บทที่ 2

สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการทดลอง

สารเคมี

absolute ethanol	:	E. Merck, Germany
charcoal reagent	:	batch no. k.220520 WHO RIA reagent programme, Switzerland
dextran reagent	:	batch no. 82/83/S WHO RIA reagent programme, Switzerland
diethyl ether	:	E. Merck, Germany
dioxane	:	E. Merck, Germany
disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	:	E. Merck, Germany
estradiol valerate	:	Sigma chemical company, U.S.A.
gelatin	:	Difco laboratories, U.S.A.
methanol (CH_3OH)	:	E. Merck, Germany
olive oil	:	Sigma chemical company, U.S.A.
POPOP (1,4 - bis[5-phenyl-2 oxazole] benzene; 2,2-P-phenylene-bis[5-Phenyloxazole]	:	Sigma chemical company, U.S.A.
PPO (2,5-Diphenylloxazole)	:	Sigma chemical company, U.S.A.
sodium chloride	:	E. Merck, Germany
sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	:	E. Merck, Germany
thiomersol (merthiolate)	:	Sigma chemical company, U.S.A.
toluene	:	E. Merck, Germany

ฮอร์โมนมาตราฐาน

estradiol standard	:	WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอนติซีรัม

estradiol antisera	:	WHO RIA reagent programme, Switzerland
prolactin double antibody with human serum	:	Diagnostic productions corporation, U.S.A.

สารติดสลากรังสี

estradiol tracer	:	Amersham international, Plc, England.
gamma coat (^{125} I) prolactin	:	Diagnostic productions corporation, U.S.A.

อุปกรณ์

beta counter	:	model 1218 Rack Beta LKB Wallac, Finland
dri - block heater	:	model DB - 3, Tecam laboratory and Industrial equipment, U.S.A.
dunoff incubator shaker	:	model 3575 - 1, Lab-line Instrument Inc., U.S.A.
dynac centrifuge	:	Clay Adams, Becton Dickinson company,U.S.A.
foam decanting rack	:	Diagnostic productions corporation, U.S.A.
gamma counter	:	LKB multigamma counter model 1260 multi gammaII LKB Wallac, Finland
larminar flow		
magnetic stirrer	:	model S-18520, Thermolyne corporation Iowa, U.S.A.
micropipett	:	Nichiryo model 5000, 8100, Japan Eppendorf 3130, Germany
needle 23G x 1 $^1/_2$" , 22G x 1 $^1/_2$"	:	Terumo corporation, Japan
pH meter	:	Model 5985 Cole-Parmer instrument equipment, U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

refigerated centrifuge	:	model PR-J, International equipment company,U.S.A.
repipet dispenser	:	Lab industries Berkeley
sonicater	:	model D-7700, West Germany
syringe 1 ml., 5 ml.	:	Terumo corporation, Japan
vortex	:	model G-506E, Scientific industries

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นลิงแสม (Macaca fascicularis) ที่เลี้ยงอยู่ในหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลิงแต่ละตัวถูกเลี้ยงในกรงเดี่ยวทำด้วยเหล็กอาบกันสนิมขนาดกว้าง 24 นิ้ว สูง 34 นิ้ว และลึก 28 นิ้ว เรือนเลี้ยงลิงกรุด้วยตาข่ายและมุ้งลวด พัดลมระบายอากาศช่วยทำให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก รวมทั้งควบคุมปริมาณแสงที่ได้รับในแต่ละวัน โดยนอกจากแสงจากธรรมชาติภายในเรือนเลี้ยงจะมีหลอดไฟให้ความสว่างตั้งแต่เวลา 6.00 - 18.00 น. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ควบคุมการปิดเปิดไฟโดยนาฬิกาตั้งเวลาอัตโนมัติ อาหารที่นำมาใช้เลี้ยงลิงเป็นอาหารสำเร็จรูปของบริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ เสริมด้วย ถั่วฝักยาว มันเทศ กล้วย และแตงกวา การให้อาหารจะให้วันละ 2 ครั้ง เวลา 8.00 - 9.00 น. และ 14.00 - 15.00 น. แบ่งกลุ่มลิงที่ใช้ทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม

1. การทดลองเพื่อศึกษาระดับแคลเซียมในซีรัมของลิงแสมปกติ การคัดเลือกลิงแสมเพศผู้ และเพศเมียในช่วงวัยต่างๆ ที่เลี้ยงอยู่ในหน่วยวิจัยไพรเมท (captive monkey) แบ่งออกเป็นกลุ่มๆตามอายุและเพศ ดังตารางที่ 2.1

2. การทดลองเพื่อศึกษาผลของอีสตราดิออลวาเลอเรท ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนอีสตราดิออล โปรแลกติน และแคลเซียมในซีรัมในลิง 2 กลุ่ม ดังตารางที่ 2.2 คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มลิงแสมเพศเมียสูงอายุที่ยังคงมีรังไข่จำนวน 7 ตัว จากการตรวจดูรอบประจำเดือนในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - ตุลาคม พ.ศ. 2538 พบว่าไม่ปรากฏรอบประจำเดือนในช่วงเวลาดังกล่าว

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มลิงแสมเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง จำนวน 5 ตัว

ตารางที่ 2.1 แสดงการจัดแบ่งกลุ่มอายุลิงแสมที่ใช้ในการศึกษาระดับแคลเซียมพื้นฐาน

กลุ่มลิงแสม	เพศเมีย	เพศผู้
ลิงวัยเด็ก (immature)	2	---------
ลิงวัยรุ่น (puberty)	3-5	3-5
ลิงวัยเจริญพันธุ์ (adult)	6-10	6-10
	11-15	11-15
ลิงสูงอายุ (aged)	>18	>20

ตารางที่ 2.2 แสดงประวัติลิงแสมเพศเมียที่ใช้ในการศึกษาผลของอีสตราดิออลวาเลอเรท

กลุ่มลิงที่นำมาใช้ในการศึกษา	หมายเลขของลิง (วันที่ถูกตัดรังไข่)	แหล่งกำเนิด	อายุขณะที่ทำการศึกษา (พ.ศ.2538)	น้ำหนัก (กิโลกรัม)
1. กลุ่มลิงแสมเพศเมียสูงอายุที่ยังคงมีรังไข่	25	แม่สอด	25 ปี	4.0
	42	สมุทรสงคราม	18 ปี	4.5
	51	สมุทรสงคราม	22 ปี	3.5
	70	สมุทรสงคราม	18 ปี	7.0
	72	สมุทรสงคราม	22 ปี	4.5
	91	สมุทรสงคราม	20 ปี	4.5
	100	สมุทรสงคราม	19 ปี	3.5
2. กลุ่มลิงแสมเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่	5 (11/06/29)	ภาคใต้	25 ปี	3.5
	6 (6/06/29)	นครศรีธรรมราช	25 ปี	3.5
	14 (20/01/28)	นครศรีธรรมราช	25 ปี	3.0
	31 (23/05/29)	ภาคใต้	25 ปี	4.0
	33 (25/05/33)	ติดท้องแม่มาจากแม่สอด	20 ปี	3.0

<u>วิธีการดำเนินการทดลอง</u>

การเตรียมอีสตราดิออลวาเลอเรท สำหรับฉีดให้ลิงทดลอง

อีสตราดิออลวาเลอเรทในรูปก่อนเตรียมนั้นจะอยู่ในรูปผงสีขาว ไม่สามารถนำมาฉีดให้กับลิงได้ทันที ดังนั้นก่อนนำมาใช้ให้นำอีสตราดิออลวาเลอเรท คำนวณตามปริมาณที่ใช้ชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียดให้ได้ปริมาณที่แน่นอน นำมาละลายด้วย absolute alcohol ในปริมาณเล็ก

น้อยพอให้ละลายในตัวถูกละลายได้หมด ผสมกับน้ำมันมะกอกด้วยปริมาตรที่แน่นอน หลังจากเตรียมเสร็จสารละลายอีสตราดิออล จะมีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/0.5 มิลลิลิตร นำมาบรรจุในขวดสีชา เขียนวันที่เตรียม ชนิดของสารไว้ที่ข้างขวดให้เรียบร้อย การเตรียมสารจะต้องเตรียมใน laminar flow รวมทั้งภาชนะที่ใช้จะต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วย sterile technics

การฉีดยา

นำสารละลายอีสตราดิออลวาเลอเรท ฉีดให้กับลิงทุกตัวทางกล้ามเนื้อตามขนาด และตามวันที่กำหนดของแต่ละการทดลอง

การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเก็บเลือดลิงแต่ละตัว ประมาณ 4 - 5 มิลลิลิตร/ครั้ง ทางหลอดเลือดหน้าขา (femoral venipuncture) ช่วงเวลา 7.00 - 10.00 น. นำเลือดที่เจาะเสร็จแล้วไปปั่นด้วยอัตราเร็ว 2800 รอบ/นาที นานประมาณ 30 นาทีแล้วแยกเก็บซีรัมทันที ซีรัมที่ได้แยกเก็บใน tube แก้วสำหรับตรวจวัดระดับแคลเซียม และเก็บใน tube พลาสติก(microfuge tube) สำหรับตรวจวัดฮอร์โมน ขณะที่ยังไม่ได้นำไปตรวจวัดเก็บซีรัมไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

แผนการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. การทดลองเพื่อศึกษาระดับแคลเซียมในซีรัมของลิงแสมเพศผู้และเพศเมีย ตามกลุ่มอายุ ทำการเจาะเลือดเก็บซีรัมในช่วงเช้า

2. การทดลองเพื่อศึกษาผลของอีสตราดิออลวาเลอเรท ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนอีสตราดิออล โปรแลกติน และแคลเซียมในซีรัม

2.1 กลุ่มลิงแสมเพศเมียสูงอายุที่ยังคงมีรังไข่ เจาะเก็บตัวอย่างเลือดเป็นช่วงๆ ก่อนและหลังได้รับอีสตราดิออลวาเลอเรท ขนาด 10 มิลลิกรัมที่ D0 และ D30 ติดตามผลถึง D60

2.2 กลุ่มลิงแสมเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ เจาะเก็บตัวอย่างเลือดเป็นช่วงๆ ก่อน และหลังได้รับอีสตราดิออลวาเลอเรท ขนาด 20 มิลลิกรัมที่ D0 หลังจากเจาะเลือดเสร็จแล้ว ติดตามผลถึง D60

เนื่องจากต้องการดูผลของอีสตราดิออลวาเลอเรท ระยะยาวกว่าที่ D60 จึงได้เพิ่มการทดลองอีก 2 กลุ่ม โดยทำการศึกษาถึง D90 และเนื่องจากต้องการตรวจสอบผลการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนอีสตราดิออล โปรแลกติน และแคลเซียมต่ออีสตราดิออลวาเลอเรทที่ให้ในกลุ่ม 2.1 และ 2.2 จึงทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดในช่วงก่อนการทดลองที่ D-10, D-5, D0

2.3 ลิงกลุ่มเดียวกับในข้อ 2.1 หลังพัก 60 วัน ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด ก่อนและหลังได้รับอีสตราดิออลวาเลอเรท ขนาด 20 มิลลิกรัมที่ D0 หลังจากเจาะเลือดเสร็จแล้ว ติดตามผลถึง D90

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 ลิงกลุ่มเดียวกับในข้อ 2.2 หลังพัก 60 วัน ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดก่อนและหลังได้รับอีสตราดิออลวาเลอเรท ขนาด 10 มิลลิกรัม ที่ D0 และ D30 ตามลำดับ หลังจากเจาะเลือดเสร็จ ติดตามผลถึง D90

วันที่เจาะเก็บตัวอย่างเลือด

1. ทำการเจาะเลือดเก็บซีรัมก่อนได้รับอีสตราดิออลวาเลอเรท ที่ D-20, D-15, D-10, D-5, D0 หลังจากนั้นให้อีสตราดิออลวาเลอเรท ขนาด 10 มิลลิกรัมในกลุ่มลิงแสมเพศเมียสูงอายุที่ยังคงมีรังไข่ ที่ D0, D30 และ 20 มิลลิกรัมในกลุ่มลิงแสมเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ที่ D0 แล้วเก็บซีรัม ที่ D1, D5, D10, D15, D20, D30, D31, D40, D60

2. หลังจากนั้นอีก 60 วัน ทำการเจาะเลือดแล้วเก็บซีรัม ที่ D-10, D-5, D0 หลังจากนั้นให้อีสตราดิออลวาเลอเรท ขนาด 20 มิลลิกรัม ในกลุ่มลิงแสมเพศเมียสูงอายุที่ยังคงมีรังไข่ที่ D0 และ 10 มิลลิกรัม ในกลุ่มลิงแสมเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ที่ D0, D30 เก็บซีรัมที่ D1, D5, D10, D15, D20, D30, D31, D40, D60, D70, D80, D90

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนอีสตราดิออลด้วยวิธี RIA</u>

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนอีสตราดิออลก่อนการทดลอง

1. **สารละลายบัฟเฟอร์** สารเคมีที่ใช้เตรียม มีดังนี้

disodium hydrogen phosphate (anhydrous)	11.6	กรัม
gelatin	1	กรัม
sodium chloride	8.8	กรัม
sodium dihydrogen phosphate (anhydrous)	2.35	กรัม
thiomersal	0.1	กรัม

ละลาย gelatin ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส กวนด้วย magnetic stirrer ตลอดเวลาจนกระทั่งละลายเข้ากันดี หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ค่อยเติมสารที่เหลือลงไปทีละอย่าง เมื่อสารทุกชนิดละลายเข้ากันดี เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้สารละลายบัฟเฟอร์อยู่ในช่วง pH 7.2 - 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อายุการใช้งานนาน 1 เดือน

2. **charcoal suspension** สารเคมีที่ใช้เตรียม มีดังนี้

buffer solution	100	มิลลิลิตร
charcoal reagent	0.625	กรัม
dextran reagent	0.0625	กรัม

ละลาย dextran ใน buffer solution จากนั้นเติม charcoal reagent เขย่าอย่างแรง นานประมาณ 30 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อายุการใช้งานนาน 1 เดือน

3. **scintillation fluid dioxane** สารเคมีที่ใช้เตรียม มีดังนี้

dioxane	200	มิลลิลิตร
POPOP	0.35	กรัม
PPO	5.5	กรัม
toluene	1000	มิลลิลิตร

นำสารเคมีทั้งหมดผสมกัน กวนด้วย magnetic stirrer ให้ละลายเข้ากันดีทิ้งไว้อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้ สารละลายที่เตรียมเสร็จแล้วให้เก็บไว้ในขวดสีชา

4. **estradiol working tracer**

estradiol tracer ซึ่งละลายอยู่ใน toluene : ethanol ในอัตราส่วน 9 : 1 เป็น stock solution tracer ปิเปตมา 100 ไมโครลิตรใส่ flask แล้วนำไปเป่าให้แห้งด้วย air compressor แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แบ่งไป count ด้วยเครื่อง gamma counter ให้ค่า total count อยู่ในช่วง 8000 - 10000 cpm

5. **estradiol antiserum**

estradiol antiserum อยู่ในรูป lypophilized form เติม buffer solution 10 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆให้ละลายเข้ากันดี เมื่อยังไม่นำมาใช้ให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. **estradiol standard**

ปิเปต estradiol standard 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 150 นาโนโมล/ลิตร แล้วเติม buffer solution 10 มิลลิลิตร นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 นาที จะได้สารละลายอีสตราดิออลที่ความเข้มข้น 1.5 นาโนโมล/ลิตร หลังจากนั้นนำสารละลาย (Stock solution) มาทำการเจือจางแบบอนุกรม(serial dilution) (ตารางที่ 2.3)

การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนอีสตราดิออล มีขั้นตอนดังนี้

การวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราดิออลในซีรัมตัวอย่าง ต้องใช้อีเทอร์มาเป็นตัวสกัดอีสตราดิออลออกจากซีรัมขั้นตอนการทำมีดังนี้

1. ปิเปตซีรัมตัวอย่าง 500 ไมโครลิตรลงใน conical tube ตัวอย่างละ 2 หลอด (duplicate test)

อีสตราดิออลมาตราฐานหลังจากทำการเจือจางแบบอนุกรมเสร็จแล้วทำการปิเปตออกมาอย่างละ 500 ไมโครลิตรลงใน assay tube อย่างละ 3 หลอด(tripicate test) เตรียมไว้สำหรับขั้นตอนที่ 4 เลยจึงไม่ต้องผ่านขบวนการสกัด

2. เติมอีเทอร์หลอดละ 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดซีรัมตัวอย่าง นำไปปั่นด้วย vortex นาน 1 นาที จากนั้นนำไปแยกชั้นโดยใช้ความเย็นของน้ำแข็งแห้งส่วนที่เป็นซีรัมจะแข็งตัวอยู่ชั้นล่าง และส่วนบนจะเป็นส่วนที่ฮอร์โมนถูกสกัดออกมารวมอยู่กับชั้นของอีเทอร์ให้เทส่วนบนออก และเก็บส่วนนี้ไว้ใน assay tube นำไป dryให้แห้งใน dri block heaterที่อุณหภูมิประมาณ 35 - 40 องศาเซลเซียสจนกระทั่งแห้ง นำไปทำการสกัดซ้ำอีกครั้งจะได้ฮอร์โมนที่อยู่ในซีรัมเกือบทั้งหมดในหลอดทดลองที่เป็น assay tube

3. นำ assay tube ไปเติมสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วปั่นด้วย vortex ทิ้งไว้ 30 นาทีและปั่น ซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติม estradiol antisera, estradiol tracer ตามตารางที่ 2.4 ปั่นด้วย vortex เสร็จ แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในตู้เย็น นาน 18-20 ชั่วโมง

4. นำ assay tube ออกมา วางในถาดใส่น้ำแข็ง เติมด้วย charcoal suspension ปั่นด้วย vortex ซึ่ง charcoal จะเป็นตัวแยกชั้นฮอร์โมนในรูป free form ออกจาก bound form

5. ทำการแยก bound form โดยใช้ refrigerated centrifugeที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. เทชั้น supernatant ลงใน counting vial เติม scintillation fluid 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นให้เข้ากันด้วย vortex นำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่องเบต้า นานประมาณ 1 นาที ต่อ 1 vial

ตารางที่ 2.3 แสดงการทำการเจือจางแบบอนุกรม (serial dilution)

ลำดับที่	ลำดับความเข้มข้น	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	สารละลายบัฟเฟอร์	ความเข้มข้นที่ได้ (เฟมโตโมล/0.5 มิลลิลิตร)
1	stock solution	0.5	-	750
2	ลำดับที่ 1	2.0	2.0	375
3	2	2.0	2.0	187.5
4	3	2.0	2.0	93.75
5	4	2.0	2.0	46.87
6	5	2.0	2.0	23.44
7	6	2.0	2.0	11.72

ตารางที่ 2.4 แสดงปริมาณสารที่ต้องเติมลงในหลอดทดลอง

หลอดทดลอง	สารละลายบัฟเฟอร์ (ไมโครลิตร)	tracer (ไมโครลิตร)	antisera (ไมโครลิตร)	incubate 18-20ช.ม.	charcoal (ไมโครลิตร)
total count	800	100	-		-
non specific binding	600	100	-		200
maximum binding	500	100	100		200
estradiol standard	500	100	100		200
สารตัวอย่าง	500	100	100		200

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนโปรแลกตินด้วยวิธี RIA</u>

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนก่อนการทดลอง

1. **prolactin antiserum และ prolactin tracer**

เติมน้ำกลั่นลงไปในขวด prolactin antiserum และ prolactin tracer อย่างละ 10 มิลลิลิตรเขย่าเบาๆให้เข้ากันดี ภายหลังจากเตรียมเสร็จให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส

2. **prolactin calibrators**

เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ลงใน calibrator A และเติมน้ำกลั่น 3.0 มิลลิลิตรลงใน calibrators B - G

3. **precipitating solution**

สารละลายจะเตรียมสำเร็จรูปมาจากบริษัทที่ทำการผลิต เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ให้เขย่าสารละลายให้ละลายเข้ากันดี

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรแลกตินในซีรัม ด้วยวิธี RIA มีขั้นตอนดังนี้

1. ติดฉลากบนหลอดทดลอง(polystylene tube)เป็นเครื่องหมายต่างๆ ดังนี้ TC (total count), NSB (non specific binding), A (maximum binding) และ B ถึง G และหมายเลขของหลอดตัวอย่างและหลอดควบคุมอย่างละ 2 หลอด(duplicate test)

2. ปิเปต calibrators A 100 ไมโครลิตรลงในหลอด A และ NSB ปิเปต calibrators B ถึง G 100 ไมโครลิตรลงในหลอด B ถึง G ตามลำดับ จากนั้นปิเปตซีรัมตัวอย่างและซีรัมที่ใช้เป็นตัวควบคุม(pool serum) 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง อย่างละ 2 หลอด

3. เติม (^{125}I) prolactin 50 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่าเบาๆ และเติม prolactin antisreum 50 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองทุกหลอดยกเว้นหลอด TC, NSB ปั่นให้เข้ากันดีด้วย vortex

4. นำไป incubate 3 ชั่วโมง(อาจได้นานถึง 4 ชั่วโมง)ที่อุณหภูมิห้อง

5. จากนั้นเติม precipitating solution 500 ไมโครลิตรลงในหลอดทุกหลอด ยกเว้นหลอด TC แล้วปั่นด้วย vortex และ refrigerated centrifuge ความเร็ว 2600 รอบ 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ฮอร์โมนที่ได้จะตกตะกอนอยู่บริเวณก้นหลอดทดลอง จากนั้นเทชั้น supernatant ทิ้ง

6. นำไปวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมา นานหลอดละ 1 นาที

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธี RIA ควรจะต้องมีการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ(precision) และความถูกต้อง(accuracy) และความไวในการวิเคราะห์(sensitivity) เพื่อตรวจสอบความเชื่อถือได้ของการวิเคราะห์นั้น

ความจำเพาะ หมายถึงความสามารถของแอนติซีรัมที่สามารถทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ รวมทั้งฮอร์โมนหรือสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์เปอร์เซนต์ การหาความจำเพาะของแอนติซีรัมทำได้โดยใช้แอนติซีรัมนำมาทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์พร้อมกับฮอร์โมนอื่นๆที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ ต้องการวิเคราะห์ แล้วหาความจำเพาะของแอนติซีรัมคิดเป็น % cross reaction ถ้าแอนติซีรัมที่ใช้มีความจำเพาะต่อฮอร์โมนสูงก็จะทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนนั้นได้ถึง 100%

% cross reaction =

$$\frac{\text{ปริมาณสารมาตราฐานของสารที่จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัม 50\%}}{\text{ปริมาณสารมาตราฐานที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ 5\%}} \times 100$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.5 แสดงความจำเพาะของแอนติซีรัมต่ออีสตราดิออล และฮอร์โมนหรือสารอื่นที่นำมาตรวจสอบโดยองค์การอนามัยโลก (Sufi et al., 1986)

ฮอร์โมน	% cross reaction
estradiol	100
estriol	0.8
estrone	0.02
cortisol	0.02
progesterone	0.02
testosterone	0.02

ตารางที่ 2.6 แสดงความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อโปรแลกตินที่ศึกษา และฮอร์โมนหรือสารอื่นที่นำมาตรวจสอบโดย Diagnostic Products Corporation

ฮอร์โมน	% cross reaction
prolactin	100
HCG	*
FSH	*
LH	*
TSH	*
HCG	*
HPL	*

* ไม่สามารถตรวจวัดได้ เนื่องจากสารแอนติซีรัมสามารถทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนหรือสารเหล่านี้ได้น้อยมาก

ความแม่นยำ หมายถึงการตรวจสอบความสามารถในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนในการวัดแต่ละครั้ง โดยทำการตรวจสอบทั้งภายในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน (inter assay) และในการวัดแต่ละครั้ง(intra assay) แล้วนำมาคำนวณหา co-efficient of variance (%CV)

$$\%CV = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของสาร(SD)}}{\text{มัชฌิมเลขคณิต } (\bar{X})} \times 100$$

ตารางที่ 2.7 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัดฮอร์โมนอีสตราดิออล และโปรแลกติน

ฮอร์โมน	ความแม่นยำในการตรวจวัดภายในครั้งเดียวกัน	ความแม่นยำในระหว่างการตรวจวัดแต่ละครั้ง
estradiol	8.13	10.99
prolactin	6.11	8.62

ความถูกต้อง หมายถึงความสามารถในการวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนจากสารตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด โดยใช้สารมาตราฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนเติมลงในสารตัวอย่างที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนที่แน่นอน ทำการตรวจวัดพร้อมกับสารตัวอย่าง เปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นที่ได้กับปริมาณความเข้มข้นที่แท้จริง แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซนต์ความถูกต้อง ดังนี้

$$\text{เปอร์เซนต์ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนจริง}} \times 100$$

ตารางที่ 2.8 แสดงค่าความถูกต้องในการตรวจวัดอีสตราดิออล และโปรแลกติน

ฮอร์โมน	เปอร์เซนต์ความถูกต้อง
estradiol	93.99
prolactin	95.52

ประสิทธิภาพในการสกัด(recovery of extraction) ในการตรวจวัดอีสตราดิออลซึ่งเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนต้องผ่านขบวนการสกัดด้วยอีเทอร์ ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบความสามารถในการทำการสกัดทุกครั้ง ประสิทธิภาพในการสกัดอีสตราดิออล เท่ากับ 92.61 %

ความไวของการวิเคราะห์ หมายถึงค่าที่น้อยที่สุดของฮอร์โมนที่สามารถทำการตรวจวัดได้ด้วยวิธี RIA ทำได้โดยนำใช้ซีรัมที่ผ่านกระบวนการกรองเอาฮอร์โมนออกแล้ว มาทำการตรวจวัด จากนั้นนำมาหาความเข้มข้นที่ระดับเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยว 95 % ที่กราฟมาตราฐาน semi logarithm

ตารางที่ 2.9 แสดงความไวของการวิเคราะห์อีสตราดิออล โปรแลกติน

ฮอร์โมน	ความไวในการตรวจวัด
estradiol	5.17 pg/ml
prolactin	10.00 mIU/L

การวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียม

ได้ส่งซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือดตามแผนการทดลอง ส่งไปทำการตรวจวัดหาปริมาณแคลเซียมที่คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถิติที่ใช้ทดสอบ

student t-test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย