ผลการทดลอง

1) การหา solvent system ที่เหมาะสมในการแยกชันรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน

ผลการใช้ซิลิกาเจล 2 ชนิด และ solvent system 21 ชนิดในการแยก MIT, DIT, T_3 และ T_4 ปรากฏผลดังตารางที่ 1 และที่ 2

ตารางที่ 1*

แสดง R_f value ของชันรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานเมื่อใช้ silicagel HF_{254}

solvent system	MIT		DIT		T_3		T_4	
	range	Ave.&	range	Ave.&	range	Ave.&	range	Ave.&
1.n-butanol-Acetone-3N NH_4OH 1:4:1	.32-.42	.38	.29-.48	.38	.62-.74	.68	.55-.73	.64
2.Butanol-Me-Et Ketone 2N NH_4OH 1:4:1£	.34-.37	.36	.31-.33	.32	.54-.66	.60	.53-.59	.56
3.Ethanol-Me-Et Ketone 6N NH_4OH 1:4:1	.17-.27	.22	.14-.22	.18	.40-.48	.44	.32-.38	.35
4.n-butanol-Methanol-20%NH_4OH 1:4:1#	.27-.37	.32	.30-.40	.35	.40-.56	.48	.36-.56	.42
5.n-butanol-HOAc - H_2O 10:1:1#	.37-.41	.39	.43-.49	.46	.43-.55	.52	.50-.56	.53
6.n-butanol-HOAc - H_2O 4:1:5#	.51-.59	.55	.59-.67	.63	.66-.74	.70	.69-.79	.74
7.n-butanol-Ethanol-3N NH_4OH 4:1:5	.28-.41	.35	.27-.31	.34	.37-.43	.40	.34-.42	.38
8.n-butanol-Dioxane-6N NH_4OH 4:1:5£	.37-.43	.40	.37-.41	.39	.41-.47	.44	.41-.45	.43
9.n-butanol-sat.with 6N NH_4OH	.14-.20	.17	.14-.19	.17	.27-.35	.31	.22-.31	.27
10.n-butanol-sat.with 2N HOAc	.37-.39	.38	.45-.51	.48	.55-.64	.60	.57-.65	.61
11.2-butanol-conc. NH_3 3:1	.14-.24	.19	.15-.19	.17	.26-.48	.37	.22-.44	.33
12.2-butanol-2.5% NH_3 w/v 3:2	.34-.41	.38	.29-.39	.34	.46-.49	.43	.30-.46	.38
13.Et.acetate-Methanol-0.2NHOAc5:2:3@	.25-.38	.32	.33-.42	.38	.34-.46	.40	.35-.47	.41
14.Et.acetate-Methanol-2N NH_4OH5:2:3@	.19-.25	.22	.11-.15	.13	.35-.49	.42	.31-.43	.37
15.Et.acetate-Methanol-6N NH_4OH5:2:3	.20-.27	.24	.13-.19	.16	.46-.50	.48	.33-.44	.38
16.HOAc-Methanol-$CHCl_3$ 0.15:1:2$	.20-.22	.21	.32-.36	.34	.38-.46	.42	.41-.51	.46
17.Amylalcohol-Dioxane-3N NH_4OH 1:3:1	.20-.22	.21	.14-.18	.16	.38-.46	.41	.34-.42	.38
18.Amylalcohol-Dioxane-3N NH_4OH 2:2:1	.21-.25	.23	.15-.19	.17	.38-.42	.40	.34-.36	.35
19.Amylalcohol-Dioxane-3N NH_4OH 3:1:1	.29-.31	.30	.25-.27	.26	.35-.39	.37	.35-.37	.36
20.Amylalcohol-Dioxane-1N NH_4OH 2:2:1	.35-.37	.36	.28-.29	.29	.70-.72	.71	.63-.71	.68
21.Phenol-water 3:1 w/w	.48-.49	.49	.58-.60	.59	.63-.67	.65	.67-.73	.70

* อัตราส่วนของตัวทำละลายทุก system เป็นปริมาตรต่อปริมาตรนอกจาก system 21

& Ave = average

£ ใช้ตาม Schorn และ Winkler (1965)[38]

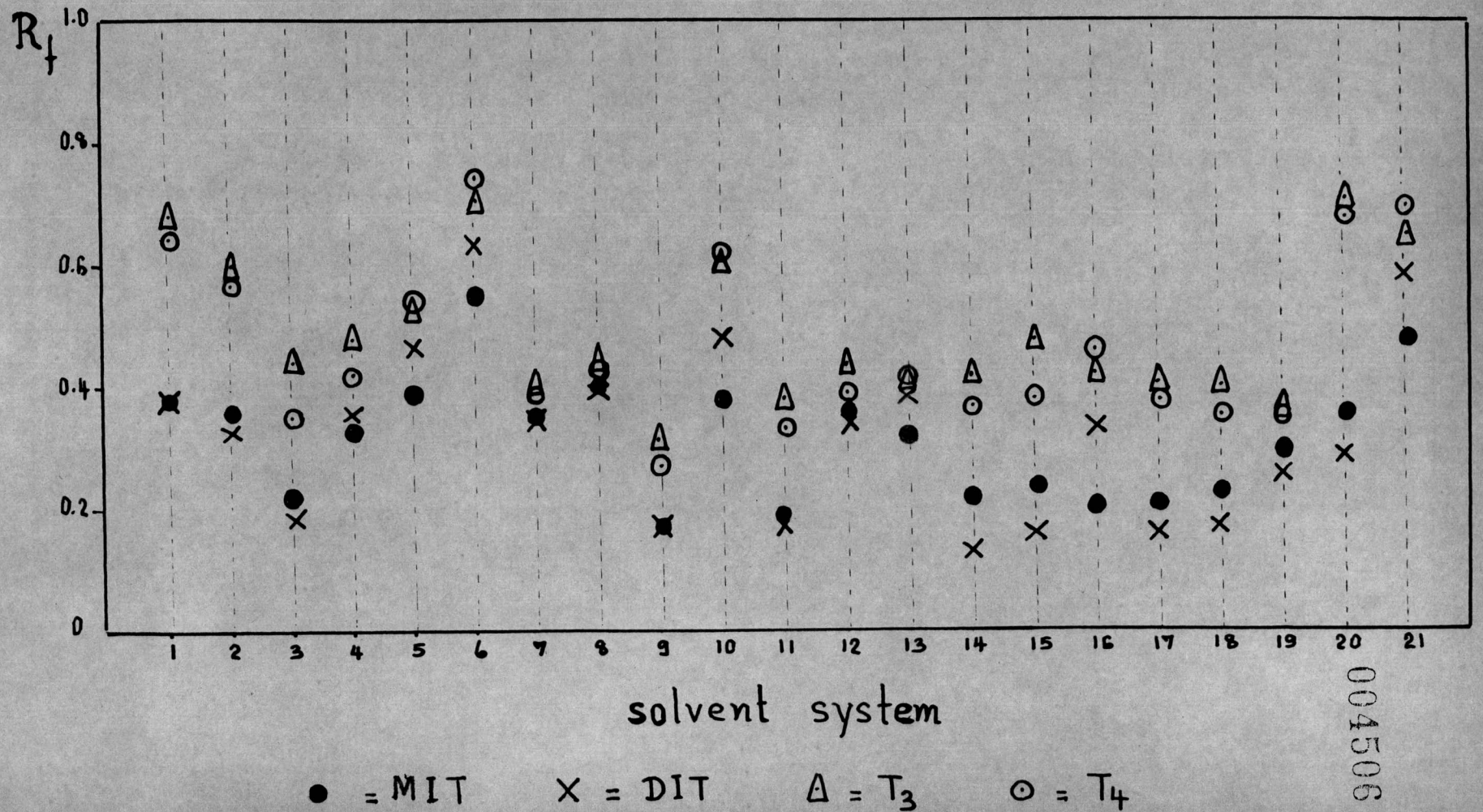
ใช้ตาม Massaglia และ Rosa (1964)[27]

@ ใช้ตาม West et al. (1965)[41]

$ ใช้ตาม Heider และ Bronk (1965)[23]

รูปที่ 1

แสดง R_f ของไทรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานใน solvent system 21 ชนิด
plate silicagel HF_{254} 0.25 มม. อบที่ 105°ซ. 30 นาที



i 17220038
0004506

ตารางที่ 2*

แสดง R_f value ของฮอร์โมนมาตรฐานเมื่อใช้ silicagel GF_{254}

solvent system	MIT		DIT		T_3		T_4	
	range	Ave.&	range	Ave.&	range	Ave.&	range	Ave.&
1.n-butanol-Acetone-3N NH_4OH 1:4:1	.31-.43	.37	.31-.46	.46	.63-.70	.67	.55-.68	.62
2.Ethanol-Me-Et Ketone 2N NH_4OH1:4:1£	.34-.36	.35	.27-.31	.29	.55-.57	.56	.47-.53	.50
3.Ethanol-Me-Et Ketone 6N NH_4OH1:4:1	.26-.30	.28	.18-.24	.22	.47-.60	.54	.40-.53	.42
4.n-butanol-Methanol-20%NH_4OH 1:4:1#	.29-.49	.39	.30-.60	.45	.50-.68	.59	.44-.60	.52
5.n-butanol-HOAc- H_2O 10:1:1#	.41-.45	.43	.49-.53	.51	.56-.62	.59	.51-.56	.54
6.n-butanol-HOAc - H_2O 4:1:5#	.53-.65	.59	.63-.71	.67	.68-.80	.72	.65-.81	.73
7.n-butanol-Ethanol-3N NH_4OH 4:1:5	.25-.29	.27	.25-.27	.26	.34-.41	.38	.24-.35	.30
8.n-butanol-Dioxane-6N NH_4OH 4:1:5£	.35-.41	.38	.35-.41	.38	.41-.50	.46	.41-.47	.44
9.n-butanol-sat.with 6N NH_4OH	.14-.20	.17	.15-.18	.17	.25-.29	.27	.21-.25	.23
10.n-butanol-sat.with 2N HOAc	.33-.43	.38	.44-.52	.48	.54-.58	.56	.53-.59	.56
11.2-butanol-conc. NH_3 3:1	.17-.24	.20	.16-.30	.23	.31-.55	.43	.31-.46	.38
12.2-butanol-2.5% NH_3 w/v 3:2	.23-.39	.31	.22-.32	.27	.31-.51	.41	.30-.46	.38
13.Et.acetate-Methanol-0.2NHOAc5:2:3@	.21-.45	.33	.27-.49	.38	.36-.58	.47	.42-.56	.49
14.Et.acetate-Methanol-2N NH_4OH5:2:3@	.20-.22	.21	.10-.12	.11	.37-.39	.38	.33-.35	.34
15.Et.acetate-Methanol-6N NH_4OH5:2:3	.21-.31	.26	.17-.21	.19	.45-.64	.55	.41-.59	.50
16.HOAc-Methanol-$CHCl_3$ 0.15:1:2$	.18-.25	.22	.30-.39	.35	.35-.45	.40	.34-.44	.39
17.Amylalcohol-Dioxane-3N NH_4OH 1:3:1	.25-.28	.27	.19-.21	.20	.58-.72	.65	.46-.58	.52
18.Amylalcohol-Dioxane-3N NH_4OH 2:2:1	.24-.32	.28	.18-.25	.22	.54-.63	.59	.37-.53	.45
19.Amylalcohol-Dioxane-3N NH_4OH 3:1:1	.32-.38	.35	.30-.36	.33	.38-.46	.42	.38-.42	.40
20.Amylalcohol-Dioxane-1N NH_4OH 2:2:1	.44-.49	.47	.38-.40	.39	.81-.84	.83	.80-.84	.82
21.Phenol-water 3:1 w/w	.47-.53	.50	.52-.61	.57	.60-.66	.63	.64-.68	.66

* อัตราส่วนของตัวทำละลายทุก system เป็นปริมาตรต่อปริมาตรนอกจาก system 21

& Ave = average

£ ใช้ตาม Schorn และ Winkler (1965)[38]

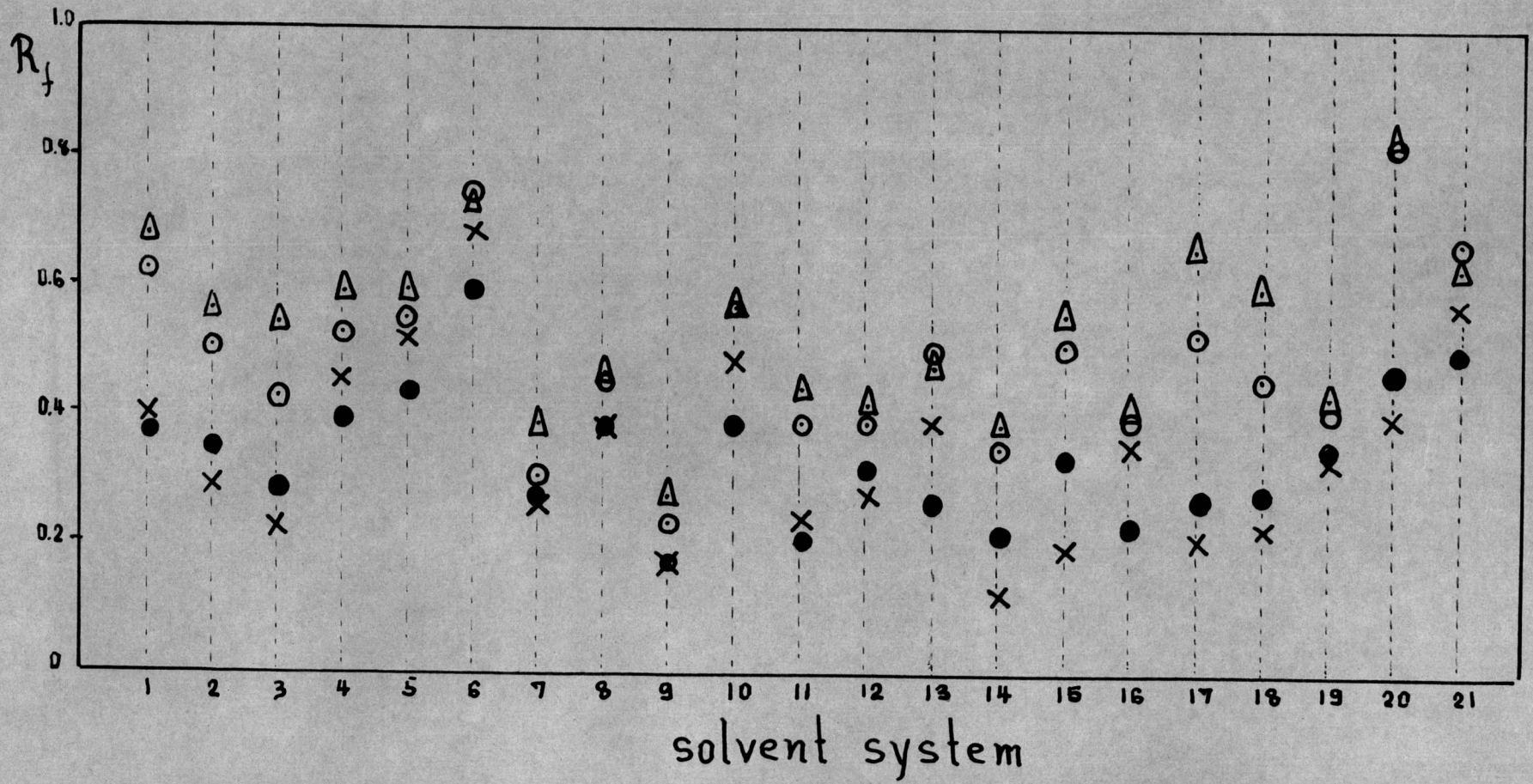
ใช้ตาม Massaglia และRosa (1964)[27]

@ ใช้ตาม West et al. (1965)[41]

$ ใช้ตาม Heider และ Bronk (1965)[23]

รูปที่ 2

แสดง R_f ของไทรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานใน solvent system 21 ชนิด
plate silicagel GF_{254} 0.25 มม. อบที่ 105°ซ. 30 นาที



ผลการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัวโดย solvent system 21 ชนิด พอจะสรุปได้ คือ

Solvent system 1 แยกทั้ง 4 ตัวได้เป็น 2 จุด คือ MIT,+ DIT และ T_3+T_4

Solvent system 5 แยกทั้ง 4 ตัวได้เป็น 2 จุด คือ MIT และ DIT+T_3+T_4

Solvent system 2,4,7,8,9 และ 11 แยกทั้ง 4 ตัว ได้เป็น 3 จุด คือ MIT+DIT, T_3 และ T_4

Solvent system 6,10,13,16 และ 21 แยกทั้ง 4 ตัว ได้เป็น 3 จุด คือ MIT DIT และ T_3 + T_4

Solvent system 3,12,14,15,17,18,19 และ 20 แยกทั้ง 4 ตัวออกจากกันได้ และ systemที่แยกได้ดีมากมี 5 system คือ system 3 (รูปที่ 8 ก.), system14 (รูปที่ 7 ก.), system15 (รูปที่ 7 ข.), system 17 (รูปที่ 8 ข.), system18 (รูปที่ 8ค.)

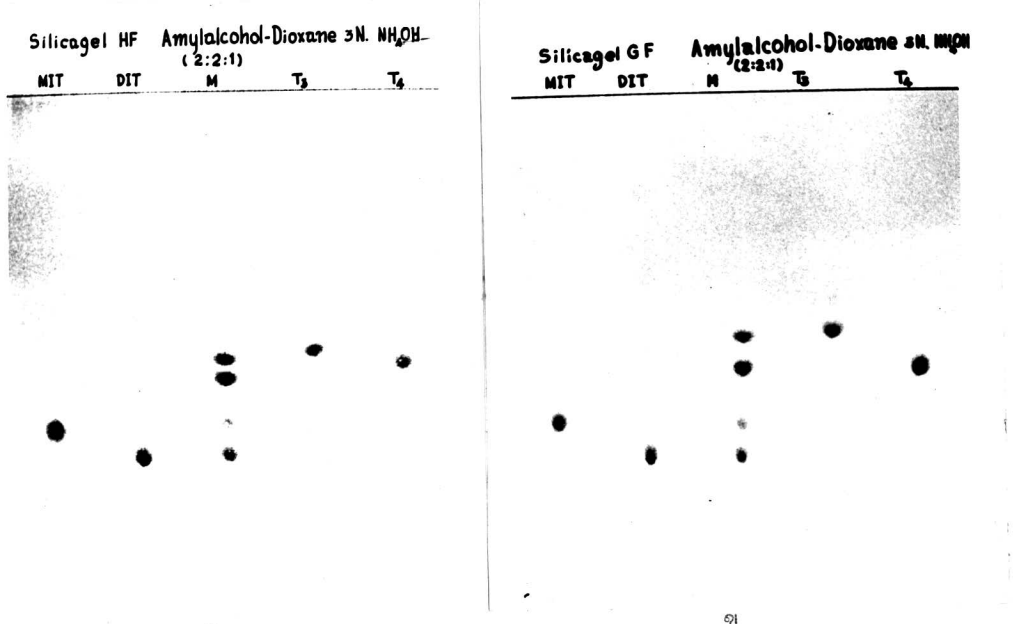
รูปที่ 3

silicagel GF Ethanol-Me-Et-ketone-2N NH_4OH 1:4:1

MIT DIT M T_3 T_4

แสดงผลการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานเมื่อใช้ solvent system 2 (Ethanol-Methylethylketone-2N NH_4OH 1:4:1)

รูปที่ 4



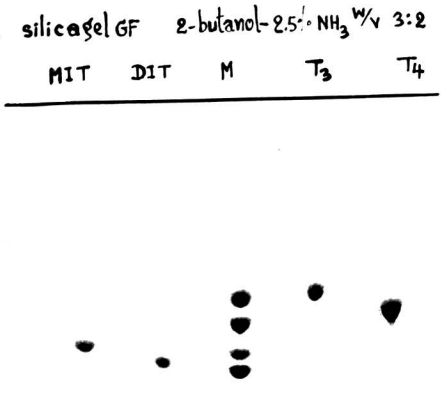
ก ข

แสดงผลการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานเมื่อใช้ solvent system 18
(Amyl alcohol-Dioxane -3N NH_4OH 2:2:1)

ก. ใช้ silicagel HF_{254}

ข. ใช้ silicagel GF_{254}

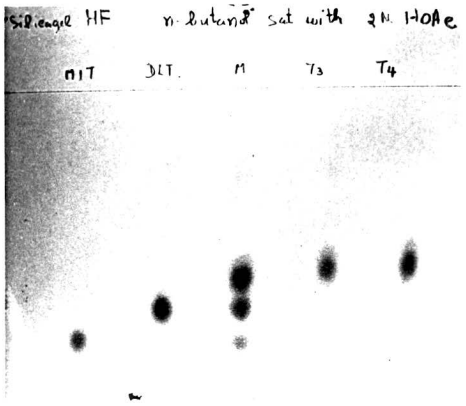
รูปที่ 5



แสดงผลการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานเมื่อใช้ solvent system 12
(2-butanol-2.5% NH_3 w/v 3:2)

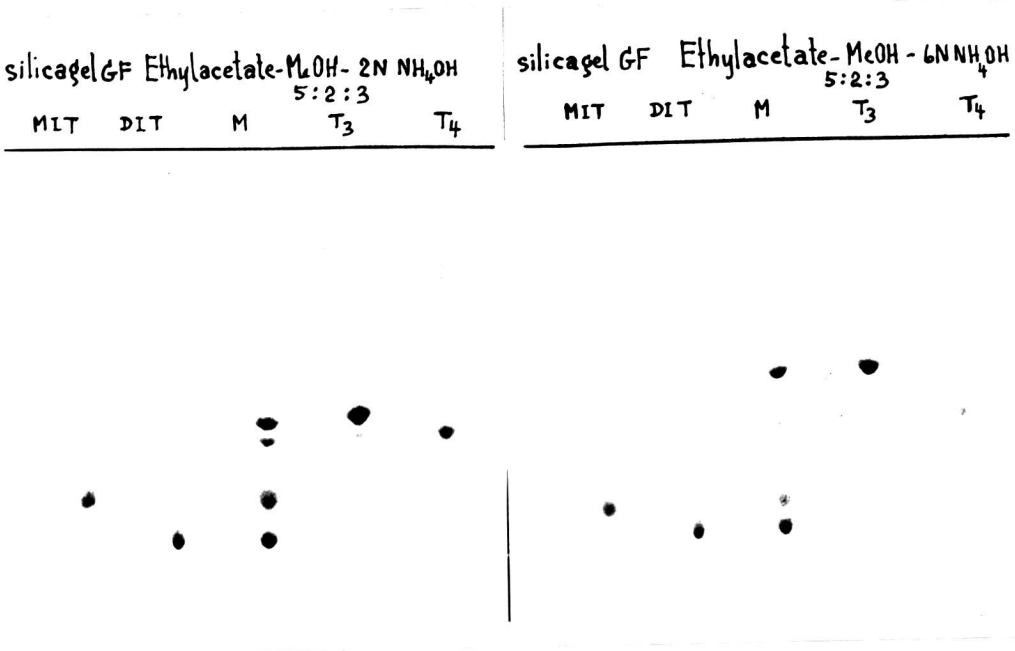
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6



แสดงผลการแยกชนิดรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานเมื่อใช้ solvent system 10 (n-butanol sat. with 2N HOAc)

รูปที่ 7



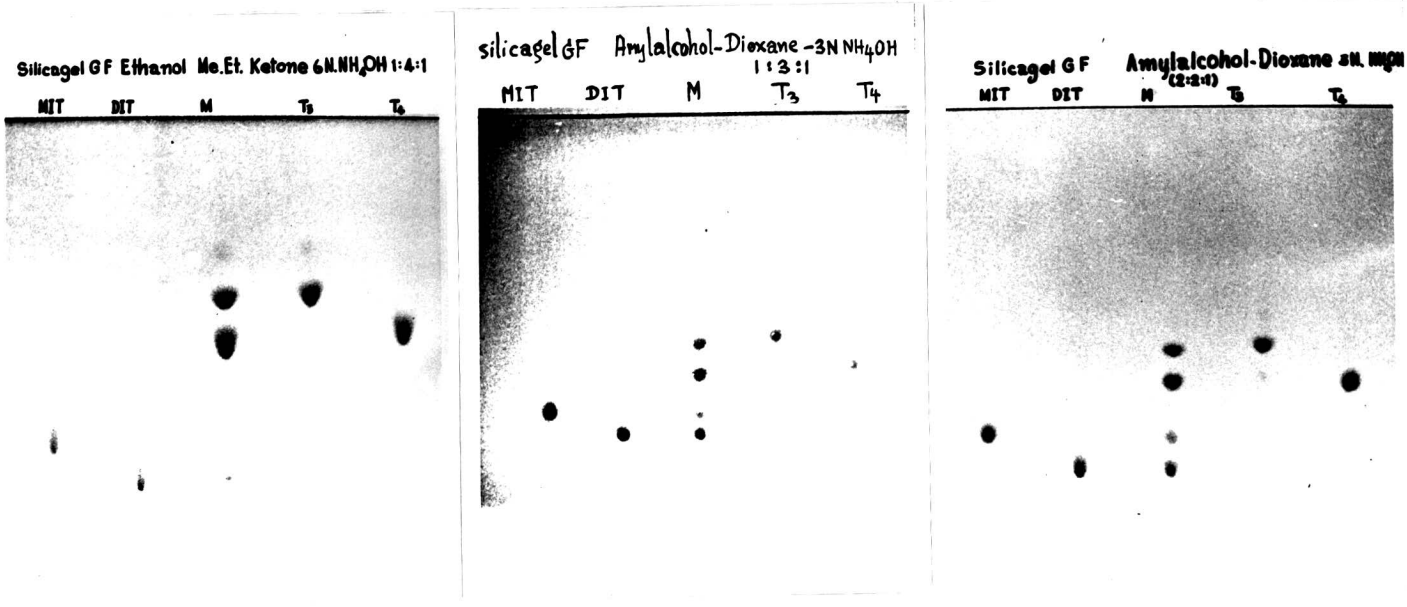
ก ข

แสดงผลการแยกชนิดรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานเมื่อใช้ solvent system 14 และ 15

ก. Ethyl acetate-Methanol- 2N NH_4OH 5:2:3 (system 14)

ข. Ethyl acetate-Methanol- 6N NH_4OH 5:2:3 (system 15)

รูปที่ 8



ก ข ค

แสดงผลการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานเมื่อใช้ solvent system 3, 17, และ 18

ก. Ethanol - Methylethylketone - 6N NH_4 OH 1:4:1 (system 3)

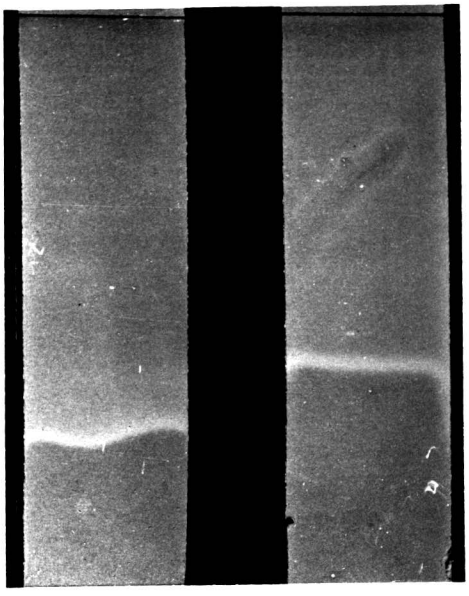
ข. Amyl alcohol - Dioxane - 3N NH_4 OH 1:3:1 (system17)

ค. Amyl alcohol - Dioxane - 3N NH_4 OH 2:2:1 (system18)

2) การใช้ Silicagel $HF_{254+366}$

จากการทดลองใช้ plate silicagel $HF_{254+366}$ 5 x 20 เซ็นติเมตร หนา 0.25 มิลลิลิตร run ในตัวทำละลายต่าง ๆ ตามตารางที่ 1 โดยไม่ใส่ธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานให้ระยะ solvent front เป็น 15 เซ็นติเมตร พบว่าใน solvent system 2,3,6,7,9,12,13,14 และ 15 จะมีเส้นขาวเกิดขึ้นเป็นระยะทางต่าง ๆ กันจากเส้นเริ่มต้น เส้นขาวนี้จะเห็นชัดมากใน solvent system 12 และ 13 ดังรูปที่ 9

รูปที่ 9



ก ข

รูปถ่ายของ plate เมื่อส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่ 254 มิลลิไมครอน แสดงเส้นที่เกิดขึ้น เมื่อใช้ silicagel $HF_{254+366}$ แทน silicagel HF_{254} หรือ silicagel GF_{254}

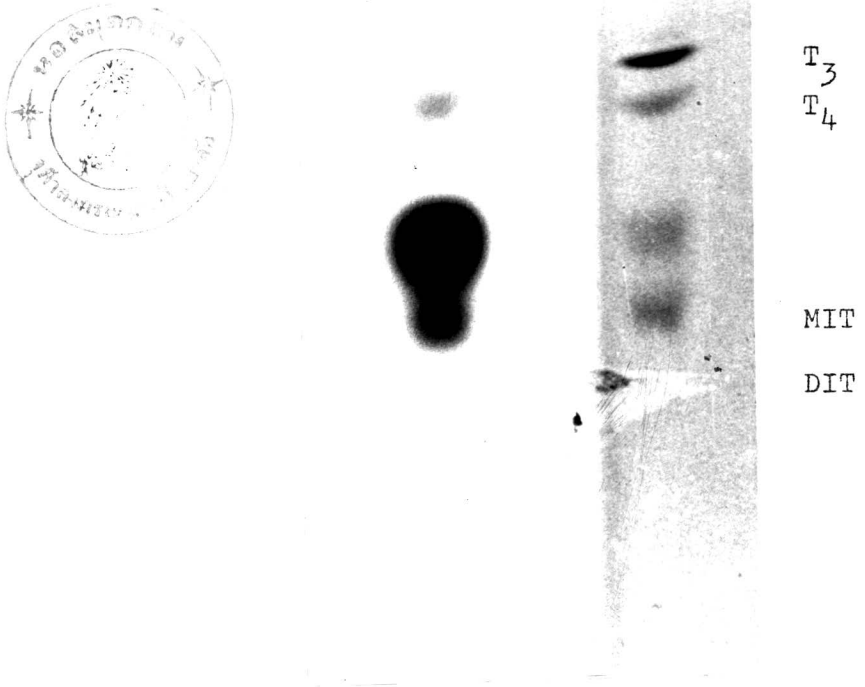
ก. เมื่อ run ด้วย Ethyl acetate - Methanol-0.2 N HOAc 5:2:3

ข. เมื่อ run ด้วย 2-butanol - 2.5 % NH_3 w/v 3 :2

3) ผลการทำ iodination ของทัยโรซีน T_3 และ T_4

การทำ iodination ของทัยโรซีน ได MIT, DIT และ T_4 ดังรูปที่ 10

รูปที่ 10



ก ข

แสดงผลการ iodination ของทัยโรซีน

ก. ARG

ข. รูปถายของ plate เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่ 254 มิลลิไมครอน

จากรูปที่ 10 จะเห็นวาการทำ iodination ของทัยโรซีนจะได MIT มากที่สุด รองลงไปเป็น DIT และ T_4 ตามลำดับ

iodination ของ T_3 จะได้ T_3 และ T_4 ปริมาณเกือบเท่า ๆ กัน

iodination ของ T_4 จะได T_4 อยางเดียว

4) การสะกัด labeled thyroid hormone ที่เติมลงใน pooled serum

การใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด สะกัด labeled thyroid hormone ที่เติมลงในซีรัม เปรียบเทียบกันระหว่างการเติมกรดและไม่เติมกรดก่อนสะกัดได้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3*

ครั้งที่สะกัด	เปอร์เซ็นต์การสะกัด					
	n-butanol		n-butanol conc.NH_3 10:1		n-butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ	
	ก	ข	ก	ข	ก	ข
1	21 (20-22)	75 (74-76)	10.5 (7-14)	35 (27-43)	15.5 (15-16)	67 (66-68)
2	50.5 (50-51)	20 (19-21)	50.5 (48-53)	24.5 (24-25)	28.5 (27-30)	20.5 (20-21)
3	15.5 (15-16)	3.5 (3-4)	12.5 (12-13)	8.0 (7-9)	8.5 (8-9)	5.5 (5-6)
4	1.5 (1-2)	1.0 (0.5-1.5)	10.5 (10-11)	6.5 (6-7)	4.5 (4-5)	3.5 (3-4)
ตะกอนที่เหลือ	18.5 (18-19)	1.5 (1-2)	20.5 (19-22)	24.5 (24-25)	42.5 (42-43)	6.5 (6-7)

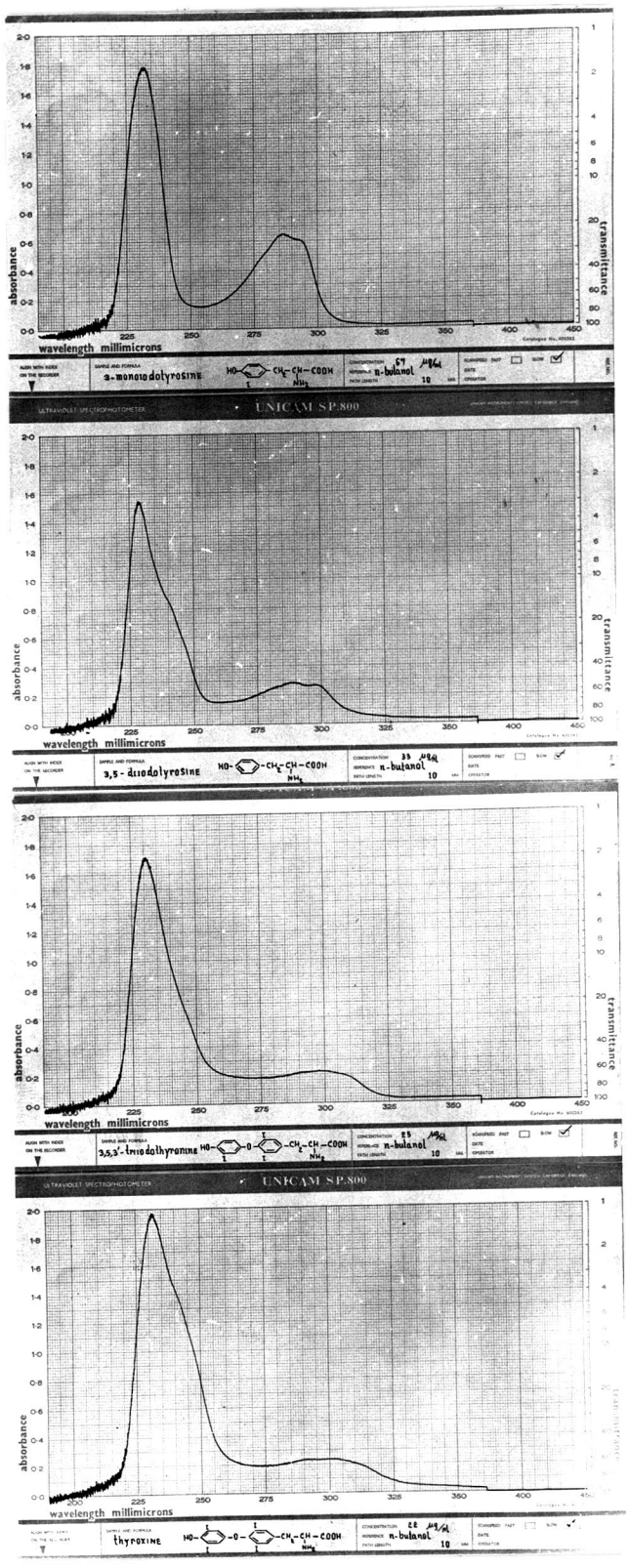
* ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำสองครั้งและค่าในวงเล็บเป็น range

ก. ผลการสะกัดโดยไม่เติมกรดก่อน

ข. ผลการสะกัดโดยเติมกรดก่อน

หมายเหตุ การสะกัดโดยใช้ n-butanol ถ้าเติมกรดก่อนจะทำให้ตะกอนจับตัวกันดีที่สุด เซ็นตริฟิวจง่าย ได้เซ็นตริฟิวจ์เกทใส แต่ถ้าไม่เติมกรดก่อนตอนสุดท้ายตะกอนจะจับกันเป็นก้อนเหนียว

รูปที่ 11



MIT

DIT

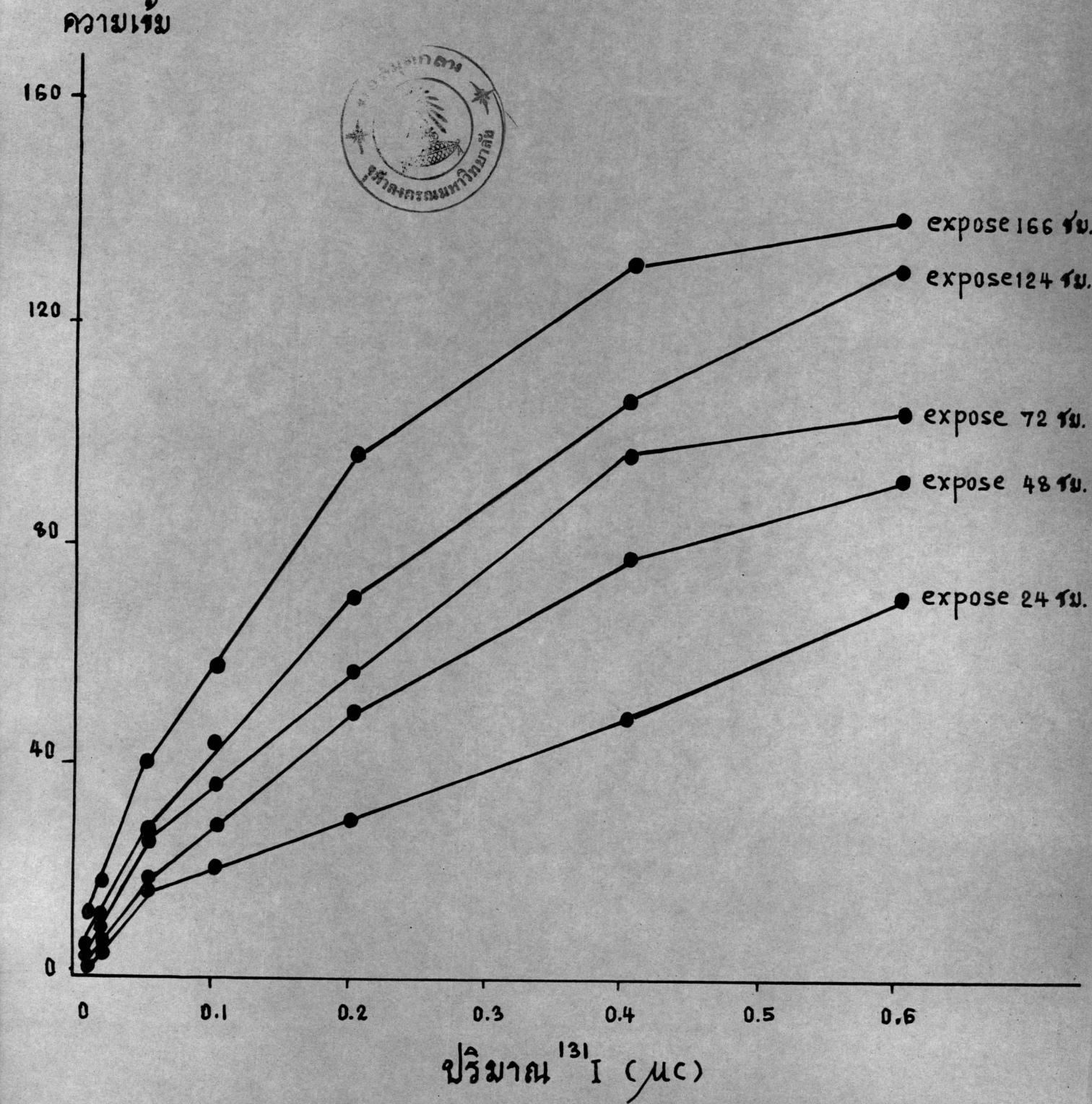
T_3

T_4

แสดง UV-spectrum ของ MIT, DIT, T_3 และ T_4

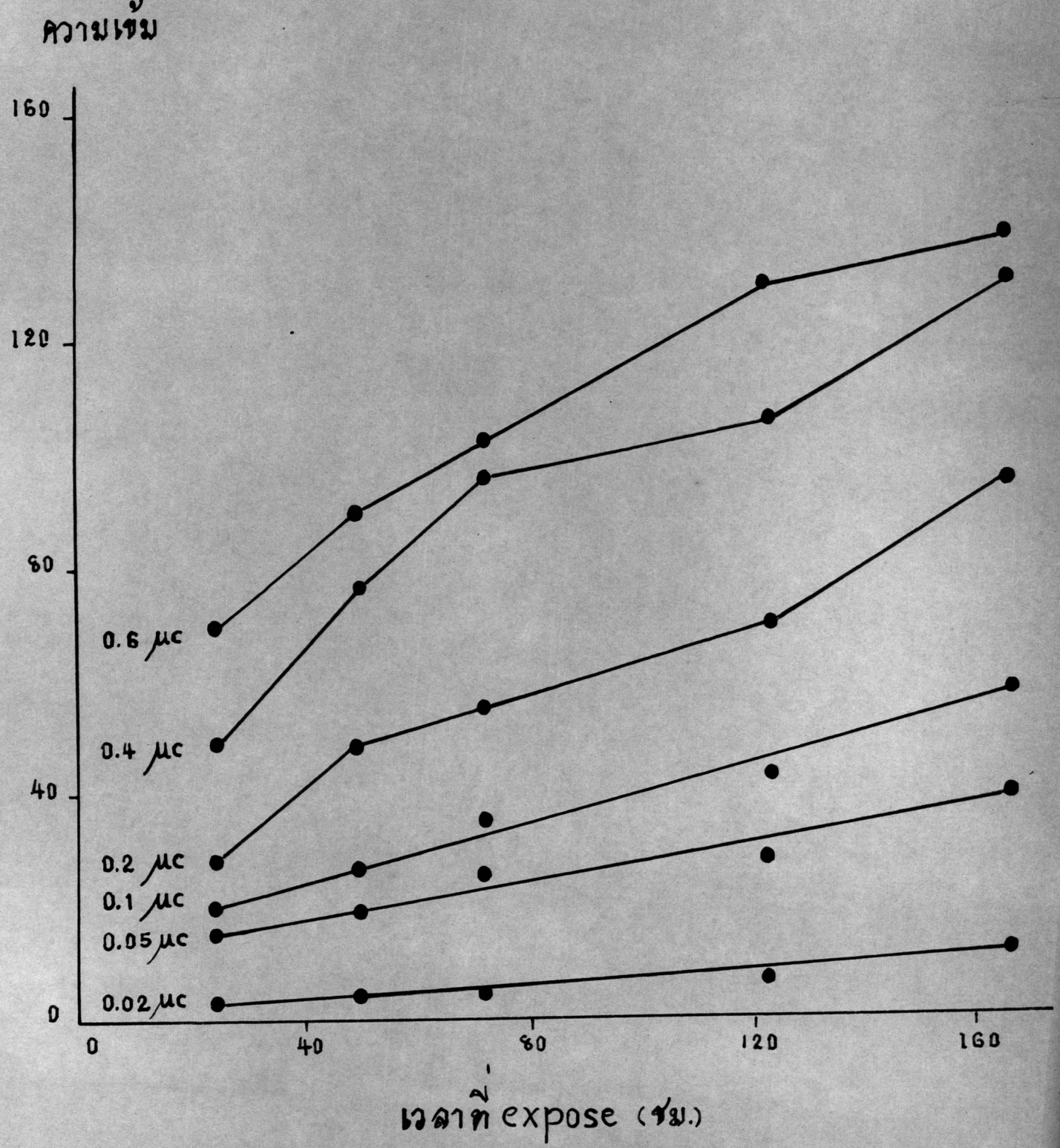
รูปที่ 12

แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มของ Kodak X-ray film กับปริมาณ ^{131}I



รูปที่ 13

แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มของ Kodak X-ray film กับเวลาที่ expose



การสะกัดด้วย n-butanol-conc. NH_3 10:1 ตะกอนจะจับตัวกันน้อยที่สุดและมีลักษณะนิ่ม ๆ ทำนองเดียวกับการสะกัดด้วย n-butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำโดยไม่เติมกรดก่อน

5) การอ่าน UV-Spectrum ของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานโดย UV-spectrophotometer

MIT, DIT, T_3 และ T_4 ให้ UV-absorption spectrum ดังรูปที่ 11

จากรูปที่ 11 จะเห็นว่าธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัวให้ maximum absorption ที่ wave length ใกล้กันมากจนไม่สามารถใช้วิธีนี้สำหรับหาปริมาณของธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัวที่อยู่รวมกันได้

6) การหาความสัมพันธ์ของปริมาณ ^{131}I กับความเข้มของฟิล์ม

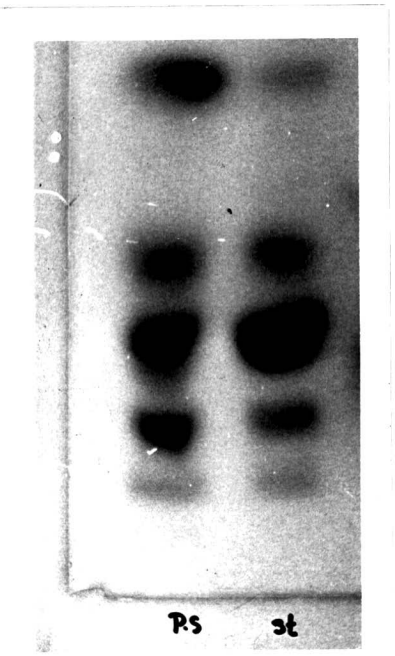
ความสัมพันธ์ของปริมาณของ ^{131}I กับความเข้มของฟิล์ม ปรากฏผลดังรูปที่ 12 และ 13

จากรูปที่ 12 และ 13 จะเห็นว่าปริมาณของ ^{131}I เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของฟิล์มเมื่อใช้ ^{131}I ระหว่าง 0.05 - 0.2 ไมโครคูรี และความเข้มของฟิล์มจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลาที่ expose ถ้าปริมาณ ^{131}I อยู่ระหว่าง 0.02-0.1 ไมโครคูรี ถ้าปริมาณของ ^{131}I มากขึ้น ความสัมพันธ์นี้จะไม่เป็นเส้นตรง

7) การทำโครมาโตกราฟที่ของ labeled thyroid hormone โดยใช้ pooled serum เป็น carrier

การทำโครมาโตกราฟที่ของ labeled thyroid hormone ซึ่งมี pooled serum เป็น carrier และไม่มี carrier ได้ผลดังรูปที่ 14

รูปที่ 14



แสดง ออโตเรดิโอแกรม ของ labeled thyroid hormone

P.S = เมื่อมี pooled serum เป็น carrier

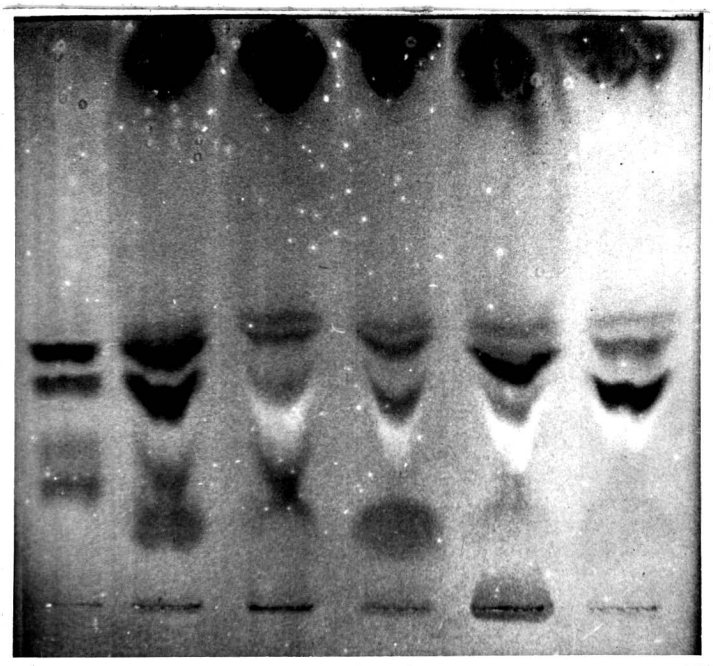
St = ไม่มี carrier

จากรูปที่ 14 จะเห็นว่าการใช้ pooled serum เป็น carrier ในการทำโครมาโตกราฟฟี่ของ labeled thyroid hormone จะให้ผลเหมือนกับ labeled thyroid hormone มาตรฐานที่ run เปรียบเทียบกันโดยไม่มี carrier

8) <u>ผลการทำโครมาโตกราฟฟี่ของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานที่เติมลงใน pooled serum</u>

การทำโครมาโตกราฟฟี่ของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานที่เติมลงใน pooled serum ได้ผลดังรูปที่ 15

รูปที่ 15



1 2 3 4 5 6

รูปถ่ายของ plate เมื่อส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่ 254 มิลลิไมครอน

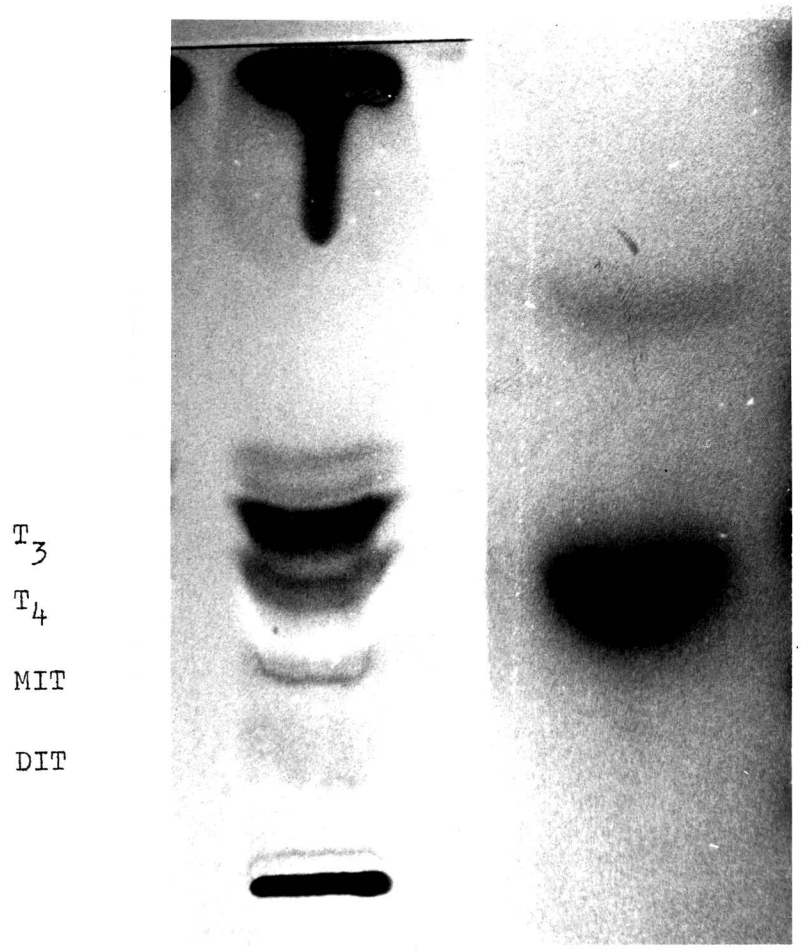
1. โครมาโตแกรมของ ธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานทั้ง 4 ตัว
2. โครมาโตแกรมของ ธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานทั้ง 4 ตัว ที่มี pooled serum เป็น carrier
3. โครมาโตแกรมของ MIT ที่มี pooled serum เป็น carrier
4. โครมาโตแกรมของ DIT ที่มี pooled serum เป็น carrier
5. โครมาโตแกรมของ T_3 ที่มี pooled serum เป็น carrier
6. โครมาโตแกรมของ T_4 ที่มี pooled serum เป็น carrier

จากรูปที่ 15 จะเห็นว่า pooled serum ทำให้การวิ่งของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานผิดไปจากฮอร์โมนที่ไม่ได้ใส่ซีรัมบ้าง แต่เราก็สามารถบอกได้ว่าจุดไหนตรงกับฮอร์โมนตัวใดเนื่องจากธัยรอยด์ฮอร์โมนแต่ละตัวที่เติมลงไปจะให้จุดเข้มขึ้นที่ตำแหน่งต่างกัน

9) <u>การทำโครมาโตกราฟฟี่ของซีรัมคนไข้ที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษ</u>

จากการศึกษาซีรัมของคนไข้ 18 ราย ปรากฏว่าซีรัมของคนไข้ 9 รายมีiodocompound 2 ตัว คือ T_4 กับอีกตัวหนึ่งซึ่งมี R_f 0.72 ดังรูปที่ 16

รูปที่ 16



ก ข

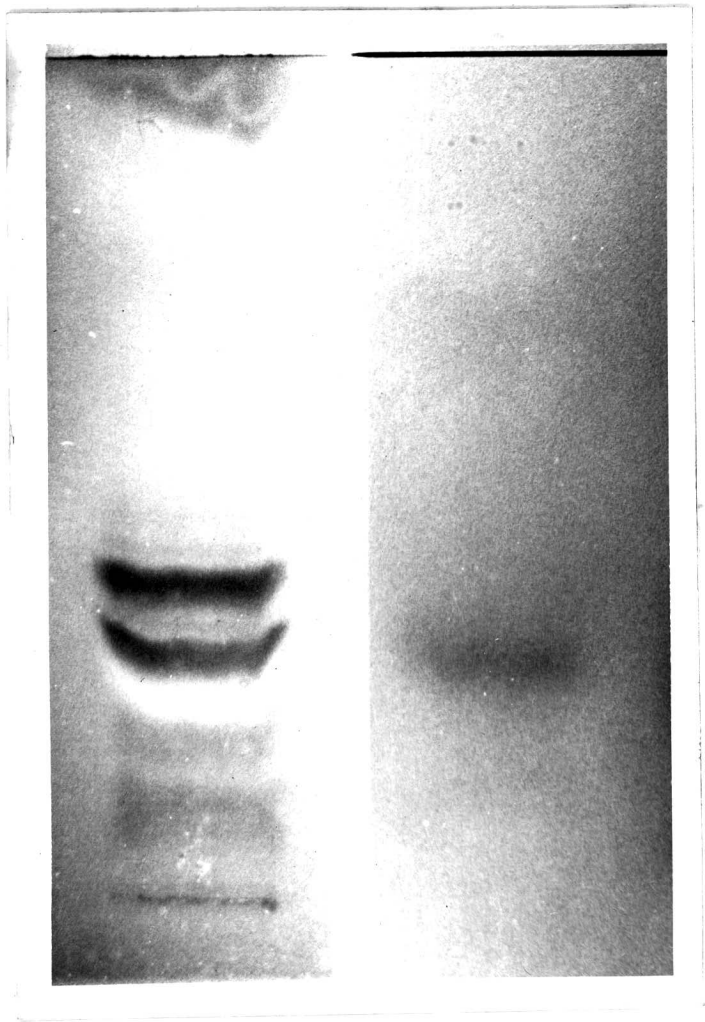
แสดงโครมาโตแกรมของซีรัมคนไข้ที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษที่พบ iodocompound ที่นอกเหนือไปจาก T_4

ก. รูปถ่ายของ plate เมื่อส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่ 254 มิลลิไมครอน แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากการเติมธัยรอยดฮอร์โมนมาตรฐานจำนวนตาม (8) ลงในซีรัมที่สะกัดแล้ว

ข. ARG ของ ก.
A เป็นจุดบน ARG ซึ่งตรงกับ T_4 ในรูป ก.
B เป็นจุดบน ARG ซึ่งมี R_f 0.72

ส่วนคนไข้อีก 9 ราย พบ iodocompound ตัวเดียว คือ T_4 ดังรูปที่ 17

รูปที่ 17



แสดงโครมาโตแกรมของซีรัมคนไข้ที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษที่พบแต่ T_4

ก. รูปถ่ายของ plate เมื่อส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่ 254 มิลลิไมครอน แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากการเติมธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานจำนวนตาม (8) ลงในซีรัมที่สะกัดแล้ว

ข. ARG ของ ก แสดงจุดที่ตรงกับ T_4 ในรูป ก