บทที่ 2

วัสดุ เครื่องมือ และวิธีทำการวิจัย

2.1 วัสดุ

Sodium(^{125}I) iodide (The Radiochemical Center, Amersham , England.

D-(15,16-^{3}H)-norgestrel (56 Ci/m mole) ละลายใน benzene: ethanol (9:1 โดยปริมาตร) ในความเข้มข้น 10 μCi/ cm^3

Rabbit anti D-norgestrel-3-oxime-BSA antisera อยู่ในรูป lyophilize, standard D-norgestrel, D-norgestrel-3-oxime, metabolite ของ D-norgestrel ต่างๆ เช่น norgestrel-caproate, 5α-dihydronorgestrel, 5β-dihydronorgestrel, 3β-hydroxy-5α-dihydro-norgestrel, 3α-hydroxy-5β-dihydronorgestrel จากบริษัท Schering AG, Berlin, Germany. โดยรับความเอื้อเฟื้อผ่าน Tenovus Institute for Cancer Research, Welsh National School of Medicine, Cardiff, U.K.

Nonradioactive steroids ตัวอื่นๆได้รับความเอื้อเฟื้อจากฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

Sephadex LH-20, dextran T 70 (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden.)

Activated charcoal (Norit A) laboratory reagent, particle size 4-5 μ, ashes 2.9 % (Serva, Germany.)

"liquiflour" liquid scintillator (NEN Gmbh, Frankfurt am

Main, Germany.)

Alumina pre-coated sheet, layer 0.2 mm, aluminium oxide N/UV 254 (Polygram® Macherey-Nagel + CO)

Isobutyl chloroformate, tri-n-butylamine,histamine(Sigma, U.S.A.)

Chloramine T, sodium metabisulphite (E. Merck AG,Germany)

Diethyl ether (BDH chemical Ltd, England)

2.2 เครื่องมือ

Tri-carb liquid scintillation spectrometor model 3390 (Packard Instrument Co. Inc., Zurich, Switzerland.)

Gamma sample counter GTL 300-500 (Wallac, Sweden.)

Refrigerated centrifuge, model P.R. 6 (International Equipment, U.S.A,)

Coleman pH meter model 39 (Coleman, U.S.A.)

2.3 การเก็บสารตัวอย่าง

2.3.1 น้ำนม

น้ำนมที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย น้ำนมสตรีปกติที่ไม่ได้ใช้ยาคุมกำเนิด ใช้เป็นน้ำนมเปรียบเทียบ (control milk) และน้ำนมจากสตรีอาสาสมัครซึ่งใช้ยาคุมกำเนิดชื่อ Microlut® ซึ่งเป็นยาประเภท Mini pill ทุกวัน ๆ ละ 1 เม็ด ยาแต่ละเม็ดประกอบด้วย D-norgestrel 30 µg

การเก็บน้ำนมจากสตรีปกติทำโดยได้รับความช่วยเหลือจากเจ้าหน้าที่แผนกพยาบาล

โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเก็บจากสตรีที่มาคลอดที่โรงพยาบาล และจากสตรีอาสาสมัครบางรายที่เป็น control subject ของโครงการวิจัยบางโครงการที่กำลังดำเนินอยู่โดยฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์

การเก็บน้ำนมจากสตรีอาสาสมัคร 6 ราย อายุระหว่าง 23 – 25 ปี เก็บน้ำนมประมาณวันที่ 7,14,28,42 และ 56 $\pm$ 3 วันหลังคลอด สองครั้งแรกเก็บก่อนเริ่มกินยา หลังจากเก็บน้ำนมครั้งที่ 2 แล้ว สตรีอาสาสมัครแต่ละรายจึงเริ่มกินยาคุมกำเนิด Microlut® ติดต่อกันทุกวัน

2.3.2 ซีรัม

ซีรัมที่ใช้ในการทดลองมี 2 ชนิด แบบเดียวกับน้ำนม คือ control serum ซึ่งต้องทำให้อยู่ในรูปของ charcoal serum และซีรัมจากสตรีอาสาสมัครกลุ่มเดียวกันกับที่เก็บน้ำนม การเจาะเลือดสตรีอาสาสมัครแต่ละราย เจาะในวันที่จะเก็บน้ำนม แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง จนกว่าเม็ดเลือดจะแยกตัวออกจากซีรัม จึงนำไปปั่นที่ 3000 xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงแยกส่วนของซีรัมออก

สารตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด คือ น้ำนมและซีรัมเก็บที่ -40°C จนกว่าจะใช้

2.4 การเตรียม charcoaled serum

ชั่งผงถ่าน 20 mg ใส่ลงในซีรัม 1 cm^3 เติม sodium azide ให้มีความเข้มข้น 0.1% คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลาประมาณ 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้องแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman NO 42 นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 45 นาที จะได้ charcoaled serum ซึ่งมีสีชา นำไปเก็บที่ -40°C

2.5 การละลายและการเก็บแอนติบอดี

ละลายแอนติบอดีซึ่งอยู่ในรูป lyophilize ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1 : 1

ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วแบ่งเก็บไว้ในขวด ๆ ละ 0.1 cm^3 ที่ $-40^{\circ}C$ ก่อนใช้ต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

2.5.1 การเตรียมแอนติบอดีสำหรับใช้ในการทดลอง

นำแอนติบอดีจากข้อ 2.5 มา 0.1 cm^3 มาเติม assay buffer ให้ครบ 200 cm^3 จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 : 2,000 เก็บใส่หลอด ๆ ละ 0.25 cm^3 และนำแอนติบอดี 1 : 2,000 มา 0.25 cm^3 มาเติม assay buffer ให้ครบ 4 cm^3 จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 : 32,000 เก็บไว้ที่ $-40^{\circ}C$ จนกว่าจะใช้

2.6 การเตรียมสารติดสลาก D-norgestrel

การเตรียมสารติดสลากนี้มีขั้นตอนที่สำคัญคือ

ก. activate D-norgestrel ด้วย tri-n-butylamine และ isobutylchloroformate

ข. ติดสลาก histamine ด้วย ^{125}I โดยวิธี chloramine T

ค. เชื่อม iodohistamine กับ Activated steroid เข้าด้วยกัน

ง. สะกัดสารที่ได้โดยใช้ ethyl acetate

จ. ทำให้สารที่ได้บริสุทธิ์โดย Thin-layer Chromatography

ขั้นตอนของปฏิกริยาแสดงไว้ในรูปที่ 3

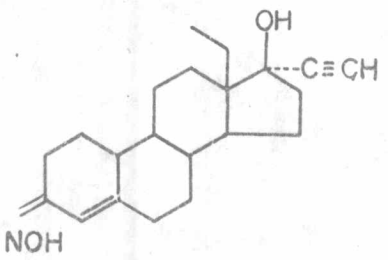
2.6.1 การเตรียมสารละลาย

สารละลาย	วิธีเตรียม
D-norgestrel-3-oxime(1.675 µM)	ละลาย 522.6 µg ของ D-norgestrel -3-oxime ใน dioxane 50 µl

สารละลาย	วิธีเตรียม
Tri-n-butylamine : dioxane (1 : 5 โดยปริมาตร)	ผสม tri-n-butylamine 5 µl กับ dioxane 20 µl
Isobutylchloroformate : dioxane (1 : 10 โดยปริมาตร)	ผสม isobutylchloroformate 5 µl กับ dioxane 45 µl
Histamine (2.22 µg)	ละลาย histamine 2.22 µg ใน .5 M phosphate buffer pH 8.0 10 µl ในหลอดที่จะใช้สำหรับดูดสาร
Chloramine-T (50 µg)*	ละลาย chloramine-T 5 mg ในน้ำกลั่น 1 cm^3
Sodium metabisulphite (300 µg)	ละลาย sodium metabisulphite 30 mg ในน้ำกลั่น 1 cm^3
0.5 M phosphate buffer pH 7.0	ละลาย disodium hydrogen phosphate (anhydrous) 3.672 g และ sodium dihydrogen phosphate (anhydrous) 2.755 g ในน้ำ 100 cm^3
0.5 M phosphate buffer pH 8.0	ละลาย disodium hydrogen phosphate (anhydrous) 0.816 g และ sodium dihydrogen phosphate (anhydrous) 6.134 g ในน้ำ 100 cm^3

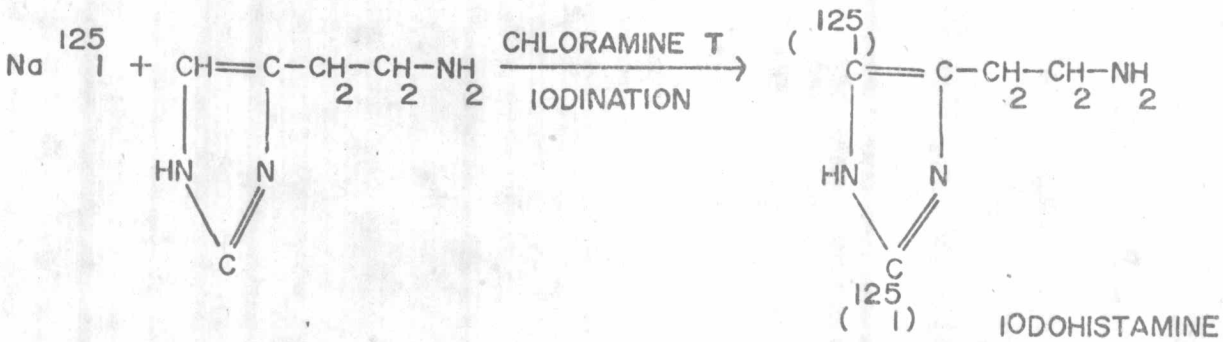
* = เตรียมทันทีก่อนใช้

รูปที่ 3 ขั้นตอนการติดสลาก D-Norgestrel



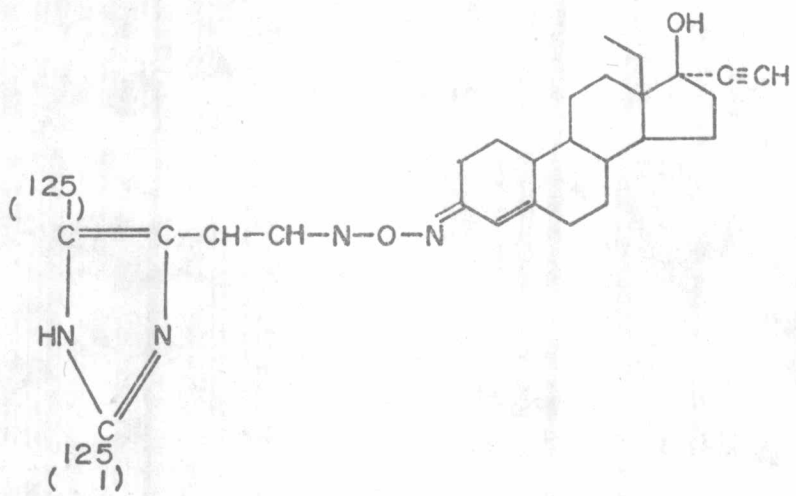
ACTIVATED D-NORGESTREL-3-OXIME

+



IODOHISTAMINE

COUPLING



D-NORGESTREL-3-OXIME-IODOHISTAMINE

2.6.2 รายละเอียดวิธีทำ

ก. การ activate steroid

ผสมสารละลายของ D-norgestrel-3-oxime, tri-n-butylamine และ isobutylchloroformate จากข้อ 2.6.1 เข้าด้วยกัน นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง อุณหภูมิ 10°c เป็นเวลา 30 นาที

ข. การติดสลาก histamine ด้วย Na (^{125}I)

เตรียมหลอดที่บรรจุ histamine จากข้อ 2.6.1

ดูด Na (^{125}I)1 m Ci ลงในหลอด

เติม Chloramine T 50 µg เขย่าเป็นเวลา 1 นาที

เติม Sodium metabisulphite 300 µg

ค. การเชื่อม iodohistamine กับ activated steroid

นำของผสมจากข้อ 2.6.2 (ก) มาเติม dioxane 0.75 cm^3 ดูดมา 50µl ใส่ลงไปในของผสมจากหัวข้อ 2.6.2 (ข) และเติม sodium hydroxide 0.1 M ลงไป 10 µl นำของผสมทั้งหมดไปแช่ในน้ำแข็งที่มีอุณหภูมิ 0°c เป็นเวลาประมาณ 2 ชม.

ง. การสะกัดสาร

หลักการ คือ นำสารที่ติดสลากได้มาล้างด้วยกรดเกลือ แล้วทำลายกรดเกลือด้วย sodium hydroxide ต่อจากนั้นจึงสะกัดสารที่ต้องการโดยใช้ ethyl acetate และดูดน้ำที่เหลือออกโดยใช้ anhydrous sodium sulphate แล้วจึงนำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์

วิธีการ คือ เติมกรดเกลือ 0.1 M 0.9 cm^3 ลงไปในของผสมที่ได้จากข้อ 2.6.2 (ค) แล้วเติม ethyl acetate ลงไป 1 cm^3 เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูดชั้น ethyl acetate เก็บไว้ ให้ชื่อว่า NG_1 ขั้นต่อมาเติม sodium hydroxide 0.1 M 0.9 cm^3 แล้วเติม 0.5 M phosphate buffer pH 7.0 1 cm^3 ต่อจากนั้นจึงสะกัดสารที่ต้องการ

000535

โดยเติม ethyl acetate ลงไป 0.5 cm^3 เขย่าให้เข้ากันประมาณ 15 วินาที แล้วดูด ethyl acetate ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ ให้ชื่อว่า NG_2 และดูดน้ำที่อาจจะปนอยู่โดยใช้ anhydrous sodium sulphate

จ. การทำให้ D-norgestrel-3-oxime-iodohistamine บริสุทธิ์

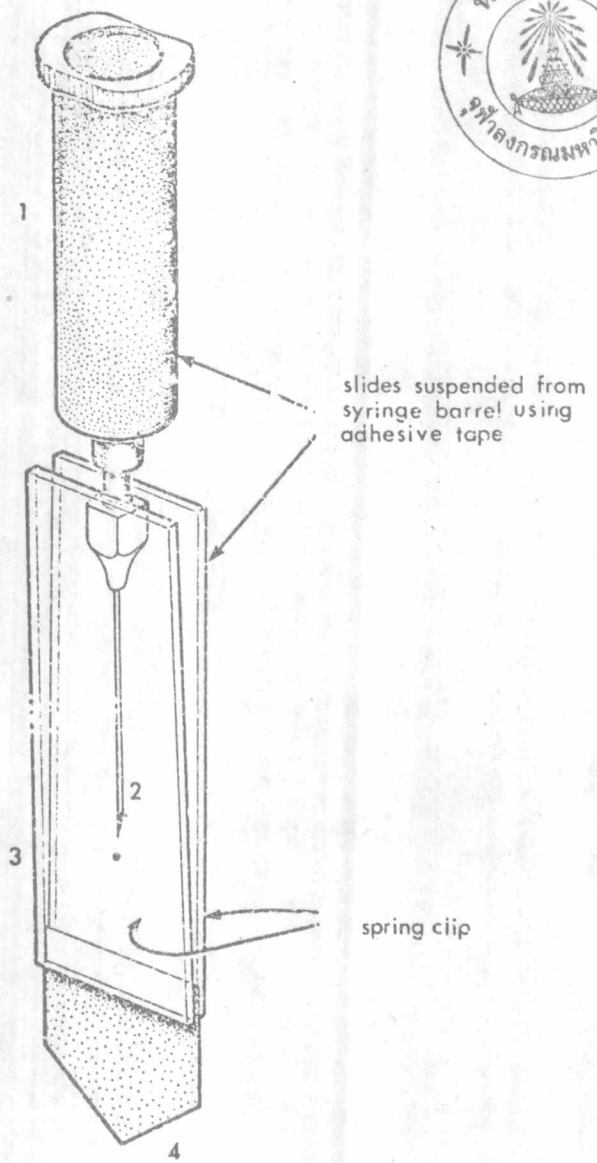
นำสารที่ได้จากข้อ 2.6.2 (ง) มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Thin-layer chromatography โดยใช้ alumina pre-coated sheet และใช้ตัวทำละลายคือ toluene : ethanol : acetic acid ในอัตราส่วน 75 : 20 : 5 โดยปริมาตร ต่อจากนั้นจึงนำแผ่น alumina มาวางทาบกับแผ่นฟิล์ม X-ray เป็นเวลาประมาณ 15 นาที เพื่อหาตำแหน่งของสารติดสลากที่ต้องการ แล้วจึงตัดแผ่น alumina บริเวณที่มีสารติดสลากอยู่มาชะสารที่ต้องการออกโดยใช้ ethanol 5 cm^3 โดยใช้เครื่องมือดังแสดงในรูปที่ 4

2.7 <u>การเตรียมสารละลายของ ^{3}H-D-norgestrel</u>

^{3}H-D-norgestrel มีไว้เพื่อใช้สำหรับติดตามการสูญเสียของปริมาณ D-norgestrel ในระหว่างการทดลอง และมีไว้เพื่อใช้สำหรับดูประสิทธิภาพของ Sephadex LH-20 column chromatography

^{3}H-D-norgestrel จากบริษัท Schering AG, Germany มี specific activity 56 Ci/mM ละลายอยู่ใน benzene : ethanol (9:1 โดยปริมาตร) นำมาเจือจางด้วย benzene : ethanol (9 : 1 โดยปริมาตร) ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10 $\mu Ci/cm^3$ ^{3}H-D-norgestrel ที่ใช้ได้จากการดูด ^{3}H-D-norgestrel ที่มีความเข้มข้น 10 $\mu Ci/cm^3$ มา 10 μl เป่าแห้งด้วยอากาศแล้วเติม assay buffer 5 cm^3 ผสมให้เข้ากัน สารละลายนี้จะมีปริมาณ D-norgestrel อยู่ประมาณ 4,000 dpm (disintegration per minute) หรือ 1.285 pg/0.1 cm^3 เก็บสารละลายนี้ไว้ที่ 4° C

รูปที่ 4 รูปแสดงเครื่องมือที่ใช้สำหรับ elute ^{125}I-D-norgestrel ออกจาก แผ่น alumina pre-coated sheet



หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

Key:

1. All glass syringe barrel (10ml)
2. Stainless steel hypodermic needle (21G x 1½in.)
3. Glass microscope slides (75 x 25 x 1mm).
4. Area of chromatogram bearing radioiodine labelled steroid.

2.8 <u>การศึกษาหา assay protocol ที่เหมาะสมในการวัดปริมาณ D-norgestrel ในสารตัวอย่าง</u>

ทำโดยผสมสารละลายต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

หลอดทดลอง	ปริมาณ D-norgestrel* มาตรฐาน (cm^3)	assay buffer (cm^3)	ปริมาณแอนติบอดี (cm^3)	ปริมาณ ^{125}I- D norgestrel (cm^3)	ปริมาณทั้งหมด (cm^3)
Blank	–	0.4	–	0.1	0.5
0	–	0.3	0.1	0.1	0.5
สารมาตรฐาน (6.25 – 400 pg/tube)	0.1	0.2	0.1	0.1	0.5

* ใช้สารละลายมาตรฐานของ D-norgestrel จากข้อ 2.8.1 (ง)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารต่าง ๆ ในหลอดทดลองสำหรับกราฟมาตรฐาน

ต่อจากนั้นจึงศึกษาถึงอิทธิพลของสิ่งต่อไปนี้เพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดลองต่อ ๆ ไป

ก. ปริมาณของแอนติบอดี

ข. ปริมาณของสารติดสลาก

ค. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการดูดซับสาร

ง. gelatin และ dextran T 70

จ. เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกริยา

2.8.1 การเตรียมสารละลาย

ก. สารละลาย buffer (0.01 M phosphate buffer pH 7.4)

ชั่ง disodium hydrogen orthophosphate (anhydrous) 0.456 g, sodium dihydrogen orthophosphate (anhydrous) 0.880 g, sodium azide 1 g และ sodium chloride 8.775 g นำสารทั้งหมดนี้ผสมเข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรครบ 1 l คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และปรับ pH ให้เป็น 7.4

ข. สารละลาย gelatin buffer (0.5% gelatinใน0.01 M phosphate buffer และ 0.15 M sodium chloride pH 7.4)

ชั่ง gelatin 0.5 g และ sodium chloride 0.877 gแล้วเติมลงใน phosphate buffer ของข้อ 2.8.1 (ก) 100 cm^3 นำไปอุ่นจนกระทั่ง gelatin ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C

ค. สารละลาย assay buffer (0.1% gelatin buffer และ 0.15 M sodium chloride pH 7.4)

ผสมสารละลายจากข้อ 2.8.1 (ก) 80 cm^3 กับสารละลายจากข้อ 2.8.1 (ข) 20 cm^3

ง. สารละลายมาตรฐาน D-norgestrel

เตรียม stock solution ที่มีความเข้มข้น 400 pg/0.1 cm^3 โดยชั่งสารมาตรฐาน 10 mg ละลายใน 10 cm^3 ของ ethanol แล้วทำให้เจือจางลงด้วย ethanol จนกระทั่งได้ความเข้มข้น 400 pg/0.1 cm^3 เมื่อต้องการใช้ จึงนำ stock solution นี้มาเจือจางแบบอนุกรมจนได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้นระหว่าง 400 – 6.25 pg/0.1 cm^3

จ. สารละลายผงถ่าน 0.25%

ชั่งผงถ่าน 0.25 g ละลายใน assay buffer 100 cm^3 ใช้ Magnetic stirrer คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียว เก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะใช้

2.9 การศึกษาอิทธิพลของน้ำนม, ซีรั่ม ตัวทำละลายอินทรีย์ และน้ำนมที่ผ่านขั้นตอน Chromatography ต่อกราฟมาตรฐานของ Radioimmunoassay ของ D-norgestrel

เนื่องจากสารตัวอย่างที่จะนำมาหาปริมาณ D-norgestrel มีทั้งน้ำนมและซีรัมและสารตัวอย่างทั้ง 2 นี้ มักจะมีสารซึ่งมีอิทธิพลต่อ radioimmunoassay ของสารต่าง ๆ ทั้งฮอร์โมนและสารอื่น ๆ โดยทั่วไปจำเป็นจะต้องสะกัดสารที่ต้องการหาปริมาณออกจากสารตัวอย่างนั้น ๆ ด้วยสารอินทรีย์อย่างใดอย่างหนึ่ง และอาจจำเป็นต้องทำให้สารที่สะกัดได้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยวิธี chromatography เสียก่อน รายละเอียดวิธีการศึกษาอิทธิพลของสารต่าง ๆ มีดังนี้ คือ

2.9.1 การทำให้ ether บริสุทธิ์

ในการทดลองจะใช้ ether เป็นตัวสะกัด แต่ ether ที่ซื้อมาเมื่อเก็บไว้ระยะหนึ่งจะเกิดสารเจือปน คือ peroxide จึงต้องทำให้บริสุทธิ์เสียก่อนโดยนำ ether มาเขย่ากับ 0.8 M $FeSO_4$ ใน 0.2 M H_2SO_4 ในอัตราส่วน 1 l ของ ether ต่อ 100 cm^3 ของ $FeSO_4$ ในกรด เขย่า 3 ครั้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 50 cm^3 2 ครั้งเพื่อล้าง $FeSO_4$ ในกรดออกจาก ether หลังจากนั้นจึงกำจัดน้ำที่หลงเหลืออยู่ใน ether ออกด้วย calcium chloride (anhydrous) แล้วจึงนำ ether ไปกลั่น เก็บส่วนที่ออกจากเครื่องกลั่นที่อุณหภูมิ 34.6°C

2.9.2 การเตรียม Sephadex LH-20 column เพื่อใช้ในการทำให้สารที่สะกัดได้บริสุทธิ์

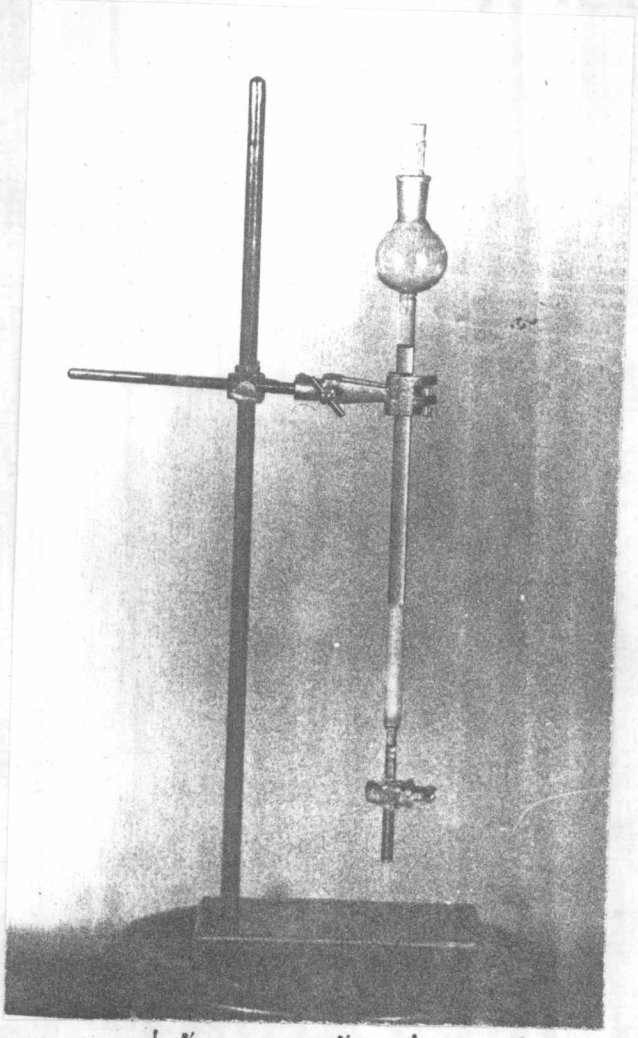
ในการทดลองได้ใช้ Sephadex LH-20 column ที่มี eluent 2 แบบเปรียบเทียบกัน

ก. Sephadex LH-20 ในสารละลาย benzene : methanol ในอัตราส่วน 85 : 15 โดยปริมาตร (Cameraon และคณะ 1972)

แช่ Sephadex LH-20 3g ไว้ใน 200 cm^3 ของ benzene: methanol 85 : 15 โดยปริมาตร ค้างคืน แล้วนำมาบรรจุลงใน column (ดังรูปที่ 5)

ข. Sephadex LH-20 ในสารละลาย isooctane : benzene : methanol ในอัตราส่วน 70 : 20 : 10 โดยปริมาตร (Thomas และคณะ 1976)

แช่ Sephadex LH-20 3 g ไว้ใน 200 cm^3 ของ isooctane : benzene : methanol 70:20:10 โดยปริมาตร ค้างคืน ส่วนขั้นอื่น ๆ ทำเหมือนข้อ 2.9.2 (ก)



รูปที่ 5 Column ที่ใช้ในการทำให้สารที่สะกัดได้บริสุทธิ์

2.9.3 การหาตำแหน่ง D-norgestrel ที่ออกจาก column

วิธีทำ นำ ^{3}H-D-norgestrel จากข้อ 2.7 หน้า 17 ประมาณ 5,000 cpm มาเป่าให้แห้งด้วยอากาศและละลายด้วย 1 cm^3 ของ benzene:methanol หรือ isooctane:benzene:methanol แล้วแต่การทดลอง นำสารละลายนี้มาหยอดลงใน column เริ่มทำการเก็บสารที่ออกจาก column หยดแรกลงไปใน scintillation vial ขวดละ 1 cm^3 เติม scintillator ที่เตรียมในข้อ 2.9.5 ลงไปขวดละ 10 cm^3 แล้วนำขวดเหล่านี้ไปนับปริมาณรังสีด้วยเครื่อง Tri-carb liquid scintillation เพื่อหาตำแหน่งของ ^{3}H-D-norgestrel ที่ออกมาจาก column

2.9.4 Reproducibility ของ Sephadex LH-20 column chromatography

เป็นการศึกษาถึงอายุการใช้งานของ column ที่มี Sephadex LH-20 ในสารละลายอินทรีย์ โดยนำ column ที่เตรียมได้ในข้อ 2.9.2 (ก) และ 2.9.2 (ข) หน้า 21 มาทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.9.3 แต่ละ column ทดลอง 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 3 วัน โดยใช้ ^{3}H-D-norgestrel ที่มีปริมาณต่าง ๆ กัน 3 ระดับ

2.9.5 การเตรียม scintillator

ใช้ถังขนาด 5 gallon บรรจุ toluene 4 gallon เติม liquifluor 640 cm^3 และ dioxane 3:1 ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

2.9.6 รายละเอียดการศึกษาอิทธิพลของสารต่าง ๆ ต่อกราฟมาตรฐาน

การศึกษาอิทธิพลของสารต่าง ๆ นี้ มีหลักการคือ เตรียมสารที่คาดว่าอาจจะมีอิทธิพลต่อกราฟมาตรฐานโดยผ่านขั้นตอนต่าง ๆ กัน ดังรายละเอียดที่แสดงไว้ในข้อ 2.9.6 (ก)→ 2.9.6 (ฉ) แล้วนำมาระเหยให้แห้ง และเติม assay buffer ลงไป 1 cm^3 เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ก่อนนำไปใช้ดังรายละเอียดในตารางที่ 2

หลอดทดลอง	D-norgestrel มาตรฐาน (cm^3)	สารที่คิดว่าจะมีอิทธิพลต่อกราฟมาตรฐานละลายใน assay buffer + (cm^3)	assay buffer บริสุทธิ์ (cm^3)	แอนติบอดี 1:32,000 (cm^3)	^{125}I-D-norgestrel (10,000cpm/0.1cm^3) (cm^3)	ปริมาตรทั้งหมด (cm^3)
Blank	–	0.2	0.2	–	0.1	0.5
0	–	0.2	0.1	0.1	0.1	0.5
6.25 – 400 pg/tube	0.1	0.2	–	0.1	0.1	0.5

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารต่าง ๆ ในหลอดทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของสารต่าง ๆ ต่อกราฟมาตรฐาน

+ ใช้สารที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2.9.6 (ก) ⟶ 2.9.6 (ฉ)

วิธีเตรียมสารที่ใช้ทดสอบอิทธิพลที่มีต่อกราฟมาตรฐานมีดังนี้ คือ

ก) ใช้ ether 10 cm^3 ระเหยให้แห้งและเติม assay buffer 1 cm^3

ข) ใช้น้ำนม 1cm^3 สะกัดด้วย ether 10 cm^3 โดยวิธีดังนี้

น้ำนม 1 cm^3

↓

สะกัดด้วย ether 10 cm^3

↓

แช่ในตู้แช่อุณหภูมิ – 40°C เป็นเวลา 30 นาที

↓

แยกชั้นของ ether ออกจากชั้นของน้ำนม

↓

นำชั้นของ ether ไปเป่าให้แห้ง

↓

เติม assay buffer 1 cm^3

ค) นำ ether มา 10 cm^3 เป่าให้แห้งแล้วละลายด้วย benzene : methanol 85:15 โดยปริมาตร 1 cm^3 เขย่า แล้วนำไปผ่าน column ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.9.2 (ก) หน้า 21 โดยทิ้งส่วนที่ผ่านจาก column ไป 8 cm^3 แรกและเก็บส่วนต่อมารวม 4 cm^3 นำไปเป่าให้แห้ง แล้วจึงเติม assay buffer 1 cm^3

ง) นำน้ำนมมาสะกัดเช่นเดียวกับวิธีในข้อ ข. นำส่วนที่สะกัดได้มาเป่าให้แห้ง แล้วนำไปละลายและผ่าน column เช่นเดียวกับข้อ ค.

จ) นำน้ำนมมา saponify ด้วย 10% KOH โดยใช้น้ำนม 1 cm^3 ผสมกับ 20% KOH 1 cm^3 นำไปตั้งบนหม้อน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นจึงนำมาสะกัดและผ่าน column เช่นเดียวกับข้อ ง.

ฉ) นำน้ำนมมาส กัดเช่นเดียวกับข้อ ง. แต่ใช้ column ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 2.9.2(ข) และจากเหตุผลเดียวกันกับในข้อ 2.9.6 (ก) จึงทิ้งส่วนที่ผ่านออกจาก column ไป 16 cm^3 แรก และเก็บส่วนต่อมารวม 10 cm^3 นำมาเป่าแห้งและละลายใน assay buffer 1 cm^3

ต่อจากนั้นนำสารที่ละลายใน assay buffer 1 cm^3 ที่เตรียมได้ในข้อ 2.9.6 (ก)—— 2.9.6 (ฉ) มา 2 ส่วนๆละ 0.2 cm^3 นำไปใช้ทำกราฟมาตรฐานตามวิธีในตารางที่ 2 หน้า 23 โดยทำเป็น duplicate

2.9.7 การหาปริมาณ D-norgestrel ในน้ำนมและซีรั่ม

ก. การเตรียมน้ำนมที่จะใช้หาปริมาณ D-norgestrel

น้ำนม 1 cm^3 + ^3H-D-norgestrel ($\simeq$ 2,000 cpm)

↓

ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที

↓

สะกัดด้วย ether 10 cm^3

↓

แช่ในตู้แช่อุณหภูมิ – 40° C เป็นเวลา 30 นาที

↓

แยกชั้นของ ether ออกจากชั้นของน้ำนม

↓

นำชั้นของ ether ไปเป่าแห้ง

↓

เติม isooctane:benzene:methanol 70:20:10 โดยปริมาตร 1 cm^3

↓

ผ่าน Column Sephadex LH-20

↓

eluent ที่ได้นำไปเป่าให้แห้ง

↓

เติม assay buffer 1 cm^3

↓

0.2 cm^3 สำหรับดู recovery โดยเติม scintillator 10 cm^3 วัดปริมาณรังสีด้วย Tri-carb. liquid scintillation

0.2 X 2 cm^3 สำหรับ duplicate assay ตามตารางที่ 2 หน้า 23

ข. การเตรียมซีรัมที่จะใช้หาปริมาณ D-norgestrel

ซีรัม 1 cm^3 + ^{3}H-D-norgestrel ($\simeq$ 2,000 cpm)

ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที

↓

สะกัดด้วย ether 10 cm^3

↓

แช่ในตู้แช่อุณหภูมิ – 40° C เป็นเวลา 30 นาที

↓

แยกชั้นของ ether ออกจากชั้นของซีรัม

↓

นำชั้นของ ether ไปเป่าให้แห้ง

↓

เติม assay buffer 1 cm^3

↓

0.2 cm^3 สำหรับดู recovery โดยเติม scintillator 10 cm^3 วัดปริมาณรังสีด้วย Tri-carb liquid scintillation

0.2 X 2 cm^3 สำหรับ duplicate assay ตามตารางที่ 2 หน้า 23

ก. Radioimmunoassay protocol

สารตัวอย่างที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วหรือ standard ใน assay buffer 200 µl

(0.01 M Phosphate buffer pH 7.4)

Assay buffer (0.01 M Phosphate buffer pH 7.4) 100 µl

^{125}I -D-norgestrel (10,000cpm) 100 µl

แอนติบอดี (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 : 160,000) 100 µl

incubate ที่ 4° C 18 – 24 ชม.

0.25% charcoal ใน assay buffer 1000 µl

Centrifuge ด้วยอัตราเร็ว 2,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

แยกส่วนใสและ charcoal ออกจากกันแล้วนำทั้งสองส่วนไปวัดปริมาณรังสีด้วย

เครื่อง gamma sample counter แล้วคำนวณหา %bound และ plot ค่า %bound

กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 6

2.10 การคำนวณหา Percentage recovery

สมมุติให้ ^{3}H-D-norgestrel ที่เติมลงในสารตัวอย่างก่อนสะกัดด้วย ether = a cpm

หลังจากสะกัดแล้วผ่าน column เติม assay buffer 1 cm^3

แบ่ง assay buffer เหลานั้นมา 0.2 cm^3 นำไปวัดรังสีได้ = b cpm

∴ ปริมาณสารที่สะกัดได้คิดเป็นร้อยละ = $\frac{b}{a} \times 100$

= c

ส่วนอีก 0.2 x 2 cm^3 นำไปวัดปริมาณ D-norgestrelตามวิธีในข้อ

2.9.7 (ค)

สมมุติอ่านปริมาณได้จากกราฟมาตรฐาน = d pg

ปริมาณสารที่สกัดได้ c มีปริมาณ D -norgestrel = d pg

" 100 " = $\frac{d}{c}$ x 100 pg

= X pg

ถ้าใช้สารตัวอย่าง 1 cm^3

ในสารตัวอย่างจะมีความเข้มข้นของ D -norgestrel = X pg/cm^3

2.11 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการวัดปริมาณ

2.11.1 ความจำเพาะ (specificity) ของแอนตีบอดี

ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 2.8 ตารางที่ 1 หน้า 18 แต่ใช้ steroid มาตรฐานชนิดที่ต้องการทดสอบ cross reaction แทน D -norgestrelมาตรฐาน และคำนวณ %cross reaction โดยวิธีที่แสดงในรูปที่ 7

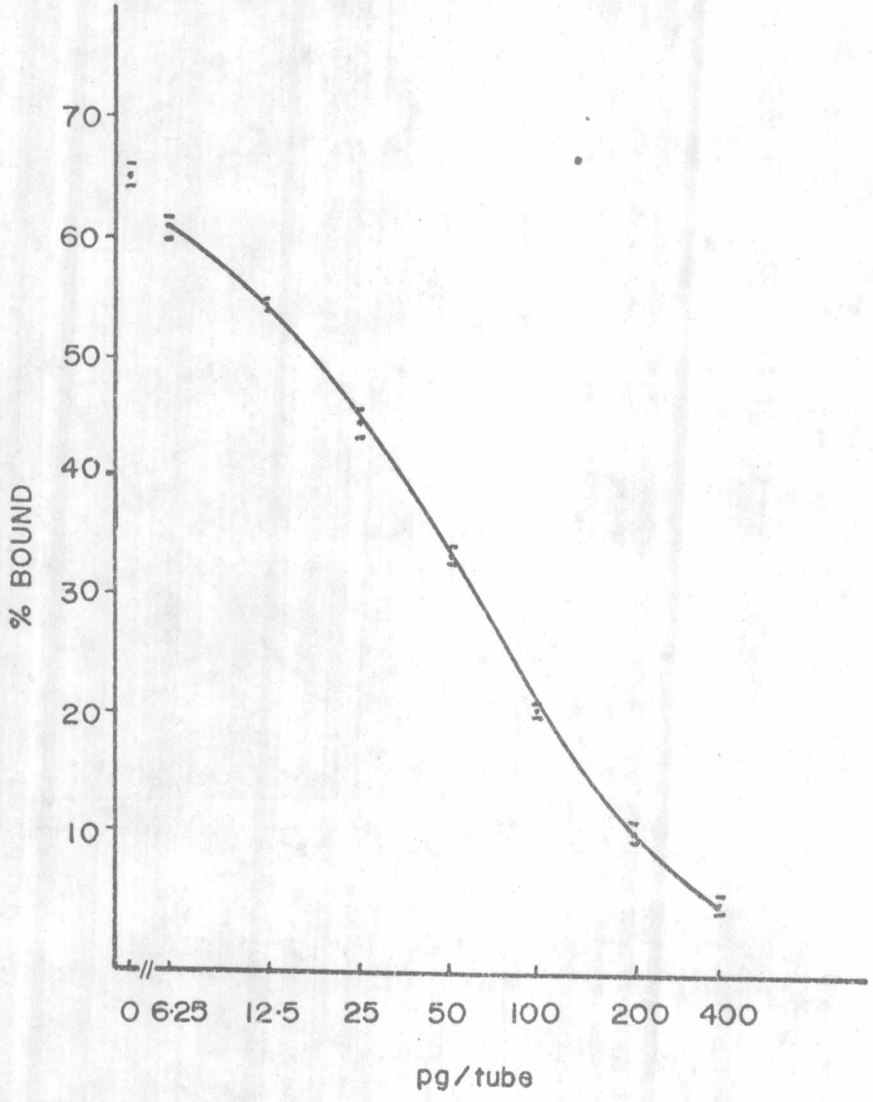
X = ปริมาณของ D -norgestrel มาตรฐานที่สามารถแย่งจับกับแอนตีบอดีแล้วให้ %Bound เท่ากับ 50% ของเส้นกราฟของD -norgestrel มาตรฐาน

Y = ปริมาณของ steroid มาตรฐานที่สามารถแย่งจับกับแอนตีบอดีแล้วให้ %Bound เท่ากับ 50% ของเส้นกราฟของ D -norgestrel มาตรฐาน

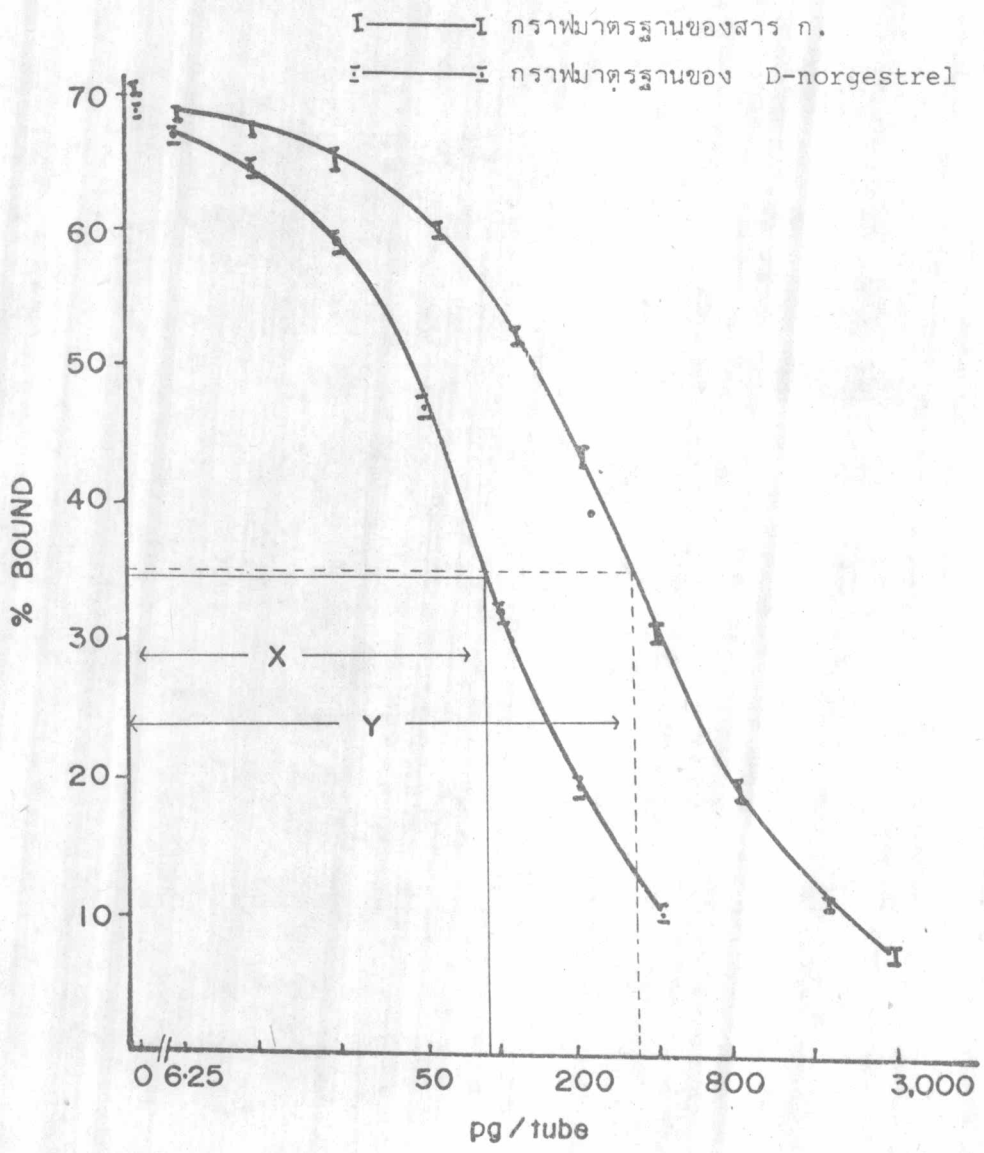
2.11.2 ความไว (sensitivity) ของวิธีการวัดปริมาณ

ความไวในการวัดของกราฟมาตรฐาน หมายถึงการหาค่าความเปี่ยงเบน-มาตรฐานที่จุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน แล้วหาค่า 95% confidence limit ที่จุดนี้ว่ามีความเข้มข้นเท่าไร ความเข้มข้นที่ได้นี้จะเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (Abraham 1974) ความไวในการวัดแบบนี้ จึงขึ้นกับความแม่นยำในการวัด แต่ Ekins (1970) ได้เสนอว่า ความไวในการวัดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารรังสีและแอนตีบอดีซึ่งต้องมีสัดส่วนพอเหมาะกับสารที่ต้องการวัดปริมาณ Specific activity ของสารติดสลากรังสี และค่า K ของปฏิกิริยาระหว่างแอนตีบอดีกับแอนตีเจน และยังได้เสนอสูตรการคำนวณความไวในการวัดไว้ด้วย (Albano และ Ekins1970) ในรายงานนี้ ได้หาความไวตามวิธีของ Abraham (1974) และได้ความไวในการวัดเท่ากับ 5 pg/cm^3

รูปที่ 6 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ D-norgestrel



รูปที่ 7 ความจำเพาะของ D-norgestrel antiserum



%cross reaction ของสาร ก. = $\frac{X}{Y}$ x 100

2.11.3 ความแม่นยำ (Precision) ของวิธีทดลอง

การศึกษาความแม่นยำในการวัดทำได้ 2 วิธี คือ

ก. ดูความแตกต่างของปริมาณ D-norgestrel ในสารตัวอย่างเปรียบเทียบ (control sample) เมื่อทำการทดลองพร้อม ๆ กันหลาย ๆ ตัวอย่าง (within assay)

ข. ดูความแตกต่างของปริมาณ D-norgestrel ในสารตัวอย่างเปรียบเทียบเมื่อทำการทดลองต่างเวลากัน และแต่ละครั้งทำหลาย ๆ ตัวอย่าง (between assay)

2.11.4 ความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีทดลอง

ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.9.7 ก. และ 2.9.7 ข. แต่ใช้น้ำนมที่ได้จากสตรีปกติ 1 cm^3 และ charcoal serum 1 cm^3 แทนน้ำผสมตัวอย่างและซีรัมตัวอย่างและเติมสารมาตรฐานลงในหลอดแต่ละหลอด โดยเติมปริมาณ 3 ระดับ คือ 100, 400 และ 700 pg ต่อหลอดทดลอง ต่อจากนั้นนำไปหาปริมาณตามวิธีในข้อ 2.9.7 ก. และคำนวณหา percentage recovery ตามวิธีในข้อ 2.10 ก็จะทราบค่าที่วัดได้จากการทดลองแล้วนำมาคำนวณหาค่าความถูกต้องได้

วิธีคำนวณ

สมมุติเติม D-norgestrel มาตรฐาน 400 pg ลงในแต่ละหลอดทดลองที่มีน้ำนมหรือ charcoal serum 1 cm^3 เมื่อวัดปริมาณ D-norgestrel ตามวิธีในข้อ 2.9.7 ก. หรือ 2.9.7 ข. และอ่านค่าของ D-norgestrel จากกราฟมาตรฐาน และแก้ percentage recovery ให้ถูกต้องแล้ว

ได้ความเข้มข้นของ D-norgestrel = X pg/cm^3

∴ ความเข้มข้นของ D-norgestrel 400 pg วัดได้ = X pg

" 100 pg " = $\frac{X}{400}$ x 100 pg

∴ ความถูกต้องของวิธีทดลอง = 0.25X เปอร์เซนต์