



1. Toppozada, M., Hafez, E.S.E. Injectable Contraceptives in Human Reproduction Conception and Contraception (Hafez E.S.E. ed) 2<sup>nd</sup> ed. pp.604-632. Detroit, Michigan, 1980.
2. Dziuk, P.J. and Cook, B "Passage of Steroids through Silicone Rubber" Endocrinology. 78(1) (1966) : 208-211.
3. Benagiano, G. "Long-acting Systemic Contraceptives" in Regulation of Human Fertility (Diczfalusy, E.ed.) pp.345. WHO Symposium, Moscow, 1976.
4. PIACT Product News, Volume 4 Number 1, March 1982.
5. Reproduction Report "Injectables and Implants" Series K Number 2, 1983.
6. Fotherby, K. "Factors Affecting the Duration of Action of the Injectable Contraceptive Norethisterone enanthate" Contraception Delivery System 2(3), (1981) : 249-257.
7. \_\_\_\_\_. "Occurrence of Ovulation in Women Receiving the Injectable Contraceptive Norethisterone enanthate" Contraception 18(5), (1978) : 535-542.
8. Goebelsmann, U. et al "Serum Norethisterone Concentrations following Intramuscular Norethisterone enanthate Injection Effect upon Serum FSH, LH, Estradiol and Progesterone" Contraception 19(1979) : 283-312.
9. Weiner, E. and Johansson, E.D.B. "The Influence of Norethisterone enanthate on Ovarian function" Acta Endocrinologica 83(2), (1976) : 386-392.

10. Werawatgoempa, S. et al "The Effect of Injectable Norethisterone enanthate on Ovarian Hormones in Thai Woman" Contraception 21 (3), (1980) : 299-309.
11. Mahgoub, S.E.L. and Karim, M. "The long-term Use of Injectable Norethisterone enanthate as a Contraceptive" Contraception 5(1), (1972) : 21-29.
12. Zanartu, J. and Navarro, C. "Fertility Inhibition by an Injectable Progestogen Acting for Three Months : A Clinical Survey of 130 Fertile Woman Treated with Norethisterone enanthate" Obstetrics and Gynecology 31(5), (1968) : 627-633.
13. Mill, T.M. et al "The Metasolic Clearance rate and Urinary Excretion of Oral Contraceptive Drug Norethisterone" American Journal of Obstetrics and Gynecology 120(6), (1974) : 763-772.
14. Kamyab, S. et al "Metabolism and Tissue Distribution of Norethisterone and Norgestrel in Rabbits" Journal Endocrinology 39, (1967) : 423-435.
15. Yalow, R.S. and Berson, S.A. "Assay of Plasma Infuline in Human Subjects by Immunological Method" Nature 184 (1959) : 1648-1652.
16. Back, D.J. et al "Studies on the Enzymatic Clearance of Norethisterone enanthate" Contraception 23 (1981) : 125-132.
17. Saxena, B.N. et al "Radioimmunoassay of Serum Norethisterone enanthate Levels in Women after Intramuscular Administration" Journal of Steroid Biochemistry 8, (1977) : 1111-1119.

18. Howard, G. Warren, R.J. and Fotherby K. "Plasma Level of Norethisterone in Women Receiving Norethisterone enanthate Intramuscularly" Contraception 12, (1975):45-52.
19. Fotherby, K. and Koetsawang, S. "Metabolism of Injectable Formulations of Contraceptive steroids in obese and Thin Women" Contraception 26(1), (1982) : 51-58.
20. John G. Wagner. "Linear Compartment Models" in Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics, 1<sup>st</sup> ed., pp.57-61, Drug intelligence Publication, Hamilton, Illinois, 1975.
21. เต็มศรี ชำนิจารกิจ และ บุพา อ่อนท้วม. "สัหสัมพันธ์และความถดถอยที่เป็นเส้นตรง" สถิติวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ 1(สิงหาคม 2523) : 121-132.
22. Sang, G.W. et al "Pharmacokinetics of Norethisterone enanthate in Humans" Contraception 24(1), (1981) : 15-27.
23. WHO TASK force on long-acting Systemic Agents for the Regulation of Fertility" Multinational Comparative Clinical Evaluation of two Long-acting Injectable Contraceptive Steroids : Norethisterone enanthate and Medroxyprogesterone acetate I. Use-effectiveness". Contraception 15(1977) : 513-533.
24. Fotherby, K. and Khan, F.S. "In vitro Hydrolysis of 19- Norsteroid esters" Journal steroid Biochemistry 13(1980) : 461-462.
25. Giwa-Osagie, O.F. et al "Norethisterone enanthate as an Injectable Contraceptive : Use of a Modified Dose Schedule" British Medical Journal 1 (6128), (1978) : 1660-1662.

26. WHO Task Force on Long-action Systemic Agents for the Regulation of Fertility. "Multinational Comparative Clinical Evaluation of Two Long-acting Injectable Contraceptive Steroid : Norethisterone enanthate and Depomedroxyprogesterone acetate II Bleeding Patterns and Side Effects" Contraception 17(1978) : 395-406.
27. Leiman, G. "Depomedroxyprogesterone acetate as a Contraceptive Agent " Its Effect on Weight and Blood Pressure" American Journal of Obstetrics and Gynecology 144(1), (1972) : 97-102.
28. Virutamasen, P. et al. "A Clinical and Metabolic Study of Norethisterone enanthate in Thai woman" Contraception 22(4), (1980) : 397-408.
29. Kesseru - Koos, E. et al "Fertility Control with Norethisterone enanthate A Long-acting Parenteral Progestagen" Acta Europaea Fertilitatis 4(4), (1973) : 203-221.
30. Ekins, R.P. "Basic Principle and Theory" British Medical Bulletin 30, (1974) : 3-11.
31. \_\_\_\_\_ . and Newman, B. (1970) "Theoretical Aspects of saturation analysis. P.11, in (Diczfalusy, E.ed.) 2<sup>nd</sup> Symposium, Steroid Assay by Protein Binding. Karolinska symposia. Geneva.
32. Abraham, G.E. "Radioimmunoassay of Ste in Biological Materials" Acta Endocrinologica Suppl. 75 (1974) : 1-42.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักการของ RIA (Radioimmunoassay)

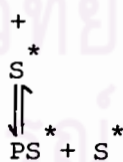
การหาปริมาณสารโดยวิธี RIA มีหลักเกณฑ์ทั่วไปเหมือนวิธี competitive protein binding หรือวิธี saturation analysis (30) คือถ้า S เป็นสารที่ต้องการหาปริมาณ P เป็น receptor reagent ที่มีความจำเพาะต่อการรวมตัวกับ S

เมื่อ S ทำปฏิกิริยากับ P ซึ่งความเข้มข้นคงที่ ขณะปฏิกิริยาถึงสมดุลแล้วจะเขียนสมการอย่างง่ายได้เป็นดังนี้



จากสมการ ความเข้มข้นของ P คงที่ เพราะฉะนั้นการเกิด PS สัมพันธ์กับ S เนื่องจาก S มักจะมากกว่า P เมื่อเกิดสมดุลแล้ว จะมี S เหลือ

เพื่อจะวัดปริมาณสาร S จะต้องมีส่วน S\* ซึ่งเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเหมือนสาร S แต่ต่างกันว่า S\* เป็นสารติดสัณฐานสี (labelled compound) S และ S\* ควรจะทำปฏิกิริยาเคมีกับ P ได้เหมือนกัน (31) เมื่อมีส่วน S\* เพิ่มเข้ามาในปฏิกิริยาเคมีสมการเคมีจึงเขียนใหม่ ดังนี้

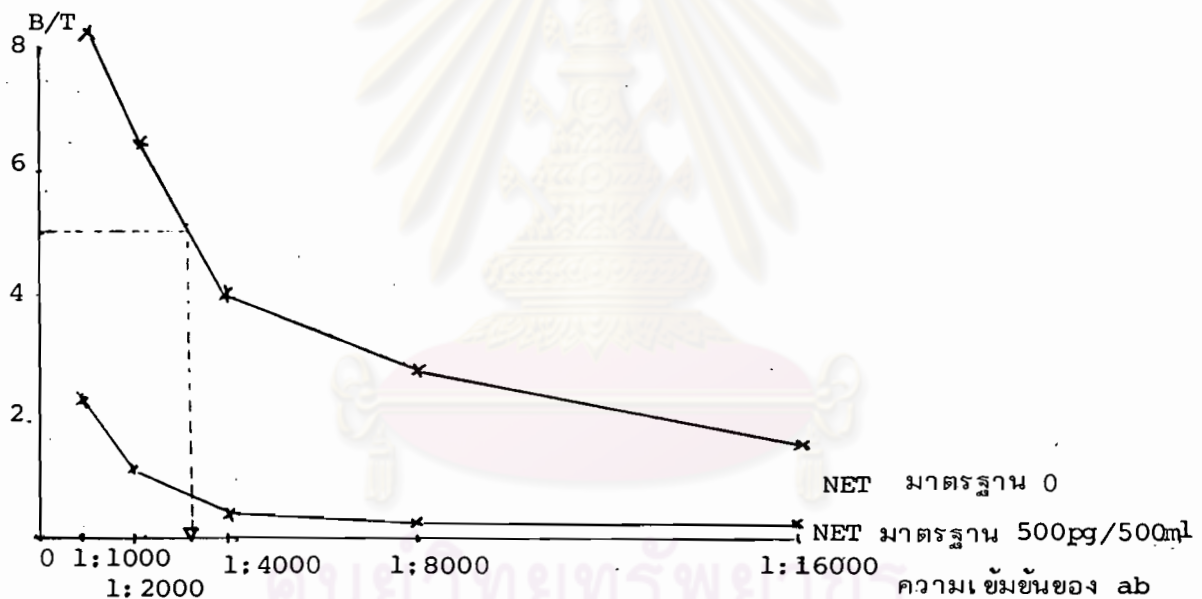


ในกรณีที่สาร P และ S\* มีค่าคงที่ ถ้า S มากจะมี PS มาก และได้ PS\* ลดลง ดังนั้น จึงมี S\* เหลือเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของสารตัวอย่างจะหาได้โดยการเปรียบเทียบ PS\* ที่ได้กับ PS\* ที่เกิดกับสารละลายมาตรฐาน



### 1. การหาความเข้มข้นของแอนติบอดี Ab (antibody) ที่เหมาะสมในการวัดปริมาณ

เนื่องจาก Ab ที่ได้รับไม่ได้บอกรายละเอียดในการละลายเพื่อใช้ในการวัด จึงต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้วัดปริมาณ โดยเลือกใช้ NET มาตรฐาน 0 และ 500 pg/500 มล. ความเข้มข้นของ Ab ในหลอดทดลองแต่ละชุด คือ 1 ต่อ 1000, 1 ต่อ 2000, 1 ต่อ 4000, 1 ต่อ 8000, 1 ต่อ 16000 โดยทำตามวิธีของ RIA incubate ที่ 4°C เป็นเวลา 18 ชม. นำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง % B/T (B คือ bound complex และ T คือ จำนวนกัมมันตภาพรังสีที่เดิมลงไปหลอดปฏิบัติการ) กับความเข้มข้นของ Ab ดังรูป



จากกราฟพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ Ab ในหลอดทดลองสูง ปฏิกริยารวมตัวเป็น bound complex (B) ของ Ab กับ  $^3\text{H-NET}$  และ NET มาตรฐานก็สูงตามด้วย นั่นคือ B ขึ้นกับความเข้มข้นของ Ab โดยทั่ว ๆ ไป นิยมเลือกอัตราส่วน  $\frac{B_0^*}{T}$  เท่ากับ 50% ในการทดลองนี้เลือก Ab ที่มีความเข้มข้น 1 : 3200 ซึ่งจะได้อัตราส่วน  $\frac{B_0^*}{T}$  เท่ากับ 50%

$B_0^*$  = ปฏิกริยาการรวมกันเป็น bound complex ระหว่าง Ab กับ  $^3\text{H-NET}$  โดยไม่มี NET มาตรฐานในหลอดทดลอง

## 2. ความแม่นยำของการวัดปริมาณ NET ด้วยวิธี RIA

การวัดปริมาณของสารด้วยวิธีใด ๆ ก็ตาม จะเชื่อถือได้ต้องแสดงให้เห็นว่าวิธีนั้น มีความจำเพาะในการวัด ความถูกต้อง และความแม่นยำในการวัด ทำโดย เตรียม pool serum เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

- 2.1 ใช้ HFS เรียกกลุ่มนี้ว่า pool A ถือเป็น serum blank
- 2.2 เติมสารมาตรฐาน NET ลงใน HFS ให้มีความเข้มข้นของ NET 1000pg/ml เรียกว่า pool B
- 2.3 เติมสารมาตรฐาน NET ลงใน HFS ให้มีความเข้มข้นของ NET 5000 pg/ml เรียกว่า pool C

ทำการวัดปริมาณ NET จากทั้ง 3 pool โดยวัด pool ละ 10 ตัวอย่างทำตามวิธีของ RIA นำมาคำนวณ  $\bar{x}$ , S.D., %cv และค่า % extraction recovery (ได้จากการเติม  $^3\text{H-NET}$  ลงในน้ำเหลืองก่อนทำการสกัดด้วยอีเธอร์) จัดเป็นการหาค่าของการวัดที่เวลาเดียวกัน (intraassay) แล้วหา reproducibility โดยทำซ้ำเติมอีก 2 ครั้ง รวมเป็น 3 ครั้ง ทำให้สามารถคำนวณหาค่าการวัดต่างวันกัน (interassay)

ผล pool B intraassay ได้ %c.v. = 9.40%, 9.189%, 8.93%  
interassay ได้ %c.v. = 15.11%

$$\text{พิสัยของ pool B} = 930.558 \pm 281.24 \text{ (}\bar{x} \pm 2\text{SD)}$$

$$\text{ความแม่นยำ (accuracy)} = 93.06\%$$

pool C intraassay ได้ %c.v. = 6.55%, 5.4%, 8.4%  
interassay ได้ %c.v. = 7.173%

$$\text{พิสัยของ pool C} = 4351.2728 \pm 624.30 \text{ (}\bar{x} \pm 2\text{SD)}$$

$$\text{ความแม่นยำ (accuracy)} = 87.02\%$$

จากผลข้างต้นเมื่อดูจากค่า % c.v. ของการวัดต่างวันกัน (interassay) ไม่เกิน 20% ซึ่งอยู่ในขอบเขตที่ยอมรับได้ (32) แสดงว่าวิธีการนี้มีความแม่นยำในการวัดพอ



ที่จะเชื่อถือได้ ทิสัยของ pool B และ C เราจะนำมาทำ quality control chart เก็บเอาไว้เพื่อใช้ในการเทียบค่า internal standard ทุกครั้งที่ทำการทดลอง  $\bar{x} \pm 2SD$



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค.

## การคำนวณค่าทางสถิติ

1. ค่าเฉลี่ย (Mean;  $\bar{x}$ ) ,

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{N_x}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{N_y}$$

2. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD)

$$SD_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N_x - 1}}$$

$$SD_y = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N_y - 1}}$$

3. ค่าสัมประสิทธิ์ความเบี่ยงเบน (coefficient of variation; %c.v.)

$$\%c.v. = \frac{SD}{\text{Mean}} \times 100$$

4. การทดสอบสมมติฐาน

ตัวอย่าง การเปรียบเทียบน้ำหนักก่อนฉีดยากับหลังฉีดยาของเข็มแรกในสตรีอาสา

สมัคร

กลุ่มที่ 1 (N = 10)

ใช้การทดสอบแบบ paired "t" test

สมมติฐาน  $H_0 : \mu = 0$

$H_a : \mu \neq 0$

อาสาสมัคร เลขที่	น.น. ก่อนฉีด (สัปดาห์ที่ 1)	น.น. หลังฉีด (สัปดาห์ที่ 9)	ค่าผลต่าง d	d- $\bar{d}$	(d- $\bar{d}$ ) <sup>2</sup>
1	52.5	53.5	1.0	0.51	0.260
5	45.0	45.4	0.4	-0.09	0.008
7	58.5	61.0	2.5	2.01	4.040
9	59.0	60.0	1.0	0.51	0.260
11	57.5	58.6	1.1	0.61	0.372
13	50.7	50.4	-0.3	-0.79	0.624
15	47.5	47.0	-0.5	-0.99	0.980
17	50.8	50.0	-0.8	-1.29	1.664
19	47.0	47.0	0	-0.49	0.240
20	48.0	48.5	0.5	0.01	0.0001

$$\sum d = 4.9$$

$$\sum (d-\bar{d})^2 = 8.4482$$

$$\text{ค่าเฉลี่ยของผลต่าง } (\bar{d}) = \frac{\sum d}{n} = \frac{4.9}{10} = 0.49$$

$$\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน } (s) = \sqrt{\frac{\sum (d-\bar{d})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{8.4482}{10-1}} = \sqrt{0.9387}$$

ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (S $\bar{d}$  หรือ standard error of mean)

$$S\bar{d} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{\sqrt{0.9387}}{10} = .307$$

$$\text{สูตร paired "t" test } t = \frac{\bar{d}}{S\bar{d}} = \frac{0.49}{0.307} = 1.596$$

$$\text{ค่า } t_{.05 \text{ df}_9} = 2.262$$

เนื่องจากค่าที่คำนวณออกมาได้น้อยกว่าค่าวิกฤต (Critical value) ที่เปิดได้จากตาราง distribution of t (Two-tailed Tests)

ค่าความน่าจะเป็นของค่า t ที่คำนวณได้ตกอยู่ในเขตยอมรับสมมติฐาน จึงสรุปว่าน้ำหนักของสัตว์อาสาสมัครก่อนฉีดยา เข็มที่ 1 และหลังฉีดยา เข็มที่ 1 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอย่าง การเปรียบเทียบน้ำหนักก่อนฉีดยาเข็มแรกในสตรีอาสาสมัครกลุ่มที่ 1  
กับกลุ่มที่ 2

ใช้การทดสอบแบบ Unpaired "t" test

$$H_0 : \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_A : \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2
จำนวน (n)	10	10
ค่าน้ำหนักเฉลี่ย ( $\bar{x}$ )	51.65	53.40
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s)	5.10	3.46

$$\text{จากสูตร } SE\bar{X}_1 = \frac{s_1}{\sqrt{n_1}}, \quad SE\bar{X}_2 = \frac{s_2}{\sqrt{n_2}}$$

$$SE\bar{X}_1 = \frac{5.10}{\sqrt{10}} = 1.61; \quad SE\bar{X}_2 = \frac{3.46}{\sqrt{10}} = 1.09$$

$SE\bar{X}_1 - \bar{X}_2$  = ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย 2 ชุด (standard error

between 2 mean)

$$\begin{aligned} SE\bar{X}_1 - \bar{X}_2 &= \sqrt{(SE\bar{X}_1)^2 + (SE\bar{X}_2)^2} \\ &= \sqrt{(1.61)^2 + (1.09)^2} = \sqrt{3.78} = 1.943 \end{aligned}$$

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{SE\bar{X}_1 - \bar{X}_2} \quad \text{กรณี } n_1 = n_2$$

$$= \frac{(51.65 - 53.40) - 0}{1.943} = 0.901$$

$$\text{ขั้นแห่งความอิสระ (df)} = (n_1 - 1) + (n_2 - 1) = 18$$

$$t_{0.5, df_{18}} = 2.101 \text{ จากตาราง distribution of } t \text{ (Two-}$$

tailed Test)

ความน่าจะเป็นของค่า t ที่คำนวณได้ตกอยู่ในเขตยอมรับสมมติฐาน จึงสรุปว่า  
น้ำหนักก่อนฉีดยาเข็มแรกในสตรีอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 กับกลุ่มที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัย  
สำคัญทางสถิติ



ภาคผนวก ง.

1. วิธีคำนวณหาความถดถอยเชิงเส้นเมื่อความสัมพันธ์ของค่า y (ความเข้มข้นของระดับยาในเลือด ; ng/ml) และ x (เวลา ; วัน) เป็นแบบ exponential curve fit ดังสมการ

$$y = ae^{bx}$$

x	x <sup>2</sup>	x- $\bar{x}$	(x- $\bar{x}$ ) <sup>2</sup>	y	lny	(lny) <sup>2</sup>	xlny
35	1225	-10.5	110.25	0.907	-0.10	0.010	-3.5
42	1764	-3.5	12.25	0.653	-0.43	0.185	-18.06
49	2401	3.5	12.25	0.444	-0.81	0.656	-39.69
56	3136	10.5	110.25	0.347	-1.06	1.124	-59.36
$\Sigma$ 182	8526	0	245.00	2.351	-2.40	1.975	-120.61

$$\bar{x} = 45.5$$

$$\begin{aligned}
 \text{จากสูตร } b &= \frac{\sum x_i \ln y_i - \frac{1}{n} (\sum x_i) (\sum \ln y_i)}{\sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2} \\
 &= \frac{-120.6 - \frac{1}{4}(182)(-2.4)}{8526 - \frac{1}{4}(33124)} = \frac{-120.61+109.2}{245} \\
 &= \frac{-11.41}{245} = 0.0466
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 a &= \exp \left[ \frac{\sum \ln y_i}{n} - \frac{b \sum x_i}{n} \right] \\
 &= \exp \left[ \frac{2.4}{4} - \frac{(-0.0466)182}{4} \right] \\
 &= \exp \left[ -0.6 + 2.1203 \right] = e^{1.5203} \\
 &= 4.57
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 r^2 &= \frac{\left[ \sum x_i \ln y_i - \frac{1}{n} \sum x_i \sum \ln y_i \right]^2}{\left[ \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right] \left[ \sum (\ln y_i)^2 - \frac{(\sum \ln y_i)^2}{n} \right]} \\
 &= \frac{\left[ -120.61 - \frac{1}{4}(182)(-1.42) \right]^2}{\left[ 8526 - \frac{33124}{4} \right] \left[ 1.975 - \frac{(5.76)}{4} \right]} \\
 &= \frac{130.1881}{131.075} = 0.993
 \end{aligned}$$

2. ตัวอย่างการคำนวณหาความเข้มข้นที่เวลาใด ๆ ( $\hat{y}$ ) สัมผัสที่ 63 วัน

$$\begin{aligned}
 \text{จากสูตร } y &= ae^{-bx} \\
 &= 4.57 \cdot e^{-0.0466 \times 63} \\
 &= 0.2426
 \end{aligned}$$

3. ตัวอย่างการหาช่วงความเชื่อมั่น 95% ของ  $\mu_{y.x}$  (21)

$$\text{จากสูตร } \hat{y} - t \frac{S_{\hat{y}}}{2} \leq \mu_{y.x} \leq \hat{y} + t \frac{S_{\hat{y}}}{2}$$

กำหนดให้  $S_{y.x}$  เป็นค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการประมาณค่าในเชิงถดถอย (Standard error of estimated regression line)

$S_{\hat{y}}$  เป็นค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าประมาณ (Standard error of estimated  $y$ ) ที่ค่า  $x$  แต่ละค่า

$$\begin{aligned}
 S_{x.y} &= \sqrt{\frac{\left[ \sum (\ln y_i)^2 - \frac{(\sum \ln y_i)^2}{n} \right] [1-r^2]}{n-2}} \\
 &= \sqrt{\frac{\left[ 1.975 - \frac{(5.76)}{4} \right] [1-0.993]}{2}} \\
 &= \sqrt{\frac{0.767 \times 0.007}{2}} = \sqrt{0.002684} = 0.0518 \\
 S_{\hat{y}} &= S_{y.x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x-\bar{x})^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}}
 \end{aligned}$$

$$= 0.0518 \sqrt{\frac{1}{4} + \frac{110.25}{8526 - \frac{1}{4}(33124)}}$$

ที่เวลา 35 วัน

$$= 0.0518 \times 0.84 = 0.04351$$

จะได้ช่วงความเชื่อมั่น 95% ของ  $\mu_{y.x}$  ที่เวลา 35 วัน

$$0.90 - (4.299)(0.0435) \leq \mu_{y.x} \leq 0.90 + (4.299)(0.0435)$$

$$0.90 - 0.187 \leq \mu_{y.x} \leq 0.90 + 0.187$$

$$0.713 \leq \mu_{y.x} \leq 1.807$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติการศึกษา

ชื่อ นางสาว ศิริพร ธนะแพสัย  
วุฒิการศึกษา ปริญญาเกสรชัยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล  
ปีการศึกษา 2523-2524



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย