

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การทดสอบการแยก D-norgestrel

เมื่อนำ D-norgestrel ที่ทดสอบตามวิธีในข้อ 2.6.2 หน้า 16 มาทำโพรบ์ด้วย
 ภาชนะ Thin-layer chromatography โดยใช้ alumina pre-coated sheet และ
 solvent system คือ toluene : ethanol : acetic acid ในอัตราส่วน 75:20:5
 โดยปริมาตร แลวนำแผ่น alumina ไปทาบบนแผ่นฟิล์ม X-ray ได้ผลดังรูปที่ 9

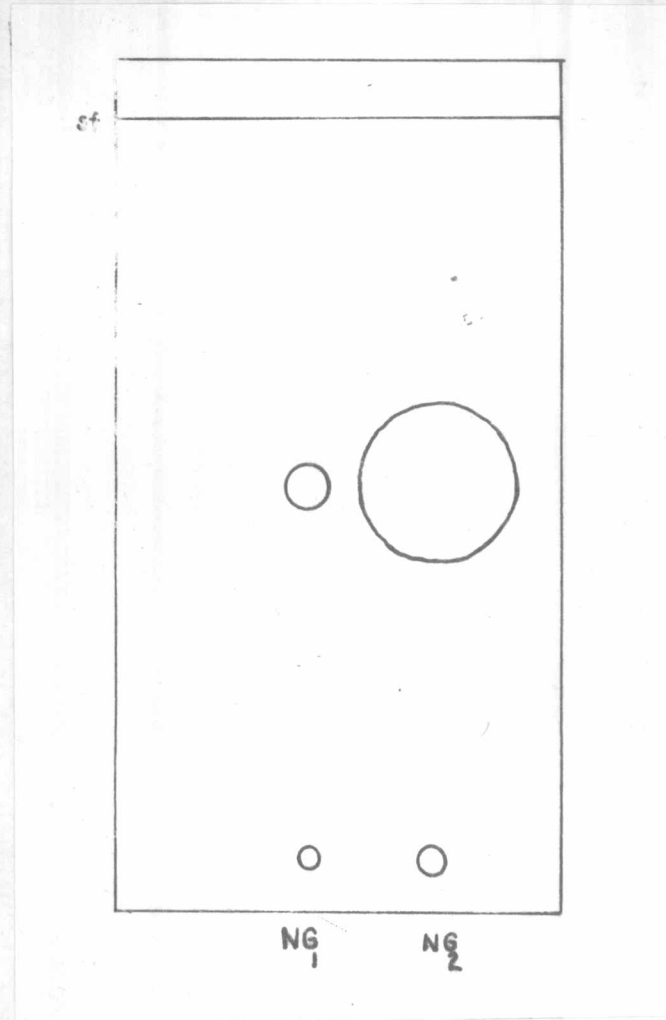
ผลปรากฏว่า Rf value ของ $NG_1 = NG_2$ และมีค่าประมาณ 0.48

เมื่อศึกษาคุณสมบัติในการรวมตัวของสารทั้ง 2 ชุดกับแอนติบอดี ปรากฏว่า (รูปที่ 9)
 เฉพาะชุด NG_2 เท่านั้นที่พบคุณสมบัติในการจับกับแอนติบอดีคือ ส่วน NG_1 นั้นจับตัวกันน้อย
 ในการทดลองต่าง ๆ ไป จึงใช้แค่ NG_2 อย่างเดียว

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐานของ D-norgestrel

3.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดี

เมื่อทดลองใช้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสุดท้ายระหว่าง 1 : 5,000 ถึง
 1 : 320,000 มาทำปฏิกิริยากับ ^{125}I -D-norgestrel ในกรณีที่ไม่มี D-norgestrel
 มาตรฐานและเมื่อมี D-norgestrel มาตรฐาน 200 pg/tube ปรากฏว่า ความเข้มข้นที่
 เหมาะสมอยู่ระหว่าง 1:80,000 ถึง 1:160,000 (รูปที่ 10) แต่ในการทดลองต่าง ๆ ไป
 เลือกใช้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:160,000



รูปที่ 8 ผลการทำ ^{125}I -D-norgestrel บริสุทธิ์ด้วย Thin-layer chromatography

จากรูป NG_1 คือสารที่ได้จากการใช้ ethyl acetate ละเอียดครั้งแรกตามวิธีในข้อ 2.6.2 ง.

หน้า 15

NG_2 คือสารที่ได้จากการใช้ ethyl acetate ละเอียดครั้งที่ 2 จากข้อ 2.6.2 ง. เช่นกัน

รูปที่ 9 Immunoreactivity ของ NG₁ และ NG₂ กับแอนติบอดี

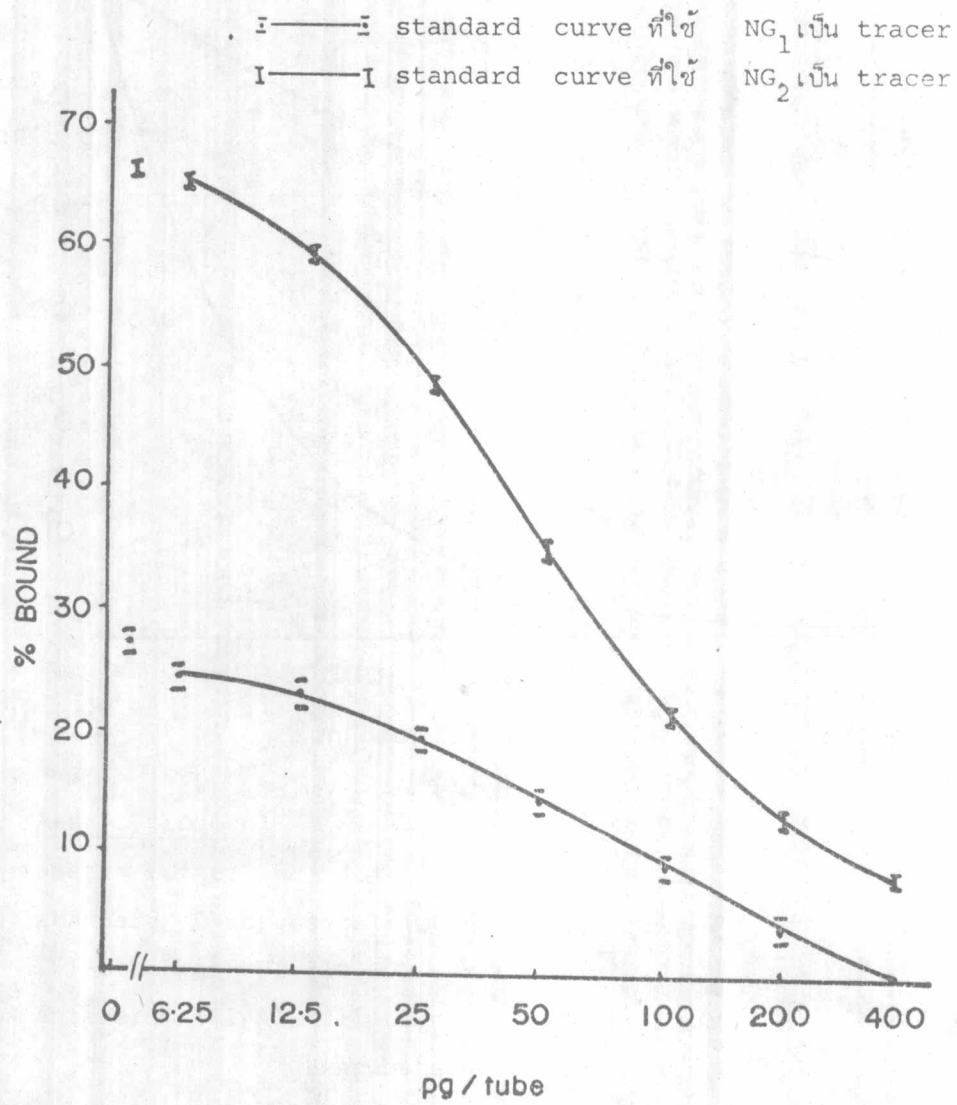
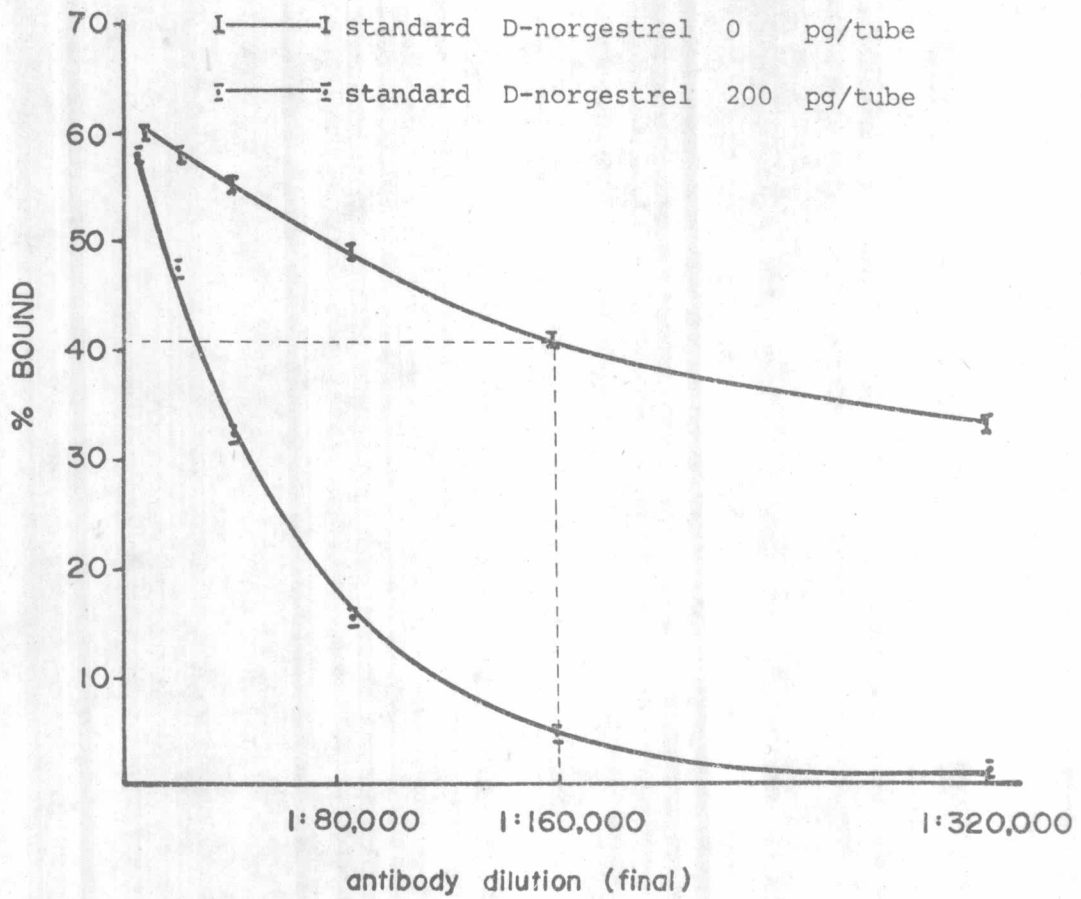


Figure 10 Antibody dilution curve



Assay protocol

assay buffer pH 7.4	200	μ l
standard D-norgestrel (0 and 200pg/tube)	100	μ l
125 I-D-norgestrel (10,000 cpm/tube)	100	μ l
antiserum (final dilution 1:5,000-1:320,000)	100	μ l
incubate overnight at 4 °C		
0.5% gelatin phosphate buffer pH 7.4	100	μ l
charcoal in 1 cm ³ assay buffer 2.5mg/tube with dextran		
T 70 0.25mg/tube		

3.2.2 การหาปริมาณ D-norgestrel ที่ติดสากที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

จากรูปที่ 11 แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้สารติดสากปริมาณ 5,000 และ 10,000 cpm/tube ไม่ทำให้เกิดการแตกต่างกันของการรวมตัวที่เห็นได้ชัด แต่หาเพิ่มปริมาณสารติดสากมากกว่า 10,000 cpm/tube กราฟที่ไล่จะแตกต่างกันไป ดังนั้น สำหรับการทดลองต่อไป ได้เลือกใช้ปริมาณของ ^{125}I -D-norgestrel 10,000 cpm/tube เนื่องจากประโยชน์ในการประหยัดเวลาของการนับสารรังสี

3.2.3 อิทธิพลของปริมาณผงถ่านต่อการดูดซับ D-norgestrel

เมื่อทำการทดลองซ้ำโดยใช้ปริมาณแอนติบอดีและสารติดสากที่เลือกแล้วเหมาะสมแล้ว จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0.05 - 3.0% ไคโกล์กรูบที่ 12 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปริมาณของผงถ่านที่เหมาะสมที่สุดในการดูดซับ

D-norgestrel อิสระคือ 0.25% ผงถ่าน $1 \text{ cm}^3/\text{tube}$

3.2.4 อิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อการดูดซับของผงถ่าน

จากการศึกษาอิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อคุณสมบัติของผงถ่านในการดูดซับ D-norgestrel ในรูปอิสระ พบว่า เมื่อให้ผงถ่านทำปฏิกิริยาที่ 4°C การดูดซับจะเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ถึงแม้จะทิ้งระยะเวลาไว้ถึง 60 นาที แต่การดูดซับจะเปลี่ยนแปลงมากขึ้นเมื่อใช้สภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า คือ 27°C (รูปที่ 13) ดังนั้น ในการทดลองครั้งต่อไป จึงเลือกเติมสารละลายผงถ่านที่อุณหภูมิค่า ประมาณ 4°C โดยการแช่ผงถ่านและหลอดทดลองในถาดน้ำแข็งและหลังจากการเติมสารละลายผงถ่านแล้ว พบว่า การดูดซับของผงถ่านจะถึงจุดสมดุลอย่างรวดเร็ว ดังนั้น เราจึงสามารถปั่นแยก D-norgestrel อิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดีได้ทันที

3.2.5 อิทธิพลของ gelatin และ dextran T-70 ต่อการดูดซับของผงถ่าน

จากรายงานเกี่ยวกับการใช้ผงถ่านสำหรับแยกสารรูปอิสระและรูปที่จับกับ แอนติบอดี

บางรายงาน พบว่า สารบางพวก เช่น gelatin หรือสารพวก dextran มีอิทธิพลต่อปฏิกิริยาการกักจับของสารหลายชนิด [Binoux และคณะ (1973), Sand และคณะ (1973)] ผู้ทดลองจึงได้ลองศึกษาอิทธิพลของสารทั้งสองต่อปฏิกิริยาการกักจับของผงถ่านของ D-norgestrel รูปอิสระ และรูปที่จับกับแอนติบอดี และพบว่า 100 μ l ของ 0.5% gelatin phosphate buffer ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาการกักจับของผงถ่าน (รูปที่ 14 แต่ dextran T 70 มีผลต่อปฏิกิริยาการกักจับของผงถ่าน แต่ไม่มีผลต่อลักษณะของกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 15)

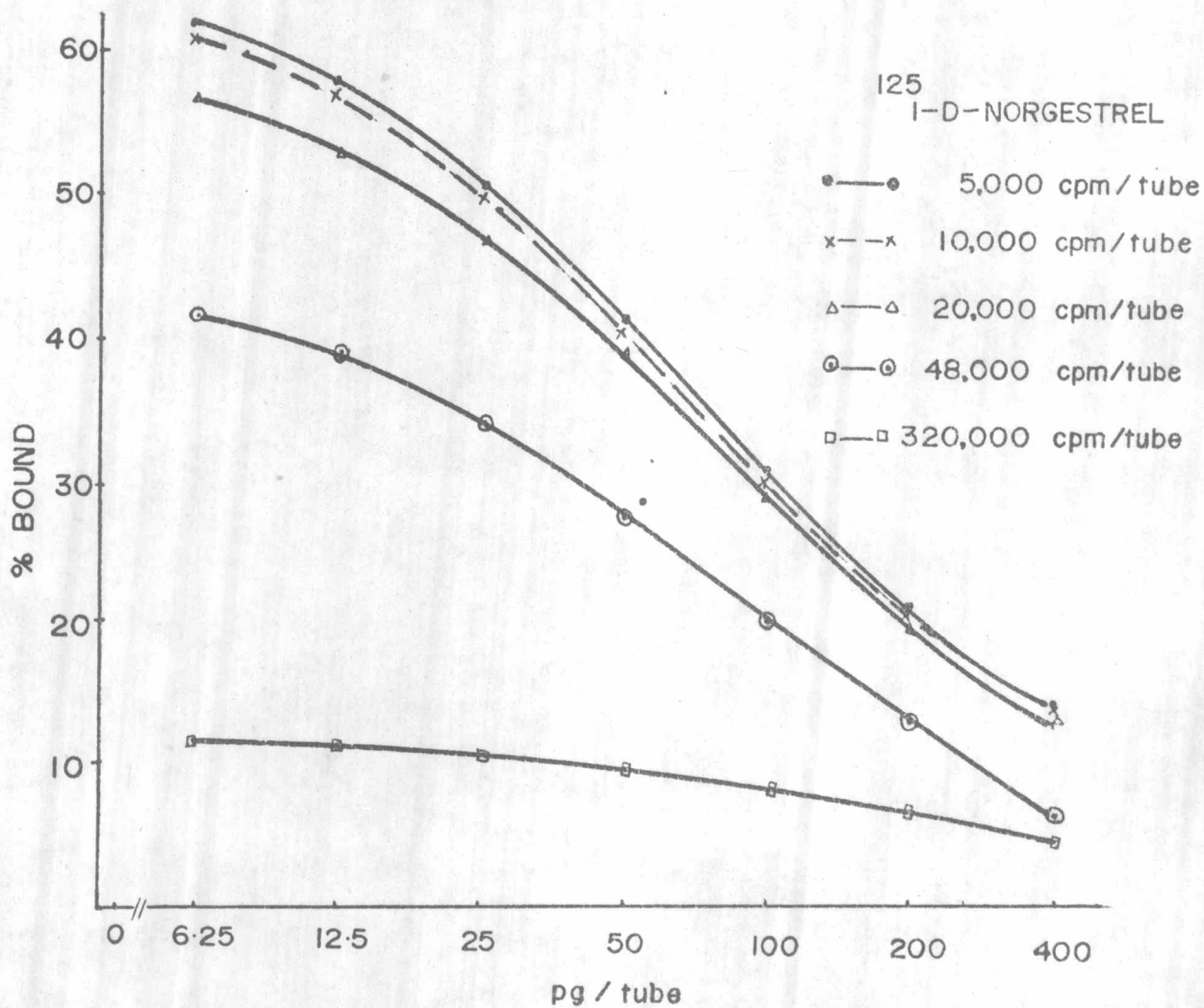
3.2.6 อิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการ incubate ต่อการรวมตัวของ D-norgestrel กับแอนติบอดี

การศึกษาค่าอิทธิพลของเวลาต่อปฏิกิริยาการรวมตัวของ D-norgestrel กับแอนติบอดี ปรากฏว่า %Bound จะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มเวลาจาก 1 ชม. จนถึง 2 ชม. ที่ 4°C และต่อจากนั้น ปฏิกิริยานี้จะคงที่ไปจนถึง 24 ชม. (รูปที่ 16) แสดงว่า ปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง D-norgestrel กับแอนติบอดีจะถึงจุดสมดุลภายในเวลา 2 ชม. แต่เพื่อความสะดวกจึงเลือก incubate สารไวคางคืน คือ ใช้เวลาระหว่าง 18 - 24 ชั่วโมง

3.2.7 อิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้ในการ incubate ต่อการรวมตัวของ D-norgestrel กับแอนติบอดี

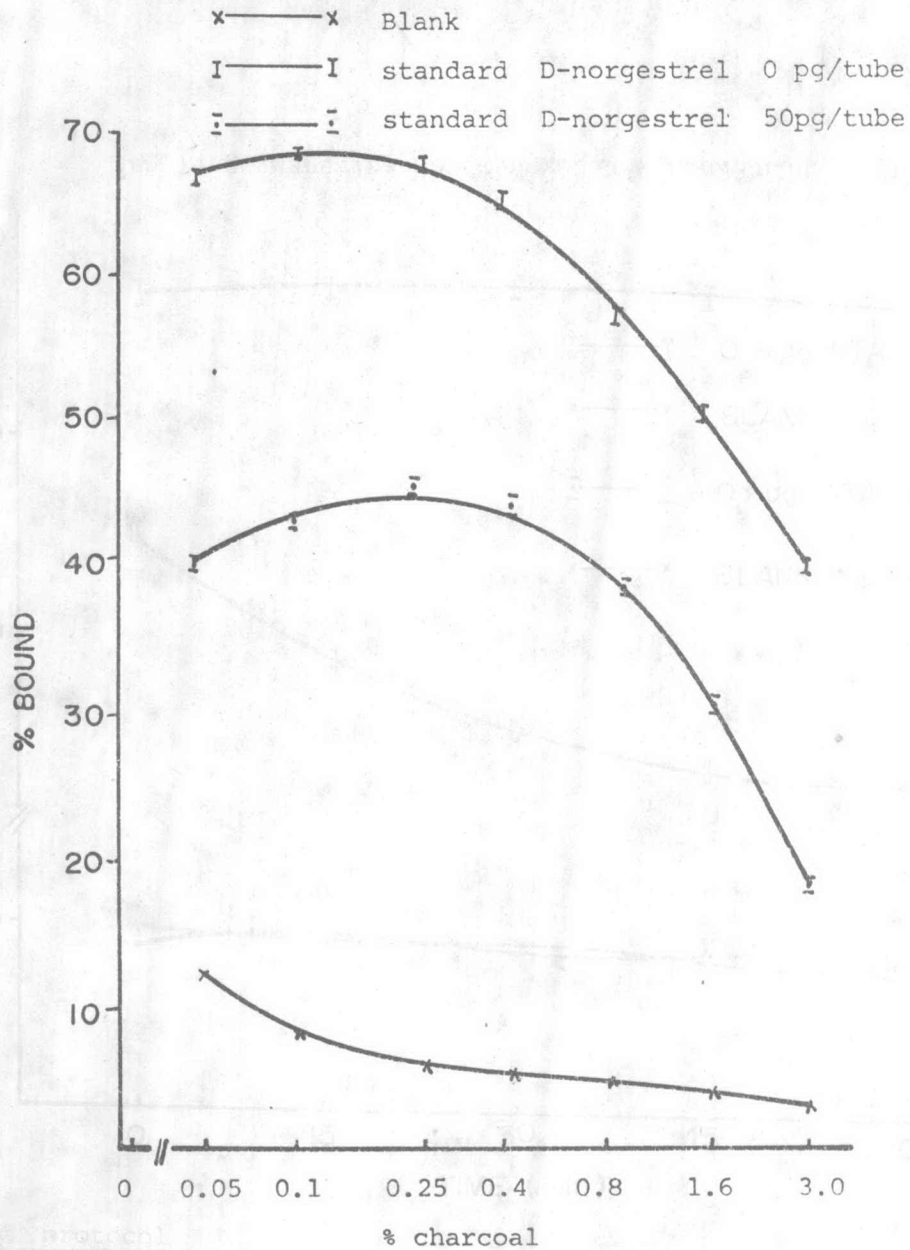
เมื่อเลือกระยะเวลาที่ incubate แล้ว ได้ใช้สภาวะที่ใดเลือกแล้วจากการทดลองก่อน ๆ ในการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยา ผลปรากฏว่า ปฏิกิริยาการรวมตัวของ D-norgestrel กับแอนติบอดีที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4°C 25°C และ 37°C ไม่แตกต่างกันมากนัก (รูปที่ 17) แต่ผู้ทดลองได้เลือกใช้อุณหภูมิ 4°C สำหรับปฏิกิริยาต่อไป เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่สะดวกต่อการทำงานที่สุด คือ สามารถจะ incubate หลอดทดลองในตู้เย็นและขณะ incubate อุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก

รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของ D-norgestrel เมื่อใช้สารติดสลากปริมาณต่างกัน



Assay protocol

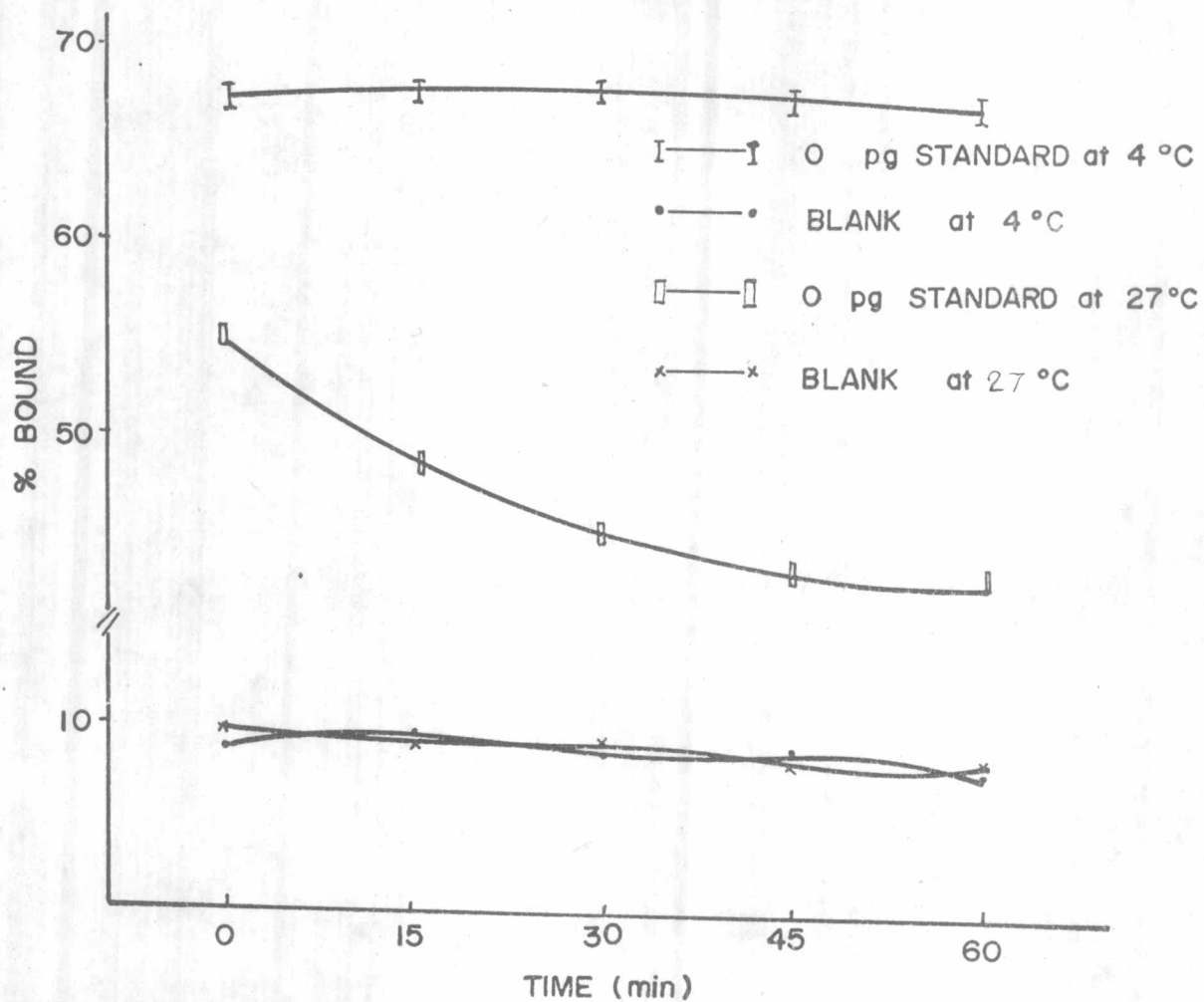
assay buffer pH 7.4	200	μl
¹²⁵ I-D-norgestrel (10,000 cpm/tube)	100	μl
standard D-norgestrel (6.25-400pg/tube)	100	μl
antiserum (final dilution 1:160,000)	100	μl
incubate overnight at 4 °C		
0.5% gelatin phosphate buffer pH 7.4	100	μl
charcoal in 1 cm ³ assay buffer 2.5mg/tube with dextran		
T 70 0.25mg/tube		



Assay protocol

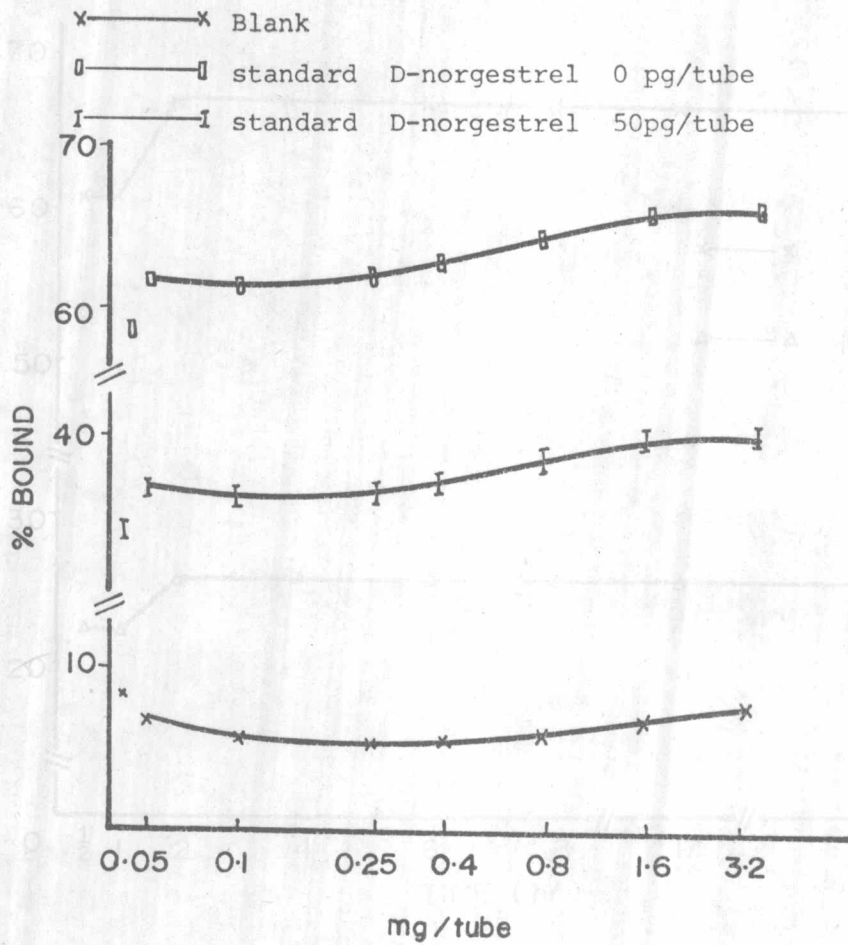
assay buffer pH 7.4	200	μl
standard D-norgestrel (0 และ 50pg/tube)	100	μl
¹²⁵ I-D-norgestrel (10,000cpm/tube)	100	μl
antiserum (final dilution 1:160,000)	100	μl
incubate overnight at 4 °C		
0.5% gelatin phosphate buffer pH 7.4	100	μl
charcoal (0.05-3 %) with dextran T 70 0.025 %	1000	μl

รูปที่ 13 อิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อการดูดซับของผงถ่าน

Assay protocol

assay buffer pH 7.4	300	μ l
125 I-D-norgestrel (10,000 cpm/tube)	100	μ l
antiserum (final dilution 1:160,000)	100	μ l
incubate overnight at 4 °C		
0.5% gelatin phosphate buffer pH 7.4	100	μ l
charcoal in 1 cm ³ assay buffer 2.5mg/tube with dextran		
T 70 0.25mg/tube		

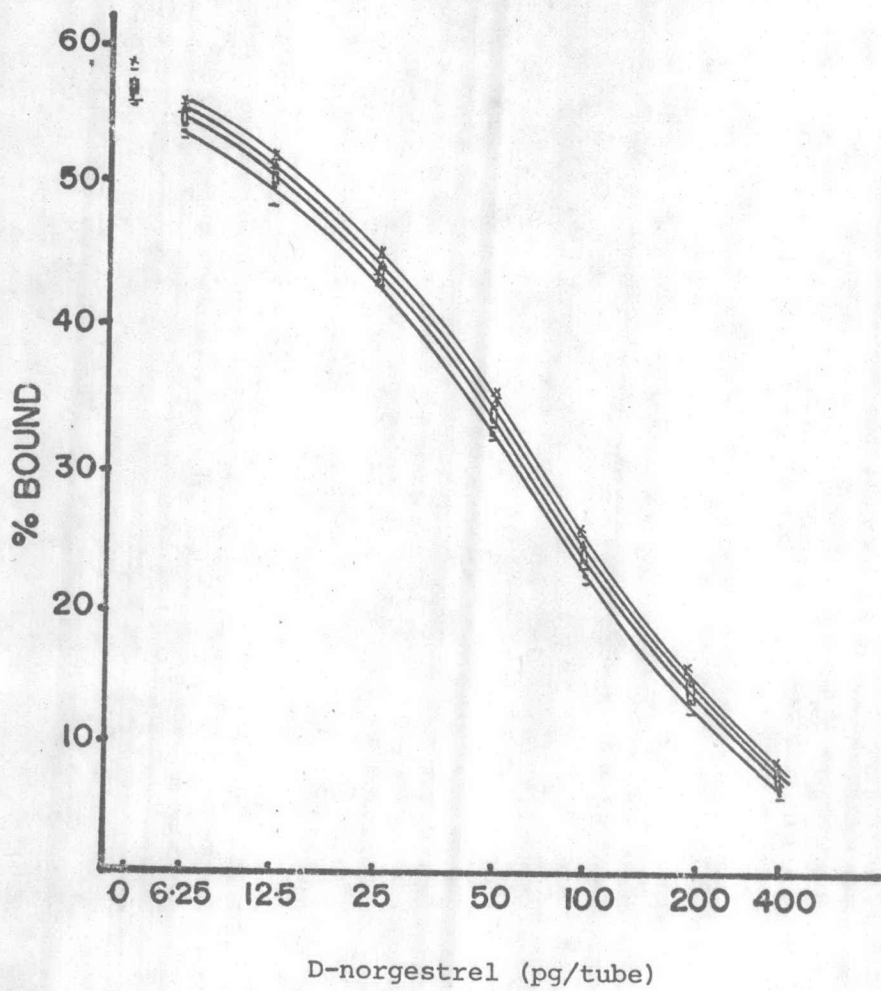
รูปที่ 15 (ก) อิทธิพลของ dextran ในการดูดซับ D-norgestrel อิสระ



Assay protocol

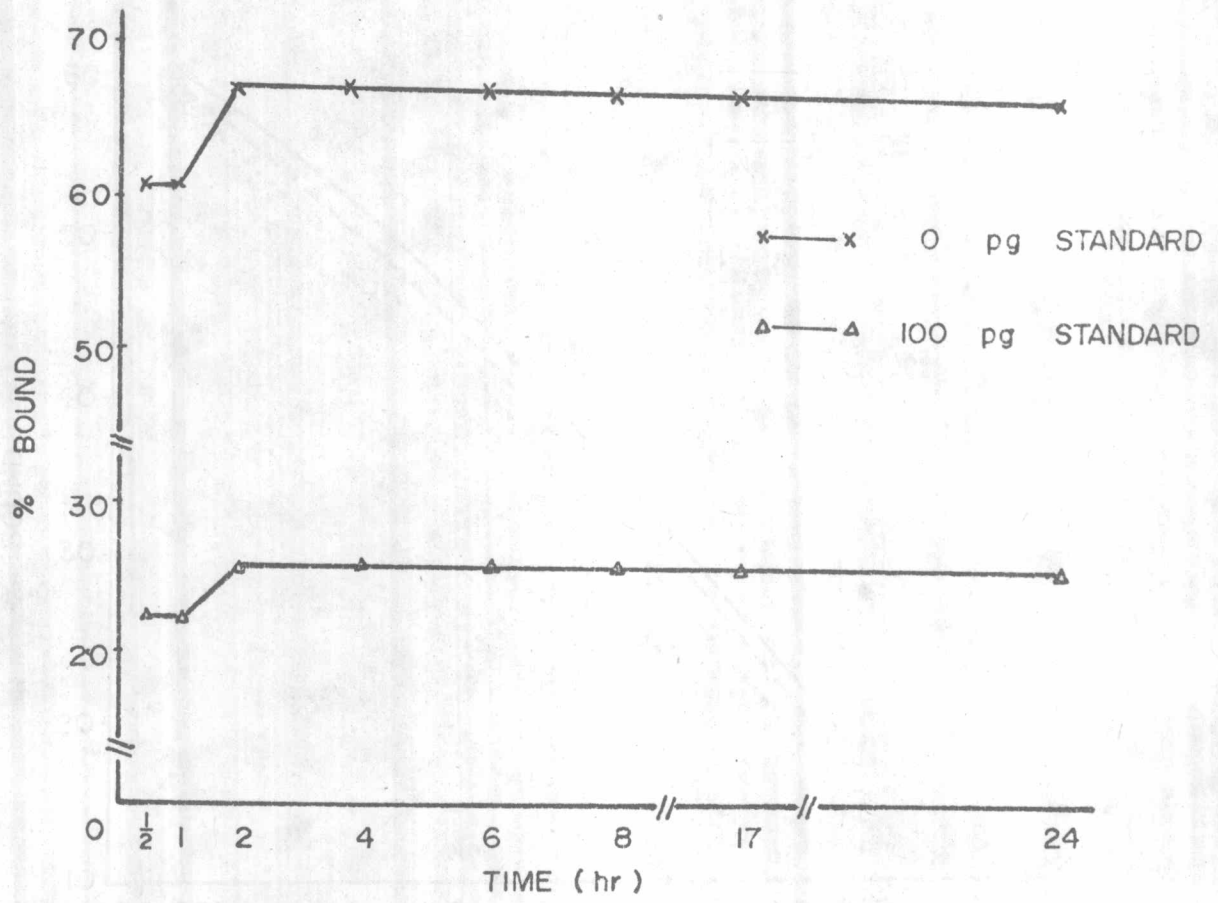
assay buffer pH 7.4 200 μ l
 standard D-norgestrel (0 และ 50pg/tube) 100 μ l
 125 I-D-norgestrel (10,000cpm/tube) 100 μ l
 antiserum (final dilution 1:160,000) 100 μ l
 incubate overnight at 4 °C
 charcoal in 1 cm³ assay buffer 2.5mg/tube with dextran
 T 70 (0.05-3.2mg/tube)

รูปที่ 15 (ข) อิทธิพลของ dextran ในการดูดซับ D-norgestrel อีสาระ



- ——— ○ กราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายผงถ่านที่ไม่มี dextran เป็นตัวดูดซับ
 - ——— □ กราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายผงถ่านที่มี 0.005% dextran เป็นตัวดูดซับ
 - ⊖ ——— ⊖ กราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายผงถ่านที่มี 0.01 % dextran เป็นตัวดูดซับ
 - × ——— × กราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายผงถ่านที่มี 0.025% dextran เป็นตัวดูดซับ
- กราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายผงถ่านที่มี dextran ตั้งแต่ 0.08 - 0.32% มีลักษณะของกราฟเหมือนกัน แต่ไม่ได้นำมาแสดง

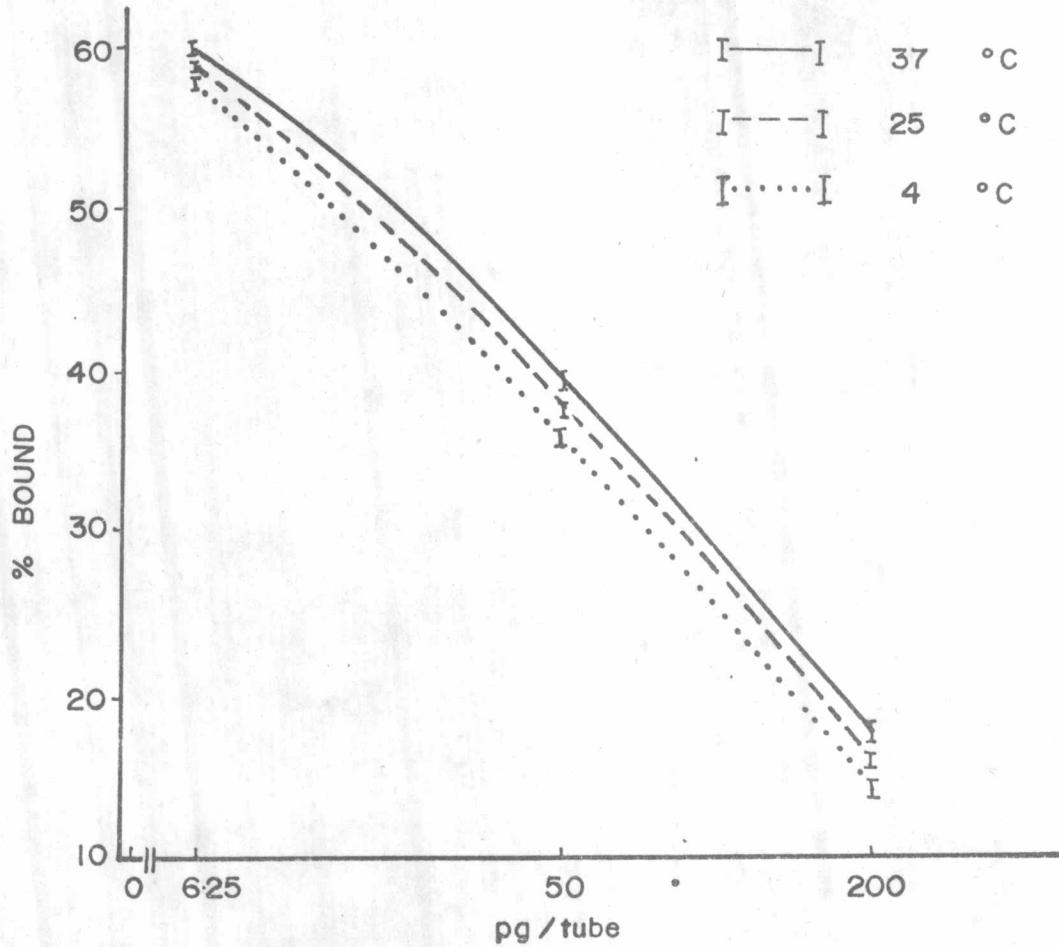
รูปที่ 16 อิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการ incubate ต่อการรวมตัวของ D-norgestrel กับแอนติบอดี



Assay protocol

assay buffer pH 7.4	200	μl
standard D-norgestrel (0 และ 100pg/tube)	100	μl
¹²⁵ I-D-norgestrel (10,000cpm/tube)	100	μl
antiserum (final dilution 1:160,000)	100	μl
incubate at 4 °C (1-24 ชม.)		
charcoal in 1 cm ³ assay buffer	2.5	mg/tube

รูปที่ 17 อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการรวมตัวของ D-norgestrel กับแอนติบอดี

Assay protocol

assay buffer pH 7.4	200	μl
standard D-norgestrel (6.25-400pg/tube)	100	μl
¹²⁵ I-D-norgestrel (10,000cpm/tube)	100	μl
antiserum (final dilution 1:160,000)	100	μl
incubate overnight at 4, 25 and 37 °C		
charcoal in 1 cm ³ assay buffer	2.5mg	/tube

3.3 Reproducibility ของ sephadex LH-20 column chromatography

การใช้ sephadex LH-20 column ในการแยกสารต่าง ๆ นั้น มีข้อดี คือ สามารถนำ column นั้นมาใช้ใหม่ได้ แต่ก่อนที่จะใช้ประโยชน์ของ sephadex จำเป็นจะต้องทดสอบให้แน่ใจก่อนว่า column แต่ละอันมีอายุการใช้งานที่นานพอ จากรูปที่ 18 และ 19 จะเห็นว่า column ที่เตรียมขึ้นมีเสถียรภาพอยู่ในเกณฑ์ดีมาก และจากการทดลองพบว่า column แต่ละอันมีอายุใช้งานอย่างน้อย 6 เดือน

3.4 ผลการหาวิธีการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณ D-norgestrel ในน้ำนม

3.4.1 อิทธิพลของน้ำนม ether และ eluent จาก sephadex column (benzene + methanol)

จากรูปที่ 20 จะเห็นว่า residue จาก ether และ column ไม่มีผลต่อความไวของปฏิกิริยา radioimmunoassay เนื่องจากความไวของปฏิกิริยายังคงเดิม (slope เท่ากัน) ส่วน residue จากน้ำนมมีผลต่อปฏิกิริยาอย่างชัดเจน กราฟที่ใ้ทำในเวลาเดียวกัน

3.4.2 ผลการใช้กระบวนการ saponification ในการขจัด

saponifiable lipids

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่า น้ำนมมีอิทธิพลทำให้ลักษณะของกราฟมาตรฐานเบี่ยงเบนไปมาก ถึงแม้จะผ่านกระบวนการสกัดด้วยตัวสกัดและผ่าน sephadex column แล้วก็ตาม การทดลองนี้จึงเพิ่มกระบวนการ saponification ก่อนสกัดน้ำนมเพื่อทดสอบว่ากระบวนการนี้สามารถจะขจัดพวก saponifiable lipids ออกจาก D-norgestrel จากรูปที่ 21 จะเห็นว่า กระบวนการ saponification ไม่สามารถขจัดสิ่งรบกวนจากน้ำนมได้หมด กราฟที่ใ้ทำในเวลาเดียวกัน

3.4.3 ผลการขจัดไขมันโดยวิธี sephadex LH-20 column ที่มี isooctane + benzene + methanol เป็น eluent

จากการใช้ sephadex LH-20 column ที่มี benzene ผสมกับ methanol เป็น eluent พบว่า ไม่สามารถจะขจัดไขมันออกได้หมด แต่เมื่อเปลี่ยน eluent เป็น isooctane ผสมกับ benzene และ methanol แทน พบว่าประสิทธิภาพในการขจัดไขมันดีขึ้นมาก และจากรูปที่ 22 จะเห็นว่า เมื่อทดลองใช้วิธีขจัดไขมันจากน้ำมันที่ได้จากสตรีหลายคน พบว่า ผลที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่กราฟมาตรฐานที่ได้ก็ยังคงแตกต่างจากกราฟที่ไม่ได้เติมสิ่งเจือปนเล็กน้อย กราฟที่ได้ทำในเวลาเดียวกัน

3.5 ผลการหาวิธีทดลองที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณ D-norgestrel ในซีรัม

3.5.1 อิทธิพลของซีรัมที่มีต่อกราฟมาตรฐาน

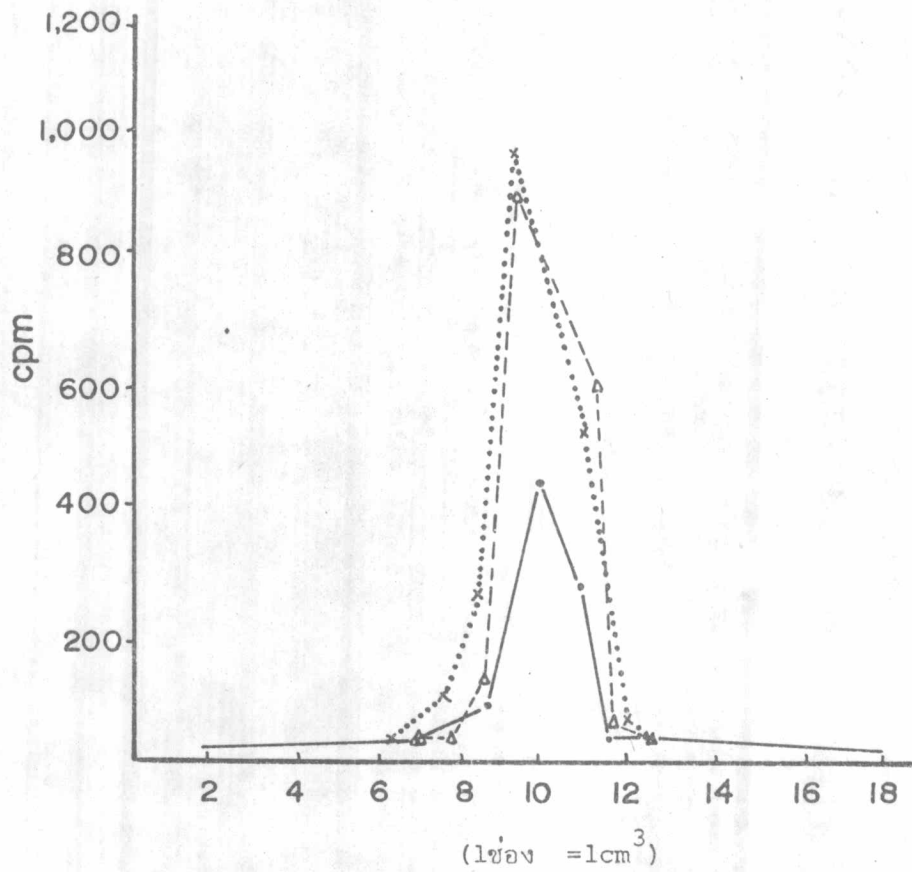
เมื่อใช้วิธีที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณ D-norgestrel ในน้ำนมแล้ว ผู้ทดลองได้ลองนำวิธีการเดียวกันกับที่ใช้ในน้ำนมมาใช้กับซีรัม แต่เนื่องจากในซีรัมมี lipid น้อยกว่าในน้ำนมมาก ผู้ทดลองจึงได้ศึกษาเพื่อหา การหาปริมาณ D-norgestrel ในซีรัมนั้นหลังการสกัดด้วย ether แล้ว จำเป็นต้องผ่าน sephadex LH-20 column ด้วยหรือไม่

จากรูปที่ 23 จะเห็นว่ากราฟมาตรฐานที่เติม ether ที่สกัดสารจากซีรัมขนานกับกราฟมาตรฐานที่ไม่มีสิ่งเจือปน แต่ %Bound ต่ำกว่าประมาณ 2 - 3% และเมื่อผ่าน column แล้ว ผลที่ได้แตกต่างจากกราฟที่เติม ether ที่สกัดสารจากซีรัมอย่างมาก ผู้ทดลองจึงได้เลือกใช้วิธีการวัดปริมาณ D-norgestrel จากซีรัมโดยไม่ผ่าน sephadex column กราฟที่ได้ทำในเวลาเดียวกัน

รูปที่ 18 Reproducibility ของ Sephadex LH-20 ที่ใช้ benzene:

methanol 85:15 โดยปริมาตรเป็น eluent

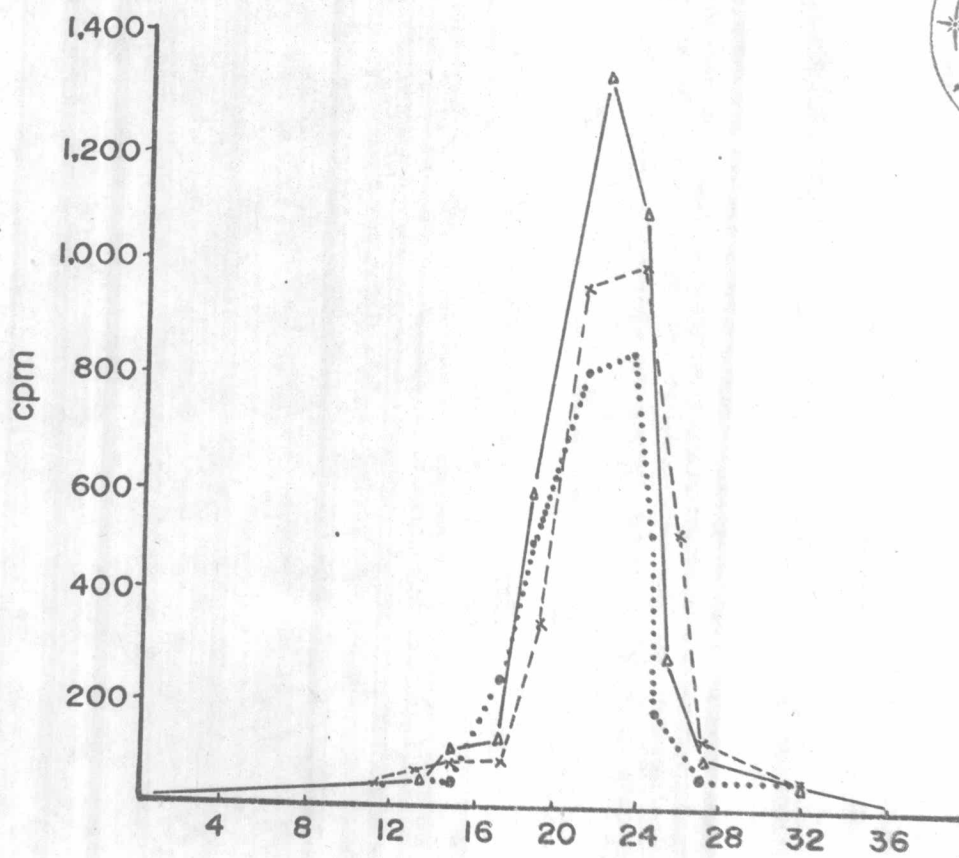
- ใช้ $^3\text{H-D-norgestrel}$ 1,500 cpm
- - - ● ใช้ $^3\text{H-D-norgestrel}$ 3,000 cpm
-● ใช้ $^3\text{H-D-norgestrel}$ 4,500 cpm



รูปที่ 19 Reproducibility ของ Sephadex LH-20 ที่ใช้ isooctane:

benzene:methanol 70:20:10 โดยปริมาตรเป็น eluent

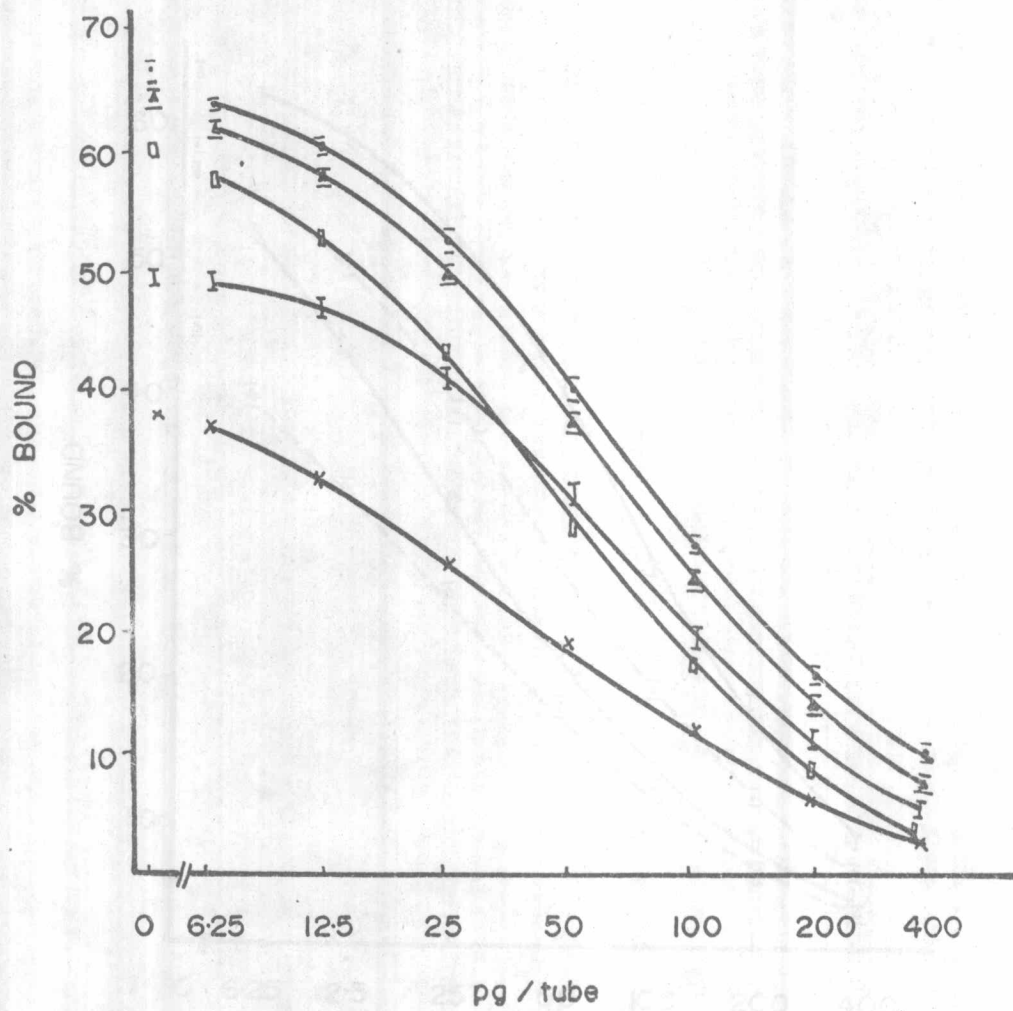
- ใช้ $^3\text{H-D-norgestrel}$ 3,000 cpm
- ใช้ $^3\text{H-D-norgestrel}$ 4,000 cpm
-● ใช้ $^3\text{H-D-norgestrel}$ 5,000 cpm



(1 ช่อง = 1 cm³)

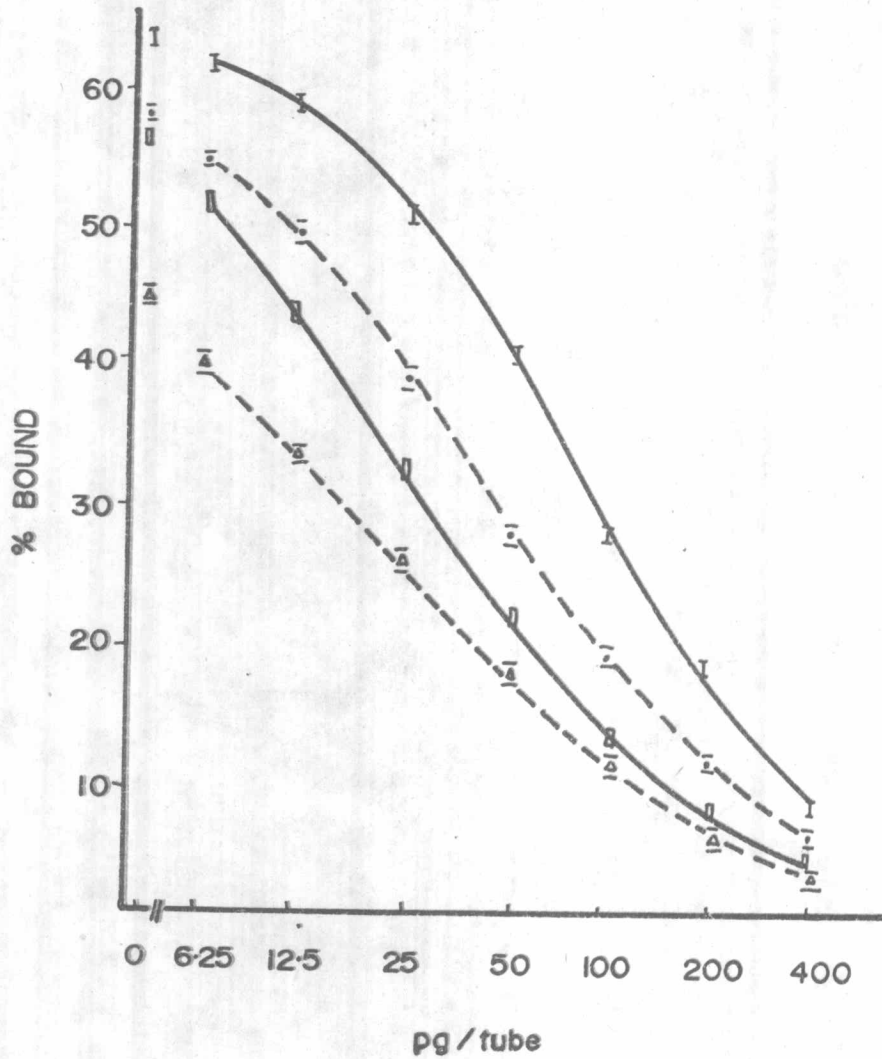


รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานของ D-norgestrel แสดงถึงอิทธิพลของ ether น้ำนํม
เมื่อผ่านและไม่ผ่าน Sephadex column



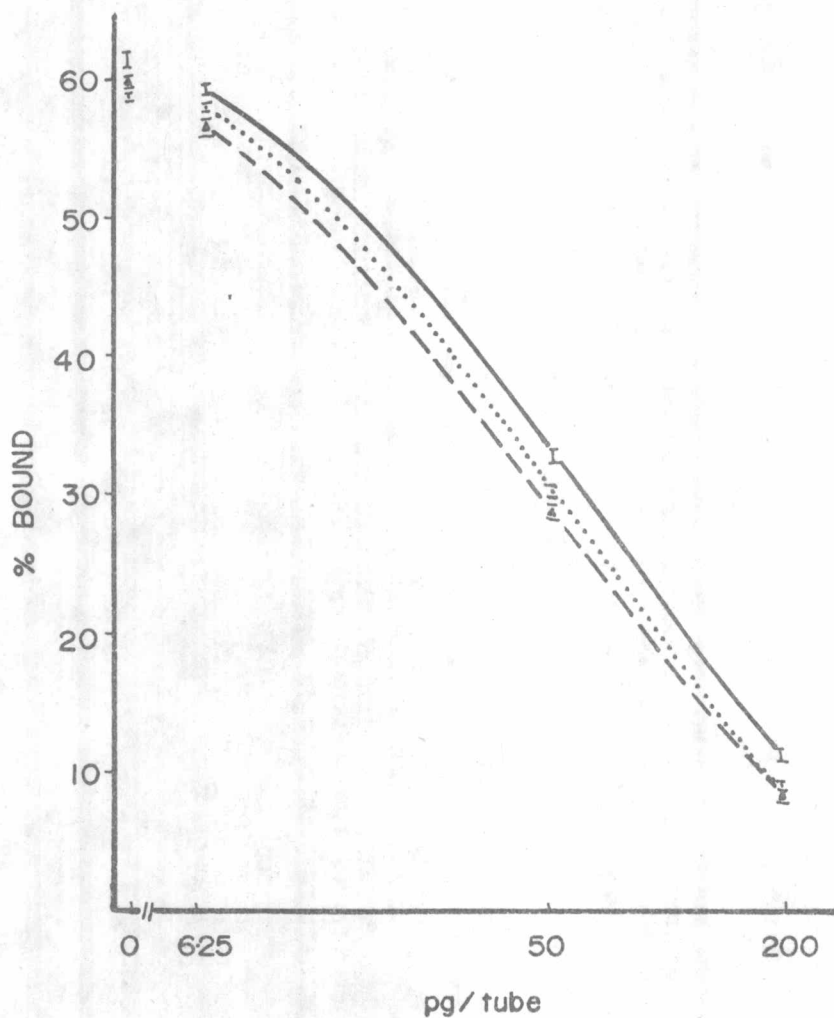
- — □ กราฟมาตรฐานที่ไม่ได้เติมสิ่งเจือปน
 △ — △ กราฟมาตรฐานที่เติม residue จาก ether
 × — × กราฟมาตรฐานที่เติม residue จากน้ำนํมสะกัดด้วย ether
 ○ — ○ กราฟมาตรฐานที่เติม residue จาก ether และผ่าน Sephadex column
 ⊥ — ⊥ กราฟมาตรฐานที่เติม residue จากน้ำนํมที่สะกัดด้วย ether และผ่าน Sephadex column

รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของ D-norgestrel แสดงอิทธิพลของน้ำนมสตรีหลังคลอดในวันต่างๆกัน ซึ่งผ่านกระบวนการ saponification ก่อนการสกัด และผ่าน Sephadex column



- I — I กราฟมาตรฐานที่ไม่มีสิ่งเจือปน
- II - - II กราฟมาตรฐานที่มีสิ่งเจือปนจากน้ำนมหลังคลอด 8 วัน
- III — III กราฟมาตรฐานที่มีสิ่งเจือปนจากน้ำนมหลังคลอด 53 วัน
- IV - - IV กราฟมาตรฐานที่มีสิ่งเจือปนจากน้ำนมหลังคลอด 15 วัน

รูปที่ 23 อิทธิพลของซีรัมต่อกราฟมาตรฐาน D-norgestrel เมื่อผ่าน
และไม่ผ่าน Sephadex column



- I—I กราฟมาตรฐานที่ไม่มีสิ่งเจือปน
 II—II กราฟมาตรฐานที่เติม ether extract ของซีรัมโดยไม่ผ่าน Sephadex column
 III—III กราฟมาตรฐานที่เติม ether extract ของซีรัมโดยผ่าน Sephadex column

3.6 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณ D-norgestrel

ได้ทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวัดปริมาณ ทั้งในด้านความจำเพาะ ความไว ความแม่นยำและความถูกต้อง จากผลการทดลองพบว่า แอนติบอดีที่ได้ี้มีความจำเพาะสูง ตารางที่ 3 ซึ่งให้เห็นว่า steroids ที่พบในธรรมชาติ ทั้งในนํ้านมและในซีรัม มีปฏิกิริยากับ แอนติบอดีชนิดนี้้น้อยมาก มีแค่ metabolites ของ D-norgestrel เท่านั้น ที่จับกับ แอนติบอดีได้บ้าง ส่วนความไวของการวัดปริมาณเป็น 5 pg/cm^3

จากผลการทดลองเปรียบเทียบความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณ (ตารางที่ 4 และ 5) พบว่า ความแม่นยำของวิธีวัดปริมาณอยู่ในระดับที่น่าพอใจ ทั้งใน นํ้านมและซีรัม และทั้งในการวัดปริมาณเดียวกัน (within assay) และระหว่างการ วัดปริมาณ (between assay) แต่ความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณจะเปลี่ยนแปลงไป เมื่อปริมาณของ D-norgestrel ในสารตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไป

ตารางที่ 4 (1) ความจำเพาะของ Anti D-norgestrel

steroids และอื่น ๆ	cross reaction (%)
D-norgestrel	100
Cholesterol	< 0.2
<u>Metabolite ของ D-norgestrel</u>	
Norgestrel - caproate	< 0.05
5 α - dihydronorgestrel	29.68
5 β - dihydronorgestrel	9.84
3 β - hydroxy - 5 α - dihydronorgestrel	11.08
3 α - hydroxy - 5 β - dihydronorgestrel	1.12
<u>C₁₈ steroids</u>	
Estrone	< 0.001
Estradiol	< 0.01
Estriol	< 0.001

ตารางที่ 4 (2) ความจำเพาะของ Anti D-norgestrel

steroids และอื่น ๆ	cross reaction(%)
<u>C₁₉ steroids</u>	
Testosterone	< 0.2
DHEA	< 0.01
<u>C₂₁ steroids</u>	
Cortisol	< 0.001
Cortisone	< 0.001
11 - Deoxycortisol	< 0.001
Progesterone	< 0.001
11 β - hydroxyprogesterone	< 0.03
11 α - hydroxyprogesterone	< 0.002
17 - hydroxyprogesterone	< 0.01
Pregnenolone	< 0.002
Pregnanediol	< 0.001
5 α - Pregnanediol	< 0.01

ตารางที่ 4 ความแม่นยำและความถูกต้องของการวัดปริมาณ D-norgestrel ในน้ำนม

Pool milk (pg/tube)	Percentage recovery							
	Within assay						Between assay	
	Assay I		Assay II		Assay III		Assay I - III	
	Mean(\bar{X}_1) ± S.D.	%C.V.	Mean(\bar{X}_2) ± S.D.	%C.V.	Mean(\bar{X}_3) ± S.D.	%C.V.	Mean of ($\bar{X}_1, \bar{X}_2, \bar{X}_3$) ± S.D.	%C.V.
Pool A (100)	98.0 ± 6.3	6.4	96.6 ± 7.6	7.9	98.8 ± 11.3	11.4	97.8 ± 1.1	1.1
Pool B (400)	68.2 ± 5.4	7.9	73.6 ± 2.1	2.9	68.1 ± 6.0	8.8	70.0 ± 3.1	4.5
Pool C (700)	67.0 ± 3.4	5.1	67.1 ± 2.7	4.0	71.1 ± 2.3	3.2	68.4 ± 2.3	3.4

ทำการทดลองครั้งละ 3 ชุด ๆ ละ 3 ตัวอย่าง

ดูค่าความแม่นยำได้จากของ เปอร์ เซนต์ของสัมประสิทธิ์ของความเปลี่ยนแปลง (Coefficient of variation)

ดูค่าความถูกต้องได้จากของ เปอร์ เซนต์ค่าเฉลี่ย (Mean)

ตารางที่ 5 ความแม่นยำและความถูกต้องของการวัดปริมาณ D-norgestrel ในซีรัม

Pool serum (pg/tube)	Percentage recovery							
	Within assay						Between assay	
	Assay I		Assay II		Assay III		Assay I - III	
	Mean (\bar{X}_1) \pm S.D.	%C.V.	Mean (\bar{X}_2) \pm S.D.	%C.V.	Mean (\bar{X}_3) \pm S.D.	%C.V.	Mean of ($\bar{X}_1, \bar{X}_2, \bar{X}_3$) \pm S.D.	%C.V.
Pool A (100)	98.3 \pm 2.0	2.0	105.8 \pm 3.0	2.8	104.4 \pm 4.9	4.7	103.0 \pm 4.0	3.9
Pool B (400)	88.0 \pm 3.2	3.7	88.1 \pm 10.2	11.6	83.2 \pm 4.0	4.8	86.5 \pm 2.8	3.2
Pool C (700)	76.5 \pm 2.4	3.2	75.2 \pm 4.4	5.9	72.2 \pm 1.1	1.6	74.6 \pm 2.2	3.0

ทำการทดลองครั้งละ 3 ซัก ๆ ละ 3 ตัวอย่าง

ดูค่าความแม่นยำได้จากของเปอร์เซ็นต์ของสัมประสิทธิ์ของความเปลี่ยนแปลง (Coefficient of variation)

ดูค่าความถูกต้องได้จากของเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ย (Mean)

3.7 ผลการหาปริมาณ D-norgestrel ในน้ำนมและซีรัม

จากผลการหาปริมาณของ D-norgestrel ในน้ำนมของสตรีอาสาสมัคร 6 ราย พบว่า D-norgestrel ในตัวอย่างน้ำนมที่เก็บมาหลังจากเริ่มกินยาคุมอยู่ระหว่าง 20 - 160 pg/cm³ (ตารางที่ 7) ในจำนวนนี้มีอยู่ 5 รายที่น้ำนมทุกตัวอย่างหลังกินยาคุมปริมาณ D-norgestrel สูงอยู่ในระดับที่วัดได้ แต่ในสตรีรายที่ 4 พบ D-norgestrel ในปริมาณที่วัดได้เพียงตัวอย่างเดียวจากน้ำนม 3 ตัวอย่างที่เก็บหลังกินยา

ปริมาณของ D-norgestrel ในซีรัมของสตรีซึ่งเจาะพร้อมกับการเก็บน้ำนมในสตรีกลุ่มเดียวกัน พบว่าปริมาณ D-norgestrel ในซีรัมมีค่าระหว่าง 0.2 - 1.5 ng/cm³ และพบ D-norgestrel ในซีรัมทุกตัวอย่างหลังการกินยาในสตรี 4 ราย ส่วนในสตรีอีก 2 ราย พบ D-norgestrel 2 ตัวอย่างจาก 3 ตัวอย่าง (รายที่ 6) และ 1 ตัวอย่างจาก 3 ตัวอย่าง (รายที่ 4)

ตารางที่ 7 ปริมาณของ D-norgestrel ในน้ำนมและซีรัมของสตรีอาสาสมัครที่ใช้ Microlut[®] เป็นยาคุมกำเนิด*

รายที่ 1 ส.ช. (อายุ 23 ปี)

จำนวนวันหลังคลอด	9*	13*	27 ⁺⁺	41 ⁺⁺	
D-norgestrel ในน้ำนม (pg/cm ³)	0	0	47.8	58.8	ไม่ได้เก็บตัวอย่าง
D-norgestrel ในซีรัม (ng/cm ³)	0	0	0.47	0.32	ไม่ได้เก็บตัวอย่าง

รายชื่อ 2 ก.น. (อายุ 23 ปี)

จำนวนวันหลังคลอด	8*	15*	29 ⁺⁺	43 ⁺⁺	57 ⁺⁺
D-norgestrel ในน้ำนม (pg/cm ³)	0	0	68.1	50.0	38.8
D-norgestrel ในซีรัม (ng/cm ³)	0	0	1.47	0.75	0.63

รายชื่อ 3 ก.ศ. (อายุ 25 ปี)

จำนวนวันหลังคลอด	8*	15*	30 ⁺⁺	43 ⁺⁺	58 ⁺⁺
D-norgestrel ในน้ำนม (pg/cm ³)	0	0	68.18	73.9	62.4
D-norgestrel ในซีรัม (ng/cm ³)	0	0	0.26	0.27	0.20

รายนาม 4 อ.ย. (อายุ 23 ปี)

จำนวนวันหลังคลอด	8*	15*	30 ⁺⁺	43 ⁺⁺	58 ⁺⁺
D-norgestrel ในน้ำนม (pg/cm ³)	0	0	75.9	0	0
D-norgestrel ในที่รับ (ng/cm ³)	0	0	0.57	0	0

รายนาม 5 ม.ท. (อายุ 23 ปี)

จำนวนวันหลังคลอด	8*	12*	26 ⁺⁺	45 ⁺⁺	58 ⁺⁺
D-norgestrel ในน้ำนม (pg/cm ³)	0	0	85.9	96.3	104.1
D-norgestrel ในที่รับ (ng/cm ³)	0	0	0.75	0.79	1.08

รายชื่อ 6 ค.ช. (อายุ 24 ปี)

จำนวนวันหลังคลอด	7*	15*	29 ⁺⁺	42 ⁺⁺	56 ⁺⁺
D-norgestrel ในน้ำนม (pg/cm ³)	0	0	166.7	29.8	19.7
D-norgestrel ในซีรัม (ng/cm ³)	0	0	1.20	0.32	0

- + สตรีทุกรายกินยา Microbut^(R) (30 μ g ของ D-norgestrel) ทุกวัน ๆ ละ 1 เม็ด เริ่มกินหลังจากเก็บสารตัวอย่างครั้งที่ 2 ไปแล้ว
- * ตัวอย่างที่เก็บก่อนกินยา
- ++ ตัวอย่างที่เก็บในระหว่างกินยา