บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 การเก็บสารตัวอย่าง

ซีรัมที่ใช้เป็นสารตัวอย่างสำหรับหาปริมาณเอสตราไดออลแบ่งเป็น 3 กลุ่ม

3.1.1 Normal female serum คือ ซีรัมจากสตรีไทยอาสาสมัคร 4 คน ทุกคนเป็นโสด อายุระหว่าง 19 – 36 ปี เจาะเลือดตอนเช้าเวลา 7.30 – 8.30 นาฬิกา ในวันที่ 2, 8, 11 – 16, 20, 22 ของรอบเดือน ถอจากนั้นเจาะเลือดวันเว้นวันจนกระทั่งถึงวันเริ่มมีประจำเดือนใหม่

3.1.2 Pooled serum คือ ซีรัมจากกลุ่มอาสาสมัครทั้งบุรุษและสตรีที่มีสุขภาพปกติ โดยเจาะเลือดในสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

ก. ซีรัมจากสตรีในวัยหมดประจำเดือน (menopausal woman)

ข. ซีรัมจากสตรีปกติวันที่ 5 และ 21 ของรอบเดือน (menstruol cycle, day 5 and day 21)

ค. ซีรัมจากบุรุษและซีรัมจากสตรีในวัยที่ยังมีประจำเดือน (male and female pool)

ง. ซีรัมจากสตรีในระยะ 3 เดือนแรกและ 3 เดือนสุดท้ายของการตั้งครรภ์ (1^{st} and 3^{rd} trimester of pregnancy)

จ. ซีรัมจากสตรีหลังคลอด 3 ชม. (post partum, 3h.)

3.1.3 Control serum คือ ซีรัมที่ใช้สำหรับควบคุมมาตรฐานการวิเคราะห์งานเป็นซีรัมที่มีปริมาณเอสตราไดออลในระดับต่ำ กลาง และสูง คือ

ก. ค่าต่ำ ได้จากซีรัมบุรุษปกติ

ข. ค่ากลาง ได้จากซีรัมบุรุษที่เติมเอสตราไดออลมาตรฐานลงไปประมาณ 500 พิโกกรัม/ซม^3

ค. ค่าสูง ได้จากซีรัมบุรุษที่เติมเอสตราไดออลมาตรฐานลงไปประมาณ 7,500 พิโกกรัม/ซม^3

ซีรัมทั้งสามกลุ่มได้จากการเจาะเลือดแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 ชม. แล้วจึงปั่นแยกซีรัมออกโดยปั่นด้วยเซนตริฟิวจ์ "Sorvall" type H ที่ความเร็ว 3,000 รอบเป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วแยกซีรัมที่ได้เก็บไว้ที่ -20° ซ.

3.2 การเตรียมน้ำยา

004710

3.2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับติดฉลากอนุพันธ์เอสตราไดออล (E_2-6-oxime) ด้วย โซเดียมไอโอไดด์-125

ไตรนอร์มอลบิวทิลลามีน ใน ไดออกเซน 1:5 V/V ผสมไตรนอร์มอลบิวทิลลามีน 0.5 ซม^3 เข้ากับ ไดออกเซน 2 ซม^3

ไอโอบิวทิลคลอโรฟอร์เมท ใน ไดออกเซน 1:10 V/V ผสมไอโอบิวทิลคลอโรฟอร์เมท 0.25 ซม^3 เข้ากับ ไดออกเซน 2.25 ซม^3

สารละลาย 0.5 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ละลายโซเดียมฟอสเฟต โมโนเบสิก โมโนไฮเดท 0.366 กรัม กับ โซเดียมฟอสเฟต ไดเบสิก แอนฮัยไดรท 12.694 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ซม^3 ปรับpH จนเป็น 8.0 ± 0.1 โดยใช้ สารละลายกรดเกลือหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์

17562545

สารละลาย 0.5 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ละลาย โซเดียมฟอสเฟต โมโนเบสิค โมโนไฮเดท 2.691 กรัม กับ โซเดียมฟอสเฟต ไดเบสิค แอนฮัยเดท 8.177 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ซม^3 ปรับ pH จนเป็น 7.0 ± 0.1 โดยใช้สารละลายกรดเกลือหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์

ยีสตามีนใน 0.5 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ละลาย ยีสตามีน 1.11 มก.ด้วยสารละลาย 0.5 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ปริมาณ 10 ซม^3

กลอรามีน-ที ในน้ำกลั่น ละลายคลอรามีน-ที 5 มก.ด้วยน้ำกลั่น 1 ซม^3

โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ ในน้ำกลั่น ละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 30 มก. ด้วยน้ำกลั่น 1 ซม^3

โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ ใน 0.5 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 5 มก. ด้วยสารละลาย 0.5 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 5 ซม^3

สารละลาย 0.1 M กรดเกลือ เจือจาง 12 M กรดเกลือ 8.3 ซม^3 ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ซม^3

สารละลาย 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัมด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ซม^3

สารละลาย 0.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัมด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ซม^3

3.2.2 การเตรียมสารละลายสำหรับทำทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี และเซฟาเดกซ์ LH-20 คอลัมน์ โครมาโตกราฟฟี (เบนซีน : เอทานอล =3: 1) เตรียมก่อนใช้โดยผสมเบนซีน 75 ซม^3 เข้ากับ เอทานอล 25 ซม^3

3.2.3 การเตรียมสารละลายสำหรับทำซีไลท์คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

สารละลาย 15% เอทิลอะซิเตท ใน ไอโซออกเทน ผสม เอทิลอะซิเตท 15 มม^3 เข้ากับ ไอโซออกเทน 85 มม^3

สารละลาย 40% เอทิลอะซิเตท ใน ไอโซออกเทน ผสม เอทิลอะซิเตท 40 มม^3 เข้ากับ ไอโซออกเทน 60 มม^3

3.2.4 การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณเอสตราไดออล

3.2.4.1 สารละลายแอสเสย์บัฟเฟอร์ (0.1 M ฟอสเฟต บัฟเฟอร์pH 7.0,0.1% เจลาติน) ละลายโมโนเบสิก โมโนไฮเดท 10.8 กรัม โมโนเบสิก ไดเบสิก แอนฮาไฮเดท 32.7 กรัม โมเดียมเอไซด์ 2 กรัม และ โมเดียมคลอไรด์ 18 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 2000 มม^3 ปรับ pH จนเป็น 7.0 ± 0.1 โดยใช้สารละลายกรดเกลือหรือ โมเดียมไฮดรอกไซด์ เติม เจลาติน 2 กรัม แล้วอุ่นจนกระทั่งเจลาตินละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่ 4° ซ.

3.2.4.2 การเตรียม tritiated-oestradiol-17β (^{3}H-E$_2$) สำหรับติดตามการสูญเสียเอสตราไดออล เตรียม Stock ^{3}H-E$_2$ (50 ไมโครคูรี/มม^3) โดยละลาย ^{3}H-E$_2$ 250 ไมโครคูรีที่ได้จากบริษัท New England Nuclear ด้วยสารละลายเบนซีน : เมทานอล (9:1) 5 มม^3 แล้วดูดมา 10 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เติมแอสเสย์บัฟเฟอร์ 10 มม^3 ผสมให้เข้ากัน สารละลายนี้ 0.1 มม^3 จะมีเอสตราไดออลประมาณ 20,000 dpm (disintegration per minute) หรือเท่ากับ 56 พิโคกรัม

สารละลาย ^{3}H-E$_2$ ที่ใช้สำหรับติดตามการสูญเสียเอสตราไดออล เตรียมโดยเจือจาง ^{3}H-E$_2$ (20,000 dpm) 1 มม^3 ด้วยแอสเสย์บัฟเฟอร์ จนครบ 10 มม^3 เก็บสารละลายนี้ที่ 4° ซ.

3.2.4.3 การเตรียมสารละลายเอสตราไดออลมาตรฐาน เตรียม stock solution ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ซม^3 โดยละลายเอสตราไดออลมาตรฐาน 10.0 มก. ด้วยเอทานอล 10 ซม^3 ทำให้เจือจางจนกระทั่งได้สารละลายเข้มข้นตามต้องการ เก็บสารละลายนี้ที่ – 20° ถึง –40° ซ. แล้วเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับทำกราฟมาตรฐานโดย

ก. สารละลายเอสตราไดออล 50,000 พิโคกรัม/ซม^3 ดูด stock solution 100 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งแล้วละลายด้วยแอสเสย์บัฟเฟอร์ 20 ซม^3

ข. สารละลายเอสตราไดออล 25,000 พิโคกรัม/ซม^3 เจือจางสารละลายจากข้อ ก. ลงเท่าตัวด้วยแอสเสย์บัฟเฟอร์

ค. สารละลายแอสตราไดออล 10,000 พิโคกรัม/ซม^3 เจือจางสารละลายจากข้อ ข. 4 ซม^{3}ด้วยแอสเสย์บัฟเฟอร์ จนครบ 10 ซม^3 ทำเช่นนี้ต่อไปจนกระทั่งได้สารละลายเอสตราไดออลที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5,000; 2,500; 1,000; 500; 100; 50 และ 25 พิโคกรัม/ซม^{3}ตามลำดับ

3.2.4.4 การเตรียมสารละลายผงถ่านความเข้มข้น 5% (10 มก.ใน 0.2 ซม^3) ผสมผงถ่าน norit A 5 กรัม กับ เดกซ์แทรน ที 70 0.5 กรัมและแอสเสย์บัฟเฟอร์ 100 ซม^3 คนให้เข้ากันแล้วเก็บสารผสมนี้ที่ 4° ซ. สารละลายนี้มีอายุการใช้งานนานประมาณ 1 เดือน

3.2.4.5 การเตรียม scintillator บรรจุ โทลูอีน 4 แกลลอนในถังขนาด 5 แกลลอน เติมลิกิวฟ่อร์ 640 ซม^{3}และ ไดออกเซน 3 ลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

3.3 <u>การเตรียม charcoaled serum</u>

ดำเนินการวิธีของ WHO matched reagent programme for RIA

of reproductive hormones, 1976. คือ ล้างผงถ่านด้วยน้ำกลั่นโดยกนผงถ่านกับน้ำ แล้วตั้งทิ้งไว้และรินส่วนน้ำใสที่มีผงถ่านขนาดเล็ก ๆ ลอยอยู่บนผิวน้ำทิ้งไป แล้วนำผงถ่านไปอบจนแห้ง อินกิวเบทซีรัม 400 ซม^3 ที่ 50° ซ. ประมาณ 1 ซม. เพื่อทำลายโบรตีนบางชนิด เติมผงถ่านที่อบแห้ง 20 กรัม เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ประมาณ 2 ซม. นำไปเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกผงถ่านออกด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แยกผงถ่านทิ้งไปแล้วนำซีรัมที่ได้มาเซนตริฟิวจ์ซ้ำจนกระทั่งสามารถแยกผงถ่านออกไปให้มากที่สุด (ปกติต้องเซนตริฟิวจ์ประมาณ 5 ครั้ง) เก็บ charcoaled serum ที่ได้ไว้ที่ -40° ซ.

3.4 การเตรียมซีไลท์ไมโครคอลัมน์ (celite microcolumn)

เผาซีไลท์ในเตาเผาที่ 550° ซ. เป็นเวลาประมาณ 18 ชม. เพื่อไล่สิ่งเจือปนออก ผสมซีไลท์ที่เผาแล้วกับเอทีลีนไกลคอลในอัตราส่วน 2:1 w/v โดยกนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วประมาณ 10 นาที แล้วบรรจุซีไลท์นี้ลงในคอลัมน์ (disposable graduated gloss pipette ขนาด 5 ซม^3 เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ของบริษัท Kimble gloss Co.) ที่มีลูกแก้วขนาดเล็ก ๆ อุดปลายล่างของคอลัมน์จนเต็มประมาณ 0.5 กรัม แล้วเกาะคอลัมน์ให้ซีไลท์ตกลงไปที่ปลายคอลัมน์จนระดับของซีไลท์อยู่ที่ เลข 3 ของปิเปต ต่อจากนั้นอัดซีไลท์ลงมาจนถึงระดับ 3.5 ± 0.1 ด้วยแท่งเหล็กที่มีปลายเป็นพลาสติก ล้างคอลัมน์ด้วย ไอโซออกเทน 3 ครั้ง ๆละ 3.5 ซม^3 ก่อนนำไปใช้แยกเอสตราไดออลให้บริสุทธิ์

3.5 การทดสอบปฏิกริยาทางเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

รายละเอียดของการทดสอบคุณสมบัติและ/หรือปริมาณ แอนติบอดี สารติดฉลาก ผงถ่าน เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกริยาและอิทธิพลของสารในตัวทำ

ละลายอินทรีย์ จะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในแต่ละการทดลอง แต่หลักเกณฑ์โดยทั่วไป คือผสมสารต่าง ๆ (ตารางที่ 1) เข้าด้วยกัน

ตารางที่ 1 รายละเอียดการทำเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

น้ำยา (ไมโครลิตร)	หลอด nonspecific binding	หลอดไม่มีสารมาตรฐาน	หลอดสารมาตรฐาน
0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, 0.1 % เจลาติน	600	500	400
สารมาตรฐาน (ตามปริมาณที่ต้องการ)	–	–	100
แอนติบอดี	–	100	100
สารสกัดจาก	100	100	100

อินคิวเบทที่ 4°C. ประมาณ 16 – 24 ชม. เติมสารละลายผงถ่านใน 0.1 % เดกซ์แทรน ที่ 7° แอสเสย์บัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ แยกส่วนผงถ่านและส่วนใสออกจากกัน

3.6 วิธีสกัดจากอนุพันธ์เอสตราไดออล (E_2-6-oxime) ด้วย โซเดียมไอโอไดด์-125

การสกัดจากอนุพันธ์เอสตราไดออล ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nars กับ Hunter (1973) และ Hunter กับคณะ (1975) ซึ่งมีหลักการดังนี้

ขั้นแรก กระตุ้นอนุพันธ์เอสตราไดออลให้อยู่ในรูปของ mixed acid anhydride ด้วยกลอโรการ์บอเนท และเทอเชียรี อะมีน

ขั้นที่สอง ติดฉลากฮีสตามีน ด้วย สารกัมมันตภาพรังสีไอโอดีน ด้วยวิธีซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Greenwood กับ Hunter (1963)

ขั้นที่สาม นำสารติดฉลาก ^{125}I -ฮีสตามีน มาทำปฏิกริยากับอนุพันธ์เอสตราไดออลจากขั้นแรก โดยปฏิกริยา mixed anhydride ตามวิธีของ Erlanger และคณะ (1957) (รูปที่ 1) รายละเอียดวิธีการติดฉลากมีดังนี้คือ

3.6.1 การกระตุ้นอนุพันธ์เอสตราไดออล

ผสม E_2-6-oxime 56ง ไมโครกรัมที่ละลายใน ไดออกเซน 5ง ไมโครลิตร กับ ไตรนอร์มอลบิวทิลามีน ใน ไดออกเซน (1:5 v/v) 5 ไมโครลิตร และไอโซบิวทิลคลอโรฟอร์เมท ใน ไดออกเซน (1:10 v/v) 5 ไมโครลิตรนำส่วนผสมไปเขย่าในอ่างน้ำเย็นอุณหภูมิ 8 - 1ง°ซ. ประมาณ 3ง นาที หลังจากนั้นเติมไดออกเซน 7.5 ลบ.^{3}

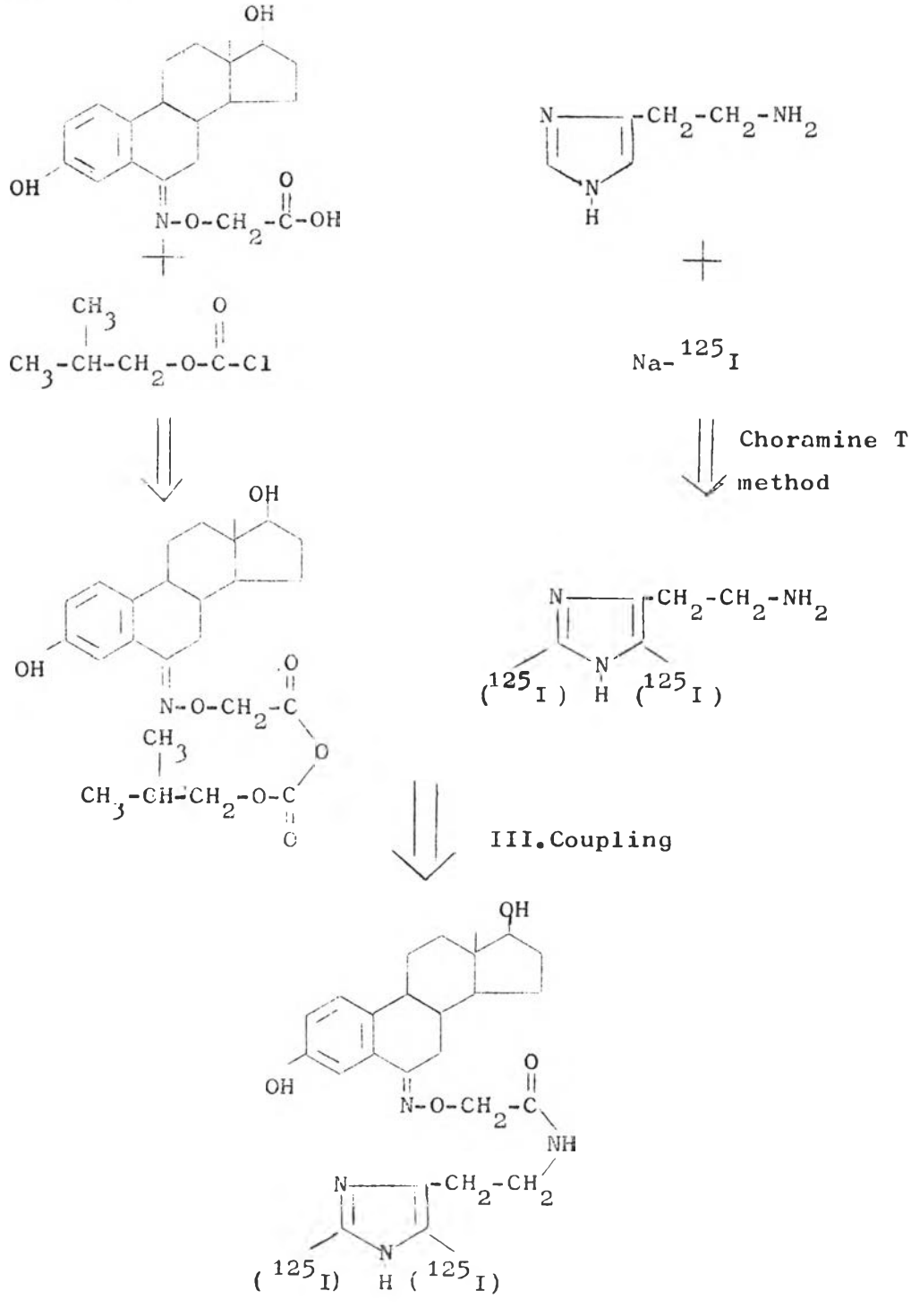
3.6.2 การติดฉลากฮีสตามีน

ผสมสารละลายฮีสตามีน (1.11 ไมโครกรัม) 1ง ไมโครลิตร กับ โซเดียมไอโอไดด์-125 (5ง.ง ไมโครคูรี) 5 ไมโครลิตร และสารละลายคลอรามีน-ที (5ง ไมโครกรัม) 1ง ไมโครลิตร ให้เข้ากันเป็นเวลา 45 วินาที แล้วเติมสารละลาย โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ (3ง.ง ไมโครกรัม) 1ง ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันทันที

3.6.3 การคอนจูเกตระหว่างอนุพันธ์เอสตราไดออลกับ ^{125}I-ฮีสตามีน

ดูดสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1 5ง ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.2 และเติม ง.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1ง ไมโครลิตร นำส่วนผสมไปเขย่าในอ่างน้ำเย็น ง°ซ. ประมาณ 1 $\frac{1}{2}$ ลม. แล้วถ่ายส่วนผสมทั้งหมดใส่ในหลอดปิดจุกแก้ว ขนาด 1ง ลบ.^{3}

รูปที่ 1 วิธีการติดฉลากอนุพันธ์เอสตราไดออลด้วยโซเดียมไอโอไดด์-125



ล้างหลอดแก้วเดิมด้วย 0.1 M กรดเกลือ 3 ครั้ง ๆ ละ 300 ไมโครลิตร เก็บสารละลายที่ล้างทั้งหมดใส่รวมกับส่วนผสมในหลอดปิดจุกแก้ว เติมเอทิลอะซิเตท 1 มม^3 เพื่อสกัดเอา ^{125}I -ไอโอไดด์ และ ^{125}I -ธีสตามีนออก โดยการเขย่า (vortex) 1 ครั้ง ดูดส่วนเอทิลอะซิเตทออกมา ให้ชื่อว่า E_2^1 ขั้นต่อมาเติม 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.9 มม^3 และสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ ใน 0.5 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, 1 มม^3 สกัดอนุพันธ์เอสตราไดออลติดฉลาก ^{125}I-ธีสตามีนด้วย เอทิลอะซิเตท 0.5 มม^3 โดยการเขย่านาน 2 นาที นำส่วนเอทิลอะซิเตทมาดูดน้ำออกด้วย โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสก่อน แล้วจึงดูดเอทิลอะซิเตทมาเก็บไว้ในหลอดปิดจุกแก้ว ให้ชื่อว่า E_2^2

3.7 วิธีเตรียมสารติดฉลาก (E_2-6-^{125}I) ให้บริสุทธิ์

นำสารติดฉลากจากข้อ 3.6 มาทำให้บริสุทธิ์โดย ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟีและเซฟาเดกซ์ LH-20 คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีตามลำดับ

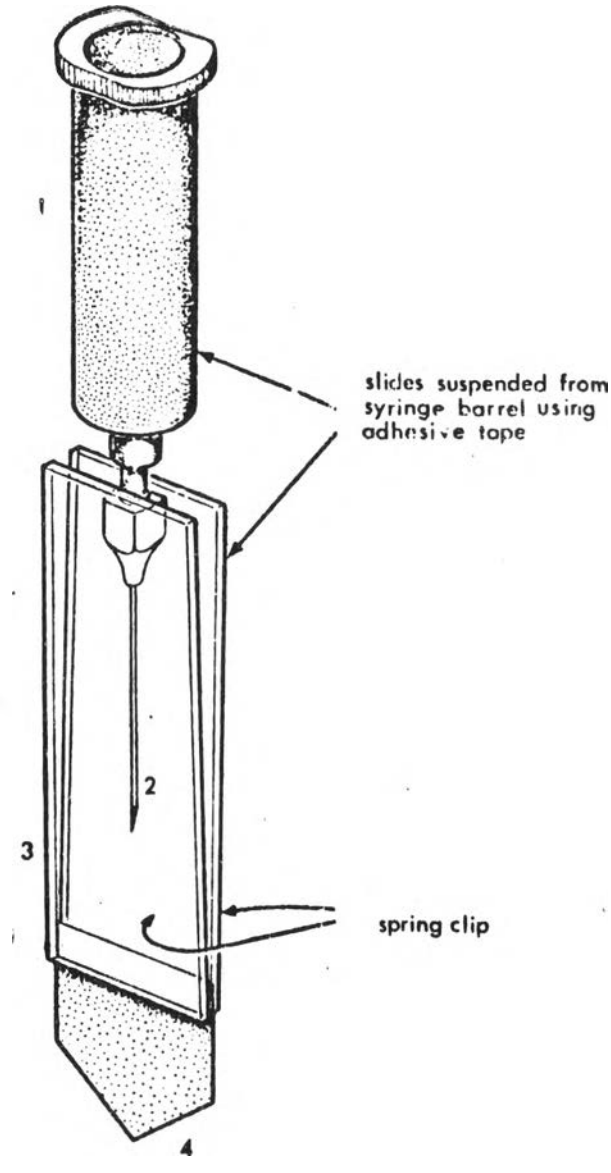
3.7.1 การทำให้สารติดฉลากบริสุทธิ์ด้วยทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

หยดสารติดฉลากลงบนแผ่น alumina pre-coated sheets ขนาด 10 x 20 ซม. ห่างจากขอบล่าง 2 ซม. แล้วนำแผ่นอลูมีนาไปแช่ในส่วนผสมของ เบนซีน : เอทานอล (3:1 V/V) เมื่อสารละลายขึ้นถึงขีดที่ต้องการแล้วจึงนำโครมาโตแกรมไปวางบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์เพื่อหาตำแหน่งสารติดฉลาก ตัดโครมาโตแกรมบริเวณสารติดฉลากออกมาชะล้างด้วย เอทานอล 4 มม^3 (รูปที่ 2) เก็บสารติดฉลากในเอทานอลที่ 4° ซ. นำสารติดฉลากมาทดสอบปฏิกริยาทางอิมมิวโนกับแอนติบอดีตามวิธีในข้อ 3.5 หน้า 19

3.7.2 การทำสารติดฉลากบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

เตรียมคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 ขนาด 1.0 x 36 ซม.

รูปที่ 2 การชะสารที่สกัดออกจากโครมาโตแกรม



Key:

1. All glass syringe barrel (10ml)
2. Stainless steel hypodermic needle (21G x 1½in.)
3. Glass microscope slides (75 x 25 x 1mm).
4. Area of chromatogram bearing radioiodine labelled steroid.

และแช่เซฟาเดกซ์ด้วยน้ำยาระ นำสารสกัดจากในเอทานอล จากข้อ 3.7.1 มาเป่าจนแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ละลายสารสกัดจากด้วยน้ำยาระเล็กน้อย แล้วดูดสารสกัดจากลงในคอลัมน์ด้วย Pasteur pipette ระด้วยเบนซีน : เอทานอล (3:1) เก็บส่วนที่ออกจากคอลัมน์ ครั้งแรกตาม void volume ประมาณ 25 มม^3 ต่อจากนั้นเริ่มเก็บส่วนที่ออกจากคอลัมน์ส่วนละ 0.5 มม^3 ทั้งหมด 50 ส่วน อัตราการไหลของน้ำยาระล้างประมาณ 0.13 มม^3/นาที นำสารสกัดจากแต่ละส่วนไปนับหาปริมาณรังสีและทดสอบปฏิกริยาทางอิมมิวโนกับซอนดีบอดี ตามวิธีใน ข้อ 3.5 หน้า 19

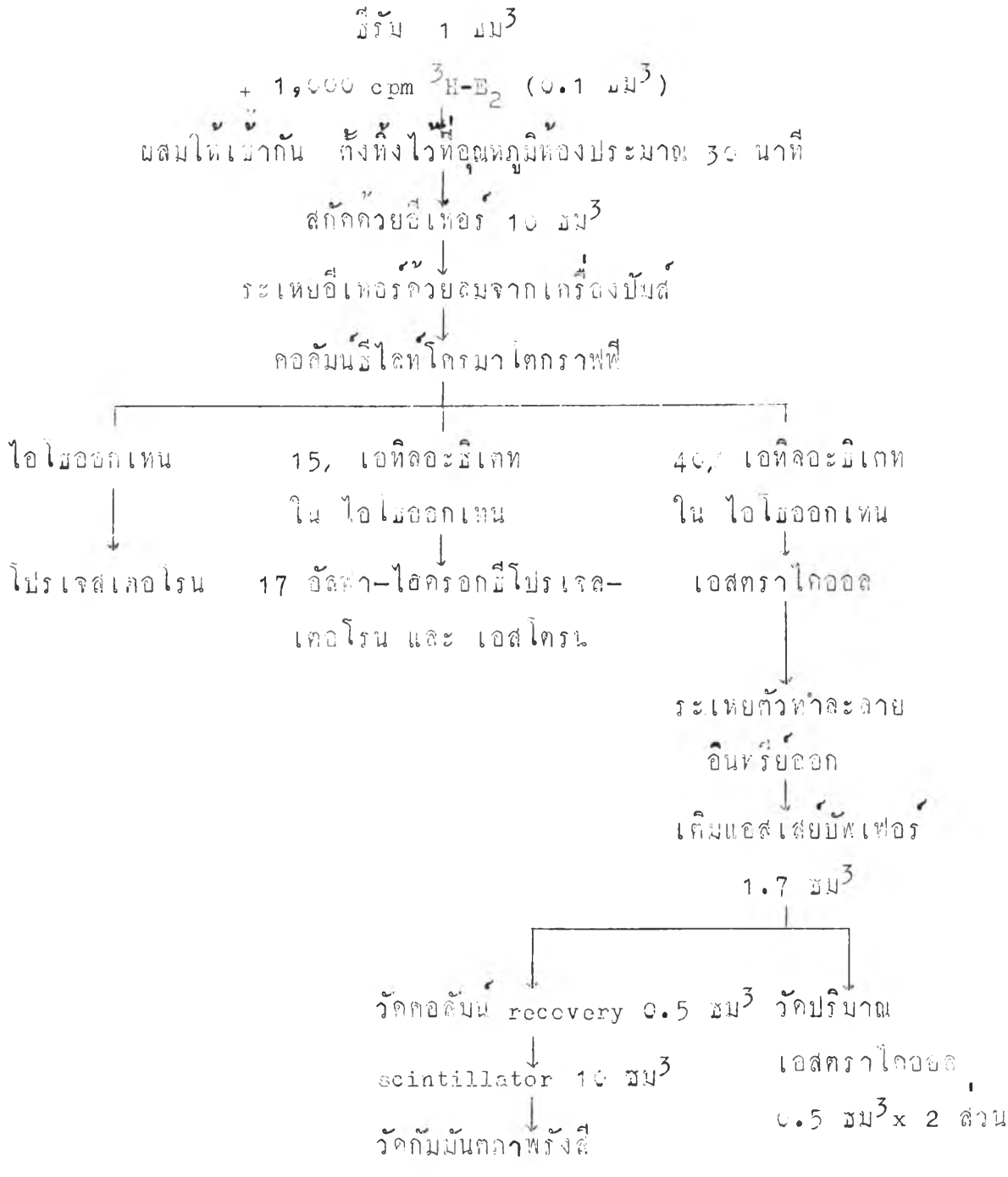
3.8 <u>วิธีวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัม</u>

การวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมได้ดำเนินตามวิธีของ Abraham และคณะ (1970 ; 1971) โดยสกัดเอสตราไดออลออกจากซีรัม แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้หลักการของ partition chromatography ใช้ซิลิกา เป็น supporter และเอทิลีนไกลคอลเป็น stationary phase ส่วน mobile phase เป็นไอโซออกเทน และส่วนผสมของไอโซออกเทน กับ เอทิลอะซิเตท (รูปที่ 3)

3.8.1 วิธีการสกัดเอสตราไดออลและการทำให้บริสุทธิ์

ผสมซีรัมตัวอย่างหรือ charcoaled serum กับ ^{3}H-E$_2$ ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.4.2 หน้า 17 0.1 มม^3 (1,000 cpm) ให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที สกัดเอสตราไดออลในซีรัมด้วยอีเทอร์ 10 มม^3 โดยการเขย่า (vortex) ประมาณ 1 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งแห้งผสมอัลกอฮอล์ (-77° ซ.) ซีรัมที่อยู่ตอนล่างของหลอดแก้วจะแข็งตัว ทำให้สามารถเทแยกชั้นของอีเทอร์ออกจากซีรัมได้ นำอีเทอร์นี้ไประเหยด้วยการพ่นอากาศลงในขวดบรรจุอีเทอร์จนแห้งสนิท เติมไอโซออกเทน 1 มม^3 เพื่อละลายสเตอรอยด์

รูปที่ 3 การสกัดฮีรัมและแยกเอสตราไดออลด้วยคอลัมน์ไฮโดรมาโตกราฟฟี
(ดัดแปลงมาจากวิธีของ Abraham และคณะ, 1971)



ต่าง ๆ ที่ถูกสกัดออกจากซีรัมตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ก่อนนำไปผ่านคอลัมน์ซีไลท์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4 หน้า 19 ดูดสารละลายในไอโซออกเทนใส่คอลัมน์ด้วย Pasteur pipette ขนาดยาว 9 นิ้ว ต่อท่อก๊าซไนโตรเจนเข้าสู่คอลัมน์ เปิดก๊าซให้มีความดันประมาณ 1 – 2 ปอนด์/ตารางนิ้ว เพื่อควบคุมอัตราการไหลของตัวทำละลายให้ได้ประมาณ 6 – 12หยด/นาที สเตอรอยด์จะแยกออกมาจากคอลัมน์โดยการชะด้วยน้ำยาชะ 3 ชนิด ๆ ละ 3.5 ซม^3 ตามลำดับดังนี้ คือ

ก. ไอโซออกเทนซึ่งเป็น nonpolar solvent จะแยกเอา nonpolar steroids เช่น โปรเจสเตอโรนออกมา

ข. 15% เอทิลอะซีเตท ใน ไอโซออกเทน ซึ่งมี polarity เพิ่มขึ้นจะแยกเอาสเตอรอยด์ที่ค่อนข้าง polar เช่น 17อัลฟา – ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน และ เอสโตรนออกมา

ก. 40% เอทิลอะซีเตท ใน ไอโซออกเทน มี polarity เพิ่มมากขึ้น จะแยกเอาสเตอรอยด์ที่มี polarity สูงกว่าส่วนที่กล่าวมาข้างต้น เช่น เอสตราไดออลออกมา

เก็บเอาส่วนของ 40% เอทิลอะซีเตท ใน ไอโซออกเทนที่ชะออกมานำไปเป่าให้แห้งด้วยอากาศ

3.8.2 การวัดปริมาณเอสตราไดออลด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

ละลายเอสตราไดออลที่ได้จากข้อ 3.8.1 ด้วย แอสเสย์บัฟเฟอร์ 1.7 ซม^3 แบ่งเป็น 3 ส่วน ๆ ละ 0.5 ซม^3 ส่วนแรกเติม scintillator 10 ซม^3 แล้ววัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง liquid scintillation spectrometer จะได้ column recovery ของสารตัวอย่างนั้น อีกสองส่วนนำไปวัดปริมาณเอสตราไดออลตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การวัดปริมาณเอสตราไดออลด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

น้ำยา (ไมโครลิตร)	หลอด nonspecific binding	หลอด สารมาตรฐาน	หลอด สารตัวอย่าง
0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, 0.1 % เจลาติน	600	400	–
สารมาตรฐาน (2.5 – 5,000 พิโคกรัม/หลอด)	–	100	–
สารตัวอย่างหลังผ่านกอลัมน์	–	–	500
แอนติบอดี (initial dil. 1:30,000)	–	100	100
สารติดฉลาก (5,000 cpm)	100	100	100

อินคิวเบทที่ 4° ซ. ประมาณ 16 – 24 ชม. เติมสารละลายผงถ่าน (10 มก.) ใน 0.1% เดกซ์แทรน ที่ 7° แอสเสย์บัฟเฟอร์ 0.2 ซม^3 เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งแช่ไว้ในถาดน้ำแข็งประมาณ 20 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4° ซ. ด้วยความเร็ว 2,500 รอบ/นาที ประมาณ 15 นาที เทแยกส่วนน้ำใสออกจากผงถ่าน นำทั้งสองส่วนไปวัดกัมมันตภาพรังสี

3.9 วิธีวัดปริมาณโปรเจสเตอโรน ลูทีไนซิงฮอร์โมน และ ฟอลลิเคิลสทิมูเลทิงฮอร์โมนในซีรั่มด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

การวัดปริมาณโปรเจสเตอโรน ลูทีไนซิงฮอร์โมน และ ฟอลลิเคิล

สทิมูเลทิงฮอร์โมนในซีรัมได้ดำเนินตามวิธีของ WHO Programme for the Provision of Matched Assay Reagents for the Radioimmunoassay of Hormone in Reproductive Physiology. Assay Method Manual (HRP/ 77.1) pp 9 & 13 รายละเอียดของการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 การวัดปริมาณโปรเจสเตอโรนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

น้ำยา (ไมโครลิตร)	หลอด nonspecific binding	หลอด สารมาตรฐาน	หลอด, สารตัวอย่าง
0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2, 0.1% เจลาติน	600	–	–
สารมาตรฐาน	–	500	–
สารตัวอย่างสกัดด้วยอีเทอร์	–	–	500
สารติดฉลากกัมมันตรังสี (≃10,000 cpm)	100	100	100
แอนติบอดี	–	100	100

อินคิวเบทที่ 4° ซ. ค้างคืน (16 – 24 ชม.) เติมสารละลายผงถ่าน 1.25 มก. ในแอสเสย์บัฟเฟอร์ 0.2 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่ 4° ซ. 15 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่อุณหภูมิ 4° ซ. ด้วยความเร็ว 2,500 รอบ/นาทีในเครื่องเซนตริฟิวจ์ MSE "Mistral 4L" ประมาณ 15 นาที เทแยกส่วนน้ำใส ออกไปวัดกัมมันตภาพรังสี

ตารางที่ 4 การวัดปริมาณฮูทีในฮิงฮอร์โมน ฟอลลิเคิลสทิมูเลทิงฮอร์โมนด้วยวิธีเรดิโวอิมมิวโนแอสเสย์

น้ำยา (ไมโครลิตร)	หลอด nonspecific binding	หลอด สารมาตรฐาน	หลอด สารตัวอย่าง
0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2, 0.5% BSA	600	400	400
สารมาตรฐาน	–	100	–
ซีรัม	–	–	100
สารติดฉลากไอโอดีน-125 (≃10,000 cpm)	100	100	100
แอนติบอดี	–	100	100

อินคิวเบทที่ 4° ซ. ประมาณ 48 ชม. เติม anti rabbit γ-globulin (initial dilution 1:26) 100 ไมโครลิตรแล้วอินคิวเบทที่ 4° ซ. ประมาณ 20 ชม. นำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 2,500 รอบ/นาที ในเครื่องเซนตริฟิวจ์ MSE "Mistral 4L" ประมาณ 30 นาที เทแยกส่วนน้ำใสออกจากตะกอนโปรตีน นำส่วนตะกอนโปรตีนไปวัดกัมมันตภาพรังสี

3.10 การคำนวณ

3.10.1 การคำนวณหาปริมาณเอสตราไดออลในซีรัม

สมมติให้ $^{3}H\text{-}E_2$ ที่เติมลงในธีรัมก่อนสกัดด้วยอีเทอร์ = a cpm

หลังจากสกัดด้วยอีเทอร์แล้วผ่านคอลัมน์เรียบร้อย

เติมแอสเซย์บัฟเฟอร์ = 1.7 ซม^3

แบ่ง 0.5 ซม^3 ไปหา column recovery

สมมติวัดกัมมันตภาพรังสีได้ = b cpm

∴ Percentage fraction recovery = $\frac{b}{a}$ x 100

= c

และอีก 0.5 ซม^{3}นำไปวัดปริมาณเอสตราไดออล

สมมติอ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐาน = d พิโคกรัม

∴ .cเปอร์เซ็นต์มีเนื้อสาร = d พิโคกรัม

ถ้า 100 เปอร์เซ็นต์มีเนื้อสาร = $\frac{d}{c}$x 100 "

= x "

ถ้าใช้ธีรัม 1 ซม^3

∴ ในสารตัวอย่างจะมีความเข้มข้นของ

เอสตราไดออล = x พิโคกรัม

ต่อ 1 ซม^3

3.10.2 การคำนวณหาความจำเพาะของแอนติบอดี (% cross reaction)

คำนวณตามวิธีของ Abraham (1969)

$$\% \text{ Cross reaction} = \frac{\text{พิโคกรัมเอสตราไดออลที่ 50\% B/Bo}}{\text{พิโคกรัมสเตอรอยด์ที่ 50\% B/Bo}} \times 100$$

Bo = cpm ของปฏิกริยารวมตัวระหว่างแอนติบอดีกับสารติดฉลากโดยไม่มีสารมาตรฐานรวมอยู่ในปฏิกริยา

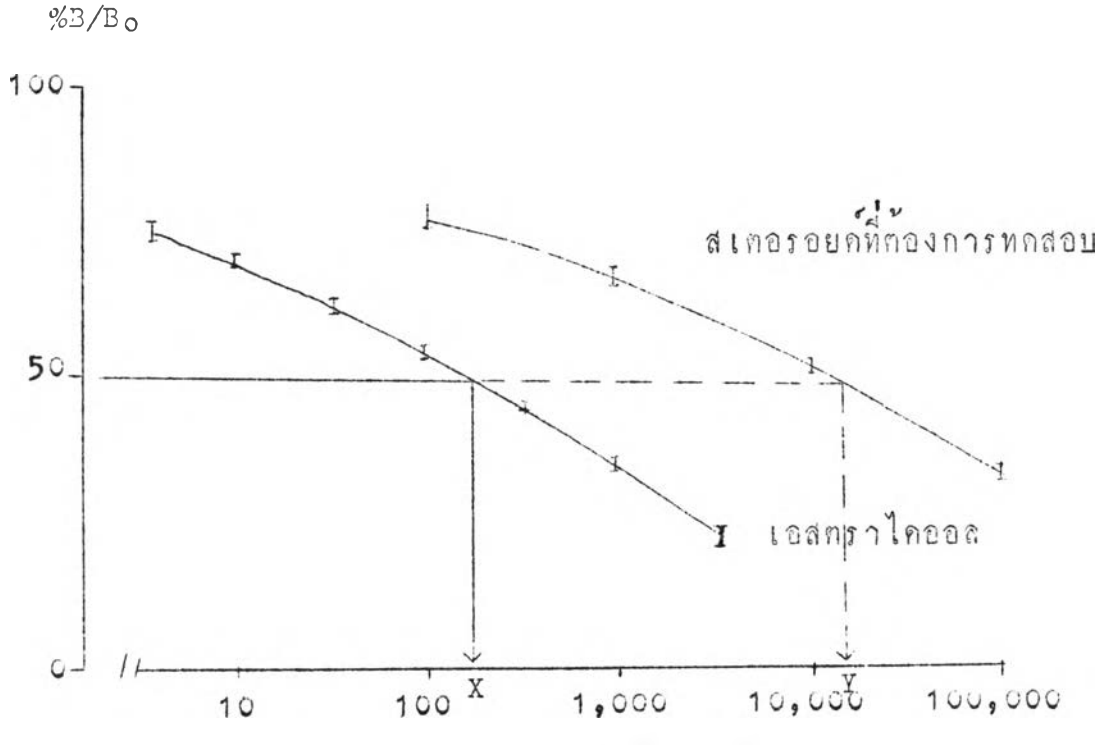
B = cpm ของปฏิกริยารวมตัวระหว่างแอนติบอดีกับสารติดฉลากโดยมีสารมาตรฐานรวมอยู่ในปฏิกริยา

สมมติ พิโคกรัมเอสตราไดออล ที่ 50% B/B_0 = x

สมมติ พิโคกรัมสเตอรอยด์ ที่ 50% B/B_0 = y

จากการทำกราฟมาตรฐานเอสตราไดออลและสเตอรอยด์ที่ต้องการทดสอบตามวิธีการในข้อ 3.8.2 หน้า 27 เขียนกราฟ % B/B_0 กับความเข้มข้นของสเตอรอยด์ที่ต้องการทดสอบ ดังรูป 4

รูปที่ 4 วิธีหา cross reaction ของสเตอรอยด์ที่ต้องการทดสอบ



สารมาตรฐาน (พิโคกรัม)

$$\% \text{ Cross reaction} = \frac{X}{Y} \times 100$$

3.10.3 การคำนวณหาความคลาดเคลื่อนทางสถิติ

ค่าที่อ่านได้จากการทดลอง = x หน่วย

จำนวนครั้งของการทดลอง = n ครั้ง

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

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) = $\sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{(Xi-\bar{X})^2}{n-1}}$

สัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปร (%CV) = $\frac{SD}{X} \times 100$

3.10.4 การคำนวณความถูกต้องของวิธีทดลอง

ทำโดยการเติมเอสตราไดออลมาตรฐานที่ทราบปริมาณลงในธีรัมบุรุษ

สมมติเดิมเอสตราไดออลมาตรฐานลงในธีรัม = A พิโคกรัม/ซม^3

แต่ธีรัมบุรุษมีความเข้มข้นเอสตราไดออล = B "

∴ ธีรัมที่เติมเอสตราไดออลมาตรฐานมีความเข้มข้น = A + B "

แต่เมื่อวัดปริมาณเอสตราไดออลโดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานและคำนวณส่วนที่สูญเสียไปให้ถูกต้องแล้วได้ความเข้มข้นเอสตราไดออล = Y "

ความเข้มข้นของเอสตราไดออล A+B พิโคกรัม วัดได้ = Y "

ความเข้มข้นของเอสตราไดออล 100 พิโคกรัม วัดได้ = $\frac{Y}{A+B} \times 100$ "

∴ ความถูกต้องของวิธีทดลอง = $\frac{Y}{A+B} \times 100$ "