บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลการประเมินความเชื่อถือได้ของเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

1.1 ความจำเพาะ

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีอิสโตรนที่ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ คำนวณที่ 50% bound

สาร	% cross reaction
E_1	100
E_1-3G	1.05
E_2-17 β	< 0.001
E_3	< 0.001
E_3-G	< 0.001
Pd-3α-G	< 0.001
β-Sitosterol	< 0.001

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีอิสโตรน-3-กลูคูโรไนด์ ที่ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ คำนวณที่ 50% bound

สาร	% cross reaction
E_1-3G	100
E_1	2.70
E_2-17β	< 0.001
E_3	< 0.001
E_3-G	< 0.001
Pd-3α-G	< 0.001

ตารางที่ 5 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีเพรกเนนไดออล-3 แอลฟ่า-กลูคูโรไนด์ ที่ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ คำนวณที่ 50% bound

สาร	% cross reaction
Pd-3α-G	100
E_1	< 0.001
E_1-3G	< 0.001
E_3	< 0.001
E_3-G	< 0.001

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับความจำเพาะของแอนติบอดีอิสตราไดออล-17 เบต้า, โปรเจสเตอโรน และเทสโทสเตอโรน ที่ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ นั้น ใช้ตาม WHO (1981) นอกจากนี้ ยังได้ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีอิสตราไดออล- 17 เบต้า ต่อ เบต้า-ซิสโตสเตอรอล พบว่ามี % cross reaction ถึง 68.42% แต่ความจำเพาะของแอนติบอดีโปรเจสเตอโรน นั้น พบว่าไม่มี cross reaction กับ เบต้า-ซิสโตสเตอรอล

1.2 ความแม่นยำและความไวของการวัด

ตารางที่ 6 แสดงความแม่นยำและความไวของการวัดฮอร์โมน E_1, E_1-3G, E_2-17β, P, Pd-3α-G และ T

ฮอร์โมน	ความแม่นยำ (% CV)		ความไวของการวัด (พิโคกรัม/หลอดทดลอง
	intra assay	inter assay	
E_1	1.06	6.82	9.9
E_1-3G	0.90	1.36	640
E_2-17β	1.03	1.17	5.98
P	1.10	8.64	8.79
Pd-3α-G	3.63	5.13	265
T	0.93	3.18	3.74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 ความถูกต้อง

ตารางที่ 7 แสดงความถูกต้องในการวัดปริมาณฮอร์โมน E_1, E_1-3G, E_2-17β, P, Pd-3α-G และ T

ฮอร์โมน	ปริมาณฮอร์โมนจริง	% ความถูกต้อง ($\bar{X}$±SD) n = 12
E_1	100 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร	92.66 ± 2.05
E_1-3G	800 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร	96.18 ± 1.39
E_2-17β	27.2 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร	96.58 ± 1.93
P	31.4 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร	95.66 ± 1.03
Pd-3α-G	500 พิโคกรัม/50 ไมโครลิตร	95.14 ± 1.31
T	31.68 พิโคกรัม/50 ไมโครลิตร	96.72 ± 1.04

2. ชนิดและปริมาณของสารในน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีคล้ายฮอร์โมนเพศชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาถึงชนิดและปริมาณของสารในน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีคล้ายฮอร์โมนเพศชนิดต่าง ๆ จากการตรวจสอบโดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ พบว่ามีปริมาณสารในน้ำมะพร้าวอ่อนที่สามารถจับกับแอนติบอดี E_1 = 0.75±0.24, E_1-3G = 280.64±15.16, E_2-17β = 2.45±0.27, P = 27.17±0.85, Pd-3α-G = 263.27±30.30 และ T = 1.58±0.28 พิโคกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 3)

3. การแยกสารในน้ำมะพร้าวอ่อน โดยวิธีธินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

จากการทดลองแยกชนิดของสารในน้ำมะพร้าวอ่อน โดยวิธีธินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4 (A,B,C,D,E,F และ G) และตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ตัวทำละลาย (solvent systems) เป็น petroleum ether : diethyl ether (95:5) (รูปที่ 4,A) พบว่าสารในน้ำมะพร้าวที่สกัดมาได้ไม่แยกจากกัน เมื่อใช้ benzene : ethanol (9:1) สารแยกออกจากกันดีขึ้น (รูปที่ 4,B) แต่ไม่สามารถแยก E_1 ออกจาก β-sitosterol ให้เห็นได้เด่นชัด เช่นเดียวกับเมื่อใช้ chloroform : methanol (95:5) (รูปที่ 4,C)

จากรูปที่ 4,D,E,F และ G และตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่า solvent systems ที่เหมาะสมที่ใช้ในการแยก E_1, E_2-17β, β-sitosterol และ P ได้ดีคือ chloroform, chloroform : acetone (95:5), chloroform : dioxane (95:5) และ chloroform : diethyl ether (95:5) แต่ไม่สามารถตรวจพบ P ได้ในสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อน

4. ผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อมดลูกของหนูแรทที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่

4.1 ผลของน้ำมะพร้าวอ่อน และฮอร์โมนมาตรฐาน E_2-17β ที่มีต่อน้ำหนักมดลูกของหนูแรท

จากการศึกษาถึงผลของน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อน้ำหนักมดลูกของหนูแรทที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ พบว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำมันมะกอก 3 มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน มีน้ำหนักมดลูกโดยเฉลี่ยเท่ากับ 19.29±2.56 มก. ส่วนกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อนคิดเทียบปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้ง 2,000 4,000 และ 7,500 มล./กก. น้ำหนักตัว/วัน ชั่งน้ำหนักมดลูกได้เท่ากับ 21.4±1.15, 22.27±0.60 และ 26.48±1.99 มก. ตามลำดับ (รูปที่ 5) จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อนที่คิดเทียบปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้ง 7,500 มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน เท่านั้น ที่มีผลทำให้น้ำหนักมดลูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ และเมื่อคิดเทียบกับ E_2-17β แล้ว มีค่าเท่ากับ 3.87 พิโคกรัม/มล.น้ำมะพร้าว (รูปที่ 6)

กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนมาตรฐาน E_2-17β 8, 43, 71 และ 143 นาโนกรัม/กก.น้ำหนักตัว/วัน มีผลไปเพิ่มน้ำหนักมดลูกเป็น 22.63±2.78, 29.63±2.60, 32.28±3.79 และ 35.59±4.22 มก. ตามลำดับ (รูปที่ 6)

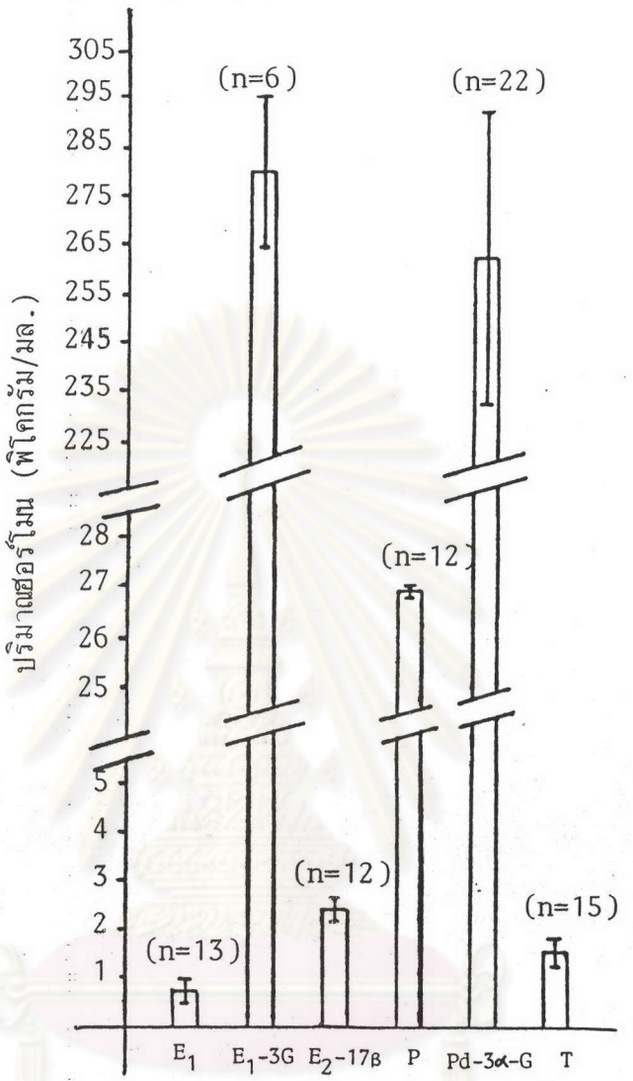
4.2 ผลของน้ำมะพร้าวอ่อน และฮอร์โมนมาตรฐาน E_2-17β ที่มีต่อเนื้อเยื่อมดลูกของหนูแรท

จากรูปที่ 7 รูป A, B แสดง histology ของมดลูกกลุ่มควบคุม รูปที่ 8 รูป A, B, C, D และรูป E, F แสดง histology ของมดลูกกลุ่มทดลอง พบว่าชั้น endometrium ของมดลูกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อน เมื่อคิดเทียบเป็นปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้งเท่ากับ 7,500 มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน เท่านั้น ที่มีทั้งการเพิ่มขนาดและจำนวนเซลล์ของเนื้อเยื่อ stromal และ luminal epithelium เมื่อ

เทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน

จากรูปที่ 9 แสดงการเจริญของชั้น endometrium ของมดลูก รูป A, B แสดง histology ของมดลูกกลุ่มที่ได้รับ E_2-17β 43 นาโนกรัม/กก.น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน พบว่ามีทั้งการเพิ่มขนาดและจำนวนเซลล์ของเนื้อเยื่อ stromal และ luminal epithelium เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

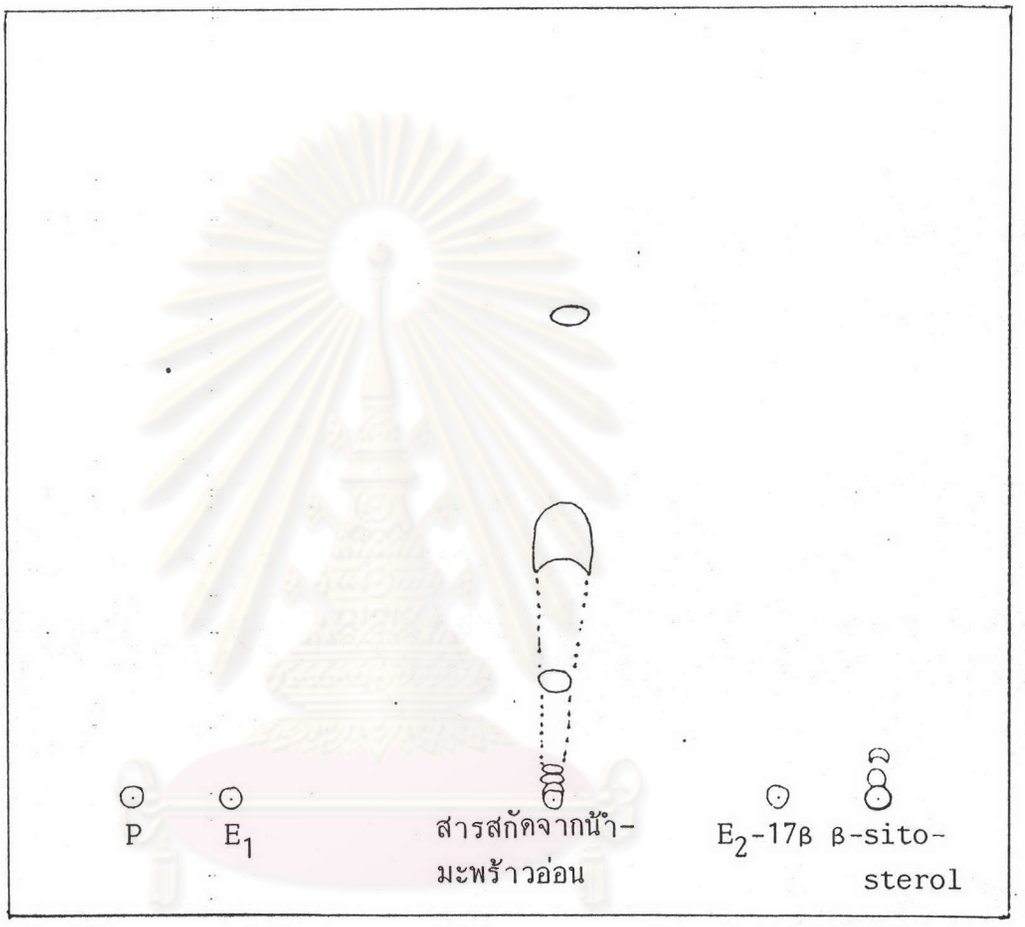


ชนิดของสารในน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีคล้ายฮอร์โมนเพศ

รูปที่ 3 แสดงชนิดและปริมาณของสารในน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีคุณสมบัติทางอิมมูโนโลยีคล้ายฮอร์โมนเพศชนิดต่าง ๆ (พิโคกรัม/มล. $\bar{X}$±SD) โดยวิธีเรดิโออิมมูโน-เอสเสย์

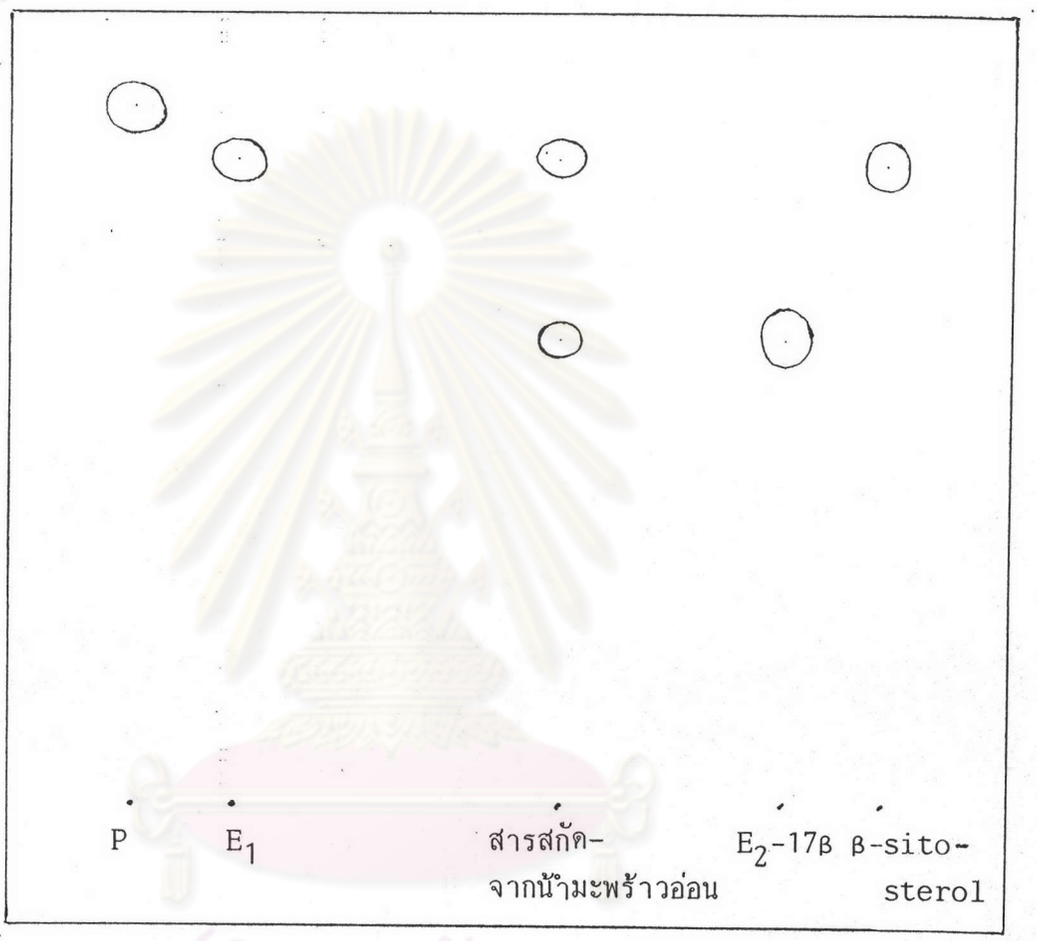
n = จำนวน pool ของน้ำมะพร้าวที่นำมาวิเคราะห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



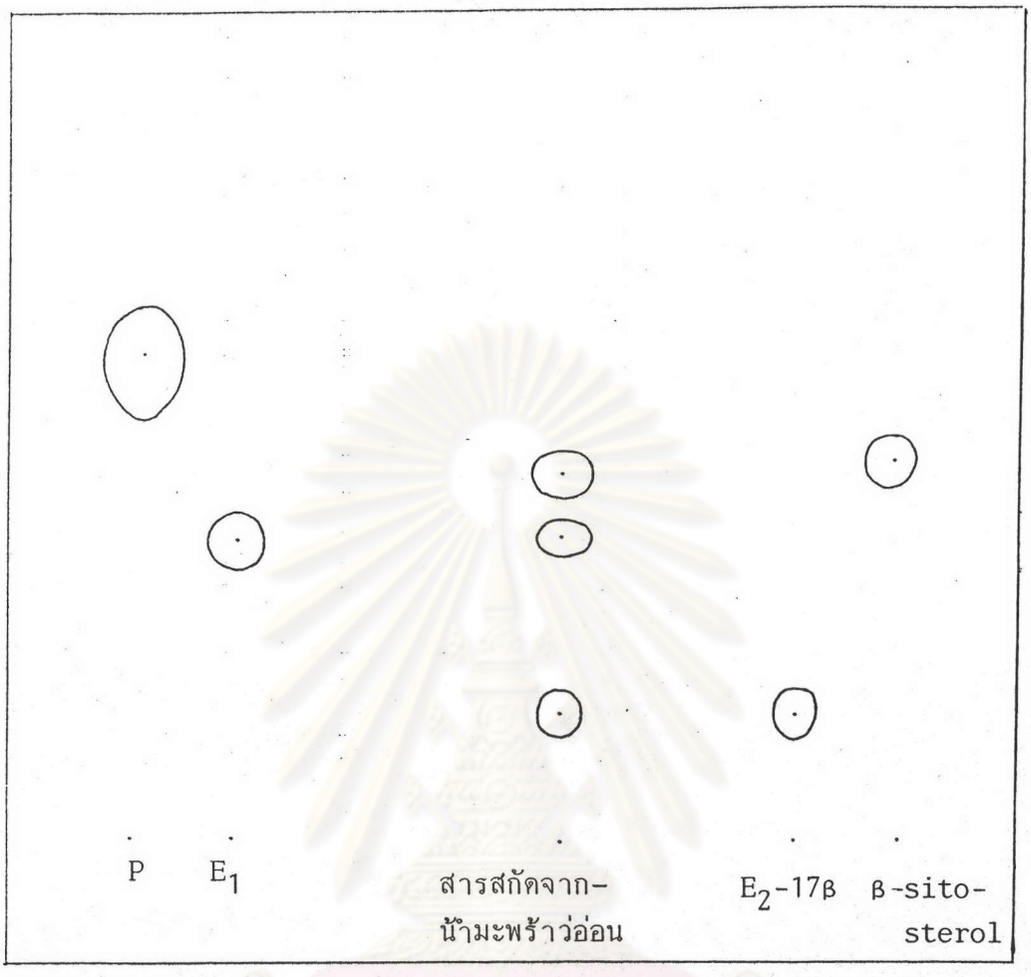
A. petroleum ether : diethyl ether (95:5)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



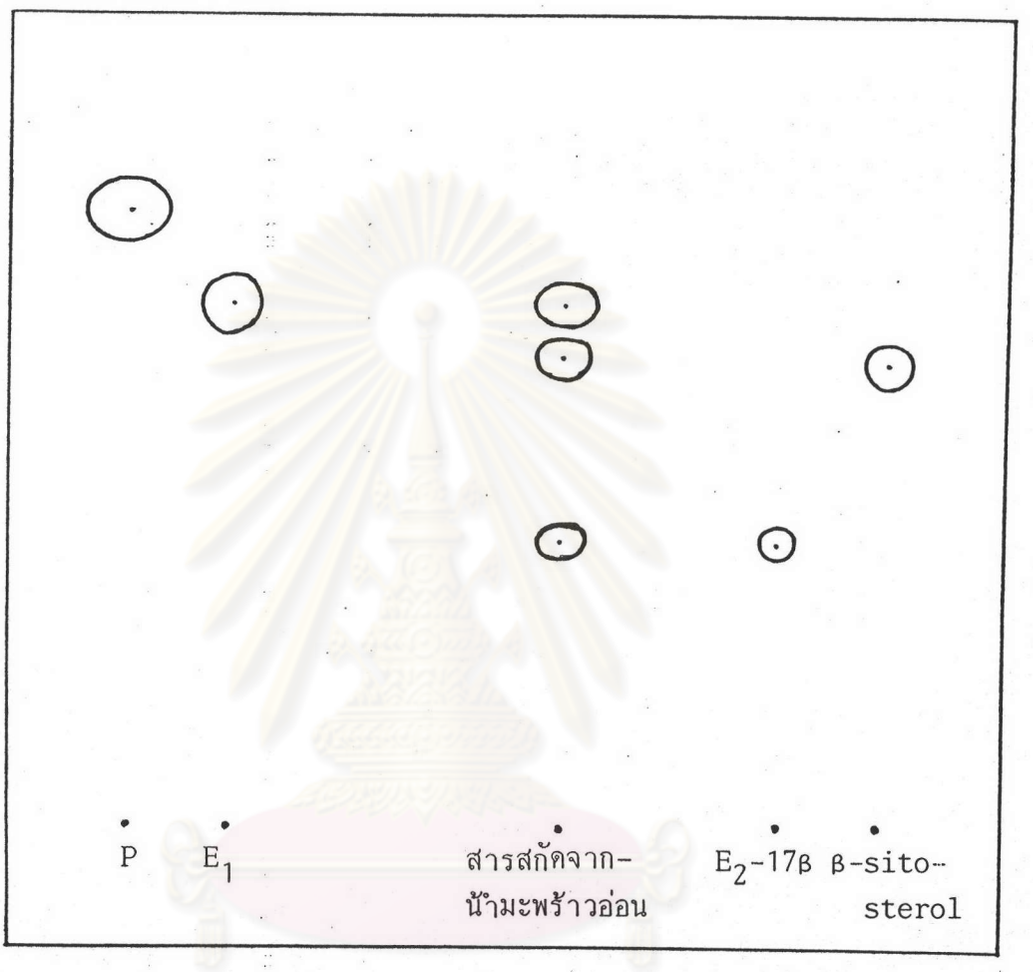
C. chloroform : methanol (95:5)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



D. chloroform

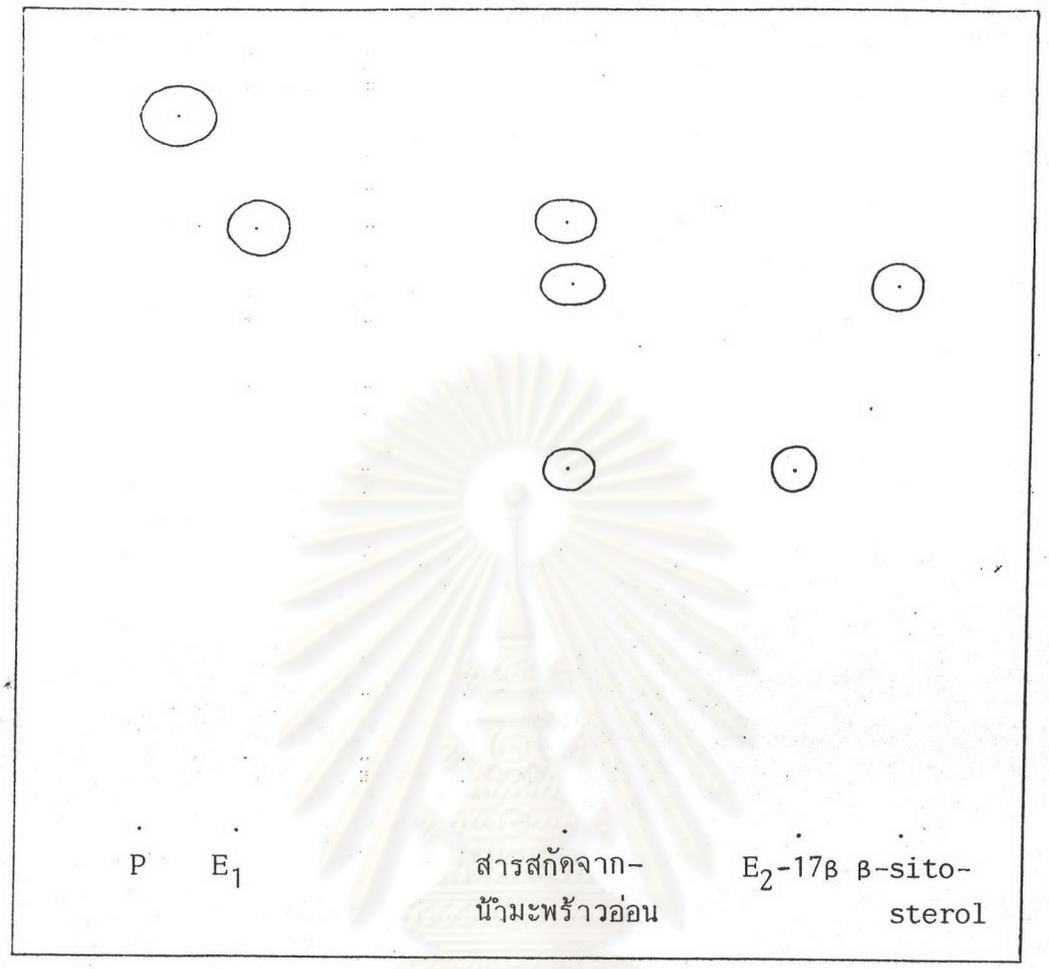
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



E. chloroform : acetone (95:5)

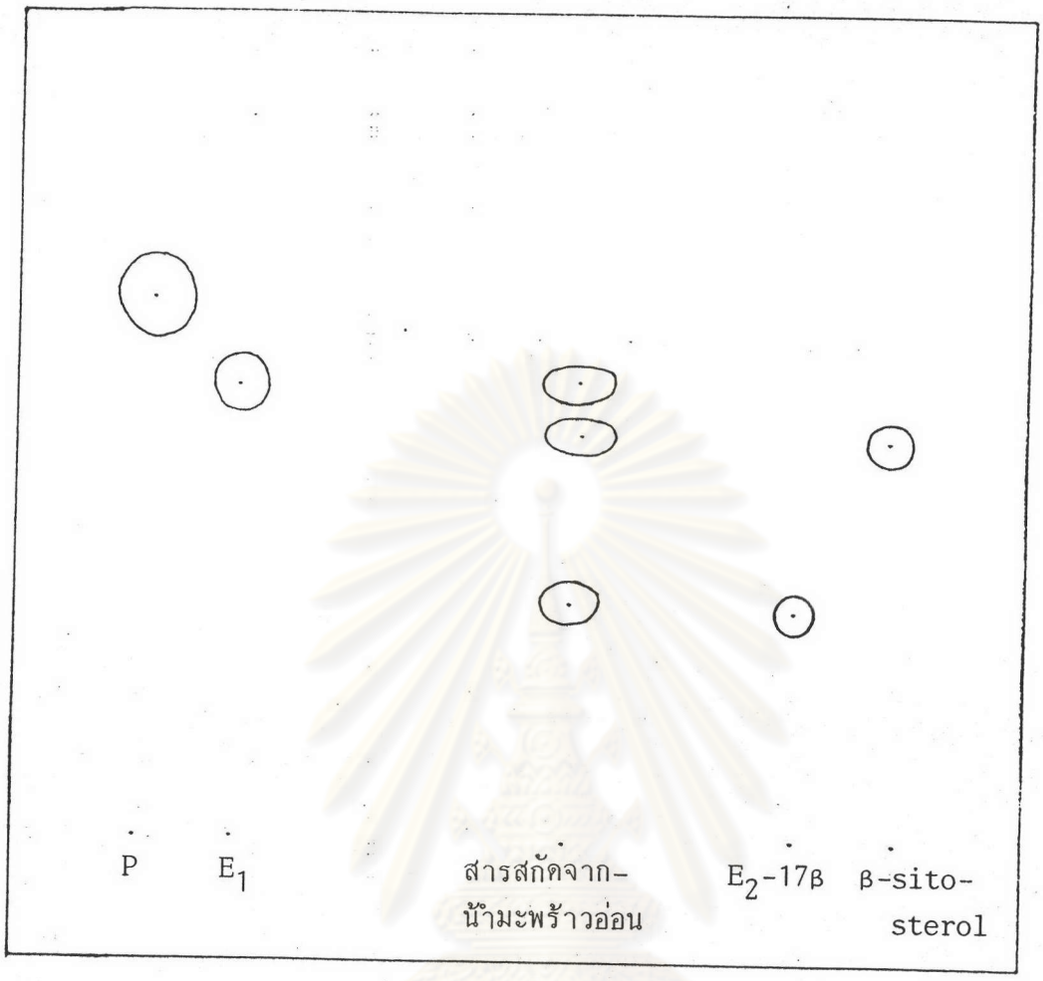
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I10296852



F. chloroform : dioxane (95:5)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



G. chloroform : diethyl ether (95:5)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงผลการแยกชนิดของสารในน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเพศ โดยวิธีธินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

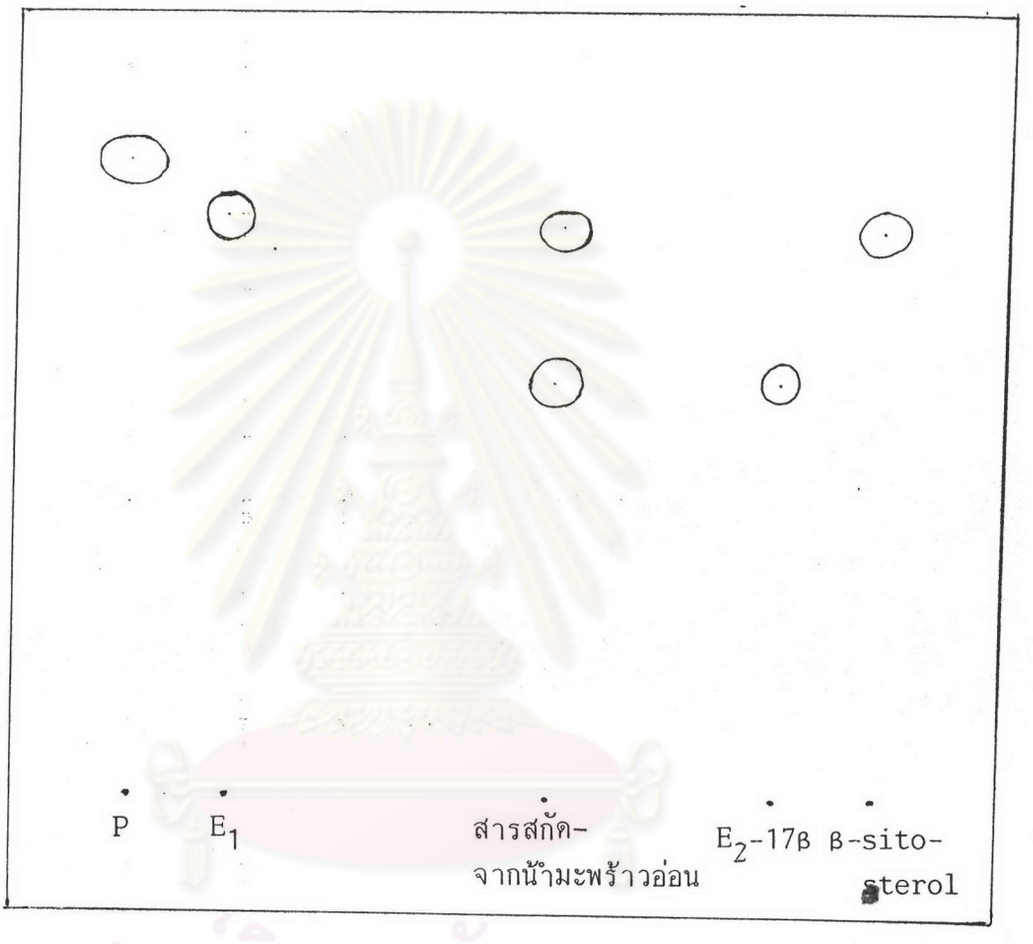
Solvent Systems	สารที่แยก	Rf value	
		ฮอร์โมนมาตรฐาน	ชนิดของสารในน้ำมะพร้าว-อ่อนที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเพศ
1. petroleum ether: diethyl ether (95:5)	E_1	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้
	E_2-17β	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้
	β-sitosterol	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้
	P	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้
2. benzene : ethanol (9:1)	E_1	0.73	0.73
	E_2-17β	0.53	0.53
	β-sitosterol	0.73	0.73
	P	0.81	ไม่พบ
3. chloroform : methanol (95:5)	E_1	0.81	0.81
	E_2-17β	0.59	0.59
	β-sitosterol	0.81	0.81
	P	0.88	ไม่พบ
4. chloroform	E_1	0.36	0.36
	E_2-17β	0.15	0.15
	β-sitosterol	0.55	0.55
	P	0.59	ไม่พบ
5. chloroform : acetone (95:5)	E_1	0.61	0.61
	E_2-17β	0.33	0.33
	β-sitosterol	0.55	0.55
	P	0.73	ไม่พบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 (ต่อ)

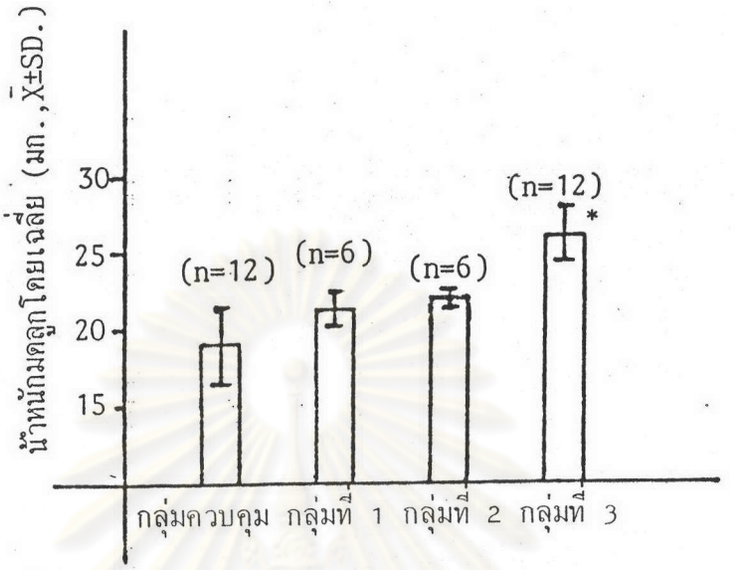
Solvent Systems	สารที่แยก	Rf value	
		ฮอร์โมนมาตรฐาน	ชนิดของสารในน้ำมะพร้าว-อ่อนที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเพศ
6. chloroform : dioxane (95:5)	E_1	0.73	0.73
	E_2-17β	0.44	0.44
	β-sitosterol	0.66	0.66
	P	0.86	ไม่พบ
7. chloroform : diethyl ether (95:5)	E_1	0.38	0.38
	E_1-17β	0.28	0.28
	β-sitosterol	0.49	0.49
	P	0.65	ไม่พบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



B. benzene : ethanol (9:1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดงผลของสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อนที่มีต่อน้ำหนักมดลูกของหนูแรท (มก., $\bar{X}$±SD.) ซึ่งมีอายุ 23 วัน เมื่อฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เป็นเวลา 3 วัน

* แสดงถึง ความแตกต่างของกลุ่มทดลอง กับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

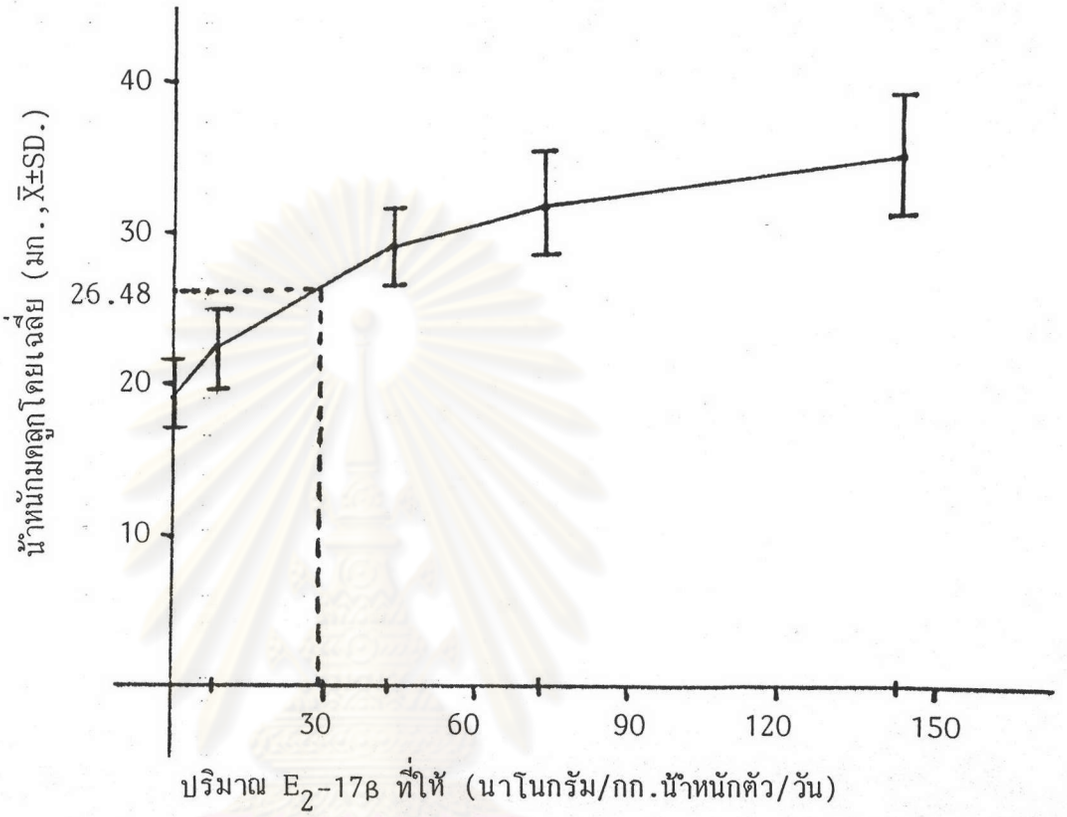
กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำมันมะกอก 3 มล./กก. น้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มที่ 1 ได้รับสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้ง 2,000 มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มที่ 2 ได้รับสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้ง 4,000 มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มที่ 3 ได้รับสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้ง 7,500 มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 กราฟแสดงผลของสารละลายมาตรฐาน E_2-17β ที่มีต่อน้ำหนักมดลูกของหนูแรท เมื่อฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน ในขนาด 8, 43, 71 และ 143 นาโนกรัม/กก.น้ำหนักตัว/วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 แสดงภาพภาคตัดขวางของมดลูกหนูแรทที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ กลุ่มควบคุม (A,B) ได้รับน้ำมันมะกอก 3 มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน ใต้ผิวหนัง 3 วันติดต่อกัน

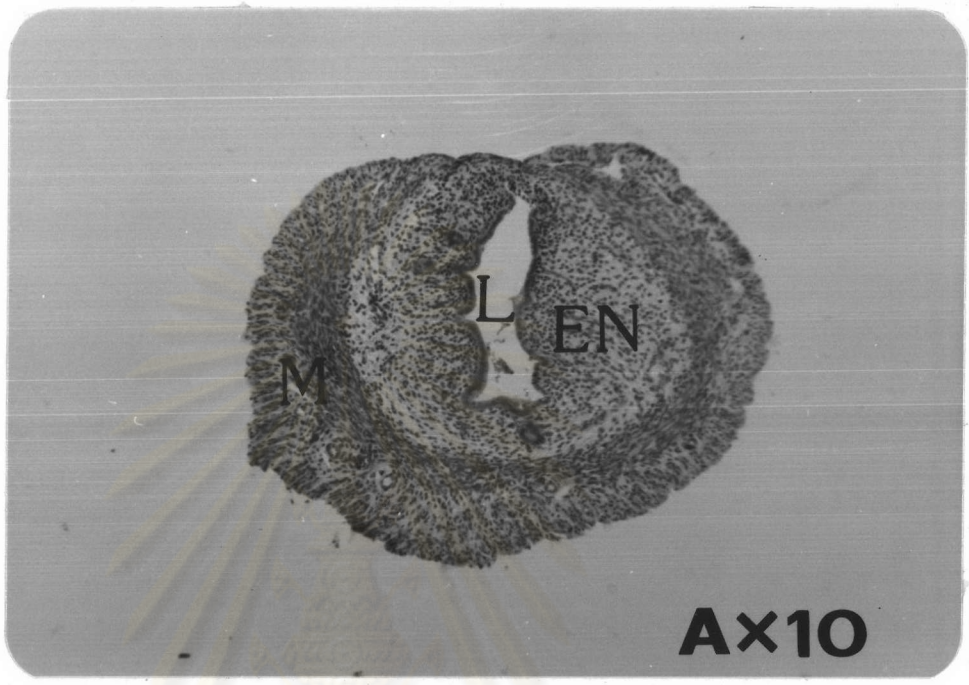
L = uterine lumen, E = luminal epithelium

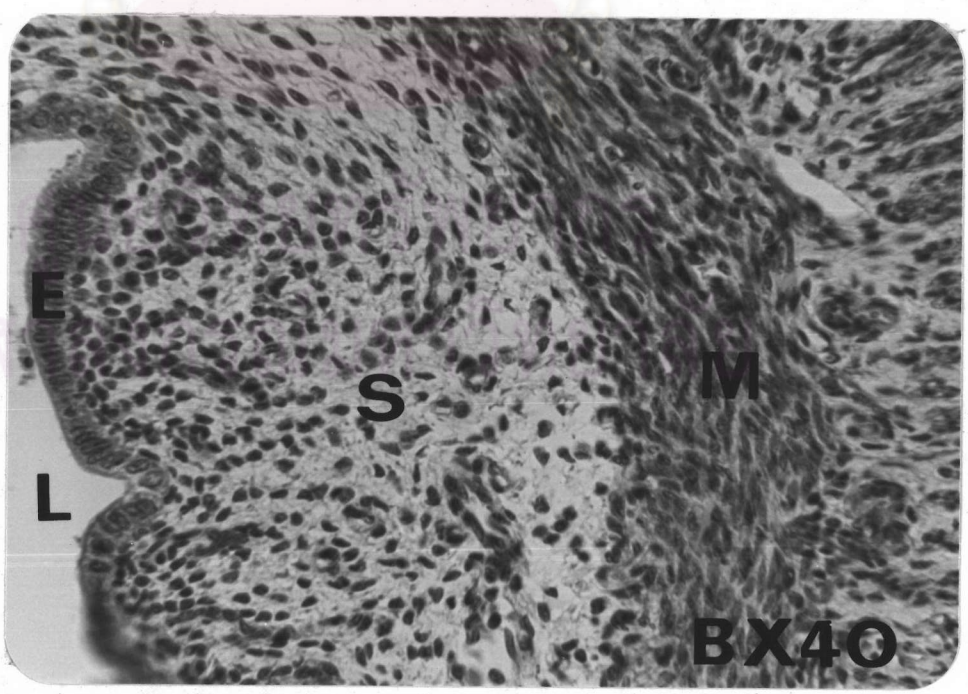
S = stromal cell, EN = endometrium

M = myometrium

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





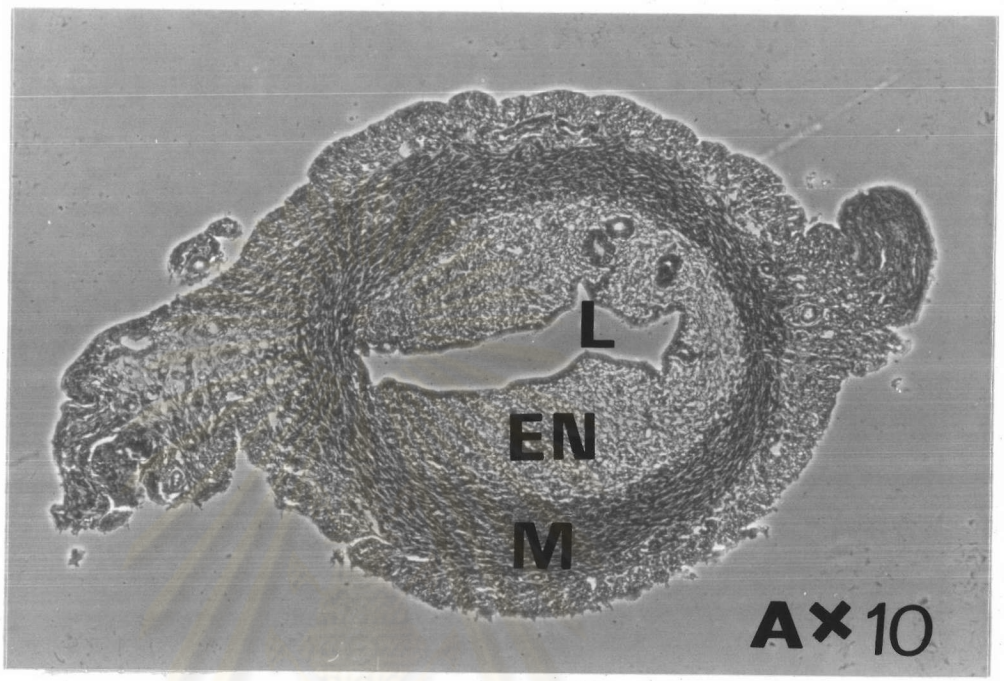
รูปที่ 8 แสดงภาพภาคตัดขวางของมดลูกหนูแรทที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ เมื่อให้สารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อน คิดเทียบปริมาตรน้ำมะพร้าวอ่อนที่ยังไม่ได้ระเหยแห้ง เท่ากับ 2,000 (A,B), 4,000 (C,D) และ 7,500 (E,F) มล./กก.น้ำหนักตัว/วัน เข้าใต้ผิวหนัง 3 วันติดต่อกัน

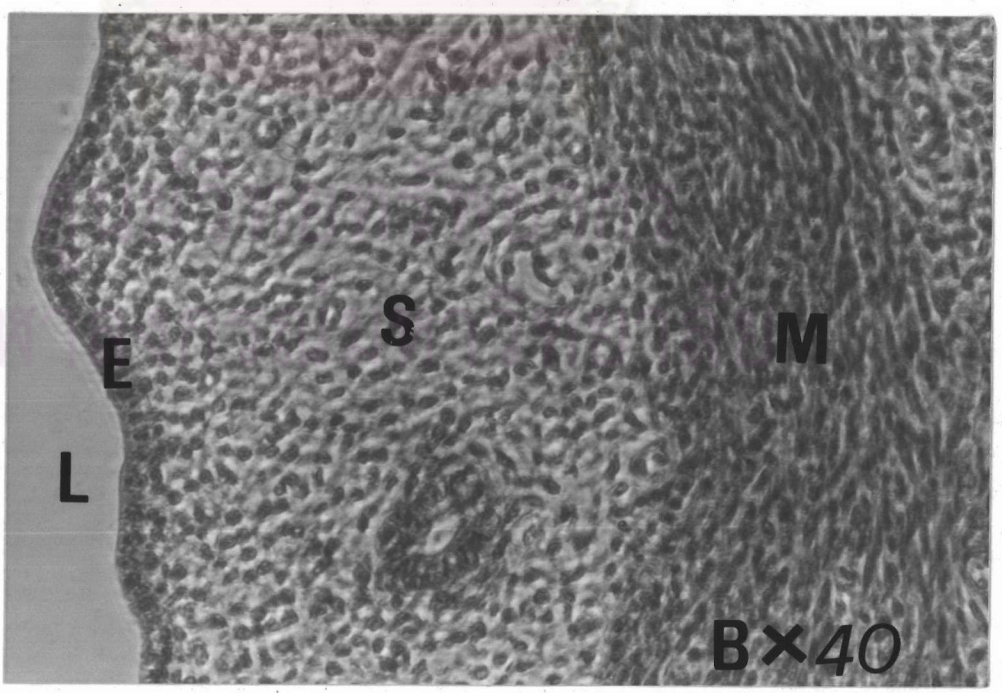
L = uterine lumen , E = liminal epithelium

S = stromal cell , EN = endometrium

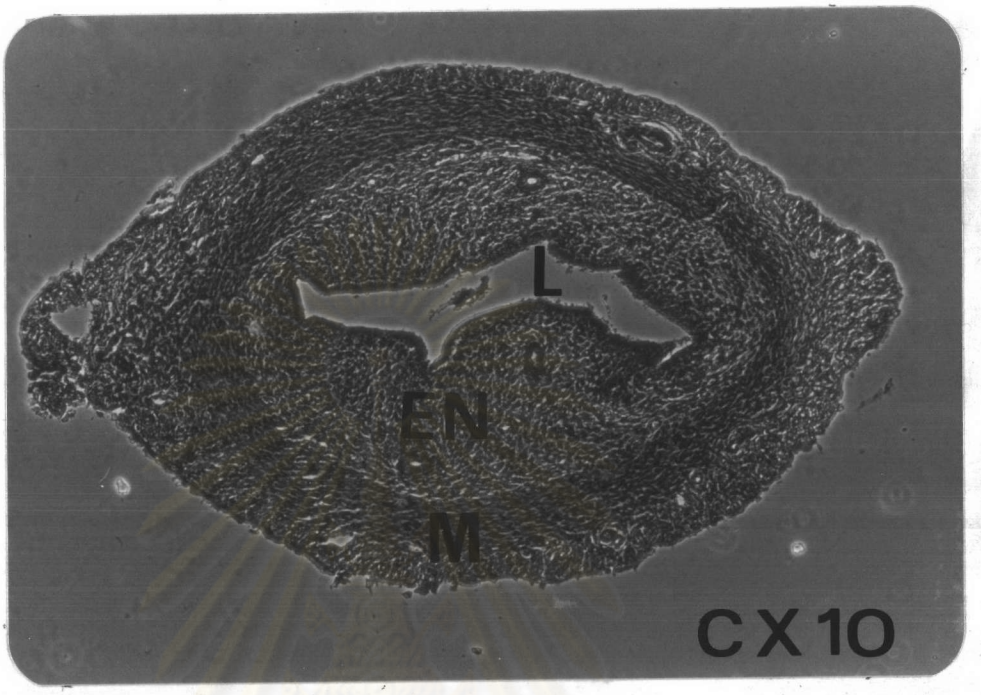
M = myometrium

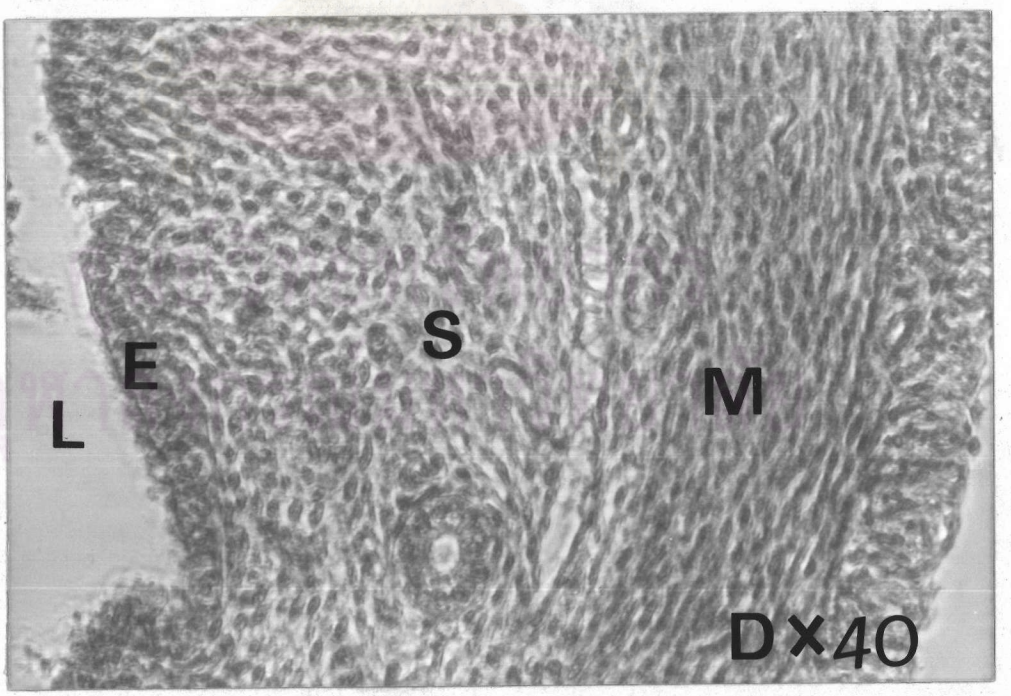
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

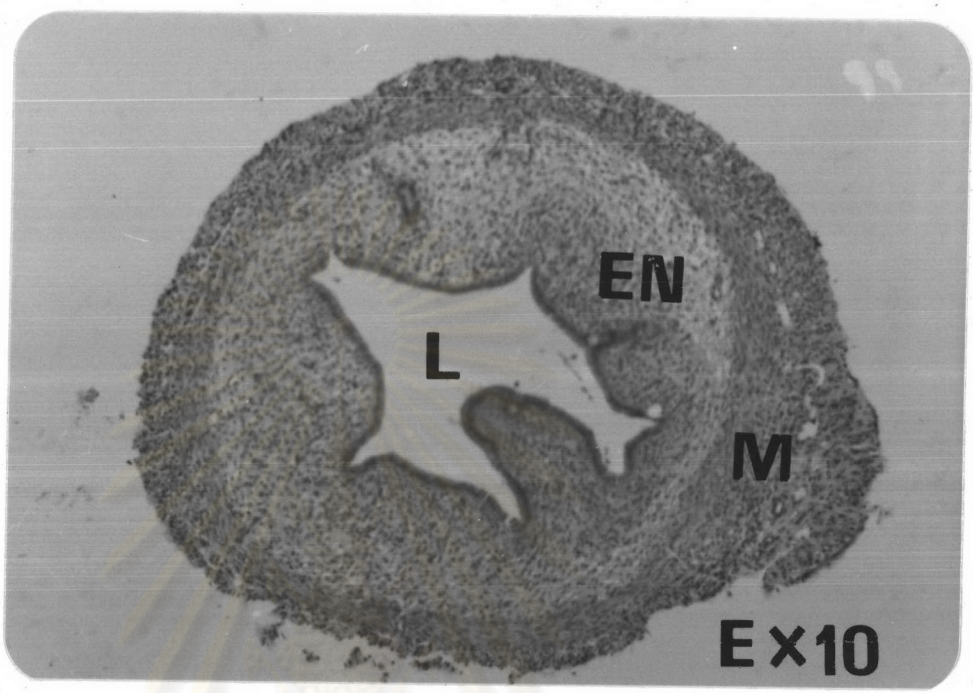


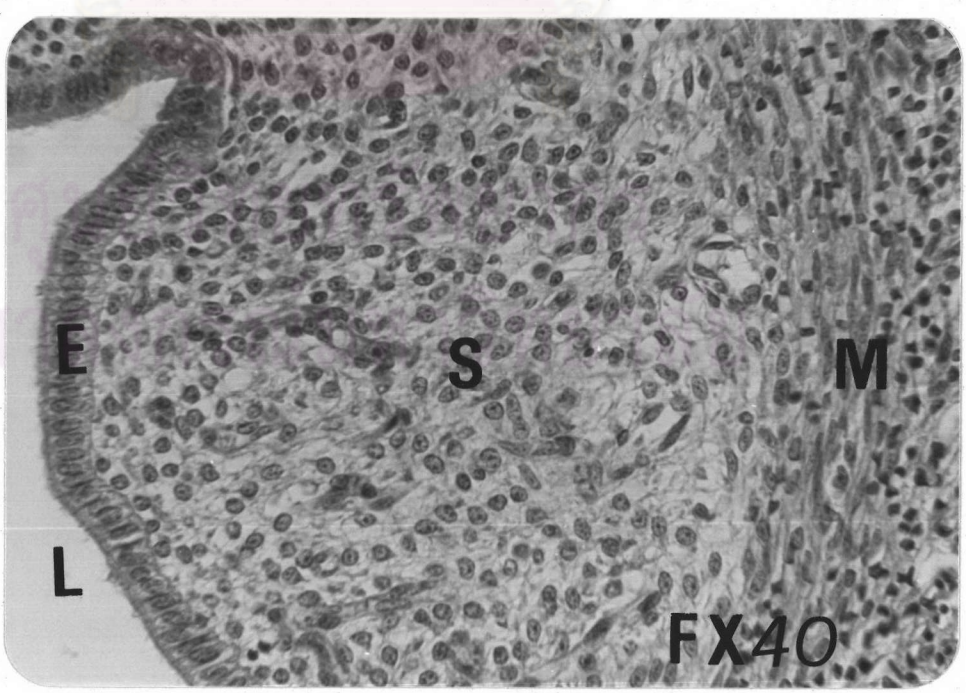


หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย






EN
L
M
E×10


E
S
M
L
FX40

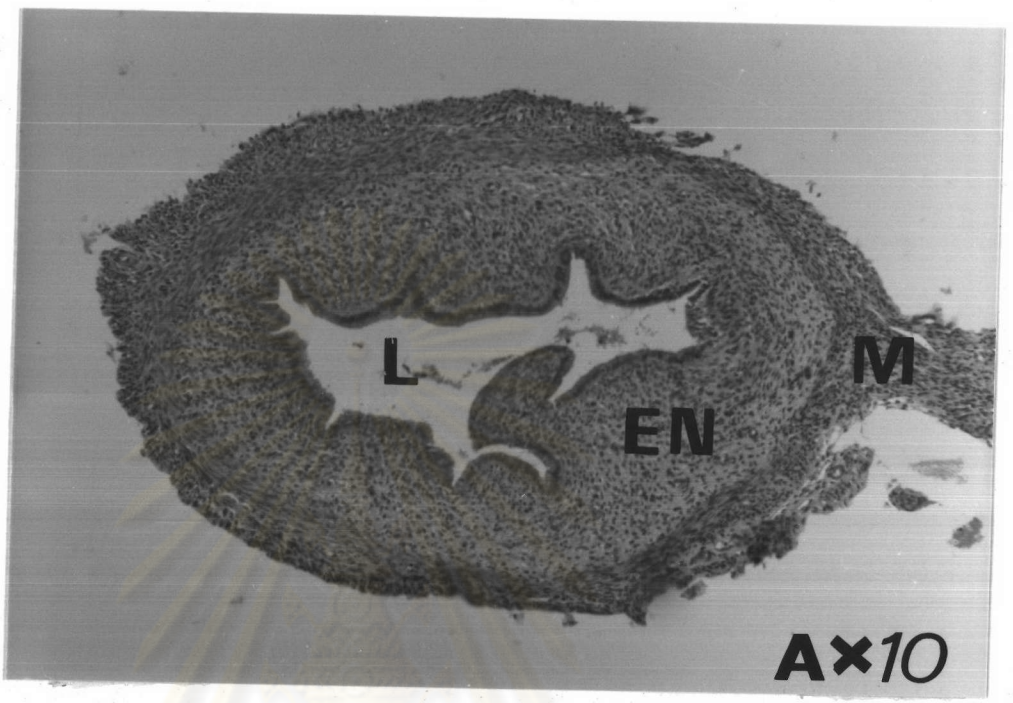
รูปที่ 9 แสดงภาพภาคตัดขวางของมดลูกหนูแรทที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ เมื่อได้รับ E_2-17β 43 นาโนกรัม/กก. น้ำหนักตัว/วัน เข้าใต้ผิวหนัง 3 วันติดต่อกัน (A,B)

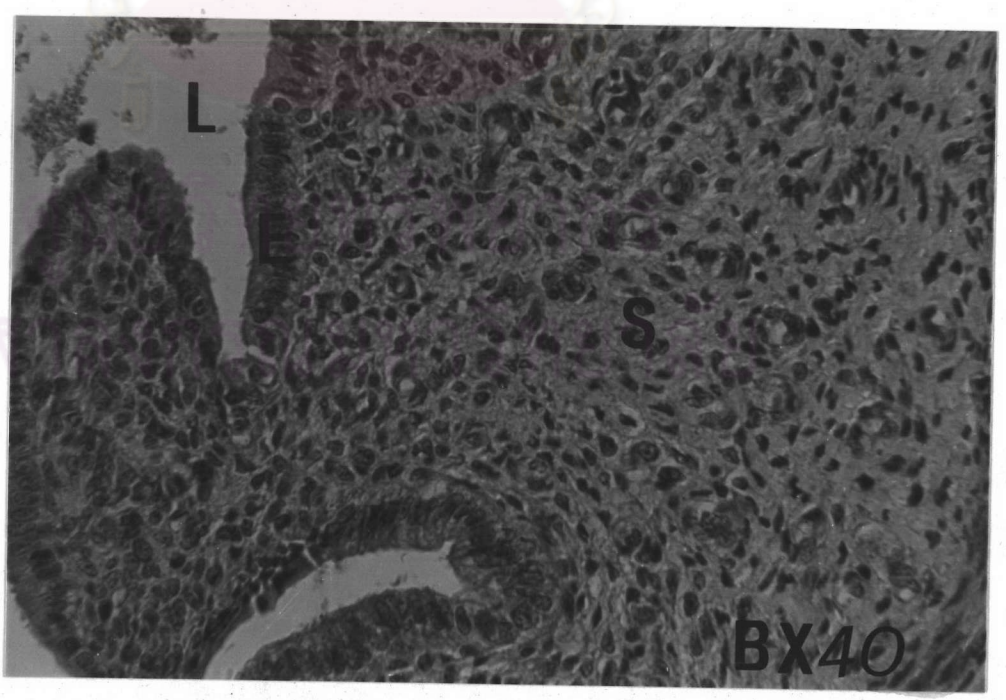
L = uterine lumen , E = luminal epithelium

S = stromal cell , EN = endometrium

M = myometrium

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


L
M
EN
A×10


L
E
S
BX40