

การวิเคราะห์คอรัทชันในพลาสติก และไมล์สภาวะ โดยวิธี คอมเพกทีฟ โปรตีน ไบอิง

นางสาว สุนา วัฒนพันธ์



006005

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2518

Competitive Protein Binding of Plasma and Urinary Cortisol

Miss Sumana Vanitchapuntu

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

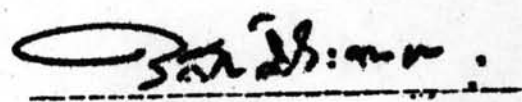
Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University


1975

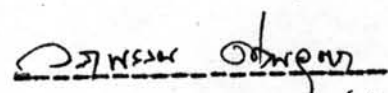
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

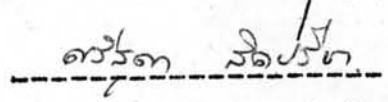


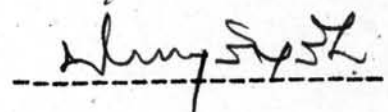
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

 ประธานกรรมการ

 กรรมการ

 กรรมการ

 กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย แพทย์หญิงศรีสุภา ลิตปรีชา

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การวัดระดับคอร์ติซอลในพลาสมา และในปัสสาวะ โดยใช้วิธี คอมแพคทีฟ  
โปรตีน ไบคิง  
ชื่อ นางสาว สุนนา วิชัยพันธุ์  
ปีการศึกษา 2518

### บทคัดย่อ

การวัดคอร์ติซอลโดยใช้วิธีคอมแพคทีฟ โปรตีน ไบคิง อาศัยหลักการที่ คอร์ติซอลในพลาสมา หรือในปัสสาวะ ไปแทนที่คอร์ติซอลที่ติดลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ในโปรตีนกลอบบูลิน ที่จับกับ คอร์ติซอลได้อย่างจำเพาะ มีผู้ใช้วิธีนี้ในการวัดปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมาของคนมาก่อนแล้ว เช่น Murphy และคณะ (1963, 1967), Jeffery และคณะ (1971) และ Florelli และคณะ (1972) และในการวัดปริมาณคอร์ติซอลในปัสสาวะ โดย Beardwell และคณะ (1968) และ Murphy (1968) เป็นต้น

วิธีคอมแพคทีฟ โปรตีน ไบคิง ที่ใช้ในการศึกษานี้ กำหนดตามวิธีการของ Murphy (1967, 1968) เมื่อเพิ่มปริมาณ Fuller's earth หรือเพิ่มอุณหภูมิในการอินคิวเบต หรือเพิ่มความเข้มข้นของพลาสมาใน corticosteroid binding globulin (CBG) จะทำให้กราฟมาตรฐานแบน แต่การเพิ่มเวลาในการอินคิวเบต ไม่ทำให้กราฟมาตรฐานเปลี่ยนแปลง วิธีนี้ สามารถวัดปริมาณคอร์ติซอลได้ต่ำสุด 8.2 pg/tube มีความแม่นยำดี และ percentage recovery ในการวัดคอร์ติซอลในพลาสมาและในปัสสาวะ มีค่า 96.69 และ 102.12 ตามลำดับ วิธีนี้มีความจำเพาะอยู่ในระดับที่น่าพอใจ

ไตแสดงปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมา เมื่อเวลา 8 - 9 น. และ 15 - 16 น. และ ปัสสาวะ 24 ช.ม. ในคนปกติจำนวน 108 คน แบ่งตามช่วงอายุต่าง ๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณคอร์ติซอลในผู้ชายและผู้หญิง และคนอายุต่างกัน การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของคอร์ติซอลในปัสสาวะทุก 2 ช.ม. ตลอดเวลา 24 ช.ม. ในคนปกติ จำนวน 4 คน พบว่าระดับของคอร์ติซอลจะขึ้นสูงสุดในเวลาประมาณ 6 - 9 น. และลดลงต่ำสุดเวลาเที่ยงคืน

การศึกษาการสำรองของคอร์ติซอลในต่อมหมวกไตชั้นนอก (adrenal cortical reserve) ทำโดยการวัดปริมาณของคอร์ติซอล หลังจากให้ ACTH 25 units ทางกล้ามเนื้อ ในคนปกติ 11 คน ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ทำการทดลองในตอนเช้า 7 คน และในตอนบ่าย 4 คน พบว่าปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมาตอนเช้าและตอนบ่ายก่อนให้ ACTH มีค่า =  $8.98 \pm 2.15$  (S.D.)  $\mu\text{g} \%$  และ  $5.54 \pm 1.28$  (S.D.)  $\mu\text{g} \%$  ภายหลังให้ ACTH ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมาจะเพิ่มขึ้นในปริมาณใกล้เคียงกัน คือมีค่า =  $26.09 \pm 1.68$  (S.D.)  $\mu\text{g} \%$  และ  $22.60 \pm 3.12$  (S.D.)  $\mu\text{g} \%$  ตามลำดับ และระดับคอร์ติซอลภายหลังการฉีด ACTH ทั้ง 2 เวลา ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อศึกษามวลของ ACTH ปริมาณเดียวกัน ต่อระดับคอร์ติซอลในปัสสาวะ 24 ช.ม. ในคนปกติ 10 คน พบว่า การให้ ACTH ทางเส้นเลือดดำ 25 units ภายในเวลา 8 ช.ม. ทำให้ระดับคอร์ติซอลเพิ่มจากเดิมประมาณ 10 เท่า คือจาก  $33.15 \pm 8.83$  (S.D.)  $\mu\text{g} / 24\text{-hr. urine}$  เป็น  $303.39 \pm 44.69$  (S.D.)  $\mu\text{g} / 24\text{-hr. urine}$ .

Thesis Title Competitive Protein Binding of Plasma and Urinary Cortisol  
Name Miss Sumana Vanitchapuntu Department Biochemistry  
Academic Year 1975

#### Abstract

Assay of cortisol by competitive protein binding (CPB) procedure is based on the displacement of a small amount of radioactively tagged cortisol from the specific corticosteroid binding globulin (CBG) in vitro. The competitive protein binding assay was used to determine human plasma cortisol by Murphy et al (1963, 1967), Jeffery et al (1971), Florelli et al (1972) and to determine 24 - hr. urinary cortisol by Beardwell et al (1968), Murphy (1968), etc.

The competitive protein binding used in this study was based on those of Murphy's (1967, 1968). When Fuller's earth content or incubating temperature or plasma concentration in CBG was increased, standard curve was flat, but there was no change when incubating time was increased. The sensitivity of this method was 8.2 pg/tube. The precision was good. The percentage recoveries in plasma and urinary cortisol were 96.69 and 102.12 respectively. The specificity of the method was satisfactory. Twenty-four hr. urinary cortisol and 8 - 9 a.m. and 3 - 4 p.m. plasma cortisol determinations were carried out in 108 normal subjects. There was no appearance of sex and age difference in both plasma and urinary concentrations. Study on diurnal variation of cortisol which was carried out by determination of 2 - hr. urine from 4 subjects and it was found

that cortisol reached its maximum level at 6 - 9 a.m. and decreased to a minimum level at midnight.

Adrenal cortical reserve was studied by determination of plasma cortisol after intramuscular administration of 25 units of ACTH into 11 normal subjects who were divided into two groups. Seven of them were studied in the morning and the rest were studied in the afternoon. It was found that plasma cortisol in the morning and in the afternoon before giving ACTH were  $8.98 \pm 2.15$  (S.D.)  $\mu\text{g} \%$  and  $5.54 \pm 1.28$  (S.D.)  $\mu\text{g} \%$  and after giving ACTH were  $26.09 \pm 1.68$  (S.D.)  $\mu\text{g} \%$  and  $22.60 \pm 3.12$  (S.D.)  $\mu\text{g} \%$  respectively. The mean values after stimulation in both cases were not significantly different.

Similar study on the effect of ACTH on 24-hr. urine in 10 normal subjects showed that infusion of 25 units of ACTH in 8 hours caused a 10 fold increase of urinary cortisol.



กติกการประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ และขอบคุณท่านผู้รายนามต่อไปนี้ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือให้วิทยานพนชนสำเร็จลงด้วยดี

- |                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ศรีสุภา | สิทปริษา |
| รองศาสตราจารย์ กร. กำจักษ์           | นงคณกุล  |
| ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ นิกร     | กุสุมสิน |
| อาจารย์ กร. วราพรพรณ                 | กานอุตรา |

เจ้าหน้าที่หน่วยคอมพิวเตอร์และเมคาบอลิซึม แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้



สารบัญ

	หน้า
บทกัยย่อ	ง
กิติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ฅ
รายการตารางประกอบ	ฉ
รายการรูปประกอบ	ฐ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์และวิธีทำเนนการ	9
- สารเคมี	9
- บุคคลที่ใช้ในการทดลอง	9
- การเก็บตัวอย่าง	10
- การเตรียม CBG - <sup>3</sup> H	10
- การหาปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมา และในมัสสาวะ	11
- การคำนวณ	12
ผลการทดลอง	15
- การหาปริมาณ Fuller's earth ที่เหมาะสม เพื่อแยก free cortisol จาก bound cortisol	15
- การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Fuller's earth ที่มีผลต่อกราฟมาตรฐาน	15
- การเปลี่ยนแปลงจุดหมุนที่มีผลต่อการแยก free cortisol จาก bound cortisol โดย Fuller's earth ปริมาณ 12 มิลลิกรัม	15
- การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ CBG ที่มีผลต่อกราฟมาตรฐาน	19
- การเปลี่ยนแปลงเวลาในการอินคิวเมทที่มีผลต่อกราฟมาตรฐาน	19
- กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการหาปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมา และในมัสสาวะ	19
- % recovery เปรียบเทียบของกราฟมาตรฐานที่ทำในสภาวะต่าง ๆ	23
- Sensitivity study	25

- Reliability ของวิธีทดลอง	26
- ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมาเวลา 8 - 9 น. และ 15 - 16 น. และปัสสาวะ ซึ่งเก็บ 24 ชม. ในคนปกติ ช่วงอายุต่าง ๆ	36
- diurnal variation ของคอร์ติซอลในพลาสมา และปัสสาวะ	41
- ACTH stimulation test	41
วิจารณ์ผลการทดลอง	50
สรุปผลการทดลองและข้อ เสนอแนะ	59
บรรณานุกรม	63

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1 Sensitivity study	25
2 ความแม่นยำของวิธีวัดปริมาณคอร์ติซอลใน pooled plasma และปัสสาวะหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน (within assay)	26
3 ความแม่นยำของวิธีวัดปริมาณคอร์ติซอลใน pooled plasma และปัสสาวะ เมื่อทำการทดลองต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน (between assay)	28
4 แสดง percentage recovery ของ plasma และ urinary extraction	30
5 ก percentage recovery ที่ได้จากการเพิ่มสารละลาย มาตรฐาน คอร์ติซอลปริมาณต่าง ๆ ลงใน pooled plasma	31
5 ข percentage recovery ที่ได้จากการเพิ่มสารละลาย มาตรฐาน คอร์ติซอลปริมาณต่าง ๆ ลงในปัสสาวะ	31
6 ก Specificity ของวิธีทดลองนี้ ทดสอบกับสเตียรอยด์ ออร์โมนสังเคราะห์	32
6 ข Specificity ของวิธีทดลองนี้ ทดสอบกับสเตียรอยด์ที่หลังจาก ค่อมหมวกไตชั้นคอร์เทกซ์	34
7 ก ผลการทดลองแสดงปริมาณปกติของคอร์ติซอลในพลาสมา เวลา 8 - 9 น. และ 15 - 16 น. ( $\mu\text{g} \%$ )	37
7 ข ผลการทดลอง แสดงปริมาณปกติของคอร์ติซอลในปัสสาวะ 24 ชม. ( $\mu\text{g}/24 \text{ hr. urine}$ )	38
8 ก การเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมา เวลา 8 - 9 น. และ 15 - 16 น. ในชายและหญิงช่วงอายุต่าง ๆ โดยใช้ t - test	39
8 ข การเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณคอร์ติซอลในปัสสาวะ 24 ชม. ในชายและหญิง ช่วงอายุต่าง ๆ โดยใช้ t - test	40

ตารางที่

ฉ  
หน้า

9 ก	ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมา เวลา 8 - 9 น. ก่อนและภายหลัง การให้ ACTH 25 units 1 ชม.	44
9 ข	ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมา เวลา 14 - 16 น. ก่อนและภายหลัง การให้ ACTH 25 units 1 ชม.	46
10	ปริมาณ Creatinine ในปัสสาวะ, ปริมาณ 17 - คีโตสเตียรอยด์, 17 - ไฮดรอกซีคอร์ติโคสเตียรอยด์ และคอร์ติซอลในปัสสาวะ ก่อนให้ ACTH ขณะให้ ACTH และภายหลังจากให้ ACTH 25 units	47
11	ปริมาณปกติของคอร์ติซอลในพลาสมา	53
12	ปริมาณปกติของคอร์ติซอลในปัสสาวะ 24 ชม.	55

รายการรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1 ส. เกี่ยวรอยคัสอร์โมนที่หลังจากคอมหมวกไคสน์คอร์เทกซ์	2
2 สอร์โมนเพทที่หลังจากคอมหมวกไคสน์คอร์เทกซ์	3
3 แสดงปริมาณ Fuller's earth ที่เหมาะสมเพื่อแยก free cortisol จาก bound cortisol	16
4 ผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ Fuller's earth ที่มีผลต่อกราฟมาตรฐาน	17
5. ผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่มีผลต่อการแยก free cortisol จาก bound cortisol โดย Fuller's earth	18
6 ผลการทดลอง การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ CBG ที่มีผลต่อกราฟมาตรฐาน	20
7 ผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงเวลาในการอินคิวเบทที่มีผลต่อกราฟมาตรฐาน	21
8 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการหาปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมา และในปัสสาวะ	22
9 เปรียบเทียบปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมาเวลา 8 - 9 น. และ 15 - 16 น. ในชายและหญิงช่วงอายุต่าง ๆ	42
10 ก. diurnal variation ของคอร์ติซอลในปัสสาวะในเวลา 24 ชม. ในผู้หญิง 2 คน	43
10 ข. diurnal variation ของคอร์ติซอลในปัสสาวะในเวลา 24 ชม. ในผู้ชาย 2 คน	43
11 ก. ปริมาณคอร์ติซอลในพลาสมา เวลา 8 - 9 น. และ 14 - 16 น. ก่อนและภายหลังการให้ ACTH 25 units	45
11 ข. ปริมาณคอร์ติซอลในปัสสาวะ 24 ชม. ก่อน, ขณะ และภายหลังการให้ ACTH 25 units	45