วัสดุและวิธีทำการวิจัย

1. สารเคมี

Ether (Ethyl) anhydrous A.R., Benzene "nanograde", Sodium phosphate dibasic heptahydrate A.R., Sodium phosphate monobasic monohydrate A.R., Sodium Chloride A.R., 2,2,4-Trimethyl pentane (Isooctane) "nanograde". Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis.

Absolute ethanol "Proanalysi", Sodium azide. E. Merck Ag. Darmstadt, Germany.

Ethyl acetate "Baker intraanalysed", Toluene "Baker Analysed" , Dioxane "Baker Analysed". J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N. J.

Ethylene glycol "Chromatoquality" , Charcoal "activated" Matheson Coleman & Bell Co. Norwood, N. J.

Biosolve (BBS-3).Beckman Instrument Inc., Fullerton, California.

Gelatin, Bacto "Difco certified" Difco Laboratories Michigan.

Dextran T 70.Pharmacia Fine Chemical., Uppsala,Sweden.

Celite "Analytical Filter - aid" John Manville Prod. Corp., Lompoc, California.

Liquifluor (PPO, POPOP,Toluene concentrate) , Estradiol - 17β - 6, 7 - H^3(N) 0.25 mCi/0.25 ml. New England Nuclear., Albany Str., Boston.

17β - Estradiol ($\Delta^{1,3,5(10)}$ Estratrien - 3, 17β - diol), Estrone ($\Delta^{1,3,5(10)}$ Estratrien - 3 - ol - 17 - one), Estriol ($\Delta^{1,3,5(10)}$ Estratrien - 3, 16α, 17β - triol), 16, 17 - Epiestriol ($\Delta^{1,3,5(10)}$ Estratrien - 3, 16β, 17α - triol), 16 - Epiestriol ($\Delta^{1,3,5(10)}$ Estratrien - 3, 16β, 17β - triol), 17 - Epiestriol ($\Delta^{1,3,5(10)}$ Estratrien - 3, 16α, 17α - triol), 3 - Deoxyestrone, Androsterone (5α - Androstan - 3α - ol - 17 - one), Androstenedione (Δ^4 - Androsten - 3, 17 - dione), Testosterone (Δ^4 - Androsten - 17β - ol - 3 - one), Progesterone (Δ^4 - Pregnen - 3, 20 - dione), 17α - Hydroxyprogesterone (Δ^4 - Pregnen - 17α - ol - 3, 20 - dione), Sigma Chemical Company, St. Louis.

Anti - E_2 - 17β - monohemisuccinate - human serum albumin ได้จาก Ass. Prof. Guy E. Abraham, Department of Obs. & Gyn. University of California.

Anti - E_2 - 6 - BSA ได้จาก Assistant Prof. Damador K. Mahajan, Department of Obs. & Gyn. The Pennsylvania State University.

2. เครื่องมือ

005335

2.1 I.E.C. Refrigerated Centrifuge Model PR - 6, International Equipment Co. Needham Heights, Massachusetts, U.S.A.

2.2 Tri - Carb Liquid Scintillation Spectrometer Model 3390, Packard Instrument Co., Inc., Zurich, Switzerland.

2.3 Thermolyne Type 1500 furnace. Sybron Corporation.

2.4 Scien Temp. 140 (-118°c - 50°c), Scientemp Corporation.

2.5 Vari - Whirl Mixer Cat. No. 58810 - 006, Van Waters & Rogers Will Scientific Co.

2.6 pH meter Model 39, Coleman Instrument Co., Illinois, U.S.A.

2.7 Magnetic stirrer No. 71/4061 Brid & Tatlock Ltd., England.

3. การเก็บสารตัวอย่าง

การเก็บสารตัวอย่างทำ 2 แบบ

3.1 อาสาสมัครเป็นสตรีไทยมีรอบเดือนปกติ ไม่เคยมีประวัติที่เป็นโรคเกี่ยวกับมดลูกและรังไข่ ไม่เคยใช้ยาคุมกำเนิด อายุระหว่าง 18 – 35 ปี ส่วนใหญ่เป็นโสด แต่งงานแล้ว 2 ราย และเป็นม่าย 2 ราย จำนวนอาสาสมัครทั้งหมด 19 คน เจาะคนละ 4 – 5 รอบเดือน และเจาะเลือดวัดฮอร์โมนในวันที่ 2, 8, 13, 14, 15, 16, 22 และ 24 ของรอบเดือน

3.2 เลือกอาสาสมัครเพิ่มอีก 6 คน ซึ่งทุกคนเป็นโสดและมีรอบเดือนปกติ อายุระหว่าง 16 – 32 ปี เจาะเลือดในวันที่ 2 และ 8 หลังจากวันเริ่มมีประจำเดือน แล้วเจาะวันที่ 11 จนถึง 18 ของรอบเดือนทุกวันติดต่อกัน หลังจากนั้นเริ่มเจาะอีกในวันที่ 20, 22 ของรอบเดือน วันเว้นวันจนกระทั่งถึงวันเริ่มมีประจำเดือนมาใหม่

ตั้งเลือดที่เจาะไว้ในอุณหภูมิห้อง เพื่อให้เลือดแยกตัวออกจากน้ำเลือด ปั่นแยกเอาน้ำเหลือง แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40° ซ

4. การเตรียมสารละลาย

4.1 การเตรียมสารละลาย Buffer (0.1 M. Phosphate buffer pH 7.0)

4.1.1 ชั่ง Sodium phosphate dibasic heptahydrate 32.7 กรัม

4.1.2 ชั่ง Sodium phosphate monobasic monohydrate 10.8 กรัม

4.1.3 ชั่ง Sodium azide 2 กรัม

4.1.4 ชั่ง Sodium chloride 18 กรัม

เติมน้ำกลั่น 2 ลิตร คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปวัด pH จะได้ pH เท่ากับ 7.0 ถ้าไม่ได้ pH 7.0 ให้ปรับจนได้ค่า pH 7.0±0.1 (โดยการเติมสารละลายกรดเกลือเมื่อ pH ของสารละลายมากกว่า 7.0 หรือถ้ามี pH น้อยกว่า 7.0 ก็เติมสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์)

เติม gelatin 2 กรัม ลงในสารละลาย buffer pH 7.0 แล้วอุ่นจนกระทั่ง gelatin ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ สารละลายที่ได้นี้เรียกว่า assay buffer

4.2 การเตรียมสารละลายผงถ่านความเข้มข้น 0.625%

4.2.1 ชั่ง Charcoal Norit A 0.625 กรัม

4.2.2 ชั่ง Dextran T70 0.0625 กรัม

เติม assay buffer 100 มล. คนให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ สารผสมนี้สามารถเก็บไว้นานเป็นเดือนโดยไม่สูญเสียคุณสมบัติในการดูดซับ F ออกจาก B

4.3 การเตรียม Scintillator

ใช้ถัง 5 แกลลอน บรรจุ Toluene 4 แกลลอน เติม liquifluor 640 มล. และ Dioxane 3 ลิตร หรือใช้ Biosolve 1.5 ลิตร แทน Dioxane ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน

4.4 การเตรียม Radioactive Estradiol - 17β ($^3H - E_2$)

$^3H - E_2$ ที่ส่งมาบรรจุในขวด 5 มล. และมีปริมาณรังสี 250 ไมโครคูรี (microcurie) เติมสารละลาย benzene : methanol (9 : 1) 5 มล. แล้วเก็บไว้ที่ 4°ซ เรียกสารละลายนี้ว่า stock $^3H - E_2$

การเตรียม $^{3}H - E_2$ เพื่อใช้ในการวัดปริมาณ E_2 ดูด stock $^{3}H - E_2$ 10 ไมโครลิตร (microlitre) เป่าแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เติม assay buffer 10 มล. ผสมให้เข้ากัน 0.1 มล. ของสารละลายนี้จะเท่ากับ 20,000 dpm (disintegration per mimute) หรือเท่ากับ 56 พิโคกรัม (picogram, pg) เก็บสารละลายนี้ไว้ที่ 4°ซ

4.5 การละลายและการเก็บแอนติบอดี

แอนติบอดี ได้จาก Associate Prof. Guy E. Abraham ในลักษณะของผลึก (lyophilized) เมื่อจะใช้ต้องละลายด้วยน้ำกลั่น 2 มล. ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียว แล้วแบ่งเก็บไว้ในขวด ๆ ละ 0.1 มล. ที่ -20°ซ จะเก็บไว้ได้นานเป็นปี โดยไม่สูญเสีย binding activity (Thorneycroft และคณะ, 1970)

4.6 การเตรียม hormone free serum (HFS)

ชั่งผงถ่าน (activated charcoal) 20 มก. ใส่ลงในน้ำเหลือง 1 มล. เติม Sodium azide ให้มีความเข้มข้น 0.1% คนด้วย magnetic stirror เป็นเวลา 24ชม. ที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นแยกเอาผงถ่านออกด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 42 นำไปปั่นเพื่อแยกผงถ่านออก ทำเช่นนี้จนกระทั่งผงถ่านถูกแยกออกเกือบหมด HFS ที่ได้จะมีสีชา เก็บไว้ในขวด ๆ ละ 15 มล. ที่ -20°ซ

4.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน E_2

ชั่งสารมาตรฐาน E_2 10 มก. แล้วละลายด้วย absolute ethanol 10 มล. ทำให้เจือจางลง จนกระทั่งได้ stock solution มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ 1 มล. absolute ethanol เก็บไว้ที่ -20°ซ ถึง -40°ซ

ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน สำหรับใช้วัดปริมาณ E_2 ทำดังนี้

สารละลายที่ 1 ดูด stock solution 20 ไมโครลิตร เป่าให้แห้ง แล้วเติม assay buffer 10 มล. จะได้สารละลายมีความเข้มข้น 2,000 พิโคกรัมต่อ 1 มล.

สารละลายที่ 2 ได้จากการทำให้สารละลายที่ 1 เจือจางลงเท่าตัว สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 1,000 พิโคกรัม ต่อ 1 มล.

สารละลายที่ 3 เจือจางสารละลายที่ 2 ลงเท่าตัว สารละลายที่ได้นี้จะมีความเข้มข้น 500 พิโคกรัม ต่อ 1 มล.

สารละลายที่ 4 ใช้สารละลายที่ 3 จำนวน 2 มล. เติม assay buffer 3 มล. สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 200 พิโคกรัม ต่อ 1 มล.

ทำเช่นนี้ต่อไปจนกระทั่งได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ E_2 เท่ากับ 100, 50, 20, 10 และ 5 พิโคกรัม ต่อ 1 มล. ตามลำดับ

5. <u>การเตรียม Celite microcolumn</u>

5.1 ชั่ง Celite ซึ่งเผาในเตาเผา (1000°ฟ เป็นเวลา 18 ชม. เพื่อไล่สิ่งเจือปนออก) 20 กรัม เติม Ethylene glycol 10 มล. (Celite : Ethylene glycol, 2 : 1) คนให้เข้ากันโดยตลอดด้วยแท่งแก้วเป็นเวลา 10 นาที Ethylene glycol จะแทรกซึมอยู่ระหว่างเนื้อ Celite ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น stationary phase นำ Celite นี้บรรจุใน column (ใช้ Disposable graduated glass pipette ขนาด 5 มล. เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. บริษัท Kimble glass Co.) ก่อนบรรจุ Celite ต้องใส่ลูกแก้วขนาดเล็ก ๆ ลงไปอุดปลายล่างของ pipette

5.2 บรรจุ Celite ให้เต็ม column แล้วเคาะ Celite ให้ตกลงมากองอยู่ตอนล่างของ pipette เคาะจนกระทั่งระดับของ Celite ตกลงมาถึงเลข 3 ของ pipette แล้วจึงอัด Celite ด้วยแท่งเหล็กซึ่งตอนปลายของแท่งเหล็กเป็นพลาสติค อัด Celite ให้ลงมาถึง 3.5 $\pm$0.1 มล. ความสูงของ Celite ประมาณ 5 ซม. ปริมาณ Celite จะเท่ากับ 0.5 กรัม (โดยประมาณ) ล้าง column ด้วย Isooctane 3 ครั้ง ๆ ละ 3.5 มล. ก่อนที่จะใช้แยก E_2 ให้บริสุทธิ์

6. <u>การหา resolution ของการแยกด้วย celite microcolumn</u> ทำได้ดังนี้

6.1 เตรียม column ตามข้อ 5 (หน้า 19)

6.2 ใช้ $^{3}H - E_1$ ประมาณ 1350 cpm. เป่าแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ละลายด้วย Isooctane 1 มล. ดูดใส่ใน column ผ่านก๊าซไนโตรเจน ความดัน 1–2 ปอนด์ต่อ 1 ตร.นิ้ว เก็บ fraction ดังนี้

6.2.1 Isooctane 1 มล. ที่ผ่านออกมาตอนแรกจะทิ้ง เพราะว่าเป็นส่วนของ Isooctane ที่เหลือค้างอยู่ใน column

6.2.2 เติม Isooctane 0.5 มล. เพื่อล้าง $^{3}H - E_1$ ที่ติดในขวดและ column เก็บ fraction นี้ไว้

6.2.3 เติม Isooctane 3.5 มล. เพื่อแยกเอา nonpolar steroids เช่น โปรเจสเตอโรน เก็บส่วนนี้ไว้รวมกับข้อ 6.2.2 (3.5 + 0.5 มล.) ระเหยแห้ง เติม Scintillator 10 มล. วัดกัมมันตภาพรังสี

6.2.4 เติม 15% Ethyl acetate in Isooctane ลงใน column 3.5 มล. เก็บ fraction ขวดละ 0.5 มล. จะได้ 7 ขวด นำไประเหยให้แห้ง แล้วเติม Scintillator ขวดละ 10 มล. นับกัมมันตภาพรังสี

6.2.5 เติม 40% Ethyl acetate in Isooctane ลงใน column 3.5 มล. เก็บ fraction นี้ไว้ในขวดเดียว ระเหยแห้ง เติม Scintillator แล้วนับกัมมันตภาพรังสี

6.3 ทำเหมือนข้อ 6.1 และ 6.2 แต่ใช้ $^{3}H - E_2$ ประมาณ 1000 cpm. แทน $^{3}H - E_1$ แล้วดำเนินการเก็บ fraction คล้ายกัน ยกเว้นเมื่อเติม 15% Ethyl acetate in Isooctane แล้วเก็บ fraction ไว้เป็นขวดเดียว แต่ 40% Ethyl acetate in Isooctane ดำเนินการเก็บ fraction เหมือนข้อ 6.2.4 คือเก็บ

fraction ขวดละ 0.5 มล.

6.4 ทำเหมือนกับข้อ 6.1, 6.2 และ 6.3 รวมกัน คือใช้ $^{3}H - E_1$ ผสมกับ $^{3}H - E_2$ ปริมาณ cpm. เท่ากัน (ประมาณ 1000 cpm) แล้วดำเนินการเก็บ fraction เหมือนข้อ 6.2 และ 6.3 รวมกันคือ Isooctane fraction เก็บไว้ขวดเดียว แต่ 15% Ethyl acetate in Isooctane และ 40% Ethyl acetate in Isooctane เก็บ fraction ขวดละ 0.5 มล.

7. <u>วิธีดำเนินการวัดปริมาณ E_2</u> (รูปที่ 4)

7.1 การสกัด E_2 ด้วยอีเทอร์ และการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Celite chromatography

ใช้น้ำเหลือง 1–3 มล. เติม $^{3}H - E_2$ 0.1 มล. (ประมาณ 1000 cpm) ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เกิดสมดุลย์ระหว่าง $^{3}H - E_2$ กับ E_2 ในน้ำเหลือง แล้วสกัดแยกด้วยอีเทอร์ ปริมาตร 10 เท่าของน้ำเหลืองที่ใช้ ตั้งทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้อีเทอร์แยกจากน้ำเหลือง ส่วนของน้ำเหลืองจะอยู่ตอนล่างของหลอดแก้ว แช่ส่วนน้ำเหลืองลงในน้ำแข็งแห้งผสมอัลกอฮอล์ (–77° ซ) เมื่อน้ำเหลืองกระทบกับความเย็นก็จะแข็งตัว สามารถเทแยกเอาชั้นของอีเทอร์ออกจากน้ำเหลืองได้ นำเอาอีเทอร์นี้ไประเหยให้แห้งด้วยการพ่นอากาศลงไปในอีเทอร์ หลังจากแห้งแล้ว เติม Isooctane 1 มล. ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้ละลายอย่างสมบูรณ์ ดูดใส่ Celite column (ข้อ 5 หน้า 19) ใช้ก๊าซไนโตรเจนความดันประมาณ 1–2 ปอนด์ ต่อ 1 ตร.นิ้ว ลงใน column เพื่อให้ตัวทำละลายไหลผ่าน column ได้เร็วขึ้น แต่ต้องควบคุมไม่ให้อัตราการไหลเร็วกว่า 15 หยดต่อ 1 นาที เพราะว่าการแยกนี้เป็น partition chromatography ถ้าอัตราการไหลช้า การ partition ใน microscopic layer จะมีมากขึ้น ทำให้เปอร์เซ็นต์ของตัวถูกละลาย (solute) ออกมาสูง และการแยกจะมี resolution สูงด้วย

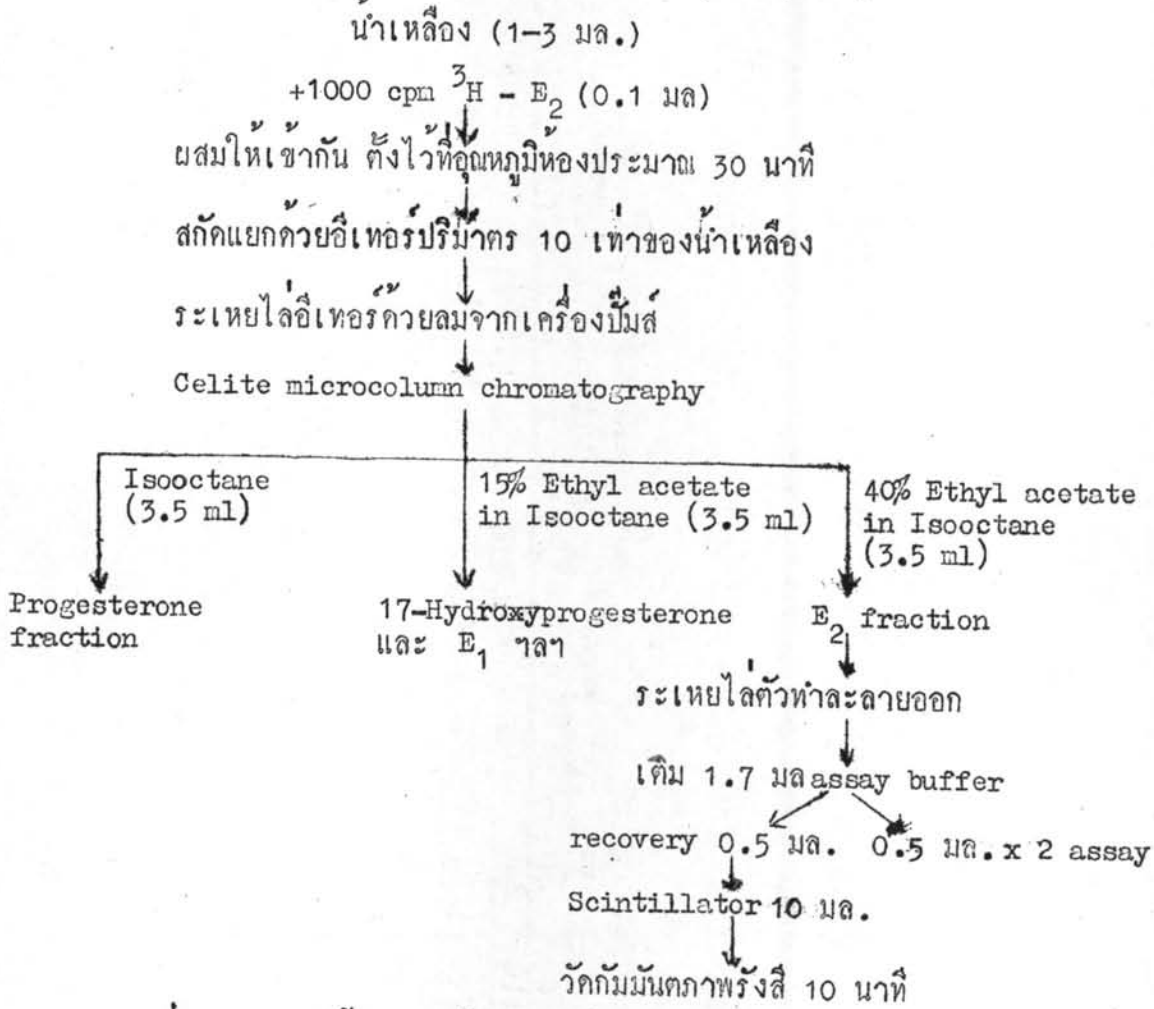
การทำ partition column chromatography ใช้ Celite เป็น supporter เพราะว่า Celite มีคุณสมบัติไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยก และ Ethylene glycol

เป็น stationary phase ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างเนื้อของ Celite mobile phase ซึ่งเป็นตัวทำลายที่จะพาสารที่ต้องการแยกออกมา มี 3 ชนิด คือ

1. Isooctane ซึ่งเป็น non polar solvent จะแยกเอา non polar steroids เช่น โปรเจสเตอโรน ฯลฯ ออกมา

2. 15% Ethyl acetate in Isooctane จะมี polarity เพิ่มขึ้น จะแยกเอาสเตอรอยด์ที่ค่อนข้าง polar เช่น 17-hydroxy-progesterone และ E_1 ฯลฯ ออกมา

3. 40% Ethyl acetate in Isooctane มี polarity เพิ่มมากขึ้น จะแยกเอาสเตอรอยด์ที่มี polarity สูงกว่าส่วนที่กล่าวมาข้างต้น เช่น E_2 ออกมา



รูปที่ 4 การสกัดน้ำเหลืองด้วยอีเทอร์, การทำ E_2 ให้บริสุทธิ์ด้วย Celite microcolumn และการวัดปริมาณ E_2 (ดัดแปลงจาก Abraham และคณะ, 1971)

7.2 การวัดปริมาณด้วยวิธี RIA

เอาส่วนของ E_2 (40% Ethyl acetate in Isooctane) ซึ่งได้จาก Celite microcolumn เป่าให้แห้งด้วยลมจากเครื่องปั๊มอากาศ เมื่อแห้งแล้วเติม 1.7 มล.assay buffer แบ่ง 0.5 มล. เติม Scintillator 10 มล. แล้ววัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง Liquid scintillation spectrometer จะได้ extraction recovery ของสารตัวอย่างนั้น ส่วนอีก 0.5 มล. (duplicate) นำไปวัดปริมาณ E_2 (Abraham, 1971)

ส่วนประกอบของสารเคมีต่าง ๆ ในหลอดทดลองซึ่งใช้ในการวัดปริมาณ E_2 มีดังนี้

ความเข้มข้นของ E_2	E_2 มาตรฐานหรือตัวอย่าง (มล.)	assay buffer (มล.)	แอนติบอดี (มล.) (1:100,000)	$^3H - E_2$ (56 พิโคกรัม) (มล.)	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)
blank	–	0.6	–	0.1	0.7
0 pg.	–	0.5	0.1	0.1	0.7
2.5-1000pg*	0.5	–	0.1	0.1	0.7
สารตัวอย่าง	0.5	–	0.1	0.1	0.7

* ใช้สารละลายมาตรฐานจากข้อ 4.7 (หน้า18)

เสร็จแล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4°ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายผงถ่าน 0.2 มล. (ข้อ 4.2 หน้า 17) ลงใน reaction mixture ซึ่งแช่อยู่ในถาดน้ำแข็งเขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งแช่ไว้ในถาดน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ปั่นแยกเอาส่วนที่เป็นน้ำใสใส่ในขวด เติม Scintillator 10 มล. นำไปวัดกัมมันตภาพรังสี

7.3 การคำนวณ

สมมติให้ $^3H - E_2$ ที่เติมลงในน้ำเหลืองก่อนสกัดด้วยอีเทอร์

= a cpm.

หลังจากสกัดด้วยอีเทอร์แล้วผ่าน column เรียบร้อย เติม assay buffer 1.7มล.

แบ่ง 0.5 มล. ไปหา recovery สมมติวัดกัมมันตภาพรังสีได้ = b cpm.

∴ percentage fraction recovery $= \frac{b}{a} \times 100$

$= c$

และอีก 0.5 มล. นำไปวัดปริมาณ E_2 สมมติอ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐาน = d พิโคกรัม

∴ c เปอร์เซ็นต์มีเนื้อสาร = d "——"

ถ้า 100 "——————" $= \frac{d}{c} \times 100$ พิโคกรัม

$= X$ พิโคกรัม

ถ้าใช้น้ำเหลือง 1 มล.

∴ ในสารตัวอย่างจะมีความเข้มข้นของ E_2 = X พิโคกรัม/มล.

แต่ถ้าใช้น้ำเหลือง 2 มล.

ความเข้มข้นของ E_2 ในสารตัวอย่าง = X พิโคกรัม/2มล.

= 0.5 X พิโคกรัม/มล.

จาก percentage fraction recovery ข้างต้นสามารถหา total percentage recovery ได้ดังนี้

0.5 มล. หา percentage fraction recovery ได้ = c

1.7 มล. "——————" "——————" $= \frac{c}{0.5} \times 1.7$

∴ total percentage recovery $= 3.4\ c$

การหา percentage recovery อาจทำได้อีกวิธีหนึ่ง คือ เติมสารมาตรฐาน E_2 ที่ทราบปริมาณลงในน้ำเหลืองผู้ชาย

สมมติเติมสารมาตรฐาน E_2 ลงในน้ำเหลือง = A พิโคกรัม/มล.

แต่น้ำเหลืองผู้ชาย 1 มล. มีความเข้มข้น E_2 = B "——"

∴ น้ำเหลืองที่เติมสารมาตรฐาน E_2 มีความเข้มข้น = A + B พิโคกรัม/มล.

แต่เมื่อวัดปริมาณ E_2 โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน

และแก้ recovery ให้ถูกต้องแล้ว ได้ความเข้มข้น E_2 = Y พิโคกรัม/มล.

ความเข้มข้นของ E_2 A+B พิโคกรัม วัดได้ Y พิโคกรัม

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

$\therefore$ percentage recovery $= \frac{Y}{A+B} \times 100$

8. <u>เปรียบเทียบ Immunological property ของสารที่สกัดได้จากน้ำเหลืองสตรีตั้งครรภ์กับสารละลายมาตรฐาน E_2</u>

เนื่องจากการทดสองหาความจำเพาะของแอนติบอดีไม่อาจจะทำได้สมบูรณ์ ดังนั้นเพื่อที่จะแสดงให้เห็นว่าวิธีการหาปริมาณ E_2 ของการวิจัยนี้เชื่อถือได้ จึงสกัดสาร E_2 จากน้ำเหลืองของสตรีตั้งครรภ์ แล้วทำ Serial dilution เทียบกับสารละลายมาตรฐาน E_2

การทดลองนี้ดัดแปลงวิธีของ Albano และ Ekins (1970) โดยใช้น้ำเหลืองของสตรีตั้งครรภ์ 5 เดือน จำนวน 2 มล. สกัดด้วยอีเทอร์ 20 มล. แยกเอาชั้นอีเทอร์มาระเหยแห้ง แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย Celite microcolumn ทำการวัดปริมาณพร้อมกับการทำกราฟมาตรฐานตามข้อ 7.2 (หน้า 23) การทดลองนี้ใช้แอนติบอดี S-52#5 ซึ่งมี cross reaction กับ E_1 35%

อีกการทดลองหนึ่งทำเช่นเดียวกับข้างต้น แต่หลังสกัด E_2 จากน้ำเหลืองแล้วไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ด้วย Celite microcolumn วัดปริมาณตามวิธีข้อ 7.2 (หน้า 23) โดยใช้แอนติบอดี A# 0012 ซึ่งมี cross reaction กับ E_1 เพียง 1.23% เท่านั้น