บทที่ 2

สัตว์ทดลอง อุปกรณ์ สารเคมีและการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ใช้ลิงหางยาว (Macaca fascicularis) เพศเมียจากโคโลนีของหน่วยวิจัยไพรเมต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 7 ตัว ทุก ๆ ตัวอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ อายุระหว่าง 6-10 ปี มีน้ำหนักตัว 3.0-4.5 กิโลกรัม และมีรอบประจำเดือนอย่างสม่ำเสมอมาแล้วอย่างน้อย 3 รอบประจำเดือนก่อนทำการทดลอง ลิงเหล่านี้ถูกเลี้ยงในกรงเดี่ยวทำด้วยเหล็กอาบสารกันสนิม มีขนาดกว้าง 24 นิ้ว ยาว 28 นิ้ว สูง 34 นิ้ว อยู่ในเรือนเลี้ยงที่มีอากาศถ่ายเทสะดวกและได้รับแสงสว่างตามธรรมชาติ อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ และเสริมด้วยกล้วยน้ำว้า แตงกวา และมันเทศ โดยให้อาหารวันละ 2 มื้อ เวลา 8.00-9.00 น. และ 15.00-16.00 น.

อุปกรณ์

1. β-Liquid Scintillation Counter: Model 1218-811 Rackbeta LKB Wallac, Finland.
2. γ-Counter: Model 1282 Compugamma LKB Wallac, Finland.
3. Dri-Block Heater: Model DB-3, Tecan Laboratory and Industrial Equipment, U.S.A.
4. Dubnoff Incu-Shaker: Model 3575-1 Lab Line Instruments, Inc., U.S.A.
5. Magnetic Stirror: S-18520, Thermolyne Corporation, U.S.A.
6. Micropipette: Pipetteman M81 Gilson, France; Eppendorf 3130, Germany.

7. Mixer: M 16715, Thermolyne Corporation, U.S.A.
8. Pyro-Magnetic: 1279-1 Lab Line Instruments, Inc., U.S.A.
9. Refrigerated Centrifuge: MSE Cool Spin 2, England.
10. สเปคโทรโฟโตมิเตอร์: LKB Biochrom Ultraspec II, England.

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็น A.R. grade ทั้งหมด

1. Charcoal Reagent: WHO RIA Reagent Programme; Switzerland.
2. Creatinine: Deutche Ware, Germany.
3. Dextran: WHO RIA Reagent Programme, Switzerland.
4. Diethyl ether: E. Merck, Germany.
5. Dioxane: Millinkrodt Inc. U.S.A.
6. 2, 5-Diphenyloxazole (PPO): E. Merck, Germany.
7. Disodium Hydrogen Phosphate: E. Merck, Germany.
   (Na_2HPO_4, MW. 142)
8. Ethanol (absolute): E. Merck, Germany.
9. Gelatin: Difco Laboratories. U.S.A.
10. Phenyl-oxazolyl phenyl-oxazolyl-phenyl (POPOP): Sigma Chemical company, U.S.A.
11. Picric Acid: J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.
12. Sodium Chloride: E. Merck, Germany.
    (NaCl, MW. 58.44)
13. Sodium Dihydrogen Phosphate: E. Merck, Germany.
    ($NaH_2Po_4.H_2O$, MW 137.99)
14. Sodium Hydroxide (NaOH): BDH Chemicals Ltd., England.
15. Thimersol (Merthiolate): Sigma Chemicals Company, U.S.A.

16. Toluene: E. Merck, Germany.

17. Triton X-100: E. Merck, Germany.

Antithyroid drug: Methimazole (Tapazole); Eli Lilly & Co (Taiwan), Inc.

Total T_4 Double Antibody Comercial kit: Diagnostic Product Corporation, Los Angeles.

ฮอร์โมนมาตรฐานและแอนติบอดี

ฮอร์โมนมาตรฐานของ E_1-3-G และ Pd-3α-G และแอนติบอดีของ E_1-3-G และ Pd-3α-G ได้รับจาก Dr. Fortune Kohen สถาบันวิทยาศาสตร์ไวซ์แมน ประเทศอิสราเอล ฮอร์โมนมาตรฐานของ E_2 และ P และแอนติบอดีของ E_2 และ P ได้รับจากองค์การอนามัยโลก ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

ฮอร์โมนติดสลากรังสี

E_1 ติดสลาก $\left[(2, 4, 6, 7 - {}^3H) - E_1\right]$, 20$\alpha$ - Hydroxyprogerterone ติดสลาก $\left[20\alpha\text{-OH-}(1, 2, 6, 7 - {}^3H)P\right]$, E_2 ติดสลาก $\left[(2, 4, 6, 7, 16, 17 - {}^3H) - E_2\right]$ และ P ติดสลาก $\left[(1, 2, 6, 7 - {}^3H) - P\right]$ ซื้อจากบริษัท Amersham ประเทศอังกฤษ

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การชักนำสัตว์ทดลองให้อยู่ในภาวะไฮโปไทยรอดย์

โดยให้ลิงหางยาวเพศเมียจำนวน 7 ตัว กินยาเมทิมาโซลในปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อวัน แบ่งเป็น 2 ครั้ง ๆ ละ 5 มิลลิกรัม คือในช่วงเวลา 8.00-9.00 น. และ 16.00-17.00 น. ทุก ๆ วัน โดยเริ่มให้กินในวันที่ 3 ของรอบประจำเดือนแรกของการให้ยาและให้กินจนกว่าระดับฮอร์โมนไทรอกซินลดลง เมื่อฮอร์โมนไทรอกซินลดต่ำลงแล้วจึงลดปริมาณยาเหลือเพียงครึ่งหนึ่ง (5 มิลลิกรัมต่อวัน) โดยให้เฉพาะช่วงเช้าและหลังจากนี้ถ้าฮอร์โมนไทรอกซินยังอยู่ในระดับต่ำเกินไปจะลดปริมาณยาเหลือเพียง $\frac{1}{4}$ ของปริมาณที่ให้ในตอนแรก (2.5 มิลลิกรัมต่อวัน) และติดตามดูผลกระทบ

ของการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนไทรอกซินที่มีต่อรอบประจำเดือน การเกิด menstrual bleeding ระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลและโปรเจสเตอโรนในซีรัม รวมทั้งเมตาบอไลต์ของอีสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนในปัสสาวะคือ E_1-3-G และ Pd-3.-G ตลอดจนความสามารถในการผสมพันธุ์และการตั้งครรภ์ โดยติดตามผลตั้งแต่เริ่มให้ยาไปจนครบ 164 วัน

2. การเจาะเลือด

เจาะเลือดลิงทดลองทุกตัวครั้งละ 7 มิลลิลิตร ทางเส้นเลือดหน้าขา (femoral venipuncture) ในช่วงเวลา 09.00-10.00 น. โดยเจาะเลือดตามวันของรอบประจำเดือนในช่วงก่อนให้ยาในวันที่ 10 และ 23 (D_{10} และ D_{23}) ของรอบประจำเดือน ส่วนในระยะชักนำให้เกิดภาวะไฮโปไทรอยด์เจาะเลือดสัปดาห์ละครั้ง โดยเริ่มในวันแรกที่ให้กินยาเมทิมาโซล ซึ่งเป็นวันที่ 3 ของรอบประจำเดือนที่ถัดมาดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงวันที่เจาะเลือด

	ระยะก่อนให้ยา	ระหว่างการให้ยา
วันที่เจาะเลือด	D_{10}, D_{23}	D_3, D_{10}, D_{17}, D_{24}, D_{31}.....D_{164}

นำเลือดที่ได้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 ชั่วโมง แล้วนำใส่ตู้เย็นไว้ค้างคืน วันรุ่งขึ้นนำเลือดไปปั่นที่ความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นซีรัมไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์หาปริมาณของฮอร์โมนไทรอกซิน อีสตราไดออล และโปรเจสเตอโรนภายในระยะเวลาไม่เกิน 2 เดือน

3. การเก็บปัสสาวะ

ทำการเก็บปัสสาวะของลิงทดลองทุกตัวโดยเปลี่ยนถาดรองรับเศษอาหารที่ได้ในกรงในตอนเย็นประมาณ 17.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่ลิงได้รับอาหารเรียบร้อยแล้ว และเก็บปัสสาวะในถาดนี้ตอนเช้าก่อนให้อาหารเวลาประมาณ 07.00-08.00 น. เก็บทุกวันโดยใช้พลาสเตอร์ปิเปต ยกเว้นวันที่มีประจำเดือน ปัสสาวะที่ได้นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศา

เซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์หาปริมาณ E_1-3-G, Pd-3α-G และครีเอตินีน ภายในระยะเวลาไม่เกิน 2 เดือน

4. การทดสอบความสามารถในการผสมพันธุ์

เมื่อระดับของฮอร์โมนไทรอกซินในสัตว์ทดลองลดลงก็นำมาผสมพันธุ์กับตัวผู้ปกติที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ ในวันที่ 11-13 ของรอบประจำเดือนแล้วตรวจสอบดูความสามารถในการยอมรับ (receptivity) และการตั้งครรภ์จนสิ้นสุดการทดลอง

การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนสเตอรอยด์โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (RIA)

สารละลายที่ใช้และวิธีเตรียม

1. Assay buffer

ละลาย Gelatin 1 กรัมในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร อุ่นให้ Gelatin ละลาย จนหมด ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมสารเคมีอื่น ๆ ดังนี้

Sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$)	3.1 กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	11.6 กรัม
Sodium chloride (NaCl)	8.8 กรัม
Thimersol	0.1 กรัม

เมื่อละลายเข้ากันดีแล้ว นำไปปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2-7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

2. Charcoal suspension

ละลาย dextran 0.0625 กรัมใน assay buffer 100 มิลลิลิตรแล้วจึงเติม charcoal reagent 0.625 กรัม เขย่าอย่างแรงนาน 30 วินาที เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

3. Counting solution

3.1 สูตรที่ 1 ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน E_2 และ P โดยละลาย PPO 5 กรัม และ PoPoP 0.3 กรัม ใน Toluene 1,000 มิลลิลิตรแล้วเติม Dioxane 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

3.2 สูตรที่ 2 ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน E_1-3-G และ Pd-3∝-G โดยละลาย PPO 22.5 กรัม ใน Toluene 3,000 มิลลิลิตร แล้วเติม Triton x-100 1,500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

4. สารละลายฮอร์โมนมาตรฐาน

4.1 สารละลาย E_1-3-G มาตรฐาน จากสารละลายตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 40 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยละลายใน assay buffer นำมาทำเจือจางลำดับส่วนโดยใช้ assay buffer จนได้สารละลาย E_1-3-G มาตรฐาน ความเข้มข้นตั้งแต่ 125-4,000 พิโคกรัม/0.5 มิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเตรียมสารละลาย E_1-3-G มาตรฐาน

ลำดับที่	จากสารละลาย E_1-3-G มาตรฐาน		assay buffer (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นที่ได้ (พิโคกรัม/0.5 มิลลิลิตร)
	ความเข้มข้น	ปริมาตร (มิลลิลิตร)		
1	40 นาโนกรัม/มล.	0.5	4.5	4000
2	ลำดับที่ 1	2.0	2.0	2000
3	ลำดับที่ 2	2.0	2.0	1000
4	ลำดับที่ 3	2.0	2.0	500
5	ลำดับที่ 4	2.0	2.0	250
6	ลำดับที่ 5	2.0	2.0	125

4.2 สารละลาย Pd-3∝-G มาตรฐาน จากสารละลายตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยละลายใน assay buffer นำมา 0.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วย assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้ Pd-3∝-G มาตรฐานความเข้มข้นแรกที่ 5,000 พิโคกรัม/0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำเจือจางลำดับส่วนอีก 5 ลำดับ จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 156.25 พิโคกรัม/0.5 มิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนการทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1

014423

4.3 สารละลาย E_2 มาตรฐาน จากสารละลายตั้งต้น 150 นาโนโมล/ลิตร ละลายในเอทานอล นำมา 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที จะได้สารละลาย E_1 มาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1.5 พิโคโมล/ลิตร เก็บไว้เป็น stock solution เมื่อต้องการใช้นำ stock solution มาทำเจือจางลำดับส่วนอีก 5 ลำดับส่วนจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 23.43 เฟมโตโมล/0.5 มิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนเหมือนกับข้อ 4.1

4.4 สารละลาย P มาตรฐาน จากสารละลายตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 25 นาโนโมล/ลิตร ละลายในเอทานอล นำมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติม assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย P มาตรฐาน ความเข้มข้นแรกที่ 1,250 เฟมโตโมล/0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำเจือจางลำดับส่วนอีก 5 ลำดับ ส่วนจะได้สารละลาย มาตรฐานความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 39.06 เฟมโตโมล/0.5 มิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนการทำเหมือนกับข้อ 4.1

5. สารละลายฮอร์โมนติดสลากรังสี

5.1 E_1-ติดสลาก จากสารละลายตั้งต้นที่มีความแรง 10 ไมโครคิวรี/มิลลิลิตร ละลายในเบนซีน: เอทานอล ในอัตราส่วน 9:1 นำมา 1 ส่วนแล้วเป่าให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 100 ส่วนจะได้สารละลายสำหรับใช้งานที่มีความแรง 100 นาโนคิวรี/มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

5.2 20α-Hydroxyprogesterone ติดสลาก จากสารละลายตั้งต้นที่มีความแรง 5 ไมโครคิวรี/มิลลิลิตร ละลายในเบนซีน: เอทานอล ในอัตราส่วน 9:1 นำมา 1 ส่วนแล้วเป่าให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 50 ส่วนจะได้สารละลายสำหรับใช้งานที่มีความแรง 100 นาโนคิวรี/มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

5.3 E_2-ติดสลาก จากสารละลายตั้งต้นที่มีความแรง 10 ไมโครคิวรี/มิลลิลิตร ละลายในเบนซีน: เอทานอล ในอัตราส่วน 9:1 นำมาเจือจางให้ได้ความแรงที่จะใช้งานเท่ากับ 100 นาโนคิวรี/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายตั้งต้นมา 1 ส่วน เป่าให้แห้งแล้วเติม assay buffer 100 ส่วน เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

5.4 P ติดสลาก จากสารละลายตั้งต้นที่มีความแรง 10 ไมโครคิวรี/มิลลิลิตร ละลายในเบนซีน: เอทานอล ในอัตราส่วน 9:1 นำมาเจือจางให้ได้ความแรงที่จะใช้งานเท่ากับ 100 นาโนคิวรี/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายตั้งต้นมา 1 ส่วน เป่าให้แห้งแล้วเติม assay buffer 100 ส่วน เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

6. สารละลายแอนติบอดี

6.1 สารละลายแอนติบอดีของ E_1-3-G จากสารละลายตั้งต้น 1:2 เตรียมให้เป็นความเข้มข้น 1:5,000 โดยนำสารละลายตั้งต้นมา 1 ส่วนแล้วเติม assay buffer 2,500 ส่วน (final dilution = 1:35,000) เตรียมแล้วใช้ทันที

6.2 สารละลายแอนติบอดีของ Pd-3α-G จากสารละลายตั้งต้น 1:2 เตรียมให้เป็นความเข้มข้น 1:4,000 โดยนำสารละลายตั้งต้นมา 1 ส่วน เติม assay buffer 2000 ส่วน (final dilution = 1:28,000) เตรียมแล้วใช้ทันที

6.3 สารละลายแอนติบอดีของ E_2 จากแอนติบอดีของ E_2 ซึ่งอยู่ในสภาพเป็นผงที่ได้จากการ lyophilization (lyophilized form) ของ WHO นำมาเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร (final dilution = 1:210,000) เขย่าให้ละลายให้หมด เตรียมแล้วใช้ทันที

6.4 สารละลายแอนติบอดีของ P จากแอนติบอดีของ P ซึ่งอยู่ในสภาพเป็นผงที่ได้จากการ lyophilization (lyophilized form) ของ WHO นำมาเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายให้หมด (final dilution = 1:56,000) เตรียมแล้วใช้ทันที

การตรวจหาปริมาณฮอร์โมน E_2 โดยวิธี RIA

การตรวจหาปริมาณ E_2 ในซีรัมทำตามวิธีการของ WHO (1986) โดยดัดแปลงขั้นตอนเพื่อความเหมาะสมดังนี้

นำตัวอย่างซีรัมที่เก็บไว้มาแบ่งใส่หลอดทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด (duplicate aliquote) หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร สกัดด้วยไดเอธิลอีเธอร์ 5 มิลลิลิตรนาน 1 นาที โดยใช้เครื่องวอร์เทกซ์ สเตอรอยด์ฮอร์โมนจะอยู่ในชั้นของไดเอธิลอีเธอร์ จากนั้นแยกชั้นของน้ำออกจากชั้นไดเอธิลอีเธอร์ โดยนำหลอดทดลองไปแช่ในถาดซึ่งมี dry ice และเอทานอล

รินส่วนของไดเอธิลอีเทอร์ลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง นำไปทำให้แห้งด้วย dri block heater ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งไดเอธิลอีเธอร์จะระเหยหมดไปเหลือสเตอรอยด์ฮอร์โมนติดอยู่ข้างหลอดออกมา แล้วเติม assay buffer หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อละลายเอาสเตอรอยด์ฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดออกมา

นำสารละลาย E_2 มาตรฐาน 6 ความเข้มข้นมาแบ่งใส่หลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย E_2 ติดสลากรังสีและสารละลายแอนติบอดีของ E_2 อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ทุกหลอดทั้งที่บรรจุ E_2 มาตรฐาน และที่สกัดได้จากซีรัม เขย่าให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

แล้วนำมาใส่ถาดน้ำแข็ง จากนั้นเติม charcoal suspension ที่ปั่นอยู่ในถาดน้ำแข็งตลอดเวลา หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นแยกผงถ่านออกที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที เทส่วนใสที่มี bound form ของฮอร์โมนติดสลากรังสีกับแอนติบอดีลงใน counting vial แล้วเติม counting solution สูตรที่ 1 หลอดละ 4.5 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง β-liquid scintillation counter เป็นเวลา 5 นาทีต่อ 1 vial

ตารางที่ 3 แสดงการตรวจหาปริมาณ E_2 โดยวิธี RIA

หลอดทดลอง	assay buffer	tracer	antibody		charcoal suspension
Tc	0.6 มล.	0.1 มล.	-	ตั้งทิ้งไว้ 4°C 18-24 ชั่วโมง	-
NSB	0.6 มล.	0.1 มล.	-		0.2 มล.
TBo	0.5 มล.	0.1 มล.	0.1 มล.		0.2 มล.
สารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง	0.5 มล.	0.1 มล.	0.1 มล.		0.2 มล.

การคำนวณและการอ่านค่าฮอร์โมน

นำค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ (count per minute; cpm) ของแต่ละตัวอย่างมาหาค่าเฉลี่ยแล้วลบออกด้วยค่าเฉลี่ยของ NSB ทุกตัวอย่างยกเว้น Tc

TBo หรือ Maximum binding คำนวณได้จาก

$$\frac{\text{(ค่าเฉลี่ย cpm ของ TBo-ค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB}}{\text{ค่าเฉลี่ยของ Tc}} \times 100\ \%$$

เปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว (% bound) ของสารละลายตัวอย่างหรือของฮอร์โมนมาตรฐานคำนวณได้จาก

$$\frac{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของสารละลายตัวอย่าง-ค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB}}{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TBo-ค่าเฉลี่ยของ NSB}} \times 100\ \%$$

นำค่า cpm ของ E_2 มาตรฐานทั้ง 6 ความเข้มข้น มาเขียนกราฟมาตรฐานลงบนกระดาษเซมิลอกาลิธึม ระหว่างความเข้มข้นกับค่า cpm ของ E_2 มาตรฐานแต่ละความเข้มข้น แล้วอ่านค่าปริมาณ E_2 ในแต่ละตัวอย่างซีรัม โดยนำค่า cpm ของแต่ละตัวอย่างมาอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานที่ทำไว้

การตรวจหาปริมาณ P โดยวิธี RIA

การตรวจหาปริมาณ P ในซีรัมทำตามวิธีการของ WHO (1986) โดยดัดแปลง[๑๕] เพื่อให้เหมาะสมดังต่อไปนี้

นำตัวอย่างซีรัมมาแบ่งใส่หลอดทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด หลอดละ 0.15 มิลลิลิตร แล้วสกัดด้วยไดเอธิลอีเธอร์ 5 มิลลิลิตรนาน 1 นาที โดยใช้เครื่องวอร์เทกซ์ สเตอรอยด์ฮอร์โมนจะละลายอยู่ในชั้นของไดเอธิลอีเธอร์ ทำการแยกชั้นของน้ำออกโดยนำหลอดทดลองไปแช่ในถาดซึ่งมี dry ice และเอทานอล แล้วรินเอาส่วนของไดเอธิลอีเธอร์ใส่ลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง นำไปทำให้แห้งด้วย dri block heater ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สเตอรอยด์จะเหลือติดอยู่ข้างหลอดแล้วเติม assay buffer หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เมื่อละลายเอาสเตอรอยด์ฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดออกมา

นำสารละลาย P มาตรฐานที่เตรียมไว้ 6 ความเข้มข้น แบ่งใส่หลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย P ติดสลากรังสีและสารละลายแอนติบอดีของ P ทุกหลอด ทั้งที่มี P มาตรฐานและที่สกัดได้จากตัวอย่างซีรัม อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

แล้วนำออกมาใส่ถาดน้ำแข็ง จากนั้นเติม charcoal suspension ที่ปั่นอยู่ในถาดน้ำแข็งตลอดเวลา หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้ง 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกเอาผงถ่านออกที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที รินส่วนใสใส่ counting vial แล้วเติม counting solution สูตรที่ 1 หลอดละ 4.5 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง β-liquid scintillation counter เป็นเวลา 5 นาทีต่อ 1 vial

นำค่า cpm ของ P มาตรฐานทั้ง 7 ความเข้มข้น มาเขียนกราฟมาตรฐานลงบนกระดาษเซมิลอกาลิธึม ระหว่างค่า cpm ของ P มาตรฐานแต่ละความเข้มข้นกับความเข้มข้นแล้วอ่านค่าปริมาณ P ในแต่ละตัวอย่างซีรัมจากกราฟมาตรฐาน

<u>การตรวจหาปริมาณ E_1-3-G โดยวิธี RIA</u>

การตรวจหาปริมาณ E_1-3-G ในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธี RIA ดัดแปลงจากของ Samarajeewa and Kellie (1975)

นำตัวอย่างปัสสาวะมาเจือจางด้วย assay buffer ในอัตราส่วน 1:20 แบ่งใส่หลอดทดลอง 2 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

นำสารละลาย E_1-3-G มาตรฐานที่เตรียมไว้ทั้ง 6 ความเข้มข้น แบ่งใส่หลอดทดลองความเข้มละ 3 หลอด ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย E_1 ติดสลากรังสีและแอนติบอดีของ E_1-3-G ทุกหลอดอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

แล้วนำออกมาใส่ถาดน้ำแข็ง จากนั้นเติม charcoal suspension ที่ปั่นอยู่ในถาดน้ำแข็งตลอดเวลา หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนใสใส่ counting vial แล้วเติม counting solution สูตรที่ 2 4.5 มิลลิลิตร ปิดฝา เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง β-liquid scintillation counter vial ละ 5 นาที

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของ E_1-3-G มาตรฐานกับค่าเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวของแต่ละความเข้มข้น อ่านค่าปริมาณ E_1-3-G ของแต่ละตัวอย่างจากกราฟแล้วคำนวณให้อยู่ในหน่วยของนาโนกรัม/มิลลิกรัมของครีเอตินิน

<u>การตรวจหาปริมาณ Pd-3∝-G โดยวิธี RIA</u>

การตรวจหาปริมาณ Pd-3∝-G ในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธี RIA ดัดแปลงจากวิธีของ Samarajeewa et al. (1979)

นำตัวอย่างปัสสาวะมาเจือจางด้วย assay buffer ในอัตราส่วน 1:20 แบ่งใส่หลอดทดลอง 2 หลอด ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร

นำสารละลาย Pd-3∝-G มาตรฐานที่เตรียมไว้ทั้ง 6 ความเข้มข้น แบ่งใส่หลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร

เติมสารละลายติดสลากรังสีของ 20∝-OH-P และแอนติบอดีของ Pd-3∝-G ทุกหลอด อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

แล้วนำออกมาใส่ถาดน้ำแข็ง เติม charcoal suspension ที่ปั่นอยู่ในถาดน้ำแข็งตลอดเวลา หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เทส่วนใสใส่ counting vial แล้วเติม counting solution สูตรที่ 2 4.5 มิลลิลิตร ปิดฝา เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง β-liquid scintillation counter vial ละ 5 นาที

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Pd-3∝-G แต่ละความเข้มข้นกับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวของแต่ละความเข้มข้น แล้วอ่านค่าปริมาณ Pd-3∝-G จากกราฟแล้วคำนวณให้อยู่ในหน่วย นาโนกรัม/มิลลิกรัม ครีเอตินิน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจหาปริมาณฮอร์โมนไทรอกซินโดยวิธี RIA

สารละลายที่ใช้และวิธีเตรียม

1. แอนติบอดีของไทรอกซิน จากแอนติบอดีของไทรอกซิน ซึ่งอยู่ในสภาพเป็นผงที่ได้จากการ lyophilization นำมาเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

2. ไทรอกซินติดสลากไอโอดีน-125 (^{125}I-T_4) จากฮอร์โมนไทรอกซินที่อยู่ในสภาพเป็นผงจากการ lyophilization นำมาเติมน้ำกลั่น 11 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

3. สารละลายไทรอกซินมาตรฐาน อยู่ในสภาพสารละลายโดยแต่ละขวดบรรจุความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 1, 4, 10, 16 และ 24 ไมโครกรัม/เดซิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

4. Antirabbit gamma globulin (Second antibody) อยู่ในสภาพสารละลาย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

ขั้นตอนการตรวจหาปริมาณ T_4 ในซีรัมโดยวิธี RIA

ทำตามวิธีการของ Diagnostic Products Corporation (1984) ดังนี้

นำตัวอย่างซีรัมและสารละลายไทรอกซินมาตรฐาน แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 0.025 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $[^{125}I]$-T_4 และแอนติบอดีของไทรอกซินทุกหลอดอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เติม Antirabbit gamma globulin ของไทรอกซินทุกหลอด หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3000 g นาน 15 นาที เทเอาส่วนใสออกแล้วนำตะกอนไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง γ-counter

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย T_4 มาตรฐานกับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวของแต่ละความเข้มข้น อ่านค่าปริมาณ T_4 ของแต่ละตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณให้อยู่ในหน่วย ไมโครกรัม/เดซิลิตร

การวิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินีน

หาปริมาณของครีเอตินีนในตัวอย่างปัสสาวะโดยใช้ Jaffe' reaction ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างครีเอตินีนกับกรดพิคริกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วจะให้สารสีแดง (Greenwald, 1928)

สารละลายและวิธีเตรียม

1. จากสารละลายครีเอตินีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมใน 0.1 N HCl ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำมาเจือจางลำดับส่วนด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10 ความเข้มข้น คือ 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78 และ 0.39 ไมโครกรัม/0.1 มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดพิคริก 0.033 M เตรียมโดยชั่งกรดพิคริกบริสุทธิ์ 8.25 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร คนให้ละลายโดยใช้ความร้อนช่วยแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.4 N เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 56 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการในการวิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินีน ทำดังนี้

เจือจางตัวอย่างปัสสาวะแต่ละตัวอย่างในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:100 แล้วแบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 3.0 มิลลิลิตร นำสารละลายครีเอตินีนมาตรฐานทั้ง 10 ความเข้มข้น มาแบ่งใส่หลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 2.9 มิลลิลิตรทุกหลอด ในขณะเดียวกันก็ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร แทนสารมาตรฐาน หรือสารตัวอย่าง จากนั้นเติมสารละลายกรดพิคริก 1.0 มิลลิลิตรทุกหลอด เติม 0.1 N NaOH 0.5 มิลลิลิตรทุกหลอด เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ในที่ปลอดแสง $1\frac{1}{2}$ - 2 ชั่วโมง วัดค่าเปอร์เซนต์แสงผ่านโดยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

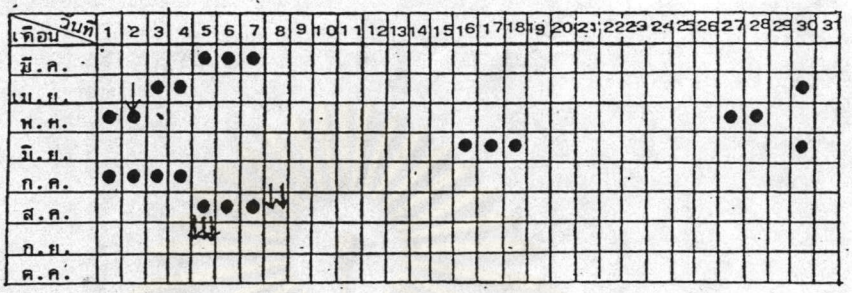
เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายครีเอตีนีนมาตรฐานกับค่าเปอร์เซนต์แสงผ่านของแต่ละความเข้มข้นในกระดาษเซมิลอกาลิธึม แล้วอ่านค่าปริมาณครีเอตินีนในตัวอย่างปัสสาวะจากกราฟแล้วคำนวณให้อยู่ในหน่วยมิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การวิเคราะห์และแปลผลทางสถิติ

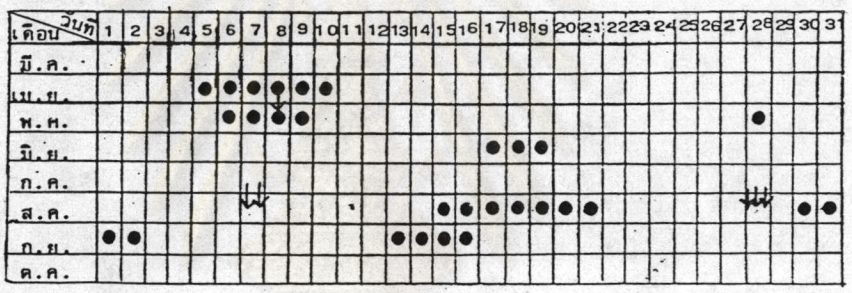
ผลการทดลองจะรายงานในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างก่อนการทดลองและระหว่างการทดลอง โดยใช้ Student's unpaired t-test ซึ่งจะพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ หรือ $p < 0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

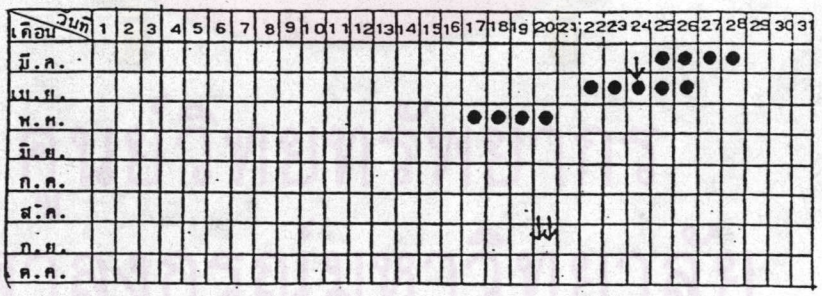
ตารางที่ 4 แสดงรอบประจำเดือนและวันที่ให้ยาในลิงทดลองที่ศึกษา ระหว่างเดือนมีนาคม - ตุลาคม 2530



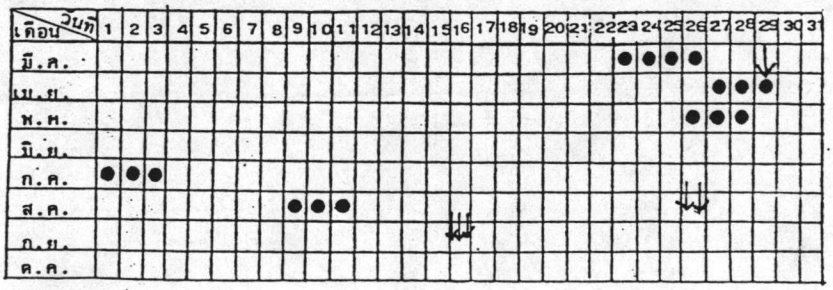
ลิงหมายเลข 25



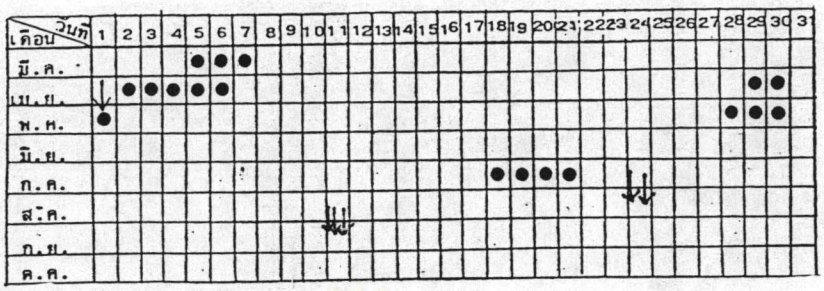
ลิงหมายเลข 33



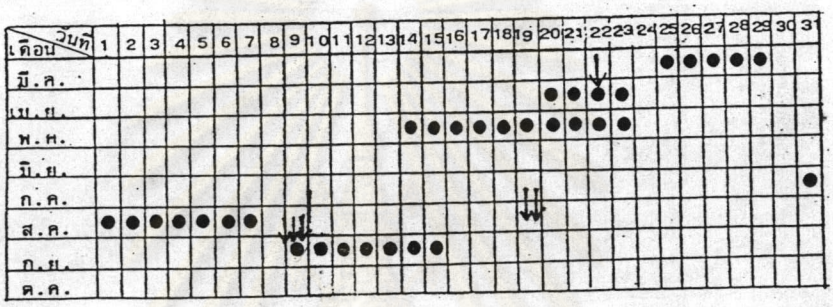
ลิงหมายเลข 63



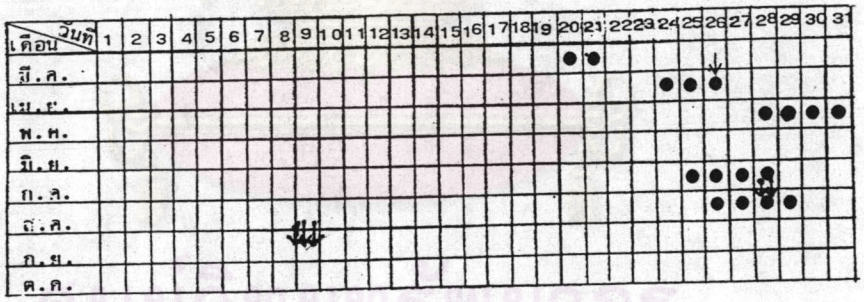
ลิงหมายเลข 77



ลิงหมายเลข 78



ลิงหมายเลข 87



ลิงหมายเลข 101

หมายเหตุ ● = (menstrual) bleeding

↓ = วันที่เริ่มต้นให้ยา (10 มก./วัน)

↓↓ = วันที่เริ่มลดยาครั้งแรก (5 มก./วัน)

↓↓↓ = วันที่เริ่มลดยาครั้งที่ 2 (2.5 มก./วัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การประเมินผลความเชื่อถือได้ของการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน

ในการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการตรวจวัดโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ควรจะมีการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) และความไวในการตรวจวัด (sensitivity) เพื่อเป็นข้อบ่งชี้ว่าวิธีการนี้มีความน่าเชื่อถือได้มากน้อยเพียงใด (Ekins, 1970, Abraham, 1974)

1. ความจำเพาะ

เป็นการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ โดยนำสารอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนที่ตรวจวัดนั้นมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแล้วคำนวณค่าเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นกับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวของสารที่นำมาทดสอบแต่ละชนิดแล้วคิดหาเปอร์เซนต์ cross reation (ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสารอื่น) ที่ระดับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ (Doerr et al., 1973)

$$\% \text{ cross reaction} = \frac{b}{a} \times 100$$

a = ปริมาณของฮอร์โมนนั้นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนนั้นที่ระดับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวเท่ากับ 50 %

b = ปริมาณของสารอื่นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานของสารนั้นที่ระดับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวเท่ากับ 50 %

ตารางที่ 5 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีของ E_1-3-G

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross reaction
E_1-3-G	100.00
estrone	27.00
estradiol	<0.001
estriol	<0.001
E_3-3-G	<0.001

ตารางที่ 6 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีของ Pd-3α-G

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross reaction
Pd-3α-G	100.00
5β-pregnane-3α, 20α-diol	0.01
5β-pregnan -20-one	<0.001
5β-pregnane-3α, 20β-diol	<0.001
20α-OH-progesterone	30.00

ตารางที่ 7 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีของ E_2

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross reaction
estradiol	100.00
estriol	0.8
estrone	< 0.02
cortisol	< 0.02
progesterone	0.02
testosterone	< 0.02

ตารางที่ 8 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีของ P

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross reaction
progesterone	100.00
cortisol	0.005
testosterone	0.1
17α-OH-progesterone	1.0
20α-OH-progesterone	2.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีของ T_4

สารที่ใช้ทดสอบ	% cross reaction
$L-T_4$	100.00
$D-T_4$	100.00
tetraiodothyroacetic acid	11.40
triiodo-L-thyronine	4.00
triiodo-D-thyronine	9.70
diiodo-L-tyrosine	0.058
monoiodotyrosine	0.36
methimozole	0.42
5, 5-diphenyl hydantoin	0.051
phenylbutazone	0.059
6-n-propyl-2-thiouracil	0.42
triiodothyroacetic acid	0.62

2. ความแม่นยำ

Abraham (1971, 1974) เสนอให้มีการตรวจสอบความแม่นยำโดยการตรวจวัดหลาย ๆ ครั้งแล้วคิดหาค่าความแม่นยำจากเปอร์เซนต์สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (% coefficient of variation, % cv)

$$\% \text{ cv} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสาร}}{\text{มัชฌิมเลขคณิต}} \times 100$$

ซึ่งมีอยู่สองส่วนคือภายในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน (intraassay) และระหว่างการตรวจวัดหลายครั้ง (interassay) ทำโดยนำปัสสาวะระหว่างรอบประจำเดือนของลิงหางยาวเพศเมีย (pooled urine) และซีรัมระหว่างรอบประจำเดือนของลิงหางยาวเพศเมีย (pooled serum) มาทำการตรวจหาปริมาณพร้อมกันไปกับการหาปริมาณในตัวอย่างปัสสาวะหรือซีรัม

ตารางที่ 10 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัด E_1-3-G, Pd-3∝-G, E_2, P และ T_4

การตรวจวัดระดับของ	ความแม่นยำ (% CV)	
	ภายในการตรวจวัดเดียวกัน (n=10)	ระหว่างการตรวจวัด (n=10)
E_1-3-G	5.43	10.02
Pd-3∝-G	8.31	7.21
E_2	6.27	5.61
P	4.56	3.51
T_4	5.21	8.11

3. ความถูกต้อง

ความถูกต้องในการตรวจวัดหาได้โดยใช้ฮอร์โมนที่ทราบปริมาณแล้วไปผ่านขบวนการตรวจวัดพร้อมกับตัวอย่าง แล้วเปรียบเทียบผลกับค่าปริมาณที่ใส่ลงไป คำนวณได้ดังนี้

$$\% \text{ ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนที่ใส่ลงไปจริง}} \times 100$$

ซึ่งจะทำการตรวจวัดความถูกต้องของแอสเสย์ฮอร์โมนละ 2 ชุด ชุดละ 6 ตัวอย่าง

ตารางที่ 11 แสดงความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ E_1-3-G, Pd-3∝-G, E_2, P และ T_4

ฮอร์โมน	ปริมาณฮอร์โมนจริง	% ความถูกต้อง ($\bar{X} \pm SD$) (n=12)
E_1-3-G	1000 พิโคกรัม/0.5 มิลลิลิตร	90.17±3.01
Pd-3∝-G	1000 พิโคกรัม/0.5 มิลลิลิตร	89.05±0.90
E_2	27.2 พิโคกรัม/0.1 มิลลิลิตร	93.5±0.81
P	31.4 พิโคกรัม/0.1 มิลลิลิตร	94.39±1.58
T_4	5.5 ไมโครกรัม/เดซิลิตร	98.00±2.82

ประสิทธิภาพในการสกัด

เนื่องจากในการตรวจวัด E_2 และ P จะต้องผ่านขั้นตอนการสกัดด้วย ไดเอธิลอีเธอร์ ดังนั้นจึงต้องทดสอบความสามารถในการสกัดด้วย โดยทำไปพร้อมกับการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนของตัวอย่างซีรัม

TCR (total count recovery) ทำโดยเติมสารละลายฮอร์โมนติดสลากรังสีปริมาณ 0.05 มิลลิลิตรใส่ลงใน counting vial แล้วเติม assay buffer 0.65 มิลลิลิตร เติม counting solution สูตรที่ 1 4.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดปริมาณรังสี

RCE (recovery of extract) ทำโดยใช้สารละลายฮอร์โมนติดสลากรังสี 0.05 มิลลิลิตรผสมกับซีรัมในระหว่างรอบประจำเดือนของลิงหางยาว (pooled serum) 0.05 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปผ่านขบวนการสกัดด้วยไดเอธิลอีเธอร์ แยกชั้นไดเอธิลอีเธอร์ลงใส่หลอดทดลองอีกชุด ระเหยจนแห้งแล้วเติม assay buffer 0.7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่ counting vial เติม counting solution สูตรที่ 1 4.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณรังสี (ทำ 6 หลอดต่อการตรวจวัด 1 ครั้ง)

ประสิทธิภาพในการสกัดคำนวณได้จาก

$$\% \text{ RCE} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ RCE}}{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TCR}} \times 100$$

ซึ่งประสิทธิภาพในการสกัดของการตรวจวัด E_2 มีค่าเท่ากับ $87.39 \pm 2.67\%$ และ P มีค่าเท่ากับ $89.09 \pm 1.64\%$

4. ความไวของการตรวจวัด

ความไวของการตรวจวัดเป็นค่าที่น้อยที่สุดของสารที่การตรวจวัดนั้นสามารถตรวจวัดได้ โดยแยกจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งในการตรวจวัดครั้งนี้ใช้ค่าปริมาณฮอร์โมนที่ระดับ 90 เปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวโดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน

4.1 ความไวของการตรวจวัด E_1-3-G มีค่า 520 พิโคกรัม/หลอด

4.2 ความไวของการตรวจวัด Pd-3α-G มีค่า 480 พิโคกรัม/หลอด

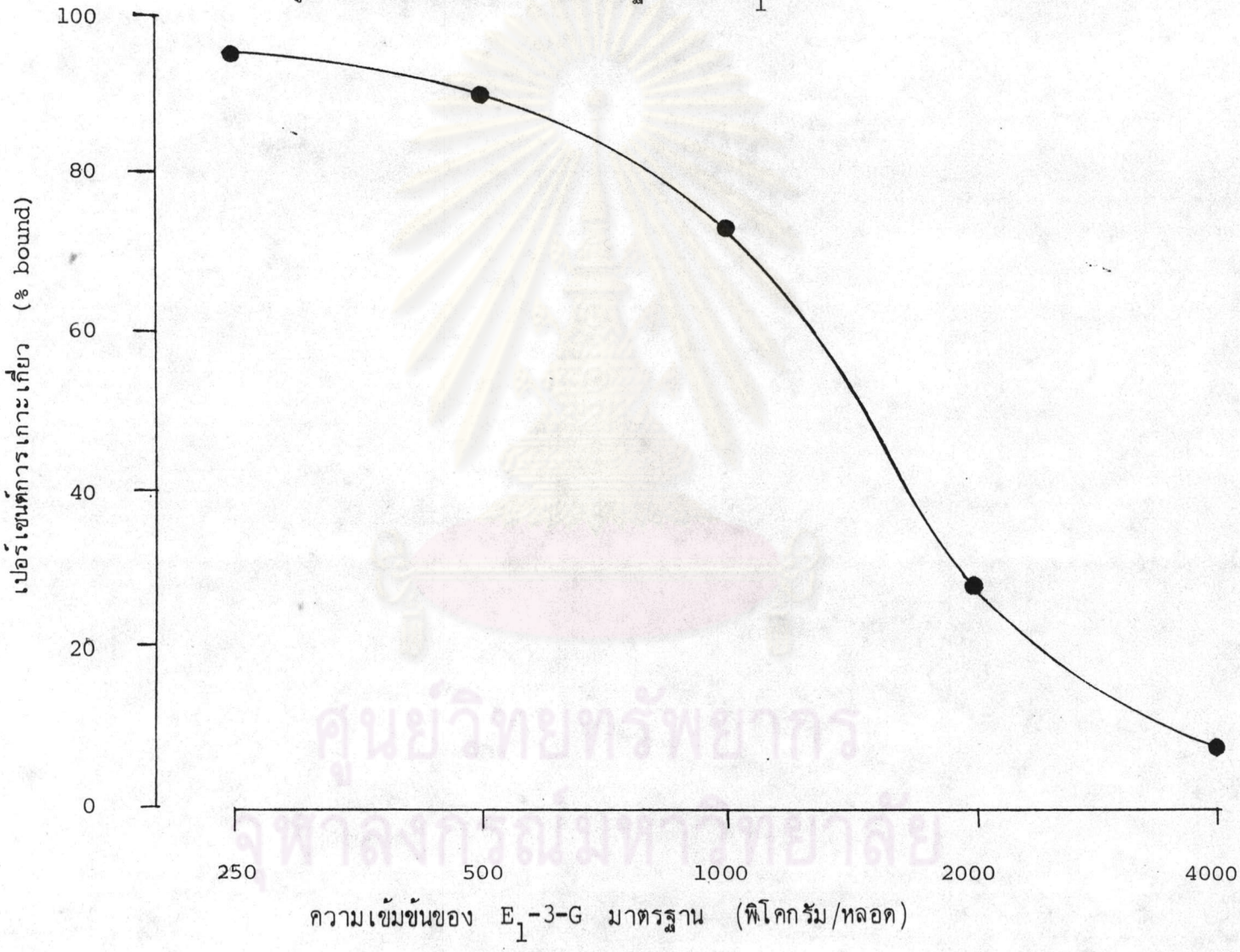
4.3 ความไวของการตรวจวัด E_2 มีค่า 5.71 พิโคกรัม/หลอด

4.4 ความไวของการตรวจวัด P มีค่า 9.42 พิโคกรัม/หลอด

4.5 ความไวของการตรวจวัด T_4 มีค่า 0.3 ไมโครกรัม/หลอด

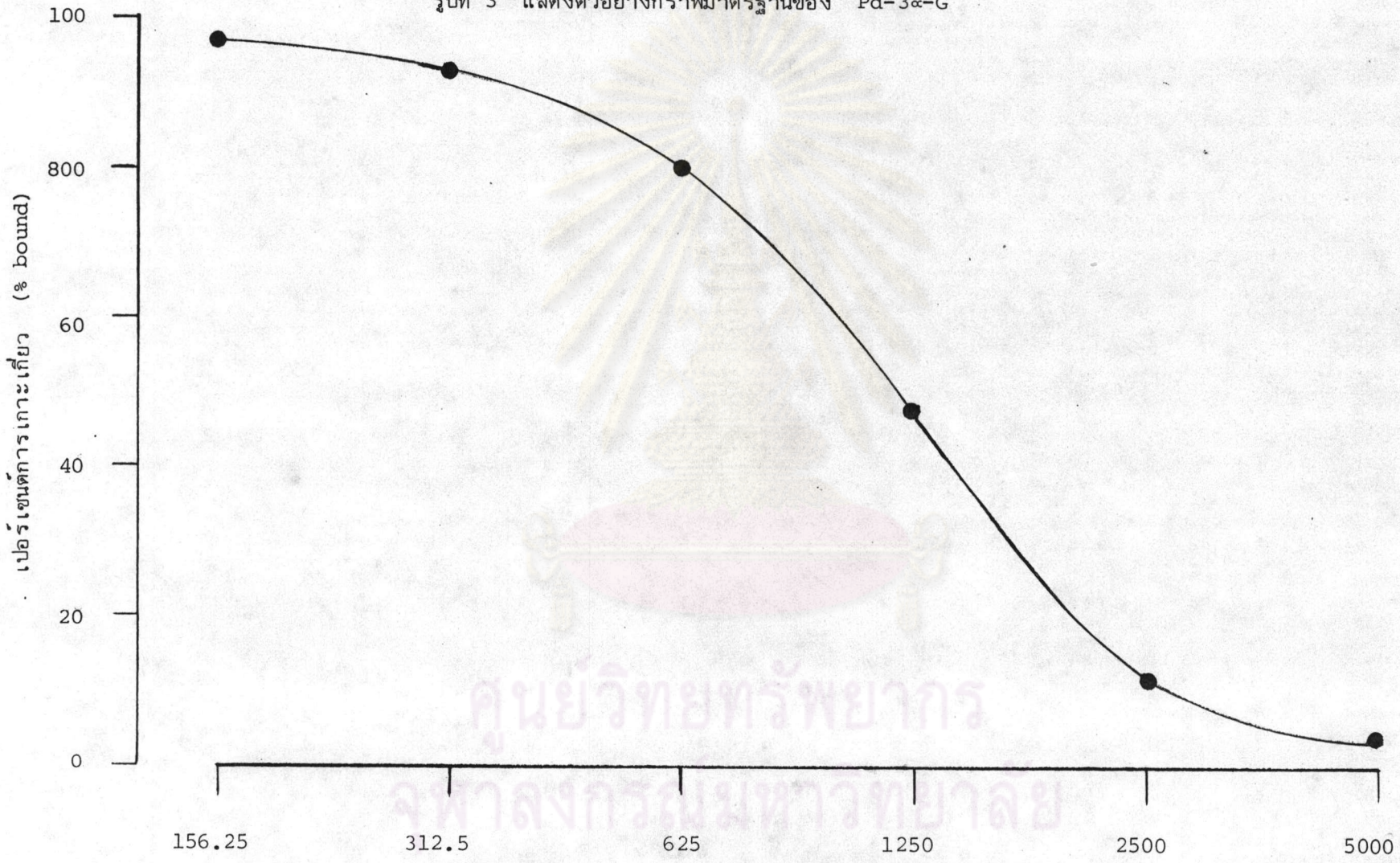
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ E_1-3 -G



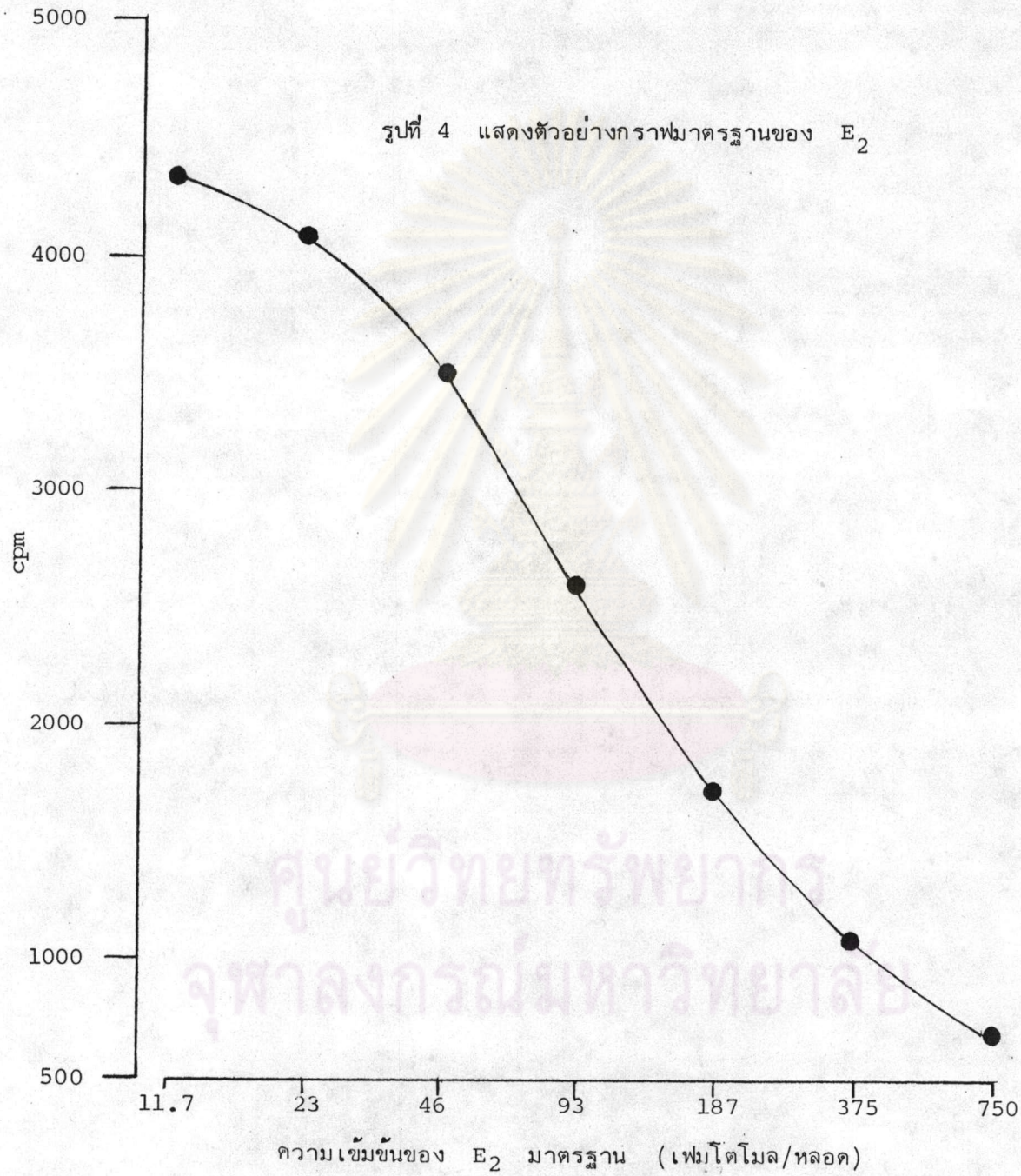
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ Pd-3∝-G



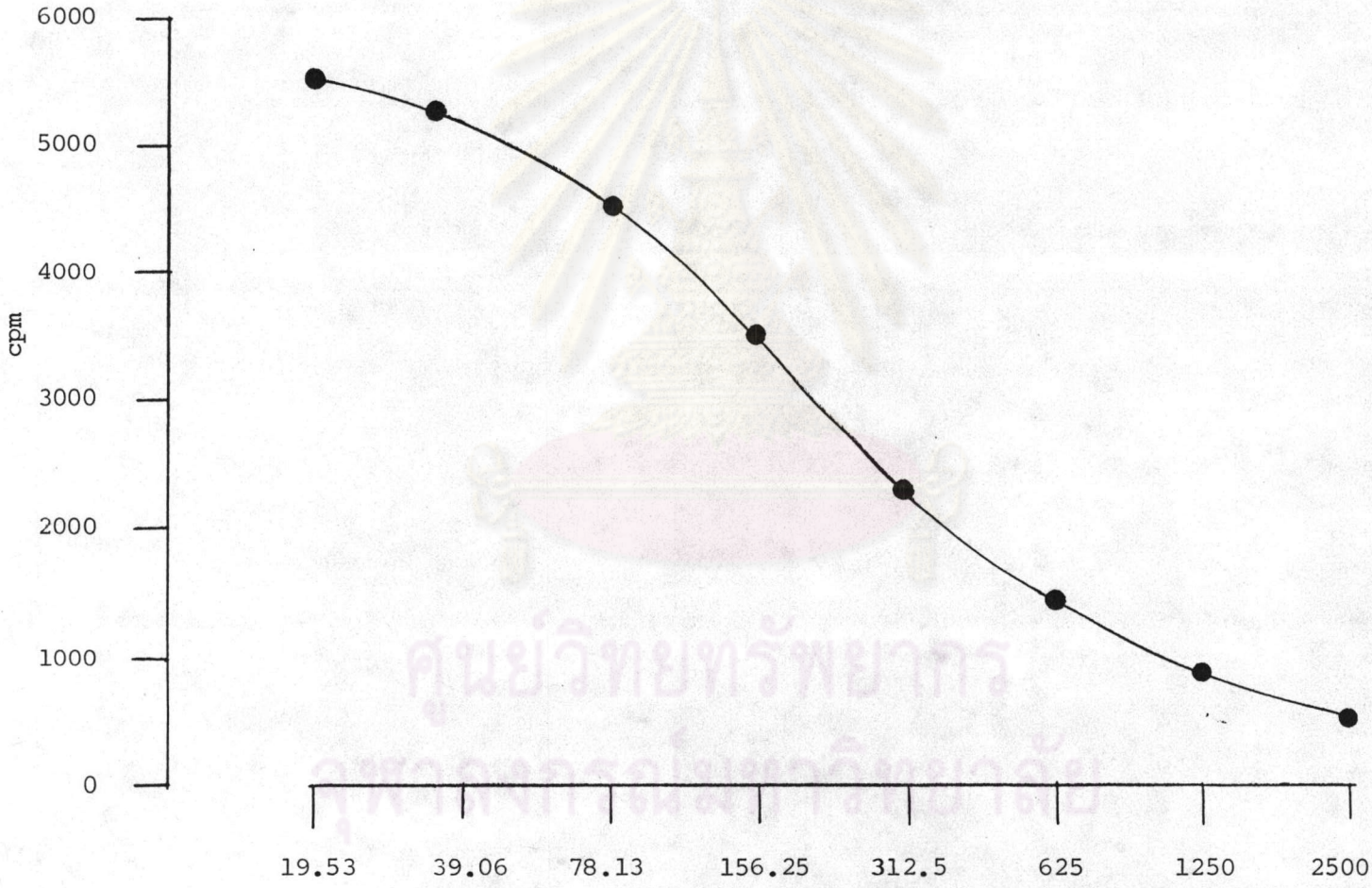
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ E_2



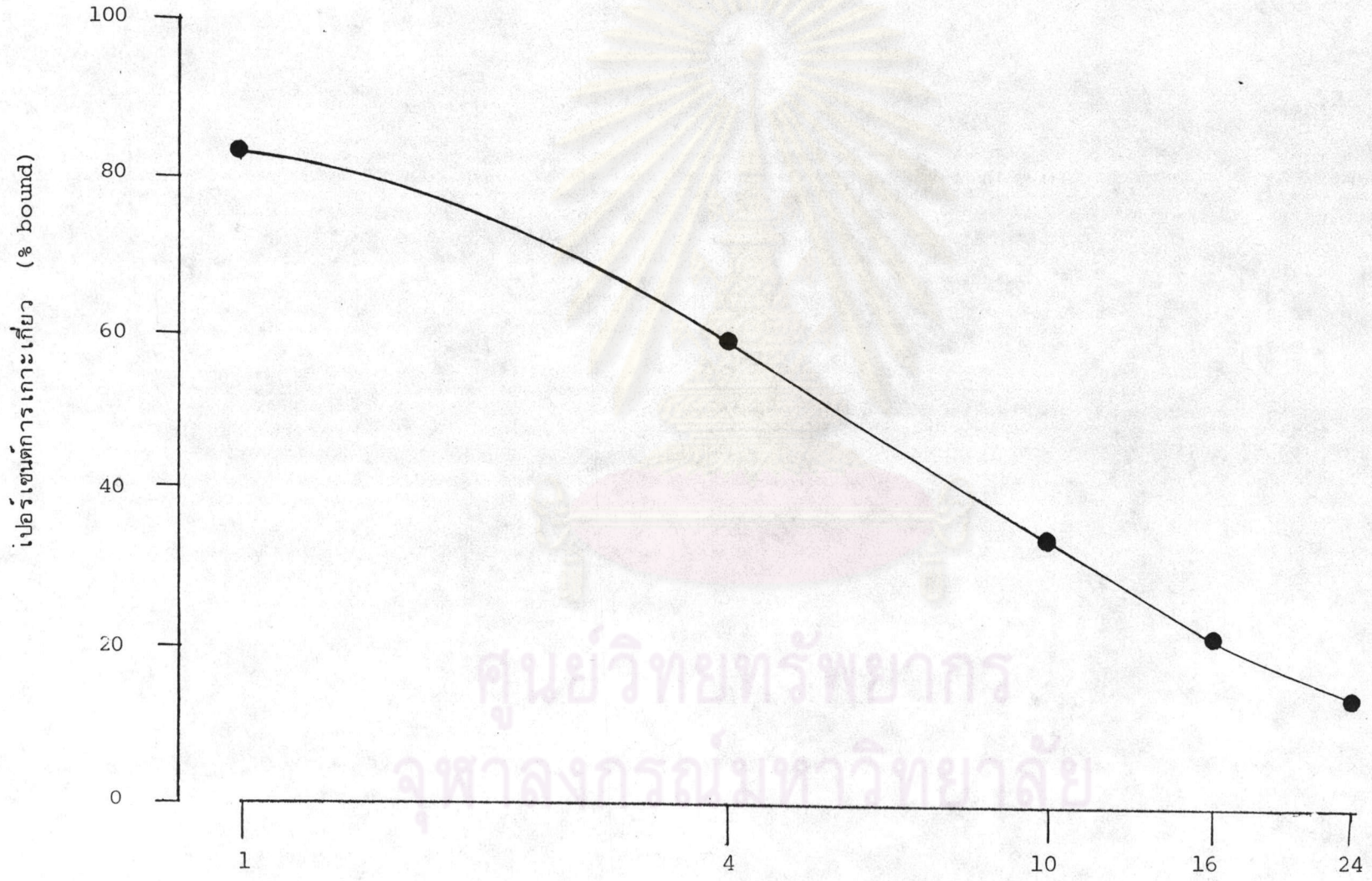
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ P



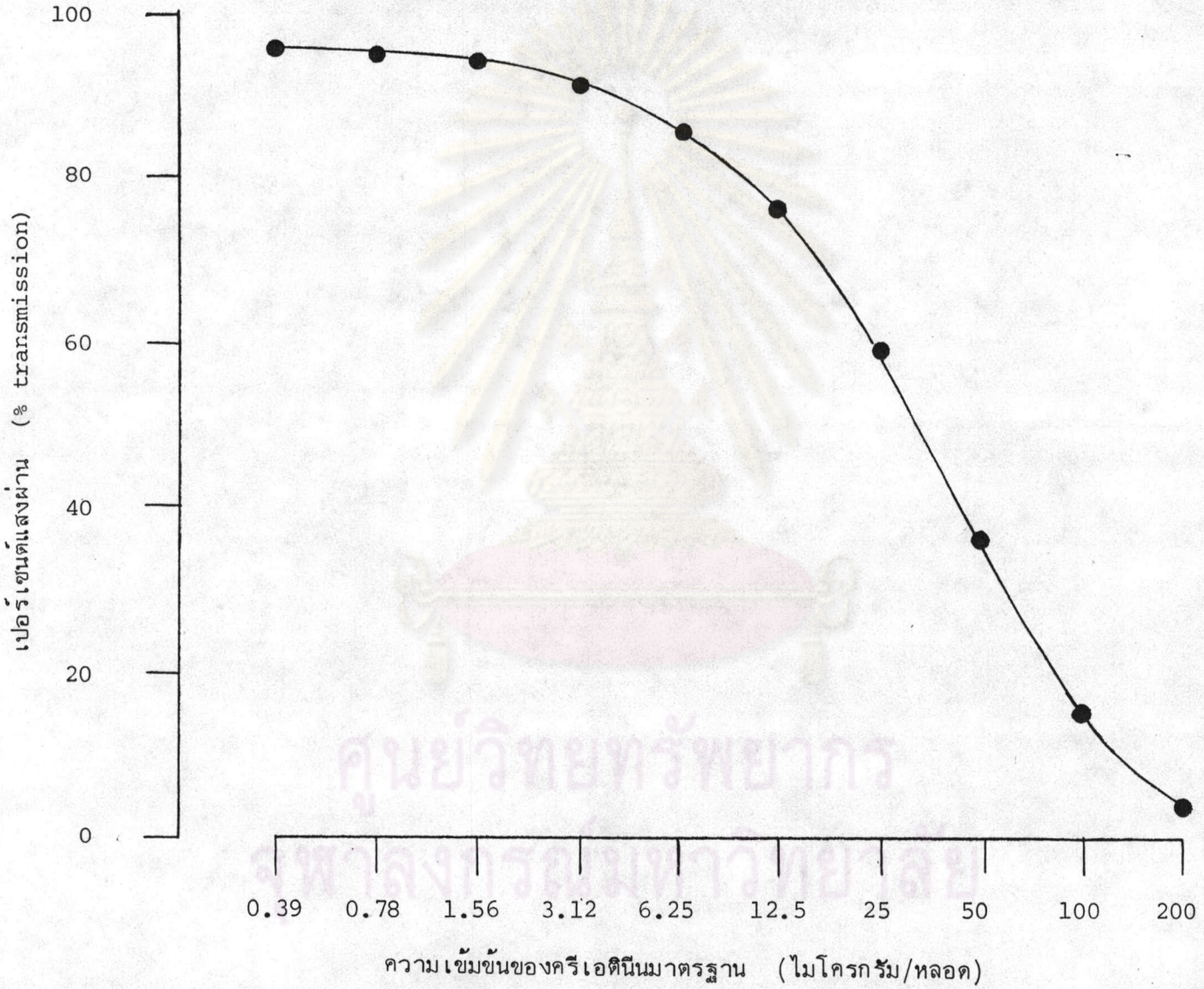
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ T_4



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของครีเอตินีน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย