บทที่ ๓

# วิธีการทดลอง

## ๓.๑ การเตรียมน้ำยา

๓.๑.๑ การเตรียมสารละลายที่จำเป็นต้องใช้ในการเตรียมสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ และสำหรับใช้ในการติดฉลากสารประกอบดังกล่าวด้วยโซเดียมไอโอไดด์-๑๒๕

สารละลาย ๒ M. โซเดียมไฮดรอกไซด์ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๘ กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนครบ ๑๐๐ มิลลิลิตร

สารละลาย ๑ M. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๔ กรัมด้วยน้ำกลั่นจนครบ ๑๐๐ มิลลิลิตร

สารละลาย ๑ M. กรดเกลือเจือจาง ๑๒ M. กรดเกลือ ๘.๓ มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนครบ ๑๐๐ มิลลิลิตร

สารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคาร์บอเนต ละลายโซเดียมคาร์บอเนตมากเกินพอในน้ำกลั่น ๕๐ มิลลิลิตร

สารละลาย ๐.๕ M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พี เอช ๗.๕ ละลายโซเดียมฟอสเฟต โมโนเบสิค โมโนไฮเดรท ๑.๓๘ กรัมกับโซเดียมฟอสเฟต ไดเบสิค (แอนไฮดรัส) ๕.๖๘ กรัมด้วยน้ำกลั่นจนครบ ๑๐๐ มิลลิลิตร

สารละลาย ๐.๐๕ M.ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พี เอช ๗.๕ เจือจางสารละลาย ๐.๕ M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พี เอช ๗.๕ ปริมาณ ๑๐ มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ ๑๐๐ มิลลิลิตร

คลอรามีน-ที ในสารละลาย ๐.๐๕ M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พี เอช ๗.๕ ละลายคลอรามีน-ที ๕ มิลลิกรัมด้วยสารละลาย ๐.๐๕ M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พี เอช ๗.๕ ปริมาณ ๑ มิลลิลิตร

โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ในสารละลาย ๐.๐๕ M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พี เอช ๗.๕ ละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ ๕ มิลลิกรัมด้วยสารละลาย ๐.๐๕ M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พี เอช ๗.๕ ปริมาณ ๑ มิลลิลิตร

๓.๑.๒ การเตรียมส่วนผสมสำหรับทำทินแลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี

คลอโรฟอร์ม : เมทธานอล : น้ำกลั่น (๔๐ : ๑๐ : ๑ v/v) เตรียมก่อนใช้ โดยการผสมคลอโรฟอร์ม ๔๐ มิลลิลิตร เมทธานอล ๑๐ มิลลิลิตรและน้ำกลั่น ๑ มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน

คลอโรฟอร์ม : เมทธานอล (๑ : ๑ v/v) เตรียมก่อนใช้ โดยการผสมคลอโรฟอร์ม ๕๐ มิลลิลิตร เมทธานอล ๕๐ มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน

เบนซีน : อะซีโตน : เมทธานอล (๕๐ : ๕๐ : ๒๐ v/v) เตรียมก่อนใช้ โดยการผสมเบนซีน ๕๐ มิลลิลิตร อะซีโตน ๕๐ มิลลิลิตรและเมทธานอล ๒๐ มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน

๓.๑.๓ การเตรียมสารละลายสำหรับทำเปเปอร์อิเลคโตรโฟรีซีส (paper electrophoresis) ๐.๐๕ M. บาร์บิโทนโซเดียม โดยการละลายบาร์บิโทนโซเดียม ๑๐.๓๐๙ กรัมในน้ำกลั่น ๑๐๐๐มิลลิลิตร

๓.๑.๔ การเตรียมสารละลายแอสเสย์บัฟเฟอร์ (๐.๐๑ M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พี เอช ๗.๐, ๐.๑% เจลาติน) เตรียมเป็นขั้นๆ ดังต่อไปนี้ คือ

สารละลายชนิดที่ ๑ ๐.๕ M. โซเดียมฟอสเฟต (โมโนเบสิค) เตรียมโดยละลาย ๖๙.๐๐๕ กรัมของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โมโนไฮเดรทด้วยน้ำกลั่นจนครบ ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร

สารละลายชนิดที่ ๒ ๐.๑ M. โซเดียมฟอสเฟต (ไดเบสิค) เตรียมโดยละลาย ๒๖.๘๑ กรัมของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เฮพตาไฮเดรทด้วยน้ำกลั่นจนครบ ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร

สารละลายชนิดที่ ๓ ๑.๐๕ M. โซเดียมคลอไรด์ เตรียมโดยละลาย ๖๑.๔๒๕ กรัมของโซเดียมคลอไรด์ด้วยน้ำกลั่นจนครบ ๑,๐๐๐ มิลลิลิตรแล้วเติมเมอร์ไทโอเลท (merthiolate) ลงในสารละลายอีก ๐.๗๕ กรัม

นำสารละลายชนิดที่ ๑ ปริมาณ ๖.๖๖ มิลลิลิตร ชนิดที่ ๒ ปริมาณ ๖๖.๖๗ มิลลิลิตร ชนิดที่ ๓ ปริมาณ ๑๓๓.๓ มิลลิลิตร มาผสมกันแล้วเติมน้ำกลั่นจนสารละลายผสมมีปริมาตรครบ ๑,๐๐๐ มิลลิลิตรจากนั้นเติม ๐.๑% ของเจลาตินคนให้เข้ากันประมาณ ๑ ชั่วโมงแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๔° เซลเซียสไว้สำหรับใช้ต่อไป

๓.๒ การเตรียมน้ำยาแขวนตะกอนผงถ่าน (dextran chacoal suspension)

เตรียมโดยการผสม ๐.๖๒๕ กรัมของผงถ่านนอริท-เอ และ ๐.๐๖๒๕ กรัมของเด็กซแตรน ที-๖๐ (dextran T-60) ใน ๑๐๐ มิลลิลิตรของแอสเสย์บัฟเฟอร์แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๔° เซลเซียส

๓.๓ การเตรียมสารละลายเทสโทสเตอโรนมาตรฐาน

เตรียม stock solution ให้มีความเข้มข้น ๑ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยละลาย ๑๐ มิลลิกรัมของเทสโทสเตอโรนด้วยแอโบลูท เมทธานอล (absolute methanol) ๑๐ มิลลิลิตรเก็บสารละลายนี้ที่อุณหภูมิ -๔๐° เซลเซียส จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สำหรับทำกราฟมาตรฐานโดยเตรียมเป็นขั้นๆ ดังต่อไปนี้

สารละลาย A เตรียมโดยเจือจาง ๒๐ ไมโครลิตรของ stock solution ด้วย ๑๐ มิลลิลิตรของสารละลายแอสเสย์บัฟเฟอร์ ซึ่ง ๐.๕ มิลลิลิตรจะมีปริมาณเทสโทสเตอโรน ๑,๐๐๐ พิโคกรัม

สารละลาย B เตรียมโดยเจือจาง ๕ มิลลิลิตรของสารละลาย A ด้วย ๕ มิลลิลิตรของแอสเสย์บัฟเฟอร์ ซึ่ง ๐.๕ มิลลิลิตรจะมีปริมาณเทสโทสเตอโรน ๕๐๐ พิโคกรัม

สารละลาย C เตรียมโดยเจือจาง ๕ มิลลิลิตรของสารละลาย B ด้วย ๕ มิลลิลิตรของแอสเสย์บัฟเฟอร์ ซึ่ง ๐.๕ มิลลิลิตรจะมีปริมาณ เทสโทสเตอโรน ๒๕๐ พิโคกรัม

สารละลาย D เตรียมโดยเจือจาง ๔ มิลลิลิตรของสารละลาย C ด้วย ๖ มิลลิลิตรของแอสเสย์บัฟเฟอร์ ซึ่ง ๐.๕ มิลลิลิตรจะมีปริมาณเทสโทสเตอโรน ๑๐๐ พิโคกรัม

สารละลาย E เตรียมโดยเจือจาง ๕ มิลลิลิตรของสารละลาย D ด้วย ๕ มิลลิลิตรของแอสเสย์บัฟเฟอร์ ซึ่ง ๐.๕ มิลลิลิตรจะมีปริมาณเทสโทสเตอโรน ๕๐ พิโคกรัม

สารละลาย F เตรียมโดยเจือจาง ๕ มิลลิลิตรของสารละลาย E ด้วย ๕ มิลลิลิตรของแอสเสย์บัฟเฟอร์ ซึ่ง ๐.๕ มิลลิลิตรจะมีปริมาณเทสโทสเตอโรน ๒๕ พิโคกรัม

สารละลาย G เตรียมโดยเจือจาง ๔ มิลลิลิตรของสารละลาย F ด้วย ๖ มิลลิลิตรของแอสเสย์บัฟเฟอร์ ซึ่ง ๐.๕ มิลลิลิตรจะมีปริมาณเทสโทสเตอโรน ๑๐ พิโคกรัม

สารละลาย H เตรียมโดยเจือจาง ๕ มิลลิลิตรของสารละลาย G ด้วย ๕ มิลลิลิตรของแอสเสย์บัฟเฟอร์ ซึ่ง ๐.๕ มิลลิลิตรจะมีปริมาณเทสโทสเตอโรน ๕ พิโคกรัม

สารละลาย I เตรียมโดยเจือจาง ๕ มิลลิลิตรของสารละลาย H ด้วย ๕ มิลลิลิตรของแอสเสย์บัฟเฟอร์ ซึ่ง ๐.๕ มิลลิลิตรจะมีปริมาณเทสโทสเตอโรน ๒.๕ พิโคกรัม

สารละลาย J มีเฉพาะแอสเสย์บัฟเฟอร์ ๕ มิลลิลิตร

๓.๔ การเตรียมแอนตีซีรัมที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

เตรียมจากแอนตีซีรัมเอช ๙๙ (H 99) โดยการเจือจางแอนตีซีรัม ๑๐ ไมโครลิตร ด้วยสารละลายแอสเซย์บัฟเฟอร์จนครบ ๑๕๐ มิลลิลิตรก็จะได้อัตราส่วนความเข้มข้นของแอนตีซีรัมเป็น ๑ : ๑๕,๐๐๐ จากนั้นดูดสารละลายแอนตีซีรัมที่เตรียมได้มา ๕๐ มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยสารละลายแอสเสย์บัฟเฟอร์จนครบ ๑๐๐ มิลลิลิตรก็จะได้อัตราส่วนความเข้มข้นของแอนตีซีรัมเป็น ๑ : ๓๐,๐๐๐ ทำเช่นนี้ต่อไปจนกระทั่งได้อัตราส่วนความเข้มข้นของแอนตีซีรัมเป็น ๑ : ๖๐,๐๐๐, ๑ : ๑๒๐,๐๐๐ และ ๑ : ๒๔๐,๐๐๐ ตามลำดับ

๓.๕ การเตรียมพูลซีรัม (pools serum)

พูลซีรัมเป็นซีรัมที่ใช้สำหรับควบคุมมาตรฐานการปฏิบัติงานในแต่ละครั้ง ซึ่งเป็นซีรัมที่มีปริมาณของเทสโทสเตอโรนในระดับต่ำ กลาง และ สูง คือ

ก. ค่าต่ำ ได้จากซีรัมของควายปลักตัวอย่าง

ข. ค่ากลาง ได้จากซีรัมของควายปลักตัวอย่างที่เติมเทสโทสเตอโรนมาตรฐานลงไปประมาณ ๒๕๐ พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร

ค. ค่าสูง ได้จากซีรัมของควายปลักตัวอย่างที่เติมเทสโทสเตอโรนมาตรฐานลงไปประมาณ ๒,๐๐๐ พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร

๓.๖ การสกัดเทสโทสเตอโรนจากซีรัมหรือพลาสมาของควายปลัก

ดูดซีรัมหรือพลาสมาของควายปลัก ๑ มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองเติมอีเทอร์ลงไป ๑๐ มิลลิลิตรนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ๑ ถึง ๒ นาที เทสโทสเตอโรนจะถูกสกัดออกมาในชั้นของอีเทอร์นำหลอดทดลองดังกล่าวไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -๔๐° เซลเซียส ประมาณ ๑๐ นาทีชั้นของซีรัมหรือพลาสมาจะแข็งตัวจากนั้นเทส่วนของชั้นอีเทอร์ออกใส่ขวดไว้แล้วนำไปเป่าด้วยลมจากเครื่องอัดอากาศเก็บไว้เพื่อใช้วัดหาปริมาณของเทสโทสเตอโรนด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ต่อไป

๓.๙ การติดฉลากสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ ด้วยโซเดียมไอโอไดด์-๑๒๕

สามารถทำได้โดยดำเนินการเป็นขั้นๆ ดังต่อไปนี้

ขั้นแรก เตรียมไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์จากไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์-ไฮโดรคลอไรด์

ขั้นสอง เตรียมเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ออกซีม [testosterone 3-(O-carboxymethyl) oxime] และทำสารประกอบที่เตรียมได้ให้บริสุทธิ์

ขั้นสาม เตรียมสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอ-ซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ [testosterone 3-(O-carboxymethyl) hydroxylamine tyrosine methyl ester] ซึ่งเป็นการเชื่อมระหว่างสารประกอบที่เตรียมได้ในขั้นแรกกับขั้นที่สองโดยใช้ ๑-เอทธิล-๓-(๓-ไดเมทธิลอะมิโนโปรปิล) คาร์โบไดอิมิด [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide] เป็นตัวเชื่อมและทำสารประกอบที่เตรียมได้ในขั้นนี้ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโตกราฟฟี่

ขั้นที่สี่ ติดฉลากสารประกอบที่เตรียมได้ในขั้นที่สามด้วยโซเดียมไอโอไดด์-๑๒๕ และทำสารประกอบที่ติดฉลากแล้วให้บริสุทธิ์โดยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี่ซึ่งใช้เทคนิคออโตราดิโอกราฟฟี่ (autoradiography) เข้าช่วย

สำหรับรายละเอียดของการเตรียมสารประกอบขั้นต่างๆ และการติดฉลากด้วยโซเดียมไอโอไดด์-๑๒๕ มีดังต่อไปนี้

๓.๙.๑ การเตรียมไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ จากไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ไฮโดรคลอไรด์ เตรียมได้โดยการละลายไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ไฮโดรคลอไรด์ในน้ำกลั่น

เล็กน้อยจากนั้นหยดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่อิ่มตัวลงไป จนกระทั่งวัดค่าพี เอช ได้ประมาณ ๗.๐ จะได้ตะกอนขาวของไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ กรองเอาตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งแล้วเก็บไว้ใช้ต่อไป

๓.๗.๒ การเตรียมสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ออกซีม โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Bernard F. Erlanger, Felix Borek, Sam M. Beiser และ Seymour Lieberman

ละลายเทสโทสเตอโรน ๕๐๐ มิลลิกรัม (๑.๗๔ มิลลิโมล) ด้วยเอทธานอล ๒๕ มิลลิลิตรเติม(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไฮโดรคลอไรด์ ๕๐๐ มิลลิกรัม (๓.๔๓ มิลลิโมล) ซึ่งละลายใน ๒.๑ มิลลิลิตรของ ๒ N. โซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปแล้วนำไปรีฟลักซ์ (reflux) ที่อุณหภูมิประมาณ ๗๕° เซลเซียสเป็นเวลา ๓ ชั่วโมง (ดังแสดงไว้ในรูปที่ ๑๐) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำให้ปริมาตรลดลงเหลือประมาณ ๒ มิลลิลิตรด้วยวิธีสูญญากาศ แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ ๖ มิลลิลิตรปรับพี เอช ของสารละลายที่ได้ให้มีค่าประมาณ ๘ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง (1 N.) สกัดเทสโทส-สเตอโรนที่ไม่ได้ทำปฏิกริยาออกจากสารละลายดังกล่าวด้วยอีเทอร์ประมาณ ๖๐ มิลลิลิตร โดยการเขย่าให้ผสมกันใช้เวลาประมาณ ๕ นาทีปล่อยให้แยกชั้น แยกเอาส่วนชั้นที่มีน้ำ (aqueous layer) ออกมาปรับ พี เอช ให้มีค่าประมาณ ๕ จากนั้นสกัดเอาสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ออกซีม ที่เตรียมได้ออกมาด้วยเอทธิลอะซีเตทประมาณ ๖๐ มิลลิลิตรโดยการเขย่าให้ผสมกันใช้เวลาประมาณ ๕ นาทีแล้วปล่อยให้แยกชั้น แยกเอาส่วนของชั้นเอทธิลอะซีเตทออกมาแล้วนำไปทำให้แห้งโดยวิธีสูญญากาศ

สำหรับการทำสารประกอบที่เตรียมได้ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นสามารถทำได้โดยการละลายสารประกอบดังกล่าวในเอทธิลอะซีเตทปริมาตรน้อยๆ แล้วนำไปทำให้แห้งโดยวิธีสูญญากาศและเก็บสารประกอบที่ได้ไว้ในโหลแก้ว (dessicator) ที่มีโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous sodium sulfate) บรรจุอยู่ซึ่งจะช่วยดูดไอของเอทธิลอะซีเตทให้หมดไป

๓.๗.๓ การเตรียมสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ และการทำสารประกอบที่เตรียมได้ให้บริสุทธิ์โดยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี่

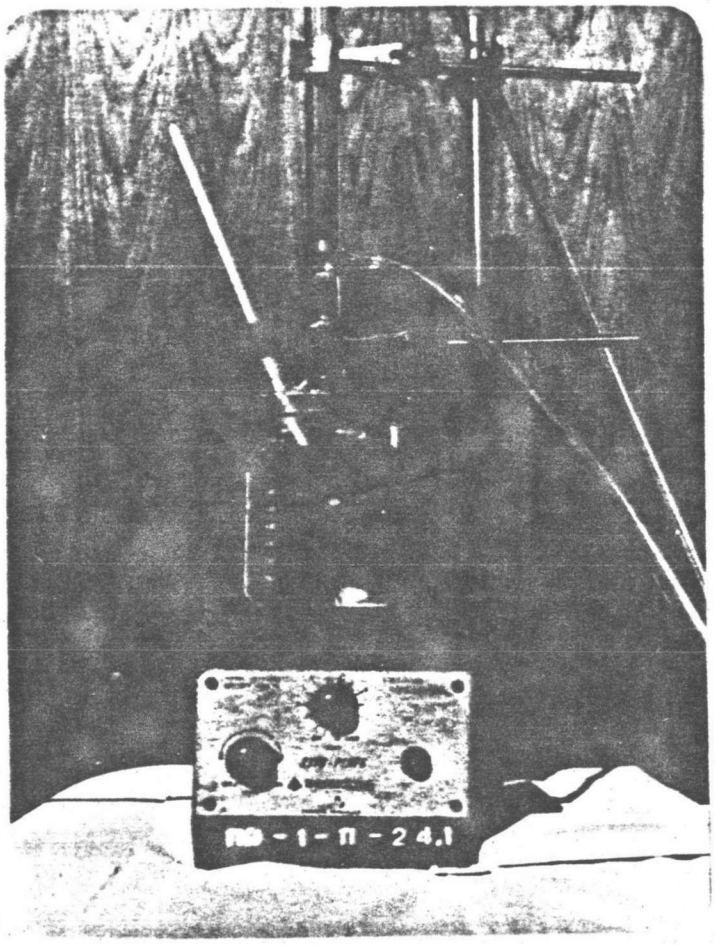
ก. การเตรียมสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์

ละลายสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ออกซีม ที่เตรียมได้ในข้อ ๓.๗.๒ ปริมาณ ๑ มิลลิโมลในเตทตระไฮโรฟูราน ๖ มิลลิลิตรจากนั้นเติม ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ ๒ มิลลิโมลและ ๑-เอทธิล-๓-(๓-ไดเมทธิลอะมิโนโปรปิล) คาร์บอไดอิมิดไฮโดรคลอไรด์ ๑.๕ มิลลิโมลซึ่งละลายใน ๐.๕ มิลลิลิตรของน้ำกลั่นลงไป นำสารละลายผสมทั้งหมดไปคนด้วยเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา ๔ ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องปฏิกริยาจะเกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ ๖ แยกสารประกอบที่เตรียมได้ให้บริสุทธิ์โดยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี่

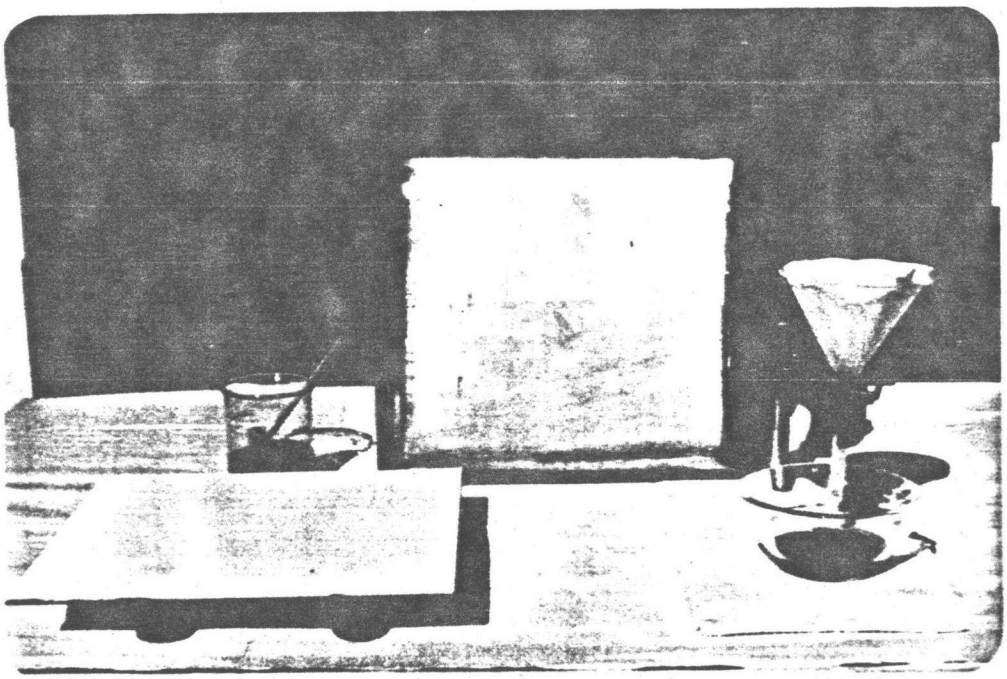
ข. การทำสารประกอบที่เตรียมได้ในข้อ ก. ให้บริสุทธิ์โดยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี่

หยดสารละลายทั้งหมดที่ได้จากข้อ ก. (หลังจากทำปฏิกริยา ๔ ชั่วโมง) ลงบนแผ่นซิลิกาเจล เอฟ-๒๕๔ ซึ่งหนา ๒ มิลลิเมตรขนาด ๒๐ x ๒๐ เซนติเมตรโดยหยดสารละลายห่างจากขอบล่าง ๒ เซนติเมตรแล้วนำแผ่นซิลิกาเจลดังกล่าวไปแช่ในส่วนผสมของ คลอโรฟอร์ม : เมทธานอล : น้ำ (๙๐ : ๑๐ : ๑ v/v) หรือเบนซีน : อะซีโตน : เมทธานอล (๕๐ : ๕๐ : ๒๐ v/v) ในโครมาโตกราฟฟี่แทงค์ดังแสดงไว้ในรูปที่ ๑๑ เมื่อสารละลายซึมถึงขีดที่ต้องการแล้ว นำแผ่นโครมาโตกราฟมาผึ่งลมให้แห้งจากนั้นนำไปส่องดูด้วยแสงเหนือม่วง (ultra violet) เปรียบเทียบค่า $R_f$ กับสารประกอบตัวอื่นๆ เช่น เทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล) ออกซีม ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ ก็จะทราบตำแหน่งที่แน่นอนของสารประกอบที่เตรียมได้ในแผ่นซิลิกาเจลดังกล่าว ขูดเอาซิลิกาเจล

ส่วนที่มีสารประกอบที่เตรียมได้รวมอยู่ออกมาแล้วชะล้างด้วยส่วนผสมของ คลอโรฟอร์ม : เมทธานอล (๑ : ๑ v/v) ๑๕๐ มิลลิลิตรกรองเอาเฉพาะส่วนของสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ ๔๒ นำเอาสารละลายที่กรองได้ไปทำให้แห้งโดยวิธีสูญญากาศแล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยเอทธิลอะซีเตทจากนั้นจึงตกตะกอนด้วยปิโตรเลียม อีเทอร์ อีกครั้งหนึ่ง




รูปที่ ๑๐ แสดงรูปเครื่องมือการเตรียมสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอซี่เมทธิล)ออกซีม



รูปที่ ๑๑ แสดงรูปเครื่องมือการแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ โดยวิธี
ทินแลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี่

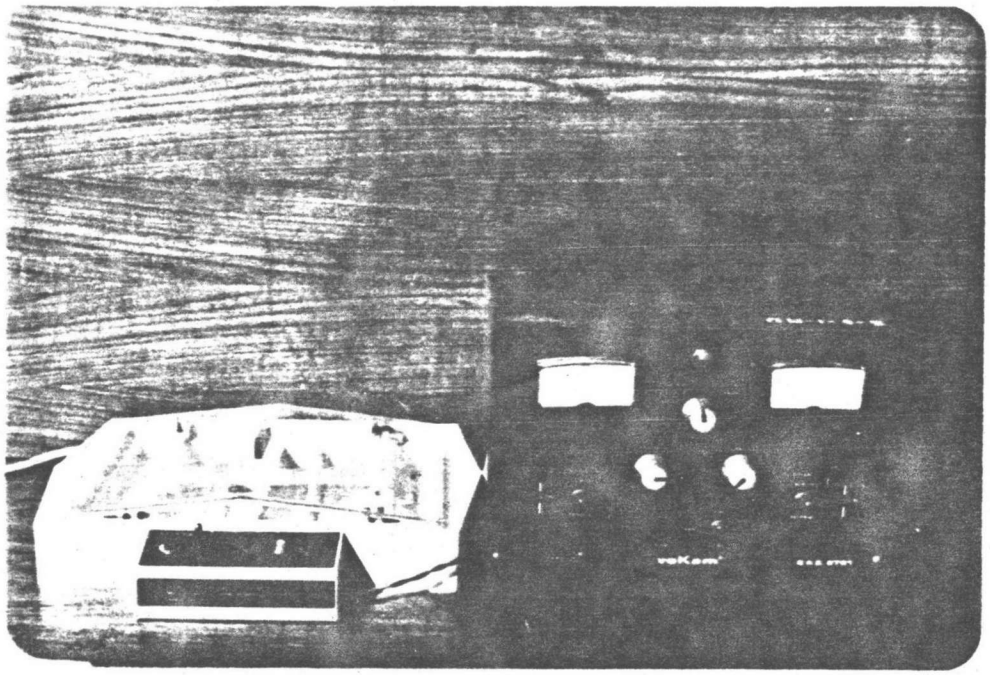
๓.๗.๔ การติดฉลากสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอกซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ ที่เตรียมได้ในข้อ ๓.๗.๓ ด้วยโซเดียมไอโอไดด์-๑๒๕ และทำสารประกอบที่ติดฉลากแล้วให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโตกราฟี่

ก. การติดฉลากสารประกอบเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอกซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ด้วยโซเดียมไอโอไดด์-๑๒๕ ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hunter และ Greenwood เตรียม stock solution ของเทสโทสเตอโรน ๓-(โอ-คาร์บอกซี่เมทธิล) ไฮดรอซีลามีน ไทโรซีน เมทธิล เอสเทอร์ ๕๐ มิลลิกรัมใน ๕๐ มิลลิลิตรของแอบโซลูทเอทธานอลจากนั้นดูด stock solution มา ๑ มิลลิลิตรแล้วเจือจางด้วยแอบโซลูทเอทธานอลจนครบ ๑๐ มิลลิลิตรจะได้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดูดสารละลายที่เตรียมได้มา ๐.๑ มิลลิลิตร (๑๐ ไมโครกรัม) ผสมกับสารละลาย ๐.๕ M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พี เอช ๗.๕ ปริมาณ ๒๕ ไมโครลิตรจากนั้นเติมโซเดียมไอโอไดด์-๑๒๕ ปริมาณ ๕ ไมโครลิตร (๕๐๐ ไมโครคูรี) และสารละลายคลอรามีน-ที ๒๕ ไมโครลิตรตามลำดับเขย่าให้ผสมกันด้วยเครื่อง vortex ประมาณ ๒๐ วินาทีเติมสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ ๒๕ ไมโครลิตรแล้วเขย่าให้ผสมกันทันทีแบ่งสารละลายสีกเล็กน้อยประมาณ ๑,๐๐๐ cpm ไปทำเปเปอร์อีเลคโตรโฟรีซีสเพื่อหาเปอร์เซนต์ของการติดฉลาก (percentage of labelling) และค่าความแรงรังสีจำเพาะ (specific activity) ของสารที่ติดฉลากสำหรับส่วนที่เหลือนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโตกราฟี่

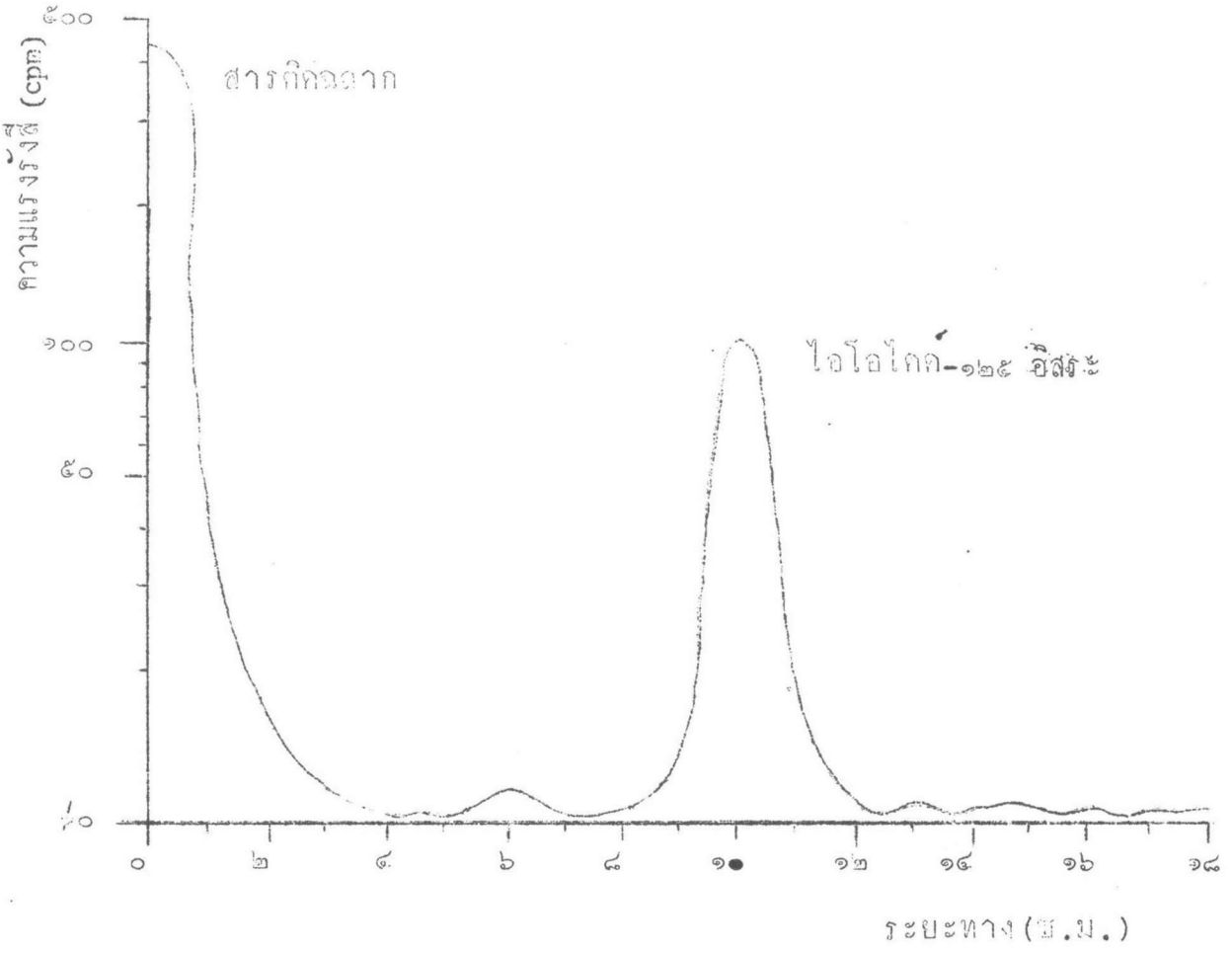
ข. การทำเปเปอร์อีเลคโตรโฟรีซีส (paper electrophoresis)[๑๘] ใช้กระดาษ Whatman No. 1 ขนาด ๔ x ๓๐ เซนติเมตรและสารละลาย ๐.๐๕ M. บาร์บิโทนโซเดียมเป็นสารละลายอีเลคโตรไลท์ (electrolyte solution) หยดสารละลายของสารประกอบที่ติดฉลากแล้วในข้อ ก. โดยมีความแรงรังสีประมาณ ๑,๐๐๐ cpm ลงบนกระดาษห่างจากกึ่งกลาง ๔ เซนติเมตรทางขั้วลบเปิดสวิทซ์ของเครื่องมือปรับ Voltage

ให้มีค่า ๒๔๐ โวลต์ (8 Volts/cm) แล้วปรับทิศทางการเคลื่อนที่ของอิออน (ion) ให้เคลื่อนเข้าหาขั้วบวกเมื่อทำการแยกครบ ๔๕ นาทีแล้วนำกระดาษออกทำให้แห้งและไปวัดรังสีเพื่อหาระยะทางที่อิออนชนิดต่างๆ เคลื่อนที่ไปจากจุดเริ่มต้นดังแสดงไว้ในรูปที่ ๑๒ และรูปที่ ๑๓ จากผลการทดลองนี้สามารถคำนวณหาเปอร์เซนต์ของการติดฉลากและความแรงรังสีจำเพาะของสารติดฉลากที่เตรียมได้แสดงไว้ในข้อ ๓.๑๐.๑ และ ๓.๑๐.๒

J 15536282



รูปที่ ๑๒ แสดงรูปเครื่องมือการทำเปเปอร์อีเลคโตรโฟรีซีส




รูปที่ ๑๓ กราฟแสดงการแยกสารประกอบกัดจากและไอโอไดด์-๑๒๕ อีสระ
ด้วยวิธีเปเปอร์อีเลคโตรโฟรีซีส

ค. การทำสารประกอบที่ติดฉลากแล้วในข้อ ก. ให้บริสุทธิ์โดยวิธีทินแลเยอร์ โครมาโตกราฟี่

หยดสารละลายของสารประกอบที่ติดฉลากแล้วทั้งหมดในข้อ ก. ลงบนแผ่นซิลิกาเจล เอฟ-๒๕๔ หนา ๒ มิลลิเมตรขนาด ๒๐ x ๒๐ เซนติเมตรโดยให้ห่างจากขอบล่าง ๒ เซนติเมตรแล้วนำแผ่นซิลิกาเจลไปแช่ในส่วนผสมของคลอโรฟอร์ม : เมทธานอล : น้ำ (๔๐ : ๑๐ : ๑ v/v) ในโครมาโตกราฟฟี่แทงค์เมื่อสารละลายซึมถึงขีดที่ต้องการแล้วนำแผ่นโครมาโตกราฟมาผึ่งลมให้แห้งจากนั้นนำไปวางทาบบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์เพื่อหาตำแหน่งสารติดฉลากซึ่งวิธีการนี้เรียกว่า ออโตราดิโอกราฟฟี (autoradiography) ขูดเอาเฉพาะซิลิกาเจลส่วนที่มีสารติดฉลากออกมาแล้วชะล้างด้วยแอบโซลูทเอทธานอลประมาณ ๕๐ มิลลิลิตรกรองเอาสารติดฉลากซึ่งละลายอยู่ในแอบโซลูทเอทธานอลออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๔° เซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในการทดลองด้านราดิโอลิมมิวโนแอสเสย์ต่อไป

๓.๘ การทดสอบปฏิกริยาทางราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

หลักเกณฑ์โดยทั่วๆ ไปคือผสมสารละลายต่างๆ (ตามตารางที่ ๑) เข้าด้วยกัน

ตารางที่ ๑ แสดงรายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

| น้ำยา (ไมโครลิตร) | หลอด nonspecific binding | หลอดไม่มีสารมาตรฐาน | หลอดสารมาตรฐาน |
|---|---|---|---|
| 0.01 M. ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พี เอช ๗.๐, ๐.๑% เจลาติน | ๖๐๐ | ๕๐๐ | ๔๐๐ |
| สารมาตรฐาน | - | - | ๑๐๐ |
| แอนติซีรัม | - | ๑๐๐ | ๑๐๐ |
| สารติดฉลาก | ๑๐๐ | ๑๐๐ | ๑๐๐ |
| รวมปริมาตรสารละลายแต่ละหลอด | ๗๐๐ | ๗๐๐ | ๗๐๐ |

จากนั้นนำสารละลายที่ผสมแล้วทุกหลอดไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ ๔° เซลเซียสประมาณ ๑๖-๑๒ ชั่วโมง (ดูผลการทดลองในบทที่ ๔) แล้วแยกฮอร์โมนอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติซีรัมโดยการเติมน้ำยาแยกตะกอนผงถ่าน ๒๑๐ ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันดีแล้วไว้ที่อุณหภูมิ ๔° เซลเซียสนาน ๒๐ นาทีแล้วนำไปเหวี่ยงที่ ๔° เซลเซียสด้วยความเร็ว ๒,๔๐๐ รอบต่อนาทีอีก ๒๐ นาทีซึ่งผงถ่านจะดูดซับเอาส่วนที่เป็นฮอร์โมนอิสระไว้ส่วนที่

เป็นน้ำใสจะเป็นฮอร์โมนที่จับกับแอนตีซีรัมจากนั้นแยกเอาแต่ละส่วนออกมาแล้วนำไปวัดหาค่าความแรงรังสีด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมาเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนต่อไปโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

๓.๔ การหาปริมาณเทสโทสเตอโรนด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

๓.๔.๑ การทำกราฟมาตรฐานโดยการผสมสารละลายต่างๆ ในส่วนที่เป็นหลอดสารมาตรฐานเข้าด้วยกันแสดงไว้ในตารางที่ ๒

๓.๔.๒ การหาปริมาณเทสโทสเตอโรนในสารตัวอย่าง ละลายเทสโทสเตอโรนที่สกัดได้จากซีรัมหรือพลาสมาในข้อ ๓.๖ ด้วยแอสเสย์บัฟเฟอร์ ๑.๗ มิลลิลิตรแบ่งออกเป็น ๓ ส่วน ส่วนละ ๐.๕ มิลลิลิตรเพื่อนำไปใช้หาปริมาณต่อไปโดยการผสมสารละลายต่างๆ ในส่วนที่เป็นหลอดสารตัวอย่างเข้าด้วยกันแสดงไว้ในตารางที่ ๒

ตารางที่ ๒ แสดงรายละเอียดการหาปริมาณเทสโทสเตอโรน
ด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

| น้ำยา (ไมโครลิตร) | หลอด nonspecific binding | หลอดสารมาตรฐาน | หลอดสารตัวอย่าง |
|---|---|---|---|
| 0.01 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พี เอช ๗.๐, ๐.๑% เจลาติน | ๖๐๐ | - | - |
| สารมาตรฐาน (๒.๕-๑,๐๐๐ พิโคกรัมต่อหลอด) | - | ๕๐๐ | - |
| สารตัวอย่าง | - | - | ๕๐๐ |
| เทสโทสเตอโรนแอนตีซีรัม (dilution ๑ : ๓๐,๐๐๐) | - | ๑๐๐ | ๑๐๐ |
| สารติดฉลาก (๑๕,๐๐๐ cpm) | ๑๐๐ | ๑๐๐ | ๑๐๐ |
| รวมปริมาณสารละลายแต่ละหลอด (ไมโครลิตร) | ๗๐๐ | ๗๐๐ | ๗๐๐ |

อินคิวเบทสารละลายทุกหลอดที่ผสมแล้วที่อุณหภูมิ ๔° เซลเซียสประมาณ ๔๘ ชั่วโมง เติมน้ำยาแขวนตะกอนผงถ่าน ๒๐๐ ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ ๔° เซลเซียส แล้วนำไปเหวี่ยงที่อุณหภูมิ ๔° เซลเซียสด้วยความเร็ว ๒,๕๐๐ รอบต่อนาทีเป็นเวลา ๒๐ นาทีแยกเอาส่วนน้ำใสออกจากส่วนที่เป็นผงถ่านแล้วนำไปวัดหาความแรงรังสีต่อไป

๓.๑๐ การคำนวณ

๓.๑๐.๑ การคำนวณหาค่าเปอร์เซนต์ของการติดฉลาก หลังจากทำเปเปอร์อิเลคโตรโฟรีซีส

สมมติให้ผลรวมของ count rate ที่ ๐-๒ ซม. = A

ผลรวมของ count rate ทั้งหมด = B

เปอร์เซนต์การติดฉลาก = $\frac{A}{B}$ x 100 = C

๓.๑๐.๒ การคำนวณหาค่าความแรงรังสีจำเพาะของสารติดฉลากรังสี

ถ้า C เป็นค่าเปอร์เซนต์การติดฉลาก

D ไมโครคูรีเป็นค่าปริมาณรังสีของโซเดียมไอโอไดด์-๑๒๕ ที่ใช้

E ไมโครกรัมเป็นน้ำหนักของสารประกอบที่นำมาติดฉลาก

ความแรงรังสีจำเพาะ = $\frac{\frac{C}{100} \times D}{E}$ ไมโครคูรีต่อไมโครกรัม

๓.๑๐.๓ การคำนวณหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$), ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D) และเปอร์เซนต์สัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปร (% CV)

สมมติให้ ค่าที่อ่านได้จากการทดลอง = Xi พีโคกรัมต่อมิลลิลิตร

จำนวนครั้งในการทดลอง = n

ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) = $\frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n}$

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D) = $\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$

ค่าสัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปร (% CV) = $\frac{S.D}{\bar{X}}$ x 100

๓.๑๐.๔ การคำนวณหาค่า % recovery

สมมติให้ ปริมาณเทสโทสเตอโรนในพูลซีรัม = M พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร
ปริมาณเทสโทสเตอโรนมาตรฐานที่เติมลงไป = N พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร
ปริมาณเทสโทสเตอโรนที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน = K พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{K}{M + N} \times 100$$

๓.๑๐.๕ การคำนวณหาค่าเปอร์เซนต์ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกริยาการรวมตัว (๑๘)

% ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกริยาการรวมตัว

$$= \frac{\text{ความแตกต่างสูงสุดของปฏิกริยาการรวมตัวที่ ๐ และ ๑,๐๐๐ พิโคกรัม}}{\text{ปฏิกริยาการรวมตัวที่ ๐ พิโคกรัม}} \times ๑๐๐$$

๓.๑๐.๖ การคำนวณหาความไว (sensitivity) ของการวัดปริมาณเทสโทสเตอโรนสามารถคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้(๑๘)

$$\text{ความไวของการวัด} = \frac{BO - 2\ S.D}{BO} \times 100$$

โดย $$BO = \frac{B}{J} \times 100$$

B เป็นค่า cpm ของปฏิกริยาการรวมตัวระหว่างสารติดฉลากกับแอนตีซีรัม โดยมีสารมาตรฐานเทสโทสเตอโรนปริมาณน้อยที่สุด (๒.๕ พิโคกรัม) ร่วมอยู่ในปฏิกริยา

J เป็นค่า cpm ของปฏิกริยาการรวมตัวระหว่างสารติดฉลากกับแอนตีซีรัม โดยไม่มีสารมาตรฐานเทสโทสเตอโรนร่วมอยู่ในปฏิกริยา

S.D เป็นค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า cpm. ของปฏิกริยาการรวมตัวของ B

ระดับปริมาณของเทสโทสเตอโรนที่น้อยที่สุดที่สามารถวัดได้ในแต่ละการทดลองสามารถหาได้โดยการเทียบค่าความไวของการวัดที่คำนวณได้กับกราฟมาตรฐานของแต่ละการทดลองนั้น

๓.๑๑ การศึกษาความเสถียร (stability) และอายุการใช้งานของสารติดฉลากรังสีที่เตรียมได้ในข้อ ๓.๗.๔

ได้ทำการศึกษาความเสถียรและอายุการใช้งานของสารติดฉลากรังสีดังกล่าวด้วยวิธีเปเปอร์อิเลคโตรโฟรีซีสและปฏิกริยาทางราดีโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยการวิเคราะห์หาอัตราการแตกตัวของสารรังสีไอโอดีน-๑๒๕ จากสารติดฉลากรังสีและเปอร์เรนต์สูงสุดของปฏิกริยาการรวมตัวกับสารแอนตีซีรัม การทดลองนี้ได้กระทำติดต่อกันทุกสัปดาห์เป็นเวลา ๗ สัปดาห์ซึ่งรายละเอียดผลของการทดลองได้แสดงไว้ในบทที่ ๔