II. การทดลอง

1. สารเคมี Kiesel gel, Silicagel G. acc. to Stahl for thinlayer Chromatography (E. Merk AG. Darmstadt, Germany)

Concentrated hydrochloric acid (E Merk AG. Darmstadt, Germany and B.D.H. Analar)

Concentrated sulfuric acid (B.D.H. Analar)

Cyclohexane (B.D.H.Laboratory reagent)

Toluene (B.D.H. Analar)

Chloroform for anesthesia (May & Baker L.T.D.)

Acetone (B.D.H. Analar)

Petroleum ether (40°-60°C, E. Merk AG. Darmstadt, Germany)

Absolute ethanol (องค์การเภสัช)

Sodium hydroxide (pellets extra pure G.R., E. Merk)

Anhydrous sodium sulfite (B.D.H. Laboratory reagents)

Potassium permanganate (B.D.H. Analar)

Sodium Chloride (B.D.H. Analar)

Ethanol (redistilled from 95 % ethanol, องค์การสุราบางยี่ขัน)

Acetic anhydride (Baker Analyzed' reagent, J.T. Baker Chemical Co.)

Pyridine (Baker Analyzed' reagent, J.T. Baker Chemical Co.)

Antibumping (B.D.H.)

Glass beads

Whatmann No.1,No.540 filter paper

Pregnanediol (5 β pregnan 3 α , 20 α diol, Sigma and Ikapharm)

Pregnanediol diacetate (5 β pregnan 3 α , 20 α diol diacetate, Sigma)

2. เครื่องมือที่ใช้

"Aparat Chromatoset" for thinlayer chromatography; Desaga

Glass plates (20 cm. x 20 cm. x 2 mm.)

Glass tanks (height: 25 cm.base:10 x 25 cm.)

Spectrophotometer (Unicam S.P. 600 series 2)

Micro mixer (Arthur H. Thomas Co. Philadelphia, U.S.A.)

Therm-O-Plate (Subsidiary of GCA Coporation Chicago U.S.A.)

Electrothermal series 3 (Griffin and George Limitted)

Thermostatic oven (Arthur H. Thomas Co. Philadelphia, U.S.A.)

Shaker (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia,U.S.A.)

Centrifuge (Model Exd. Serial No. A 8561 x - 2, 3/4 H.P.)

Perkin Elmer 881, Gas Chromatograph

Glass wares

round bottom flasks 250 ml, 500 ml, B 24 x 29 Q/Q

condensers B 24 x 29 Q/Q

separating funnels 250 ml., 500 ml, B 24x29 Q/Q

Kober tubes glass stoppers B 24 x 29 Q/Q

B 14 x 15 Q/Q

Centrifuge tobes glass stoppers C 14x15 Q/Q

3. การเก็บปัสสาวะ

ปัสสาวะที่ใช้การทดลองมีอยู่ 2 จำพวกคือ

3.1 ปัสสาวะของสตรีไม่ตั้งครรภ์

ปัสสาวะที่ใช้ทดลองเก็บจากสตรีไม่ตั้งครรภ์ที่มีรอบประจำเดือนปกติและตรวจแล้วว่ามีสุขภาพแข็งแรง จำนวน 5 ราย ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ปัสสาวะของนักศึกษาปริญญาโท 2 ราย อายุ 25 และ 28 ปี

ปัสสาวะของพยาบาล 1 ราย อายุ 23 ปี

ปัสสาวะของข้าราชการชั้นจัตวา 1 ราย อายุ 18 ปี

และปัสสาวะของคนงานในมหาวิทยาลัย 1 ราย อายุ 32 ปี

เริ่มเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงของผู้ถูกทดลองดังกล่าว ตั้งแต่ 7.00 น. ของวันที่หนึ่งไปจนถึง 7.00 น. ของวันรุ่งขึ้น (การเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจะเริ่มเมื่อเวลาใดก็ได้แล้วแต่ความสะดวกของผู้เก็บ เมื่อเริ่มเวลาใดก็สิ้นสุดการเก็บเวลาเดียวกันของวันถัดไป) โดยไม่ใส่สารกันบูด (preservative) วัดปริมาตรปัสสาวะที่เก็บได้ทั้งหมดใน 24 ชั่วโมง ซึ่งจะอยู่ระหว่าง 500-2,000มล. (และแบ่งเก็บไว้สำหรับทำการทดลองเพียงประมาณ 300 มล.) โดยเก็บในตู้เย็น 0° - 4° ซ.

การเก็บปัสสาวะใน 1 รอบเดือน ตั้งต้นเก็บในวันที่หนึ่งของการมีประจำเดือนจนถึงวันแรกที่มีประจำเดือนของรอบเดือนถัดไป ถือว่าครบ 1 รอบเดือน

ในผู้ถูกทดลองบางรายใช้เก็บปัสสาวะเป็น 48 ชั่วโมง จนครบ 1 รอบเดือนเช่นเดียวกัน ระยะเวลาเก็บปัสสาวะเพื่อรอการทดลองประมาณ 1 ปี

3.2 ปัสสาวะของสตรีตั้งครรภ์

ผู้ถูกทดลองเป็นคนงานในโรงพยาบาลศิริราช 1 ราย นอกนั้นเป็นคนไข้ในแผนกสูตินรีเวช โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

การเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ใช้คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เป็นสารกันบูด จำนวน 30 มล. จากนั้นวัดปริมาตรทั้งหมด ซึ่งมีอยู่ระหว่าง 500 - 2,000 มล. แล้วแบ่งเก็บไว้สำหรับทำการทดลอง เพียงประมาณ 300 มล.ในตู้เย็น อุณหภูมิ 0° - 4° ซ. ระยะเวลาที่เก็บ เพื่อรอการทดลองประมาณ 1ปี การเก็บปัสสาวะของสตรีตั้งครรภ์ เก็บทุก ๆ สัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 วัน

4. การวัดอุณหภูมิตอนตื่นนอน (Basal Body Temperature BBT)

การวัดอุณหภูมิของร่างกายตอนตื่นนอน ซึ่งอยู่ในภาวะที่ไม่มีการออกกำลังกายใด ๆ ทั้งสิ้น เป็นการตรวจดูการตกไข่ของสตรีไม่ตั้งครรภ์ เพื่อทดสอบว่ารอบเดือนของผู้ถูกทดลองเป็นรอบเดือนปกติหรือไม่ (ในสตรีที่มีประจำเดือนนั้นจะมีอยู่ 2 แบบ คือ มีประจำเดือนแต่ไข่ไม่ตกนับว่าไม่ปกติ กับมีประจำเดือนและมีไข่ตก นับว่าปกติ) ทำการวัดทางปากโดยอมไว้ใต้ลิ้น เป็นเวลาประมาณ 3 นาที ใช้เทอร์มอมิเตอร์วัดไข้ชนิดเซนติเกรด มีความละเอียดเป็น 0.1 องศา เก็บผลของอุณหภูมิควบคู่กับการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จนครบ 1 รอบเดือน

จากผู้ถูกทดลอง 5 ราย ทำการวัดอุณหภูมิตอนตื่นนอน 3 ราย เป็นนักศึกษาปริญญาโท 1 ราย ข้าราชการชั้น จัตวา 1 ราย และ คนงาน 1 ราย

5. วิธีวัดระดับเปรกเนนไดออลในปัสสาวะโดยวิธี Thinlayer chromatography(TLC)

5.1 การเตรียมสารที่ใช้

ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane) กลั่นใหม่โดยทิ้ง 50 มล.แรกเก็บเฉพาะส่วนกลางที่ 80° ซ

002294

โทลูอีน (toluene) กลั่นใหม่ ทิ้ง 50 มล.แรก และเก็บที่อุณหภูมิ 110°ซ.

คลอโรฟอร์ม กลั่นใหม่ 3 ครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ 60°ซ.

แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute ethanol) กลั่นใหม่ 2 ครั้ง โดยเก็บที่อุณหภูมิ 78°ซ.

เตรียมสารละลาย NaOH 1 N

เตรียมสารละลาย 25 % NaCl ใน NaOH 1 N

เตรียมสารละลายด่างทับทิม (permanganate solution) ให้มีความเข้มข้น 2 % ใน NaOH 1 N

สารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน (standard pregnanediol) เตรียมให้มีความเข้มข้น 0.2 มก./มล. (เปรกเนนไดออลมาตรฐานที่ใช้ในที่นี้ซื้อจากบริษัท Ikapharm, Israel) และเก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ.

5.2 วิธีทดลอง

ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Sulimovici, Lunenfeld and Shelesnyak (1965) ซึ่งได้ดัดแปลงเล็กน้อย หลักการมีอยู่ว่านำปัสสาวะมาต้มกับกรด แล้วสกัดเปรกเนนไดออล ด้วยไซโคลเฮกเซน ขจัดสิ่งเจือปน (impurity) และสีของสารละลายที่สกัดได้ด้วยสารละลายด่างทับทิมและด่าง แยกเปรกเนนไดออลออกจากฮอร์โมน ตัวอื่น ๆ ด้วย silica gel G. โดยวิธี TLC และนำไปทำให้เกิดสีเหลือง กับกรดกำมะถันเข้มข้น วัด optical density (O.D.) ที่ช่วงคลื่น 380, 425, 470 มิลลิไมครอน ด้วย เครื่อง spectrophotometer หาปริมาณโดยเทียบกับสารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน วิธีการทดลองโดยละเอียดมีตามลำดับดังนี้

5.2.1 การเตรียมStationary phase

ทำความสะอาดแผ่นแก้ว (glass plate) ด้วยผงซักฟอก เช็ดให้แห้ง และเช็ดตามด้วย ปิโตรเลียม อีเทอร์ B.P. 40° - 60°ซ. แอลกอฮอล์ ตามลำดับ ปล่อยแห้ง ชั่ง silica gel G 30 กรัม เติมน้ำกลั่น 60 มล. เขย่าอย่างแรงติดต่อกัน 1 นาทีครึ่ง แล้วรีบเทลงใน applicator ซึ่งได้จัดความหนาไว้ 0.50 มม. ± 0.05 มม.ลากผ่านแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 15 นาที ให้แห้งพอหมาด แล้วนำเข้าอบที่อุณหภูมิ 110° ซ. ในตู้อบ 2 ชั่วโมง และเก็บไว้ใน desicator ก่อนนำไปใช้ ต้องอบอีกครั้งหนึ่งที่อุณหภูมิ 110° ซ. ครึ่งชั่วโมง

5.2.2 การเตรียม Mobile phase

เตรียม 100 มล. ของ mobile phase ด้วย คลอโรฟอร์ม : อะซีโตน เท่ากับ 80 : 20 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใส่ในแทงค์แก้ว ปิดฝาให้สนิทโดยทาด้วย grease stopcock เพื่อป้องกันการระเหย และปล่อยทิ้งไว้ 17 ชั่วโมงก่อนใช้ เพื่อให้ภายในแทงค์แก้วอิ่มตัวด้วยไอของสารละลายดังกล่าว

5.2.3 การสกัดเปรกเนนไดออลจากปัสสาวะ

นำปัสสาวะ 50 มล.ใส่ในขวดก้นกลม (round bottom flask Q/Q) 500 มล. เติม สารกันพลุ่ง (antibumping granules) 2-3 เม็ด ต้มให้เดือดโดย reflux ด้วย condenser B 24 x 29 Q/Q บนเตาไฟฟ้า (Therm-o-plate) เติมกรดเกลือเข้มข้น 5 มล.ในขณะเดือด แล้วต้มต่ออีก 10 นาที ทำให้เย็นด้วยน้ำก๊อก ทันที

ปริมาตรของปัสสาวะที่ใช้ทดลอง อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามตารางต่อไปนี้

ปริมาตรปัสสาวะ 24 ชั่วโมง(มล.)	400-1,000	1,000-1,500	1,500-2,000	2,000-3,000
ปริมาตรปัสสาวะที่ใช้ทดลอง (มล.)	40	60	80	100
ปริมาตรกรดเกลือเข้มข้นที่เติม(มล.)	4	5	6	7

เมื่อปัสสาวะที่ ต้มเย็นแล้วเทใส่ separating funnels 250 มล. เติมไซโคลเฮกเซน 25 มล. สกัดโดยเขย่า 100 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขส่วนล่างที่เป็นปัสสาวะออกสกัดเช่นนี้ 3 ครั้ง ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำ นำไซโคลเฮกเซนที่สกัดได้รวมกัน ล้างให้หมดกรด และขจัด emulsion ด้วย 25 % NaCl ใน 1 N NaOH 20 มล. เขย่าแรง ๆ 20 ครั้ง ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำเติมสารละลายด่างทับทิม 50 มล. เขย่าแรง ๆ3นาที ทิ้งให้แยกชั้นไขส่วนล่างที่เป็นด่างทับทิมออกและล้างให้หมดด่างทับทิมด้วยน้ำกลั่น 50 มล. 3 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรอง No.1 ลงในขวดก้นกลม 250 มล. เติมสารกันพลุ่ง 1-2 เม็ด นำไปกลั่นให้ปริมาตรเหลือ 2-5 มล.ด้วย electro-thermal series3 ทิ้งไว้ให้เย็น เทใส่หลอดเซนติฟิว ล้างด้วย คลอโรฟอร์ม 2 มล. 2 ครั้ง เติมสารกันพลุ่ง 1-2 เม็ดในขณะเดียวกัน เตรียมสารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน โดยปิเปตมา 0.5 มล. ใส่หลอดเซนติฟิว แล้วนำทั้งหมดไประเหยให้แห้ง ภายใต้กาซไนโตรเยนที่อุณหภูมิ 60°-70° ซ. ใน water bath เมื่อแห้งสนิทแล้ว ทิ้งให้เย็น เติม คลอโรฟอร์ม 0.5 มล. ปิดให้แน่นและเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (micro mixer) 1 นาที

5.2.4 การ run ascending chromatography

ปิเปตสารละลายที่ได้ในข้อ 5.2.3 0.2 มล.ค่อย ๆ หยดลงบน silica gel G. plate ที่อบแล้ว $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง แล้วนำลงในแทงค์แก้วที่เตรียมไว้ใน ข้อ 5.2.2 ให้ mobile phase เคลื่อนที่ไปบนแผ่นแก้วประมาณ 75 นาที จนเกือบสุดขอบบนก็นำออกจากแทงค์ได้ ไว้ในอากาศให้หมดกลิ่น คลอโรฟอร์ม และ อะซีโตน

5.2.5 การ spray และการวัดสี

เมื่อหมดกลิ่นสารละลายดังกล่าวแล้ว spray ด้วยน้ำกลั่น ทำเครื่องหมาย สี่เหลี่ยมจตุรัสล้อมรอบบริเวณที่เปรกเนนไดออลปรากฏ โดยเทียบระดับกับเปรกเนนไดออลมาตรฐานและขีดสี่เหลี่ยมจตุรัส ณ. บริเวณว่างใต้ระดับที่หยดสารลง เพื่อทำเป็น blank นำแผ่นแก้วนี้ไปอบที่ 110° ซ. เป็นเวลา 10 นาที ใช้ spatula ปลายตัดและฟิล์มถ่ายรูป ขูดใส่หลอด B 19 Q/Q เติม conc. H_2SO_4 3 มล. และ Na_2SO_3 3 มก. เขย่าให้ทั่ว ๆ และใส่ใน water bath 100° ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำออกมาปล่อยให้เย็น นำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge (1,800 rpm) 10 นาที เทส่วนใสไปวัด O.D. ด้วยเครื่อง spectrophotometer อ่านค่า O.D. ที่ช่วงคลื่น 380, 425 และ 470 มิลลิไมครอน โดยเทียบกับ blank ค่า O.D. ที่จะใช้ได้จะต้องทำ Allen correction (Allen, 1950) ซึ่งใช้สูตรดังนี้

$$O.D._{corr.}\ (O.D._{correction}) = O.D._{425} - \frac{O.D._{380}+O.D._{470}}{2}$$

การทำ Allen correction เพื่อความถูกต้องของค่า O.D. เนื่องจากที่ 425 มิลลิไมครอน นั้นมีสารที่ให้สีนอกเหนือจากเปรกเนนไดออล ที่ต้องการวัดปนอยู่ ดังนั้นถ้าวัด 3 ช่วงคลื่นและแก้ค่า O.D. ที่ได้ดังสูตรข้างบน จะให้ค่าถูกต้องมากขึ้น

5.2.6 การทำ percentage recovery

การทำ percentage recovery เพื่อจะทดสอบว่าวิธีการทดลองที่จะทำมีการสูญเสียเปรกเนนไดออลมากน้อยเพียงไร ในการทดลองจึงจำเป็น ต้องมีสภาวะเหมือนทำกับของจริงทุกประการ ดังนั้น

ปัสสาวะที่จะใช้ทดลองจะต้องเป็นปัสสาวะที่มีปริมาณเปรกเนนไดออลอยู่น้อยมาก เช่น ปัสสาวะผู้ชาย ปัสสาวะในสตรีหลังหมดระดู หรือปัสสาวะของเด็ก ในที่นี้ใช้ปัสสาวะผู้ชาย เก็บ 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับปัสสาวะอื่น ๆ แล้วนำมา 50 มล. เติมสารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐานที่รู้จำนวนแน่นอน ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 5.2-5.2.5 แล้วคำนวณหา percentage recovery ได้

5.3 การคำนวณ

5.3.1 การคำนวณหาปริมาณเปรกเนนไดออลในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

สมมติให้ Unknown อ่าน $O.D._{corr.}$ = a

สารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐานอ่านค่า $O.D._{corr.}$ = b

จำนวนปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (มล.) = c

จำนวนปัสสาวะ ที่ใช้ทดลอง (มล.) = d

สารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน 1 มล.มีเปรกเนนไดออล 0.2 มก.

สารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน0.5มล.มีเปรกเนนไดออล 0.1 มก.

100ไมโครกรัม

สารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน0.2มล.มีเปรกเนนไดออล $100 \times \frac{0.2}{0.5}$ "

40ไมโครกรัม

สารละลาย Unknown 0.5 มล.มาจากปัสสาวะ = d มล.

สารละลาย Unknown 0.2 มล.มาจากปัสสาวะ = $\frac{2}{5}$ d มล.

สารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน $O.D._{corr.}^{b}$ มีเปรกเนนไดออล

= 40 ไมโครกรัม

สารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน $O.D._{corr.}^{a}$ มีเปรกเนนไดออล

= 40 $\frac{a}{b}$ ไมโครกรัม

ปัสสาวะ $\frac{2}{5}$ d มล. มีเปรกเนนไดออล อยู่ = 40 $\frac{a}{b}$ ไมโครกรัม

ปัสสาวะ c มล. มีเปรกเนนไดออล อยู่ = 40 $\frac{a}{b} \times \frac{c}{d} \times \frac{5}{2}$ ไมโครกรัม

∴ เปรกเนนไดออลในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง = $\frac{100}{10^3}$ $\frac{ac}{bd}$ มก.

∴ จะได้สูตร มิลลิกรัมเปรกเนนไดออล/ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง = $\frac{1}{10}$ $\frac{axc}{bxd}$

5.3.2 <u>การคำนวณ percentage recovery</u>

สมมติให้ ปริมาณเปรกเนนไดออลจากปัสสาวะผู้ชาย = B มก.

ปริมาณเปรกเนนไดออลจากปัสสาวะผู้ชายเติมสารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน = A มก.

∴ ปริมาณเปรกเนนไดออล recovery = (A-B) มก.

และให้ปริมาณเปรกเนนไดออลมาตรฐานที่เติม = X มก.

∴ ปริมาณเปรกเนนไดออล X มก. หลังการทดลองมี recovery

= (A-B) มก.

ปริมาณเปรกเนนไดออล 100 มก. หลังการทดลองมี recovery

= $\frac{X(A-B)}{100}$ มก

∴ % Recovery = $\frac{X\ (A-B)}{100}$

6. <u>วิธีวัดระดับเปรกเนนไดออลโดย Gas Chromatography (GLC)</u>

6.1 <u>การเตรียมสารที่ใช้</u>

6.1.1 โทลูอีน กลั่นใหม่โดยการกลั่นธรรมดา 50 มล. แรกทิ้ง เก็บเฉพาะส่วนกลางที่ 110°ซ.

6.1.2 แอลกอฮอล์ กลั่นใหม่โดย reflux แอลกอฮอล์ 95 % 1,000 มล. กับ NaOH 40 กรัม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กลั่นธรรมดาเอา

$CaCl_2$ anhydrous เพื่อดูดน้ำ แล้วกลั่นอีกครั้งโดยผ่าน column เอา 50 มล.แรกทิ้ง เก็บแต่เฉพาะส่วนกลางที่ 78°ซ. (สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ 2512)

6.1.3 สารละลายเปรกเนนไดออล **มาตรฐาน**

ละลาย 25 มก. ของ 5 β pregnan 3α ,20α diol ในขวดมาตรฐาน ปริมาตร 25 มล. ด้วยแอลกอฮอล์จะได้สารละลายเปรกเนนไดออล**มาตรฐาน** 1 มก./มล.

6.1.4 สารละลายเปรกเนนไดออลไดอะซีเตต

โดยละลาย 25 มก.ของ 5 β pregnan 3 α , 20 α diol diacetate ในขวดมาตรฐาน ปริมาตร 25 มล.ด้วย แอลกอฮอล์ จะได้สารละลายเปรกเนนไดออลไดอะซีเตต 1 มก./มล.

6.2 <u>วิธีทดลอง</u> ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Brush, Taylor and Maxwell (1966) ซึ่งแยกการทดลองเป็น 2 แบบดังนี้

6.2.1 <u>วิธีวัดระดับเปรกเนนไดออลในสตรีตั้งครรภ์ตั้งแต่ 20 สัปดาห์ขึ้นไป</u>

ใช้ปัสสาวะ 20 มล. ใส่ในขวดก้นกลม 500 มล. เติมน้ำกลั่นจนเป็น 150 มล. เติมโทลูอีน 50 มล. และ ลูกแก้ว (ป้องกันการ bump) 2 เม็ด ต้มให้เดือดบนเตาไฟฟ้า โดยการ reflux ด้วย condenser Q/Q ในขณะที่เดือด เติม conc. HCl 15 มล. ต้มต่อ 10นาที แล้วทำให้เย็น **ด้วยน้ำ**ก๊อกทันที นำปัสสาวะที่เย็นแล้วนี้เทใส่ separating funnels 500 มล. เขย่า 100 ครั้ง ไขส่วนที่เป็นน้ำมาเติมโทลูอีน 50 มล. เพื่อสกัดครั้งที่ 2 นำโทลูอีนที่สกัดได้มารวมกัน ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำ ล้างด้วย 25 % NaCl ใน 1 <u>N</u> NaOH 25มล. เขย่าแรง ๆ 20 ครั้ง แยกส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง และเติมสารละลายด่างทับทิม 50 มล. เขย่าแรง 2 นาที แยกส่วนที่เป็นด่าง**ทับทิม**ออกและล้าง

ด้วยน้ำกลั่น 50 มล. 3 ครั้ง จนหมดด่างทับทิม กรองด้วยกระดาษกรองNo.540ลง ในขวดก้นกลม 250 มล. ใส่ลูกแก้ว 1 เม็ด นำไปกลั่นให้ปริมาตรลดลงเหลือ2-5 มล.(ต้องระวังไม่ให้แห้ง) ถ่ายใส่ Kober glass tube B 14 Q/Q ด้วย pasteur pipette ล้างขวดด้วยแอลกอฮอล์ 2 มล.2 ครั้ง ระเหยให้แห้งสนิทภายใต้ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 60°-70°ซ. ใน water bath ละลาย residue* ด้วย แอลกอฮอล์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 1 นาที นำไปวัดปริมาณของเปรกเนนไดออลด้วย Perkin Elmer 881 Gas Chromatograph โดยจัดสภาวะดังนี้

column; 2.5 % FS 1265

detector; flame ionization detector

column temperature ; 224°C

injector temperature; 350°C

detector temperature; 250°C

nitrogen flow rate ; 30 ml/min.

ฉีด (injected) สารละลายที่ได้ 2 ไมโครลิตรด้วย 10 ไมโครลิตร Hamilton syringeในการทดลองทุกครั้งต้องฉีด 2 ไมโครลิตรของสารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐานกำกับด้วย วัด peak height ของ**ปัสสาวะที่ทดลอง และเทียบกับ** peak height ของสารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน จะหาปริมาณเปรกเนนไดออลได้

6.2.2 <u>วิธีวัดระดับเปรกเนนไดออลในสตรีตั้งครรภ์ต่ำกว่า 20 สัปดาห์และในสตรีไม่ตั้งครรภ์</u>

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 6.2.1 แต่ใช้ปัสสาวะ 40-50 มล. เติมน้ำกลั่นจนเป็น 150 มล.

เมื่อละลาย residue* (6.2.1) ที่แห้งด้วยแอลกอฮอล์ 2 มล. แล้วดูดมา 100 ไมโครลิตร ด้วย micropipette ใส่ในหลอด C 14 Q/Q ทำให้แห้งภายใต้กาซไนโตรเจนที่ 60° - 70° ซ. แล้วหยด pyridine และ acetic anhydride อย่างละ 5 หยด ปิดให้แน่นพอควรเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 1 นาที และทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องหรือต้มที่ 60° - 70° ซ. เป็นเวลา 60 นาที ต่อไปทำให้แห้งภายใต้กาซไนโตรเจนที่60-70° ซ.ละลาย residue ที่ได้ด้วยแอลกอฮอล์ 100 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 1นาที ฉีด 2 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง Gas chromatograph พร้อมทั้งฉีด 2 ไมโครลิตรของสารละลายเปรกเนนไดออล ไดอะซีเตตมาตรฐานวัด peak height และคำนวณหาปริมาณเปรกเนนไดออลได้

6.3 <u>การคำนวณ</u>

6.3.1 <u>วิธีคำนวณหาปริมาณเปรกเนนไดออลในปัสสาวะสตรีตั้งครรภ์ 20 สัปดาห์ขึ้นไป</u>

สมมติให้ peak height ของสารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน = H_s

peak height ของปัสสาวะที่ทดลอง = H_u

ปริมาตรของปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (มล.) = V

สารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐานมี peak height H_s มาจาก

เปรกเนนไดออล = 2 ไมโครกรัม

ปัสสาวะที่ทดลองมี peak height H_u จะมีเปรกเนนไดออล=2 x $\frac{H_u}{H_s}$ ไมโครกรัม

ปัสสาวะที่ทดลอง 2 ไมโครลิตร มีเปรกเนนไดออล = 2 $\frac{H_u}{H_s}$ ไมโครกรัม

ปัสสาวะที่ทดลอง 2 x 10^3 ไมโครลิตร มีเปรกเนนไดออล = 2 $\frac{H_u}{H_s}$ x $\frac{2}{2}$ x 10^3ไมโครกรัม

= 2 $\frac{H_u}{H_s}$ x 10^3 ไมโครกรัม

= 2 $\frac{H_u}{H_s}$ มก.

∴ ปัสสาวะ 20 มล. มีเปรกเนนไดออล $= 2\frac{H_u}{H_s}$ ม ,

ปัสสาวะ V มล. มีเปรกเนนไดออล $= 2\frac{H_u}{H_s} \times \frac{V}{20}$ มก

มก.เปรกเนนไดออล/ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง $= \frac{H_u}{H_s} \times \frac{V}{10}$

6.3.3 <u>วิธีคำนวณหา percentage recovery</u> มีวิธีการดังนี้

สมมติให้ peak height ของปัสสาวะผู้ชาย $= H_m$

peak height ของสารละลายเปรกเนนไดออลมาตรฐาน $= H_s$

peak height ของปัสสาวะผู้ชายที่เติมเปรกเนนไดออลมาตรฐาน $= H_x$

ให้เติมเปรกเนนไดออลลงไป $= A$ มก.

∴ ปริมาณเปรกเนนไดออลในปัสสาวะผู้ชาย $= 2\frac{H_m}{H_s}$ (6.3.1)

ปริมาณเปรกเนนไดออลในปัสสาวะผู้ชายที่เติมเปรกไดออลมาตรฐาน $= 2\frac{H_x}{H_s}$ มก.

∴ ปริมาณเปรกเนนไดออล recovery $= 2\frac{H_x}{H_s} - 2\frac{H_m}{H_s}$ มก.

$= \frac{2}{H_s}(H_x - H_m)$ มก.

เปรกเนนไดออลที่เติม A มก.มี recovery $= \frac{2}{H_s}(H_x - H_m)$ มก.

เปรกเนนไดออลที่เติม 100 มก.มี recovery $= \frac{2}{H_s}(H_x - H_m) \times \frac{100}{A}$ มก.

∴ % recovery $= \frac{2}{H_s}(H_x - H_m) \times \frac{100}{A}$

7. วิธีวัดระดับเปรกเนนไดออลโดยวิธี Thinlayer chromatography และ Gas chromatography (TLC + GLC)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.2 แต่ใช้ปัสสาวะ 100 มล. ทำเป็น 150 มล. ด้วยน้ำกลั่น เมื่อผ่านขบวนการจนถึงขั้นระเหยให้แห้งภายในไนโตรเจนก๊าซ แล้วนำ residue ที่ได้ละลายด้วย คลอโรฟอร์ม 0.3 มล. ปิเปต 0.2 มล. ค่อย ๆ หยดลงบนแผ่น silica gel G ขูดใส่หลอด B 14 Q/Q elute ด้วย แอลกอฮอล์ 1.0 มล. ปิดให้สนิท เขย่าอย่างแรงด้วย shaker 20 นาที ตกตะกอน 10 นาที แล้วใช้ pasteur pipette แยกส่วนใส ออกใส่หลอดแก้วและดูดมา 250 ไมโครลิตรใส่ในหลอด C 14 Q/Q ระเหยให้แห้ง ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่ 60°-70° ซ. และทำให้เป็นไดอะซีเตต ตามวิธี 6.2.2 แต่ละลายด้วยแอลกอฮอล์ 250 ไมโครลิตร และฉีด 2 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง gas chromotograph

การคำนวณใช้หลักการเดียวกับวิธีใน 6.3.2 และการหา percentage recovery ก็ใช้หลักการเดียวกับใน 6.3.3