บทที่ 2

สัตว์ทดลอง การทดลอง และการประเมินผลวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดฮอร์โมน

สัตว์ทดลอง

ลิงหางยาวเพศเมียจากโคโลนีของหน่วยวิจัยไพรเมต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 4 ตัว ทุกตัวเกิดในหน่วยวิจัยไพรเมต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอยู่ในวัยเจริญพันธุ์อายุ 5 - 6 ปี น้ำหนัก 3 - 4.5 กิโลกรัม ก่อนการทดลองแต่ละตัวเลี้ยงแยกไว้ในกรงเดี่ยวขนาด 24 นิ้ว × 34 นิ้ว × 28 นิ้ว ในเรือนเลี้ยงลิง มีอากาศถ่ายเทได้สะดวกและควบคุมปริมาณแสงที่ได้รับในแต่ละวัน กล่าวคือได้รับแสงวันละ 12 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 06.00 - 18.00 น. เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ในเวลาเช้า เสริมด้วยผักและผลไม้ เช่น แตงกวา ข้าวโพด กล้วย มันเทศ สับปะรด ในเวลาบ่าย และไข่ต้มสัปดาห์ละครั้ง ลิงทดลองดังกล่าวถูกขังแยกไว้ดังที่อธิบายมาข้างต้นตั้งแต่อดนมจนถึงวันเริ่มการทดลองและก่อนการทดลอง (ระยะควบคุม) ลิงทดลองเหล่านี้มีประจำเดือนสม่ำเสมอ 3 ครั้ง

กรงที่ใช้ในการทดลองมีสองแบบ แบบแรกเป็นกรงเดี่ยวขนาด 24 นิ้ว × 34 นิ้ว × 28 นิ้ว (ภาพที่ 2.1) อยู่ในเรือนเลี้ยงลิง ก่อนการทดลองแยกขังลิงทดลองไว้ในกรงเดี่ยวกรงละตัว แบบที่สองเป็นกรงขนาดใหญ่ แบ่งออกเป็นสองส่วน (ภาพที่ 2.2) ส่วนหนึ่งมีขนาด 80 นิ้ว × 121 นิ้ว × 65 นิ้ว ใช้เป็น ริเวณทดสอบพฤติกรรม อีกส่วนหนึ่งขนาด 24 นิ้ว × 34 นิ้ว × 28 นิ้ว ใช้เป็นบริเวณขังลิงทดลองขณะฉีดเคตตามีนฮัยโดรคลอไรด์ ทั้งสองส่วนนี้ติดต่อถึงกันได้ด้วยประตูเลื่อนซึ่งปกติจะปิดไว้และจะเปิดเมื่อต้องการจะฉีดเคตตามีนฮัยโดรคลอไรด์ก่อนทำการเจาะเลือด

การทดลอง

การเจาะเลือด

ก่อนเจาะเลือดทุกครั้งฉีดเคตตามีนฮัยโดรคลอไรด์เพื่อลดความกระวนกระวายขณะเจาะเลือด โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) ขนาด 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก

ตัว 1 กิโลกรัม เจาะเลือดลิงทดลองแต่ละตัวครั้งละประมาณ 3 มิลลิลิตรจากเส้นเลือดดำหน้าขา (femoral vein) ใส่ในหลอดทดลอง ปิดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นนาน 30 นาที ความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที ใช้ปาสเตอร์ปิเปตแยกซีรัมที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออล โปรเจสเตอโรน และคอร์ติซอลด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

การบันทึกพฤติกรรม

การบันทึกพฤติกรรมกระทำหลังจากขังลิงทดลองทั้งสี่ตัวรวมกันในกรงขนาด 80 นิ้ว × 121 นิ้ว × 65 นิ้ว โดยผู้บันทึกนั่งสังเกตอยู่หลังกระจกด้านเดียว (one-way mirror) และบันทึกพฤติกรรมที่เกิดขึ้นลงในตารางที่ออกแบบไว้เพื่อบันทึกพฤติกรรมโดยเฉพาะ (ตารางที่ 2.1) พฤติกรรมที่บันทึกได้แก่

1. พฤติกรรมก้าวร้าว

1.1 แทนที่ (Displace; DI) ลิงตัวหนึ่งเดินไปยังลิงที่สนใจ และลิงที่ถูกสนใจลุกออกไปโดยไม่เกิดการต่อสู้ จากนั้นลิงตัวที่สนใจจะเข้าไปแทนที่ตำแหน่งของตัวที่ถูกสนใจในทันที บางครั้งการเข้าไปแทนที่ในตำแหน่งที่ลิงตัวเดิมอยู่นั้น อาจเกิดจากการผลักลิงที่อยู่เดิมออกไป (ภาพที่ 2.3)

1.2 ขู่ (Threat; TH) มีหลายระดับ ตั้งแต่การจ้องมอง (stare threat) จนถึงการอ้าปากขู่ (open mouth threat) มักจะเริ่มจากการจ้องมอง ผงกหัวขึ้นลง หูตั้งชัน กลอกตาไปมา และแยกเขี้ยวใส่ลิงอีกตัวหนึ่ง (ภาพที่ 2.4)

1.3 โจมตี (Attack; ATT) เกิดขึ้นเมื่อลิงตัวหนึ่งเข้าชน ไล่ต้อน หรือกระโดดเข้าหาลิงตัวที่เป็นเป้าหมาย กัด ทำร้ายบริเวณลำตัว หรือหางของลิงตัวที่เป็นเป้าหมาย

2. พฤติกรรมทางสังคมทั่ว ๆ ไป

2.1 เข้าใกล้ (Approach; AP) ลิงตัวหนึ่งเคลื่อนที่เข้าใกล้ลิงอีกตัวหนึ่งในระยะเอื้อมมือถึง และยังคงอยู่ในตำแหน่งนั้นอย่างน้อย 5 วินาทีโดยไม่มีการต่อสู้ (ภาพที่ 2.5)

2.2 เสนอตัว (Present; PR) ถ้าเป็นพฤติกรรมทางเพศ คือการที่สิงเพศเมียเข้าใกล้สิงเพศผู้ และทำท่าย่อตัวลงหันสะโพกให้กับสิงเพศผู้พร้อมกับหันมามองเพศผู้ จากนั้นจะวิ่งห่างจากเพศผู้เป็นระยะทางสั้น ๆ และกระทำกริยาเดิมซ้ำอีก แต่ถ้าเป็นพฤติกรรมทางสังคมทั่วไปจะเกิดขึ้นเมื่อสมาชิกที่มีตำแหน่งทางสังคมต่ำหันหางไปทางสมาชิกที่มีตำแหน่งทางสังคมสูงกว่า และยกหางขึ้นพร้อมกันหันมามอง สิงตัวที่มีตำแหน่งทางสังคมสูงกว่า (ภาพที่ 2.6)

2.3 Invite to groom (INV) สิงตัวหนึ่งเข้าใกล้สิงอีกตัวหนึ่งในระยะเอื้อมมือถึง จากนั้นก้มหัวลงต่ำหรืออาจจะหันส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายให้ และหยุดนิ่งอยู่เช่นนั้น (ภาพที่ 2.7)

2.4 Groom (GR) สิงตัวหนึ่งใช้มือเก็บอนุภาคเล็ก ๆ ที่ติดอยู่ตามขนหรือหนังของสิงอีกตัวหนึ่งเข้าปาก (ภาพที่ 2.8)

2.5 ถอยหนี (Withdraw; WD) สิงตัวหนึ่งเดินหนีเมื่อสิงอีกตัวหนึ่งเดินมาบางครั้งอาจจะถูกขู่หรือถูกโจมตีด้วย

<u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางพฤติกรรม</u>

ข้อมูลทางพฤติกรรมวิเคราะห์ด้วย non-parametric statistics โดยหาค่ามีเดียนและควอไทล์ ดีวิเอชัน ทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ด้วย Kruskal-Wallis Test เมื่อพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงทดสอบโดยใช้ Man-Whitney U Test ในแต่ละคู่

ในรายงานนี้ ศึกษาและเก็บข้อมูล 2 ประเภท คือ ประเภทแรกเป็นข้อมูลทางฮอร์โมน ได้แก่ อีสตราไดออล โปรเจสเตอโรน และคอร์ติซอล ประเภทที่สองเป็นข้อมูลทางพฤติกรรม การทดลองแบ่งออกเป็นสองระยะ คือ

1. ระยะควบคุม ระยะนี้เก็บเฉพาะข้อมูลทางฮอร์โมน ขังสิงทดลองแต่ละตัวแยกไว้ในกรงเดี่ยวขนาด 24 นิ้ว × 34 นิ้ว × 28 นิ้ว เจาะเลือดในตอนเช้าเวลา 08.00 - 08.30 น. ครั้งละ 3 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 2 วัน คือวันจันทร์และวันพฤหัสบดีเป็นเวลา 3 เดือน

2. ระยะทดลอง ระยะนี้เก็บข้อมูลทางฮอร์โมนและพฤติกรรม ย้ายลิงทดลองทั้งสี่ตัวมาขังไว้ในกรงเดียวกัน ขนาด 80 นิ้ว × 121 นิ้ว × 65 นิ้ว ในสามเดือนแรกเจาะเลือดสัปดาห์ละ 2 วัน คือวันจันทร์และวันพฤหัสบดี เวลา 08.00 - 08.30 น. ครั้งละ 3 มิลลิลิตร ระยะสี่เดือนหลังเจาะเลือดครั้งละ 3 มิลลิลิตร ในช่วงเวลาเดียวกัน คือ 08.00 - 08.30 น. สัปดาห์ละ 1 วัน การบันทึกพฤติกรรมใน 75 วันแรกของการทดลอง บันทึกทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง ๆ ละ 20 นาที คือ ช่วงเช้าเวลา 07.30 - 07.50 น. และช่วงบ่ายเวลา 13.30 - 13.50 น. วันที่ 76 ถึง 171 ของการทดลอง บันทึกสัปดาห์ละ 2 วัน ๆ ละ 2 ครั้ง ๆ ละ 20 นาที เวลา 07.30 - 07.50 น. และ 13.30 - 13.50 น. ตั้งแต่วันที่ 172 จนสิ้นสุดการทดลอง บันทึกพฤติกรรมสัปดาห์ละ 1 วัน ๆ ละ 2 ครั้งในช่วงเวลาเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว ข้อมูลที่ได้จากการทดลองช่วงเช้าและบ่ายรวมกันเป็นหนึ่งการทดลอง การวิเคราะห์ผลการทดลองแบ่งวิเคราะห์เป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรกจำนวน 58 การทดลอง และระยะที่สองจำนวน 51 การทดลอง โดยดูจากจำนวนความก้าวร้าวที่ลดลง

การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนต่าง ๆ จะใช้วิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของ WHO Method Manual ปี 1981

014485

ตารางที่ 2.1 ตารางบันทึกพฤติกรรม

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ตารางบันทึกพฤติกรรม

เวลา.....

Actor / Recipient	603								605								606								607							
	AP	PR	INV	GR	WD	DI	TH	ATT	AP	PR	INV	GR	WD	DI	TH	ATT	AP	PR	INV	GR	WD	DI	TH	ATT	AP	PR	INV	GR	WD	DI	TH	ATT
603																																
Total																																
605																																
Total																																
606																																
Total																																
607																																
Total																																

ตารางที่ 2.2 รายละเอียดเกี่ยวกับการเจาะเลือดลิงทดลองในระยะควบคุมและระยะทดลอง

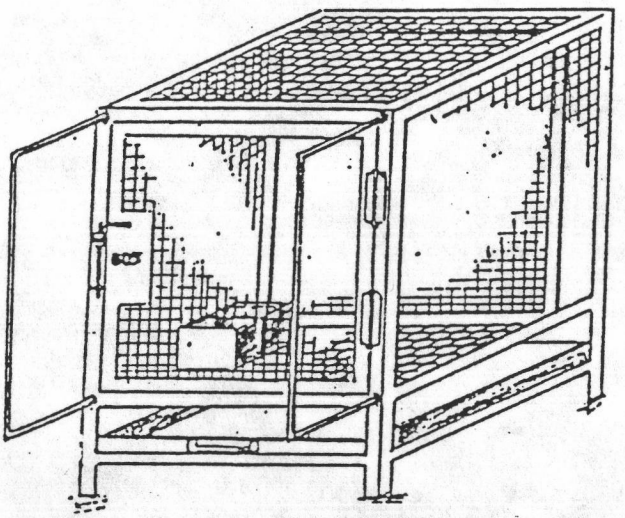
ระยะ	สถานภาพ	ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง (เดือน)	วันที่เจาะเลือดในแต่ละสัปดาห์	จำนวน (มิลลิลิตร)	เวลาที่เจาะ
ควบคุม	อยู่ตามลำพัง	3	วันจันทร์และวันพฤหัสบดี	3	08.00 - 08.30 น.
ทดลอง	อยู่รวมกัน	3	วันจันทร์และวันพฤหัสบดี	3	08.00 - 08.30 น.
		4	วันพฤหัสบดี	3	08.00 - 08.30 น.

ตารางที่ 2.3 ความถี่ของการบันทึกพฤติกรรมในระหว่างการทดลองทั้งสองระยะ

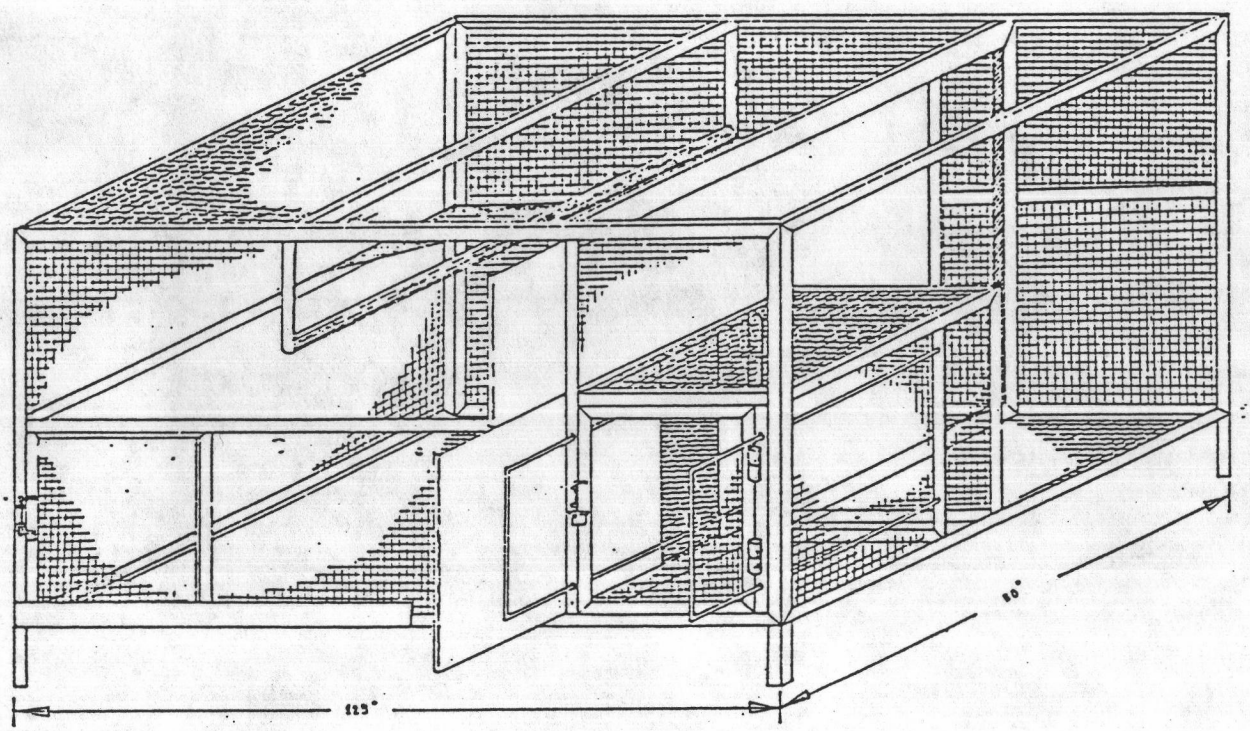
ระยะเวลาของการทดลอง	การบันทึกพฤติกรรม
75 วันแรกของการทดลอง	บันทึกทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง ๆ ละ 20 นาที
วันที่ 76 - 171 ของการทดลอง (96 วัน)	บันทึกสัปดาห์ละ 2 วัน ๆ ละ 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
วันที่ 172 - 209 ของการทดลอง (38 วัน)	บันทึกสัปดาห์ละ 1 วัน ๆ ละ 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที

ตารางที่ 2.4 ระยะเวลาการมีประจำเดือนครั้งแรกของลิงทดลองหลังการอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

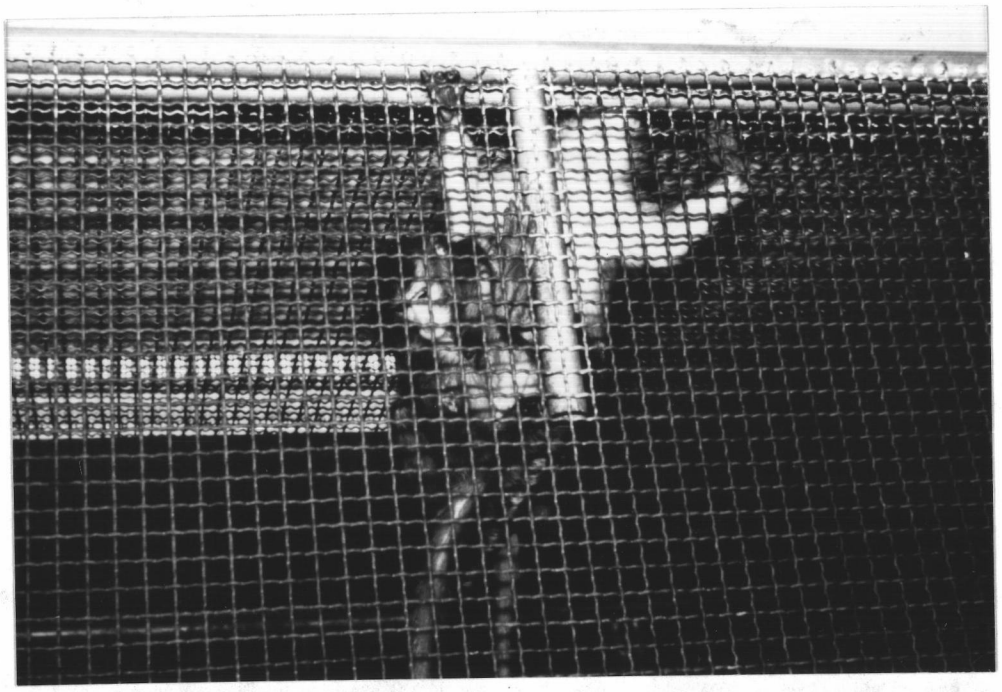
หมายเลขลิงทดลอง	ระยะเวลาที่มีประจำเดือนครั้งแรกหลังจากอยู่รวมกัน (วัน)
607	358
606	374
605	103 (นับจากวันแรกของระยะที่สอง 43 วัน)
603	6



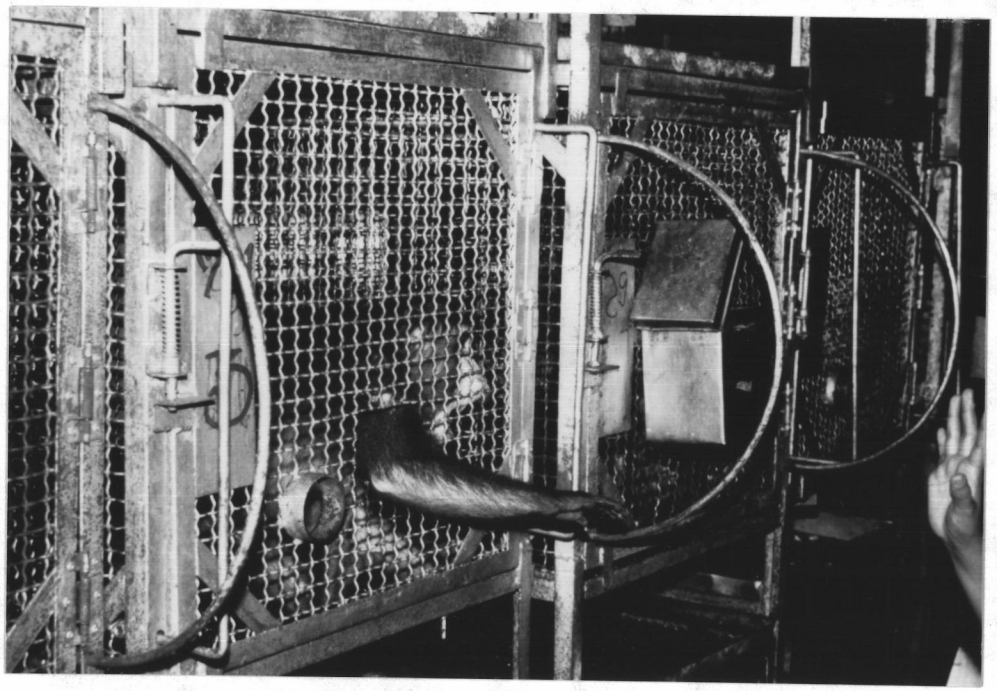
ภาพที่ 2.1 ลักษณะของกรงที่ใช้เลี้ยงลิงในระยะควบคุม



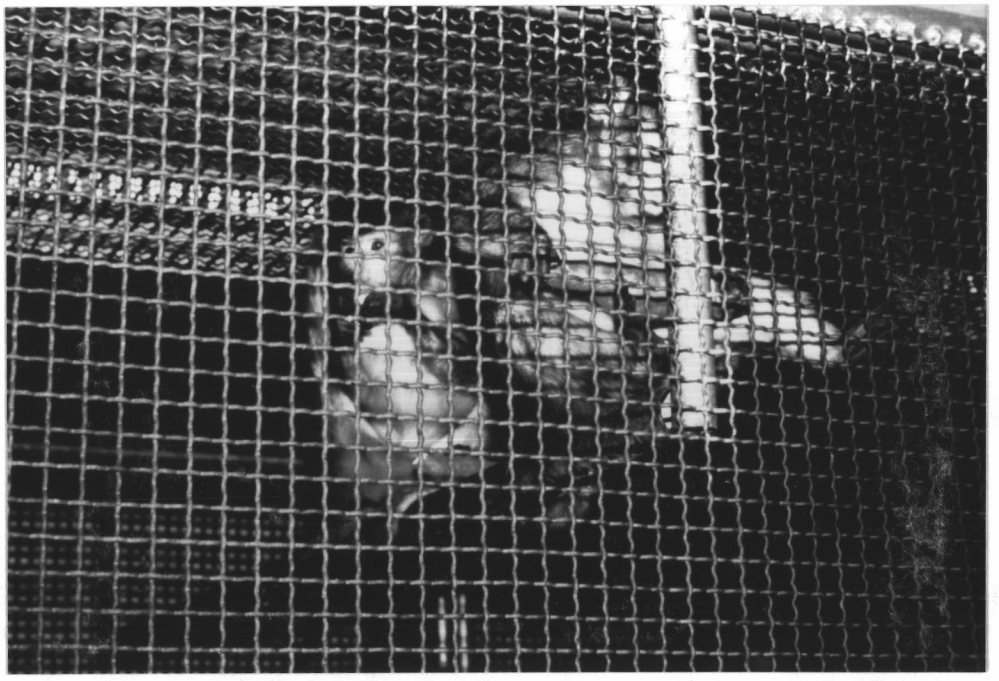
ภาพที่ 2.2 ลักษณะของกรงที่ใช้ในการศึกษาพฤติกรรม



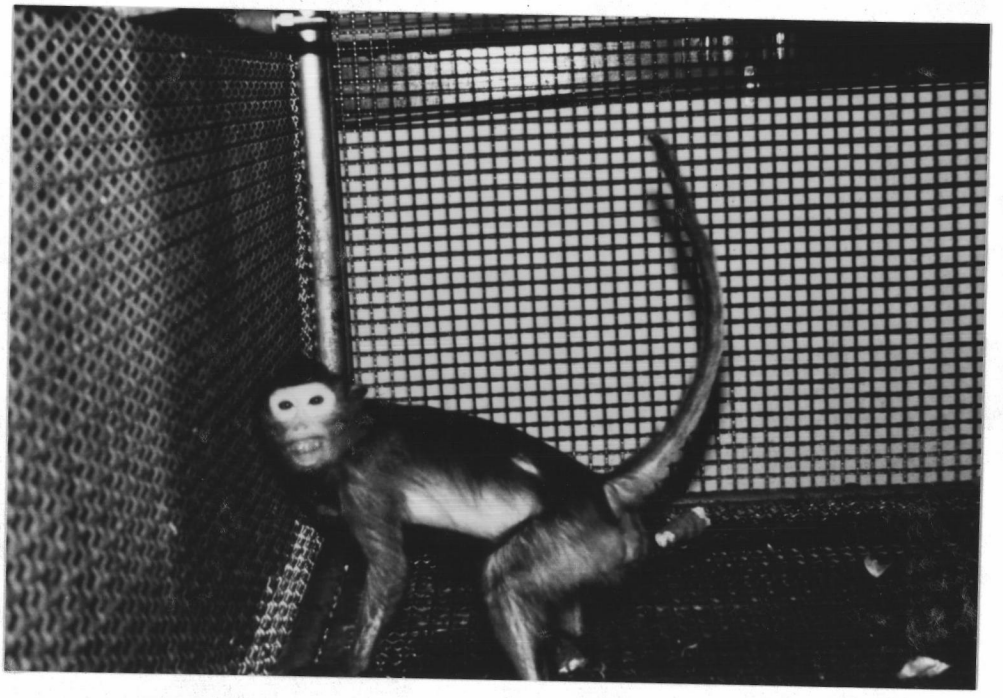
ภาพที่ 2.3 พฤติกรรมแทนที่ (Displace)



ภาพที่ 2.4 พฤติกรรมขู่ (Threat)

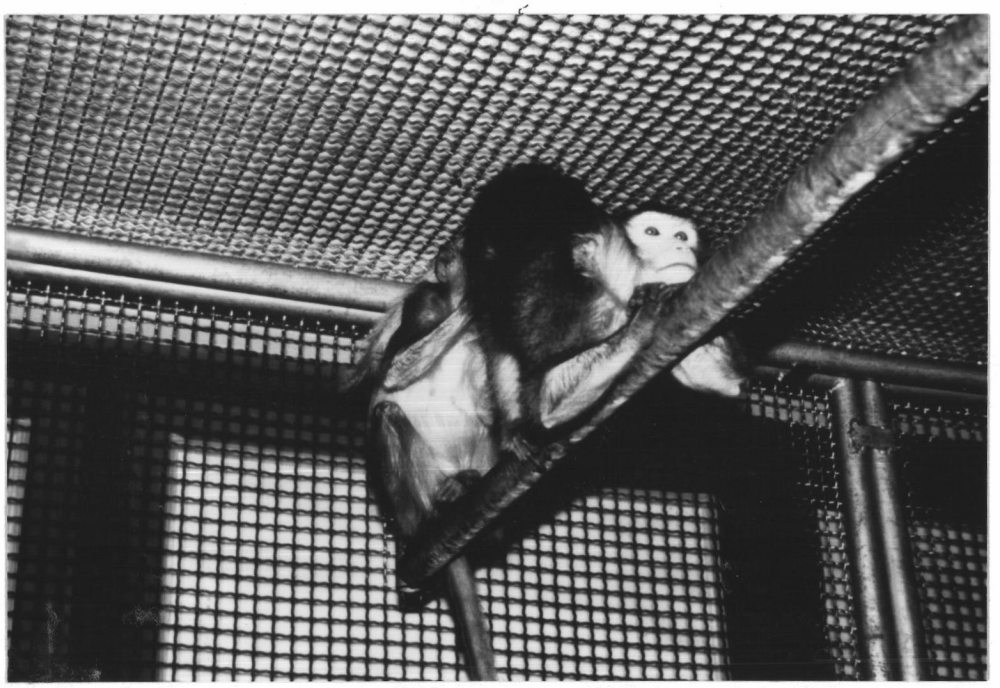


ภาพที่ 2.5 พฤติกรรมเข้าใกล้ (Approach)

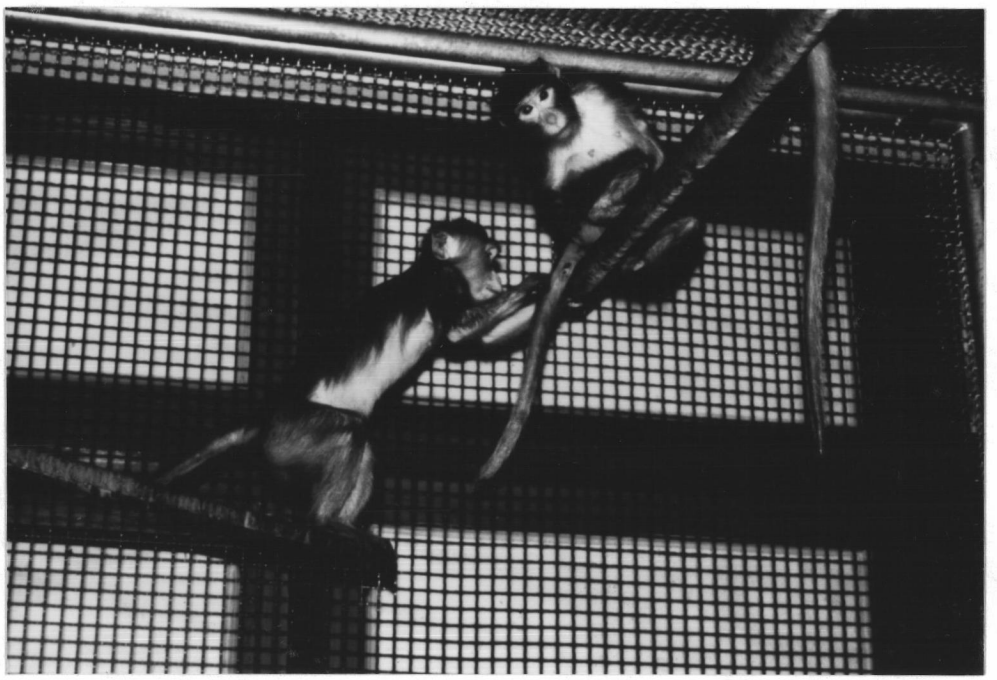


ภาพที่ 2.6 พฤติกรรมเสนอตัว (Present)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.7 พฤติกรรมเชื้อเชิญ (Invite to groom)



ภาพที่ 2.8 พฤติกรรม Groom

การศึกษาด้านฮอร์โมน

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล โปรเจสเตอโรน และคอร์ติซอล ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ได้แก่

1. Absolute ethanol : Proanalyse Merk Germany

2. Antiserum to Oestradiol : Batch No. 81/E WHO RIA Macthed Reagent Programe

3. Antiserum to Progesterone : Batch No. 81/G WHO RIA Matched Reagent Programe

4. Antiserum to Cortisol : Batch No. k907010 WHO RIA Matched Reagent Programe

5. ^{3}H-Oestradiol : Amersham International PLC England

6. ^{3}H-Progesterone : Amersham International PLC England

7. ^{3}H-Cortisol : Amersham International PLC England

8. Oestradiol standard : Batch No. k079610 WHO RIA Matched Reagent Programe

9. Progesterone standard : Batch No. k079410 WHO RIA Matched Reagent Programe

10. Cortisol standard : Batch No. k079510 WHO RIA Matched Reagent Programe

11. Charcoal reagent : Batch No. 81/Q WHO RIA Matched Reagent Programe

12. Dextran : Batch No. 82/83/S WHO RIA Matched Reagent Programe

13. Sodium dihydrogen phosphate : Proanalysi Art. 6346 E. Merk, Darmstadt

14. Disodium hydrogen phosphate : Proanalysi Art. 6586 E. Merk, Darmstadt

15. Sodium Chloride : General Purpose reagent BDH Chemicals Ltd., Pode England

16. Thiomersal : Sigma Chemical Comp., U.S.A.

17. Gelatin : Bacto Gelatin Difco Laboratories, U.S.A.

18. PPO (2, 5-diphenyloxazole) : Art. 2946 E. Merk, Darmstadt

19. PoPoP (1, 4-bis [2-(5-phenyl oxazolyl)]-Benzene; Phenyl-oxazolylphenyl-Oxazolyl-Phenyl) : Sigma Chemical Comp., U.S.A.

20. Toluene : Proanalysi E. Merk, D-6100 Darmstadt, F.R. Germany

21. 1, 4-Dioxan : Proanalysi Art. 9671 E. Merk, Darmstadt.

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียด : Right a Weight, M.W. Aingworth & Son Inc, U.S.A.

2. เข็มฉีดยาเบอร์ 22 และ 27 : Turumo Corporation, Tokyo, Japan

3. Syringe ขนาด 5 หรือ 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร (disposible syringe) : Turumo Corporation, Tokyo, Japan

4. Refrigerated Centrifuge

5. Vortex mixer : M 16715, Thermolyne Corporation, Iowa, U.S.A.

6. pH meter : 5985 Cole Parmer Instrument Company, Chicago, Illinoi 60648, U.S.A.

7. Magnetic stirrer : S-18520 Thermolyne Corporation, Iowa, U.S.A.

8. Tri-block heater : U-460, Thecam incorporated, Princeton, N.J., U.S.A.

9. β-Liquid Scintillation Counter : Packard Instrument Co., Model BPL, U.S.A.

10. Micropipet : Pipets : Pipetteman M. 81 Gilson France Eppendorf 3130 Germany

11. Micro-re/Pipetter : Semi Emeryvulle, Calif. 94608, U.S.A.

การวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล

สารละลายและวิธีเตรียม

1. Assay buffer เตรียมโดยใช้

Sodium dihydrogen orthophosphate (hydrate)	3.10	กรัม
Disodium hydrogen orthophosphate (anhydrous)	11.60	กรัม
Sodium Chloride	8.80	กรัม
Thiomersal (merthiolate)	0.10	กรัม
Gelatin	1.00	กรัม

สารละลายทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร (โดยอุ่น gelatin ในน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยก่อน แล้วเติมสารอื่นลงไป เมื่อละลายหมดเติมน้ำกลั่นลงไปให้เป็นหนึ่งลิตร) ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2 - 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานหนึ่งเดือน

2. Oestradiol standard เตรียมโดยใช้ oestradiol standard จาก WHO ซึ่งมีความเข้มข้น 16 นาโนโมลต่อลิตร ปิเปตสารละลายนี้ 500 ไมโครลิตร เติม assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายอีสตราไดออลมาตรฐานซึ่งมีความเข้มข้น 800 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 800 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ถึง 25 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

3. Oestradiol working tracer เตรียมโดยใช้ oestradiol stocking tracer ซึ่งมีความแรง 10 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วย compressor air แล้วเติม assay buffer 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 66.67 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร

4. Oestradiol antiserum เตรียมโดยใช้ oestradiol antiserum จาก WHO ซึ่งอยู่ในรูปที่ระเหยแห้ง เมื่อจะใช้เติม assay buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายให้หมด เตรียมแล้วใช้ทันที เก็บไว้ไม่ได้

5. Charcoal suspension เตรียมโดยใช้ dextran 0.0625 กรัม ละลายใน assay buffer 100 มิลลิลิตร แล้วเติม charcoal 0.625 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้นาน 1 เดือน เมื่อจะใช้ต้องทำให้อยู่ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเสมอ โดยแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา

6. Counting solution

PPO	5	กรัม
POPOP	0.3	กรัม
Toluene	1	ลิตร
1, 4-Dioxan	200	มิลลิลิตร

ละลาย PPO และ POPOP กับ toluene แล้วจึงเติม 1, 4-Dioxan ผสมให้เข้ากัน

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล

1. การสกัด

ใส่ซีรัมตัวอย่างจำนวน 200 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองรูปกรวยตัวอย่างละ 2 หลอด เติม diethyl ether 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์นาน 1 นาที แล้วแยกชั้นน้ำออกจากชั้น ether โดยแช่ลงในถาดที่มี absolute ethanol ผสมกับน้ำแข็งแห้ง รินส่วนของอีเทอร์ซึ่งมีอีสตราไดออลละลายอยู่ลงในหลอดทดลอง นำไปทำให้แห้งด้วย tri-block heater ซึ่งมีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2. เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของอีสตราไดออล

ละลายอีสตราไดออลที่ระเหยอีเทอร์ออกแล้ว เติมด้วย assay buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากันอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นเติม oestradiol antiserum 100 ไมโครลิตร และ oestradiol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเติม charcoal suspension ที่ปั่นในภาชนะที่แช่น้ำแข็งไว้ตลอดเวลาจำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่วางบนถาดน้ำแข็ง วอร์เท็กซ์แล้วทิ้งไว้ 15 นาที จึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที รินส่วนใสลงใน counting vials จากนั้นเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องตรวจวัดรังสีเบต้า

แต่ละแอสเสย์ประกอบด้วยหลอดใส่สารตัวอย่าง หลอดใส่สารมาตรฐาน หลอดใส่สารควบคุมคุณภาพ หลอด non specific binding (NSB) หลอด maximum binding ซึ่งแต่ละหลอดมีส่วนประกอบของสารแตกต่างกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.5 และหลอด blank

2.1 หลอดใส่สารตัวอย่าง ได้จากส่วนที่สกัด และระเหย ether ออกแล้ว และทำตามขั้นตอนในข้อ 2 จนสิ้นสุดขบวนการ จะทราบปริมาณอีสตราไดออลในซีรัมได้ เมื่อนำค่า count ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2 หลอดควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล์ในซีรัม (quality Control; Q.C.) นำซีรัมลิงหางยาวเพศเมียซึ่งเป็นซีรัมรวม (pool serum) มาปิเปตใส่หลอดทดลองรูปกรวย 6 หลอด ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล ทำควบคู่ไปกับหลอดใส่สารตัวอย่าง ทำเพื่อทดสอบหาความแม่นยำของการวิเคราะห์

2.3 หลอดใส่สารมาตรฐาน ทำโดยนำอีสตราไดออลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400 และ 800 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ปิเปตใส่หลอดทดลอง 3 หลอด ๆ ละ 500 ไมโครลิตร (ในแต่ละความเข้มข้น) นำมาวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัด เติม oestradiol antiserum และ oestradiol tracer ได้เลย แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 2 ต่อไปจนสิ้นสุดกระบวนการ

2.4 การเตรียมหลอด non specific binding (NSB) เตรียมโดยเติม assay buffer 600 ไมโครลิตร และ oestradiol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 2 ต่อไป จนสิ้นสุดกระบวนการ ทำเพื่อทดสอบว่า tracer ที่จับกับสารอื่นที่ไม่ใช่ antibody เมื่อใช้ผงถ่านดูดซับแล้วจะมีปริมาณรังสีเหลือเท่าไร

2.5 หลอด maximum binding (Bo) เตรียมโดยเติม assay buffer 500 ไมโครลิตร oestradiol antiserum 100 ไมโครลิตร และ oestradiol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำตามขั้นตอนในข้อ 2 ต่อไปจนสิ้นสุดกระบวนการ ทำเพื่อทดสอบว่า เมื่อ oestradiol antiserum และ oestradiol tracer จับกันสูงสุด จะมีปริมาณรังสีเท่าไร

2.6 หลอด blank เตรียมโดยการเติม counting solution 5 มิลลิลิตรลงใน counting vial ที่มี assay buffer 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณรังสี ทำเพื่อทดสอบว่า counting vial และ counting solution มีกัมมันตภาพรังสีปริมาณเท่าใด

ตารางที่ 2.5 ปริมาตรของสารละลายในหลอดทดลองต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล

สารละลาย / หลอดทดลอง	Tracer (ไมโครลิตร)	Antiserum (ไมโครลิตร)	Buffer (ไมโครลิตร)	Standard (ไมโครลิตร)	Total (ไมโครลิตร)
NSB	100	-	600	-	700
Bo	100	100	500	-	700
Standard	100	100	-	500	700
Sample	100	100	500	-	700
Q.C.	100	100	500	-	700

3. ประสิทธิภาพของการสกัด

ประสิทธิภาพของการสกัดคิดออกมาเป็นเปอร์เซนต์ของ recovery ทำโดยใส่ตัวอย่างซีรัม 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง 3 หลอด เติม oestradiol tracer 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วไปสกัดด้วย ether 5 มิลลิลิตรเช่นเดียวกับตัวอย่างอื่น ๆ จนได้ส่วนที่แห้ง นำส่วนที่แห้งมาละลายโดยเติม assay buffer 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่ลงใน counting vial เติม counting solution ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวัดกัมมันตภาพรังสี เปรียบเทียบปริมาณกัมมันตภาพรังสีที่วัดได้กับปริมาณกัมมันตภาพรังสีของ oestradiol tracer 50 ไมโครลิตรที่ไม่ได้ถูกสกัด ก็จะทราบประสิทธิภาพของการสกัดได้ ประสิทธิภาพของการสกัดของอีสตราไดออลที่วัดได้ 87.57 ± 5.23 เปอร์เซนต์

<u>การคำนวณ</u>

1. กราฟมาตรฐาน นำค่า CPM ของ oestradiol standard ในแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ย แล้วลบออกด้วย CPM ของ NSB นำค่าที่ได้ไป plot กับความเข้มข้นของ oestradiol standard บนกระดาษกราฟ semilog

2. ตัวอย่างซีรัม นำค่า CPM ของตัวอย่างซีรัมแต่ละค่าลบด้วย CPM ของ NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน ได้ค่าเป็นเฟมตาโมลต่อหลอดทดลอง เปลี่ยนเป็นเฟมตาโมลต่อมิลลิลิตร โดยคิดตามปริมาณที่ใช้

3. เปอร์เซนต์ประสิทธิภาพของการสกัด (% recovery)

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{CPM ที่สกัดได้}}{\text{CPM ที่ใช้เติม}} \times 100$$

4. quality control คำนวณเช่นเดียวกับตัวอย่างซีรัม นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกันภายในแต่ละแอสเสย์ และระหว่างแอสเสย์ เพื่อทดสอบ precision

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรเจสเตอโรน

สารละลายและวิธีเตรียม

1. Assay buffer เตรียมโดยใช้สารเคมี และวิธีการเดียวกับ assay buffer ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล

2. Progesterone standard เตรียมโดยใช้ progesterone standard จาก WHO ซึ่งมีความเข้มข้น 25 นาโนโมลต่อลิตร มิเปตสารละลายนี้ 500 ไมโครลิตร เติม assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐานซึ่งมีความเข้มข้น 1,250 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ทำ serial dilution ให้ถึง 19.5 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

3. Progesterone working tracer เตรียมโดยใช้ progesterone stocking tracer ซึ่งมีความแรง 100 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วย compressor air แล้วเติม assay buffer 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 66.67 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร

4. Progesterone antiserum เตรียมโดยใช้ progesterone antiserum จาก WHO ซึ่งอยู่ในรูปของสารระเหยแห้ง แล้วเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายให้หมด เตรียมแล้วใช้ได้ทันที

5. Charcoal suspension เตรียมโดยใช้สารเคมีและวิธีการเดียวกันกับที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล

6. Counting solution เตรียมโดยใช้สารเคมีและวิธีการเดียวกันกับที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออล

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรเจสเตอโรน

1. การสกัด

ใส่ตัวอย่างซีรัม 150 ไมโครลิตร ถ้าอยู่ในระยะฟอลลิคูลาร์ และระยะกลางของรอบเดือน และ 50 ไมโครลิตรถ้าอยู่ในระยะลูเทียล ลงในหลอดทดลองรูปกรวย ตัวอย่างละ 2 หลอด เติม diethyl ether 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์นาน 1 นาที แล้วแยกชั้นน้ำออกจากชั้นอีเทอร์ โดยแช่ลงในถาดที่มี absolute ethanol ผสมกับน้ำแข็งแห้ง รินส่วนของอีเทอร์ซึ่งมีโปรเจสเตอโรนละลายอยู่ลงในหลอดทดลอง ทำให้แห้งด้วย tri-block heater ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2. เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของโปรเจสเตอโรน

ละลายโปรเจสเตอโรนที่ระเหยอีเทอร์ออกแล้วด้วย assay buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที แล้วผสมอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นเติม progesterone antiserum 100 ไมโครลิตร progesterone tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเติม charcoal suspension ที่ปั่นอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่วางบนถาดน้ำแข็ง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ทิ้งไว้ 15 นาที จึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที รินส่วนใสลงใน counting vial จากนั้นเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปตรวจวัดรังสีเบต้า

ในแต่ละแอสเสย์ประกอบด้วย หลอดใส่สารตัวอย่าง หลอดใส่สารมาตรฐาน หลอดใส่สารควบคุมคุณภาพ หลอด NSB หลอด maximum binding ซึ่งแต่ละหลอดมีส่วนประกอบของสารแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.6 และหลอด blank

ตารางที่ 2.6 ปริมาตรของสารละลายในหลอดทดลองต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรเจสเตอโรน

สารละลาย / หลอดทดลอง	Tracer (ไมโครลิตร)	Antiserum (ไมโครลิตร)	Buffer (ไมโครลิตร)	Standard (ไมโครลิตร)	Total (ไมโครลิตร)
NSB	100	-	600	-	700
Bo	100	100	500	-	700
Standard	100	100	-	500	700
Sample	100	100	500	-	700
Q.C.	100	100	500	-	700

2.1 หลอดใส่สารตัวอย่าง ได้จากส่วนที่สกัดและระเหยอีเทอร์ออกแล้ว ทำตามขั้นตอนในข้อ 2 จนสิ้นสุดกระบวนการ จะทราบปริมาณของโปรเจสเตอโรนในซีรัม เมื่อนำค่า count ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2 หลอดควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์หาโปรเจสเตอโรนในซีรัม (quality control) นำซีรัมสิงหางยาวเพศเมียซึ่งเป็นซีรัมรวมปิเปตใส่หลอดทดลองรูปกรวย 6 หลอด ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรเจสเตอโรนตั้งแต่ขั้นตอนการสกัดจนสิ้นสุดกระบวนการ ทำควบคู่ไปกับหลอดใส่สารตัวอย่าง ทำเพื่อทดสอบความแม่นยำของการหาปริมาณสาร

2.3 หลอดใส่สารมาตรฐาน ทำโดยนำสารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 19.5, 39.05, 78.12, 156.25, 312.5, 625 และ 1,250 เฟมตาโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ปิเปตใส่หลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด ๆ ละ 500 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัด สามารถเติม progesterone antiserum และ progesterone tracer ได้เลย แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 2 จนสิ้นสุดกระบวนการ

2.4 หลอด non-specific binding เตรียมโดยการเติม assay buffer 600 ไมโครลิตร และ progesterone tracer ผสมให้เข้ากัน แล้วทำขั้นตอนในข้อ 2 จนถึงสิ้นสุดกระบวนการ ทำเพื่อทดสอบว่า tracer ที่จับกับสารอื่นที่มิใช่ antibody เมื่อใช้ผงถ่านดูดซับแล้วจะมีปริมาณรังสีเหลือเท่าใด

2.5 หลอด maximum binding (Bo) เตรียมโดยเติม assay buffer 500 ไมโครลิตร progesterone antiserum 100 ไมโครลิตร และ progesterone tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 2 จนสิ้นสุดกระบวนการ ทำเพื่อทดสอบว่า progesterone antiserum และ progesterone tracer จับกันสูงสุดจะมีปริมาณรังสีเท่าไร

2.6 หลอด blank เตรียมโดยการเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ลงใน counting vial ที่มี assay buffer 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณรังสี ทำเพื่อทดสอบว่า counting vial และ counting solution มีกัมมันตภาพรังสีปริมาณเท่าใด

3. ประสิทธิภาพของการสกัด

ประสิทธิภาพของการสกัด คิดออกมาเป็นเปอร์เซนต์ของ recovery ทำได้โดยปิเปตตัวอย่างซีรัม 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองจำนวน 3 หลอด จากนั้นเติม progesterone tracer 50 ไมโครลิตรทุกหลอด ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปสกัดด้วย diethyl ether 5 มิลลิลิตรเช่นเดียวกับตัวอย่างอื่น จนได้ส่วนที่แห้ง นำมาละลายด้วย assay buffer 700 ไมโครลิตร ใส่ลงใน counting vial เติม counting solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดรังสี เบต้า เปรียบเทียบปริมาณรังสีที่วัดได้กับปริมาณรังสีของ progesterone tracer 50 ไมโครลิตร ที่ไม่ได้ถูกสกัด ก็จะทราบประสิทธิภาพของการสกัดได้ ประสิทธิภาพของการสกัดของโปรเจสเตอโรนที่วัดได้ 77.45 ± 1.37 เปอร์เซนต์

<u>การคำนวณ</u>

ใช้วิธีการเดียวกันกับการหาปริมาณอีสตราไดออล

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอล</u>

1. สารละลายและวิธีเตรียม

1.1 Assay buffer เตรียมโดยใช้สารเคมีและวิธีการเดียวกันกับ assay buffer ที่ใช้ในการหาปริมาณอีสตราไดออลและโปรเจสเตอโรน

1.2 Cortisol standard เตรียมโดยใช้ cortisol standard ซึ่งอยู่ในรูป ethanolic solution มีความเข้มข้น 6.0 ไมโครโมลต่อลิตร ปิเปตมา 100 ไมโครลิตร ใส่ vial เป่าให้แห้งด้วย compressor air จากนั้นเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายให้หมด นำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใน water bath จะได้สารละลายคอร์ติซอลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 60 นาโนโมลต่อลิตร หรือ 60 พิโครโมลต่อมิลลิลิตร เรียกว่า "solution B" เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 - 3 สัปดาห์ เมื่อจะใช้ก็ทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 6,000 เฟมตาโมลต่อ 100 ไมโครลิตร ถึง 187 เฟมตาโมลต่อ 100 ไมโครลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที ปิเปตสารละลายคอร์ติซอลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 6,000, 3,000, 1,500, 750, 375 และ 187 เฟมตาโมลต่อ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด ๆ ละ 100 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอล ดังจะกล่าวต่อไปในข้อ 3

1.3 Cortisol working tracer เตรียมโดยใช้ cortisol stocking tracer ซึ่งมีความแรง 10 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร เป่าให้แห้งด้วย compressor air แล้วเติม assay buffer 7.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ working tracer ซึ่งมีความแรง 133.33 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร

1.4 Cortisol antiserum เตรียมโดยใช้ cortisol antiserum จาก WHO ซึ่งอยู่ในรูปที่ระเหยแห้ง เติม assay buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายให้หมด เตรียมแล้วใช้ทันที

1.5 Charcoal suspension เตรียมโดยใช้สารเคมีและวิธีการเดียวกันกับที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออลและโปรเจสเตอโรน

1.6 Counting solution เตรียมโดยใช้สารเคมีและวิธีการเดียวกันกับที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออลและโปรเจสเตอโรน

2. การเตรียมหลอดใส่สารตัวอย่าง และหลอดใส่สารควบคุมคุณภาพ

การเตรียมหลอดใส่สารตัวอย่างและหลอดใส่สารควบคุมคุณภาพมีวิธีการเช่นเดียวกันและทำพร้อมกัน มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

2.1 ปิเปตซีรัมตัวอย่างหรือซีรัมที่ใช้สำหรับควบคุมคุณภาพจำนวน 16 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

2.2 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์

2.3 อินคิวเบทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ใน water bath เพื่อ denature cortisol binding globulin

2.4 ทิ้งไว้ให้เย็น

2.5 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์

2.6 ปิเปตใส่หลอดทดลอง หลอดละ 100 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด สำหรับสารตัวอย่าง และตัวอย่างละ 3 หลอด สำหรับหลอดใส่สารควบคุมคุณภาพ

3. เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ของคอร์ติซอล

ทำโดยเติม assay buffer 400 ไมโครลิตรลงในหลอดใส่สารตัวอย่าง หลอดใส่สารควบคุมคุณภาพ และหลอดใส่สารละลายคอร์ติซอลมาตรฐาน ผสมให้เข้ากัน เติม cortisol antiserum 100 ไมโครลิตร และ cortisol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงเติม charcoal suspension ที่ปั่นอยู่ในภาชนะที่ใส่น้ำแข็งตลอดเวลาจำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลองที่วางไว้บนถาดน้ำแข็ง วอร์เท็กซ์แล้วทิ้งไว้ 15 นาที นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที รินส่วนใสลงใน counting vial จากนั้นเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดรังสีเบต้า

ในการทำแอสเสย์ นอกจากจะประกอบด้วยหลอดใส่สารตัวอย่าง หลอดใส่สารควบคุมคุณภาพ และหลอดใส่สารมาตรฐานแล้ว ยังประกอบด้วยหลอด NSB หลอด maximum binding ซึ่งแต่ละหลอดมีส่วนประกอบของสารแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.7 และหลอด blank

หลอด non-specific binding

เตรียมโดยเติม assay buffer 600 ไมโครลิตร และ cortisol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 3 ต่อไปจนสิ้นสุดกระบวนการ ทำเพื่อทดสอบว่า tracer ที่จับกับสารอื่นที่มิใช่ antibody เมื่อใช้ผงถ่านดูดซับแล้วจะมีปริมาณรังสีเหลือเท่าใด

หลอด maximum binding

เตรียมโดยเติม assay buffer 500 ไมโครลิตร cortisol antiserum 100 ไมโครลิตร และ cortisol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 3 จนสิ้นสุดกระบวนการ ทำเพื่อทดสอบดูว่า cortisol tracer จับกับ cortisol antiserum สูงสุดจะมีปริมาณรังสีเท่าไร

หลอด blank

เตรียมโดยการเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ลงใน counting vial ที่มี assay buffer 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจวัดรังสี เพื่อดูว่า counting vial และ counting solution มีปริมาณรังสีเท่าใด

การคำนวณ

ใช้วิธีการเดียวกันกับการหาปริมาณอีสตราไดออล

การประเมินผลวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดฮอร์โมน

การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการตรวจวัดสาร (reliability of method) Abraham (1974) ได้ให้ข้อเสนอว่า ควรจะมีการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) และความไวของการวัดปริมาณ (sensitivity)

1. ความจำเพาะ (specificity)

เป็นการตรวจสอบว่า antiserum นอกจากจะทำปฏิกริยากับฮอร์โมนที่ศึกษาแล้ว ยังสามารถทำปฏิกริยากับฮอร์โมนอื่นได้เท่าใด โดยคิดเป็นเปอร์เซนต์เมื่อทำปฏิกริยากับฮอร์โมนอื่น (cross reaction) ซึ่ง oestradiol, progesterone และ cortisol antiserum ได้ทำการทดสอบแล้ว ดังตารางที่ 2.11, 2.12 และ 2.13 ตามลำดับ (WHO Match Reagent Programe, 1986) เมื่อการเกาะเกี่ยว (B/Bo) เท่ากับ 50 เปอร์เซนต์

2. ความแม่นยำ (precision)

Abraham (1971, 1974) เสนอให้ทดสอบความแม่นยำได้จากสารตัวอย่างเดียวกัน (quality control) ทำการทดสอบหลาย ๆ ครั้ง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปอร์เซนต์ความแม่นยำของการวิเคราะห์ได้จากเปอร์เซนต์ของสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation; C.V.) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\% \text{ C.V.} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสาร}}{\text{ค่ามัชฌิมเลขคณิต}} \times 100$$

ความแม่นยำของการตรวจหาปริมาณอีสตราไดออล โปรเจสเตอโรน และคอร์ติซอล โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ได้จากการตรวจหาปริมาณอีสตราไดออล (4 ครั้ง) โปรเจสเตอโรน (4 ครั้ง) และคอร์ติซอล (2 ครั้ง) พบว่าในการทดลองเดียวกัน (intra assay) มีสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน 2.22, 1 และ 2.17 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ส่วนสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนในระหว่างการทดลอง (inter assay) มีค่าเป็น 2.93, 11.90 และ 3.44 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

3. ความถูกต้อง

เป็นการทดสอบค่าที่วัดได้ว่าถูกต้องตามความเป็นจริงหรือไม่ มากน้อยเพียงใด ความถูกต้องของการตรวจวัดหาได้จาก การนำสารหรือฮอร์โมนที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนไปตรวจวัดโดยวิธีเดียวกับตัวอย่าง แล้วเปรียบเทียบผลกับค่าที่ทราบอยู่แล้ว ค่าของความถูกต้องคิดเป็นเปอร์เซนต์ recovery

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนจริง}} \times 100$$

ในการตรวจวัดครั้งนี้ ได้หาความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณอีสตราไดออล (4 ครั้ง) โปรเจสเตอโรน (4 ครั้ง) และคอร์ติซอล (2 ครั้ง) พบว่ามีความถูกต้องของการวิเคราะห์โดยคิดเป็นเปอร์เซนต์ recovery 80 ± 2.16, 80 ± 3.5 และ 77.5 ± 3.54 เปอร์เซนต์ตามลำดับ เมื่อเติมอีสตราไดออล โปรเจสเตอโรน และคอร์ติซอล จำนวน 100, 100 และ 50 ไมโครลิตรตามลำดับ

4. ความไว (sensitivity)

ความไวของการตรวจวัดเป็นค่าที่น้อยที่สุดของสารที่การตรวจวัดนั้นสามารถตรวจวัดได้ โดยแยกจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งในการตรวจวัดครั้งนี้ใช้ค่าปริมาณฮอร์โมนที่ระดับ 95 เปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว โดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน ความไวของการตรวจวัดอีสตราไดออล (n = 12) โปรเจสเตอโรน (n = 12) และคอร์ติซอล (n = 6) มีค่า 13.06 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร 12.56 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 48 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

<u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางฮอร์โมน</u>

การวิเคราะห์ข้อมูลทางฮอร์โมนใช้ parametric statistics โดยหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ด้วย one-way analysis of variance และ HSD test

ตารางที่ 2.7 ปริมาตรของสารละลายในหลอดทดลองต่าง ๆ ที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอล

สารละลาย / หลอดทดลอง	Tracer (ไมโครลิตร)	Antiserum (ไมโครลิตร)	Buffer (ไมโครลิตร)	Standard (ไมโครลิตร)	Sample (ไมโครลิตร)	Total (ไมโครลิตร)
NSB	100	-	600	-	-	700
Bo	100	100	500	-	-	700
Standard	100	100	400	100	-	700
Sample	100	100	400	-	100	700
Q.C.	100	100	400	-	100	700

ตารางที่ 2.8 เปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวของ oestradiol antiserum กับฮอร์โมนอื่น

Substances	% Cross Reaction
Oestradiol	100
Cortisol	<0.02
Testosterone	<0.02
Oestriol	0.8
Oestrone	<0.02
Progesterone	0.02

ตารางที่ 2.9 เปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวของ progesterone antiserum กับฮอร์โมนอื่น

Substances	% Cross Reaction
Progesterone	100
Cortisol	0.005
Testosterone	0.10
17α-hydroxyprogesterone	1.00
20α-dihydroprogesterone	2.70

ตารางที่ 2.10 เปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยวของ cortisol antiserum กับฮอร์โมนอื่น

Substances	% Cross Reaction
Cortisol	100
Cortisone	<0.1
Corticosterone	9.2
11-deoxycortisol	27.1
Progesterone	0.2
17α-hydroxyprogesterone	0.8
11α-hydroxyprogesterone	0.07
Testosterone	0.08