หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรท พันธุ์วิสตาร์ เพศเมีย อายุ 23 วัน เลี้ยงไว้ในเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นห้องปรับอากาศ อุณหภูมิห้อง 25±1 °ซ ให้ได้รับแสงสว่าง 14 ชั่วโมง คือ ระหว่างเวลา 6.00-20.00 น. และมืด 10 ชั่วโมง คือ ระหว่างเวลา 20.00-6.00 น. โดยใช้สวิทช์ไฟฟ้าอัตโนมัติ กินอาหารสำเร็จรูปมาตรฐานของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ และมีน้ำประปาให้ดื่มตลอดเวลา

1.2 ฮอร์โมนและแอนติบอดี

[2,4,6,7-^{3}H] Estrone, [2,4,6,7,16,17-^{3}H] Estradiol-17β , [1,2,6,7-^{3}H] Progesterone และ [1,2,6,7-^{3}H] Testesterone ของบริษัท Amersham, England

[6,7-^{3}H] Estrone-3 Glucuronide, [6,7-^{3}H] Pregnanediol-3α-Glucuronide และแอนติซีรัมของเพรกเนนไดออล -3 แอลฟ่า-กลูคูโรไนด์ ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก WHO ซึ่งผลิตโดย Dr. Samarajeewa. P., Department of Biochemistry, University College London, England

ฮอร์โมนมาตรฐานอิสโตรน, อิสโตรน-3-กลูคูโรไนด์, เพรกเนนไดออล-3 แอลฟ่า-กลูคูโรไนด์ และแอนติซีรัมของอิสโตรน, อิสโตรน-3 กลูคูโรไนด์ ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Dr. Fortune Kohen, Department of Hormone Research, Weizmann Institute of Science. Israel

ฮอร์โมนมาตรฐานและแอนติซีรัมของอิสตราไดออล-17 เบต้า, โปรเจนเตอโรน และ เทสโทสเตอโรน ของ WHO Matched Reagent Programme, Switzerland

ฮอร์โมนมาตรฐาน เบต้า-ซิสโตสเตอรอล ของบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A. ซึ่งได้รับความเอื้อเฟื้อจาก รองศาสตราจารย์ นิจศิริ เรืองรังษี ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็น AR Grade ทั้งหมด

acetone : จาก E. Merck, Germany

benzene : จาก E. Merck, Germany

n-butyl alcohol : จาก E. Merck, Germany

canada balsm (permount) : จาก Fisher Scientific company, U.S.A.

charcoal reagent : Batch no. 82/83R จาก WHO Matched Reagent Programme, Switzerland

chloroform : จาก E. Merck, Germany

dextran : Batch no. 82/83S จาก WHO Matched Reagent Programme, Switzerland

diethyl ether : จาก E. Merck, Germany

dioxane : จาก Mallinckrodt, Inc., U.S.A.

disodium hydrogen orthophosphate (anhydrous) : จาก E. Merck, Germany

eosin : จาก J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.

ethyl alcohol : จาก E. Merck, Germany

formalin 40% : จาก E. Merck, Germany

gelatin : จาก Bacto Gelatin Difco Laboratory, U.S.A.

glacial acetic acid : จาก E. Merck, Germany

glycerine : จาก E. Merck, Germany

haematoxylin : จาก E. Merck, Germany

hydrochloric acid : จาก E. Merck, Germany

liquifluor : จาก New England Nuclear, U.S.A.

methanol : จาก E. Merck, Germany

olive oil : Product no. O-1500 จาก Sigma Chemical Company, U.S.A.

paraplast : จาก Shurwood Medical Co., U.S.A.

petroleum ether : จาก BDH Chemicals Ltd., England

picric acid : จาก J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.

potass alum : จาก BDH Chemicals Ltd., England

sodium chloride : จาก E. Merck, Germany

sodium hydrogen orthophosphate : จาก E. Merck, Germany

thiomersal (merthiolate) : จาก Sigma Chemical Company, U.S.A.

triton X-100 : จาก E. Merck, Germany

toluene : จาก E. Merck, Germany

xylene : จาก J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.

2. อุปกรณ์

β-counter : Model BPL ของ Packard Instrument Co., U.S.A.

dri-block heater : Model DB-3 ของ Tecam Laboratory and Industrial Equipment, U.S.A.

Duo-UV source : UV Min UVIS 254 nm & 366 nm, Germany

microtome : Model 820 ของ American Optical Rotary Microtome, U.S.A.

refrigerated centrifuge : Model PR-J ของ International Equipment Company, U.S.A.

TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254} : Art. 5554 ของ E. Merck Germany

vaccum freeze dryer : Model 25 SRC ของ The Virtis Company, U.S.A. และ Hamland, England

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การทดลอง

3.1 การเตรียมน้ำมะพร้าวอ่อน

ใช้น้ำมะพร้าวอ่อนน้ำหอมพันธุ์เตี้ย ที่ปลูกในอำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม ในพื้นที่บริเวณใกล้เคียงกัน ผลมะพร้าวอ่อนอายุประมาณ 6 เดือน วัดปริมาณน้ำมะพร้าวอ่อน ได้ค่าเฉลี่ย 325±36.61 มล./ผล มีค่าพิสัยระหว่าง 270-415 มล. และชั่งน้ำหนักเนื้อมะพร้าวอ่อนโดยเฉลี่ย 98.40±15.42 กรัม/ผล มีค่าพิสัยระหว่าง 72.46-129.57 กรัม นำน้ำมะพร้าวอ่อนแต่ละผลมาเทรวมกัน กรองผ่านกระดาษกรอง นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องไลโอฟิไลเซอร์ จากนั้นนำน้ำมะพร้าวอ่อนที่ระเหยจนแห้งดีแล้วมาละลายในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 10:1 สำหรับใช้ในการทดลองทางเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ อินเลเยอร์โครมาโตกราฟีและไบโอเอสเสย์ ยกเว้นการทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของสารในน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อแอนติบอดีอิสโตรน-3-กลูคูโรไนด์ จะละลายน้ำกลั่นในอัตราส่วน 20:1 แล้วแบ่งใส่ขวด ขวดละ 10-200 มล. นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

3.2 การทดสอบทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวอ่อน

3.2.1 การเตรียมน้ำมะพร้าวอ่อนสำหรับการทดสอบทางเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

นำน้ำมะพร้าวอ่อนที่เตรียมไว้จากหัวข้อ 3.1 ปิเปตใส่ลงในหลอดทดลอง โดยใช้น้ำมะพร้าวอ่อนเพื่อทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อแอนติบอดีอิสโตรน (E_1) อิสตราไดออล-17 เบต้า (E_2-17β) โปรเจสเตอโรน (P) และเทสโทสเตอโรน (T) ในปริมาณเท่ากับ 1,000 500 250 และ 1,000 ไมโครลิตร ตามลำดับ มาสกัดด้วยไดเอทธิล อีเธอร์ 5 มล. โดยใช้ vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที ปล่อยให้แยกชั้นนำไปแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งที่อยู่ใน 95% เอทธิลแอลกอฮอล์ โดยแช่เฉพาะชั้นล่าง ชั้นล่างซึ่งเป็นน้ำ ก็จะแข็งตัว เทส่วนของอีเธอร์ใส่ในหลอดทดลอง นำไประเหยแห้งด้วย dri-block heater ที่อุณหภูมิ 30 °ซ

3.2.2 การเตรียมสารละลายสำหรับเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

assay buffer

ละลาย gelatin 1.00 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มล. อุ่นให้ gelatin ละลายจนหมด ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงละลาย

sodium dihydrogen orthophosphate	2.35 กรัม
sodium hydrogen orthophosphate (anhydrous)	11.60 กรัม
sodium chloride	8.80 กรัม
thiomersal	0.10 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นาน 1 เดือน

charcoal suspension

ละลาย dextran 0.0625 กรัม ใน assay buffer 100 มล. แล้วจึงเติม charcoal 0.625 กรัม ใช้แท่งแก้วแม่เหล็กกวน (magnetic bar) บนเครื่อง magnetic stirror เก็บไว้ที่ 4 °ซ ได้นาน 1 เดือน เวลาจะใช้ต้องนำไปกวนด้วยแท่งแม่-เหล็ก ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ตลอดเวลา

scintillation fluid

สูตร I สำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวที่มีต่อแอนติบอดีอิสโตรน-3-กลูคูโรไนด์ (E_1-3G) และ เพรกเนนไดออล-3 แอลฟ่า-กลูคูโรไนด์ (Pd-3α-G) เตรียมโดยละลาย PPO (2,5-diphenyloxazole) 22.5 กรัม ใน toluene 3 ลิตร แล้วเติม triton X-100 1.5 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

สูตร II สำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อแอนติบอดี E_1, E_2-17 β, P และ T เตรียมโดยตวง toluene 3 ลิตร liquifluor 128 มล. และ dioxane 600 มล. ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

ฮอร์โมนติดสลากรังสี

Estrone, Estradiol-17β และ Progesterone working tracer

เตรียมโดยใช้ stock tracer ซึ่งมีความแรง (specific activity) 10 ไมโครคูรี่/มล. ปิเปตมา 100 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 10 มล. ผสมให้เข้ากัน จะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 100 นาโนคูรี่/มล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ

Estrone-3-glucuronide working tracer

เตรียมโดยใช้ stock estrone - 3 - glucuronide tracer 30 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 15 มล. เขย่าให้ละลาย เก็บไว้ที่ 4 °ซ

Pregnanediol-3α-glucuronide working tracer

ใช้ stock pregnanediol-3α-glucuronide tracer 25 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 10 มล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ

Testosterone working tracer

เตรียมโดยใช้ stock testosterone tracer ซึ่งมีความแรง 5 ไมโครคูรี่/มล. จำนวน 150 ไมโครลิตรระเหยให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 5 มล. ผสมให้เข้ากัน จะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 0.75 ไมโครคูรี่/5 มล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ

ฮอร์โมนมาตรฐาน

Estrone, Estrone-3-glucuronide, Estradiol-17β, Progesterone, Pregnanediol-3α-glucuronide และ testosterone standard

เตรียมโดยการใช้ฮอร์โมนมาตรฐาน E_1, E_1-3G, E_2-17β, P, Pd-3α-G และ T 500 ไมโครลิตร มาเติม assay buffer 4.5 ไมโครลิตร จากนั้นทำ serial dilution ของฮอร์โมนมาตรฐานดังกล่าว ให้มีความเข้มข้น ดังตารางที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงการเตรียมความเข้มข้นของฮอร์โมนมาตรฐาน E_1, E_1-3G, E_2-17β, P, Pd-3α-G และ T

ฮอร์โมนมาตรฐาน	stock ของความเข้มข้นของฮอร์โมนมาตรฐาน	ความเข้มข้นที่ต้องการ (serial dilution)
E_1	10 นาโนกรัม/500 ไมโครลิตร	1000-7.8 พิโคกรัม/500 ไมโครลิตร
E_1-3G	80 นาโนกรัม/500 ไมโครลิตร	4000-125 พิโคกรัม/500 ไมโครลิตร
E_2-17β	16 นาโนโมล/ลิตร	800-6.25 เฟมโตโมล/500 ไมโครลิตร
P	24 นาโนโมล/ลิตร	1200-37.5 เฟมโตโมล/500 ไมโครลิตร
Pd-3α-G	100 นาโนกรัม/มล.	5000-39.06 พิโคกรัม/500 ไมโครลิตร
T	22 นาโนโมล/ลิตร	1100-34.38 เฟมโตโมล/500 ไมโครลิตร

แอนติซีรัม

Estrone antisera

เตรียมโดยใช้ estrone antisera 1:2 dilution ปิเปตมา 40 ไมโครลิตร แล้วเติม assay buffer 10 มล. จะได้ estrone antisera 1:500 dilution เตรียมแล้วใช้ได้ทันที

Estrone-3-glucuronide antisera

เตรียมโดยใช้ estrone-3-glucuronide antisera 1:2 dilution มา 10 ไมโครลิตร เติม assay buffer 25 มล. ได้เป็น 1:5000 dilution ผสมให้เข้ากัน เตรียมแล้วใช้ทันที

Estradiol-17β, Progesterone และ Testosterone antisera

เตรียมโดยใช้ antisera ซึ่งอยู่ในสภาพที่ระเหยแห้ง (lyophilized form) จาก WHO นำมาเติม 10 มล. assay buffer เขย่าให้ละลาย เตรียมแล้วใช้ทันที

Pregnanediol-3α-glucuronide antisera

เตรียมโดยใช้ pregnanediol-3α-glucuronide antisera 1:2 dilution ปิเปตมา 5 ไมโครลิตร เติม assay buffer 10 มล. ผสมให้เข้ากัน

จะได้ความเข้มข้นเป็น 1:4000 dilution เตรียมแล้วใช้ทันที

3.2.3 การทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อแอนติบอดี E_1, E_2-17β, P และ T

นำหลอดทดลองที่ระเหยอีเธอร์จนแห้งสนิทดีแล้วจากหัวข้อ 3.2.1 มาเติม assay buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากันอีกครั้งเป็น assay tubes

เตรียม standard estrone ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 และ 1,000 พิโคกรัม/500 ไมโครลิตร โดยการทำ serial dilution แล้วปิเปตแต่ละความเข้มข้นมา 500 ไมโครลิตร/หลอดทดลอง

นำ assay tubes และ standard tubes มาเติม estrone working tracer และ estrone antisera อย่างละ 100 ไมโครลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเติมสารละลายในหลอดทดลองต่าง ๆ เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยี ของน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อแอนติบอดี E_1

หลอดทดลอง	assay buffer (ไมโครลิตร)	tracer (ไมโครลิตร)	antibody (ไมโครลิตร)	ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 °ซ นาน 18-24 ชั่วโมง	charcoal suspension (ไมโครลิตร)
Tc*	600	100	-		-
NSB*	600	100	-		200
TB_o*	500	100	100		200
สารละลายมาตรฐาน หรือ สารละลายตัวอย่าง	500	100	100		200

หมายเหตุ Tc* = total count, NSB* = non specific binding

TB_o* = maximum binding

013015

หลังจากเติม tracer และ antibody แล้ว เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางในถาดที่มีน้ำแข็ง แล้วจึงเติม charcoal suspension 200 ไมโครลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ที่ 4 °ซ นาน 15 นาที นำไปปั่นแยกเอาส่วน free form ที่จับอยู่กับ charcoal ออก ที่ 500 × g (2,500 รอบต่อนาที) ที่ 4 °ซ นาน 15 นาที เทส่วนใสที่เป็น bound form ใส่ใน counting vial เติม scintillation fluid สูตร II 4.5 มล. เขย่าและนำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง β- counter นาน 5 นาที ต่อ vial

สำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อแอนติบอดี E_2-17β, P และ T นั้น ใช้วิธีการทดสอบทางเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ เช่นเดียวกันกับการทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อแอนติบอดี E_1 ซึ่งวิธีการดังกล่าวดัดแปลงจากวิธีการของ WHO (1981)

3.2.4 <u>การทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวอ่อน ที่มีต่อแอนติบอดี E_1-3G และ Pd-3α-G</u>

ใช้วิธี dilution หรือ non-extraction method (ดัดแปลงตามวิธีการของ Collins, Collins, Kilpatrick, Manning, Pike and Tyler, 1979; Stanczyk, Miyakawa and Goebelsmann, 1980; Adlercreutz, Brown, Collins, Goebelsman, Kellie, Campbell, Spieler and Braissand, 1982) ดังนี้

นำน้ำมะพร้าวอ่อนที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.1 ปิเปตลงในหลอดทดลองในปริมาณ 425 ไมโครลิตร ทำให้เจือจางด้วย assay buffer 75 ไมโครลิตร รวมปริมาตรเป็น 500 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นเป็น 5.7:1 เป็น assay tubes

เตรียม standard E_1-3G โดยการทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 125, 250, 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 พิโคกรัม/500 ไมโครลิตร

นำ assay tubes และ standard tubes มาเติม tracer และ antibody อย่างละ 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำเช่นเดียวกันกับการทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อแอนติบอดี E_1 ตามขบวนการทาง RIA ยกเว้นใช้ scintillation fluid สูตร I แทนสูตรII

สำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อแอนติบอดี Pd-3α-G นั้น ใช้วิธีการทำเช่นเดียวกับ E_1-3G แต่ใช้น้ำมะพร้าวอ่อนจากหัวข้อ 3.1 ในปริมาณ 250 ไมโครลิตร แล้วทำให้เจือจางด้วย assay buffer 250 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นเป็น 1:1 เป็น assay tubes

และเตรียม standard Pd-3α-G ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 39.06, 78.125, 312.5, 625, 1,250, 2,500 และ 5,000 พิโคกรัม/500 ไมโครลิตร หลังจากนั้น ทำเช่นเดียวกันกับการทดสอบคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีของน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อแอนติบอดี E_1-3G

3.2.5 การคำนวณผลทางเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

นำค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ (count per minute, CPM) ของแต่ละ vial ซึ่งทำซ้ำกันตัวอย่างละ 3 vial มาหาค่าเฉลี่ย แล้วหักออกด้วยค่า CPM เฉลี่ยของ NSB ทุกตัวอย่าง ยกเว้นส่วนที่เป็น Tc จากนั้นนำแต่ละค่าดังกล่าวไปหารค่าเฉลี่ย CPM ของ TB_o คูณด้วย 100 ได้เป็น % B/TB_o ของแต่ละค่า ดังนี้

$$\% \ B/TB_o = \frac{(\text{ค่าเฉลี่ย CPM ของตัวอย่าง} - \text{ค่าเฉลี่ย CPM ของ NSB})}{\text{ค่าเฉลี่ย CPM ของ } TB_o} \times 100$$

เขียนกราฟบน semi-logarithm ระหว่าง % B/TB_o กับ log ความเข้มข้นของฮอร์โมนมาตรฐาน จากกราฟมาตรฐานดังกล่าว สามารถอ่านค่าปริมาณของสารที่มีอยู่ในน้ำมะพร้าวอ่อน ซึ่งสามารถจับกับแอนติบอดีที่เราทดสอบได้

% bound ของแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ tracer เมื่อไม่มีสารมาตรฐาน คำนวณได้จาก

$$\frac{(\text{ค่าเฉลี่ย CPM ของ } TB_o - \text{ค่าเฉลี่ย CPM ของ NSB})}{\text{ค่าเฉลี่ย CPM ของ Tc}} \times 100$$

3.2.6 การประเมินความเชื่อถือได้ของเอสเสย์

การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการตรวจวัดสาร โดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ Ekin (1970) และ Abraham (1974) ได้ให้ข้อเสนอว่า ควรจะมีการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) และความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) เพื่อเป็นข้อบ่งชี้ว่าวิธีการนี้มีความน่าเชื่อถือ

ได้มากน้อยเพียงใด ดังรายละเอียดของแต่ละหัวข้อดังนี้

ความจำเพาะ (specificity)

หมายถึงความสามารถของแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนนั้น ๆ ได้กี่เปอร์เซนต์ และสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการจะวิเคราะห์ได้มากน้อยเท่าใด ถ้าแอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะสูง ก็จะทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนนั้น ๆ ได้ 100% และจะไม่ทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนอื่นที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนที่จะวิเคราะห์

การหาความจำเพาะของแอนติบอดี ทำได้โดยการใช้แอนติบอดีนั้นทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนที่ต้องการจะวิเคราะห์พร้อมกับฮอร์โมนอื่น ๆ ที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วหาความจำเพาะของแอนติบอดี โดยคิดเป็น % cross reaction ดังนี้

$$\% \text{ cross reaction} = \frac{\text{ปริมาณสารมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ 50\%}}{\text{ปริมาณของสารมาตรฐานที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ 50\%}} \times 10$$

ความแม่นยำ (precision)

หมายถึงความสามารถในการวิเคราะห์สารแต่ละครั้งได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งจะทดสอบความแม่นยำได้โดยทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างชนิดเดียวกันหลาย ๆ ครั้ง แล้วหาความแม่นยำของการวิเคราะห์โดยคำนวณเปอร์เซนต์สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (% coefficient of variation, % CV) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\% \text{ CV} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสาร (SD)}}{\text{มัชฌิมเลขคณิต } (\bar{X})} \times 100$$

การทดสอบความแม่นยำ ทำได้โดยการนำน้ำมะพร้าวที่เตรียมไว้จากหัวข้อ 3.1 โดยใช้ปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนเพื่อทดสอบกับแอนติบอดี E_1 = 1000, E_1-3G = 425, E_2-17β = 500, P = 250, Pd-3α-G = 250 และ T = 1000 ไมโครลิตร สกัดด้วยอีเธอร์ 5 มล. นาน 1 นาที ยกเว้น E_1-3G และ Pd-3α-G ที่ใช้วิธี dilution นำไปผ่านขบวนการทางเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ ซึ่งจะทำการทดสอบความแม่นยำของการวัดภายในชุดเดียวกัน เรียกว่า intraassay precision 6 ตัวอย่าง และต่างชุดกันหรือระหว่างชุด เรียกว่า interassay precision 2 ชุด

ความถูกต้อง (accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ หาได้จากการนำสารหรือฮอร์โมนที่ทราบปริมาณที่แน่นอน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแล้วเทียบกับปริมาณฮอร์โมนที่แท้จริง คิดออกมาเป็นเปอร์เซนต์ ก็จะทราบเปอร์เซนต์ความถูกต้องของการวิเคราะห์

$$\% \text{ accuracy} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนจริง}} \times 100$$

ทำโดย ปิเปตฮอร์โมนมาตรฐาน E_1 = 100 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร, E_1-3G = 800 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร, E_2-17β = 27.2 พิโคกรัม (หรือ 100 เฟมโตโมล)/100 ไมโครลิตร, P = 31.4 พิโคกรัม (หรือ 100 เฟมโตโมล)/100 ไมโครลิตร, Pd-3α-G = 500 พิโคกรัม/50 ไมโครลิตร และ T = 31.68 พิโคกรัม (หรือ 110 เฟมโตโมล)/50 ไมโครลิตร สกัดด้วยอีเธอร์ 5 มล. นาน 1 นาที ยกเว้น E_1-3G และ Pd-3α-G ที่ใช้วิธี dilution นำไปผ่านขบวนการทางเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ ซึ่งจะทำการตรวจวัดความถูกต้องของการเอสเสย์ฮอร์โมนละ 2 ชุด ชุดละ 6 ตัวอย่าง

ความไวของการวิเคราะห์

ความไวของการวิเคราะห์ หมายถึง ค่าที่น้อยที่สุดของสารที่วิธีการวิเคราะห์นั้นสามารถวัดได้ ทำได้โดยการทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเดียวกับความเข้มข้นของสารที่นำมาทำกราฟมาตรฐาน มีความเข้มข้นละ 10 ค่า นำค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากจุดศูนย์ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ที่ขอบเขตความเชื่อมั่นที่ 95%(-2SD) ลากมาตัดกราฟมาตรฐานจุดใดจุดนั้นจะเป็นความไวของการวิเคราะห์

3.3 การทดสอบแยกชนิดของสารที่มีอยู่ในน้ำมะพร้าวอ่อน โดยวิธีธินเลเยอร์-โครมาโตกราฟี

นำน้ำมะพร้าวอ่อนที่เตรียมไว้จากหัวข้อ 3.1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาสกัดด้วยไดเอทธิล อีเธอร์ 5 มล. จนได้ปริมาตรสารสกัด จากน้ำมะพร้าวอ่อน คิดเทียบกับปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้งทั้งหมด 5,000 มล. นำมาละลายในเอทธิล แอลกอฮอล์ 1 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

นำแผ่นธินเลเยอร์ ซึ่งเป็นแผ่นสำเร็จรูปที่ทำด้วยอลูมิเนียม เคลือบด้วยซิลิกา เจล ไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น หลังจากนั้น ปล่อยให้เย็นใน dessicator เป็นเวลา 15 นาที

ในการทดลองนี้ ต้องการทราบว่าสารที่มีในน้ำมะพร้าวอ่อน มีอะไรบ้างที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเพศ จึงได้ spot สารตัวอย่างเทียบกับสารละลายฮอร์โมนมาตรฐาน อิสโตรน อิสตราไดออล-17 เบต้า โปรเจสเตอโรน และเบต้า- ซิสโตสเตอรอล โดยใช้สารที่ใช้แยกทั้งหมด 7 ชนิดได้แก่

1. petroleum ether : diethyl ether (95:5)
2. benzene : ethyl alcohol (9:1)
3. chloroform : methanol (95:5)
4. chloroform
5. chloroform : acetone (95:5)
6. chloroform : dioxane (95:5)
7. chloroform : diethyl ether (95:5)

วิธีทำ : spot สารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ (1 มก./มล. เอทธิลแอลกอฮอล์) ลงบนแผ่นธินเลเยอร์ ให้ห่างจากปลายล่างประมาณ 2 ซม. เรียกว่า จุดเริ่มต้น และจุดที่ spot ให้ห่างกันจุดละประมาณ 2 ซม. พร้อมกับสารสกัดอย่างหยาบจากน้ำมะพร้าวอ่อน เมื่อคิดเทียบเป็นปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้งเท่ากับ 500 มล./spot ขนาดของจุดไม่ควรให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางเกิน 1-2 มม. ทำทั้งหมด 7 แผ่น นำแต่ละแผ่นไปแช่ในภาชนะที่มีสาร-ละลายที่เตรียมไว้แยกกัน 7 ชนิด ปิดฝาภาชนะกันไม่ให้สารละลายระเหยออก ปล่อยให้สารละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวทำละลาย เคลื่อนที่พาสารที่มีในสารตัวอย่าง ซึ่งมีสัมพรรคภาพ (affinity) ต่อตัวทำละลายที่อยู่ในซิลิกาเจลต่างกัน ถ้าสารที่ต้องการแยกที่มีอยู่ในน้ำมะพร้าว มีสัมพรรคภาพ ต่อตัวทำละลายที่อยู่ในซิลิกา เจล ได้ดี ก็จะเคลื่อนที่ไปได้ช้า ส่วนสารที่มีสัมพรรค-ภาพต่อตัวทำละลายไม่ดี ก็จะถูกชะออกจากจุดเริ่มต้นให้เคลื่อนที่ได้เร็ว อัตราส่วนปริมาณความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดที่แข่งละลายระหว่างตัวทำละลายนี้จะมีค่าคงที่เรียกกว่า Rf value ซึ่งมีค่าเท่ากับระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นหารด้วยระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นที่เรียกว่า solvent front เมื่อปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่สูงห่างจากขอบบนประมาณ 1 ซม. นำแผ่นธินเลเยอร์ออก ทำให้แห้ง แล้วส่องดูตำแหน่งของสารที่

เคลื่อนที่ด้วยหลอดไฟอุลตราไวโอเลต ที่ความยาวช่วงคลื่น 254 นาโนเมตร และ 366 นาโนเมตร ทำเครื่องหมายตำแหน่งที่สารนั้นเคลื่อนที่ วัดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ แล้วหา Rf value เทียบกับสารมาตรฐานก็จะทราบว่าสารที่แยกออกมาเป็นสารชนิดใดได้

3.4 การทดสอบทางไบโอเอสเสย์ของน้ำมะพร้าวอ่อน

3.4.1 การเตรียมน้ำมะพร้าวอ่อนสำหรับฉีดในสัตว์ทดลอง

นำน้ำมะพร้าวอ่อนที่เตรียมไว้จากหัวข้อ 3.1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาสกัดด้วยไดเอทธิล อีเธอร์ 5 มล. โดยใช้ vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที ปล่อยให้แยกชั้น นำไปแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งที่อยู่ใน 95% เอทธิล แอลกอฮอล์ โดยแช่เฉพาะชั้นล่าง ชั้นล่างซึ่งเป็นน้ำก็จะแข็งตัว เทส่วนของอีเธอร์ใส่ในหลอดทดลองที่สะอาด นำไประเหยแห้งด้วย dri-block heater ทำเช่นเดียวกันนี้หลาย ๆ ครั้ง จนได้สารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อนเมื่อคิดเทียบปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้งเท่ากับ 35,000 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 °ซ จนกว่าจะนำมาละลายในน้ำมันมะกอกสำหรับใช้ในการทดลอง

3.4.2 วิธีการทดสอบผลทางชีววิทยาของสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อน ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอสโตรเจนต่อมดลูกของหนูแรท

ใช้หนูแรท เพศเมียอายุ 23 วัน น้ำหนักโดยเฉลี่ย 34.97±3.08 กรัม จำนวน 84 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม จำนวน 12 ตัว

ฉีดน้ำมันมะกอก 3 มล./กก. น้ำหนักตัว/วัน เข้าใต้ผิวหนัง

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง จำนวน 24 ตัว

นำน้ำมะพร้าวอ่อนที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 3.4.1 มาละลายในน้ำมันมะกอก แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังในปริมาตร 3 มล. ต่อ กก.น้ำหนักตัวต่อวัน โดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มย่อยการทดลองคือ

กลุ่มที่ 2.1 จำนวน 6 ตัว จะได้รับสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อน เมื่อคิดเทียบเป็นปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้งเท่ากับ 2,000 มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มที่ 2.2 จำนวน 6 ตัว จะได้รับสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อน เมื่อคิดเทียบเป็นปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้งเท่ากับ 4,000 มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มที่ 2.3 จำนวน 12 ตัว จะได้รับสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อน เมื่อคิดเทียบเป็นปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้ง เท่ากับ 7,500 มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ทดลองฉีดฮอร์โมนมาตรฐานอิสตราไดออล-17 เบต้า จำนวน 48 ตัว

ฉีดฮอร์โมนมาตรฐานอิสตราไดออล- 17 เบต้า ที่ละลายในน้ำมันมะกอก ซึ่งมีความเข้มข้น 8, 43, 71 และ 143 นาโนกรัม/3 มล.น้ำมันมะกอก/กก.น้ำหนักตัว/วัน ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 12 ตัว

หลังจากฉีดหนูแรท ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน ในเช้าวันที่ 4 ของการทดลอง ฆ่าหนูทุกกลุ่มโดยให้ดมยาสลบไดเอทธิล อีเธอร์ แล้วเปิดหน้าท้องเป็นช่องกว้าง ตัดมดลูกทั้งสองข้างออกมา เลาะไขมันออกให้หมด ซับเลือดออก แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมดลูกมาตัดเป็นท่อนขนาดไม่เกิน 3 มม. แช่ในน้ำยา Bouin เพื่อศึกษาลักษณะทาง histology ต่อไป

3.4.3 การเตรียมมดลูกเพื่อศึกษาทาง histology

วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อของมดลูก เพื่อศึกษาทาง histology ดัดแปลงตามวิธีการของเวคิน นพนิตย์ (2524) ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

นำมดลูกที่แช่ในน้ำยา Bouin นาน 18-24 ชั่วโมง ไปล้างด้วย 70% เอทธิล แอลกอฮอล์ นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาดูดน้ำออก (dehydration) ด้วย เอทธิล แอลกอฮอล์ 90%, 95%, 100% จนถึงไซลีน ผ่านพาราพลาสแล้วนำไปฝังในพาราพลาส ทิ้งไว้ให้เย็น ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 6 ไมครอน ด้วยไมโครโตม ย้อมสีฮีมาตอกซีลิน และ อีโอซิน ดูลักษณะของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.5 การวิเคราะห์และแปลผลทางสถิติ

ผลการทดลองจะรายงานในรูปของค่าเฉลี่ย ± ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X}$±SD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้ student's unpaired t-test ซึ่งจะพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% หรือที่ $P < 0.05$