

#### IV. วิจารณ์ผลการทดลอง

Borth (1952) ได้ทดลองวัดเปรกเนนโคออลในปัสสาวะ ด้วยวิธีวัดสี (colorimetric method) โดยการไฮโครไลสด้วยกรด สกัดด้วยโทลูอีน ทำโครมาโตกราฟที่ด้วยอลูมินา วัดสีที่เกิดขึ้นกับกรดกำมะถันเข้มข้นมี recovery rate 87 % ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้วัดปริมาณเปรกเนนโคออล ทางคลินิกในขณะนั้น Oertel and Groot (1965) ได้ทดลองวัดเปรกเนนโคออลโดยทำการไฮโครไลสด้วยเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase สกัดด้วยเบนซีน ล้างด้วยค่าง ทำ TLC วัดสีที่เกิดขึ้นกับกรดกำมะถันเข้มข้น มี recovery rate 79 % Sulimovici et al (1965) ได้ดัดแปลงวิธีของ Klopffer et al (1955) ทำการไฮโครไลสด้วยกรด สกัดด้วยไซโคลเฮกเซน ทำ TLC วัดสีที่เกิดขึ้นกับกรดกำมะถันเข้มข้น มี recovery rate ประมาณ 90 %

วิธี TLC ที่นำมาใช้ทดลองในที่นี้ ได้ดัดแปลงวิธีของ Sulimovici et al (1965) คือเพิ่มขึ้น oxidation ด้วยสารละลายค่างทับทิมทำให้เกิด dehydration คือลดน้ำออกจากโมเลกุลของเปรกเนนไตรออล (pregnanetriol) ด้วยเหตุผลที่นำมาใช้ก็เพื่อขจัดและแยกเปรกเนนไตรออลออกจากเปรกเนนโคออล เวลาทำ TLC และเพื่อทำลายสีที่เกิดขึ้นในสารละลายเปรกเนนโคออลที่สกัดด้วย ไซโคลเฮกเซน หรือ โทลูอีน ผลการเพิ่มขึ้นนี้ทำให้ recovery rate ลดลง คือได้ค่า ทั้งการเติมเปรกเนนโคออลมาตรฐานก่อนและหลังต้มกับกรด เท่ากับ 74.1 - 79.9 % และ 73.3 - 96.0 % ตามลำดับ แต่ค่า recovery rate ที่ทดลองได้ก็อยู่ในเกณฑ์ที่ใช้ได้เมื่อเทียบกับผลงานของผู้นควาทางคานันดิงกลาวแล้วข้างต้น หลังจากนั้นได้มีผู้ศึกษาและนำเทคนิคทาง gas chromatography มาใช้วัดเปรกเนนโคออลในปัสสาวะหลายท่านด้วยกัน อาทิเช่น

Jones et al (1962) และ Turner et al (1963) ได้พยายามตรวจหาระดับเปรกเนนโคออลในปัสสาวะ โดยทำการไฮโครไลสด้วยกรด และสกัดด้วยโทลูอีน แล้ววัดด้วย GLC ซึ่งใช้คอลัมน์ (column) บรรจุด้วย polysiloxane วิธีการทดลองนี้มี recovery rate 69-95 % David et al (1963) ได้ทดลองวัดเปรกเนนโคออล ด้วยวิธีการเดียว

กับ Turner et al ( 1963 ) แอคโกลัมน์ที่ใช้บรรจุด้วย 2 % Silicone gum rubber ( + 50 mole % cyanoethyl polysiloxane ) มี recovery rate 69 - 95 % Cox (1963) ได้ทดลองวัดเปอร์เซ็นต์ไอโอดีนในปัสสาวะระยะตั้งครบกไฮโครไลสด้วยกรด สกติกด้วยโทลูอีน วัดด้วย GLC ที่ใช้คอลัมน์บรรจุด้วย neopentyl glycol adipate (NGA) ผลการวัดด้วยวิธีนี้ได้ผลใกล้เคียงกับวัดด้วยวิธีของ Klopper et al (1955) และมี recovery rate ที่ได้จากการเติมเปอร์เซ็นต์ไอโอดีนในปัสสาวะระยะตั้งครบก 92-103% เช่นเดียวกับ Brush et al (1966) ได้ทดลองวัดเปอร์เซ็นต์ไอโอดีนที่ได้จากการสกัดปัสสาวะ โดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนวัดด้วย GLC แอคโกลัมน์บรรจุด้วย QF<sub>1</sub> (trifluoro propyl methyl silicone) มี recovery rate 67 %

การวัดเปอร์เซ็นต์ไอโอดีน ด้วยวิธี GLC ที่ใช้ในนี้ได้นำมาดำเนินการทดลองตามวิธีของ Brush et al (1966) โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย FS 1265/S (trifluoro propyl methyl silicone) มี recovery rate ที่เติมเปอร์เซ็นต์ไอโอดีนมาตรฐานก่อนและหลังคมกับกรกเผา กับ 82.0-92.9 % และ 87.3 - 96.4 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ recovery rate ที่มีผู้คนควาทางนี้มาแล้ว recovery rate ที่ทดลองได้ อยู่ในเกณฑ์เชื่อถือได้

นอกจากนี้ถ้าปริมาณเปอร์เซ็นต์ไอโอดีนต่ำ ๆ ได้มีผู้คนควาเพื่อให้ได้การวัดที่มีความถูกต้องมากที่สุด เช่น Wotiz (1963) ได้ทดลองทำ acetylation เปอร์เซ็นต์ไอโอดีนที่สกัดได้จากปัสสาวะ แล้วจึงวัดด้วย GLC มี recovery rate ที่ระดับเปอร์เซ็นต์ไอโอดีน 5,000 ไมโครกรัมต่อปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เท่ากับ  $\pm 2.4$  % และที่ระดับ 50 ไมโครกรัมต่อปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เท่ากับ  $\pm 6$  % Lau and Jones (1964) ได้ทดลองนำเทคนิคทาง TLC เข้าไปใช้ทำให้สารละลายเปอร์เซ็นต์ไอโอดีนที่สกัดได้ บริสุทธิ์เสียก่อนที่จะวัด ด้วย GLC และมี recovery rate 82.4 - 96.4 % Barry et al ( 1966 ) ได้ทดลองวิธีการทำให้สารละลายเปอร์เซ็นต์ไอโอดีนที่สกัดได้ บริสุทธิ์ หลายวิธีด้วยกัน เช่น ใช้ทำโครมาโตกราฟี ด้วย silica gel หรือ solvolysis ด้วย perchloric acid tetrahydrofuran แล้วจึงวัดด้วย GLC ที่มีคอลัมน์บรรจุด้วย ส่วนผสมของ 1 % XE - 60 - 1 % SE - 30

ผู้ทดลองรายนี้ได้สรุปว่ามีความจำเป็นที่จะต้องทำให้สารละลายแปรกเนนไดออกซึ่งสกัดได้จาก ปัสสาวะบริสุทธิ์เสียก่อนวัดด้วย GLC โดยวิธีนี้มี recovery rate 83% Kirshner and Lipsett(1964) ได้ทดลองทำ acetylation สารละลายแปรกเนนไดออกซึ่งสกัดด้วย อีเทอร์ แล้วทำ TLC ซึ่งใช้ระบบสารละลายที่ run plate เป็น benzene: ethylacetate=80:20 แล้ว elute ด้วย อะซีโตน วัดด้วย GLC โดยวิธีนี้มี recovery rate ประมาณ 95 %

การทดลองในที่นี้วิธี TLC + GLC ได้ทดลองทำ TLC ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Sulimovici et al(1965) แล้วทำ acetylation(Brush et al,1966) และวัดด้วย GLC ได้ค่า recovery rate ที่เดิมแปรกเนนไดออกมาตรฐานก่อนและหลังต้มกับกรด เท่ากับ 67.00-79.10 % และ 79.00-84.16%ตามลำดับ recovery rate ที่ได้จากการเติม แปรกเนนไดออก ปริมาณน้อย (100 ไมโครกรัม) ก่อนต้มกับกรดต่ำกว่าปกติคือได้ 67 % น่าจะมาจากสาเหตุที่ว่า การไฮโครไลสด้วยกรดมีส่วนทำลายแปรกเนนไดออกในรูปอิสระ ซึ่ง David et al (1963) ก็ได้ทดลอง recovery rate ที่ได้จากการไฮโครไลส ด้วยกรด ได้ค่า 68 % เขาสรุปว่าเนื่องจาก การถูกทำลายระหว่างไฮโครไลสมากกว่าความผิดพลาดจากขบวนการทดลอง เพราะว่าทดลองภายหลังที่เพิ่มปริมาณแปรกเนนไดออกจะได้ 90-95 % นอกจากนี้ Patti et al (1963) ยังได้กล่าวว่า การไฮโครไลสด้วยกรด แปรกเนนไดออกจะถูกทำลายมากกว่าการไฮโครไลสด้วยเอนไซม์ อีกประการหนึ่ง การทำ TLC ก่อนทำ acetylationจะมีผลทำให้ recovery rate ค่าหรือไม่ เป็นเรื่องน่าสงสัย และควรจะ ได้ศึกษาถึงความแตกต่างระหว่างการทำ TLC ก่อน acetylationและการทำacetylation ก่อนทำTLC

ในก้านเทคนิคที่นำมาใช้ในวิธีการวัดต่าง ๆ นั้น ช่วยให้ได้ผลถูกต้องมากขึ้น แต่ยังคง ขึ้นกับข้อมูลหลายประการที่น่าสนใจจึงจะได้แยกกล่าวเป็นวิธี ๆ คือ ในก้านเทคนิคทาง TLC นั้น นับว่าได้ประโยชน์มาก เพราะว่าสามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว ประหยัด และสิ่งข้อสารเคมีในการ ทดลองได้ง่าย วิธี TLC ของ Sulimovici et al (1965) นั้น ผู้ทดลองรายงานวิธี



เขาเหมาะสำหรับวัดเปรกเนนไดออกไซด์ ในระยะครึ่งหลังรอบเดือน ในระยะครึ่งแรก แต่ไม่เหมาะกับการวัดเปรกเนนไดออกไซด์ในระยะครึ่งแรกรอบเดือน (หรือในสตรีหลังหมดประจำเดือน ชาย และ เด็ก) จากผลการทดลองในปีสวาระระยะไม่ตั้งครรรภ์ จำนวน 5 ราย มีหลายตัวอย่างในระยะครึ่งแรกรอบเดือน ที่วัดผลไม่ได้ คงเนื่องมาจากวิธีการวัดสีอินดิเคอร์เนื่องจากวิธีเดิมของ Sulimovici et al (1965) ไม่เหมาะสมกับการวัดระดับเปรกเนนไดออกไซด์ในระยะนี้ จะแก้ไขข้อบกพร่องของวิธีนี้จะทำได้ด้วยการเพิ่มปริมาณปีสวาระที่ใช้ทดลองเป็น 150 มล. ปัญหาที่จะเกิดสีเข้มของสารละลายเปรกเนนไดออกไซด์ที่สกัดได้ทำให้เกิด tailing บนแผ่น silica gel เราแก้ไขได้ด้วยการ oxidize ด้วยสารละลายค่างทับทิม คงจะทำให้ลักษณะกราฟทดลองรอบเดือนของผู้ถูกทดลองในรายที่มีเปรกเนนไดออกไซด์ต่ำสมบูรณ์ขึ้น และมีลักษณะเฉพาะของเปรกเนนไดออกไซด์ซึ่งการตกไข่เด่นชัดขึ้น

ในด้านเทคนิคทาง GLC นั้น วิธีการนี้ได้ประโยชน์สองประการ คือประการที่หนึ่งได้ลดขบวนการ (procedure) บางอย่างลงทำให้วัดผลได้รวดเร็วขึ้น อีกประการหนึ่งยังทำให้มี recovery rate สูงขึ้นด้วย

เกี่ยวกับ responsibility ของ flame ionization detector ในเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ที่มีต่อปริมาณของเปรกเนนไดออกไซด์มาตรฐานนั้น Wotiz and Chatteraj (1968) พบว่าปริมาณเปรกเนนไดออกไซด์ ตั้งแต่ 0.0075-16 ไมโครกรัม เมื่อฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟแล้ว flame ionization detector จะมี response ออกมาเป็น peak height ที่เมื่อนำไปเขียนกราฟระหว่าง peak height กับปริมาณเปรกเนนไดออกไซด์ที่ฉีดเข้าไป จะได้กราฟเป็นเส้นตรง

ในการทดลองในที่นี้ปริมาณเปรกเนนไดออกไซด์ 1-5 ไมโครกรัม ที่ใช้ฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จะได้กราฟเป็นเส้นตรง แต่ในเปรกเนนไดออกไซด์อะซีเตต ปริมาณ 5 ไมโครกรัม จะมีการเปลี่ยนแปลงมาก แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการฉีดด้วยปริมาณ 2 ไมโครกรัมต่อ 2 ไมโครลิตร จะได้ responsibility ที่คงที่มากที่สุด แสดงว่าปริมาณที่ต่ำไปจะเกิด เบอร์เซนต์นิคพลาดได้มาก หรือในปริมาณที่สูง ๆ เริ่มสูงกว่า 5 ไมโครกรัม ก็ไม่เหมาะสมกับการใช้เป็นมาตรฐานในการ

คำนวณปริมาณแปรกเนนโคออลที่มีปริมาณต่ำ เพราะการใช้ Attenuation ในเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟของ Perkin-Elmer 881 ที่เปลี่ยนไปแต่ละ Attenuation จะมีผลผิดพลาดได้ 0.3-3 % ดังนั้น การใช้ Attenuation เดียวกัน ทั้งแปรกเนนโคออลมาตรฐานและตัวอย่าง ปัสสาวะที่ทดลองจะเป็นวิธีที่ดีที่สุด

วิธี GLC ของ Brush et al (1966) ถ้าปริมาณแปรกเนนโคออลต่ำกว่า 10 มก. ต่อ ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จะต้องทำ acetylation ให้แปรกเนนโคออลกลายเป็นแปรกเนนโคออลโคอะซีเตตเสียก่อนที่จะวัดด้วย GLC ซึ่งเทคนิคอันนี้นำมาใช้ก็ด้วยเหตุผลที่จะแยกส่วนของแปรกเนนโคออล ออกจากสารพวกสะเตียรอยด์อื่น ๆ ที่มี retention time (rt) ใกล้กับแปรกเนนโคออลมาก ๆ เพราะว่าแปรกเนนโคออลโคอะซีเตตจะมี rt ที่ยาวกว่าตัวแปรกเนนโคออลเอง Kirscher and Lipsett (1964) ได้ให้หลักฐานว่ามีการสร้างสารตัวใหม่ (derivative product) ซึ่งเป็นสารในปัสสาวะที่ยังไม่พบแน่ชัดว่ามีลักษณะเป็นอย่างไร (unidentified urinary component) และสารตัวนี้มี rt ใกล้เคียงกับ rt ของแปรกเนนโคออลมาก จนไม่สามารถจะแยกออกจากกันได้ นอกจากทำ acetylation เสียก่อน

แต่จากการค้นคว้าของท่านอื่น ๆ การทำ acetylation เพียงอย่างเดียวเพื่อจะแยก peak ของแปรกเนนโคออลออกจากสารพวกสะเตียรอยด์อื่น ๆ เท่านั้นยังไม่เพียงพอ มีอีกส่วนหนึ่งที่สำคัญมากก็คือ stationary phase ภายในคอลัมน์ของเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ ได้มีการค้นคว้าและปรับปรุงเกี่ยวกับคานนี้หลายท่านคือ Jones et al (1962) และ Turner et al (1963) ได้ใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย polysiloxane ซึ่งไม่สามารถจะแยกแปรกเนนโคออล ออกจากอัลโลแปรกเนนโคออลและแปรกนาโนโลนได้ Patti et al (1963a,b) ได้เปลี่ยนเป็น SE -30 ถึงแม้ว่าจะแยกพวก etiocholanolone และ androsterone ได้สำเร็จก็ยังแยก แปรกนาโนโลน และ 11  $\beta$ -hydroxy androsterone ออกจากแปรกเนนโคออลไม่สำเร็จ Cox (1963) ได้ทดลองใช้ neopentyl glycol adipate (NGA) คอลัมน์นี้สามารถจะแยกแปรกเนนโคออล ออกจากสารพวกสะเตียรอยด์อื่น ๆ ได้ Barry et al (1966)

โคกทดลองใช้ส่วนผสมของ 1% XE -60 และ 1 % SE -30 ก็พบว่าสามารถจะแยกแปรกเนนโคกออกจากสารละเอียดรอยคั่วอื่น ๆ ได้เช่นเดียวกัน แต่ว่า Vanden Heuvel et al (1961) กล่าวว่าการใช้ stationary phase เป็น  $QF_1$  นั้นสามารถจะแยกแปรกเนนโคก อัดโคก แปรกเนนโคก แปรกนาโนโลน หรือ 11- hydroxy androsterone ออกจากกันได้ชัดเจน ซึ่งการทดลองในที่นี้ได้ใช้ FS 1265/S เป็น trifluorosilicone เช่นเดียวกับ  $QF_1$  ประกอบกับ peak ที่ทดลองได้ไม่มีส่วนของ peak อื่น ๆ มาปะปนอยู่เลย จึงมั่นใจได้ว่า คอลัมน์ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการแยก แปรกเนนโคกออกจากสารละเอียดรอยคั่วอื่น ๆ

นอกจากนี้ยังมีผู้คนความหลายผ่านที่เห็นว่าการทำให้สารละลายแปรกเนนโคกที่สกัดได้จากปัสสาวะ บริสุทธิ์เสียก่อนที่จะวัดด้วย GLC นั้นมีผลดีกว่าวัดโดยไม่ทำให้บริสุทธิ์เสียก่อน อาทิเช่น Lau and Jones (1964) ได้เน้นว่าการนำเทคนิค TLC เข้ามาใช้จะช่วยแยกสารละเอียดรอยคั่วอื่น ๆ ออกจากส่วนของแปรกเนนโคกได้ชั้นหนึ่งก่อน เช่นเดียวกับ Patti et al (1963a,b) ซึ่งใช้วิธีสกัดของ Klendshoj et al (1953) ก็ได้สนับสนุนว่าควรทำ TLC ก่อนวัดด้วย GLC นอกจากนี้ Barry et al (1966) ยังได้พยายามที่จะทำให้สารละลายแปรกเนนโคกบริสุทธิ์ก่อนวัดด้วย GLC ดังนั้นการทดลองที่นำวิธี TLC รวมกับวิธี GLC ก็นับว่าเป็นการเพิ่มขึ้นทำให้สารละลายแปรกเนนโคกที่สกัดได้บริสุทธิ์เสียก่อนที่จะวัดด้วย GLC และเป็นเทคนิคที่ถูกต้อง ผลที่ทดลองได้จะได้ peak ของแปรกเนนโคกเพียง peak เดียวในกราฟ โดยไม่มี peak ของสารละเอียดรอยคั่วอื่น ๆ มาปะปนอยู่เลย จึงสรุปได้ว่า ในกรณีของระดับแปรกเนนโคกต่ำกว่า 1 มก. ต่อปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ควรทำ acetylation ทำ TLC ก่อนวัดด้วย GLC จะได้ผลที่เชื่อแน่ว่าไม่มีสารอื่น ๆ ปนอยู่ แต่ recovery rate ที่ต่ำก็เป็นปัญหาที่จะต้องปรับปรุงแก้ไขเกี่ยวกับ eluant และเทคนิค 2 อัน ดังกล่าวควรทำอย่างไรกัน Cox (1963) ก็ได้ให้เหตุผลว่าปริมาณแปรกเนนโคกที่สูงกว่า 1 มก. ต่อปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ถ้าวัดด้วย GLC ไม่จำเป็นต้องผ่านวิธีการ TLC เพียงทำ acetylation ก็เพียงพอแล้ว แต่ถาปริมาณต่ำกว่า 1 มก. ต่อปัสสาวะ 24 ชั่วโมง การนำ TLC เขาร่วมด้วยก่อนวัดด้วย GLC จะทำให้ผลการทดลองดีขึ้น

Wotiz and Mozden (1965) ได้รายงานวาระดับแปรกเนนโคออลที่วัดโดยวิธีของ Kloppe<sup>r</sup> et al (1955) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่วัดด้วย GLC จะได้ค่าจากวิธีวัดที่สูงกว่าวิธี GLC เขาสรุปว่าคงเนื่องจากปริมาณแปรกเนนโคออลที่ต่ำกว่า 1 มก. ต่อปีสสาวะ 24 ชั่วโมง เมื่อทำให้เกิดสีกับกรดกำมะถันเข้มข้น จะมีสีของสารอื่น (chromogen) ที่เกิดกับกรดกำมะถันเข้มข้นเช่นเดียวกันมารบกวน เป็นการเพิ่มค่าที่ได้ให้สูงกว่าปกติ ดังนั้น ค่าที่วัดโดยวิธีนี้จึงให้ค่าสูงกว่าวิธี GLC

แต่การทดลองในที่นี้ด้วยวิธี TLC ด้วยวิธีของ Sulimovi<sup>ć</sup> et al (1965) ในระยะครั้งแรกรอบเดือน ได้ค่าต่ำกว่าของ Kloppe<sup>r</sup> et al (1955) อยู่แล้วเพราะฉะนั้น ค่าที่ทดลองได้ในปีสสาวะระยะครั้งแรกรอบเดือนโดยการวัดด้วยวิธี GLC สูงกว่าวัดด้วยวิธี TLC คงเนื่องจากสาเหตุ 2 ประการคือ ประการที่หนึ่ง วิธี TLC ได้ค่าต่ำกว่าวิธีของ Kloppe<sup>r</sup> et al (1955) ผลที่ได้จึงตรงข้ามกับผลงานของ Wotiz and Mozden (1965) ซึ่งเปรียบเทียบ กับ วิธี TLC ที่ต่างกัน จึงยังไม่ทราบแน่ชัดว่า วิธี GLC ที่ใช้ในที่นี้ จะสูงหรือต่ำกว่าวิธี TLC ของ Kloppe<sup>r</sup> et al (1955) ประการที่สอง แมว่าจะนำเทคนิคชั้น TLC เข้ารวมก่อนวัดด้วย GLC ระดับแปรกเนนโคออลในระยะครั้งแรกรอบเดือน ก็ยังมีค่าสูงกว่าวิธี TLC อยู่ก็ แสดงว่าค่าที่สูงในวิธี GLC นั้น อาจเนื่องมาจาก sensitivity และ recovery rate ของวิธี GLC สูงกว่าวิธี TLC หรือจะเนื่องจากมีสารอื่น ๆ ที่มี  $r_t$  ใกล้เคียงกับแปรกเนนโคออลมารบกวน โดยเพิ่ม peak height ของแปรกเนนโคออล ค่าที่ได้จึงสูงกว่าปกติ เพราะว่ Chatteraj and Scomegna (1967) ได้ค้นพบว่า มีสารพวกนี้ อยู่ในสารละลายแปรกเนนโคออลที่ใช้วัดด้วย GLC อยู่จริง โดยผู้ทดลองรายนี้ได้ทดลองนำ 70%  $(NH_4)_2SO_4$  ไปตกตะกอน สารพวกสะเตียรอยด์ทั้งที่อยู่ในรูปอิสระหรืออยู่ในรูป conjugate กับ sulphate หรือ glucuronide ออกจากปีสสาวะเสียก่อน แล้วจึงทำการไฮโดรไลสด้วยเอนไซม์ สกัด แล้วทำ acetylation ต่อจากนั้นทำ TLC ก่อนวัดด้วย GLC ได้ค่า recovery rate (เพิ่มขึ้น) 82-105% และผู้ทดลองได้สรุปว่า การตกตะกอนด้วย 70%  $(NH_4)_2SO_4$  ก็เพื่อจะแยกแปรกเนนโคออล และสะเตียรอยด์อื่น ๆ ออกจากสารพวก lipid ที่มี  $r_t$  ใกล้เคียงกับแปรกเนนโคออล และ lipid พวกนี้มีปริมาณไม่น้อยกว่าปริมาณแปรกเนนโคออลใน

ปัสสาวะ จากหลักฐานที่ผู้รายงานนั้นคนพบจึงพอจะเป็นข้ออ้างอิง เกี่ยวกับค่าแปรกเนนโคคอลที่วัดด้วย GLC สูงกว่าวัดด้วย TLC ดังกล่าวแล้ว

แต่จากการทดลองด้วยตัวอย่างจำนวนมากในปัสสาวะระยะไม่ตั้งครรภ์ตลอดรอบเดือนรวม 112 ตัวอย่าง จะพบว่าวิธี GLC มีค่าไม่สูงกว่าวิธี TLC ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่จากรายงานของ Vander Molen (1965) ที่กล่าวว่าถ้าวัดด้วยตัวอย่างจำนวนมากจะพบว่าวิธี GLC และวิธี TLC (Klopper et al 1955) ไม่แตกต่างกันเลย ซึ่งวิธี GLC นั้น เขาได้นำเทคนิค TLC เขาร่วมด้วย จึงยังเปรียบเทียบไม่ได้ว่า ผลงานที่ทดลองได้นี้ จะตรงกับรายงานของผู้ทดลองรายอื่น ๆ หรือไม่

จากการกล่าวมาทั้งหมด Podmore (1966) ได้แนะนำว่าวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์เป็นประจำในห้องปฏิบัติการทางคลินิคนั้น สำหรับปัสสาวะในระยะตั้งครรภ์ การตรวจหาแปรกเนนโคคอลควรใช้วัดด้วยการใช้สารละลายแปรกเนนโคคอลที่สกัดโดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ฉีดเข้าเครื่องโครมาโตกราฟแต่เพิ่ม internal standard เช่น สารสะเตียรอยด์ cholestanone เพราะว่าสารตัวนี้จะมี rt ยาวกว่าตัวแปรกเนนโคคอล เป็นการทำให้ peak ที่โคของแปรกเนนโคคอลเด่นชัด และแน่นอนขึ้น ส่วนปัสสาวะในระยะไม่ตั้งครรภ์ ควรทำ TLC ด้วย silica gel เพื่อแยกแปรกเนนโคคอลโคอะซีเตต ออกจากสิ่งเจือปนอื่น ๆ ก่อนวัดด้วย GLC

ในความเห็นของผู้ทดลอง วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ประจำวันในห้องปฏิบัติการทางคลินิก ในเมืองไทยนั้น สำหรับปัสสาวะในระยะตั้งครรภ์ ตั้งแต่ 20 สัปดาห์ขึ้นไป ควรใช้วัดด้วยวิธี GLC ของ Brush et al (1966) เพราะวิธีนี้สามารถวัดปริมาณแปรกเนนโคคอลตั้งแต่ 0.01 มก. ต่อปัสสาวะ 24 ชั่วโมงขึ้นไป ได้ถูกต้อง และรวดเร็วกว่าวิธีอื่น ส่วนปัสสาวะในระยะไม่ตั้งครรภ์ หรือตั้งครรภ์ไม่เกิน 20 สัปดาห์ ควรจะวัดโดยวิธี TLC ที่คัดแปลงจากวิธีของ Sulimovici et al (1965) เพราะว่าลักษณะกราฟตลอดรอบเดือนที่วัดโดยวิธีนี้ได้ลักษณะเฉพาะเด่นชัดกว่า และเร็วกว่าวิธี GLC ซึ่งจะต้องผ่านการทำ acetylation ก่อนวัดด้วยเครื่องกาซโครมาโตกราฟ



คำนเสถียรภาพ (stability) ของเปรกเนนโคออลในบัสสาวะที่เก็บ  $0^{\circ} - 4^{\circ}\text{C}$ . โดยไม่ใส่สารกันบูด จากผลที่ทดลองได้พบว่า ถ้าปริมาณสูงกว่า 4 มก. คอบัสสาวะ 24 ชม. จะเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อย แต่ถ้าต่ำกว่า 4 มก. คอบัสสาวะ 24 ชม. จะมีการเปลี่ยนแปลงพอสมควร แต่ทั้งนี้ถ้าพิจารณาลักษณะกราฟตลอดรอบเดือน ก็ไม่แตกต่างไปจากเดิม แต่ถ้าทดลองทันทีจะได้กราฟที่มีการเพิ่มและลดเป็นลำดับดีกว่าการเก็บเป็นระยะเวลาจนถึง 15 และ 50 สัปดาห์ การเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเหล่านี้จะเนื่องมาจากสาเหตุอันใดยังไม่มีผู้ศึกษาเพราะว่าจากรายงานของ Brush et al (1966) กล่าวว่า การเก็บบัสสาวะเพื่อการทดลอง โดยไม่ใส่สารกันบูด ควรเก็บที่  $4^{\circ}\text{C}$ . ถ้าจะทดลองภายใน 3 วัน หรือเก็บที่  $-10^{\circ}\text{C}$  ถ้าจะทดลองภายใน 7 วัน เป็นที่น่าเสียดายที่คณะผู้ทำนี้มิได้รายงานผลที่จะเกิดขึ้นภายหลังจากนี้ ดังนั้น การเก็บบัสสาวะในสภาพดังกล่าวเพื่อรอการทดลองนั้นในสัปดาห์ที่ 15 และ 50 ในตัวอย่างที่ผู้ถูกทดลองมีระดับเปรกเนนโคออลต่ำย่อมสงสัยว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงได้เช่นกัน เพราะว่าการทดลองคุณสมบัติในบัสสาวะได้ทดลองวัดในผู้ถูกทดลองที่มีระดับเปรกเนนโคออลสูงเพียง 1 ราย แต่ทั้งนี้ก็คือว่าได้รักษาสภาพให้คงเดิมมากที่สุดเท่าที่จะปฏิบัติได้แล้ว เนื่องจากความจำเป็นต้องรอการทดลองเปรียบเทียบใน 2 วิธี ในสถานที่ทดลองที่ห่างกัน ถ้าจะมีการค้นคว้าเพิ่มเติมทางค่านี้อต่อไป ผู้ทดลองคิดว่า ควรจะทำในสถานที่เดียวกัน และทำการไฮโดรไลส์ สกัดพร้อมกัน แล้วจึงจะแยกวัดด้วยเทคนิคทาง TLC และ GLC ที่หลังจะได้ผลเปรียบเทียบที่แน่นอนมากกว่า

ปริมาณเปรกเนนโคออลที่วัดได้โดยวิธีต่าง ๆ ในบัสสาวะระยะต่าง ๆ กันนั้น จะได้แยกกล่าวและวิจารณ์ผลที่ได้ดังต่อไปนี้

ปริมาณเปรกเนนโคออลระยะไม่ตั้งครรภ์จากการทดลองในผู้ถูกทดลองจำนวน 5 ราย รวม 112 ตัวอย่างนั้น วัดโดยวิธี TLC ระยะครึ่งแรกรอบเดือน อยู่ระหว่าง 0.11-0.32 มก. คอบัสสาวะ 24 ชั่วโมง และในระยะครึ่งหลังรอบเดือนมีค่าอยู่ระหว่าง 2.38-5.48 มก. คอบัสสาวะ 24 ชั่วโมง (ในผู้ถูกทดลองจำนวน 4 ราย) แต่รายที่ 5 มีความผิดปกติที่วาระครึ่งหลังรอบเดือน (luteal peak) ต่ำ และมีระยะสั้นกว่ารายอื่น ๆ แสดงถึง

คอร์ปัสลูเทียม ทำหน้าที่ไม่ดี แม้ว่าจะมีไทรค ก็มี corpus luteum insufficiency แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นว่า ระดับในระยะครั้งแรกรอบเดือนของผู้ถูกทดลองทั้งหมดจะเปลี่ยนแปลงไม่มาก และมีค่าต่ำกว่า 1 มก. ต่อปีสสาวะ 24 ชั่วโมง แต่ในระยะครึ่งหลังรอบเดือน จะมีการเปลี่ยนแปลงมาก ขึ้นกับความแตกต่างของระดับแปรกเนนไดออกลินในแต่ละบุคคล ผลการทดลองนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานของ Klopper (1957) จะเห็นว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างเชื้อชาติที่เกี่ยวกับการหลังโปรเจสเทอโรน ในภาวะไม่ตั้งครรภ์ เพราะว่า Klopper (1957) ได้ค่าแปรกเนนไดออกลินในระยะครึ่งแรกรอบเดือนต่ำกว่า 1 มก. ต่อปีสสาวะ 24 ชม. และค่าในระยะครึ่งหลังรอบเดือนจะเปลี่ยนแปลงไปตามความแตกต่างในแต่ละบุคคล คือ มีค่าอยู่ระหว่าง 2-5 มก. ต่อปีสสาวะ 24 ชั่วโมง

แต่ถ้าวัดโดยวิธี GLC นั้น ระยะครึ่งแรกรอบเดือน ค่าแปรกเนนไดออกลินอยู่ระหว่าง 0.51-0.87 มก. ต่อปีสสาวะ 24 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าวิธี TLC ส่วนค่าในระยะครึ่งหลังรอบเดือน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละบุคคลกว้างมากกว่า วัดโดยวิธี TLC คือมีค่าอยู่ระหว่าง 0.98 - 7.65 มก. ต่อปีสสาวะ 24 ชั่วโมง ในรายที่ค่าสูงสุด 7.65 มก. นั้น สูงกว่าวิธี TLC ถึง 2 มก. ต่อปีสสาวะ 24 ชั่วโมง คงเนื่องมาจาก sensitivity ของเครื่องโครมาโตกราฟ หรือ เนื่องจากการรบกวนของสิ่งเจือปนอื่น ๆ หรือจะว่ามาจากความผิดพลาดทางเทคนิคก็ได้ทดลองวัดในตัวอย่างเดียวกัน นี้ซ้ำ 3 ครั้ง ปรากฏว่าได้ผลใกล้เคียงกันมาก ส่วนอีก 1 รายที่ได้ค่าต่ำกว่าวิธี TLC อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงในปีสสาวะ ระหว่างรอบการทดลองก็ได้เพราะการย้ายปีสสาวะจากที่หนึ่งมาทดลองยังอีกที่หนึ่ง ขณะขนส่งไม่ได้อยู่ในอุณหภูมิที่ตั้งกล่าว ย่อมเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ หรือบางวันห้องเย็นที่เก็บปีสสาวะเสีย อุณหภูมิเพิ่มขึ้น ก็เกิดการตั้งกล่าวได้ เป็นต้น ส่วนรายอื่น ๆ อีก 3 รายได้ผลใกล้เคียงกับวิธี TLC จะเห็นได้ว่าในปีสสาวะไม่ตั้งครรภ์ ถ้าวัดโดยวิธีของ Brush et al (1966) จะได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร แม้ว่าในระยะครึ่งแรกรอบเดือนจะได้ค่าเป็นที่น่าพอใจก็ตาม แต่ในระยะครึ่งหลังรอบเดือนนั้นค่าเปลี่ยนแปลงมาก แต่ทั้งนี้เนื่องจากกรณีสงสัยเกี่ยวกับการเก็บปีสสาวะ จึงควรจะได้ศึกษาการวัดระดับแปรกเนนไดออกลินในปีสสาวะไม่ตั้งครรภ์โดยวิธี GLC หลังจากการเก็บปีสสาวะทันที

ภายใน 3-7 วัน ไม่เกินกว่านี้ เพื่อจะดูว่ามีผลแตกต่างจากที่ทดลองได้หรือ เป็นการเน้นให้  
 ด้ว่าบัสสาวะในระยะนี้จะวัดโดยวิธี GLC ได้ผลหรือไม่ จากรายงานอื่น ๆ การวัด  
 เปรกเนโคออลในระยะนี้ ควรผ่านเทคนิค TLC ก่อนวัดด้วย GLC ตามที่กล่าวแล้วข้าง  
 ต้น จึงได้ทำการทดลองวัดในรายที่ 2 ด้วยวิธี TLC + GLC ปรากฏว่าได้ค่าในระยะครึ่ง  
 แรกรอบเดือน 0.68 มก.ต่อบัสสาวะ 24 ชั่วโมง และในระยะครึ่งหลังรอบเดือนได้ค่าสูงสุด  
 ประมาณ 4 มก.ต่อบัสสาวะ 24 ชั่วโมง ทำให้ค่าเปรกเนโคออลที่ได้โดยวิธีนี้ในระยะ luteal  
 peak ได้ลักษณะกราฟที่แสดงลักษณะเฉพาะเกี่ยวกับการตกไข่ขึ้น และเป็นการชี้ให้เห็นว่า  
 ถ้าไม่ทำ TLC จะมีสารเจือปนที่มี rt เดียวกับเปรกเนโคออลรบกวนทำให้ peak เปรก  
 เนโคออลสูงกว่าปกติ

ข้อสังเกตว่าระดับเปรกเนโคออลในระยะครึ่งหลังรอบเดือนหลังจากค่าขึ้นสูงสุด  
 แล้วจะเริ่มลดค่า และระดับที่ต่ำสุดที่จะทำให้เริ่มมีประจำเดือน เคือนัดไปมีอยู่ในระดับเท่า  
 ใด และเป็นเวลานานเท่าใด ที่คอร์ปัสลูเทียมเสื่อมจนคงสภาพ secretory phase  
 ต่อไปไม่ได้ ปรากฏว่าผู้ถูกทดลองจำนวน 5 ราย ที่วัดโดยวิธี TLC มี 3 ราย ที่ระดับ  
 ลดลงต่ำกว่า 1 มก. คือ ประมาณ 0.7-0.9 มก.ต่อบัสสาวะ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 2-4  
 วัน ก็จะเริ่มมีประจำเดือน เคือนัดไป ส่วนอีก 2 ราย ลดต่ำกว่า 0.2 และ 0.5 มก.ต่อ  
 บัสสาวะ 24 ชั่วโมง อยู่ 2-4 วัน ก็เริ่มมีประจำเดือน เคือนัดไป แต่ถ้าวัดโดยวิธี GLC  
 มีอยู่ 4 ราย ที่ระดับเปรกเนโคออลต่ำกว่า 1 มก.ต่อบัสสาวะ 24 ชั่วโมง และ 1 รายที่  
 ต่ำกว่า 1.4 มก.ต่อบัสสาวะ 24 ชั่วโมง ก็เริ่มมีประจำเดือน เคือนัดไป แสดงให้เห็นว่า  
 เมื่อระดับเปรกเนโคออล เข้าสู่ระดับใกล้เคียงกับระดับในครึ่งแรกรอบเดือน ประมาณ 2-4  
 วัน ก็จะเริ่มมีประจำเดือน เคือนัดไป ซึ่งระดับเปรกเนโคออลในตอนนี้จะ เป็นเปรกเนโค  
 ออลที่มาจาก การหลั่งโปรเจสเทอโรนของ ออริณัลคอร์เทกส์ เท่านั้น คอร์ปัสลูเทียมเสื่อมลง  
 จนไม่ให้โปรเจสเทอโรนแล้ว ทั้งนี้ค่าเหล่านี้จะขึ้นกับความแตกต่างของระดับเปรกเนโคออล  
 ในแต่ละบุคคลด้วย

ปริมาณเปรกเนโคออลในบัสสาวะที่เริ่มจากภาวะไม่ตั้งครรภ์ จนถึงภาวะตั้งครรภ์นั้น

หลังจากการมีประจำเดือนครั้งสุดท้ายถึงวันที่ 43 ระดับเปอร์กเนนไคออลไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ก็เหมือนระดับเปอร์กเนนไคออลในระยะครึ่งหลังรอบเดือน ในภาวะไม่ตั้งครรภ์รายอื่น ๆ ระดับสูงสุดไม่เกิน 3 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ตอนระยะวันที่ 29-32 ระดับค่า ก็ไม่ต่ำกว่า 1 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณที่ยังคงสภาพ การตั้งครรภ์ต่อไปได้ ในระยะการตั้งครรภ์ สัปดาห์แรก จนถึงสัปดาห์ที่ 15 ระดับเปอร์กเนนไคออลจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นไม่เห็นชัดเจนนัก ลักษณะการเพิ่มนั้น มีการลดและเพิ่มสลับกันบางสัปดาห์ แต่ในสัปดาห์ที่ 17, 18, 19 ระดับเปอร์กเนนไคออลลดต่ำผิดปกติ แม้ว่าจะทำการวัดซ้ำ 3 ครั้งก็ได้ผลเช่นเดิม จึงคิดว่าจะต้องมีความผิดปกติในปัสสาวะ ช่วง 3 สัปดาห์นี้ เพราะจากการสืบประวัติผู้ถูกทดลองในระยะนี้ไม่พบความผิดปกติใด ๆ เกิดขึ้น ดังนั้น ความผิดปกติอันนี้ น่าจะเนื่องมาจากสาเหตุ 2 ประการคือ ประการที่หนึ่ง เนื่องจาก คอปัสสาวะเทียม และรบกวนหน้าที่ไม่ดี ประการที่สอง การเก็บปัสสาวะไม่ครบ 24 ชั่วโมง ทำให้ค่าที่วัดต่ำกว่าปกติ การเพิ่มจะค่อย ๆ ทวีจำนวนมากขึ้นจนสูงสุดในสัปดาห์ที่ 33 ได้ 31 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (จะเห็นได้ว่า การเพิ่มของระดับเปอร์กเนนไคออลในระยะตั้งครรภ์ของบุคคลเดียวกัน ก็มีเปลี่ยนแปลง เช่นเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากความแตกต่างของระดับเปอร์กเนนไคออลในบุคคลต่าง ๆ กัน)

ปริมาณเปอร์กเนนไคออลในระยะตั้งครรภ์ปกติ ที่ได้จากการทดลองในสตรีตั้งครรภ์ระยะต่าง ๆ จำนวน 15 ราย รวม 52 ตัวอย่าง ในระยะตั้งครรภ์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 20-38 ได้ค่าเฉลี่ยของเปอร์กเนนไคออลอยู่ระหว่าง 7.23-33.40 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ซึ่งค่าเหล่านี้มาจากการทดลอง 52 ตัวอย่าง นับว่ายังไม่เพียงพอที่จะหาค่าปกติของเปอร์กเนนไคออลในระยะตั้งครรภ์ปกติในสตรีไทย แต่อย่างไรก็ตามค่าที่ทดลองได้ เหล่านี้อยู่ระหว่างค่าที่เชื่อถือได้ เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานในค่านี เช่น Rusell et al ( 1960 ) ซึ่งได้ค่าปกติ

ในสัปดาห์ที่	12	อยู่ระหว่าง	4-19	มก. คอปัสสาวะ	24	ชั่วโมง
สัปดาห์ที่	20	อยู่ระหว่าง	9-34	มก. คอปัสสาวะ	24	ชั่วโมง
สัปดาห์ที่	36	อยู่ระหว่าง	26-68	มก. คอปัสสาวะ	24	ชั่วโมง
สัปดาห์ที่	38	อยู่ระหว่าง	26-70	มก. คอปัสสาวะ	24	ชั่วโมง

หลังจากสัปดาห์ที่ 38 แล้ว ระดับโปรตีนในเลือดจะเริ่มลดลงเล็กน้อย จนถึงระยะคลอด

ปริมาณโปรตีนในเลือดในระยะตั้งครรภ์ปกติ จากสตรีตั้งครรภ์ปกติโดยเป็นโรคต่าง ๆ จำนวน 21 ราย รวม 27 ตัวอย่าง ที่ทำหลายตัวอย่างในโรคเดียวกันคือ toxemia pregnancy ทดลอง 8 ตัวอย่าง พบว่าค่าต่าง ๆ เหล่านี้อยู่ในระดับปกติ Brush et al (1966) กล่าวว่า การตั้งครรภ์ที่เป็น toxemia ในระยะร้ายแรง จะทำให้ระดับโปรตีนในเลือดลดลง แต่การทดลองในที่นี้ มีจำนวน ตัวอย่างน้อยไปประการหนึ่ง อีกประการหนึ่งระยะการเป็น toxemia แพทย์มิได้แจ้งไว้ในประวัติคนไข้ จึงไม่สามารถจะสรุปได้เป็นอย่างหนึ่งอย่างใด ในกรณีที่ตั้งครรภ์ปกติรายอื่น ๆ ทำการทดลองในตัวอย่างที่น้อยไป ส่วนใหญ่ค่าอยู่ในระดับปกติ นอกจาก 2 รายที่ผิดปกติคือ placenta previa 1 ราย และ Jaundice อีก 1 ราย ค่าต่ำกว่าระดับปกติ ซึ่งตามรายงานของ Russel et al (1957) ได้ทดลองในสตรีที่ตั้งครรภ์เป็น placenta previa 6 รายพบว่าค่าอยู่ในระดับปกติ ดังนั้น การทดลองวัดระดับโปรตีนในเลือดในสตรีตั้งครรภ์ปกติในที่นี้ยังควรจะทำการศึกษาต่อเพื่อหาค่าโปรตีนในเลือดในโรคต่าง ๆ ว่าจะอยู่ในระดับปกติเพียงใดหรือไม่

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. โค้ดทดลองวัดปริมาณแปรกเนนไคออลในปัสสาวะโดยวิธี TLC (ดัดแปลงจากวิธี Sulimovici et al, 1965) วิธี GLC (Brush et al, 1966) และวิธี TLC + GLC (รวม 2 วิธีข้างต้นเข้าด้วยกัน) ได้ recovery rate ของการเติมแปรกเนนไคออลมาตรฐานก่อนต้มกับกรดในวิธีทั้ง 3 ดังนี้ 74.1-79.9 %, 82.00-92.90 % และ 67-79.16 % ตามลำดับ ส่วน recovery rate ของการเติมแปรกเนนไคออลมาตรฐาน ภายหลังต้มกับกรดในวิธี TLC วิธี GLC และวิธี TLC + GLC ได้ 73.3-96.0 %, 87.30-96.40 % และ 79-84.16 % ตามลำดับ สำหรับการทดสอบ reproducibility ของทั้ง 3 วิธี จากการทดลองวัดปริมาณแปรกเนนไคออลในปัสสาวะแต่ละตัวอย่างซ้ำกัน 10 ครั้ง เมื่อหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานพบว่า การทดลอง 10 ครั้ง มีค่าอยู่ระหว่าง range ที่มีระดับความเชื่อมั่น 95 %
2. เสถียรภาพของแปรกเนนไคออลในปัสสาวะ เมื่อเก็บไว้ที่ 0° - 4° ซ. ประมาณ 1 ปี โดยไม่ใส่สารกันบูด เพื่อรอการทดลองในวิธี GLC และ วิธี TLC + GLC พบว่าลักษณะกราฟของระดับแปรกเนนไคออลตลอดรอบเดือนของผู้ถูกทดลอง 1 ราย ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม
3. ในการฉีดสารละลายแปรกเนนไคออลมาตรฐาน (มีความเข้มข้น 1 มก./มล.) ควบคู่กับการฉีดตัวอย่างสารละลายแปรกเนนไคออลที่สกัดจากปัสสาวะเข้าเครื่องโครมาโตกราฟ นั้น ปริมาตรที่เหมาะสมคือ 2 ไมโครลิตร เพราะจะได้ peak ของแปรกเนนไคออลคงที่มากที่สุด
4. ปริมาณแปรกเนนไคออลในปัสสาวะที่วัดโดยวิธีต่าง ๆ
  - 4.1 ในระยะไม่ตั้งครรภ์ ทำการทดลองในสตรีไม่ตั้งครรภ์ปกติจำนวน 5 ราย เมื่อวัดโดยวิธี TLC ในระยะครึ่งแรกรอบเดือน ระดับแปรกเนนไคออลอยู่ระหว่าง 0.11-0.31 มก.ต่อปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ในระยะครึ่งหลังรอบเดือน อยู่ระหว่างประมาณ

- 2-5 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และวัดโคโยวิธี GLC นั้น ระดับในระยะครึ่งแรกรอบเดือนอยู่ระหว่าง 0.51-0.87 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ส่วนระดับในระยะครึ่งหลังรอบเดือน มีค่าประมาณอยู่ระหว่าง 2-7 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ถ้าวัดโคโยวิธี TLC + GLC ทำการทดลองในผู้ถูกทดลอง 1 ราย ได้ค่าแปรกเนนไคออล ในระยะครึ่งแรกรอบเดือน 0.68 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และระดับในระยะครึ่งหลังรอบเดือนประมาณ 4 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง
- 4.2 ปริมาณแปรกเนนไคออลที่เริ่มจากภาวะไม่ตั้งครรภ์ จนถึงภาวะตั้งครรภ์ในบุคคลเดียวกันได้ทำการทดลองปัสสาวะในภาวะดังกล่าว 1 ราย ได้ระดับเฉลี่ยของแปรกเนนไคออลใน 15 วัน หลังจากมีประจำเดือนครั้งสุดท้าย 0.44 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และค่าสูงสุดในระยะวันที่ 15-30 ต่อมาเท่ากับ 2.94 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ระดับแปรกเนนไคออลจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น จากการตั้งครรภ์สัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 15 จะไม่เห็นชัดเจนนัก หลังจากสัปดาห์ที่ 15 จะเพิ่มจำนวนแปรกเนนไคออลจนเห็นได้ชัด และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนสูงสุดในสัปดาห์ที่ 38 ซึ่งปริมาณแปรกเนนไคออลในระยะตั้งครรภ์สัปดาห์ที่ 20-38 มีค่าประมาณอยู่ระหว่าง 10-31 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง
- 4.3 ปริมาณแปรกเนนไคออลในระยะตั้งครรภ์ปกติได้ทดลองวัดแปรกเนนไคออลในปัสสาวะสตรีตั้งครรภ์ปกติระยะต่าง ๆ จำนวน 15 ราย รวม 52 ตัวอย่าง ระดับแปรกเนนไคออลจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามจำนวนสัปดาห์การตั้งครรภ์ ค่าเฉลี่ยของแปรกเนนไคออลในระยะการตั้งครรภ์สัปดาห์ที่ 20 - 38 มีค่าอยู่ระหว่าง 7.23-33.40 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง หลังสัปดาห์ที่ 38 ระดับแปรกเนนไคออลจะลดลงเล็กน้อย (ประมาณ 22 มก. คอปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เป็นค่าที่ได้จากการทดลองเพียงตัวอย่างเดียว) จนถึงระยะคลอด
- 4.4 ปริมาณแปรกเนนไคออลในระยะตั้งครรภ์ผิดปกติ จากการทดลองวัดในสตรีตั้งครรภ์ผิดปกติด้วยโรคต่าง ๆ จำนวน 21 ราย พบว่าค่าส่วนใหญ่อยู่ระดับปกติ

5. ผลเปรียบเทียบระหว่างวิธีที่ใช้วัดเปอร์เซ็นต์ไดออกด ได้ผลว่าวิธี GLC วัดได้ค่าสูงกว่าวิธี TLC ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % แต่วิธี GLC จะได้ค่าไม่สูงกว่าวิธี TLC ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และวิธี GLC กับวิธี TLC + GLC ในระดับความเชื่อมั่น 95 % 2 วิธีนี้จะไม่มีความแตกต่างกัน
6. ควรจะได้อศึกษาคือไปถึงความแตกต่างระหว่างการทำ acetylation ก่อนทำ TLC และการทำ TLC ก่อนทำ acetylation แล้วจึงนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่องกาชโครมาโตกราฟ
7. ควรดำเนินการทดลองวัดระดับเปอร์เซ็นต์ไดออกดในระยะตั้งครรภ์ปกติและผิดปกติ เพิ่มขึ้นจะได้ค่าปกติ (normal value) ที่มีความกว้างขวางกว่านี้ เพื่อใช้เป็นมาตรฐานสำหรับเป็นเครื่องชี้บ่งความผิดปกติในระหว่างตั้งครรภ์ ส่วนในกรณีตั้งครรภ์ผิดปกติที่พบของได้ในแต่ละโรค ที่เพิ่มขึ้น เพื่อจะใช้เป็นเครื่องชี้บ่งว่าความผิดปกติในการเป็นโรคต่าง ๆ ระหว่างตั้งครรภ์ จะมีผลต่อการหลั่งโปรเจสเทอโรนของคอร์ปัสลูเทียม และรกหรือไม่
8. วิธีการทดลองที่เหมาะสมที่จะใช้วิเคราะห์เป็นงานประจำวัน สำหรับใช้ทางคลินิกนั้น ปัสสาวะไม่ตั้งครรภ์ และปัสสาวะตั้งครรภ์ไม่เกิน 20 สัปดาห์ ควรใช้วิธี TLC ที่ดัดแปลงมาใช้ในที่นี้ (ดัดแปลงจาก Sulimovici et al, 1965) ส่วนในปัสสาวะตั้งครรภ์ตั้งแต่ 20 สัปดาห์ขึ้นไป ควรใช้วิธี GLC (Brush et al, 1966)