หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุและวิธีทำการวิจัย

1. สารเคมี

Norethisterone enanthate (Noristerat ®) ของบริษัท Schering AG Germany ขนาดบรรจุ 1 มล.(มิลลิลิตร) ซึ่งประกอบด้วย 200 มก.(มิลลิกรัม) NET-EN ใน oily solution (Caster oil : benzyl benzoate 6 : 4 โดยปริมาตร)

15, 16 ^{3}H - Norethisterone ซึ่งมี specific activity 83.43 mCi/mg (ไมโครคูรี/มิลลิกรัม)

Anti-Norethisterone-11 -Succinoyloxy-bovine serum albumin

สารมาตรฐาน norethisterone

สารเคมีข้างต้นนี้ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Schering AG Germany

Diethyl ether ของ E. merck เยอรมัน

Ethanol 95% ของ E. merck เยอรมัน

น้ำแข็งแห้ง (dry ice)

Sodium dihydrogen phosphate (Anhydrous) ของ Mallinckrodt Chemical Works สหรัฐอเมริกา

Sodium hydrogen phosphate (anhydrous) ของ Mallinckrodt Chemical works สหรัฐอเมริกา

Sodium Chloride ของ Mallinckrodt Chemical Works สหรัฐอเมริกา

Thimerosal (Ethylmercuri thiosalicylate) ของ Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา

Gelatine powder ของ Hopkin & Williams Ltd. อังกฤษ

Activated Charcoal (Norit A) ของ Serva เยอรมัน

Dextran T_{70} ของ Pharmacia Fine Chemical AB สวีเดน

Dioxane ของ Mallineckrodt Chemical Works สหรัฐอเมริกา

Toluene ของ E.merck เยอรมัน

PPO (2,5-Diphenyloxazole) ของ Sigma สหรัฐอเมริกา

2. เครื่องมือ

Rackbeta liquid Scintillation Counter model 1216 ของ LKB Wallac สวีเดน

Refrigerated Centrifuge coolspin ของ MSE อังกฤษ

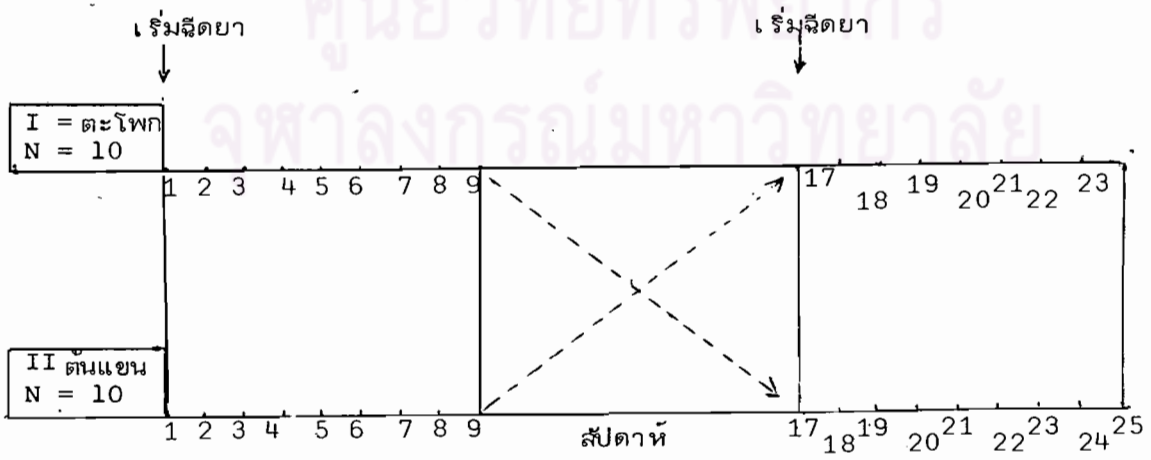
PH meter

Magnetic Stirrer

3. วิธีทำการวิจัย

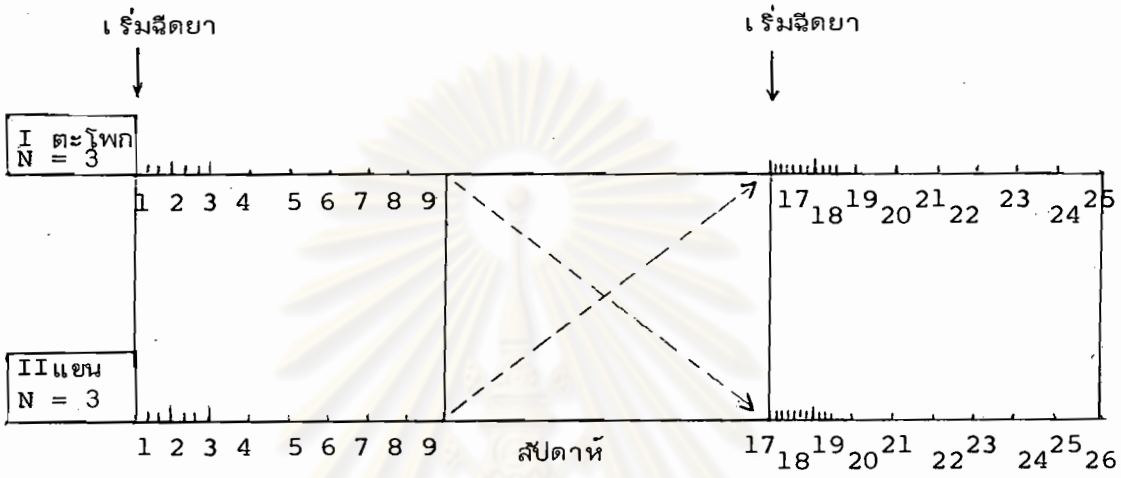
3.1 รูปแบบการวิจัย การวิจัยทำในรูปแบบ Cross-over design กล่าวคือ ได้คัดเลือกสตรีอาสาสมัคร 20 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 10 คน แล้วดำเนินการดังนี้

3.1.1 กลุ่มที่ 1 จะฉีด NET-EN ที่บริเวณตะโพกก่อน ในขณะเดียวกันกลุ่มที่ 2 ก็จะได้รับการฉีด NET-EN ที่บริเวนต้นแขนก่อน กำหนดให้เริ่มฉีดยาภายในวันที่ 1-5 ของรอบเดือน โดยที่ก่อนฉีดยาจะเจาะเลือดไว้เพื่อเป็นการควบคุมทุกครั้ง หลังจากนั้นจะเจาะเลือดสัปดาห์ละครั้ง ๆ ละ 15 มล.(มิลลิลิตร) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะเว้นระยะไป 8 สัปดาห์ แล้วเริ่มฉีดยาใหม่ในสัปดาห์ที่ 17 โดยกลุ่มแรกกลับมาฉีดที่บริเวณต้นแขนและกลุ่มที่ 2 เปลี่ยนไปฉีดบริเวณตะโพก พร้อมทั้งเจาะเลือดอีกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ๆ ละครั้ง ๆ ละ 15 มล. ดังรูป



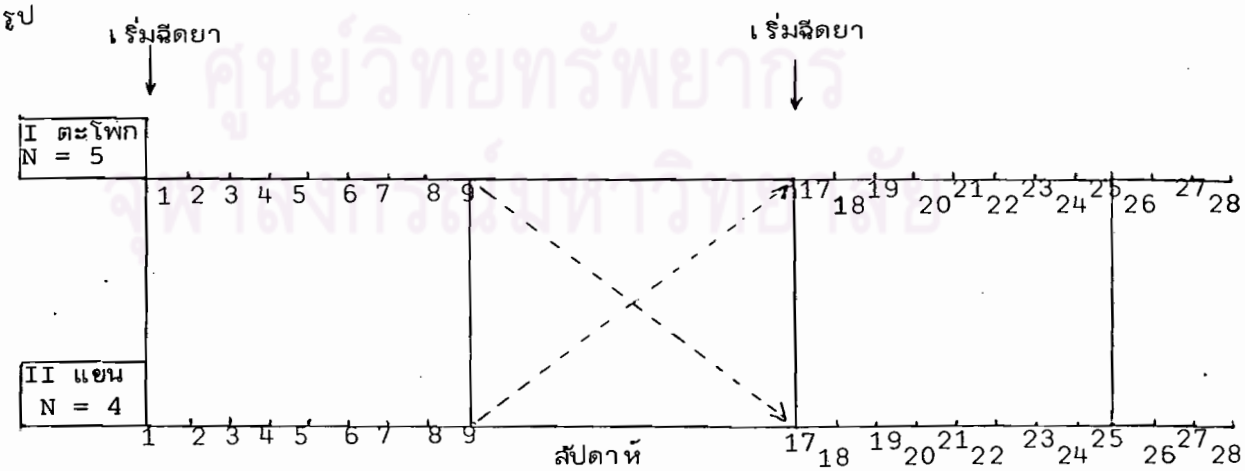
รูปที่ 4 แสดงแผนภาพการเจาะเลือดแบบ Cross over design

3.1.2 เพื่อจะสังเกตระดับยาในน้ำเหลืองเลือดที่ค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นในช่วงต้นหลังฉีดยา กำหนดให้สัตรีอาสาสมัครกลุ่มละ 3 คน เจาะเลือดเพิ่มในสัปดาห์ที่ 1-3 โดยเจาะทุกวันจันทร์ พุธ ศุกร์ และเมื่อฉีดยาเข็มที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 17 แล้ว จะมีการเจาะเลือดทุกวันเป็นเวลา 10 วัน ดังรูป



รูปที่ 5 แสดงการเจาะเลือดในช่วงต้นของการฉีดยาทั้งสองเข็ม

3.1.3 เพื่อจะสังเกตระดับยาในน้ำเหลืองเลือดตอนช่วงปลาย (นานกว่า 8 สัปดาห์หลังจากฉีดยาแล้ว) กำหนดให้สัตรีอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 จำนวน 5 คน และกลุ่มที่ 2 จำนวน 4 คน เจาะเลือดเพิ่มทุกสัปดาห์ จากสัปดาห์ที่ ถึง 28 แล้วนำมาหาปริมาณ NET ดังรูป



รูปที่ 6 แสดงการเจาะเลือดในช่วงปลายของการฉีดยาเข็มที่ 2 เพื่อหาปริมาณ NET

3.2 หลักเกณฑ์การเลือกผู้เข้าร่วมทำการศึกษา

3.2.1 สตรีอาสาสมัครที่ให้ความร่วมมือกับโครงการวิจัยและป้องกันการตั้งครรภ์ระหว่างการศึกษาด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งหรือทำหมันแล้ว

3.2.2 มีอายุระหว่าง 18-40 ปี มีบุตรที่มีชีวิตอย่างน้อย 1 คน และมีประวัติประจำเดือนปกติอย่างน้อย 3 เดือน ก่อนเข้ารับเข้าทำการศึกษา

3.2.3 มีน้ำหนักระหว่าง 45-60 กก. (กิโลกรัม) และมีฮีโมโกบินไม่น้อยกว่า 10 กรัม%

3.2.4 ไม่ได้ใช้วิธีการคุมกำเนิดโดยใช้ฮอร์โมนอย่างน้อย 3 เดือน ก่อนรับเข้าทำการศึกษา

3.3 หลักเกณฑ์ที่ไม่เลือกเข้าศึกษา

3.3.1 ตรวจพบว่าตั้งครรภ์

3.3.2 มีโรคทางอายุรศาสตร์ ดังต่อไปนี้

โรคเบาหวาน

โรคตับ

โรคความดันโลหิต

โรคต่อมธัยรอยด์ทำงานผิดปกติ

โรคไต

โรคหัวใจ

โรคของหลอดเลือด

เนื้องอกของอวัยวะสืบพันธ์หรือเต้านม

โรคจิต

โรคโลหิตจาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 หลักเกณฑ์การคัดสตรีอาสาสมัครออกจากการศึกษา

3.4.1 เกิดตั้งครรภ์ระหว่างการศึกษา

3.4.2 ย้ายที่อยู่ติดต่อไม่ได้

3.4.3 มีอาการข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ

3.4.4 มีความดันโลหิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

3.4.5 มีอาการของหลอดเลือดอักเสบ (Phlebitis)

3.5 ขั้นตอนการคัดเลือกสตรีอาสาสมัคร

3.5.1 ซักถามประวัติครอบครัว ประวัติการมีประจำเดือน และที่อยู่ของสตรีอาสาสมัครเพื่อสะดวกในการติดตาม

3.5.2 อธิบายให้ทราบถึงระยะเวลาในการศึกษา และบอกรายละเอียดต่าง ๆ เพื่อให้สตรีอาสาสมัครมีการตัดสินใจให้แน่นอนอีกครั้ง

3.5.3 ชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูง ความดัน และปริมาณฮีโมโกลบิน

3.5.4 ส่งพบแพทย์เพื่อตรวจร่างกาย ตรวจภายในและตรวจหามะเร็ง

3.5.5 นัดให้มาในวันที่ 1-5 ของรอบเดือน เพื่อเจาะเลือดและฉีดยาคุมกำเนิด NET-EN พร้อมทั้งนัดเวลาให้มาเจาะเลือดครั้งต่อไป และในการเจาะเลือดครั้งต่อไปจะต้องชั่งน้ำหนัก วัดความดัน พร้อมทั้งมีการซักถามอาการข้างเคียงด้วยทุกครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติทั่วไปของสตรีอาสาสมัคร

คุณสมบัติ	กลุ่มที่ 1 N = 10	กลุ่มที่ 2 N = 10	ความแตกต่างทางสถิติ
อายุ (ปี)	23 - 39	31 - 40	
	(32.70±4.57)	(35.80±3.49)	NS*
จำนวนบุตร	1 - 5	1 - 3	
	(2.3±1.06)	(2.2±0.63)	NS
น้ำหนัก (กิโลกรัม)	45 - 59	47 - 58.7	
	(51.65±5.10)	(53.40±3.46)	NS
ส่วนสูง (เซนติเมตร)	145 - 158.5	144 - 164	
	(151.30±4.08)	(151.55±5.10)	NS
Quetetet's index**	19.07 - 26.00	21.01 - 25.08)	
(กิโลกรัม/เมตร^2)	(22.59±2.29)	(23.26±1.32)	NS
พื้นที่ผิว (ตารางเมตร)***	1.35 - 1.59	1.38 - 1.61	
	(1.46±0.08)	(1.48±0.07)	NS
ความดันโลหิต (ม.มปรอท)	100/60-130/90	100/60-130/90	
	(112.0±0.89/70.0 ±8.16)	(112.0±12.29/71.0 ±9.94)	NS
ฮีโมโกลบิน (กรัม%)	10.0 - 13.2	10.0 - 14.0	
	(11.76±1.03)	(11.97±1.43)	NS
ค่าเฉลี่ยของรอบเดือน (วัน)	28 - 37	28 - 33	
	(31.30±2.71)	(30.0±2.11)	NS

ความแตกต่างทางสถิติใช้ Unpaired "t" test

*NS = Not Significant ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**Quetetet's index = $\frac{\text{น้ำหนัก}}{(\text{ส่วนสูง})^2} = \frac{W}{H^2}$

***พื้นที่ผิว (Surface area) ได้จาก Dubois Arch Intern Med. A.863. 1916 body surface chart ซึ่งคิดโดย Boothby and Sandiford ที่ Mayo Clinic

ตารางที่ 2 แสดงประวัติการคุมกำเนิดของสตรีอาสาสมัครก่อนเข้าร่วมทำการศึกษา

วิธีการคุมกำเนิด	กลุ่มที่ 1 N = 10	กลุ่มที่ 2 N = 10
ทำหมัน	5	5
สามีทำหมัน	1	1
ใช้ถุงยางอนามัย	3	2
ยาฉีดคุมกำเนิด	1	-
ไม่ได้ใช้วิธีการใดเลย	-	2

กลุ่มที่ 1 ฉีดยาที่ตะโพกก่อน ⟶ ฉีดที่ต้นแขน

กลุ่มที่ 2 ฉีดยาที่ต้นแขนก่อน ⟶ ฉีดที่ตะโพก

ในกลุ่ม 1 มี 1 คนที่เคยฉีดยาคุมกำเนิด NET-EN มาก่อนที่จะเข้าร่วมทำการศึกษา 11 เดือน

3.6 การเตรียมและเก็บน้ำเหลืองเลือด (serum)

เลือดของสตรีอาสาสมัครจำนวน 15 มล. เมื่อตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง เม็ดเลือดแดงจะจับตัวกันแยกออกมา เทน้ำใสใส่หลอดแก้วนำมาปั่นโดยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง (Centrifuge) ในอัตราเร็ว 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เทแยกน้ำเหลืองเลือด (sereum) ออกจากตะกอน เก็บในหลอดแก้วติดสลาก เขียนชื่อสตรีอาสาสมัคร วันที่เจาะ สัปดาห์ที่เจาะ แล้วนำไปแช่แข็งที่ -20°ซ จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ต่อไป

3.7 การเตรียมสารละลาย

3.7.1 การเตรียมสารละลาย buffer (0.1 M phosphate buffer PH 7.4)

R_x Sodium dihydrogen phosphate (anhydrous) 5.4 กรัม

Sodium hydrogen phosphate (anhydrous)	43.78	กรัม
Sodium chloride	17.6	กรัม
Thimerosal	0.2	กรัม
Gelatin	2.0	กรัม

ชั่งสารตามสูตร ยกเว้น gelatin เติมน้ำกลั่น 2 ลิตร คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัด PHให้ได้ 7.4 ถ้าไม่ได้ให้ปรับ PH โดยเติมสารละลายกรดเกลือหรือสารละลาย NaOH แล้วจึงเติม gelatin 2 กรัม ลงในสารละลาย buffer PH 7.4 อุ่นจนกระทั่ง gelatin ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในตู้เย็นที่ 4°ซ

3.7.2 การเตรียมผงถ่านความเข้มข้น 0.625%

R_X	Charcoal Norit A	0.625	กรัม
	Dextran T_{70}	0.0625	กรัม

ชั่งสารตามสูตรแล้วเติม assay buffer 100 ml คนให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4°ซ

3.7.3 การเตรียม Scintillator

ผสม toluene 4 แกลลอน PPO 132.17 กรัม และ dioxane 3 ลิตร ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ในถังขนาด 5 แกลลอน

3.7.4 การเตรียม radioactive norethisterone (^{3}H-NET)

^{3}H-NET เป็น stock solution ในสารละลาย benzene : methamol (9:1) นำมา 15 มคล.(ไมโครลิตร) เป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เติม assay buffer 20 มล. ผสมให้เข้ากันทุก ๆ 100 มคล. สารละลายนี้จะมีค่า radioactivity ประมาณ 10,000 cpm (count per minute)

3.7.5 การเตรียม HFS (Hormone free serum)

ชั่งผงถ่าน (activated charcoal) 20 มก. ใส่ลงใน serum 1 มล. เติม sodium azide ให้มีความเข้มข้น 0.1% คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 24 ช.ม. ที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นแยกเอาผงถ่านออกด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที กรองด้วย

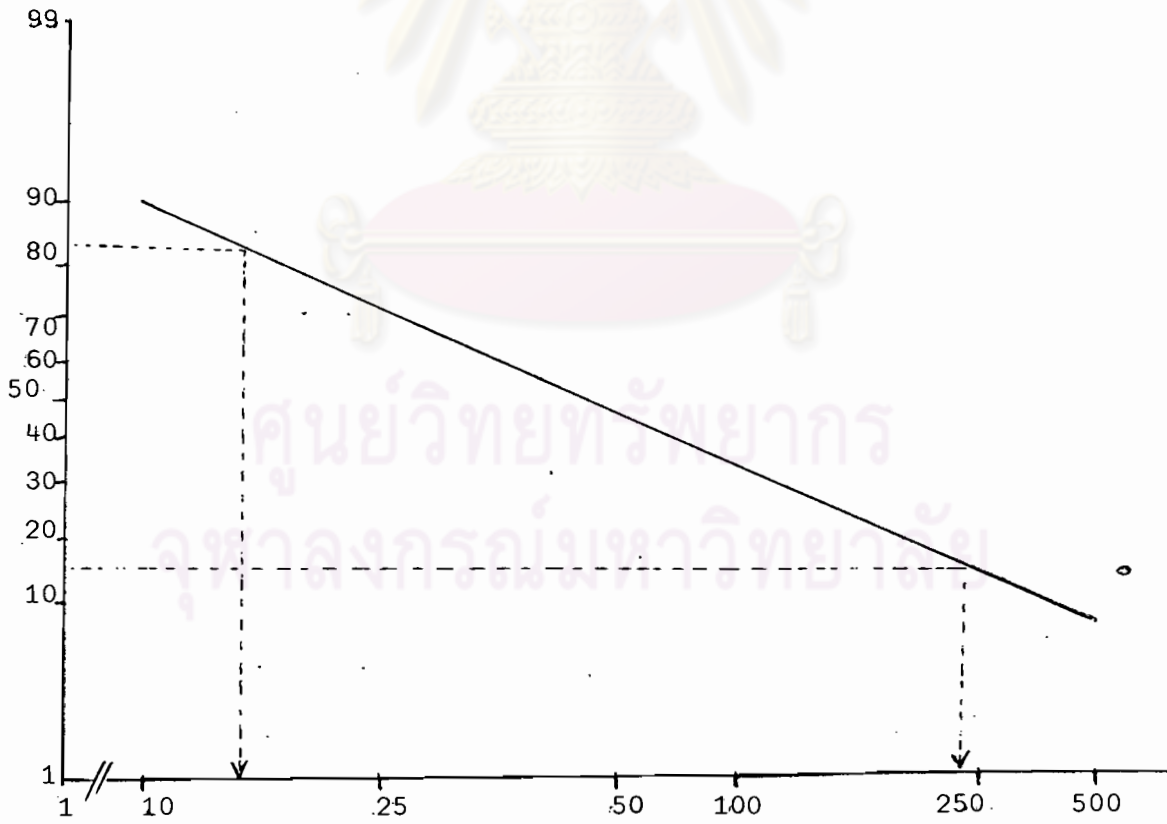
013150

I17450986

กระดาษกรอง Whatman No. 42 แล้วนำไปปั่นเพื่อแยกผงถ่านออกอีก ทำเช่นนี้จนกระทั่งผงถ่านถูกแยกออกเกือบหมด HFS ที่ได้จะมีสีชา เก็บใส่ขวดแช่แข็งที่ -20°ซ

3.7.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

Stock solution ของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 มคก/มล นำมาเจือจางจนเป็น 500 พคก/500 มคล (500 พิโคกรัม/500 ไมโครลิตร) แล้วนำมาทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 500, 250, 100, 50, 25, 10 พคก/500 มคล แล้วนำมาทำตามวิธี RIA ในขั้นตอนของการ assay หาปริมาณ นำค่า cpm ที่ได้มาคำนวณหาค่า $\%B/B_0$ จะพบว่าค่า $\%B/B_0$ที่ได้นั้นเป็นสัดส่วนกลับกันกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน เมื่อนำไปเขียนกราฟในกระดาษ *logit-logarithm โดยให้แกน y เป็น $\%B/B_0$ แกน x เป็นค่าความเข้มข้นของ NET (พคก/500 มคล) จะได้เส้นตรงดังรูป



รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่าง $\%B/B_0$ กับความเข้มข้นของ NET โดยใช้ logit-logarithm

เมื่อต้องการหาปริมาณของ NET ในน้ำเหลืองเลือด นำน้ำเหลืองเลือดนั้นไปทำตามวิธี RIA เริ่มจากขั้นตอนการสกัด นำค่า cpm ที่ได้มาคำนวณหาค่า $\%B/B_0$ นำค่ามาลากเส้นตัดกราฟมาตรฐาน จะได้ปริมาณความเข้มข้นของ NET ตามต้องการ

logit เป็นการปรับค่าทางคณิตศาสตร์ เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง ซึ่งค่า $\text{logit}(y) = \log_e(y/(1-y)) = a+b\log_e(x)$ เมื่อ $y = (B-N)/(B_0-N)$ โดยที่ N เป็น non specific binding มีค่าน้อยมากเข้าใกล้ 0 ในทางปฏิบัติจึงใช้เพียงค่า B/B_0

B = ปฏิกิริยาการรวมกันเป็น bound complex ระหว่าง ab กับ ^{3}H-NET โดยมี NET ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในหลอดทดลอง

B_0 = ปฏิกิริยาการรวมกันเป็น bound complex ระหว่าง ab กับ ^{3}H-NET โดยไม่มี NET ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในหลอดทดลอง

3.8 <u>วิธีดำเนินการวัดปริมาณ NET โดย RIA (Radioimmunoassay)</u>

ดัดแปลงจากวิธีของ ดร.สุกัญญา วีรวัฒนกุมพะ (10)

ก. <u>ขั้นตอนการสกัด</u> (Extraction)

ใช้น้ำเหลืองเลือด 0.1- 1 ml

+ 1000 cpm ^{3}H-NET (0.1 ml)

↓

ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที

↓

สกัดแยกด้วยอีเธอร์ ปริมาตร 10 เท่าของน้ำเหลืองเลือด

↓

ปั่นตลอดเวลา หลอดละ 1 นาที ด้วยเครื่อง Multi-tube Voretexer

ทำให้ NET เข้ามาละลายตัวในชั้นอีเธอร์

↓

จุ่มลงในน้ำแข็งแห้ง + อัลกอฮอล์ ชั้นน้ำเหลืองเลือดจะแข็งตัว

เทแยกชั้นอีเธอร์ออกมา

↓

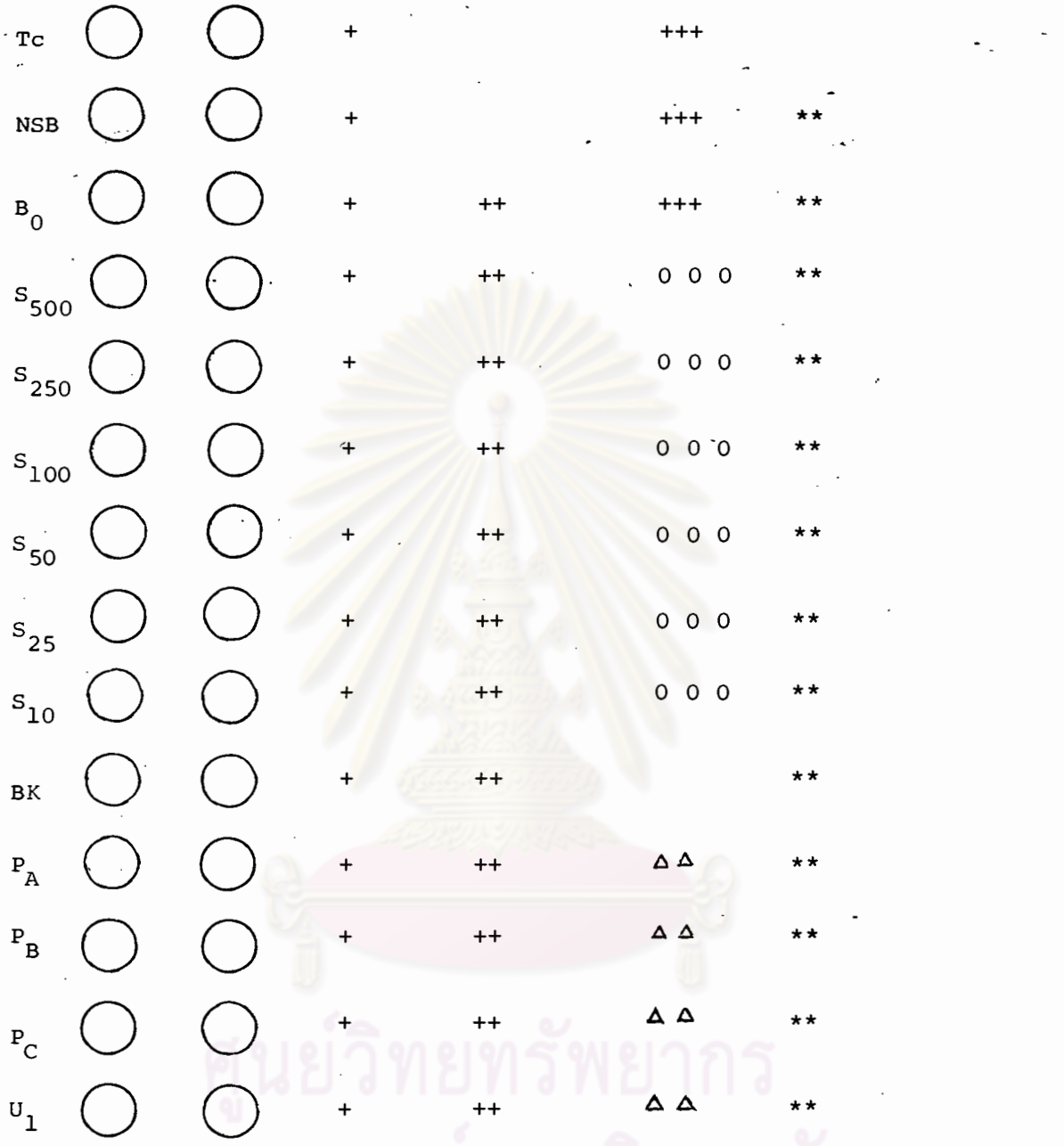
ระเหยไล่อีเธอร์ ด้วยลมจากเครื่องปั๊ม

ข. ขั้นตอนการเตรียม reaction mixture tube เพื่อจะนำไปวัดหาปริมาณ NET

ละลาย residere ที่เหลือจากการทำให้แห้ง (ซึ่งประกอบด้วย NET ในปริมาณที่มีอยู่ในน้ำเหลืองเลือด $+^{3}$H-NET ที่เติมลงไปในขั้นตอนการสกัด 1000 cpm) ใน assay buffer 1.7 มล. ใช้ไมโครไปเปตต์ ดูดสารละลายใส่หลอด reaction mixture tube (จากหลอดที่ BK ลงไปจนถึงหลอดที่เป็น U_1.....) หลอดละ 0.5 มล. ทำเทียบกัน 2 หลอด (ในรูป 8 ใช้สัญญลักษณ์ ΔΔ) แล้วนำไปเติมสารต่าง ๆ ตามขั้นตอนดังแสดงไว้ในรูป 8 ต่อจากนั้นผสมให้สารต่าง ๆ ในแต่ละหลอดเข้ากัน นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 18-24 ชม.

ขณะเดียวกัน ใช้ไมโครไปเปตต์ดูดสารละลายส่วนที่เหลือจากที่เติมลงใน reaction mixture tubeแล้ว มา 0.5 มล. ใส่ใน counting vialนำมาเติม Scintillator 5 มล. นำไปวัดกัมมันตภาพรังสีหลอดละ 5 นาที (ส่วนนี้จะเรียกว่า recovery แทนสัญญลักษณ์ด้วย R ต่าง ๆ ส่วนนี้จะเป็นประโยชน์ในการคำนวณ เนื่องจากปริมาณ NET ที่มีอยู่ในน้ำเหลืองเลือด $+^{3}$H-NET ที่เติมลงไป ในส่วนของ recoveryนี้ จะเท่ากับที่มีอยู่ใน reaction mixture tubeแต่ละหลอด)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



\+ เติม ^{3}H-NET (10,000 cpm) 0.1 มล.

++ เติม Ab 0.1 มล.

+++ เติม assay buffer จนมีปริมาตรรวม 0.7 มล.

0 0 0 เติม NET มาตรฐาน 0.5 มล.

Δ Δ เติมสารละลายที่ได้จากขั้นตอนการล้างตัด 0.5 มล.

*** เติมสารละลายผงถ่าน 0.2 มล. จะเป็นการทำในขั้นตอนต่อไป ซึ่งเป็นขั้นตอนการแยก bound complex ออกจาก free form

รูปที่ 8 การเรียง reaction mixture tube พร้อมทั้งแสดงการเติมสารตามขั้นตอนเพื่อจะนำไปวัดหาปริมาณ NET

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Tc (Blank) หรือ Total Count จะเป็นการบอกว่า ^{3}H - NET ที่เติมทุกหลอดของการทดลองมี radioactivity ประมาณ 10,000 Cpm

NSB = Non Specific Binding ซึ่งจะแตกต่างกับหลอดที่เป็น Tc ในแง่มีการเติมสารละลายผงถ่าน 0.2 มล เพื่อแยก bound complex ออกจาก free form โดยผงถ่านจะดูดซับส่วนที่เป็น free form ไว้ทำให้หลอด NSB นี้มีค่า cpm ต่ำมากเข้าใกล้ 0

B_o - หลอดที่มีปฏิกิริยารวมกันเป็น bound complex ระหว่าง Ab กับ ^{3}H - NET โดยไม่มี NET ในหลอดทดลองเลย ค่า cpm ที่ได้เป็น 50% ของหลอดที่เป็น Tc

$S_{500} \rightarrow S_{10}$ จะเป็น serial dilution ของ NET มาตรฐานในความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 500, 250, 100, 50, 25, 10, พคก/500 มคล เพื่อนำค่า% B/B_o ที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานในการทำแต่ละครั้ง

BK ถือเป็น reagent blank เนื่องจากเป็นหลอดที่มีเฉพาะ ^{3}H - NET จำนวนประมาณ 1/3 ของที่เติมลงไปในขั้นตอนการล่กัด (1/3 ของ 1,000 cpm เนื่องจากแบ่งเป็น recovery 1 ส่วน ใช้สัญญลักษณ์ R_{BK} และอยู่ใน reaction mixture tube 2 หลอดอีกหลอดละ 1 ส่วน และใช้ assay buffter แทนน้ำเหลืองเลือด เพื่อเป็นการแสดงว่า assay buffer ที่เติมลงไปไม่มีผลใดๆ ต่อปฏิกิริยาการเกิด bound bomplex และค่า cpm ที่ได้จะเท่ากับ B_o คือเป็น 50% ของ Tc

P_A = pool A ถือเป็น serum blank เนื่องจากมีการเติมน้ำเหลืองเลือดที่ปราศจากฮอร์โมนใด ๆ + ^{3}H - NET ปริมาณ 1/3 ของที่เติมลงไปในขั้นตอนการล่กัด (เติม 1,000 cpm) และในส่วน recovery จะใช้สัญญลักษณ์ R_{P_A} ที่ปกติไม่มีผลใด ๆ ต่อปฏิกิริยาการเกิด bound complex และค่า cpm ที่ได้จะเท่ากับที่ได้จาก BK และ Bo คือเป็น 50% ของ Tc

P_B, P_C = pool B และ pool C เพื่อใช้วัดความแม่นยำของการปริมาณ NET ด้วยวิธี RIA โดยการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ของค่าที่ระดับต่ำและสูงตามลำดับลงในน้ำเหลืองเลือดแล้วนำมาหาปริมาณของ NET ตามวิธีการ RIA โดยแบ่งเป็น 3 ส่วน และ 1/3 คือ Recovery ซึ่งใช้สัญญลักษณ์ R_{P_B} เป็นการตรวจสอบว่าการหาปริมาณที่ได้ออกมานั้นมีค่าตรงกับปริมาณที่เติมลงไป

ค. ขั้นตอนปั่นแยก (separation)

1. เปิดเครื่อง centrifuge ตั้งความเร็ว 3,000 รอบ/นาที และอุณหภูมิ 4 °ซ

2. นำหลอดที่ทำปฏิกิริยา (reaction mixture tube) ออกจากตู้เย็นมาแช่ในถาดน้ำแข็ง

3. เติมสารละลายผงถ่าน 0.2 มล. ลงในหลอดที่ทำปฏิกิริยา ยกเว้นหลอดที่เป็น Tc

4. จับเวลาให้แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที

5. นำไปปั่นแยกในเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 °ซ

6. นำมาเทใส่ counting vial โดยนำเฉพาะน้ำใสมาเติม scintillator vial ละ 5 ml แล้วนำไปวัดกัมมันตภาพรังสีโดยใช้เวลา vial ละ 5 นาที

ง. ขั้นตอนการคำนวณ

สมมติให้ ^{3}H-NET ที่เติมลงในน้ำเหลืองก่อนสกัดด้วยอีเธอร์ = a cpm

หลังจากสกัดด้วยอีเธอร์แล้วทำให้แห้งเติม assay buffer 1.7 ml

แบ่ง 0.5 ml ไปหา recovery สมมุติวัดได้ b cpm

$$\% \text{ fraction recovery } \frac{b}{a} \times \frac{1.7}{0.5} \times 100 = c \times \frac{1.7}{0.5} \%$$

อีก 0.5 ml นำไปวัดปริมาณ NET สมมุติอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานได้ d pg

1.7 ml มี NET $= d \times \frac{1.7}{0.5}$ pg

$c \times \frac{1.7}{0.5}$ % recovery วัด NET ได้ $d \times \frac{1.7}{0.5}$ pg

100% recovery วัด NET ได้ $d \times \frac{1.7}{0.5} \times 100 / c \times \frac{1.7}{0.5} = x$ pg

ถ้าใช้ต้นใช้ serum 0.5 ml

ดังนั้นใน serum 0.5 ml มีเนื้อสาร x pg คิดเป็น $\frac{x}{0.5}$ pg/ml

3.9 วิธีคำนวณหาค่าคงที่ของการขจัดยาออกจากร่างกาย (Elimination rate Constant) และค่าครึ่งชีพของยา (half life)

เนื่องจากยาฉีดคุมกำเนิด NET-EN นี้ ไม่มีฤทธิ์ต่อร่างกายโดยตรง แต่ออก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฤทธิ์ได้โดยเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงให้เป็น NET ก่อนจึงจะสามารถออกฤทธิ์ได้ ดังนั้น NET-EN จึงมีลักษณะเป็น prodrug และกลไกการเปลี่ยนแปลงนี้ก็ยังไม่มีหลักฐานยืนยันที่แน่นอน แต่เชื่อแน่ว่าลักษณะทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาจะต้องอยู่ในรูปแบบของ polyexponential ซึ่งอธิบายได้โดยสมการ (20)

$$C = \sum_{i=1}^{n} C_i e^{-k t} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad 1$$

จากสมการที่ 1 สามารถกระจายได้เป็น

$$C = C_1 e^{-k_1 t} + C_2 e^{-k_2 t} + \ldots\ldots + C_{n-1} e^{-k_{n-1} t} + C_n e^{-k_n t} \quad \ldots 2$$

เมื่อเวลาผ่านไป จนถึงช่วงเวลาที่ระดับยาเริ่มลดลงอย่างช้า ๆ ในช่วงเวลาดังกล่าวถือว่า การดูดซึมและการกระจายตัวของยาได้ถึงสมดุลย์กันแล้ว ซึ่งทำให้ค่า $C_1 e^{-k_1 t}$, $C_2 e^{-k_2 t}, \ldots, C_{n-1} e^{-k_{n-1} t}$ มีค่าเป็น 0 เหลือแต่เพียง $C_n e^{-k_n t}$ ซึ่งแสดงการขจัดยาออกจากร่างกาย จะตรงกับส่วนปลายของเส้นกราฟ นำมาเขียนสมการได้เป็น

$$C = C_n e^{-k_n t} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad 3$$

เมื่อเทียบกับสมการของความถดถอยเชิงเส้น ซึ่งเป็นแบบ exponential curve fit คือ

$$Y = a e^{bx} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad 4$$

จะเห็นว่า สมการที่ 3 และ 4 เป็นแบบเดียวกัน ดังนั้น

$C = Y$ คือ ความเข้มข้นของยาระดับ NET ในน้ำเหลืองเลือด ng/ml

$C_n = a$ คือ จุดตัดบนแกนตั้ง (intercept) เกิดจากการลากต่อเส้นกราฟไปตัดแกน Y

$k_n = b$ คือ ค่าคงที่ของการขจัดยาออกจากร่างกาย (Elimination rate Constant)

$x = t$ คือ เวลา; วัน, สัปดาห์ เป็นต้น

การคำนวณคิดจากสมการ

$$Y = ae^{bx}$$

$$b = \frac{\sum x_i \ln y_i - \frac{1}{n}(\sum x)(\sum \ln y_i)}{\sum x_i^2 - \frac{1}{n}(\sum x_i)^2}$$

$$a = \exp\left[\frac{\sum \ln y_i}{n} - \frac{b\sum x_i}{n}\right]$$

$$r^2 = \frac{\left[\sum x_i \ln y_i - \frac{1}{n}\sum x_i \sum \ln y_i\right]^2}{\left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}\right]\left[\sum (\ln y_i)^2 - \frac{(\sum \ln y_i)^2}{n}\right]}$$

การคำนวณหาค่า k หรือ b จากเครื่องคิดเลขแบบ Hewlett Packard 97 ตัวอย่างการแทนค่าจากสูตร แสดงในภาคผนวก ง.

จากค่าคงที่ของการขจัดยาออกจากร่างกาย เราสามารถนำมาหาค่าครึ่งชีพของยา (half life, $T_{1/2}$)(20) โดยที่

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

การหาค่าคงที่ของการขจัดยาจากร่างกาย นอกจากจะคำนวณจากสูตรแล้วยังสามารถหาได้จากกราฟโดยการเขียนกราฟค่าความเข้มข้นของระดับยาในน้ำเหลืองเลือด (แกน Y) กับเวลา (แกน x) ในกระดาษ semi-log จะได้เส้นกราฟลักษณะเป็น polyexponential และส่วนปลายของเส้นจะมีความสัมพันธ์กับการขจัดยาออกจากร่างกาย เพราะถือว่าในช่วงเวลาดังกล่าวการดูดซึมและการกระจายตัวของยาได้ถึงสมดุลย์แล้ว ค่าความลาด (slope) ของเส้นตรงส่วนปลายจะเป็นค่าคงที่ของการขจัดยาออกจากร่างกาย

ค่าคงที่ของการขจัดยาออกจากร่างกายที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการทำนายถึงระดับยาในเลือดที่เวลาใด ๆ โดยกำหนดช่วงความเชื่อมั่น 95% (95% confidence interval)

การหาช่วงความเชื่อมั่น 95% ของ μ_{yx} จากสูตร (21)

$$y - t\frac{\alpha}{2} s_y \leqslant \mu_{yx} \leqslant y + t\frac{\alpha}{2} s_y$$

ตัวอย่างการแทนค่าจากสูตรแสดงในภาคผนวก ง.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย