วิจารณ์ผลการทดลอง

การหา solvent system ที่เหมาะสมในการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน

Solvent system ทั้ง 21 ชนิดที่ทดลองใช้แยกธัยรอยด์ฮอร์โมน 4 ตัว (MIT, DIT, T_3 และ T_4) มี 8 system ที่แยกทั้ง 4 ตัวออกจากกันได้คือ system 3,12,14, 15,17,18,19 และ 20 และมี11 system แยกได้เป็น 3 จุด คือ system 2,4,7,8,-9 และ 11 แยกได้เป็น MIT + DIT, T_3 และ T_4 และ system 6,10,13,16 และ21 แยกได้เป็น MIT, DIT และ T_3 + T_4 ส่วนอีก 2 system คือ system1 และ 5 แยกทั้ง 4 ตัวออกจากกันได้เป็น 2 จุดเท่านั้น รูปที่ 1 และ 2 แสดงผลการแยกด้วย solvent system 21 ชนิดอย่างคราว ๆ เนื่องจากใน solvent system บาง system เช่น system2 (ตามรูปที่ 2)ธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัวดูเหมือนแยกออกจากกันได้ แต่ความจริง MIT และ DIT ยังแยกออกจากกันไม่ได้ (รูปที่ 3) หรือบาง system เช่น system19 จะแยกทั้ง 4 ตัวออกจากกันได้ แต่ตามรูปที่1 และ 2 ดูเหมือนทั้ง 4 ตัวยังไม่แยกจากกัน ทั้งนี้เนื่องจากค่า R_f ที่แสดงในรูปที่ 1 และ 2 นั้นเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำหลาย ๆ ครั้ง ซึ่งเวลาวัด R_fจะวัดจากเส้นเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลางของสาร โดยวิธีนี้ในบาง solvent system เช่น system 2 ซึ่งจุดของ MIT และ DIT ยาวกว่าปกติก็อาจจะให้ค่า R_f ที่ห่างกัน แต่ความจริงสารทั้ง 2 ตัวยังไม่แยกจากกันอย่างชัดเจน

Solvent system ที่แยกธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัวออกจากกันได้ดีมาก คือsystem 3,14,15,17 และ 18 และผลการแยกโดย Solvent system ทั้ง 21 ชนิดเมื่อใช้silicagel HF_{254}จะเป็นแบบเดียวกับเมื่อใช้ silicagel GF_{254} (เช่น system 18 ในรูปที่ 4) จะต่างกันแต่ค่า R_f เท่านั้น ทั้งนี้คงเนื่องจากซิลิกาเจลทั้งสองชนิดดูดสารได้ไม่เท่ากัน ดังนั้นในการพิจารณาผลการทดลองใน solvent system อื่น ๆ จะแสดงแต่รูปที่ใช้แยกด้วย silicagel GF_{254} อย่างเดียว

Solvent system 2 และ 8 เป็น system ที่ใช้ตาม Schorn และWinkler (1965)[38] และ solvent system 4 ใช้ตาม Massaglia และ Rosa (1964)[27]

ปรากฏว่าทั้ง 3 system แยกธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัวได้เป็น 3 จุด คือ แยกธัยโรนีนออกจากกัน และแยกออกจากทัยโรซีน แต่เมื่อทดลองเปลี่ยน NH_4 OH จาก 2 N ใน system 2 มาเป็น 6 N ใน system 3 ปรากฏว่า MIT และ DIT แยกออกจากกันได้ (รูปที่ 3 และ 4) แสดงว่าการเปลี่ยนตัวทำละลายบางตัวจะทำให้ผลการแยกเปลี่ยนไป

System 7 และ 9 ดัดแปลงมาจาก Schorn และ Winkler (1965)[38] และ West et al (1965)[41] ตามลำดับโดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของ NH_4 OH แต่ทั้งสอง system แยกธัยรอยด์ฮอร์โมนออกจากกันได้เป็น 3 จุดเช่นเดียวกับ system 2,4 และ 8 จากการทดลองเปลี่ยนชนิดของแอลกอฮอล์จาก n-butanol มาเป็น 2-butanol ใน solvent system 11 และ 12 ปรากฏว่า system12 แยกทั้ง 4 ตัวออกจากกันได้ แต่ค่า R_f ยังไม่ห่างกันมากนัก (รูปที่ 5)

จากการทดลองเปลี่ยน 6 N NH_4OH ใน solvent system 9 มาเป็น 2N HOAc ใน solvent system 10 ปรากฏว่าผลการแยกเปลี่ยนไปคือ system 9 แยกได้เป็น MIT+DIT, T_3 และ T_4 แต่ system 10 แยกได้เป็น MIT, DIT และT_3+T_4 และใน solvent system10 ค่า R_f ของทุกตัวจะยาวกว่าใน system 9 แสดงว่าธัยรอยด์ฮอร์โมนจะละลายใน n-butanol ที่มีกรดน้ำส้มอยู่ด้วยน้อยกว่าที่ละลายใน n-butanol ที่มี NH_4 OH อยู่ด้วย ดังนั้น ถ้าลองเปลี่ยนปริมาณของ n-butanol และ HOAc ให้ต่างไปจาก solvent system 10 ก็อาจจะได้ผลต่างกันออกไป แต่ไม่ได้ทดลองแยกเนื่องจากสังเกตว่าตัวทำละลายคู่นี้ให้ผลการแยกไม่ดีนัก (รูปที่ 6)

Solvent system ที่ได้ทดลองทำต่อไปคือ solvent system 13 และ 14 ซึ่งใช้ตาม West et al. (1965)[41] ปรากฏว่า system13 แยกทั้ง 4 ตัวออกได้เป็น 3 จุดเช่นเดียวกับ system 10 แต่ system14 แยกออกจากกันได้ทั้ง 4 ตัว และแยก MIT ออกจาก DIT ได้ดีมาก (รูปที่ 7 ก.) แต่ T_3 และ T_4 ยังแยกออกจากกันได้ไม่ดีเท่า MIT กับ DIT จึงได้ทดลองเปลี่ยน NH_4 OH จาก 2N ใน system 14 มาเป็น6N

ใน system 15 ปรากฏว่า T_3 และ T_4 แยกออกจากกันได้ดีขึ้นกว่า system 14 (รูปที่ 7 ข.)

Solvent system อีกชุดหนึ่งที่ได้ทดลองทำคือ solvent system 17,18,19 และ 20 ซึ่งดัดแปลงมาจาก Schorn และ Winkler (1965)[38] และใช้ amyl alcohol -dioxane- NH_4 OH ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน จะเห็นว่าถ้าปริมาณของ NH_4 OH คงที่และเพิ่มแอลกอฮอล์พร้อม ๆ กับลดไดออกเซนจะทำให้พวกทัยโรซีนมี R_f เพิ่มขึ้น ตรงข้ามกับพวกทัยโรนีน แต่ถ้าปริมาณของแอลกอฮอล์และไดออกเซนคงที่ การเปลี่ยน NH_4 OH จาก 3N ใน system 18 มาเป็น 1 N ใน system 20 จะทำให้ R_f ของทุกตัวเพิ่มขึ้น solvent ชุดนี้แยกธัยรอยด์ฮอร์โมนออกจากกันได้ทุกตัว และ system 17 กับ 18 แยกได้ดีมาก

Solvent system5ชนิดที่แยกธัยรอยด์ฮอร์โมนออกจากกันได้ดีมาก คือ system3, 14, 15, 17 และ 18 สามชนิดแรกจะเสียเวลาในการแยกประมาณ 1 ชั่วโมง และสองชนิดหลังจะเสียเวลาในการแยกประมาณ 2 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง system 3,14 และ 15 มีข้อดีคือจะเสียเวลาในการแยกน้อย แต่ system 14 และ 15 จะให้จุดที่แยกดีกว่าใน system 13 (รูปที่ 7 และ 8 ก.) และ system 17 กับ 18 จะให้จุดที่ดีกว่า system 14 และ 15 (รูปที่ 7 และ 8 ข.ค.) ดังนั้น ถ้าเปรียบเทียบกันแล้ว solvent system 18 จะให้ผลการแยกดีที่สุดแต่มีข้อเสียคือต้องใช้เวลานาน ผู้เขียนจึงได้เลือกใช้ system 15 ในการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนที่สะกัดได้จากซีรัมของคนไข้ แต่การใช้ system 15 มีข้อควรระวังคืออัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้นั้น ตัวทำละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น และใช้ชั้นบนสำหรับแยก ถ้าอัตราส่วนของตัวทำละลายผิดไปเล็กน้อย ตัวทำละลายจะรวมเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งใช้แยกธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัวออกจากกันไม่ได้

จากการทดลองใช้ solvent system ทั้ง 21 ชนิดในการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัวออกจากกัน จะเห็นว่าการแยกจะให้ผลดี เมื่อใช้เพียง one-dimensional chromatography เท่านั้น การใช้ one-dimensional chromatography นี้ดีกว่าการใช้ two-dimensional chromatography เนื่องจากการหาตำแหน่งของจุดบนโครมาโตแกรมจะทำ

ได้ง่ายโดยการเทียบกับจุดของสารมาตรฐานที่ทำพร้อม ๆ กันเพราะจุดเหล่านี้จะอยู่ในแนวซึ่งขนานกัน

การทดลองใช้ silicagel $HF_{254 + 366}$ แทน silicagel HF_{254} หรือ silicagel GF_{254} ปรากฏว่า solvent system 2,3,6,7,9,12,13,14 และ 15 จะมีเส้นขาวซึ่งเรืองแสงผิดปกติเกิดขึ้นเป็นระยะทางต่าง ๆ กันจากเส้นเริ่มต้น (รูปที่ 9) เส้นขาวนี้ไม่ทราบว่าเกิดจากอะไร ไม่มีผลต่อการแยกชัยรอยด์ฮอร์โมน แต่จะมีผลต่อการดูตำแหน่งของสารบ้างถ้าสารนั้นมี R_f เท่ากับทางขาวนั้นพอดี

<u>การทำ iodination และการสะกัด labeled thyroid hormone ที่เติมลงใน pooled serum</u>

การทำ iodination ของชัยรอยด์ฮอร์โมนนี้ ไม่ได้ทำการทดลองมากนักเนื่องจากไม่ใช่ความมุ่งหมายเดิมในการศึกษา แต่ได้ทำการทดลองด้วยเนื่องจากจำเป็นจะต้องใช้ labeled thyroid hormone เติมลงใน pooled serum เพื่อจะศึกษาการสะกัดฮอร์โมนจากซีรัมด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แต่การศึกษาโดยการสะกัดจากซีรัมโดยตรงไม่สามารถทำให้ได้ผลถูกต้องแน่นอนเนื่องจากซีรัมของคนไข้โดยปกติมีฮอร์โมนอยู่น้อยมาก การซื้อ labeled compound จากต่างประเทศเป็นการสิ้นเปลืองโดยใช่เหตุ การ iodination โดยวิธีของ Brown และ Reith 1966[13] เป็นวิธีที่ให้ specific activity สูงมาก ผู้เขียนได้ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Brown และ Reith ซึ่งแพทย์หญิงมาคุ้มครองวาสนะสมสิทธิ์ แห่งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ได้ศึกษาอยู่เพื่อให้ได้ labeled thyroid hormone ตัวที่ต้องการมากที่สุด

การทดลองสะกัดชัยรอยด์ฮอร์โมนโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตามตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าการสะกัดโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ถ้าเติมกรดก่อนครั้งแรกจะสะกัดได้มากที่สุด ถ้าไม่เติมกรดก่อน ครั้งที่ 2 จะสะกัดได้มากที่สุด การใช้ n-butanol และ n-butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ จะได้ผลดีเมื่อเติมกรดก่อน ส่วนการใช้ n-butanol-conc NH_3 10:1

สะกัดโดยไม่เติมกรดก่อนจะได้ผลดีกว่า ถ้าสะกัดด้วย n-butanol โดยเติมกรดก่อน ธัยรอยด์ฮอร์โมนจะเหลือติดกับตะกอนน้อยที่สุด การสะกัดธัยรอยด์ฮอร์โมนจากซีรัมเพื่อจะนำไปทำโครมาโตกราฟฟี่จะมีข้อยุ่งยากคือ เมื่อนำสารละลายที่สะกัดได้ไประเหยให้แห้งพบว่าถึงแม้จะเซ็นตริฟิวจ์ให้สารละลายที่ได้ใสเพียงไรก็ตาม เมื่อทำให้แห้งแล้วจะยังมีตะกอนเหลืออยู่เสมอและตะกอนนี้จะไม่ละลาย เวลาใช้ n-butanol - conc NH_3 10:1 ละลายส่วนที่เหลือไปทำโครมาโตกราฟฟี่จะต้องระวังอย่าให้มีตะกอนติดไปเนื่องจากตะกอนนี้จะทำให้การวิ่งของธัยรอยด์ฮอร์โมนไม่สม่ำเสมอเพราะตัวทำละลายซึมขึ้นไปบนซิลิกาเจลไม่สะดวก

<u>การทำโครมาโตกราฟฟี่และการหาปริมาณธัยรอยด์ฮอร์โมนจากซีรัม</u>

การทำโครมาโตกราฟฟี่และการหาปริมาณธัยรอยด์ฮอร์โมนจากซีรัมนั้นทำได้ไม่ง่ายนักถ้าซีรัม**ไม่มีกัมมันตรังสี** เนื่องจากปริมาณของธัยรอยด์ฮอร์โมนในซีรัมนั้นมีน้อยมากประมาณ 15 ไมโครกรัมต่อซีรัม 100 มิลลิลิตร ดังนั้น ถ้ามีวิธีใดซึ่งจะหาปริมาณธัยรอยด์ฮอร์โมนแต่ละ fraction ได้โดยไม่ลำบากมากนัก ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่การศึกษาโรคทางต่อมธัยรอยด์

การหาปริมาณของธัยรอยด์ฮอร์โมนนั้น ขั้นแรกจะต้องทราบตำแหน่งของธัยรอยด์ฮอร์โมนบนโครมาโตแกรมก่อน การดูตำแหน่งของธัยรอยด์ฮอร์โมนบนโครมาโตแกรมนั้น วิธีที่นิยมใช้กันมาก คือ ทำให้เกิดสีด้วย cericsulphate -arsenious acid[11,12] หรือ ferrichloride-ferricyanide-arsenic acid[18] วิธีฉีดสารเพื่อให้เกิดสีนี้มีข้อเสียคือสีที่เกิดขึ้นจะอยู่ได้ไม่นาน ผู้เขียนได้ทดลองใช้ซิลิกาเจลชนิดเรืองแสงซึ่งมีข้อดีคือไม่ต้องยุ่งยากเกี่ยวกับสารที่นำมาฉีดให้เกิดสีและสามารถจะใช้แสงอัลตราไวโอเลทส่องดูตำแหน่งของสารซึ่งปรากฏเป็นจุดสีเข้มบนพื้นที่เรืองแสงและจุดสีเข้มนี้จะปรากฏให้เห็นชัดถึงแม้จะเก็บไว้เป็นเวลานาน และจากการทดลองพบว่าวิธีนี้จะมีความไวน้อยกว่าการฉีดสารให้เกิดสี แต่การใช้ซิลิกาเจลชนิดเรืองแสงมีข้อควรระวังคือ สารที่สะกัดจากซีรัมที่ไม่ใช่ธัยรอยด์ฮอร์โมนอาจจะทำให้เกิดจุดดำบนซิลิกาเจลได้ถ้าสารนั้นดูดแสงอัลตราไวโอเลทเช่นเดียวกับธัยรอยด์ฮอร์โมน การเติมธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานลงในซีรัมที่สะกัดออกมาได้แล้วทำโครมาโตกราฟฟี่จะช่วยให้ทราบแน่นอนว่าจุดดำบนโครมาโตแกรมนั้นเป็นธัยรอยด์ฮอร์โมนหรือไม่

จากรูปที่ 15 จะเห็นว่าจุดที่เข้มขึ้นไม่ตรงกับสารมาตรฐานที่ทำพร้อม ๆ กันนัก แต่ก็ทราบได้ว่าจุดใดบนโครมาโตแกรม คือ ธัยรอยด์ฮอร์โมนตัวไหน จากนี้ในการทำซีรัมของคนไข้ซึ่งมีกัมมันตรังสีอยู่ด้วยซึ่งใช้วิธีทำ ARG แล้วนำฟิล์มมาทาบกับ plate ดูก็จะทราบได้ว่าจุดดำบนฟิล์ม คือ ธัยรอยด์ฮอร์โมนตัวใด แต่ในกรณีที่มี labeled thyroid hormone มาตรฐานจะทำได้ง่ายขึ้นโดยไม่จำเป็นต้องเติมธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานลงในซีรัมที่สะกัดแล้วเนื่องจากเมื่อทดลองเติม labeled thyroid hormone ลงในซีรัมแล้วสะกัดมาทำโครมาโตกราฟพี่เทียบกับของเดิมดูพบว่าจุดดำบนฟิล์มจะเหมือนกันดังรูปที่ 14 แต่การใช้ labeled thyroid hormone มีข้อเสียคือราคาแพงและสลายตัวได้ง่าย การใช้ธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานเติมลงในซีรัมจึงเหมาะสมกว่าและยังช่วยตัดปัญหาเรื่องความคลาดเคลื่อนของ R_f ซึ่งเกิดขึ้นได้ในการ run โครมาโตกราฟพี่

เมื่อทราบตำแหน่งของธัยรอยด์ฮอร์โมนบนโครมาโตแกรมแล้ว ขั้นต่อไปก็คือการหาปริมาณ ได้กล่าวแล้วว่าธัยรอยด์ฮอร์โมนในซีรัมมีน้อยมาก วิธีที่เหมาะสมในการหาปริมาณเท่าที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน คือวิธี radioimmuno assay และก็ยังสามารถทำได้เฉพาะ T_4 เท่านั้น ผู้เขียนได้ทดลองหา UV-absorption spectrum ของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานเพราะคิดว่าวิธีนี้อาจจะมีประโยชน์ในการหาปริมาณฮอร์โมนได้ แต่จากการทดลองพบว่าธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัว ให้ maximum absorption ใกล้เคียงกันมาก (รูปที่ 11) วิธีนี้จึงไม่เหมาะสำหรับหาปริมาณธัยรอยด์ฮอร์โมนที่มีอยู่รวมกัน และวิธีนี้จะมีข้อผิดพลาดได้มาก ถ้ามีสารที่ดูดแสงอัลตราไวโอเลตได้ปนอยู่ด้วย

นอกจากนี้ผู้เขียนได้ทดลองหาความสัมพันธ์ของปริมาณ ^{131}I กับความเข้มของฟิล์มและเวลาที่ expose เพราะคาดว่าความสัมพันธ์นี้จะเป็นประโยชน์ในการหาปริมาณธัยรอยด์ฮอร์โมนจากซีรัมโดยการอ่านความเข้มของ ARG ของโครมาโตแกรมของซีรัม จากการทดลองพบว่าปริมาณ ^{131}I จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของฟิล์มเมื่อใช้ ^{131}I ประมาณ 0.05 ถึง 0.2 ไมโครคูรี (รูปที่ 12) และความเข้มของฟิล์มจะเป็นสัดส่วนกับเวลาที่ expose ถ้าปริมาณ ^{131}I ไม่เกิน 0.1 ไมโครคูรี (รูปที่ 13) ถ้าปริมาณ ^{131}I มากหรือน้อยเกินไปความสัมพันธ์นี้จะไม่เป็นเส้นตรง เนื่องจากถ้าปริมาณ ^{131}I มากเกินไป ความเข้มบนฟิล์มก็จะมากที่สุด

เท่าปริมาณของ AgBr บนฟิล์มซึ่งจะเปลี่ยนเป็น Ag ถ้าปริมาณของ AgBr หมด ความเข้มบนฟิล์มก็จะไม่เพิ่มขึ้นอีก และถ้าปริมาณของ ^{131}I น้อยเกินไปก็อาจจะไม่พอเพียงที่จะทำให้เกิดจุดดำบนฟิล์มเนื่องจากฟิล์มไม่มีความไวพอ และอีกประการหนึ่งการอ่านความเข้มของจุดดำบนฟิล์มด้วย densitometer จะมีขีดจำกัด คือถ้าจุดดำเกินไปเครื่องมือจะบอกความแตกต่างไม่ได้ตรงกับความเป็นจริง และถ้าจุดดำน้อยเกินไปเครื่องมือก็จะมีความไวไม่พอ เนื่องจากเวลาอ่านความเข้มโดยปกติพื้นรอบ ๆ จุดดำควรจะเป็นสีขาว แต่ในการอ่านความเข้มบนฟิล์มนี้เนื้อฟิล์มจะไม่เป็นสีขาวจึงต้องปรับให้แสงผ่านเนื้อฟิล์มเป็น 100 % ก่อน บางครั้งอาจจะมีข้อผิดพลาดได้ถ้าเนื้อฟิล์มดำไม่สม่ำเสมอหรือการล้างฟิล์มไม่ใช้ความระมัดระวังมากพอ ถ้าจุดที่นำมาอ่านความเข้มต่างจากเนื้อฟิล์มน้อยมาก ก็จะมีข้อผิดพลาดได้ง่ายยิ่งขึ้น และนอกจากนี้การทำ ARG ด้วย ^{131}I มีข้อเสียคือพลังงานของ ^{131}I สูง ทำให้เกิด scatter radiation ได้มากเป็นเหตุให้ resolution ของฟิล์มไม่ดีพอ ทำให้จุดดำบนฟิล์มโตกว่าที่เป็นจริง จากการทดลองหาความสัมพันธ์ของปริมาณ ^{131}I กับความเข้มของฟิล์มโดยใช้ฟิล์มของ Kodak และ Fuji พบว่า resolution ของฟิล์ม Kodak จะดีกว่าฟิล์ม Fuji ผู้เขียนคาดว่าถ้ามีโอกาสหาความสัมพันธ์นี้อย่างละเอียด วิธีนี้น่าจะใช้ในการหาปริมาณของธัยรอยด์-ฮอร์โมนได้เพราะเราสามารถจะหาอัตราส่วนของธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัว และถ้าทราบปริมาณของธัยรอยด์ฮอร์โมนตัวใดตัวหนึ่งอย่างแน่นอนเช่น T_4 ซึ่งหาได้โดย radioimmuno assay ก็จะหาปริมาณของตัวที่เหลือได้โดยการคำนวณเปรียบเทียบตามอัตราส่วน

ซีรัมของคนไข้ที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษหลังจากได้รับการรักษาด้วย ^{131}I แล้ว น่าจะพบธัยรอยด์ฮอร์โมนทุกตัวเนื่องจากปริมาณของ ^{131}I ที่ใช้รักษา (7-15 มิลลิคูรี) มากพอที่จะทำให้ผนังเซลของธัยรอยด์แตกและคอลลอยด์ออกมาสู่กระแสโลหิตได้ แต่จากการทดลองทำโครมาโตกราฟฟี่ของซีรัมคนไข้ 18 ราย ซีรัมคนไข้ 9 รายพบ T_4 และสารอีกตัวหนึ่งซึ่งมี R_f 0.72 อีก 9 รายพบแต่ T_4 ใน 9 รายหลังนี้จะเห็นว่าความเข้มข้นของ T_4 ที่พบ (รูปที่ 17) น้อยกว่าใน 9 รายแรก (รูปที่ 16) มาก ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่า การที่ไม่พบสารที่มี R_f 0.72 นั้น เนื่องจากปริมาณธัยรอยด์ฮอร์โมนในซีรัมมีน้อย สารที่มี R_f 0.72 นี้

เมื่อเทียบกับ T_4 แล้วมีปริมาณน้อยกว่ามาก ถ้ามี T_4 น้อย สารตัวนี้อาจจะน้อยจนไม่ปรากฏบนโครมาโตแกรม ส่วนการที่ไม่พบธัยรอยด์ฮอร์โมนตัวอื่น ๆ เลยนั้นอาจจะเป็นเพราะวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้ยังไม่มีความไวพอที่จะเห็นธัยรอยด์ฮอร์โมนตัวอื่น ๆ ซึ่งมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับ T_4

สิ่งที่น่าสนใจคือการที่พบสารที่มี R_f 0.72 ซึ่งเป็น iodocompound ที่ถ้าเราสามารถพิสูจน์ได้ว่าสารตัวนี้คืออะไร และไม่ได้เป็น artifactที่เกิดจากการทดลอง สารตัวนี้น่าจะเป็นสารที่เกิดจากการสร้างธัยรอยด์ฮอร์โมนในต่อมธัยรอยด์ เพราะต่อมธัยรอยด์เป็นต่อมไม่มีท่อชนิดเดียวในร่างกายที่สามารถผลิต iodocompoundได้ และเป็นหลักฐานที่จะแสดงให้เห็นว่าต่อมธัยรอยด์ของคนที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษเหล่านี้มีการสร้างธัยรอยด์ฮอร์โมนผิดไปจากคนไข้ทั่ว ๆ ไปซึ่งเคยมีรายงานในวารสารการแพทย์ในต่างประเทศ