การทดลอง

1. สารเคมี

Estriol ($\Delta^{1,3,5\,[10]}$ Estratrien - 3β -16α, 17β - triol) Grade 1, Lot No. 15 B - 1500 Sigma Chemical Company U.S.A.

Concentrated hydrochloric acid, 95% - 98% sulfuric acid, sodium chloride, sodium bicarbonate (A.R. grade) Mallinckrodt Chemical Works, New York

Petroleum spirit (40°C - 60°C, Analar), p-nitrophenol (Laboratory reagent), sym-tetrachloroethane (acetylene tetrachloride) (Technical reagent grade), anhydrous sodium sulfate (Analar), BDH Chemical Ltd., Poole, England

Sodium hydroxide (A.R.), absolute ethanal Pro Analysi E. Merck AG. Darmstadt, Germany

Hydroquinone (R), ferrous sulfate ($FeSO_4\ 7H_2O$) (R) May & Baker Ltd., Dagenham, England

Anaesthetic ether A/S Den Norske Eterfabrikk, Oslo, Norway

Anhydrous calcium chloride (Baker analyzed reagent) J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J.

Ethanal 95% (องค์การเภสัชกรรม)

2. เครื่องมือที่ใช้

2.1 Super - Mixer, Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA ; U.S.A. Cat. No. 8929 W.

2.2 International refrigerated centrifuge model PR6, International Equipment Co., Needham Heights, Massachusetts, 02194, U.S.A.

2.3 Aminco - Bowman spectrophotofluorometer with Xenon lamp, American Instrument Company, Inc. Silverspring, Maryland, U.S.A.

2.4 Coleman pH meter model 39

2.5 Quickfit tubes MF 24/1/6 with stopper SB 14, MF 24/1/5 with stopper SB 14

2.6 หลอดที่ใช้สกัดสารจากปัสสาวะ ใช้หลอดแก้วไพเรกซ์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 9.4 มม. ยาว 1½ นิ้ว เชื่อมต่อกับหลอดแก้ว Quickfit MF 24/1/5 ซึ่งเมื่อเชื่อมเสร็จแล้ว จะมีลักษณะดังรูปที่ 6 (ในภาคผนวก)

2.7 เครื่องสกัดแบบการแบ่งละลายของ Paton-Brown (Paton-Brown partitioning extractor) เครื่องมือนี้มีลักษณะดังรูปที่ 7 (ในภาคผนวก) ออกแบบโดย Brown และคณะ (1968) เพื่อใช้หาปริมาณเอสโตรเจนโดยเฉพาะ เครื่องสกัดนี้ประกอบด้วย partition tube 12 อัน ติดอยู่บนคานในสภาพที่สามารถถอดเข้าออกได้ คานนี้สามารถจะหมุนกลับไปมาได้ โดยทำมุมกับแนวราบ 15° และมีเครื่องจับเวลาอัตโนมัติคอยควบคุมให้หมุนตามเวลาที่ต้องการ ตัว partition tube นั้นออกแบบมาให้เก็บสารละลายไว้ได้พอดีกับปริมาตรของสารละลายหรือตัวทำละลายอินทรีย์ ที่ใช้ในการสกัดเอสโตรเจน ไม่ว่าจะทิ้งสารชั้นบนหรือสารชั้นล่างไปก็ตาม

3. <u>ปัสสาวะ</u>

ปัสสาวะที่ใช้ในการทดลองมีอยู่ 2 จำพวก คือ

1. ปัสสาวะของสตรีที่ไม่ตั้งครรภ์

การเก็บปัสสาวะมี 2 แบบ คือแบบ 48 ชั่วโมงและแบบ 24 ชั่วโมง โดยเริ่ม

เก็บตั้งแต่เวลา 7.00 น. ของวันหนึ่งจนถึง 7.00 น. ของวันรุ่งขึ้นหรือวันถัดไปแล้วแต่กรณี นำปัสสาวะนี้มาตวงเพื่อวัดปริมาตร จากนั้นทำให้มีปริมาตรครบ 2,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันแล้วแบ่งเก็บไว้ที่ -10° ซ ทำเช่นนี้ทุกวันหรือทุกสองวัน ตั้งแต่วันแรกของรอบเดือนจนถึงวันสุดท้ายก่อนจะเริ่มวันแรกของรอบเดือนถัดไป

2. ปัสสาวะของสตรีที่กินยาคุมกำเนิด

เก็บปัสสาวะ 24 หรือ 48 ชั่วโมง ติดต่อกัน 4 รอบเดือน โดยรอบเดือนแรกไม่ได้กินยาคุมกำเนิด คือเป็นรอบเดือนก่อนกินยา (control cycle) จากนั้นจึงเริ่มกินยาคือ เมเกสตรอล อาซีเตท 0.5 มก. ทุกวันติดต่อกันใน 2 รอบเดือนถัดมา และหยุดกินยาเมื่อเริ่มรอบเดือนที่ 4

4. <u>การเตรียมสารที่ใช้</u>

4.1 <u>อีเธอร์สำหรับสกัดสาร</u> เตรียมโดยเขย่า anaesthetic ether กับ 0.8 M. $FeSO_4$ ใน 0.2 M. H_2SO_4 ในอัตราส่วน 1,000มล. ต่อ 100 มล. 3 ครั้ง เพื่อล้างเปอร์ออกไซด์ออก จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 50 มล. 2ครั้ง ใส่แคลเซี่ยมคลอไรด์ (ชนิด anhydrous) เขย่าแรง ๆ เพื่อดูดน้ำ นำมากลั่นธรรมดา โดยใส่แคลเซี่ยมคลอไรด์ลงในขวดกลั่นด้วย ทิ้ง 50 มล. แรกไปเก็บส่วนที่ 34.6 °ซ ไว้ และนำมากลั่นผ่านคอลัมน์อีกครั้งหนึ่ง

4.2 0.8 M. $FeSO_4$ ใน 0.2 M. H_2SO_4 เตรียมโดยละลาย $FeSO_4.7H_2O$ หนัก 222.41 กรัม ใน 0.2 M. H_2SO_4 1,000 มล.

4.3 <u>สารละลายโซเดียมคาร์บอนเนต pH 10.5</u> เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 21 กรัม และโซเดียมไบคาร์บอนเนต 70 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 10.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6 M.

4.4 <u>โคเบอร์รีเอเจนต์</u> เตรียมโดยละลาย ไฮโดรควินโนน (hydroquinone)

2 กรัมในกรดกำมะถัน 66% 100มล. อุ่นเล็กน้อยเพื่อช่วยในการละลาย สารละลายที่ได้จะใสไม่มีสี เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล เตรียมเสร็จแล้ว 24 ชั่วโมง จึงจะนำมาใช้ได้

4.5 กรดกำมะถัน 66% เตรียมโดยผสมกรดกำมะถัน 98% 67.4มล. กับน้ำกลั่น 32.6 มล.

4.6 อิทริชรีเอเจนต์ เตรียมโดยละลาย พาราไนโตรฟีนอล 2 กรัมในอัลกอฮอล์ (absolute ethanal) 1 มล. แล้วเติมอะเซททีลีน เตตราคลอไรด์ (acetylene tetrachloride) ลงไป 100 มล. เขย่าให้เข้ากันดี สารละลายที่ได้มีสีเหลืองอ่อนนำไปเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิ 4° ซ

4.7 การทำให้พาราไนโตรฟีนอล และ อะเซททีลีนเตตราคลอไรด์ บริสุทธิ์ขึ้น พาราไนโตรฟีนอล ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นได้โดยการตกผลึกใหม่ ละลายพาราไนโตรฟีนอล 10กรัม ในสารผสมของเบนซินกับอัลกอฮอล์ (80:20 V/V) 50 มล. แล้วนำไปกรองโดยใช้ sintered glass funnel ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศ เทสารละลายที่ได้จากการกรองลงในกระจกนาฬิกาทิ้งไว้ให้สารผสมของเบนซินกับอัลกอฮอล์ ระเหยไป พาราไนโตรฟีนอลจะตกผลึกค้างอยู่บนกระจกนาฬิกา อะเซททีลีนเตตราคลอไรด์ ทำให้บริสุทธิ์ในกรณีที่เก่าและมีสีเหลืองจัดได้โดยนำไปกลั่นลำดับส่วนเก็บส่วนที่ 146° ซ ไว้

4.8 ปิโตรเลียมอีเธอร์ กลั่นใหม่ โดยนำมากลั่นลำดับส่วน โดยใส่คัลเซี่ยมคลอไรด์ลงไปในขวดกลั่นด้วย เก็บส่วนที่อยู่ระหว่าง 40-60° ซ ไว้

4.9 Sulfuric acid dichromate cleaning solution

โซเดียมไดโครเมท 120 กรัม ละลายในน้ำ 1,000มล. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 1,600มล.

4.10 สารละลายเอสตริออลมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมใน 1มล. ของอัลกอฮอล์ ละลายเอสตริออล 5 มก. ในอัลกอฮอล์ 50 มล. จะได้สารละลายเข้มข้น 0.1 มก. ใน 1 มล. ต่อจากนั้นจึงเตรียมสารละลายเข้มข้น 1 ไมโครกรัมใน 1 มล. จากสารละลาย 0.1 มก. ใน 1มล. และ 0.1ไมโครกรัม ใน 1 มล. จาก 1 ไมโครกรัม

ใน 1 มล. ตามลำดับ

4.11 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 M. เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40กรัม ในน้ำแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

5. การวัดปริมาณเอสโตรเจน

ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Brown และคณะ (1968) โดยดัดแปลงบางขั้นเพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องมือที่มีอยู่ หลักการของวิธีนี้ก็คือ ทำให้เอสโตรเจนในปัสสาวะซึ่ง อยู่ในรูปคอนจูเกท เปลี่ยนมาอยู่ในรูปของเอสโตรเจนอิสระ โดยทำไฮโดรไลซิสด้วยกรด สกัดเอาไขมันทั้งหลายรวมทั้งเอสโตรเจนอิสระซึ่งเป็นสารพวกฟีนอล (phenolic compound) ออกด้วยอีเธอร์ โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปช่วยให้ประสิทธิภาพในการสกัดของอีเธอร์ดีขึ้น ล้างชั้นอีเธอร์ ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอนเนต pH 10.5 พวกสารที่เป็นกรด (acidic fraction) จะออกไปกับสารละลายคาร์บอนเนต จากนั้นเติมปิโตรเลียมอีเธอร์ ลงไปลด polarity ของอีเธอร์ แล้วสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เอสโตรเจนอิสระจะเข้ามาอยู่ในชั้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ พวกสารที่เป็นกลาง (neutral fraction)จะอยู่ในชั้นของสารผสมระหว่างปิโตรเลียมอีเธอร์และอีเธอร์ เติมผงโซเดียมคาร์บอนเนต ลงไปในชั้นโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อลด pH ให้ต่ำลง สกัดชั้นของสารผสมระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมไบคาร์บอนเนตด้วยอีเธอร์ เอสโตรเจนอิสระซึ่งเป็นสารพวกฟีนอล ละลายในอีเธอร์ได้ดีกว่า แยกเอาชั้นอีเธอร์ออกมาระเหยไล่อีเธอร์ออก นำไปทำตามปฏิกริยาให้สีของโคเบอร์ และสกัด โคเบอร์โครโมเจนด้วยอิทธริธรีเอเจนต์ นำไปวัดความเรืองแสง

ลำดับขั้นการทดลอง

5.1 วิธีไฮโดรไลซิส นำปัสสาวะ 1 มล. จากที่เก็บไว้ 2,000มล. มาเติมน้ำให้เป็น 6 มล. เติมกรดเกลือเข้มข้นลงไป 0.9 มล. นำไปต้มที่100°ซ ความดันปรกติเป็นเวลา 60 นาที แล้วทำให้เย็นนำไปเทใส่ใน partition tubes

5.2 การสกัด มีลำดับขั้นดังนี้

ขั้นที่ 1 เติมโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 1 กรัม ปล่อยให้เครื่องสกัดหมุนกลับไปมาจนโซเดียมคลอไรด์ละลายหมด สกัดด้วยอีเธอร์ 6 มล. เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งชั้นล่างที่เป็นกรดไป

ขั้นที่ 2 ล้างอีเธอร์ที่ได้จากขั้นที่ 1 โดยเติมสารละลายคาร์บอนเนต pH 10.5 2 มล. เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งชั้นล่างที่เป็นสารละลายคาร์บอนเนต

ขั้นที่ 3 เติมปิโตรเลียมอีเธอร์ลงไป 6 มล. แล้วปล่อยให้เครื่องสกัดหมุนกลับไปมาจนเป็นเนื้อเดียวกัน สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 M. 6 มล. เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งชั้นบนที่เป็นสารผสมของปิโตรเลียมอีเธอร์และอีเธอร์

ขั้นที่ 4 เติมผงโซเดียมไบคาร์บอนเนตประมาณ 0.8 กรัม แล้วปล่อยให้เครื่องสกัดหมุนกลับไปมาจนละลายหมด สกัดด้วยอีเธอร์ 6 มล. เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งชั้นล่างที่เป็นสารผสมระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมไบคาร์บอนเนต เก็บเอาชั้นอีเธอร์มา โดยระวังไม่ให้มีสารละลายผสมระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมไบคาร์บอนเนตติดปนมา ไม่เช่นนั้น สารที่ติดมาจะเป็นสาเหตุทำให้ค่าเอสโตรเจนที่ควรจะวัดได้ลดลง

5.3 การทำให้แห้ง นำชั้นอีเธอร์ที่เก็บได้ ไประเหยในตู้ดูดควัน โดยแช่หลอดแก้วที่มีอีเธอร์อยู่ลงในน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 80-90 °ซ พร้อมกับเป่าก๊าซไนโตรเจนลงไปในขณะที่ทำการระเหยไล่อีเธอร์ เพื่อป้องกันมิให้เกิดออกซิเดชั่น นอกจากนั้นความเย็นของก๊าซไนโตรเจน จะช่วยไม่ให้อีเธอร์พลุ่งขึ้นมาพ้นปากหลอด และการขยายตัวของก๊าซไนโตรเจน เมื่อโดนความร้อนจะพาไอของอีเธอร์ออกไปได้เร็วด้วย นำหลอดแก้วใส่สารละลายเอสตริออลมาตรฐานความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัม หรือ 0.1 ไมโครกรัมใน 0.1 มล. มาระเหยไล่อัลกอฮอล์ ด้วยวิธีนี้เช่นกัน

5.4 การทำให้เกิดความเรืองแสง นำหลอดแก้วที่ระเหยไล่อีเธอร์ อัลกอฮอล์

และ หลอดใหม่สำหรับทำเป็น reagent blank มาเติมโคเบอร์รีเอเจนต์ หลอดละ 1 มล. เขย่าด้วย Supermixer 45 วินาที เติมผงไฮโดรกวินโนน ประมาณ 1มก. ปิดจุก นำไปใส่ในน้ำเดือด เขย่าจนผงไฮโดรกวินโนนละลายหมด ต้มต่อไป 40 นาที ที่ 100° ซ ความดันปรกติ นำมาทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิ 0° ซ ทิ้งไว้ 5-10 นาที เติมน้ำกลั่นที่เย็นจัด ๆ 1.5มล. เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 0° ซ นี้ เพื่อขจัดความร้อนที่เกิดจากการเติมน้ำลงไป จากนั้นรินสารละลายในหลอดลงในหลอดที่ใช้สกัดสาร ซึ่งใส่ อิททริชรีเอเจนต์ ไว้ 0.75 มล. และแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 0° ซ ปิดจุกให้แน่น เขย่าด้วยมืออย่างแรง 100ครั้ง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,000 รอบ ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 0° ซ เป็นเวลา 3 นาที จะได้ของเหลวแยกกันเป็น 2 ชั้น ชั้นบนคือกรด ชั้นล่าง คือ อิททริชรีเอเจนต์ นำไปดูดเอาชั้นบนทิ้งโดยใช้เครื่องดูดอากาศช่วย จากนั้นเทใส่ลงในหลอดกลมที่ทำด้วยควอทซ์ (Quartz) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มม. ยาว 40 มม. ซึ่งใช้สำหรับเครื่อง Aminco - Bowman Spectrophotofluoremeter (SPF) โดยเฉพาะ การเทต้องระวังมิให้น้ำที่ติดอยู่ข้าง ๆ และก้นหลอดที่ใช้สกัดสารติดปนมาด้วย นำไปวัดความเรืองแสงทันทีด้วย SPF ที่

1. Excitation wavelength 532 nm และ emission wavelength 550 nm ค่าความเรืองแสงที่ได้แทนด้วยสัญญลักษณ์ F 532/550

2. Excitation wavelength 490 nm และ emission wavelength 520 nm ค่าความเรืองแสงที่ได้แทนด้วยสัญญลักษณ์ F 490/520

วิธีการเลือก excitation wavelength และ emission wavelength ที่เหมาะสมอธิบายไว้ในหน้า 28

การวัดความเรืองแสงในปัสสาวะตัวอย่างนั้น ทำพร้อมๆ กับการวัดความเรืองแสงโดยใช้สารละลายเอสตริออลมาตรฐานที่ทราบปริมาณ

6. <u>การหาค่าคงที่สำหรับแก้ไขการคำนวณหาปริมาณเอสโตรเจน</u>

ความเรืองแสง F 532/550 เนื่องจากเอสโตรเจนซึ่งมีค่าสูงสุดนั้น ไม่ได้เป็น

ความเรืองแสงจากเอสโตรเจนอย่างเดียว ในปัสสาวะมีสารปลอมปน (impurities) ซึ่งเรืองแสงในช่วงความยาวกลื่นเดียวกันนี้อยู่ด้วย ส่วน F 490/520 นั้น ความเรืองแสงเนื่องจากเอสโตรเจนจะมีค่าต่ำสุดในขณะที่ความเรืองแสงเนื่องจากสารปลอมปนจะยังมีอยู่ ดังนั้น จะนำ F 532/550 ไปคำนวณค่าเอสโตรเจนโดยตรงไม่ได้ จะต้องหักค่าความเรืองแสงเนื่องจากสารปลอมปนออกเสียก่อน ค่าที่จะนำมาหักออกนี้ คือค่า F 490/520 คูณกับตัวคงที่ (k) ค่า k คืออัตราส่วนระหว่าง F 532/550 และ F 490/520 ที่หาได้จากปัสสาวะที่ถือว่าไม่มีเอสโตรเจน ในทางปฏิบัติใช้ปัสสาวะจากเด็กผู้ชายอายุระหว่าง 2 ถึง 8 ปี ค่า k นี้จะเป็นค่าคงที่สำหรับแต่ละห้องปฏิบัติการ จากการทดลองพบว่า k มีค่า 0.396 ± 0.010 (mean $\pm$SD) และเพื่อความสะดวกในการคำนวณจึงใช้ค่า k = 0.4 ตลอดการทดลอง

7. <u>การคำนวณ</u>

การคำนวณหาปริมาณเอสโตรเจนในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง หรือ 48 ชั่วโมงนั้น คำนวณจากค่าความเรืองแสง ซึ่งหักค่าความเรืองแสงจากสารปลอมปนออกแล้วตามสูตร

F corrected = F 532/550 - k·F 490/520

สมมติค่า F corrected ของสารละลายเอสโตรเจนมาตรฐาน 0.1 ไมโครกรัม ใน 1 มล. เป็น x

สมมติค่า F corrected จากปัสสาวะตัวอย่าง 1 มล. เป็น y

ปริมาณเอสโตรเจนในปัสสาวะ 1 มล. = $0.1 \frac{y}{x}$ ไมโครกรัม

ปริมาณเอสโตรเจนในปัสสาวะที่เก็บไว้ (2,000 มล.)

= $2{,}000 \times 0.1 \frac{y}{x}$ ไมโครกรัม

= $200 \frac{y}{x}$ ไมโครกรัม

8. <u>การหา percentage recovery</u>

การหา percentage recovery นั้น ทำ 2 แบบ คือ percentage recovery ก่อนและหลังไฮโดรไลซิส ถ้าจะหา recovery ก่อนไฮโดรไลซิส

ให้เติมสารละลายเอสโตรเจนมาตรฐานลงในปัสสาวะ 1 มล. ก่อนทำไฮโดรไลซิส และดำเนินการทดลอง ดังที่อธิบายตั้งแต่หัวข้อ 5.1 หน้า 24 ถ้าจะหา recovery หลังไฮโดรไลซิส ก็เติมสารละลายเอสโตรเจนมาตรฐานลงในปัสสาวะหลังจากทำไฮโดรไลซิสแล้ว เริ่มทำการทดลองจากหัวข้อ 5.2 หน้า 25

สมมติ F corrected ของสารละลายเอสโตรเจนมาตรฐาน 0.1 ไมโครกรัม ใน 1 มล. เป็น a

F corrected ของปัสสาวะตัวอย่างที่มีเอสโตรเจนมาตรฐาน 0.1 ไมโครกรัม ใน 1 มล. เป็น b

F corrected ของปัสสาวะตัวอย่าง 1 มล. เป็น c

$\therefore$ ความเรืองแสงเนื่องจากเอสโตรเจน 0.1 ไมโครกรัมในปัสสาวะตัวอย่าง = b - c

ปริมาณเอสโตรเจนที่สกัดได้ $= \frac{0.1\ (b - c)}{a}$ ไมโครกรัม

9. <u>การเลือก excitation wavelength และ emission wavelength ที่เหมาะสม</u>

ในการวัดปริมาณเอสโตรเจน การเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับ SPF แต่ละเครื่องเป็นสิ่งจำเป็นที่สุดที่จะต้องทำ วิธีดำเนินการใช้หลักการของ Brown (1972)

9.1 <u>การเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับเอสโตรเจน</u>

ระเหยไล่อัลกอฮอล์ จากสารละลายมาตรฐานเอสกริออล 0.1 ไมโครกรัม นำไปต้มกับโคเบอร์รีเอเจนต์ จากนั้นสกัดด้วยอิทหริธรีเอเจนต์ นำไปวัดความเรืองแสงโดยตั้ง slid widths ของเครื่องที่ 2 มม. ตั้ง emission wavelength ที่ 560 nm เปลี่ยน excitation wavelength ไปรอบ ๆ 535 nm จนได้ excitation wavelength ที่เอสโตรเจนให้ค่าความเรืองแสงสูงที่สุด คือ 532 nm สำหรับ SPF เครื่องที่ใช้ในการทดลองนี้ ต่อมาตั้ง excitation wavelength ไว้ที่ 532 nm แล้วเปลี่ยน emission wavelength ไปรอบ ๆ 550nm จนได้

emission wavelength ที่เอสโตรเจนให้ค่าความเรืองแสงสูงที่สุดคือ 547 nm

นำ reagent blank ซึ่งได้จากการดำเนินการทดลองตามหัวข้อ 5.4 หน้า 25 มาวัดความเรืองแสงโดยตั้ง excitation wavelength ไว้ที่ 532 nm เปลี่ยน emission wavelength ไปรอบ ๆ 550 nm

นำค่า emission wavelength และ % transmittance ซึ่งได้จากการวัดเอสตริออล 0.1 ไมโครกรัม และ reagent blank มาเขียนกราฟ (รูปที่ 7 ข)

ในกรณีของ reagent blank จะเห็นได้ชัดว่าระยะแรกที่ emission wavelength อยู่ในช่วง 540-550 nm % transmittance จะลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อผ่านมาถึงช่วง 555-560 nm % transmittance จะเริ่มลดลงทีละน้อย การเปลี่ยนแปลงทีละน้อยนี้ เนื่องมาจากลักษณะการเรืองแสงของ reagent blank emission wavelength ที่จุดเปลี่ยน (inflection point) (550 nm) เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการอ่านค่าเอสโตรเจนเพราะว่า

1. เป็นจุดที่อ่านค่าเอสโตรเจนได้เกือบสูงที่สุด

2. เป็นค่า emission wavelength ที่เข้าใกล้ excitation wavelength ได้มากที่สุด แล้วแสงตกกระทบ (incident light) ไม่ไปรบกวน detection system ของเครื่อง SPF

3. ให้ค่า reagent blank ต่ำ

สรุปได้ว่า excitation wavelength และ emission wavelength คู่ที่เหมาะในการอ่านค่าความเรืองแสงของเอสโตรเจน คือ 532 nm และ 550 nm

9.2 <u>การเลือกความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมสำหรับสารปลอมปน</u>

ทำได้โดยเลือกใช้ความยาวคลื่นแสงที่เอสโตรเจนให้ค่าความเรืองแสงน้อยที่สุด แต่สารปลอมปนให้ค่าความเรืองแสงสูง ได้ทดลองทำตาม Brown (1968) โดยนำ

สารสกัดจากปัสสาวะของเด็กผู้ชาย อายุระหว่าง 2-8 ปี ซึ่งถือว่าไม่มีเอสโตรเจน และเอสตริออล 0.1 ไมโครกรัม มาศึกษาลักษณะเรืองแสง ที่ excitation wavelength 490 nm และ emission wavelength ในช่วง 500-580 nm แล้วนำเขียนกราฟ (รูปที่ 7ข) พบว่าที่ excitation wavelength 490nm และ emission wavelength 520 nm เอสโตรเจนให้ค่าความเรืองแสงต่ำที่สุด หรือถือว่าไม่ให้เลย แต่สารสกัดจากปัสสาวะของเด็กผู้ชาย หรือสารปลอมปน ให้ค่าความเรืองแสงสูง

รูปที่ 7ข ลักษณะการเรืองแสงของเอสโตรเจนและสารปลอมปนที่ความยาวคลื่นแสงต่าง ๆ กัน