บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การผสมพันธุ์

กำหนดโดยการนับวันในรอบประจำเดือนก่อนวันผสมประมาณ 7 วัน นำกรงลิงเพศเมียมาตั้งไว้ใกล้ ๆ กรงของลิงพ่อพันธุ์ เพื่อให้ลิงที่จะผสมพันธุ์นั้นคุ้นเคยกันเสียก่อน เมื่อถึงวันที่0.45(Dukelow and Bruggeman, 1979) ของรอบประจำเดือนแล้วจับลิงเพศเมียใส่ในกรงของลิงพ่อพันธุ์ และคอยดูว่ามีการผสมพันธุ์หรือไม่ ต่อจากนั้นตรวจดูสเปิร์มในช่องคลอดของลิงเพศเมีย และเมื่อพบสเปิร์มก็นับวันนั้นเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ (P_1)

2. การเก็บปัสสาวะ

เปลี่ยนถาดที่รองรับเศษอาหารเวลาประมาณ 17.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่ลิงกินอาหารเรียบร้อยแล้ว และเก็บปัสสาวะในตอนเช้าเวลาประมาณ 7.00 - 8.00 น. ซึ่งเป็นเวลาก่อนให้อาหารลิงในตอนเช้า นำปัสสาวะที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วเก็บส่วนใสของปัสสาวะไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์หาฮอร์โมน สำหรับปัสสาวะที่จะนำไปตรวจหา mCG ต้องนำมากรองอีกครั้งหนึ่งด้วยกระดาษกรองละเอียดเบอร์ 5 แล้วจึงนำส่วนที่ได้จากการกรองไปตรวจหา mCG อีกทีหนึ่ง ปัสสาวะที่นำไปตรวจหา mCG ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส จึงจะได้ผลดี

3. สารละลายที่ใช้และวิธีการเตรียม

3.1 ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาไลน์ (Phosphate-buffer saline, PBS)

สารละลาย ก. โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยใช้โซเดียมฟอสเฟต 69.005 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

สารละลาย ข. โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยใช้โซเดียมฟอสเฟต 26.81 กรัม แล้วเติมด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน

สารละลาย ค. โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.05 โมลาร์ เตรียมโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 61.425 กรัม เติมด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร เมอธิโอเลต 0.75 กรัม แล้วผสมให้เข้ากัน

ต่อจากนั้นนำสารละลาย ก. 6.66 มิลลิลิตร สารละลาย ข. 66.67 มิลลิลิตร และสารละลาย ค 133.3 มิลลิลิตร มาผสมให้เข้ากัน แล้วเติมด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร เติมด้วยเจลาติน 0.1 เปอร์เซนต์ ผสมให้เข้ากันนาน 1 ชั่วโมง ในที่สุดจะได้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.14 โมลาร์ เมอธิโอเลต 0.01 เปอร์เซนต์ ฟอสเฟต 0.01 โมลาร์ และมี pH 7.4 ตามต้องการ นำสารละลายนี้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3.2 สารละลายแขวนลอยถ่าน (Chacoal suspension)

เตรียมโดยใช้ norit A 0.625 กรัม dextran T.60 0.0625 กรัม และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมในแต่ละครั้งสามารถเก็บไว้ได้นาน 1 เดือน

3.3 สารละลายก่อประกายแสง (Scintillation solution)

เตรียมโดยใช้ POPOP (1, 4-bis-214 Methyl 1-5 Phenyloxazolyl-Benzole) 0.3 กรัม PPO (2,5-Diphenyloxazole) 7 กรัม และ napthalene 100 กรัม ละลายใน dioxane 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

3.4 สารละลายอิลโตรนติดฉลากสารภูมิต้านทานต่อฮอร์โมนไทรอยด์เตรียม

เตรียมโดยใช้อิลโตรนติดฉลากภูมิต้านทานต่อฮอร์โมนไทรอยด์เตรียมที่มีความแรง 250 ไมโครคูรี ในตัวทำละลาย (เบนซีน 9 ส่วน เอทานอล 1 ส่วน) 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดฝาเกลียว ขนาด 5 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายลงในขวดให้มีปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ ซึ่งมีความแรง 1 ไมโครคูรี (20 มิลลิลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร) ใส่ลงในขวด ขนาด 20 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง สารละลายที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร จะมีความแรง 10,000 cpm ต้องเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงไปอีกให้มีความแรงเป็น 6,000 cpm ต่อ 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าความแรงที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ สารละลายอิลโตรนติดฉลากภูมิต้านทานต่อฮอร์โมนไทรอยด์ที่เตรียมได้นี้เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถเก็บไว้ได้นาน 1 เดือน

3.5 สารละลายแอนติซีรัมของอิลโตรน

เตรียมได้โดยใช้อิลโตรนแอนติซีรัม K4/3676 10 ไมโครลิตร และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 125 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในที่สุดจะได้อิลโตรนแอนติซีรัมที่เจือจางลงในอัตราส่วน 1 : 12500 นำสารละลายที่เตรียมได้นี้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 2 เดือน

3.6 สารละลายอีสโตรนมาตรฐาน

สารละลาย I เตรียมโดยใช้อีสโตรน 10 กรัม และเมทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีปริมาณอีสโตรน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมทานอลบริสุทธิ์

สารละลาย II เตรียมโดยใช้สารละลาย I 10 มิลลิลิตร และเมทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีอีสโตรน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมทานอลบริสุทธิ์ บรรจุใส่ขวดแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ถึง -40 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 ปี

การเตรียมอีสโตรนมาตรฐานให้มีปริมาณตั้งแต่ 0 - 1000 พิโคกรัม ต่อ 0.25 มิลลิลิตร มีวิธีการดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 วิธีการเตรียมสารละลายอีสโตรนมาตรฐานจากสารละลาย II ที่มีปริมาณอีสโตรน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมทานอลบริสุทธิ์

สารละลายที่ต้องการ	สารละลายที่ใช้ผสม		ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้ผสม (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารละลายที่ต้องการ (พิโคกรัมต่อ 0.25 มิลลิลิตร)
	ชื่อสารละลาย	ปริมาณ (มิลลิลิตร)		
A	II	0.004	10	1000
B	A	5	5	500
C	B	5	5	250
D	C	4	6	100
E	D	5	5	50
F	E	5	5	25
G	F	4	6	10
H	G	5	5	5
I	H	5	5	2.5
I_1	I	5	5	1.25
I_2	I_1	5	5	0.625
J	I_2	0	5	0

3.7 ตัวอย่างที่ใช้ควบคุมมาตราฐานการวิเคราะห์หาปริมาณอิสโตรนในปัสสาวะ

ตัวอย่างที่ 1 ใช้ปัสสาวะของสิงเพศเมียที่ไม่ตั้งครรภ์หลาย ๆ ตัวมารวมกัน

ตัวอย่างที่ 2 ใช้ปัสสาวะของสิงเพศเมียที่ตั้งครรภ์ตั้งแต่ 100 - 120 วัน หลายๆ ตัวมารวมกัน

3.8 สารละลายมาตราฐานของครีเอตินิน

เตรียมโดยละลายครีเอตินินจำนวน 13.2 มิลลิกรัม ในกรดเกลือ 0.1 N แล้วเจือจางให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. <u>การตรวจหา mCG</u>

การตรวจหา mCG ใช้วิธี ฮีมแอกกลูติเนชัน อินฮิบิชัน แอสเสย์ (Hemagglutination Inhibition Assay : HIA) ตามวิธีของ Wide และ Gemzell (1960) และของ Mishell et al (1963) แล้วดัดแปลงเพื่อให้เกิดความเหมาะสม ตามวิธีของ Theppisai, et al, (1971) ซึ่งมีหลักการดังนี้ เมื่อเอาเม็ดเลือดแดงแกะมา coat ด้วย hCG แล้วเอามาทำปฏิกิริยากับ hCG-antiserum จะเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแกะนั้นซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า แอกกลูติเนชัน (agglutination) และจะเห็นภาพการทดลองจริง ๆ เป็นลักษณะก้อน ๆ สีน้ำเล่มอกระจายอยู่เรียกว่า Mat. ถ้านำเอา hCG มาทำปฏิกิริยากับ hCG-antiserum ก่อน hCG-antiserum จะถูกทำให้หมดประสิทธิภาพ (inactived) ด้วย hCG หมด เลยทำให้ hCG-antiserum นั้นหมดฤทธิ์ที่จะไปทำปฏิกิริยากับ hCG ที่ถูก coat อยู่บนเม็ดเลือดแดงแกะ เมื่อทำเช่นนี้เม็ดเลือดแดงแกะที่ถูก coat ด้วย hCG ก็จะไม่จับกลุ่มกัน (no agglutination) เมื่อเม็ดเลือดแดงนั้นถูกตั้งไว้ 2-3 ชั่วโมง ก็จะตกตะกอนเป็นรูปวงแหวน ซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า ring

active
ปัสสาวะไม่มี hCG + hCG-antiserum
↓
active hCG-antiserum
+ เม็ดเลือดแดงแกะที่ coat ด้วย hCG
↓
agglutination
↓
mat (ไม่ท้อง)

<u>หลักการของปฏิกิริยา agglutination</u>

active
ปัสสาวะมี hCG + hCG-antiserum
↓
inactivated hCG-antiserum
+ เม็ดเลือดแดงแกะที่ coat ด้วย hCG
↓
no agglutination
↓
ring (ท้อง)

<u>หลักการของปฏิกิริยา agglutination inhibition</u>

วิธีการตรวจหา mCG

1. บรรจุฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาไลน์ (PBS) pH 6.4 หลุมละ 0.40 มิลลิลิตร ลงใน plastic tray 2 แถว โดยใช้ cornwall automatic syringe

2. ใส่ปัสสาวะที่กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 0.40 มิลลิลิตร ลงในหลุมแถวบนและหลุมแถวล่าง โดยปัสสาวะแต่ละวันอยู่ในหลุมแต่ละคู่เรียงตามลำดับจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายผสมปัสสาวะและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในแต่ละหลุมให้เข้ากัน แล้วดูดทิ้ง 0.40 มิลลิลิตร ทุกหลุม

3. หยด hCG - antiserum ที่มีความเข้มข้น 1 : 150 ลงในหลุมแถวบนทุกหลุม สำหรับหลุมแถวล่างไม่ใส่ hCG - antiserum เนื่องจากเป็นหลุมควบคุม

4. หยดเม็ดเลือดแดงแกะที่ coat ด้วย hCG หลุมละ 1 หยด ทุกหลุม ทั้งแถวบนและแถวล่าง

5. เขย่า plastic tray เบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 ชั่วโมง ต่อจากนั้นอ่านผล

5. <u>การวิเคราะห์หาระดับ E_1 ทั้งหมดในปัสสาวะ</u>

การวิเคราะห์หาระดับ E_1 ทั้งหมดในปัสสาวะใช้วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ตามวิธีการของ Kamonpatana et al (1981)

1. การเจือจางปัสสาวะ

ปัสสาวะของสิ่งที่จะนำมาหาระดับฮอร์โมนต้องนำมาทำให้เจือจางเสียก่อน โดยใช้เครื่องมือ automatic dilution pipette โดยดูดปัสสาวะ 0.02 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.90 มิลลิลิตร (1 : 46) แล้วใช้เครื่องเขย่าผสมให้เข้ากัน

2. ซัยโตรลับซีล

ใช้พิพเปตดูดปัสสาวะที่เจือจางแล้ว 0.02 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร อย่างละ 2 หลอดแล้วเติมกรดเกลือความเข้มข้น 6 เปอร์เซนต์ 0.12 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือดนาน 1 ชั่วโมง เพื่อหา E_1 ทั้งหมด

3. การสกัด

ใช้ปิเปตเตอร์เติมไดเอธิลอีเธอร์ 3 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องนาน 1 นาที แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที รินส่วนใสใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยอ้อมแห้งสุญญากาศ

4. เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ของอิสโตรน

นำส่วนแห้งที่เหลือมาละลายด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาไลน์ 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตเติมแล้วเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ใช้ Hamilton syringe dispensor เติมสารละลายอิสโตรนแอนติซีรัม ความเข้มข้น 1 : 12500 จำนวน 0.10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นใช้ Hamilton syringe dispensor เติมสารละลายอิสโตรนติดสลากที่มีความแรง 6,000 cpm 0.10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 - 18 ชั่วโมง

ต่อจากนั้นใช้ Hamilton syringe dispensor เติมสารละลายแยวนลอยถ่าน 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที รินส่วนใสใส่ขวดฝาเกลียว ขนาด 6 มิลลิลิตร แล้วใช้ปิเปต เติมสารละลายก่อประกายแสง 3 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้สนิท นำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่องวัดรังสีเบตา

วิเคราะห์ blanks โดยนำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด มาทำการวิเคราะห์ตามวิธีการตั้งแต่ขั้นเลือกจางปัสสาวะ

การควบคุมมาตรฐานการวิเคราะห์อิสโตรนในปัสสาวะ ทำได้โดยการนำปัสสาวะรวมของสิ่งที่ท้องและไม่ท้องอย่างละ 10 หลอด มาทำการวิเคราะห์ตั้งแต่ขั้นเลือกจางปัสสาวะ

กราฟมาตรฐานของอิสโตรน ทำโดยนำอิสโตรนมาตรฐานที่มีปริมาณตั้งแต่ 0 0.625 1.25 25 5 10 25 50 100 250 500 และ 1000 พิโคกรัม ต่อ 0.25 มิลลิลิตรอย่างละ 3 หลอด มาทำการวิเคราะห์ตั้งแต่ขั้นเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

วิธีการคำนวณ

1. กราฟมาตรฐาน นำค่า cpm ของอิสโตรนมาตรฐาน ซึ่งมีปริมาณตั้งแต่ 0 - 1000 พิโคกรัมต่อ 0.25 มิลลิลิตร มาหาค่าเฉลี่ยแล้วคิดหาเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวโดยเทียบจาก cpm ที่เป็น 100 เปอร์เซนต์ การเกาะเกี่ยว ของสารละลาย J ซึ่งมีปริมาณอิส-

โตรนมาตรฐาน 0 พิโคกรัม ต่อ 0.25 มิลลิลิตร) นำค่าเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวกับค่าปริมาณอิล์โตรนมาตรฐานมาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยใช้กระดาษกราฟ semilogarithm

2. Blank นำค่า cpm ของ blanks มาหาเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวเช่นเดียวกับอิล์โตรนมาตรฐาน แล้วคิดเป็นปริมาณพิโคกรัมต่อ 0.25 มิลลิกรัม โดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน ถ้าค่า blanks มากกว่าค่าประสิทธิภาพต่ำสุดในการวัดให้นำค่าเฉลี่ยของ blanks ทั้ง 4 หลอดไปลบออกจากค่าของตัวอย่างที่ไม่ทราบค่า

3. ตัวอย่างที่ไม่ทราบค่า นำค่า cpm ของตัวอย่างที่ไม่ทราบค่าทั้งหมดมาคิดหาเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวเช่นเดียวกับอิล์โตรนมาตรฐานแล้วคิดเป็นปริมาณพิโคกรัมต่อ 0.25 มิลลิลิตร โดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างการคำนวณ

U = ค่าของตัวอย่างที่ไม่ทราบค่าที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน

B = $\bar{X} \pm SD$ ของ blank

ปริมาณอิล์โตรน = U เมื่อค่าเฉลี่ยของ blank น้อยกว่าค่าประสิทธิภาพต่ำสุดในการวัด

ปริมาณอิล์โตรน = U - B เมื่อค่าเฉลี่ยของ blank มากกว่าค่าประสิทธิภาพต่ำสุดในการวัด

ปริมาณอิล์โตรน = U x 46 x 50 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ

= (U-B) x 46 x 50 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร

6. <u>การวิเคราะห์หาระดับอิล์โตรนอิล์ระในปัสล่าวะ</u>

การวิเคราะห์หาระดับอิล์โตรนอิล์ระในปัสล่าวะ ใช้วิธีการเดียวกับการหาระดับอิล์โตรนทั้งหมด โดยการปิเปตปัสล่าวะ ตัวอย่างละ 0.02 มิลลิลิตร มาทำการล่กัดด้วยอีเทอร์โดยไม่ต้องเจือจางปัสล่าวะและไม่ต้องชับโตรไลซิล์ ดังนั้นการคำนวณ

ปริมาณอิล์โตรนอิล์ระ = U x 50 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ

= (U - B) x 50 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การหาปริมาณครีเอตินินในปัสสาวะ

ปัสสาวะที่เก็บทุก ๆ วันนำมาหาปริมาณครีเอตินิน ตามแบบของ Jaffe (Jaffe's picrate reaction) ซึ่งบรรยายโดย Folin (1914) และดัดแปลงตามแบบของ Owen et al (1954) และ Taussky (1954) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. เจือจางปัสสาวะโดยใช้ automatic dilution pipette ดูดปัสสาวะจำนวน 0.035 มิลลิเมตร แล้วผสมด้วยน้ำกลั่นจำนวน 6.965 มิลลิลิตร (เจือจาง 1 : 200) ทำอย่างละ 1 หลอด

2. เตรียมหลอดทดลอง 3 หลอด

2.1 reagent blank ประกอบด้วย 3.00 มิลลิลิตร ของน้ำกลั่น

2.2 ครีเอตินินมาตรฐานประกอบด้วย 2.90 มิลลิลิตร ของน้ำกลั่น และ 0.1 มิลลิลิตรของสารละลายครีเอตินินมาตรฐาน

2.3 สารละลายตัวอย่าง ประกอบด้วยปัสสาวะที่เจือจาง 1 : 200 จำนวน 3.00 มิลลิลิตร

3. ใส่ 1.00 มิลลิลิตร ของกรดพิคริก ในทุกหลอดผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า

4. ใส่ 0.5 มิลลิลิตร ของ 1.4 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ในหลอดทดลองที่ 1 แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่านาน 30 วินาที แล้วเติม 1.4 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดต่อไปทุก 30 วินาที จนกว่าจะครบชุด

5. หลังจากที่ใส่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 นาที อ่านค่าการดูดแสงที่ 500 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาจำนวนของครีเอตินินในปัสสาวะ

การคำนวณ

1. ปริมาณของครีเอตินินในปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร จากตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์หาจากสูตร

$$\text{มิลลิกรัมครีเอตินิน/มิลลิลิตร ปัสสาวะ} = \frac{AX}{AS} \times 0.132 \times 0.1 \times \frac{1}{0.015}$$

Ax = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาวิเคราะห์

As = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายครีเอตินินมาตรฐาน

2. ปริมาณของครีเอตินินที่ขับออกมา 24 ชั่วโมง ของแต่ละตัวอย่างที่นำมาศึกษาหาได้จากสูตร

ครีเอตินิน 24 ชั่วโมง = มิลลิกรัมครีเอตินิน/มิลลิลิตรปัสสาวะ x มิลลิลิตรของปัสสาวะ 24 ชั่วโมง

3. ปริมาณของปัสสาวะที่ขับออกมา 24 ชั่วโมง ของแต่ละตัวอย่างหาได้จากสูตร

$$\text{ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง} = \frac{\text{ครีเอตินิน 24 ชั่วโมง}}{\text{มิลลิกรัมครีเอตินิน/มิลลิลิตรปัสสาวะ}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย