 รูปแบบที่ได้จากการชะสารติดฉลากออกจากคอลัมน์เซฟาเท็กซ์ LH-20 และปฏิกิริยาการรวมตัวกับแอนติบอดี R3 f.b. ของสารติดฉลากแต่ละส่วน



#### Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1% gelatin	400 $\mu$ l
buffer or standard oestradiol	100 $\mu$ l
antibody R3 f.b. (final dilution 1:420,000)	100 $\mu$ l
E <sub>2</sub> -6- <sup>125</sup> I (2,000 cpm)	100 $\mu$ l
incubated for 20 hours at 4°C	
charcoal 10 mg/tube in 0.2 cm <sup>3</sup> 0.1% dextran T 70 assay buffer	

ในการทดลองต่อไปนี้จึงนำสารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งที่เกิดขึ้นจากสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์จากหลอดที่ 41-50 ไปทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

#### 4.6 การศึกษาคุณสมบัติของผงถ่านที่มีผลต่อการดูดซับสารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเซฟาแลกซ์ LH-20

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณผงถ่านมีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับสารรูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดี และผู้ทดลองได้เปลี่ยนมาใช้สารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้ง จึงได้ทดสอบปฏิกิริยาการดูดซับสารติดฉลากด้วยผงถ่านอีกครั้งหนึ่ง

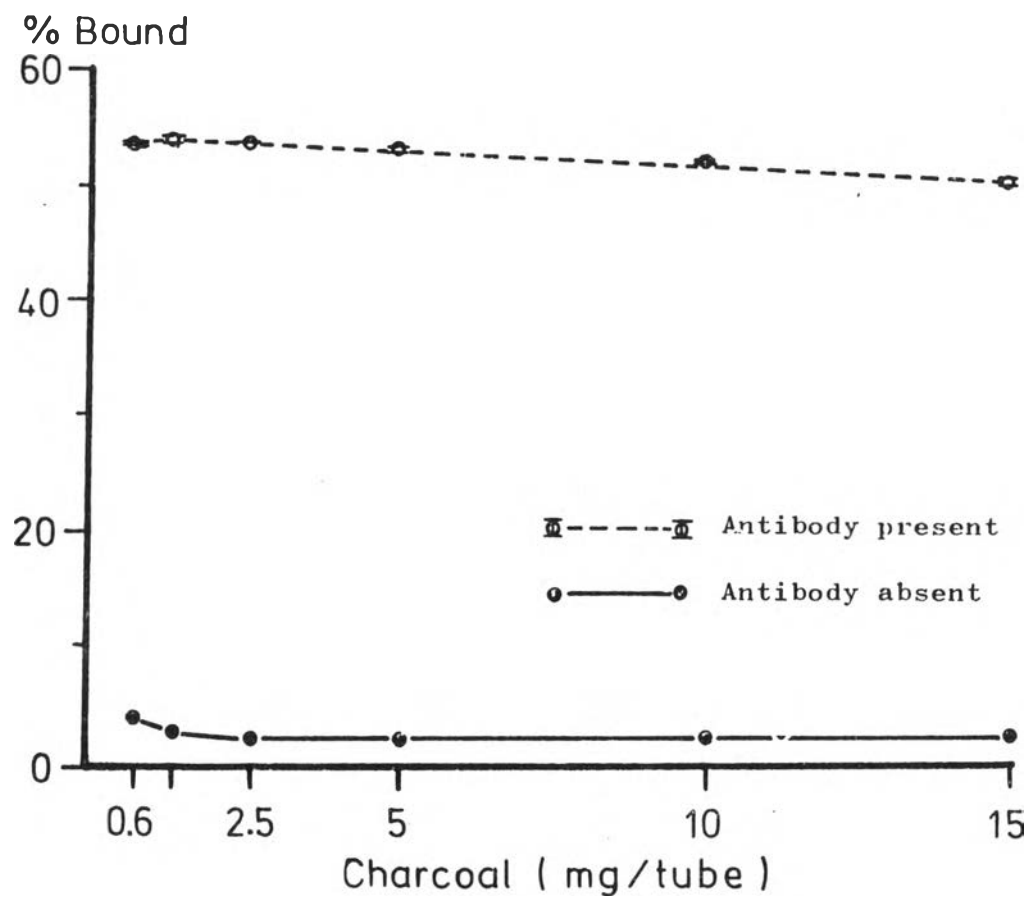
จากรูปที่ 10 แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ผงถ่านเพียง 0.62 มก. จะให้ค่า nonspecific binding ต่ำมาก และปริมาณผงถ่านที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อปฏิกิริยารวมตัวของแอนติบอดีกับสารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งน้อยมาก ในการทดลองขั้นต่อไป ผู้ทดลองได้เลือกใช้ปริมาณผงถ่าน 10 มก. เนื่องจากปริมาณผงถ่านจำนวนนี้สามารถดูดซับเอสตราไดโอดรูปอิสระได้ดี และมีผลต่อปฏิกิริยารวมตัวไม่มากนัก และเพื่อให้เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ในระยะหลังกับผลการทดลองในระยะแรกได้

#### 4.7 การศึกษา antibody dilution curve โดยใช้สารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้ง

เพื่อเป็นการทดสอบสภาวะการวัดปริมาณเอสตราไดโอดให้แน่ชัดอีกครั้งหนึ่ง ผู้ทดลองจึงได้ศึกษา antibody dilution curve ใหม่ โดยใช้สารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้ง 2,000 cpm ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ความเข้มข้นสุดท้ายตั้งแต่ 1:105,000 ถึง 1:1,680,000

จากรูปที่ 11 จะเห็นว่า ปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยสารมาตรฐาน เอสตราไดโอด 1,000 พิโกกรัม จะสูงเมื่อความ

รูปที่ 10 อิทธิพลของปริมาณผงถ่านต่อการจับสารคัดกรองที่ผ่านคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ LH-20

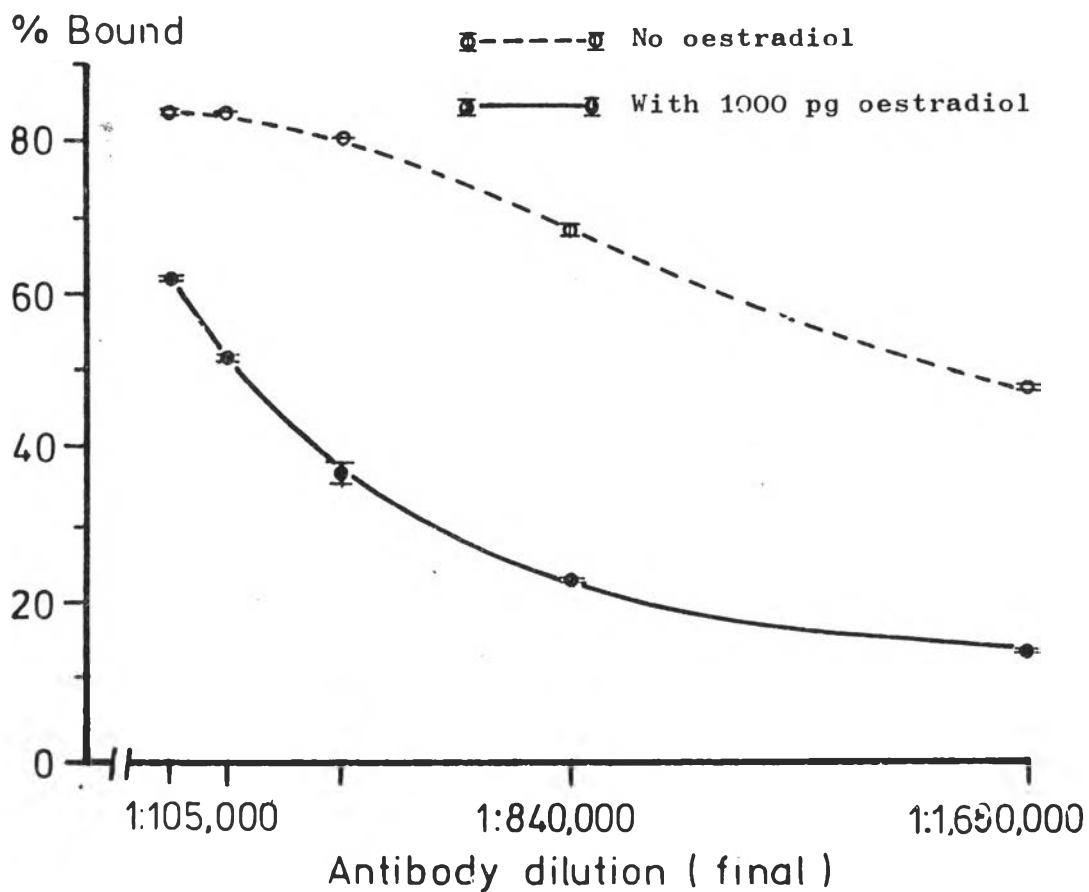


Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1% gelatin 500  $\mu$ l  
 buffer or antibody R3 f.b. (final dilution 1:420,000) 100  $\mu$ l  
 $E_2$ -6- $^{125}$ I (2,000 cpm) 100  $\mu$ l  
 incubated for 20 hours at 4°C  
 charcoal in 0.2 cm<sup>3</sup> 0.1% dextran T 70 assay buffer



รูปที่ 11 ปฏิกิริยาการรวมตัวของแอนติบอดี R3 f.b. กับสารติดฉลากที่ทำให้  
บริสุทธิ์ 2 ครั้ง



#### Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1% gelatin	400	$\mu$ l
buffer or standard oestradiol	100	$\mu$ l
antibody R3 f.b.	100	$\mu$ l
$E_2$ -6- $^{125}$ I (2,000 cpm)	100	$\mu$ l
incubated for 20 hours at 4°C		
charcoal 10 mg/tube in 0.2 cm <sup>3</sup> 0.1% dextran T 70 assay buffer		

เข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดีอยู่ระหว่าง 1:420,000 ถึง 1:840,000 ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกิริยาการรวมตัวจะสูงเกิน 50% เมื่อความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดีเป็น 1:420,000 หรือเจือจางกว่า ตารางที่ 9 ในการทดลองต่อไปนี้ ผู้ทดลองได้เลือกไว้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:840,000

ตารางที่ 9 ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวระหว่างสารกึ่งกลางที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งกับแอนติบอดี R3 f.b. ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ปริมาณสารกึ่งกลาง (cpm)	แอนติบอดี (ความเข้มข้นสุดท้าย)	ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัว (%)*
2,000	1:105,000	26
2,000	1:210,000	38
2,000	1:420,000	55
2,000	1:840,000	68
2,000	1:1,680,000	71

\* ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัว

$$= \frac{\text{ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกิริยาการรวมตัวที่ 0 และ 1,000 พิโคกรัม}}{\text{ปฏิกิริยาการรวมที่ 0 พิโคกรัม}} \times 100$$

#### 4.8 การเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้สารกึ่งกลางที่ทำให้บริสุทธิ์ครั้งเดียว และสารกึ่งกลางที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเซฟาเคนซ์ LH-20

จากการทดลองทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารที่ทำให้บริสุทธิ์ครั้งเดียว เปรียบเทียบกับการใช้สารกึ่งกลางที่ทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 ด้วยคอสมิน

เซฟาแลน LH-20 (รูปที่ 12) จะเห็นว่า การใช้สารที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้ง จะทำให้ประสิทธิภาพการรวมตัวกับแอนติบอดีสูงกว่า ในการศึกษาต่อ ๆ ไป จึงได้เลือกใช้แคเฉพาะสารที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งโดยตลอด

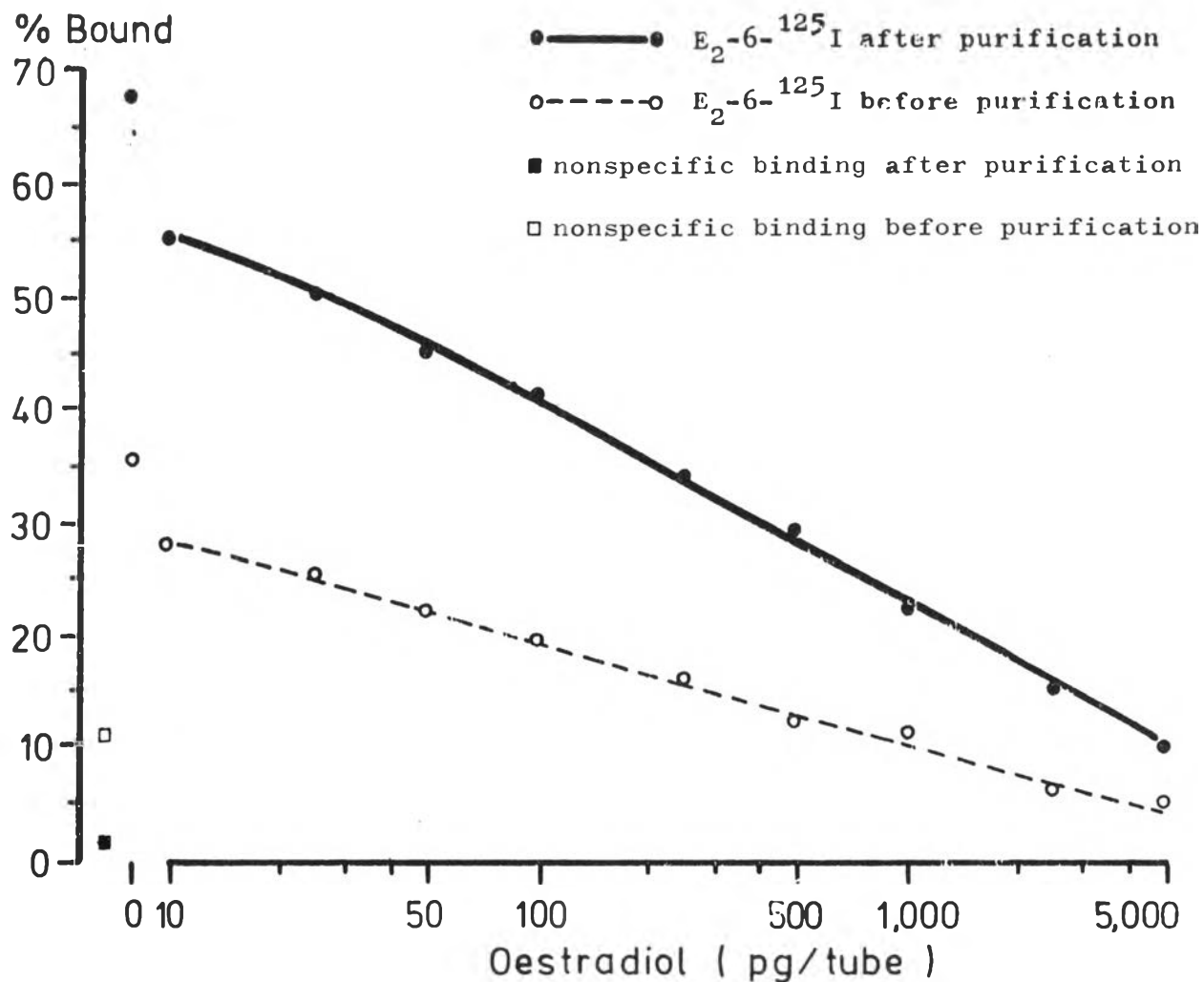
#### 4.9 การศึกษาอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่อกราฟมาตรฐาน

เมื่อศึกษาอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่อกราฟมาตรฐาน โดยการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาอินคิวเบชันที่ 4°ซ. เป็นเวลา 4 ถึง 24 ชม. ปรากฏว่า อาจแยกผลการทดลองที่ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม (รูปที่ 13) คือกราฟมาตรฐานกลุ่มแรก (อินคิวเบชัน 4 และ 8 ชม.) จะต่างกับกลุ่มที่สอง (อินคิวเบชันต่างคืน) เล็กน้อย และความแตกต่างนี้มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้น เมื่อระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานอยู่ในระดับต่ำ และปฏิกิริยาที่เกิดจากการอินคิวเบชันในแต่ละกลุ่มเกือบจะไม่แตกต่างกัน ในการทดลองต่อไปได้เลือกอินคิวเบชันที่ 4°ซ. เป็นเวลาประมาณ 16 ถึง 24 ชม. เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่สะดวกกับการปฏิบัติ

#### 4.10 การศึกษาอิทธิพลของอีเทอร์และ 40% เอทิลอะซิเตท ใน ไอโซออกเทน ต่อกราฟมาตรฐาน

เนื่องจากปัจจุบันการวัดปริมาณเอสตราโคออลในซีรัมส่วนใหญ่ยังมีความจำเป็นต้องสกัดสารออกจากซีรัมด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และในหลายกรณีอาจจะจำเป็นต้องเพิ่มขึ้นของโครมาโตกราฟฟีก่อนการทำปฏิกิริยาเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ด้วย ในการทดลองนี้ ผู้ทดลองจึงได้ศึกษาถึงอิทธิพลของสารอินทรีย์ที่ใส่มากในการสกัดเอสตราโคออลจากซีรัม คือ อีเทอร์ต่อกราฟมาตรฐาน และอิทธิพลของสารที่คาดว่าจะใช้สำหรับการทำโครมาโตกราฟฟีก คือ 40% เอทิลอะซิเตท ใน ไอโซออกเทน ซึ่งจะใช้เป็นกั๊วะเอสตราโคออลออกจากคอลัมน์ซิลิกา โดยนำสารที่ได้จากการสกัดและจากการระเหยคอลัมน์มาละลายด้วย แอสเสย์โซลเวนต์ แล้วใช้ทำกราฟมาตรฐานเทียบกับแอสเสย์โซลเวนต์ จากรูปที่ 14 จะเห็นว่า อีเทอร์ และ 40% เอทิลอะซิเตท ใน ไอโซออกเทนที่นาน

รูปที่ 12 อิทธิพลของการทำให้สารติดฉลากบริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20  
ต่อ กราฟมาตรฐานของเอสตราไดโอด



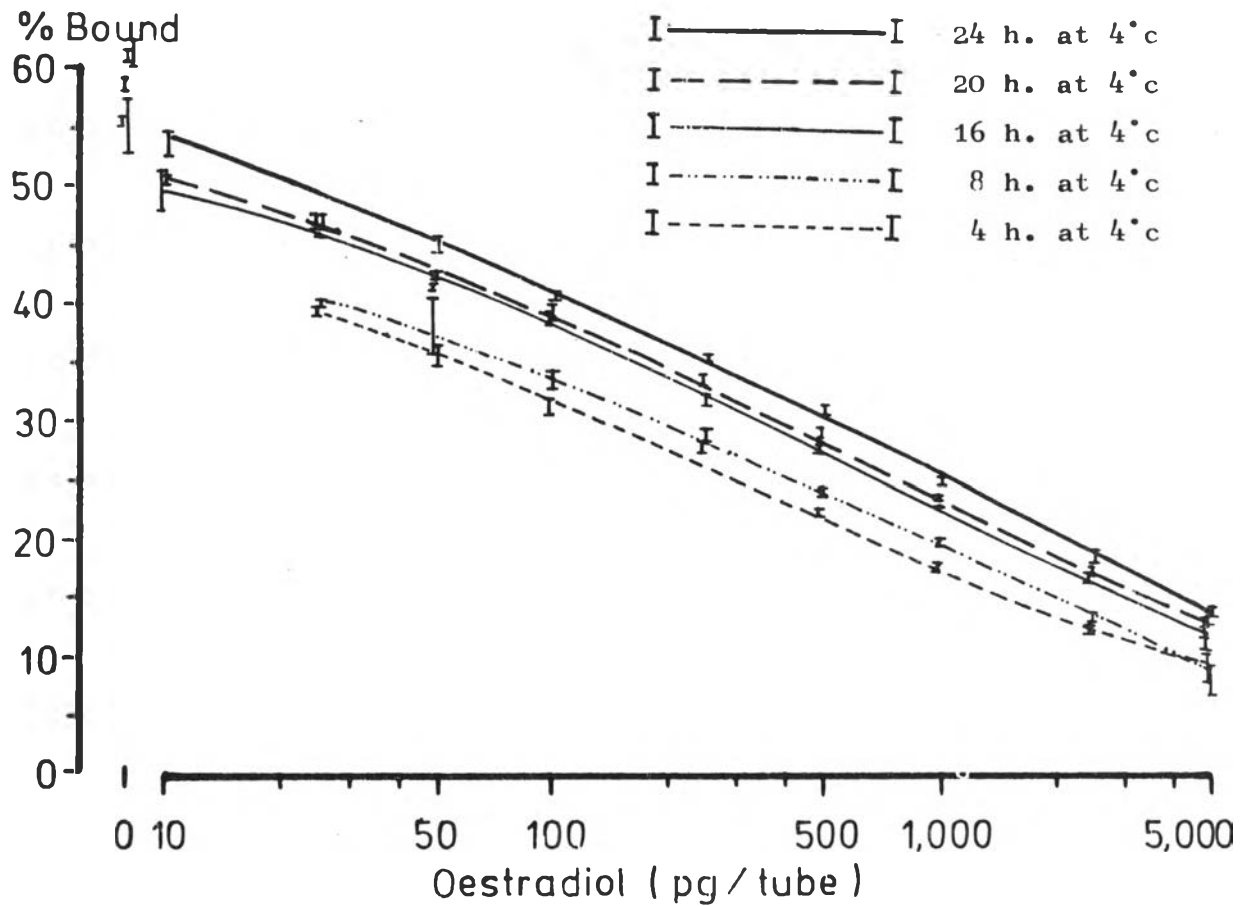
#### Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1% gelatin	400	μl
standard oestradiol	100	μl
antibody R3 f.b. (final dilution 1:840,000)	100	μl
E <sub>2</sub> -6- <sup>125</sup> I (2,000 cpm)	100	μl

incubated for 20 hours at 4°C

charcoal 10 mg/tube in 0.2 cm<sup>3</sup> 0.1% dextran T 70 assay buffer

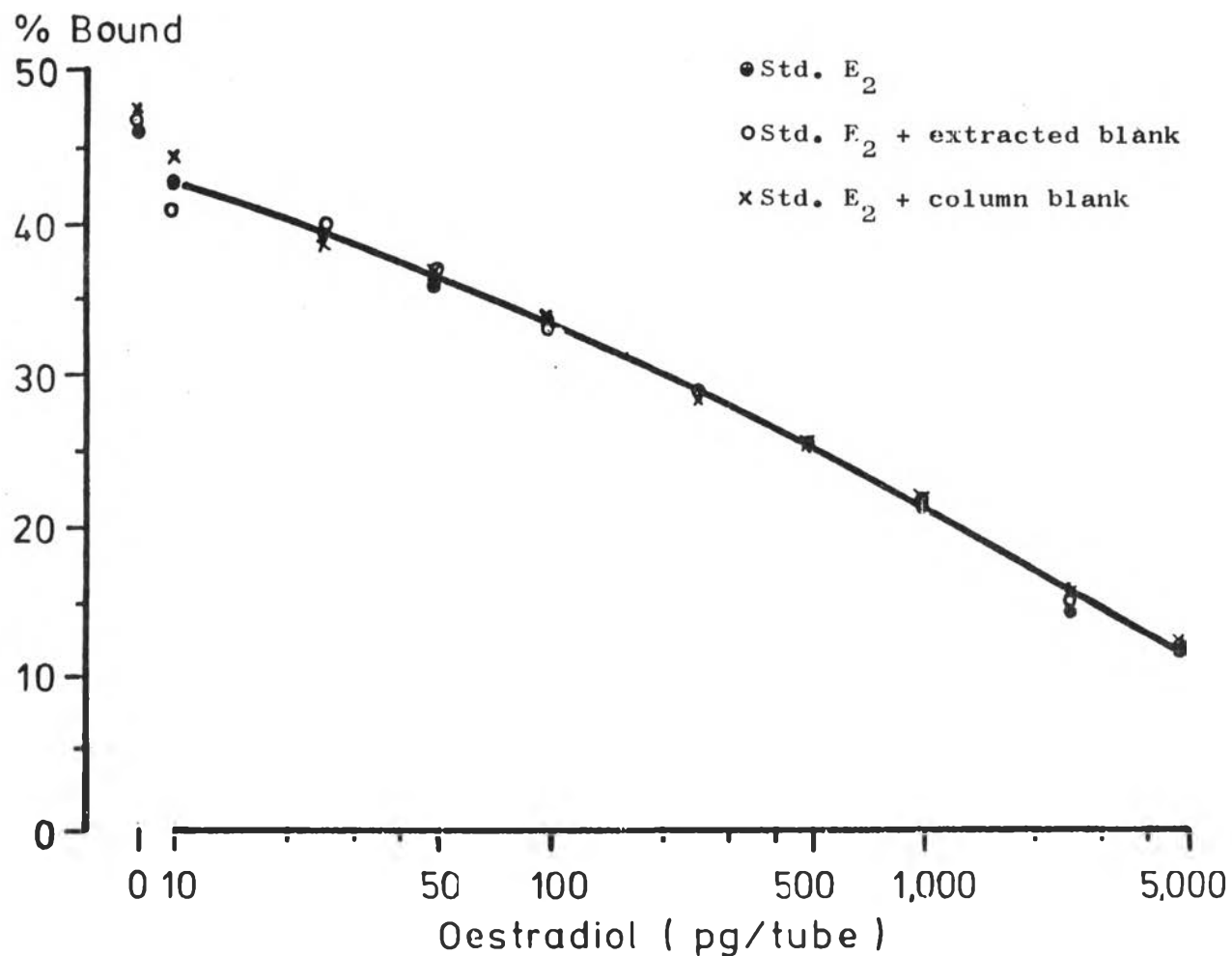
รูปที่ 13 อิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่อกราฟมาตรฐาน



Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1% gelatin	400	μl
standard oestradiol	100	μl
antibody R3 f.b. (final dilution 1:840,000)	100	μl
$E_2$ - $6$ - $^{125}I$ (2,000 cpm)	100	μl
incubated at 4°C		
charcoal 10 mg/tube in 0.2 cm <sup>3</sup> 0.1% dextran T 70 assay buffer		

รูปที่ 14 อิทธิพลของน้ำยาสกัดและน้ำยาชะคอลัมน์ต่อกราฟมาตรฐาน



#### Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 0.1% gelatin	400	μl
standard oestradiol	100	μl
antibody R3 f.b. (final dilution 1:210,000)	100	μl
E <sub>2</sub> -6- <sup>125</sup> I (5,000 cpm)	100	μl
incubated for 20 hours at 4°C		
charcoal 10 mg/tube in 0.2 cm <sup>3</sup> 0.1% dextran T 70 assay buffer		

จากคอดัมบีไลต์ ไม่มีผลต่อปฏิกิริยารวมตัวของแอนติบอดี ดังนั้น จึงสามารถนำกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากแอสเสย์พีเพอร์มาใช้ในการหาปริมาณเอสตราไดโอดในซีรัมซึ่งสกัดด้วยอีเทอร์และผ่านชั้นตอนของโครมาโตกราฟฟีแบบใช้ซีไลต์ได้

#### 4.11 การศึกษาเสถียรภาพของสารทัศนฉลากภายหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วย

##### เซฟาแลกซ์ LH-20

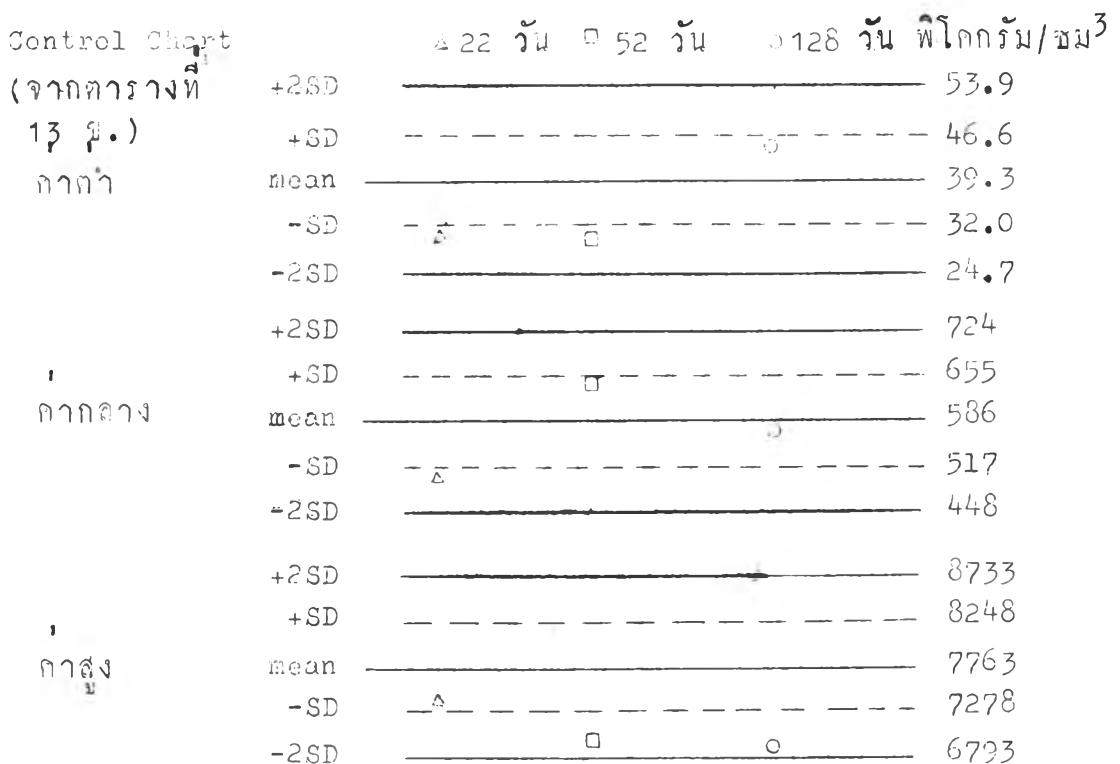
โดยปกติแล้วในการทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของสารใด ๆ ก็ตาม ปริมาณการใช้สารทัศนฉลากจะน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณสารที่เตรียมโคหรือปริมาณสารที่ซื้อมา จึงจำเป็นต้องเก็บสารทัศนฉลากที่ใช้ไว้เป็นระยะเวลาหนึ่งซึ่งจะเป็นเวลานานเท่าใดขึ้นอยู่กับเสถียรภาพของสารทัศนฉลากแต่ละชนิด การทดสอบเสถียรภาพของสารทัศนฉลากจึงเป็นสิ่งจำเป็น ในการทดลองนี้ ผู้ทดลองได้ศึกษาเสถียรภาพของสารทัศนฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 ด้วยเซฟาแลกซ์ LH-20 โดยทดลองปฏิกิริยารวมตัวของแอนติบอดีกับสารทัศนฉลากที่เก็บไว้ที่ 4 °ซ. เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน และวัดปริมาณเอสตราไดโอดใน control serum ที่ 3 ระดับความเข้มข้น จากผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 10 จะเห็นว่า ปฏิกิริยารวมตัวที่ความเข้มข้นสารมาตรฐาน 0 พิโคกรัมไม่แตกต่างกันมากนัก ตลอดระยะเวลาของการทดลองเป็นเวลาประมาณ 4 เดือน และปริมาณเอสตราไดโอดใน control serum ทั้ง 3 ระดับ เมื่อใช้สารทัศนฉลาก ภายหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเซฟาแลกซ์ LH-20 นาน 128 วัน มีค่าอยู่ไม่เกินค่าเฉลี่ย  $\pm 2$  ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่า control serum เดิมที่ใช้สารทัศนฉลากที่มีอายุไม่เกิน 22 วัน โดยทำการทดลองติดกัน 3 ครั้ง

ตารางที่ 10 คุณสมบัติของสารกึ่งผลึกในการรวมตัวกับแอนติบอดี R3 f.b. และปริมาณเอสตราไดโอดที่วัดจาก control serum เมื่อใช้สารกึ่งผลึกในระยะเวลาต่าง ๆ ภายหลังจากทำให้บริสุทธ์ด้วยกรดมัน เซซาเจกิม LH-20

ระยะเวลา หลังจาก บริสุทธ์(วัน)	ปฏิกิริยารวม ที่ 0 พิโค- กรัม (%bound)	control serum (พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup> )					
		ค่าต่ำ		ค่ากลาง		ค่าสูง	
		mean ± SD	mean ± SD %CV	mean ± SD %CV	mean ± SD %CV	mean ± SD %CV	
22	72.4 ± 1.1	31.1±5.8 18.6	509 ± 54 10.7	7332± 292 5.1			
52	69.0 ± 0.7	30.1±5.5 18.2	627 ± 67 10.7	6990 ± 326 4.7			
126	71.8 ± 1.5	45.8±11.1 24.3	578 ± 35 6.0	6851 ± 148 2.7			

\* ทดสอบกับ control serum แล้ละระดับ ๆ 4 ตัวอย่าง

อายุของสารกึ่งผลึก





#### 4.12 การเปรียบเทียบการวัดปริมาณเอสตราโคบอลในซีรัมก่อนและหลังการ ผ่านโครมาโทกราฟี

เป็นที่ทราบกันดีว่า เเรคโอบิอิมิวโนแอสเสย์ของสเตอรอยด์ใด ๆ ในซีรัมนั้นมักจะถูกรบกวนโดยสเตอรอยด์หรือสารอื่น ๆ ที่มีปะปนอยู่ในซีรัม และก่อนที่จะวัดปริมาณของสารที่สนใจ อาจจำเป็นต้องขจัดสารรบกวนต่าง ๆ ออกเสียก่อน แต่ขั้นตอนการขจัดสารจะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเสียเวลา ในการทดลองนี้ ผู้ทดลองได้ลองวัดปริมาณเอสตราโคบอลในซีรัมสภาวะต่าง ๆ เพื่อทดสอบว่า ผลที่ได้จะเหมือนกันหรือไม่ ถ้าเพิ่มขึ้นตอนของซีไลต์โครมาโทกราฟีที่หลังจากการสกัดก่อนวัดปริมาณ จากตารางที่ 11 จะเห็นว่า ผลการวัดปริมาณเอสตราโคบอลในซีรัม 11 ตัวอย่าง มีอยู่สองตัวอย่าง (ตัวอย่าง ที่ 10 และ 11) ที่ผลจากวิธีทั้งสองไม่แตกต่างกัน และมีอยู่สองตัวอย่าง (ตัวอย่าง ที่ 3 และ 9) ที่ผลจากโครมาโทกราฟีจะสูงกว่า และ 7 ใน 9 ตัวอย่างที่เหลือ ผลที่ได้จากวิธีโครมาโทกราฟีจะต่ำกว่าผลที่ได้จากวิธีสกัดอย่างเฉียว

#### 4.13 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณเอสตราโคบอล

ผู้ทดลองได้ทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีทดลองทั้งในแง่ความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ ความไว ความแม่นยำ และความถูกต้อง และได้ทดสอบอิทธิพลของโครมาโทกราฟีต่อความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีทดลองโดยการวัดปริมาณเอสตราโคบอลในซีรัมสภาวะต่าง ๆ กัน ก่อนและหลังการผ่านซีไลต์กอลด์มันน์

##### 4.13.1 ความจำเพาะของแอนติบอดี (R3 f.b.)

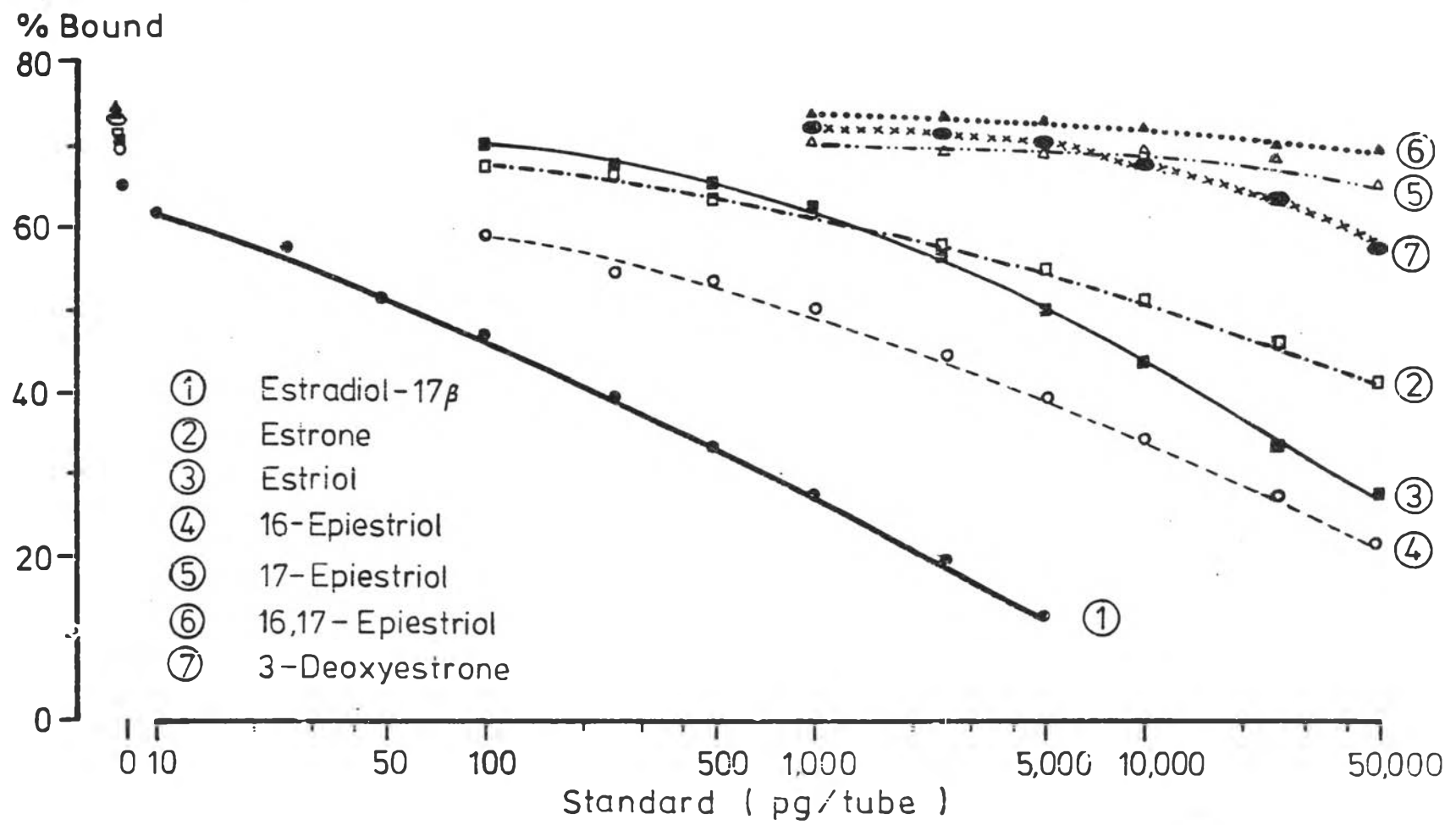
จากการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีกับสเตอรอยด์ส่วนใหญ่ที่พบในกระแสโลหิตและเมตาโบไลต์ของเอสตราโคบอลเทียบกับเอสตราโคบอล พบว่า แอนติบอดีเกิด cross reaction กับ เอสโตรน เอสทริออล และ 16-อีพีเอสทริออลโครอยละ 0.36 1.72 และ 5.0 ตามลำดับ ส่วนสเตอรอยด์อื่นที่นำมาทดลองเกิด cross reaction น้อยกว่า 0.01% (รูปที่ 15 และตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 ผลเปรียบเทียบอิทธิพลของการใช้ไลโทโครมาเทกราฟีต่อปริมาณ  
เอสตราไดออล

ตัว อย่าง ที่	สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นของเอสตราไดออล พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup>				p from t-pair test
		วิธีสกัดสารอย่าง เดียว		วิธีสกัดและผ่าน โครมาเทกราฟี		
		mean ± SD*	%CV	mean ± SD*	%CV	
1.	Control serum(I)	132.0 ± 10.9	8.2	30.1 ± 5.5	18.2	p < 0.01
2.	Control serum(II)	1064 ± 120	11.2	626.5 ± 67.3	10.7	p < 0.01
3.	Control serum(III)	6002 ± 435	7.2	6990 ± 326	4.7	p < 0.05
4.	Menopausal women	87.2 ± 14.5	16.6	6.5 ± 1.7	26.1	p < 0.01
5.	Menstrual cycle, day 5	169.4 ± 20.5	12.1	64.1 ± 7.6	11.9	p < 0.01
6.	Menstrual cycle, day 21	470.8 ± 39.2	8.3	341.4 ± 49.0	14.4	p < 0.01
7.	Male pool	63.5 ± 14.5	22.8	32.4 ± 3.7	11.4	p < 0.01
8.	Female pool	246.2 ± 16.6	7.5	115.9 ± 13.4	11.5	p < 0.01
9.	Pregnancy (1 <sup>st</sup> trimester)	2994 ± 144	4.8	3611 ± 269	4.7	p < 0.01
10.	Pregnancy (3 <sup>rd</sup> trimester)	26932 ± 1661	6.1	25055 ± 2065	8.2	p > 0.05
11.	Post partum, 3h.	16535 ± 1441	8.7	14046 ± 636	4.5	p > 0.05

\*ค่าเฉลี่ยจากวิธี 4 ตัวอย่าง

รูปที่ 15 ความจำเพาะของ anti-E<sub>2</sub>-6-BSA ( rabbit 3 final bleed )



Assay protocol

0.1 M phosphate buffer pH 7.0,	0.1 gelatin	400 $\mu$ l	incubated for 20 hours at 4 <sup>o</sup> C
standard		100 $\mu$ l	charcoal 10 mg/tube in 0.2 cm <sup>3</sup>
antibody R3 f.b. (final dilution 1:840,000)		100 $\mu$ l	0.1% dextran T 70 assay buffer
E <sub>2</sub> -6- <sup>125</sup> I (2,000 cpm)		100 $\mu$ l	

ตารางที่ 12 ความจำเพาะของ anti E<sub>2</sub>-6-BSA (rabbit's final blood)

steroid	cross reaction (%)
Cholesterol	< 0.01
<u>C<sub>21</sub> steroid</u>	
Progesterone	< 0.01
17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone	< 0.01
Cortisol	< 0.01
<u>C<sub>19</sub> steroid</u>	
Testosterone	< 0.01
$\Delta^4$ Androstene 3,17-dione	< 0.01
Androsterone	< 0.01
Dehydroepiandrosterone	0.01
<u>C<sub>18</sub> steroid</u>	
Oestradiol-17 $\beta$	100
Gestrone	0.56
Oestriol	1.72
16-Epiestriol	5.0
17-Epiestriol	< 0.01
16,17-Epiestriol	< 0.01
3-Decyestrone	0.05

#### 4.13.2 ความไวของการวัดปริมาณเอสตราโคบอล

จากการวัดปริมาณมาตรฐานของ เอสตราโคบอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ระดับ 10, 100, 1,000 และ 10,000 หน่วยความไวของการวัดจากกราฟมาตรฐานการวัดการวัดของ Abraham (1969, 1974) โดยคำนวณจากจุดที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐานเป็นศูนย์กับค่า 2 เท่าของความเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยคำนวณความไวของวิธี 3.0 พิโคกรัม/หลอด หรือ 10.2 พิโคกรัม/มล<sup>3</sup>

#### 4.13.3 การเปรียบเทียบความแม่นยำของการวัดปริมาณเอสตราโคบอลในซีรัมก่อนและหลังการผ่านคอลัมน์มีไลโทโครมาโทกราฟี

เพื่อทดสอบความแม่นยำของการวัดปริมาณเอสตราโคบอลใน control serum ที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ ด้วยวิธีที่ไม่ผ่านและผ่านมีไลโทโครมาโทกราฟีรวม 3 ครั้ง แต่ละครั้งวัดปริมาณสารในซีรัมระดับความเข้มข้น 10, 100, 1,000 หน่วย 2 วิธีที่มีความแม่นยำใกล้เคียงกัน คือ มีค่าสัมประสิทธิ์การเบี่ยงเบนแปร coefficient of variation (%CV) ในระหว่างการทดสอบทุกระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 20% และความแม่นยำของการวัดเอสตราโคบอลทั้ง 2 วิธีในซีรัมที่มีปริมาณเอสตราโคบอลสูงจะดีกว่าปริมาณค่า (ตารางที่ 13 ก. และ 13 ข.)

#### 4.13.4 การเปรียบเทียบความถูกต้องของวิธีในการวัดปริมาณเอสตราโคบอลในซีรัมก่อนและหลังการผ่านคอลัมน์มีไลโทโครมาโทกราฟี

จากการวัดปริมาณเอสตราโคบอลในซีรัมบุรุษหลังการเติม เอสตราโคบอลมาตรฐาน 150, 1,500 และ 8,000 พิโคกรัม/มล<sup>3</sup> โดยวิธีที่ไม่ผ่านและผ่านมีไลโทโครมาโทกราฟี ปรากฏว่า ความถูกต้องของวิธีไม่ผ่านและผ่านมีไลโทโครมาโทกราฟีอยู่ระหว่าง  $85.7 \pm 4.8$  ถึง  $139.6 \pm 20.7$  และ  $91.1 \pm 6.5$  ถึง  $111.9 \pm 9.3$  ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 13 ก. ความแม่นยำของวิธีวัดปริมาณเอสตราไดออกซอนก่อนการผ่านมีไลต์โครมาโทกราฟี

* Control serum	การทดลองที่ 1 พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup>		การทดลองที่ 2 พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup>		การทดลองที่ 3 พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup>		การทดลองที่ 1 - 3 พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup>	
	mean ± SD	%CV	mean ± SD	%CV	mean ± SD	%CV	mean ± SD	%CV
ค่าต่ำ	120.9 ± 8.5	7.0	87.2 ± 8.8	10.1	127.3 ± 15.2	18.5	108.7 ± 20.9	19.3
ค่ากลาง	966 ± 63	6.5	969 ± 40	4.1	1086 ± 96	8.9	995 ± 80	8.1
ค่าสูง	6706 ± 344	5.1	6935 ± 559	8.1	6958 ± 393	5.6	6852 ± 447	6.5

\* ทดลอง control serum ระบุละ 10 ตัวอย่าง

ตารางที่ 13 ข. ความแม่นยำของวิธีวัดปริมาณเอสตราไดออกซอนหลังการผ่านมีไลต์โครมาโทกราฟี

* Control serum	การทดลองที่ 1 พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup>		การทดลองที่ 2 พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup>		การทดลองที่ 3 พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup>		การทดลองที่ 1 - 3 พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup>	
	mean ± SD	%CV	mean ± SD	%CV	mean ± SD	%CV	mean ± SD	%CV
ค่าต่ำ	44.1 ± 8.7	19.8	34.8 ± 3.9	11.1	39.0 ± 3.8	9.7	39.3 ± 7.3	18.5
ค่ากลาง	621 ± 61	9.8	559 ± 71	12.6	601 ± 84	13.9	586 ± 69	11.8
ค่าสูง	7821 ± 285	3.6	7994 ± 517	6.5	7281 ± 398	5.5	7763 ± 485	6.2

\* ทดลอง control serum ระบุละ 10 ตัวอย่าง

ตารางที่ 14 ความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณเอสตราไดโอด

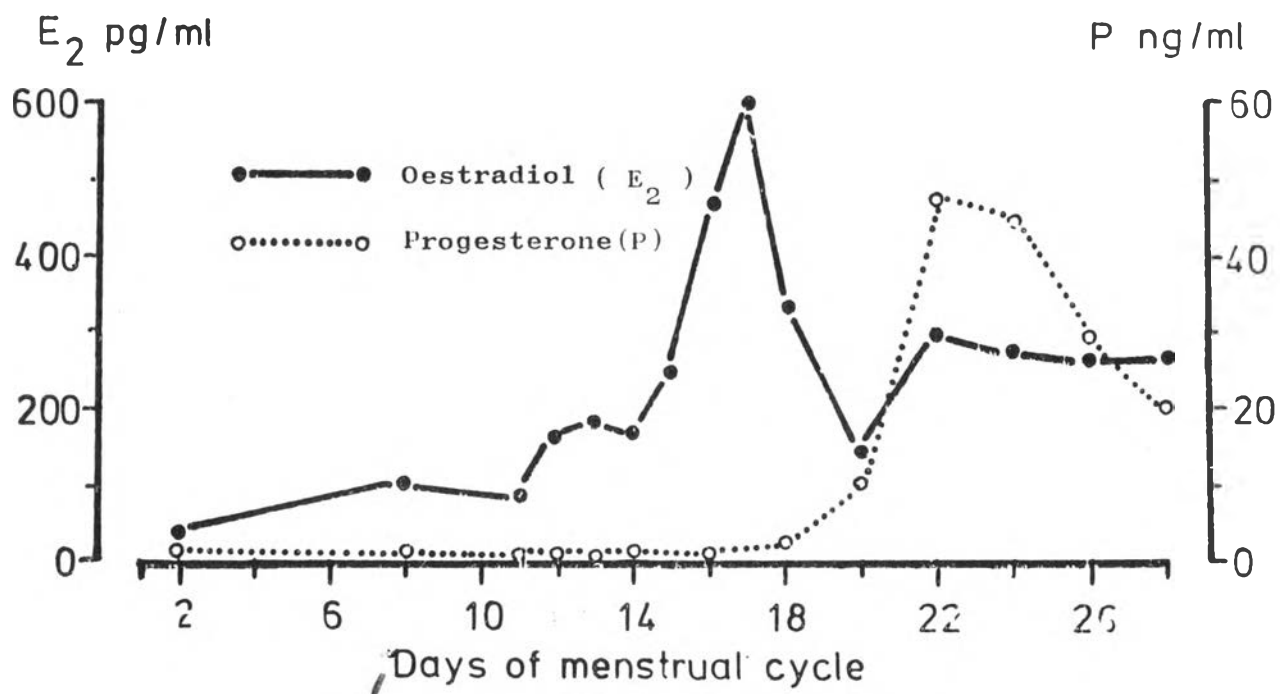
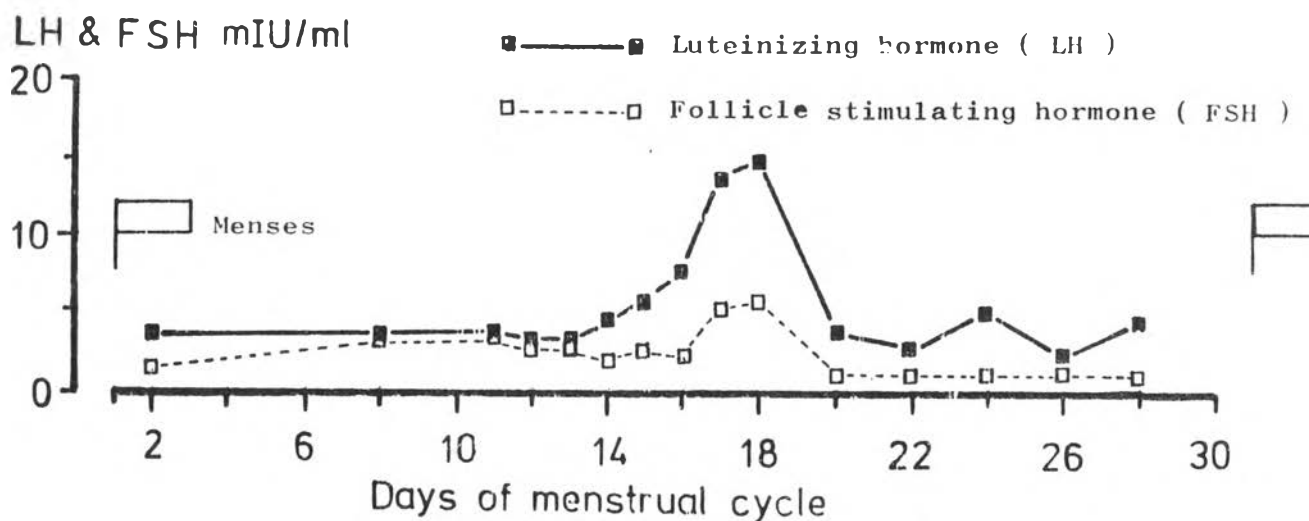
ปริมาณ E <sub>2</sub> มาตรฐาน ที่เติม (พิโคกรัม/ซม <sup>3</sup> )	%Recovery				p from t-pair test
	ก่อนผ่านซีไลต์		หลังผ่านซีไลต์		
	mean ± SD	%CV	mean ± SD	%CV	
150	139.6 ± 20.7	14.8	102.9 ± 12.8	12.4	p < 0.05
1,500	97.4 ± 4.1	4.2	91.1 ± 6.5	7.1	p > 0.05
8,000	85.7 ± 4.8	5.6	111.9 ± 9.3	8.3	p < 0.01

\* ค่าเฉลี่ยจาก 5 ตัวอย่าง

#### 4.14 ผลการวัดปริมาณเอสตราไดโอดในซีรัมสตรีไทย

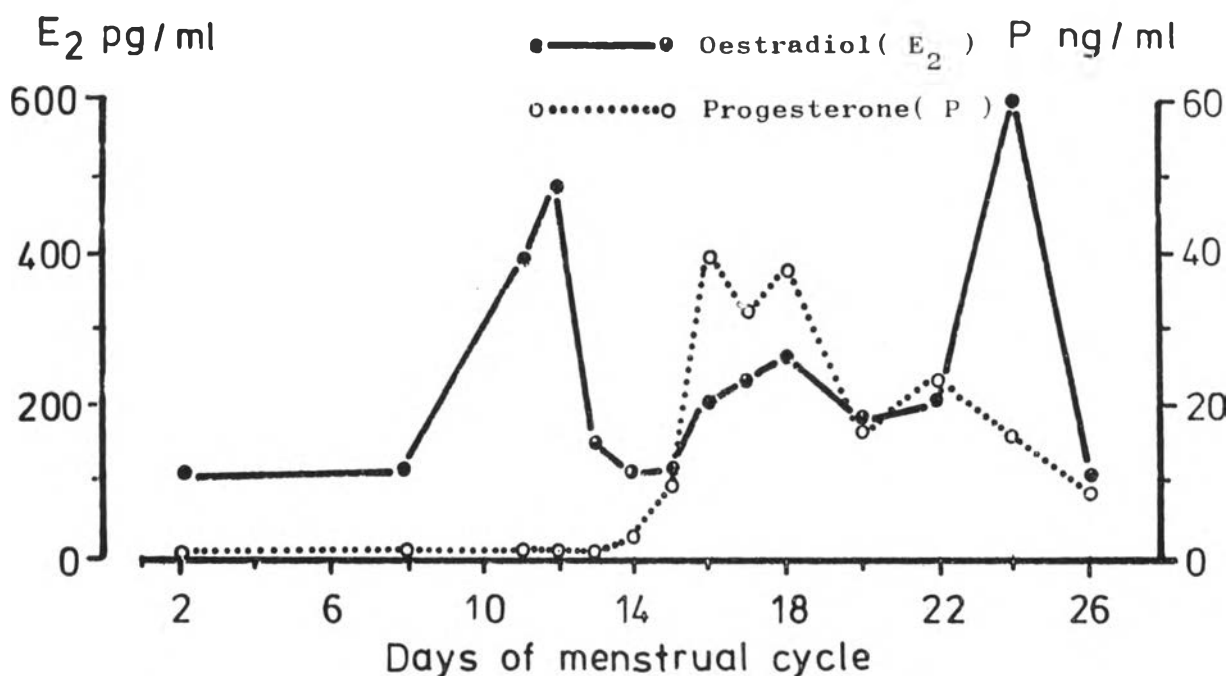
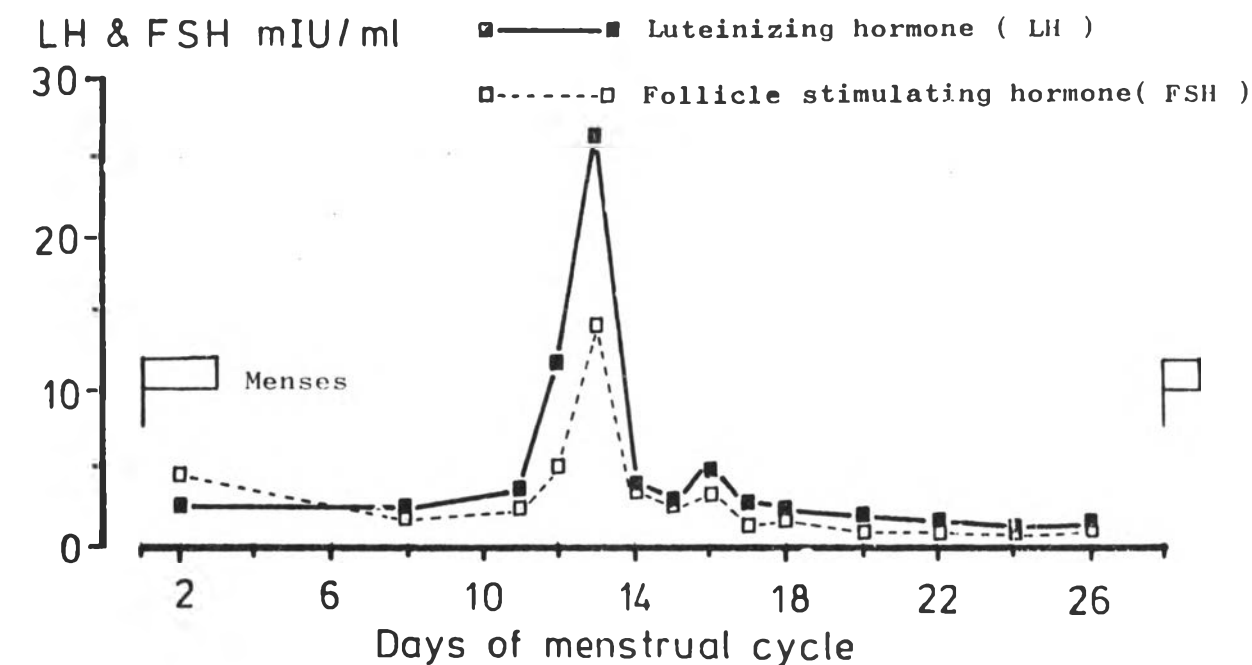
เมื่อศึกษาการวัดปริมาณเอสตราไดโอดในซีรัมสตรีอาสาสมัคร 4 ราย ที่มีรอบเดือน 28 วัน 2 ราย รอบเดือน 24 และ 31 วัน อย่างละราย โดยวิธีผ่านซีไลต์โครมาโตกราฟี พร้อมทั้งวัดปริมาณโปรเจสเตอโรน (P) ลูทีไนซิง-ฮอโมน (LH) และฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอโมน (FSH) พบว่า ระดับเอสตราไดโอดในสตรีอาสาสมัครทั้ง 4 รายจะเริ่มสูงขึ้น ประมาณ 4 วันก่อน LH สูงสุด (peak) ต่อจากนั้นความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุด 487-1,194 พิโคกรัม/ซม<sup>3</sup> และมีค่าเฉลี่ยเป็น 770 พิโคกรัม/ซม<sup>3</sup> ก่อนหนึ่งวัน ที่ระดับ LH จะมียค่าสูงสุด ต่อจากนั้นจะลดลง และเริ่มสูงขึ้นอีกภายหลังจากระดับ LH สูงสุด 2 วัน ค่าสูงสุดในระยะหลังนี้อยู่ระหว่าง 232-608 พิโคกรัม/ซม<sup>3</sup> ค่าเฉลี่ย 380 พิโคกรัม/ซม<sup>3</sup> ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 16 ถึง 19

รูปที่ 16 ระดับลูทีนในซิงฮอร์โมน ฟอสติเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน โพรเจสเทอโรน และเอสตราไดโอดในซีรัมของอาสาสมัครรายที่ 1



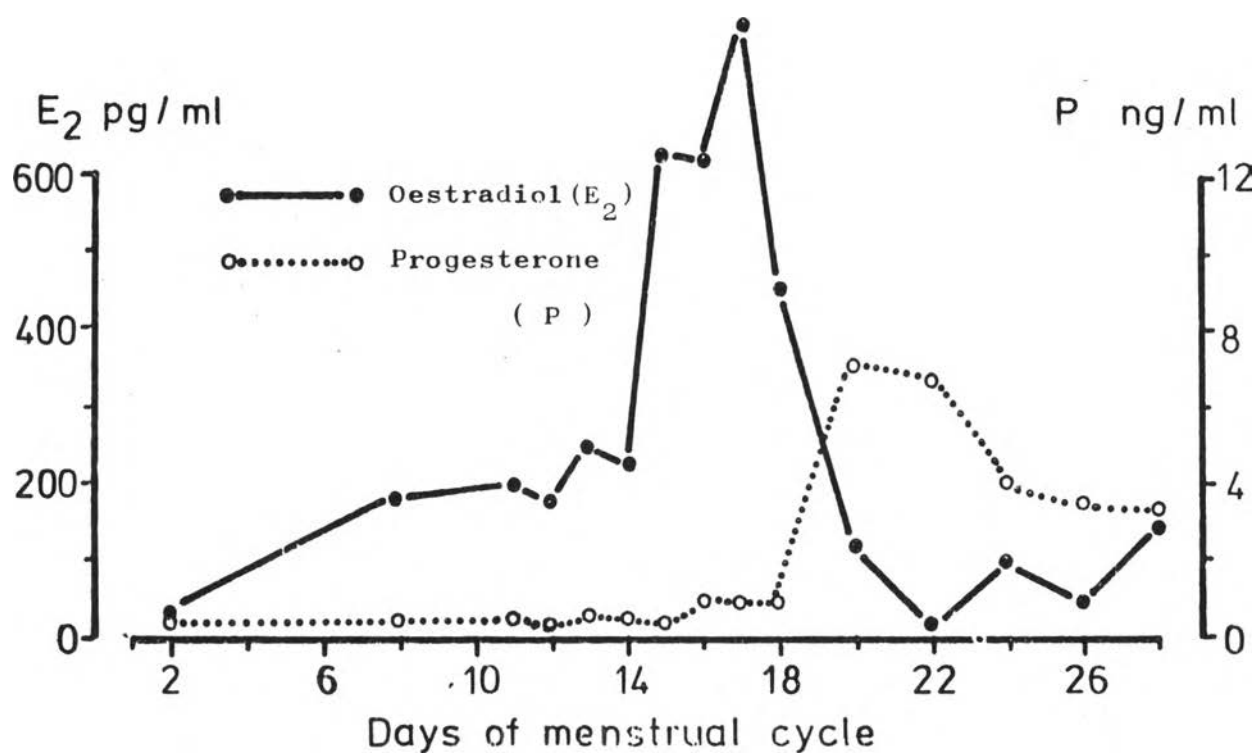
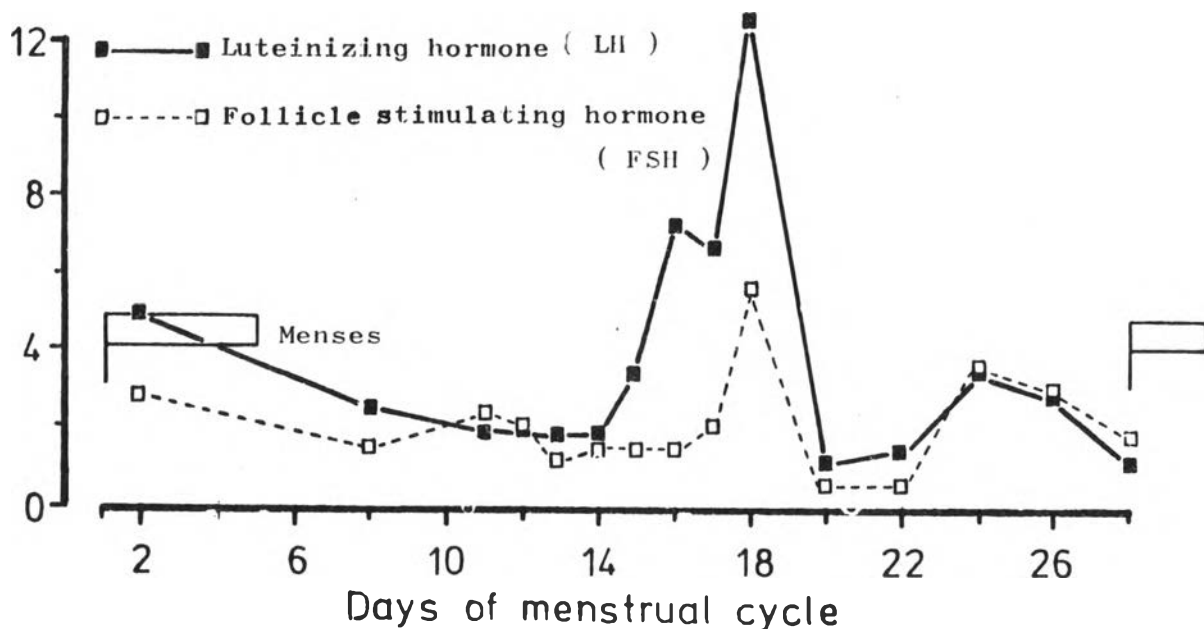


รูปที่ 17 ระดับลูทีนในซิงฮอร์โมน ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน โพรเจสเตอโรน และเอสตราไดโอดในซั้มของอาสาสมัครรายที่ 2



รูปที่ 18 ระดับฮอร์โมนในช่วงรอบเดือน ผลิตและกระตุ้นโดยฮอร์โมน โพรเจสเตอโรน และเอสตราไดโอดในซีรัมของอาสาสมัครรายที่ 3

LH & FSH mIU/ml



รูปที่ 19 ระดับฮอร์โมนในซิงฮอร์โมน ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน โพรเจสเตอโรน และเอสตราไดโอดในซิงฮอร์โมนของอาสาสมัครรายที่ 4

