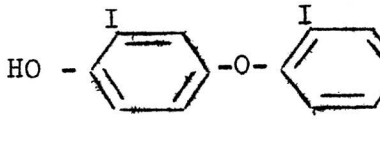
บทนำ

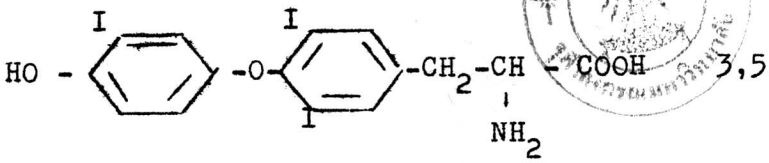
ต่อมธัยรอยด์เป็นต่อมไม่มีท่อขนาดใหญ่อยู่สองข้างของหลอดลมตอนใต้ลูกกระเดือก ต่อมทั้งสองข้างนี้จะเชื่อมกันเป็นคอคอด (isthmus) ทางด้านหน้าของหลอดลม ต่อมธัยรอยด์ประกอบด้วย follicle หรือ acini อยู่รวมกันและมีเยื่อบาง ๆ กั้นอยู่แต่ละ follicle ประกอบด้วย acinar cell เรียงเป็นชั้นเดียว ด้านในเป็นช่องว่างเรียกว่า follicular cavity Acinar cell ซึ่งทำหน้าที่เป็นต่อมนั้นผิดกับต่อมอื่น ๆ คือ เมื่อสร้างฮอร์โมนขึ้นแล้วจะไม่เก็บฮอร์โมนไว้ในเซล แต่เก็บไว้ใน follicular cavity ฮอร์โมนซึ่งเก็บไว้ใน follicle นี้มีลักษณะเหนียวและข้นเรียกว่าคอลลอยด์ (colloid) ซึ่งส่วนใหญ่เป็น peptide chain ของธัยโรโกลบูลิน (thyroglobulin)

ธัยโรโกลบูลินเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 650,000 ถึง 700,000[4] ถ้านำมาไฮโดรไลส์จะได้กรดอะมิโนซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนทั่ว ๆ ไป และอนุพันธ์ที่ถูกเติมไอโอดีนของกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ L-histidine, L-tyrosine และ L-thyronine ที่สำคัญ คือ พวกไอโอโดธัยโรนีน (iodothyronines) และพวกไอโอโดทัยโรซีน (iodotyrosines)

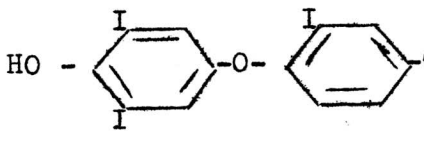
ไอโอโดธัยโรนีนเป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของธัยโรโกลบูลินและเป็น iodinated product ที่ถูกขับออกมาจากต่อมธัยรอยด์ ไอโอโดธัยโรนีนที่พบในต่อมธัยรอยด์มีอยู่ 4 ชนิด คือ 3,3'-diiodothyronine (T_2), 3,5,3'-triiodothyronine (T_3), 3,3',5'-triiodothyronine และ 3,5,3'5',-tetraiodothyronine (T_4) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าธัยรอกซีน (thyroxine)



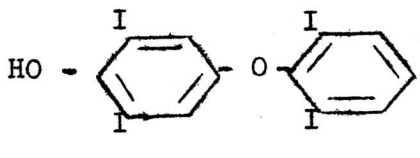
3,3'-diiodothyronine(T_2)



3,5,3' -triiodothyronine (T_3)

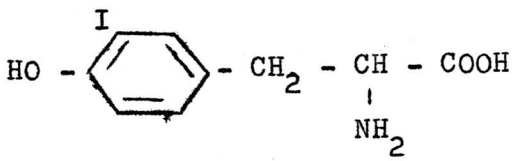


3,3',5' -triiodothyronine

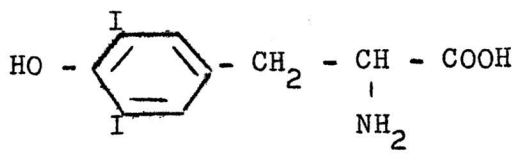


Thyroxine (T_4)

ไอโอโดทัยโรซีนเป็นส่วนประกอบของธัยโรโกลบูลินที่สำคัญรองลงมาจากไอโอโดธัยโรนีน ที่พบในต่อมธัยรอยด์มี 2 ชนิด คือ 3-monoiodotyrosine (MIT) และ 3,5-diiodotyrosine (DIT)



3-monoiodotyrosine (MIT)



3,5-diiodotyrosine (DIT)

Iodinated amino acid ที่พบในต่อมธัยรอยด์ พวกไอโอโดทัยโรซีนปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ว่ามี biological activity อย่างไร พวกที่ทราบแน่นอนว่ามี biological activity คือ ไอโอโดธัยโรนีน และ form ที่ร่างกายใช้เป็นฮอร์โมน คือ L-form ไตรไอโอโดธัยโรนีน ที่พบ 2 ตัวนั้น T_3 จะมีปฏิกริยาต่อร่างกายมากกว่า 3,3'5'-triiodothyronine หรือ T_4

ถ้าเทียบ biological activity ของ T_4 เป็น100 T_3จะมี biological activity 500-1,000 และ 3,3',5'-triiodothyronine จะมี biological activity 5 เมื่อเทียบกันตามน้ำหนัก[4]

นอกจากธัยโรโกลบูลินแล้วในต่อมธัยรอยด์ยังมีไอโอโดโปรตีนอื่น ๆ อีก จากการศึกษาสมบัติทางฟิสิคส์ของไอโอโดโปรตีนเหล่านี้พบว่ามีอย่างน้อย 2 ชนิด[33,34] ชนิดหนึ่งมีอยู่มากมีลักษณะเป็นอนุภาคเล็ก ๆ พบมากในเนื้องอกของต่อมธัยรอยด์และพบในธัยรอยด์ปกติของสัตว์หลายชนิด อีกชนิดหนึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าชนิดแรกและละลายได้ดีกว่า พบบ้างในธัยรอยด์ปกติและมีมากในเนื้องอกของต่อมธัยรอยด์ทั้งชนิดที่ไม่ร้ายแรง (benign) และชนิดที่เป็นมะเร็ง (malignant) จากการศึกษาพบว่านอกจากกรดอะมิโนซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนทั่ว ๆ ไปแล้ว ไอโอโดโปรตีนชนิดนี้มี MIT,DIT, T_3และ T_4 เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยเช่นเดียวกับธัยโรโกลบูลิน แต่จะมีไอโอโดทัยโรซีนมากกว่า ไอโอโดทัยโรซีนในธัยโรโกลบูลิน และไอโอโดธัยโรนีนน้อยกว่าไอโอโดธัยโรนีนในธัยโรโกลบูลิน

ต่อมธัยรอยด์ต่างจากต่อมไม่มีท่ออื่น ๆ อีกคือ ฮอร์โมนในคอลลอยด์และในเลือดเป็นคนละรูป ในคอลลอยด์เป็น peptide chain ของธัยโรโกลบูลิน ส่วนในเลือดฮอร์โมนจะจับกับ inter α-globulinโดย non-covalent linkage แต่ธัยโรโกลบูลินจะปรากฏในเลือดคนไข้ที่เป็นโรคบางชนิดคือ Riedel's disease, Hashimoto's disease และหลังการผ่าตัดต่อมธัยรอยด์หรือการทำลายเนื้อต่อมโดยไอโอดีนกัมมันตรังสี นอกจากนี้เขาพบไอโอโดโปรตีนในกระแสโลหิตที่เรียกว่า "compound X" ในคนไข้ที่เป็นมะเร็งของต่อมธัยรอยด์[3]

ธัยรอยด์ฮอร์โมนมีความสำคัญต่อร่างกายตั้งแต่เกิดจนตลอดชีวิต ทำหน้าที่สัมพันธ์กับการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายแทบทุกระบบ[5] คือ

1. เพิ่มการใช้ออกซิเจนของเซลที่มีชีวิตทุกชนิด
2. ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบหมุนเวียนโลหิตเนื่องจากเซลหัวใจทำงานมากกว่าปกติ ความดันโลหิตเพิ่มขึ้นและ pulse pressure กว้าง

3. Fat metabolism พบว่าใน hypothyrodism โคเลสเตอรอลในเลือดจะเพิ่มขึ้น ใน hyperthyroidism บางรายลดลง

4. Protien metabolism ถ้าธัยรอกซีนในเลือดสูง ร่างกายจะมี negative nitrogen balance

5. Carbohydrate metabolism ถ้าขาดธัยรอยฮอร์โมน อัตราการดูดซึมของกลูโคส กาแลกโตสและน้ำตาลอื่น ๆ จะลดลง นอกจากนี้ธัยรอยด์ฮอร์โมนยังมีผลต่อการใช้คาร์โบไฮเดรทของร่างกาย คือ จะเพิ่ม glycogenolysis, gluconeogenesis และเพิ่มการใช้กลูโคสของเนื้อเยื่อ[2]

6. น้ำและอีเลคโตรไลท์ พบว่าถ้าธัยรอกซีนต่ำแคลเซี่ยมในเลือดจะเพิ่มขึ้นโดยที่ฟอสฟอรัสไม่เปลี่ยน และจะมีน้ำขังอยู่ใน extracellular compartment เป็น myxedematous fluid ถ้าฮอร์โมนมากการขับถ่ายแคลเซี่ยมทางอุจจาระและปัสสาวะจะเพิ่มขึ้นโดยที่แคลเซี่ยมในซีรัมไม่เปลี่ยน

7. กระดูก ธัยรอยด์ฮอร์โมนมีความสัมพันธ์กับการสร้างกระดูก

8. ระบบประสาท ถ้าธัยรอกซีนน้อยในเด็กเกิดใหม่ การเจริญเติบโตของเซลประสาทและเนื้อสมองจะไม่สมบูรณ์ เกิดโรคปัญญาอ่อนได้

9. วิตามิน ธัยรอยด์ฮอร์โมนเกี่ยวข้องกับวิตามินหลายตัว เช่น A, B_{12}, C, D

10. Creatine-creatinine metabolism พบว่าถ้าให้อาหารที่ไม่มี creatine จะทำให้การขับถ่าย creatineทางปัสสาวะ สูงขึ้นใน hyperthyroidism และน้อยหรือไม่มีเลยใน hypothyroidism ทำให้เหมือนว่าร่างกายเก็บ creatine ไว้มากใน hypothyroidism

11. การเจริญเติบโตของร่างกาย ถ้าขาดธัยรอยด์ฮอร์โมนร่างกายจะไม่เจริญเติบโตอย่างปกติ

12. ธัยรอยด์ฮอร์โมนมีความสัมพันธ์กับการทำงานของต่อมไม่มีท่ออื่น ๆ อีกหลายต่อม แต่กลไกของปฏิกริยาไม่ทราบแน่นอน

โรคทางต่อมธัยรอยด์ที่มีการใช้ฮอร์โมนผิดไปจากปกติแบ่งได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ

1. Tumour เนื้องอกทั้งชนิดที่ไม่ร้ายแรงและชนิดที่เป็นมะเร็งจะทำให้เนื้อต่อมถูกทำลายไปมากน้อยแล้วแต่ชนิดของโรคหรือเนื้องอกบางชนิดสร้างธัยรอยด์ฮอร์โมนได้ เป็นสาเหตุให้ปริมาณฮอร์โมนที่ต่อมธัยรอยด์สร้างขึ้นมีมากน้อยผิดไปจากปกติซึ่งจะเป็นผลไปถึงการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกายดังกล่าวมาแล้วได้

2. Metabolic disorder เกิดจากต่อมธัยรอยด์สร้างฮอร์โมนออกมาให้ร่างกายใช้มากหรือน้อยกว่าปกติ ถ้าร่างกายใช้ฮอร์โมนมากกว่าปกติอาจจะเป็น thyrotoxicosis หรือ acromegaly ก็ได้ ถ้าร่างกายใช้ฮอร์โมนน้อยกว่าปกติในผู้ใหญ่จะเป็น myxedaema ในเด็กจะเป็น cretinism

การศึกษาความผิดปกติของธัยรอยด์ฮอร์โมนนั้นศึกษาได้ทั้งทางปริมาณและชนิดของฮอร์โมน ความผิดปกติทางปริมาณนิยมใช้ตรวจโดยการหา protien bound iodine(PBI) หรือ butanol extractable iodine (BEI) การหา BEI จะดีกว่า PBI ในข้อที่ว่าปริมาณไอโอดีนที่หาได้จะเป็นไอโอดีนที่มาจากไอโอโดโปรตีนเท่านั้น แต่ทั้งการหา PBI และ BEI ก็ไม่เพียงพอที่จะใช้เป็นเครื่องบอกความผิดปกติของธัยรอยด์ฮอร์โมนได้ จำเป็นต้องอาศัยการวิเคราะห์อื่น ๆ ด้วย ปริมาณไอโอดีนจากการหา PBI หรือ BEI นั้นอาจจะมาจากไอโอโดไทโรซีนหรือไอโอโดธัยโรนีนก็ได้ การศึกษาธัยรอยด์ฮอร์โมนจึงควรจะศึกษาพร้อม ๆ กันไปทั้งในด้านปริมาณและชนิดของไอโอโดโปรตีน

วิธีศึกษาธัยรอยด์ฮอร์โมนนั้น ที่ใช้กันมากคือโครมาโตกราฟฟี่ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดที่จะแยกและพิสูจน์ชนิดของสารประกอบที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน การศึกษาธัยรอยด์ฮอร์โมนด้วยโครมาโตกราฟฟี่เริ่มมาตั้งแต่คริสตศตวรรษที่ 20[16,17,25,39] ในตอนแรก ๆ ใช้คอลัมน์ หรือกระดาษ ต่อมาเมื่อเทคนิคทาง thin-layer เจริญขึ้น จึงมีการนำ thin - layer chromatography (TLC)มาใช้ด้วย คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี่ใช้วิธี adsorption หรือ ion-exchangeวิธี adsorption อาจใช้ adsorbent ได้หลายชนิด เช่น cellulose

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

powder[24,26,35] kieselguhr[14] หรือ starch[15] และวิธี ion-exchange อาจใช้ resin เช่น dowex[6,10,32] หรือ sephadex[29] ส่วนเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี่นั้นใช้ได้ทั้ง one-dimensional และ two-dimensional การศึกษาโดยวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี่หรือ TLC นั้น จำเป็นต้องทำให้ธัยรอยด์ฮอร์โมนเข้มข้นเข้า วิธีการที่ดีคือสะกัดฮอร์โมนโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ที่ใช้กันมากคือ n-butanol[8,9,19,35] หรือใช้ n-butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ[20] Gross และ Pitt-River[21] พบว่าถ้าเติมกรดเกลือลงในซีรัมก่อนสะกัดจะทำให้ได้ผลดีขึ้น นอกจาก n-butanol แล้วอาจใช้ตัวทำละลายอื่น ๆ ก็ได้เช่น acetone[7,30,31,40]

การหาตำแหน่งหรือปริมาณของธัยรอยด์ฮอร์โมนบนโครมาโตแกรมนั้น ถ้าเป็นสารที่มีกัมมันตรังสีก็ใช้วิธี autoradiography (ARG) ถ้าเป็นสารที่ไม่มีกัมมันตรังสีก็ใช้วิธีทำให้เกิดสี วิธีที่ใช้กันมากคือฉีดด้วย cericsulphate-arsenious acid[11,12]

การศึกษาด้วยเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี่และ TLC นั้น วิธี TLC มีข้อได้เปรียบคือทำได้ง่ายและมักจะเสียเวลาน้อยกว่าวิธีแรก การใช้ TLC ศึกษาธัยรอยด์ฮอร์โมนเริ่มมาตั้งแต่ปี 1963[22,37] ต่อมาวิธีนี้จึงเป็นที่แพร่หลายมากขึ้น[23,28,36,38,40]

การศึกษาธัยรอยด์ฮอร์โมนเป็นสิ่งที่น่าสนใจและเนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีการวิจัยมากเพียงพอเมื่อเทียบกับจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคชนิดต่าง ๆ ของต่อมธัยรอยด์ในประเทศไทย ผู้เขียนได้พยายามศึกษาหาวิธีแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนเพื่อจะศึกษาฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมธัยรอยด์ของคนที่เป็นโรค Congenital Cretinism ที่พบในประเทศไทยว่าผิดปกติหรือไม่ และเพื่อจะวิจัยถึงการสร้างฮอร์โมนในคนไข้โรคคอพอกเป็นพิษ—ในประเทศไทยว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงต่างจากที่เคยมีรายงานในต่างประเทศหรือไม่โดยศึกษาฮอร์โมนของต่อมธัยรอยด์ในซีรัมของผู้ป่วยหลังจากที่ได้รับการรักษาด้วย ^{131}I แล้ว ส่วนการศึกษาฮอร์โมนของคนที่เป็นโรค Congenital Cretinism จำเป็นต้องระงับไปเนื่องจากการศึกษาด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟี่โดยวิธีทำให้เกิดสีต้องใช้ซีรัมจำนวนมากเกินกว่าที่สมควรจะเจาะจากเด็กเหล่านี้ และวิธีการใช้สารกัมมันตรังสีก็จำเป็นต้องให้สารปริมาณมากเนื่องจากต่อมธัยรอยด์ของเด็กพวกนี้จับ ^{131}I ได้น้อยมาก

การให้สารกัมมันตรังสีแก่เด็กพวกนี้ในปริมาณมาก ๆ ก็เป็นสิ่งที่ไม่ควรกระทำ อย่างไรก็ตาม ผู้เขียนหวังว่าการศึกษาชัยรอยด์ฮอร์โมนของคนไข้พวกนี้จะทำได้ในโอกาสต่อไปถ้ามีเทคนิคที่ดีกว่าในปัจจุบันและเป็นสิ่งที่ควรกระทำอย่างยิ่งเนื่องจากความรู้จากการศึกษานี้จะมีประโยชน์ในการช่วยเหลือผู้ป่วยที่เป็นโรคเหล่านี้มาก

วัสดุที่ใช้

1) ซีรัม

ซีรัมที่ใช้ได้จากคนไข้ของแผนกรังสีโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ซึ่งเป็นโรค คอพอกเป็นพิษ และได้รับการรักษาแล้วด้วย ^{131}I ประมาณ 3-7 วัน

2) สารเคมี

L - Thyroxine sodium pentahydrate และ L-3,5,3'-triiodothyronine (Mann Research Laboratories Inc. Subsidiary of B.D.Laboratories, Inc. N.Y.,U.S.A.)

L (+) -3, 5 - diiodotyrosine และ 3-monoiodotyrosine (Smith-Kline and French Laboratories, Philadelphia, U.S.A.)

Ethyl alcohol 95 % (โรงงานเภสัชกรรม)

Methanol และ Silicagel (E.Merck Ag. Darmstadt, Germany)

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้เป็น technical grade จากบริษัท May and Baker Ltd., England นอกจากคลอโรฟอร์มและฟีนอลซึ่งนำมากลั่นก่อนใช้

3) ฟิล์ม

X-ray film ของ Fuji Photo Film Co. Ltd., และ Kodak No Screen Medical X-ray film,U.S.A.

4) เครื่องมือที่ใช้

Shandon Thin-layer Chromatography Equipment Basic Outfit No.2805

Unicam Spectrophotometer Model SP.800

Recording Electrophoresis Densitometer Model 43 พร้อมด้วย Automatic Integrator Model 49 Photovolt Corp. N.Y.,U.S.A.

Well type NaI (T1) Scintillation Detector size 2" x 2" และเครื่อง Scaler ของ Nuclear Chicago Model 183 B.

วิธีทำ

1) การเตรียม plate สำหรับทำโครมาโตกราฟฟี่

1.1 Plate silicagel HF_{254} และ silicagel $HF_{254+366}$ เตรียมโดยใช้ซิลิกาเจล 30 กรัมเขย่ากับน้ำ 70 มิลลิลิตรให้เข้ากันดีประมาณ 30 วินาที เทใส่ spreader ลากไปด้วยความเร็วสม่ำเสมอ ทิ้งไว้ให้จับตัวกันดีบนเครื่องมือแล้วจึงนำออกมาทิ้งไว้ในอากาศอย่างน้อย 3 ชั่วโมงก่อนนำไปอบที่ 105 °ซ. 30 นาที และเก็บไว้ใน dessicator ที่มีซิลิกาเจลสีฟ้าอยู่

1.2 Plate silicagel GF_{254} ใช้ซิลิกาเจล 30 กรัมเขย่ากับน้ำ 60 มิลลิลิตร แล้วทำแบบเดียวกับ 1.1

2) การเตรียมตัวทำละลายสำหรับโครมาโตกราฟฟี่

ตัวทำละลายทุกชนิดเตรียมทันทีก่อนใช้ แต่ถ้าตัวทำละลายนั้นไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมงและใช้ชั้นบนสำหรับทำโครมาโตกราฟฟี่

3) การหา solvent system ที่เหมาะสมในการแยกธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน

หยด MIT, DIT, T_3 และ T_4 ซึ่งละลายใน n-butanol-conc.NH_3 10:1 โดยบริมาตร ตัวละ 20 ไมโครกรัมลงไปบน plate silicagel HF_{254} และ silicagel GF_{254} หนา 0.25 มิลลิเมตร ขนาด 20 x 20 เซ็นติเมตร เป็นระยะห่างกันพอสมควร อีกจุดหนึ่งหยดธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัว ๆ ละ 20 ไมโครกรัม นำไป run ในแทงค์ซึ่ง equilibrate ด้วยตัวทำละลายก่อนอย่างน้อย 15 นาที วิธี equilibrate แทงค์ทำโดยเทตัวทำละลายลงบนกระดาษกรองซึ่งกรุไว้รอบ ๆ แทงค์ให้ชุ่ม ปิดฝาทิ้งไว้แล้วจึงทำโครมาโตกราฟฟี่ให้ solvent front ขึ้นสูงถึง 15 เซ็นติเมตร เมื่อตัวทำละลายแห้งแล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลทที่ 254 มิลลิไมครอน พื้นของ plate จะเรืองแสงสีเขียว แต่บริเวณที่มีธัยรอยด์ฮอร์โมนอยู่จะเห็นเป็นจุดดำ วัด R_f ของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานทุกตัวเปรียบเทียบกันทุก system

ในการ run ทุกครั้ง ใช้ plate silicagel $HF_{254+366}$ หนา 0.25 มิลลิเมตร ขนาด 5 x 20 เซ็นติเมตรที่ไม่ได้หยดธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐาน run พร้อม ๆ กับ plate silicagel HF_{254} และ silicagel GF_{254} ให้ได้ระยะ solvent front 15 เซ็นติเมตรเช่นเดียวกัน

Plate ที่ทำโครมาโตกราฟฟี่แล้ว ถ่ายรูปเก็บไว้โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลทส่องในที่มืดและถ่ายรูปจุดดำบนพื้นเรืองแสงสีเขียว

4) <u>การทำ iodination ของทัยโรซีน, T_3 และ T_4 เพื่อใช้ในการหาเปอร์เซ็นต์การสะกัดธัยรอยด์ฮอร์โมนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์</u>

ดัดแปลงจากวิธีของ Brown และ Reith 1966[13] ดังนี้

6.1 นำทัยโรซีน (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มา 10 ไมโครลิตร เติม ^{125}I ลงไป 200 ไมโครคูรี เขย่าให้เข้ากันดี เติม KI (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร และ chloramine T (4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 15 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันดีเป็นเวลา 1 นาที เติม sod. metabisulphite (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 40 ไมโครลิตร เขย่าอีก 30 วินาทีแล้วเติม KI (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร

6.2 ใช้ T_3 (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตรแทนทัยโรซีน และทำเช่นเดียวกับ 6.1

6.3 ใช้ T_4 (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตรแทนทัยโรซีน และทำเช่นเดียวกับ 6.1 แต่ไม่ใส่ KI (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

นำสารละลายที่เตรียมได้ทั้ง 3 หลอดมาทำโครมาโตกราฟฟี่โดยใช้ plate silicagel GF_{254} หนา 1 มิลลิเมตร ตัวทำละลายที่ใช้คือ Ethyl acetate-Methanol-6N NH_4OH 5:2:3 ในการ run โครมาโตกราฟฟี่ใช้ MIT, DIT, T_3 และ T_4 ตัวละ 20 ไมโครกรัมเป็น carrier เมื่อ solvent front ขึ้นสูงถึง 15 เซ็นติเมตร รอให้แห้งแล้วนำ plate ไปวางบนฟิล์ม X-ray ของ Fuji ในห้องมืด 2 ชั่วโมงจึงนำฟิล์มมาล้างดูตำแหน่งจุดดำบนฟิล์มว่าตรงกับธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานตัวใดบ้าง เลือกขูดซิลิกาเจลบริเวณที่ตรง

กับธัยรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ตัวมารวมกันแล้วสะกัดด้วย n-butanol-conc.NH_3 10:1 สามครั้ง ๆ ละ 10 มิลลิลิตร ระเหยสารละลายที่ได้ในสูญญากาศจนเหลือประมาณ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution ของของผสมของ labeled thyroid hormone เพื่อใช้ต่อไป

หมายเหตุ

ทัยโรซีนที่นำมาทำ iodination ละลายในน้ำ ส่วน T_3 และ T_4 ละลายใน absolute alcohol

KI, chloramine T, sod. metabisulphite ละลายใน borate buffer pH 8 และ chloramine T กับ sod. metabisulphite ต้องใช้สารละลายที่เตรียมใหม่ ๆ

5) การหาเปอร์เซ็นต์การสะกัด labeled thyroid hormone ที่เติมลงในซีรัม

นำ pooled serum มา 15 มิลลิลิตร ใส่ stock solution จาก (4) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีแล้วแบ่งใส่หลอด 12 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร เติม 5N HCl ลงไป 6 หลอด ๆ ละ 0.2 มิลลิลิตร สะกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ n-butanol n-butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ และ n-butanol-conc.NH_3 10:1 เปรียบเทียบกันระหว่างซีรัมที่เติมกรดและไม่เติมกรดก่อนสะกัด การสะกัดทำ 4 ครั้ง โดยใช้ตัวทำละลายสองเท่าตัว 2 ครั้ง และตัวทำละลายเท่าตัว 2 ครั้ง นำเซ็นตริฟิวจ์เกทที่สะกัดแต่ละครั้งและตะกอนที่เหลือไปหา activity ว่าสะกัดได้เท่าใด

6) การอ่าน UV-absorption ของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานโดยUV-spectrophotometer

ใช้ MIT, DIT, T_3 และ T_4 ซึ่งละลายใน n-butanol ให้มีความเข้มข้น 67, 33, 25 และ 22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับใส่ลงในเซลขนาด 10 มิลลิเมตร อ่าน spectrum โดย Unicam Ultraviolet Spectrophotometer Model SP 800 ใช้เวลาอ่าน 8 นาที

7) การหาความสัมพันธ์ของปริมาณ ^{131}I กับความเข้มของฟิล์ม

หยด ^{131}I ปริมาณตั้งแต่ 0.001 - 0.6 ไมโครคูรีลงบน plate silicagel GF_{254} หนา 1 มิลลิเมตร 5 แผ่นเป็นระยะห่างกันพอควร นำไป expose บน Kodak X-ray film เป็นเวลา 24,48,72,124 และ 166 ชั่วโมงตามลำดับ นำไปล้างดูความเข้มของจุดด่างบนฟิล์ม ตัดฟิล์มให้มีขนาด 1.5 นิ้ว นำไปอ่านความเข้มโดย densitometer เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มของฟิล์มกับปริมาณสาร และความเข้มของฟิล์มกับเวลาที่ expose

8) การทำโครมาโตกราฟฟี่ของ labeled thyroid hormone โดยใช้ pooled serum เป็น carrier

นำ pooled serum มา 3 มิลลิลิตร เติม stock solution ซึ่งเตรียมได้จาก (4) ซึ่งมี activity 5,500 cpm /มิลลิลิตร 0.5 มิลลิลิตร เติม 5N HCl 0.2 มิลลิลิตร ต่อซีรัม 1 มิลลิลิตร แล้วสะกัดด้วย n-butanol สองเท่าตัว 1 ครั้งและ n-butanol เท่าตัว 3 ครั้ง ระเหยเซ็นตริฟิวจ์เกทั้งหมดให้แห้งในสูญญากาศแล้วละลายใน n-butanol-conc.NH_3 10:1 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร เซ็นตริฟิวจ์นำส่วนที่ใสมาเติม KI, T_4, T_3, DIT และ MIT ลงไปตัวละ 20 ไมโครกรัม แล้วหยดลงบน plate silicagel HF_{254} หนา 1 มิลลิเมตร ให้เป็นทางยาว 2-3 เซ็นติเมตร ทำเปรียบเทียบกับ stock solution จาก (4) ซึ่งเติม KI และธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานทั้ง 4 ตัวเท่ากับ stock solution ซึ่งมี pooled serum เป็น carrier แล้ว run โดยใช้ solvent system Ethyl acetate-Methanol-6N NH_4OH 5:2:3 ให้ solvent front เป็น 15 เซ็นติเมตร เมื่อแห้งแล้ว นำ plate ไป expose บนฟิล์มของ Fuji ประมาณ 10 วัน จึงนำฟิล์มมาล้างดูจุดด่างที่เกิดขึ้นบนฟิล์ม

9) การทำโครมาโตกราฟฟี่ของธัยรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานที่เติมลงใน pooled serum

ใช้ pooled serum 5 มิลลิลิตรสะกัดโดยวิธีเดียวกับ (8) เติม MIT 80 ไมโครกรัม ทำโครมาโตกราฟฟี่พร้อม ๆ กับ pooled serum ที่เติม DIT, T_3 และ T_4 ตัวละ

40 ไมโครกรัม ใช้ plate และ ตัวทำละลายเหมือนกับ (8) run ให้ได้ solvent front 15 เซ็นติเมตร ถ่ายรูป plate เก็บไว้

10) <u>การทำโครมาโตกราฟฟี่ของซีรัมคนไข้ที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษ</u>

ใช้ซีรัมคนไข้ที่เป็นโรคคอพอกเป็นพิษซึ่งได้รับการรักษาด้วย ^{131}I แล้วประมาณ 3-7 วัน 3-10 มิลลิลิตร การสะกัดซีรัม runโครมาโตกราฟฟี่และเติม carrier ทำเช่นเดียวกับ (8) นำ plate ที่ได้ไปวางบนฟิล์ม X-ray ของบริษัท Fuji ในห้องมืดประมาณ 7 วัน จึงนำฟิล์มมาทาบกับ plate เพื่อดูว่าจุดดำบนฟิล์มตรงกับชัยรอยด์ฮอร์โมนตัวใด