

บทที่ 3

Validation of Assay Technique

การประเมินผลการตรวจหาฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี RIA

1. การทดสอบความแม่นยำของการวัดปริมาณฮอร์โมน FSH Abraham (1971, 1974) เสนอการตรวจสอบความแม่นยำของการทดลองหลายๆครั้ง และคำนวณดังนี้

$$\% CV = \frac{SD}{Mean} \times 100$$

CV = coefficient of variation

SD = standard deviation

1.1 Intraassay เราตรวจสอบโดยวัดปริมาณฮอร์โมนใน FSH ของสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับ คือ สูง กลาง และต่ำใน assay เดียวกัน ตามวิธีการทดลองตรวจวัดโดยวิธี RIA ได้ค่า $\% CV = 4.12 \pm 0.66$ ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดง $\% CV$ ของ intraassay การวัดปริมาณฮอร์โมน FSH

ฮอร์โมน	ค่าฮอร์โมน	$\% CV$
FSH STD	$\bar{x} \pm SD \quad n = 3$	
ค่าต่ำ	0.87 ± 0.04	4.59
ค่ากลาง	25.56 ± 1.27	4.96
ค่าสูง	44.51 ± 1.25	2.80
	ค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm SEM$)	4.12 ± 0.66

1.2 Interassay ใช้เซรัมของหนูที่ตัดครึ่งไข่ม้วน 20 μ l และเซรัมของหนูเพศผู้ 20 μ l รวม 3 assay และหาปริมาณฮอร์โมนโดยวิธี RIA และนำมาคำนวณค่า $\% CV$ เฉลี่ยได้เท่ากับ 8.61 ± 1.59 ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดง % CV ของ interassay ในการวัดปริมาณฮอร์โมน FSH

รายการ	ปริมาณฮอร์โมน 20 μ l ($\bar{x} \pm SD$) (n* = 3)	% CV
เซรัมหนูตัดครึ่งโต	2.25 \pm 0.158	7.02
เซรัมหนูเพศผู้	0.45 \pm 0.046	10.20
	($\bar{x} \pm SEM$) ค่าเฉลี่ย	8.61 \pm 1.59

n* เป็นจำนวนครั้งของการ assay

2. coefficient of variation ของ standard curve

จากการ assay ฮอร์โมน FSH 3 ครั้ง อ่านค่าฮอร์โมน FSH และ standard จากเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อจะหาค่า coefficient of variation ของกราฟมาตรฐานทั้งสาม นำค่า cpm มาหาค่า % binding และนำมาเขียนกราฟลงในกระดาษ semilogarithm ทั้ง 3 กราฟ ดังรูปที่ 9

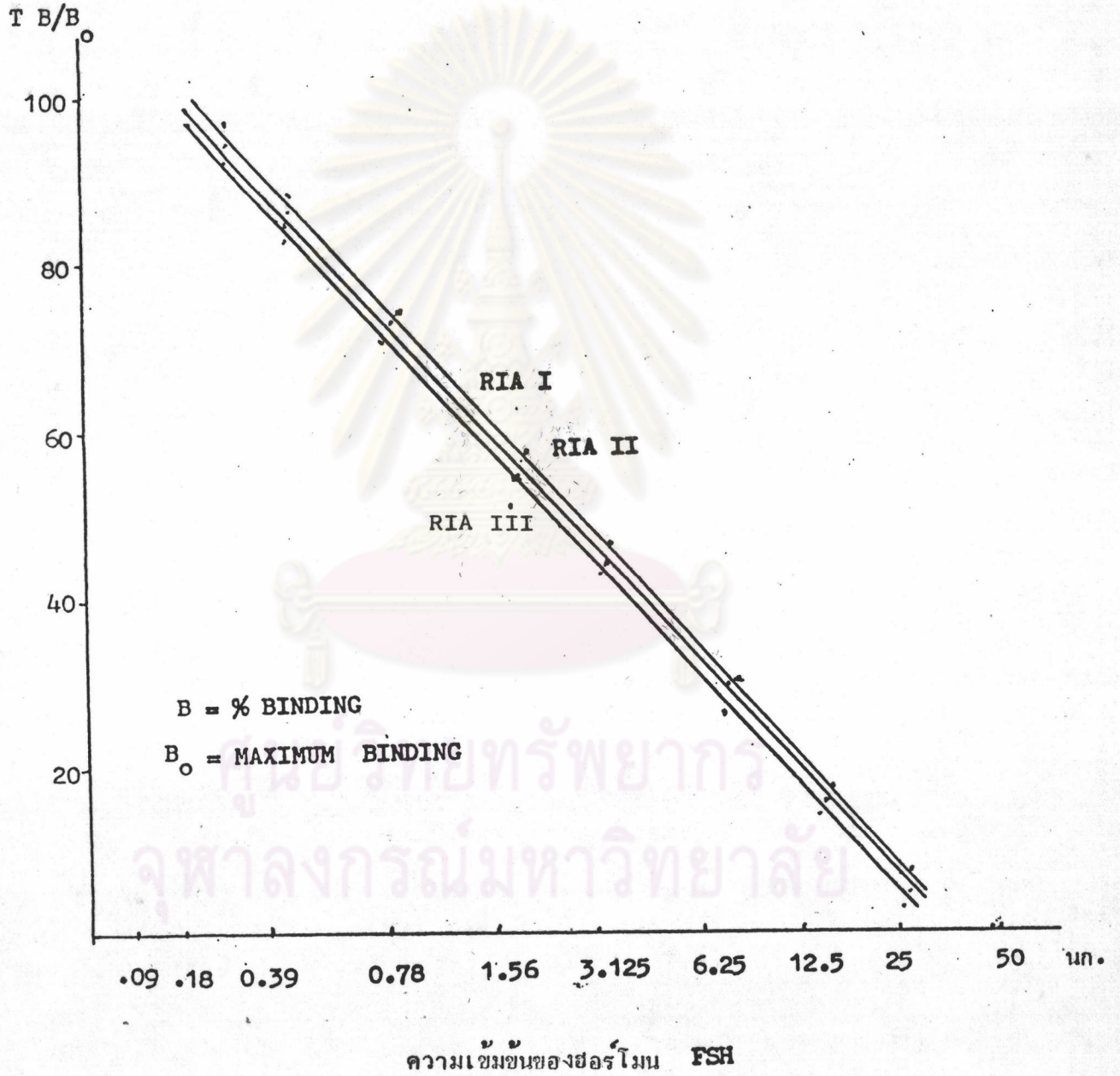
อ่านค่าจากกราฟที่ % binding เทียบกันทั้ง 3 กราฟมาตรฐาน นำมาหาค่า Mean , SD และ % CV ตามตารางที่ 5 และพบว่ามี coefficient of variation เฉลี่ยเท่ากับ 8.69 ± 0.39

3. sensitivity คือ ค่าต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในการ assay นั้นๆ สำหรับการหาฮอร์โมน FSH โดยวิธี RIA พบว่าค่าที่อ่านได้น้อยที่สุดเท่ากับ 0.95 นก./1 มล. ดังนั้น sensitivity จากการทดลองนี้เท่ากับ 0.95 นก./มล.

4. specificity ทำการทดลองโดยการนำฮอร์โมนมาตรฐาน Luteinizing hormone (NIADDK-rat-LH-RP-2) และมาทำการทดสอบเหมือนวิธีการหาฮอร์โมน FSH โดยใช้ฮอร์โมน LH 50 ng แทนฮอร์โมน standard FSH พบว่าฮอร์โมน LH 50 ng ไม่ปฏิบัติ cross reaction กับ anti-FSH น้อยกว่า 0.01%

ตารางที่ 5 ความแปรปรวนของปริมาณฮอร์โมน FSH standard ในแต่ละจุดความเข้มข้น

ความเข้มข้น: (นก./หลอด)	ค่าเฉลี่ย $\bar{x} \pm SD$	% CV
0.78 0.72 0.66	0.72 ± 0.06	8.30
1.56 1.42 1.30	1.43 ± 0.13	9.09
3.125 2.9 2.6	2.87 ± 0.26	9.16
6.25 5.8 5.3	5.78 ± 0.47	8.22
12.5 11.5 10.5	11.5 ± 1.0	8.69
25.0 23.0 21.0	23.0 ± 2.0	8.69
ค่าเฉลี่ย % CV		8.69 ± 0.39



รูปที่ 9 แสดงกราฟมาตรฐานของการทำ RIA ทั้ง 3 ครั้ง เพื่อคำนวณ % CV

การประเมินผลการตรวจหาฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี BA

1. การทดสอบความแม่นยำของการวัดปริมาณฮอร์โมน FSH การคำนวณค่าความแม่นยำเช่นเดียวกับการประเมินผลด้วยวิธี RIA

1.1 intraassay วิธีการเช่นเดียวกับการหาในวิธี RIA โดยตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนของสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับ คือ สูง กลาง ต่ำ ใน assay เท่ากัน และนำมาหาค่า % CV เฉลี่ยเท่ากับ 5.29 ± 1.79

ตารางที่ 6 แสดง % CV ของ intraassay ในการวัดปริมาณฮอร์โมน FSH โดยวิธี BA

ฮอร์โมน FSH std	$\bar{x} \pm SD$ n = 3	% CV
ค่าต่ำ	0.75 ± 0.07	8.87
ค่ากลาง	11.16 ± 0.42	3.73
ค่าสูง	56.01 ± 1.83	3.27
ค่าเฉลี่ย % CV ($\bar{x} \pm SEM$)		5.29 ± 1.79

1.2 interassay ค่าเป็นการเช่นเดียวกับการหา interassay โดยวิธี RIA เรามาคำนวณหาค่า % CV เฉลี่ยได้ 8.23 ± 2.31

2. coefficient of variation ของกราฟมาตรฐาน จากการหาปริมาณฮอร์โมน FSH โดยวิธี BA จำนวน 4 การทดลอง ได้นำกราฟมาตรฐานมาเขียนลงในกราฟแผ่นเดียวกัน และนำมาคำนวณหาค่า % CV ของแต่ละความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานที่ 4

$$\text{จากสูตร } CV = \frac{SD}{\text{Mean}} \times 100$$

SD = standard deviation ของความเข้มข้นนั้นๆ

Mean = ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นนั้นๆ

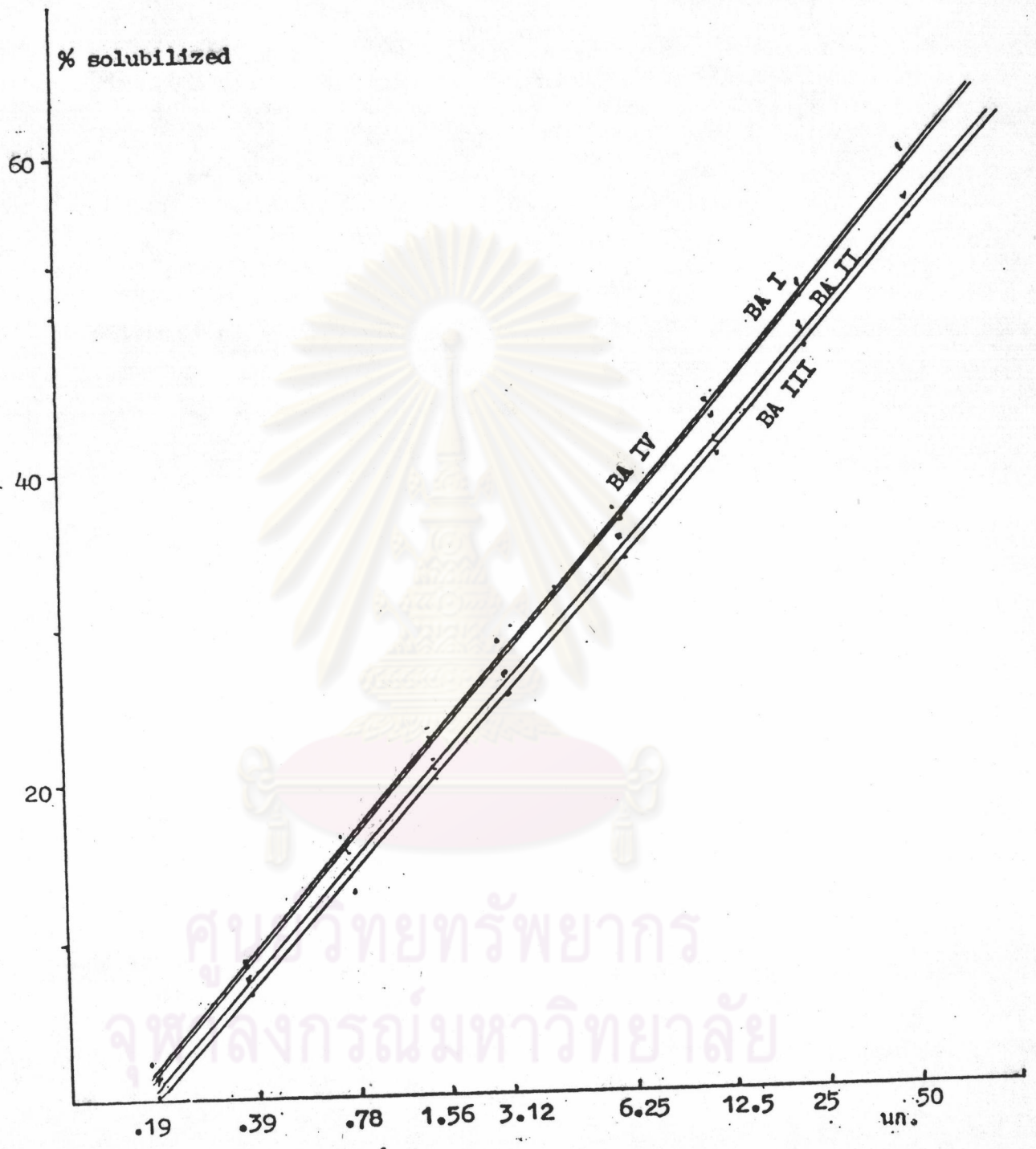
ดังนั้นค่าเฉลี่ย % CV ของกราฟมาตรฐาน ตามรูปที่ 10 เท่ากับ 11.61 ± 5.49

3. sensitivity ของการวัดปริมาณฮอร์โมน FSH คือ ปริมาณฮอร์โมนที่น้อยที่สุดที่สามารถอ่านค่าได้ด้วย bioassay วิธีนี้ ซึ่งให้ sensitivity เท่ากับ 0.20 นก./0.2 มล. หรือเท่ากับ 1 นก./1 มล.

4. specificity ของการหาปริมาณฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี BA ทำการทดสอบโดยการนำฮอร์โมนมาตรฐาน LH มาทดสอบแทนฮอร์โมนมาตรฐาน FSH โดยใช้ 100 ng LH พบว่า % cross reaction น้อยกว่า 0.01%



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของการหาฮอร์โมน FSH โดยวิธี BA และนำมาหาค่า % CV จากความเข้มข้นต่างๆได้เท่ากับ 11.61 ± 5.49