บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

2.1. สัตว์ทดลอง

แม่กระบือปลักอายุอยู่ในช่วงระหว่าง 3-5 ปี คลอดลูกมาแล้วเป็นเวลา 45 วัน และอยู่ในระหว่างการให้นมลูกจำนวน 5 ตัว คือ เบอร์ 301 302 303 304 และ 305 มีการจัดการและการเลี้ยงด้วยเทคโนโลยีพื้นบ้าน โดยปล่อยให้แทะเล็มหญ้าตั้งแต่เวลา 7.00 น. - 17.00 น.ของทุกวัน บริเวณริมอ่างเก็บน้ำบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนะ

2.2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

Beta counter (LKB-Wallac 1216 Rackbeta LKB,Wallac, Finland)

Gamma counter (LKB-Wallac 1280 Ultrogamma LKB, Wallac, Finland)

Micropipette (Finnpipette Ky, Helsinki, Finland)

Microsyringe (Hamilton syringe dispenser :LT 1500 Hamilton Bonadez, Switzerland.)

Mixer (Lab-line instrument, USA.)

pH-meter (Orion model 720 A, Orion Research Incoporated, USA.)

Refrigerated centrifuge (MSE coolspin scientific Instruments, England)

2.3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.3.1 ฮอร์โมนและแอนติบอดี

ฮอร์โมนและแอนติบอดี	แหล่งที่ผลิต
Gn-RH (Fertagyl)	Intervet International B.V. Boxmeer Holland
1st LH antibody (AS-LH 901)	Prof.Dr.D. Schams Institut Für Physiologie, Germany
2nd LH antibody (anti-rabit-globulin from sheep)	"
Oestradiol 17-B antiserum #8932 (180381)	Dr.R.I. Cox, Csiro Prospect, NSW., AUS.
1,2,6,7,16,17-^{3}H Oestradiol)	Amersham, UK.
Progesterone antiserum (P/040)	โครงการการใช้นิวเคลียร์เทคโนโลยีเพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1,2,6,7-^{3}H Progesterone	Amersham, UK.
Standard LH (bLH-DSA)	Prof.Dr.D. Schams Institut Fur Physiologie, Germany

ฮอร์โมนและแอนติบดี	แหล่งที่ผลิต
Standard Oestradiol 17-B (cat.No.Art 8964)	Merck, Germany
Standard Progesterone (cat.No.24614)	Merck, Germany

2.3.2 เคมีภัณฑ์

ชื่อสารเคมี	หมายเลขแคตตาล็อค	แหล่งที่ผลิต
Benzene	-	Merck, Germany
Buffalo serum	-	โครงการการใช้นิวเคลียร์ฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
Cellulose(type HBs)	-	Serva Feinbiochemica Heidelberg, Germany
Choloramine-T	G.R.	Merck, Germany
Dextran T-60	18692	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Germany
Diethylether	Art.921	Merck, Germany
Di-Sodiumhydrogenphosphate di-hydrate($Na_2HPO_4.2H_2O$)	Art.6580	Merck, Germany
Di-Sodiumhydrogenphosphate heptahydrate($Na_2HPO_4.7H_2O$)	Art.6574	Merck, Germany
Ethanol	-	Merck, Germany

ชื่อสารเคมี	หมายเลขแคตตาล็อค	แหล่งที่ผลิต
Gelatin	22151	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Germany
Heparin Leo injection	-	Leo Pharmaceutical Products, Denmark
Human Albumin	-	Behring Werke AG, Germany
Merthiolate	1/375	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Germany
Normal horse serum	-	โครงการการใช้นิวเคลียร์ฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
Norit A	30890	Serva Feinbiochemica, GmbH & Co, Germany
POPOP($C_{24}H_{16}N_2O_2$)	Art.7249	Merck, Germany
Potassium dihydrogen phosphate(KH_2PO_4)	Art.4873	Merck, Germany
Potassium iodide(KI)	G.R.	Merck, Germany
p-Terphenyl	T 1250	Sigma, USA
Sephadex G-50 (20-80 μ)		Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
Silicone	-	Serva Feinbiochemica Hcidelberg, Germany
Sodium chloride	Art.6404	Merck, Germany

ชื่อสารเคมี	หมายเลขแคตตาล็อค	แหล่งที่ผลิต
Sodium di-hydrogenphosphate monohydrate($NaH_2PO_4.H_2O$)	Art.6346	Merck, Germany
Sodium iodide-125		Amersham, U.K.
Sodium metabisulphite	G.R.	Merck, Germany
Toluene	Art.832 5	Merck, Germany
Tri-distilled water	-	องค์การเภสัชกรรม

2.3.3. บัฟเฟอร์และสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

<u>ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0</u>

สารละลาย ก. โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.50 M. เตรียมจากชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โมโนไฮเดรต จำนวน 69.005 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน

สารละลาย ข. โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.10 M. เตรียมจากการชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เฮปตะไฮเดรต จำนวน 26.81 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน

สารละลาย ค. โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.04 M. เตรียมจากการชั่งโซเดียมคลอไรด์จำนวน 61.425 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร เติมเมอธิโอเลต จำนวน 0.75 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน

ตวงสารละลาย ก. ปริมาตร 6.66 มิลลิลิตร สารละลาย ข. ปริมาตร 66.07 มิลลิลิตร และสารละลาย ค. ปริมาตร 133.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายเจลลาติน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้พีเอช 7.0

สารละลาย 0.5 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5

เตรียมจากการชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โมโนไฮเดรต จำนวน 74.5 กรัม และโปรแตสเซี่ยม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 11.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็น กรด-ด่างให้ได้พีเอช 7.5

สารละลาย 0.05 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5

เตรียมจากการชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต จำนวน 7.44 กรัม และโปรแตสเซี่ยมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจำนวน 1.117 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้พีเอช 7.5

สารละลาย 0.01 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5

เตรียมจากการชั่งไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 1.45 กรัม และโปรแตสเซี่ยมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 0.223 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้พีเอช 7.5

สารละลายแอลบูมิน บัฟเฟอร์

เตรียมจากการชั่งแอลบูมินจากมนุษย์ จำนวน 500 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลาย 0.05 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ให้มีปริมาตร 1 ลิตร

2.3.4 การติดสลาก LH ด้วยไอโอดีน 125

แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนที่ 1 การติดสลาก LH ด้วยไอโอดีน 125

ขั้นตอนที่ 2 การทำสารละลายติดสลากให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนที่ 1 การติดสลาก LH ด้วยไอโอดีน 125

1. เติมโซเดียมไอโอไดด์ 0.5 มิลลิคูรี ใน 50 ไมโครลิตร ของ 0.05 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ลงในหลอดทดลองสำหรับใช้ในการติดสลากรังสี
2. เติมสารละลาย LH มาตรฐาน จำนวน 5 ไมโครกรัม ใน 25 ไมโครลิตร ของ 0.5 M.ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.5
3. เขย่าให้เข้ากันเล็กน้อยด้วยเครื่องเขย่า
4. เติมคลอรามีน-ที(ละลายคลอรามีน-ที จำนวน 20 มิลลิกรัมใน 10 มิลลิลิตร 0.05 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5) ลงไปปริมาตร 25 ไมโครลิตร
5. เขย่าให้เข้ากันทันทีโดยใช้เครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 วินาที
6. หยุดปฏิกริยาโดยเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ (ละลายโซเดียมจำนวน 2 มิลลิกรัมใน 10 มิลลิลิตรของ 0.05 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร) แล้วเขย่าให้เข้ากัน
7. เติมโปรแตสเซี่ยมไอโอไดด์ (ละลายโปรแตสเซี่ยมไอโอไดด์จำนวน 20 มิลลิกรัมใน 0.05 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร) ลงไปปริมาตร 200 ไมโครลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากันเล็กน้อย
8. ดูดสารละลายทั้งหมดเติมลงใน เซฟาเดกซ์ จี-50 คอลัมน์ ด้วยพาสเจอร์ปิเปตที่เคลือบด้วยซิลิโคน แล้วล้างหลอดทดลองด้วยโปรแตสเซี่ยมไอโอไดด์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรแล้วเติมลงในคอลัมน์อีก

ขั้นตอนที่ 2 การทำสารละลายติดสลากให้บริสุทธิ์

<u>การทำสารละลายติดสลากให้บริสุทธิ์ ครั้งที่ 1</u> โดยการผ่านคอลัมน์ด้วย 0.05 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาในหลอดทดลองขนาด 3 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บทั้งหมดประมาณ 20 หลอด (ในหลอดที่ 4-10 เติมแอลบูมิน บัฟเฟอร์ ลงไปหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร เพื่อรองรับสารละลายที่ได้จากคอลัมน์) หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่องวัดรังสีแกมม่า จากการผ่านเซฟาเดกซ์จี-50 คอลัมน์ สารติดสลากที่ได้จะออกมาก่อน

<u>การทำสารละลายติดสลากให้บริสุทธิ์ ครั้งที่ 2</u> ด้วยการผ่านเซลลูโลสคอลัมน์ โดยการเติมสารติดสลากที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งแรก ลงในเซลลูโลสคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วผ่านคอลัมน์ด้วย 0.01 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ด้วยหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร คอยตรวจปริมาณรังสีในหลอดทดลองที่เก็บได้แต่ละหลอด ซึ่งส่วนของฮอร์โมนที่ถูกทำลายจะออกมาเป็นส่วนแรก เก็บต่อไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งปริมาณรังสีที่วัดได้ลดลงจึงเติมซีรั่มม้าปกติ 2 มิลลิลิตร ซึ่งละลายด้วย 4 มิลลิลิตรของ 0.5 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ลงไปในคอลัมน์เพื่อเป็นตัวดึงเอาส่วนของสารติดสลากที่ติดอยู่ในคอลัมน์ออกมา เก็บสารละลายที่ได้ออกมาในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร สารติดสลากที่ได้จะออกมาพร้อมกับสารละลายของซีรั่มม้าปกติที่เติมลงไป ตรวจได้จากปริมาณรังสีที่ออกมาโดยการวัดด้วยเครื่องวัดรังสีแกมม่า

2.4. <u>วิธีการดำเนินการวิจัย</u>

การดำเนินการวิจัยแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ

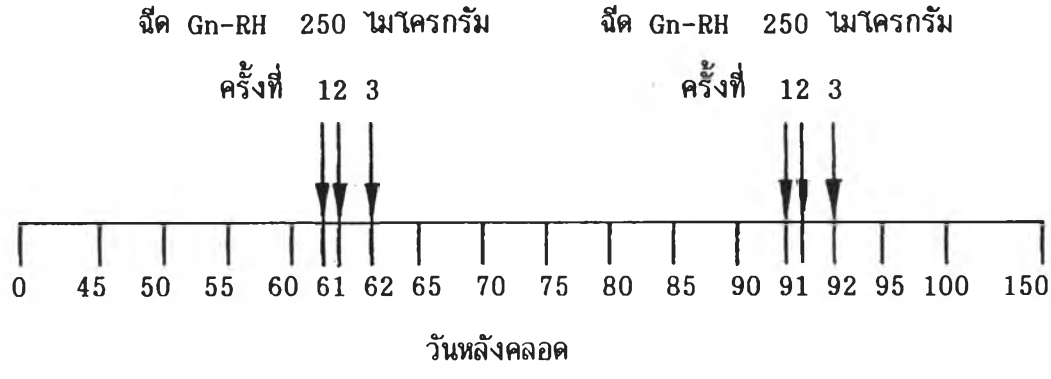
ขั้นตอนที่ 1. การฉีด Gn-RH และการเก็บตัวอย่างพลาสมา

ขั้นตอนที่ 2. การส้วงตรวจรังไข่ผ่านทางทวารหนัก

ขั้นตอนที่ 3. การวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน LH และ ฮอร์โมน เอสตราไดออล 17-เบต้า ในพลาสมา

ขั้นตอนที่ 1 <u>การฉีด Gn-RH และการเก็บตัวอย่างพลาสมา</u>

<u>การฉีด Gn-RH</u>



รูปที่ 2.1 แสดงแบบแผนการฉีด Gn-RH ขนาด 250 ไมโครกรัม ในแม่กระบือหลังคลอด

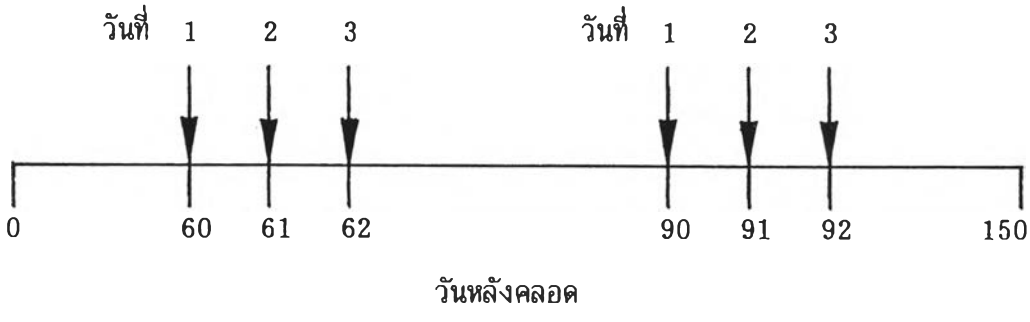
ทำการฉีด Gn-RH ขนาด 250 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอ โดยแบ่งฉีด 3 ครั้ง ครั้งละเท่า ๆ กัน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และ 2.2 โดยครั้งแรกฉีด เวลา 6.00 น. ครั้งที่ 2 เวลา 12.00 น. หลังคลอด 61 วัน และครั้งที่ 3 ฉีดเวลา 6.00 น. หลังคลอด 62 วัน และถ้าพบว่าหลังการฉีดแล้วรังไข่ไม่ทำงาน จากการตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมาพบว่าต่ำกว่า 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลาติดต่อกันมากกว่า 3 สัปดาห์ (Barkawi et al,1987) จะทำการฉีดซ้ำอีกโดยฉีดครั้งที่ 1,2 หลังคลอด 91 วัน และครั้งที่ 3 หลังคลอด 92 วัน

รูปที่ 2.2 แสดงการฉีด Gn-RH เข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอของแม่กระบือทดลอง

<u>การเก็บตัวอย่างพลาสมาเพื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน หลังคลอด 45-150 วัน</u>

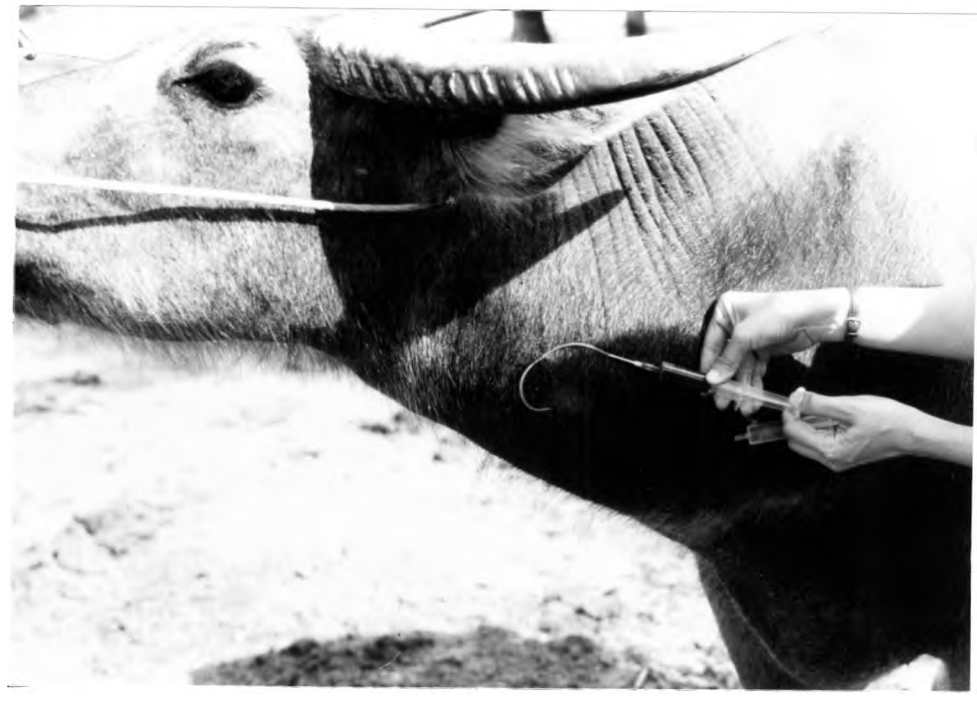
โดยการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำ จูกูลาร์ ทุก ๆ 5 วัน โดยทำการเก็บเลือดในวันหลังคลอด 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 และ 150 การเก็บจะเก็บตัวอย่างเลือดครั้งละ 7.0 มิลลิลิตร ด้วยหลอดเก็บเลือดที่เคลือบด้วยสารกันเลือดแข็งตัวเฮปปาริน จากนั้นจึงนำมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นแยก เก็บส่วนพลาสมาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนถึงเวลาทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

การเก็บตัวอย่างพลาสมาทุก 10 นาที เพื่อวิเคราะห์ LH
ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และฮอร์โมน เอสตราไดออล 17-เบต้า



รูปที่ 2.3 แสดงแบบแผนการเก็บตัวอย่างพลาสมาทุก 10 นาที เป็นเวลา 3 วัน วันละ 12 ชั่วโมง

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดทุก 10 นาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในวันที่ 60 61 และ 62 หรือ 90 91 และ 92 ดังแสดงในรูปที่ 2.3 โดยสอดสายแคทธิเตอร์ (catheter) ผ่านเข็มเบอร์ 16 ที่เจาะผนังหลอดเลือดดำจูกูลาร์ โดยที่ปลายด้านหนึ่งเย็บติดกับผิวหนังบริเวณคอ และปิดทับด้วยเทป ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ซึ่งเป็นวิธีการที่จะทำให้สัตว์เครียดน้อยที่สุด (Kamonpatana et al, 1980) และทำการล้างสายแคทธิเตอร์ด้วยเฮปปารินที่เจือจางด้วยน้ำเกลือ ทุกครั้งหลังจากเก็บเลือดครั้งละ 7 มิลลิลิตร และทำการเก็บตัวอย่างพลาสมาโดยแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่หนึ่งเป็นพลาสมาที่เก็บทุก 10 นาที เพื่อวิเคราห์ระดับ LH และส่วนที่สอง เป็นพลาสมาที่เก็บทุกชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และฮอร์โมน เอสตราไดออล 17-เบต้า



รูปที่ 2.4 แสดงการเก็บตัวอย่างเลือดกระบือทุก 10 นาทีด้วยไซริงก์ขนาด 10 มิลลิลิตร โดยผ่านทางสายแคทธิเตอร์

ขั้นตอนที่ 2 <u>**การล้วงตรวจรังไข่ผ่านทางทวารหนัก**</u>

การล้วงตรวจรังไข่ผ่านทางทวารหนัก เพื่อบอกลักษณะที่พบบนรังไข่ เช่น ฟอลลิเคิลหรือคอร์ปัสลูเทียมและขนาดของรังไข่ ทำตามวิธีของ Lohachit และคณะ (1985) กระทำโดยเจ้าหน้าที่ของโครงการการใช้นิวเคลียร์ฯ โดยทำการล้วงตรวจรังไข่ผ่านทางทวารหนักทุกครั้งที่มีการเก็บตัวอย่างพลาสมาทุก 5 วัน ตั้งแต่หลังคลอด 45-150 วัน

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน LH และ ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ในพลาสมา

ใช้วิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ (Kamonpatana et al,1976, and 1980) โดยทำการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ RIA ของโครงการการใช้นิวเคลียร์ฯ คณะสัตวแพทย-ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมา

1. นำตัวอย่างพลาสมาที่ต้องการวิเคราะห์ มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเครื่องเขย่า ปิเปตตัวอย่างพลาสมาด้วย ไมโครปิเปตปริมาตร 50 ไมโครลิตร และฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 12x75 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 หลอด
2. ปิเปตพลาสมาควบคุมคุณภาพ โดยกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1. ตัวอย่างพลาสมาควบคุมคุณภาพหลอด ก. เป็นพลาสมาที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจส-เตอโรน 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลอด ข. เป็นพลาสมาที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลอด ค.เป็นพลาสมาที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 1.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และหลอด blank ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนพลาสมา โดยทำตัวอย่างละ 4 หลอด
3. ปิเปตสารละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0 2.5 5 10 25 50 100 250 500 และ 1000 พิโครกรัมต่อปริมาตร 50 ไมโครลิตร และหลอดศูนย์ที่ใช้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 50 ไมโครลิตร ทำความเข้มข้นละ 3 หลอด เติมพลาสมาที่ปราศจากฮอร์โมนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทุกหลอดเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4. เติมสารละลายดานาซอล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองข้อ 1 2 และ 3 ทุกหลอด ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา ไม่ต่ำกว่า 18 ชั่วโมง
5. เติมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนแอนติบอดี ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทุกหลอด ยกเว้นหลอดศูนย์เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แทนผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. เติมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ติดสลากสารกัมมันตรังสีตริเตรียม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทุกหลอดผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 18 ชั่วโมง
7. เติมสารละลายถ่านดูดซับ ที่กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอดที่แช่ในอ่างน้ำแข็งผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที
8. เทแยกส่วนน้ำใสลงในขวดสำหรับวัดปริมาณรังสีเบต้า และเติมสารก่อประกายรังสีปริมาตร 4 มิลลิลิตรทุกขวด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 10 ชั่วโมง นำไปวัดปริมาณรังสีเบต้าด้วยเครื่องวัดรังสีเบต้า ผลที่ได้จะเป็นจำนวนนับปริมาณรังสี ต่อนาที นำค่าที่ได้มาหาความเข้มข้นเทียบจากกราฟระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมาตรฐานเป็นนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเชื่อถือได้ (Reliability) ของการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน แอนติบอดี (P/040) นำไปทดสอบหาเปอร์เซนต์ cross reaction กับสเตอรอยด์ต่างๆ ซึ่งจะมี cross reaction กับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 เปอร์เซนต์ ฮอร์โมนไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน 17-แอลฟา 0.74 เปอร์เซนต์ ฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน 0.68 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนสเตอรอยด์ตัวอื่น ๆ น้อยกว่า 0.001 เปอร์เซนต์

ความแม่นยำ (precision) จากค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (coefficient of variation) ของการทำซ้ำ ตัวอย่างละ 4 หลอดในการทดลอง 5 ครั้ง ของพลาสมาควบคุมคุณภาพ ที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ค่าสูง กลาง และต่ำ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรในการทดลองเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 อยู่ระหว่าง 5.4-9.7 4.7-8.7 และ 3.9-12.2 เปอร์เซนต์ และระหว่างครั้งการทดลองเท่ากับ 8.9 10.2 และ 11.4 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และประสิทธิภาพต่ำสุดในการตรวจวัด จากกราฟมาตรฐานฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเท่ากับ 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2.1 แสดง ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร ของการตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ในพลาสมากระบือในการทดลองเดียวกันและระหว่างครั้งการทดลอง

การทดลองครั้งที่	ปริมาณ P ในพลาสมาหลอด ก (พคก./มล.)	%CV	ปริมาณ P ในพลาสมาหลอด ข (พคก./มล.)	%CV	ปริมาณ P ในพลาสมาหลอด ค (พคก./มล.)	%CV
1	98.7 85.7 116.4 93.8	11.4	576.1 474.9 543.6 603.6	8.7	1160.0 1366.7 1049.8 1147.4	9.7
2	104.0 94.0 95.5 98.0	3.9	521.3 596.2 500.1 503.0	7.3	1305.8 1340.7 1264.1 1459.1	5.4
3	115.7 99.1 102.3 108.2	5.9	507.0 459.1 479.6 519.1	4.7	1263.1 1210.8 1176.4 1244.7	6.9
4	104.8 78.9 87.6 78.4	12.2	455.5 442.6 451.9 512.4	5.8	1222.1 1232.7 1093.8 989.3	8.8
5	111.6 119.4 110.1 102.1	5.5	581.1 580.0 556.3 464.9	8.7	1163.8 1160.8 1360.0 1240.0	6.5
Intraassay	-	7.8	-	7.1	-	6.6
Interassay	-	11.4	-	10.2	-	8.9

วิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน เอสตราไดออล 17-เบต้า ในพลาสมา

แบ่งการตรวจวิเคราะห์ออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 แยก ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า จากพลาสมาตัวอย่าง

1. ปิเปตพลาสมาตัวอย่าง ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 x 175 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 1 หลอด
2. ปิเปตพลาสมาควบคุมคุณภาพ ทำตัวอย่างละ 3 หลอด ดังนี้

   หลอด จ. พลาสมาที่มีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า มาตรฐาน 5 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

   หลอด ฉ. พลาสมาที่มีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า มาตรฐาน 10 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

   หลอด ช. พลาสมาที่มีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า มาตรฐาน 25 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

   หลอด blank ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แทนพลาสมา
3. เติม ไดเอทธิล อีเธอร์ ลงในทุกหลอด หลอดละ 12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที
4. นำไปทำให้เย็นจนส่วนพลาสมาแข็งตัวด้วยน้ำแข็งแห้ง แล้วแยกส่วนน้ำใส ใส่ลงในขวดขนาด 20 มิลลิลิตร
5. ระเหยไดเอทธิล อีเธอร์ ด้วยเครื่องทำให้แห้งด้วยสูญญากาศ
6. เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ทุกขวด ขวดละ 1.2 มิลลิลิตร
7. เขย่าจนฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ที่แห้งติดขวดละลายในบัฟเฟอร์ เพื่อไปทำการทดลองขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

ขั้นตอนที่ 2

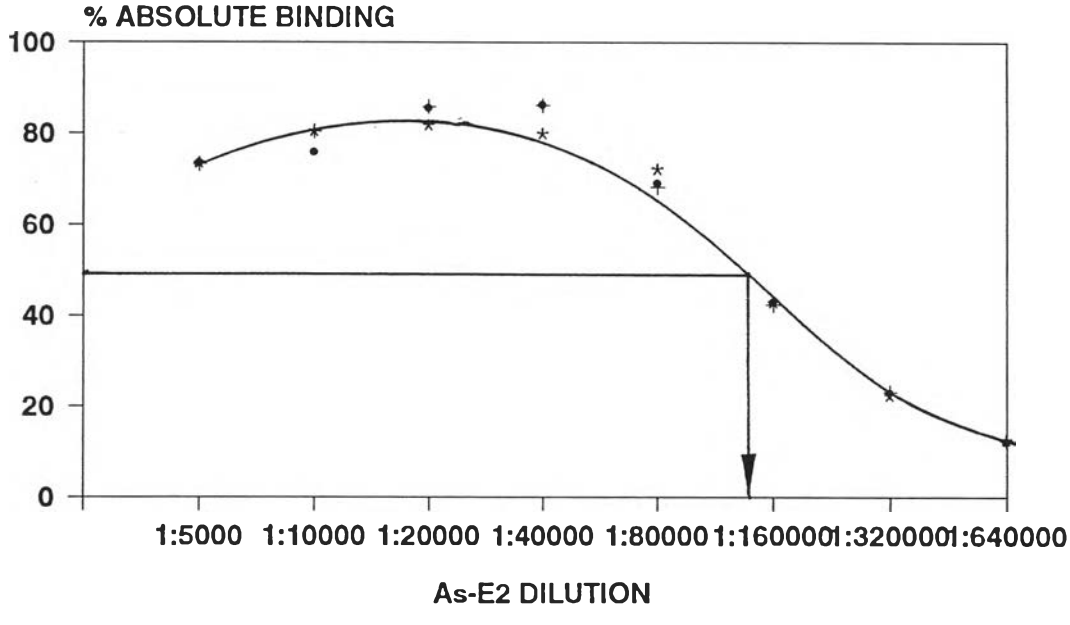
1. ปิเปตสารละลายจากขั้นตอนที่ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 12 x 75 มิลลิเมตร โดยทำตัวอย่างละ 2 หลอด ในขณะที่พลาสมาควบคุมคุณภาพ และ blank ทำตัวอย่างละ 4 หลอด
2. ปิเปตสารละลาย ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า มาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 0 0.625 1.25 2.5 5 10 25 50 100 250 และ 500 พิโครกรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตร และหลอดศูนย์ที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร อย่างละ 3 หลอด
3. เติมสารละลาย ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า แอนติบอดี ลงในหลอดทดลอง ข้อ 2 ปริมาตรหลอดละ 0.1 มิลลิลิตรทุกหลอด ยกเว้นหลอดศูนย์เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แทน เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เติมสารละลาย ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ติดสลากสารกัมมันตรังสีตริเตียมลงในหลอด ข้อ 3 ปริมาตรหลอดละ 0.1 มิลลิลิตรทุกหลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 18 ชั่วโมง
5. ขั้นตอนการแยกส่วนเกาะเกี่ยวออกจากสารอิสระ และหาความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า กระทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมา ข้อ 7 และข้อ 8

การหา ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า แอนติบอดีความเข้มข้นที่เหมาะสม

ปิเปตฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า แอนติบอดี ความเข้มข้น 1:5,000 1:10,000 1:20,000 1:40,000 1:80,000 1:160,000 1:320,000 และ 1:640,000 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร และฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ติดสลากสารกัมมันตรังสีตริเตียม ความแรง 10,000 จำนวนนับ

I17071938

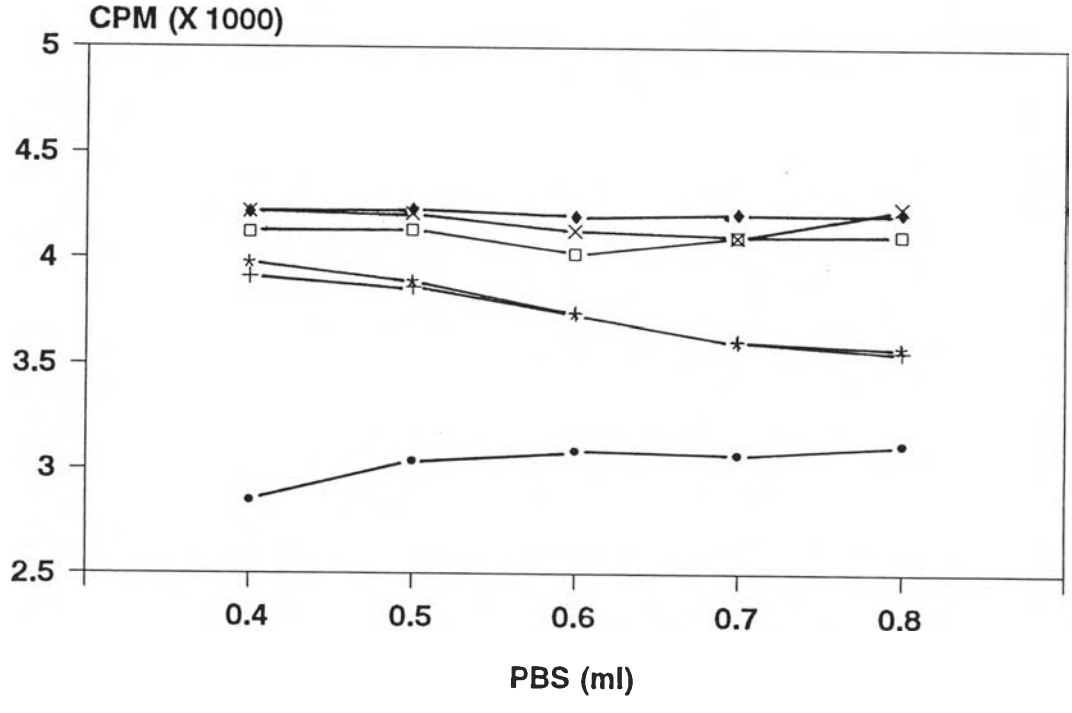
ปริมาณรังสีต่อนาทีต่อ 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 18 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกริยาได้สมบูรณ์จากนั้นนำมาแยกส่วนที่เกาะเกี่ยวออกจากสารอิสระ ตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว ตามวิธีการข้อ 5 นำค่าที่ทำการตรวจวัดระดับรังสีเบต้ามาคำนวณหาเปอร์เซนต์ การเกาะเกี่ยวสมบูรณ์ (Absolute binding) และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า แอนติบอดี ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์คือ ค่าความเข้มข้นที่มีเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวสมบูรณ์เท่ากับ 50 เท่ากับ 1:150,000



รูปที่ 2.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวสมบูรณ์ และความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า แอนติบอดี และความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ แสดงด้วยลูกศร

การหาปริมาณสารก่อประกายแสง (Scintillation) และเวลาที่เหมาะสมก่อนนำตัวอย่างเข้าเครื่องทำการตรวจวัดปริมาณรังสีเบต้า

ปิเปตฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ติดสลากกัมมันตรังสีตริเตียมความแรง 4,249 จำนวนนับปริมาณรังสีต่อนาที (cpm) ต่อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเติมสารก่อประกายรังสี ปริมาตร 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยทำตัวอย่างละ 3 ขวด และกระทำเช่นเดียวกัน โดยเปลี่ยนปริมาตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 เป็น 0.5 0.6 0.7 และ 0.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดปริมาณรังสีเบต้า นำค่าจำนวนนับปริมาณรังสีต่อนาที และปริมาตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 มาเขียนกราฟที่ทำการวัดเมื่อชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 10 ดังแสดงในรูปที่ 2.6 แสดงให้เห็นถึงปริมาตรสารก่อประกายแสง 4.0 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 10 สามารถวัดได้ค่าคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง แม้ว่าปริมาตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะเปลี่ยนแปลง เวลาที่ใช้หลังการเติมสารก่อประกายแสง ก่อนนำมาทำการวัดปริมาณรังสีเบต้าจึงไม่ควรต่ำกว่า 10 ชั่วโมง



รูปที่ 2.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนนับปริมาณรังสีเบต้าต่อนาที กับปริมาณของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และปริมาณสารก่อประกายรังสี ในเวลาที่ใช้ในการตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกริยาสมบูรณ์

. ปริมาณสารก่อประกายรังสี 3 มิลลิลิตร ใช้เวลาตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง

\+ ปริมาณสารก่อประกายรังสี 4 มิลลิลิตร ใช้เวลาตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง

* ปริมาณสารก่อประกายรังสี 5 มิลลิลิตร ใช้เวลาตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง

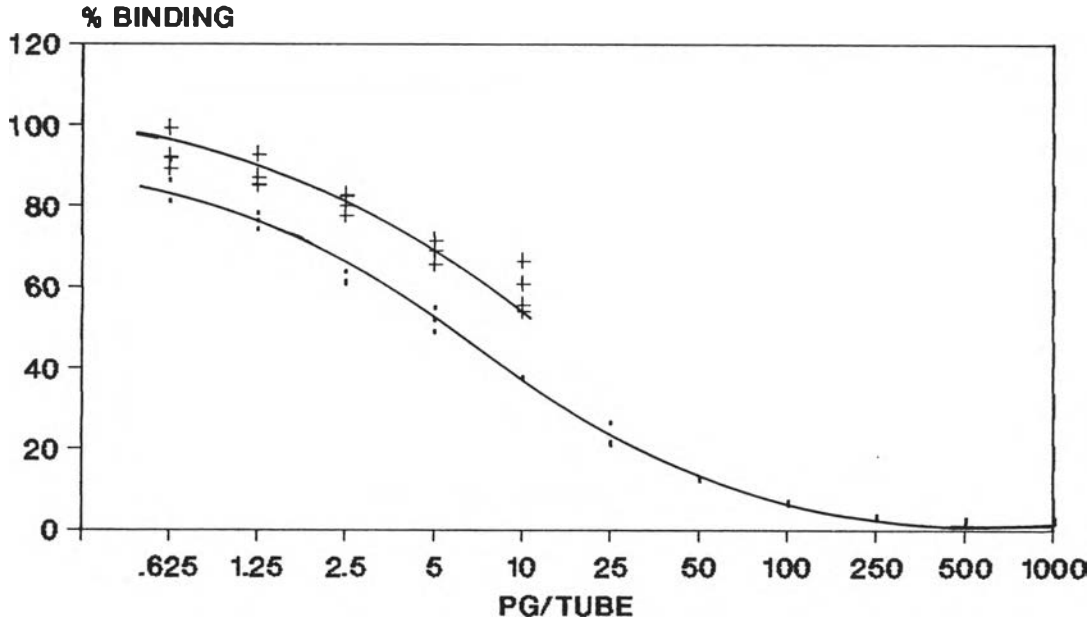
□ ปริมาณสารก่อประกายรังสี 3 มิลลิลิตร ใช้เวลาตั้งทิ้งไว้ 10 ชั่วโมง

♦ ปริมาณสารก่อประกายรังสี 4 มิลลิลิตร ใช้เวลาตั้งทิ้งไว้ 10 ชั่วโมง

x ปริมาณสารก่อประกายรังสี 5 มิลลิลิตร ใช้เวลาตั้งทิ้งไว้ 10 ชั่วโมง

การทดสอบความขนานกันระหว่างฮอร์โมน เอสตราไดออล 17-เบต้า ในพลาสมากระบือ และฮอร์โมน เอสตราไดออล 17-เบต้ามาตรฐาน

นำพลาสมากระบือท้องประมาณ 8 เดือน นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันนำมาตรวจวัดระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า และเขียนกราฟเปรียบเทียบกับ ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า มาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ในพลาสมามีความขนานกับ ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้ามาตรฐาน โดยกราฟที่ได้จะขนานกันไป



รูปที่ 2.7 กราฟแสดงความขนานกันระหว่างฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ในพลาสมา แม่กระบือปลักตั้งท้อง 8 เดือน เจือจางอย่างอนุกรม 2 4 8 และ 16 เท่า (+) เทียบขนานกับฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้ามาตรฐาน ในบัฟเฟอร์ (•)

ความเชื่อถือได้ของการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ในพลาสมา

ความจำเพาะเจาะจงของฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า แอนติบอดี จากการทดสอบหาเปอร์เซนต์ cross reaction กับสเตอรอยด์ต่าง ๆ ซึ่งมี cross reaction กับฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ได้ 100 เปอร์เซนต์ ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-แอลฟา 0.48 เปอร์เซนต์ เอสไตรน 8.40 เปอร์เซนต์ และเอสตราไดออล 0.48 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนฮอร์โมนอื่น ๆ อยู่ระหว่าง <0.03-1.68 เปอร์เซนต์

ความแม่นยำของการตรวจวัด จากค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรของการทำซ้ำตัวอย่างละ 4 หลอด ในการทดลอง 5 ครั้ง ของพลาสมาควบคุมคุณภาพที่มีระดับฮอร์โมนค่าสูง กลาง และต่ำ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรในการทดลองเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.2 อยู่ระหว่าง 3.5-10.3 3.8-12.8 และ 2.0-11.0 เปอร์เซนต์ และระหว่างครั้งการทดลองเท่ากับ 10.0 10.1 และ 7.6 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ความถูกต้องของการตรวจวัด หาได้จากการเติม ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ปริมาณ 5 10 และ 25 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในพลาสมากระป๋อที่มีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้าต่ำ โดยทำความเข้มข้นละ 5 หลอด และนำค่าที่ตรวจวัดได้จากการวิเคราะห์มาหาค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$) และเปอร์เซนต์การวิเคราะห์ได้ (% recovery) ดังแสดงในตารางที่ 2.3 พบว่าปริมาณฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ที่ตรวจวัดได้จากวิธีการนี้เท่ากับ 3.87 ± 0.61 9.11 ± 1.04 และ 25.08 ± 2.25 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเปอร์เซนต์การวิเคราะห์ได้เท่ากับ 96.2 98.2 และ 99.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ประสิทธิภาพต่ำสุดในการวัดจากกราฟมาตรฐาน ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า เท่ากับ 0.30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2.2 แสดง ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร ของการตรวจวัดระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ในพลาสมากระบือในการทดลองเดียวกันและระหว่างครั้งการทดลอง

การทดลองครั้งที่	ปริมาณ E_2 ในพลาสมาหลอด จ (พคก./มล.)	%CV	ปริมาณ E_2 ในพลาสมาหลอด ฉ (พคก./มล.)	%CV	ปริมาณ E_2 ในพลาสมาหลอด ช (พคก./มล.)	%CV
1	2.82 3.82 3.62 3.62	11.0	10.07 7.64 8.01 8.59	10.6	23.43 25.54 23.61 23.91	5.0
2	3.84 4.05 4.09 3.77	3.4	8.26 8.51 9.52 10.36	9.1	23.90 23.29 21.09 20.19	6.9
3	3.60 3.45 3.43 3.68	2.9	8.75 7.9 9.31 9.41	6.7	26.47 28.51 28.51 -	3.4
4	3.45 3.52 3.41 3.77	3.9	9.59 9.02 8.65 8.88	3.8	21.95 27.09 28.59 28.78	10.3
5	3.82 3.78 3.90 3.97	2.0	9.32 11.15 7.8 10.22	12.8	26.96 24.9 25.04 26.55	3.5
Intraassay	-	4.6	-	8.6	-	5.8
Interassay	-	7.6	-	10.1	-	10.0

ตารางที่ 2.3 แสดงความถูกต้องของการตรวจวัดระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ในพลาสมา

ปริมาณ ฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบต้า ที่เติม (พคก./มล.)	จำนวนหลอด (n)	ปริมาณที่ตรวจวัดได้ ($\bar{X} \pm SD$)	% recovery
0	5	BS	-
5	5	3.87 ± 0.61	96.2
10	5	9.11 ± 1.04	98.2
25	5	25.08 ± 2.25	99.5

<u>วิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับ LH ในพลาสมา</u>

การวิเคราะห์หาระดับ LH ในพลาสมาทำตามวิธีของ Kamonpatana และคณะ (1981)ดังนี้

1. ปิเปตพลาสมาตัวอย่างลงในหลอดพลาสติคขนาด 12 x 75 มิลลิเมตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 หลอด
2. ปิเปตพลาสมาควบคุมคุณภาพ ที่ได้จากการเติม LH ลงในพลาสมา หลอด I ความเข้มข้น 1.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลอด II ความเข้มข้น 2.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและหลอด III ความเข้มข้น 5.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรโดยทำความเข้มข้นละ 6 หลอด ปริมาตรหลอดละ 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

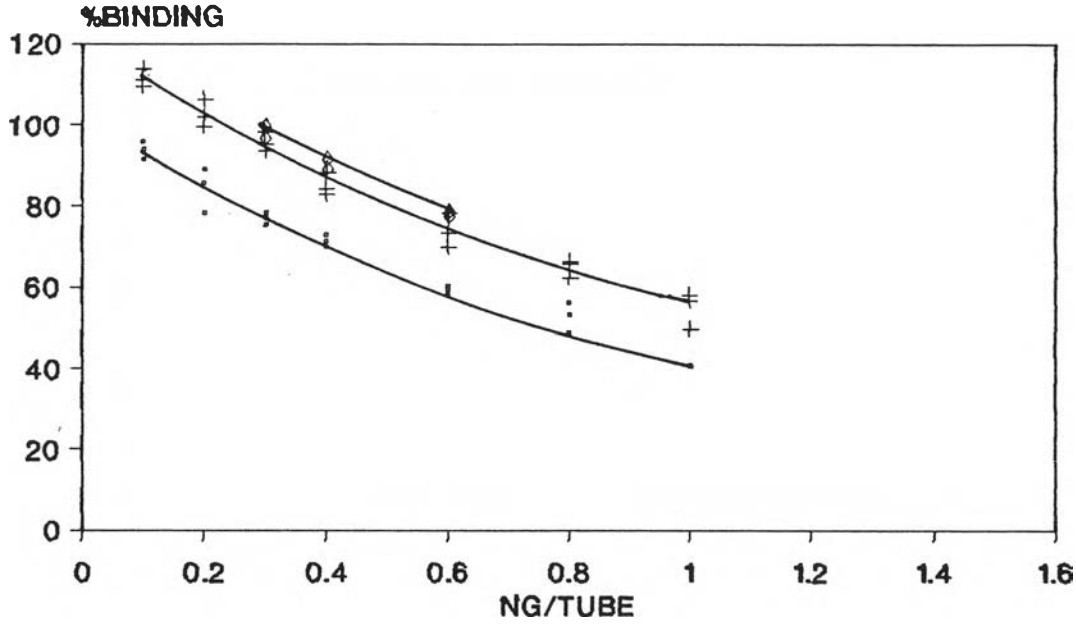
3. ปิเปต LH มาตรฐานความเข้มข้น 0 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 1.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาตรหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร โดยทำความเข้มข้นละ 3 หลอด เติมอัลบูมินบัฟเฟอร์ทุกหลอด หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร
4. เติมแอนติบอดีชนิดแรก ความเข้มข้น 1:70,000 ร่วมกับซีรั่มของกระต่ายปกติความเข้มข้น 1:300 ลงในหลอดทดลองข้อ 1 2 และ 3 หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร
5. เติมซีรั่มของกระปือที่มีระดับ LH ต่ำ 1 ส่วนต่ออัลบูมิน บัฟเฟอร์ 3 ส่วน หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ทุกหลอดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง
6. เติม LH ที่ติดสลากสารกัมมันตรังสี ^{125}I ความแรง 100,000 จำนวนนับปริมาณรังสีต่อนาที ต่อ 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
7. เติมแอนติบอดีชนิดที่สอง ความเข้มข้น 1:21 ลงในหลอดทดลองทุกหลอด หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง
8. เติม 0.05 M ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ลงในหลอดทดลองทุกหลอด หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการปั่น ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
9. เทส่วนน้ำใสออกแล้วเช็ดน้ำบริเวณปากหลอดให้แห้ง นำตะกอนที่ได้ติดอยู่ก้นหลอดไปตรวจปริมาณรังสีแกมม่า ด้วยเครื่องวัดรังสีแกมม่า เป็นค่าจำนวนนับปริมาณรังสีต่อนาที และเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของ LH จากกราฟ LH มาตรฐาน

การทดสอบความขนานกันระหว่าง LH ในพลาสมากระบือ และ LH มาตรฐาน

นำพลาสมากระบือมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันมาตรวจวัดระดับ LH นำมาเขียนกราฟเปรียบเทียบกับ LH มาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 2.8 พบว่า LH ในพลาสมา LH มาตรฐาน และ LH มาตรฐาน ที่เจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีความขนานกัน โดยกราฟที่ได้ขนานกัน

ความเชื่อถือได้ของการวิเคราะห์ระดับ LH ในพลาสมา

ความแม่นยำของการตรวจวัด จากค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรของการทำซ้ำตัวอย่างละ 6 หลอด ในการทดลอง 5 ครั้ง ของพลาสมาควบคุมคุณภาพที่มีระดับ LH สูง กลาง และต่ำ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร ดังแสดงในตารางที่ 2.4 ในการทดลองเดียวกัน อยู่ระหว่าง 5.1-8.4 7.5-9.3 และ 10.3-12.8 เปอร์เซนต์ และระหว่างครั้งการทดลองเท่ากับ 7.7 9.3 และ 14.4 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ประสิทธิภาพต่ำสุดในการวัดจากกราฟมาตรฐาน LH เท่ากับ 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 2.8 กราฟแสดงความขนานกันระหว่าง LH ในพลาสมากระบือ (◊)
LH มาตรฐานที่เจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (.)
และ LH มาตรฐาน (+)

ตารางที่ 2.4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรของการตรวจวัดระดับ LH ในพลาสมากระบือ ในการทดลองเดียวกันและระหว่างครั้งการทดลอง

การทดลองครั้งที่	ปริมาณ LH ในพลาสมาหลอด I	%CV	ปริมาณ LH ในพลาสมาหลอด II	%CV	ปริมาณ LH ในพลาสมาหลอด III	%CV
1	0.82 0.89 0.75 0.93 1.00 0.77	10.3	1.59 1.72 1.48 1.69 1.97 1.76	8.8	4.50 3.94 3.80 3.90 4.33 4.70	7.9
2	1.00 0.82 1.00 0.85 0.83 0.71	11.8	1.76 1.62 1.68 1.75 1.94 2.00	7.5	3.90 4.25 4.03 3.83 4.22 4.75	7.2
3	0.82 1.00 0.80 1.00 0.79 0.78	11.1	1.69 1.43 1.56 1.52 1.90 1.56	9.3	4.07 3.69 3.95 3.81 3.88 4.33	5.1
4	0.74 0.66 0.61 0.61 0.79 0.78	10.7	1.63 1.80 1.72 1.68 1.50 1.91	7.5	4.51 4.42 3.90 4.19 3.91 4.71	7.0
5	0.77 0.82 1.07 0.80 1.00 1.00	12.8	1.46 1.48 1.90 1.55 1.64 1.72	9.3	3.83 4.16 3.72 4.82 4.17 4.10	8.4
Intraassay	-	11.4	-	8.6	-	7.2
Interassay	-	14.4	-	9.3	-	7.7