# บทที่ 2

# อุปกรณ์ และ วิธีทำการวิจัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

## อุปกรณ์

### เคมีภัณฑ์

- Zeolite powder (Sigma) Lot. 45C - 0439
- Calcium hydroxide (May & Baker) Lot. 43737
- Lloyd's reagent (BDH) Product No. 33053
- Copper sulfate (May & Baker) Lot. 35248
- Potassium hydroxide (J.T.Baker) Analytical reagent Lot. 44280
- Isopropanol (BDH) Analytical reagent : Product No. 29694
- Acetic acid 1.0 N (May & Baker) Analytical reagent
- Sodium metaperiodate (E. Merck) Lot. 7435364
- 2, 4 - pentanedione (BDH) Product No. 27035
- Ammonium acetate (May & Baker) Lot. 34448
- Triolein Standard Solution (Sigma) Lot. 740 - 0098(Igm.)
- Ethyl acetate (Riedel) Analytical reagent
- Ethanol (E. Merck) Analytical reagent
- Sulphoric acid (concentration) (BDH) Analytical reagent
- Ferric chloride (Riedel) Lot. 5E 30273
- Serachol (serum) calibration reference) (Warner -

Lambert) Lot.0706084

Cholesterol Content: Total 461 mg./dl

Free 84 mg./dl

Ester 377 mg./dl

## เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- Spectronic 20 (Bausch & Lob)
- Centrifuge
- Water - Bath ที่อุณหภูมิ 50°C และ 60°C - 70°C
- Erlenmeyer flasks
- Screw cap test tubes
- Volumetric Flask
- pH meter

## วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

### วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้สำหรับตรวจหาค่าระดับ Serum Triglyceride

- Zeolite Mixture

นำเอา Zeolite powder มาบดให้ละเอียดโดยใช้ Waring blender ประมาณ 2 นาที และนำไปอบค้างคืนไว้ในตู้อบที่ 110°C ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำเอา Zeolite powder ที่อบแล้ว 50 กรัม ผสมกับ Calcium hydroxide 5 กรัม Lloyd's reagent (Hydrated Aluminium Silicate) 5 กรัม และ Copper Sulfate 2.5 กรัม ชั่งสารแต่ละอย่างใส่ Beaker แยกแต่ละชนิด แล้วนำมาผสมใส่ขวดสีชา โดยเติม Zeolite power ลงไปครึ่งหนึ่งก่อน แล้วจึงเท Calcium hydroxide, Lloyd's reagent และ Copper Sulfate เสร็จจึงใส่ Zeolite powder ที่เหลือลงไปให้หมด ปิดขวดเขย่าให้เข้ากัน

- Potassium Hydroxide 5%

เตรียม 5% Potassium hydroxide ใน Isopropanol- water

(40 :60 V/V) แช่เก็บไว้ในตู้เย็น โดยชั่ง Potassium hydroxide 5 กรัมแล้วใส่ลงใน Beaker ซึ่งมีน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร และ Isopropanol 40 มิลลิลิตรผสมอยู่เขย่าให้ละลาย แล้วเก็บในขวดสีชา

- Acetic acid 1.0 N.

ชั่ง Acetic acid 12.01 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล 60.05) ละลายในน้ำกลั่น จำนวน 200 มิลลิลิตร

- Sodium metaperiodate 0.025 M. in 1.0 N. Acetic acid;Stock Solution

ชั่ง Sodium metaperiodate 1.069 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล 213.89) และเติม Acetic acid 1.0 N. ใส่ลงใน Beaker 50 มิลลิลิตร ค่อย ๆ ละลาย Sodium metaperoidate ทิ้งไว้สักครู่พอละลายหมดจึงเติม Acetic acid ให้ครบปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา แช่ตู้เย็น

- Working Sodium metaperiodate

ผสม Stock Solution ของ Sodium metaperiodate 3 มิลลิลิตร และ Isopropanol 5 มิลลิลิตรใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตรแล้วค่อย ๆ เติม Acetic Acid 1.0 N. ลงไปจนครบปริมาณ 25 มิลลิลิตร น้ำยานี้ต้องเตรียมสำหรับใช้เพียงวันเดียวเท่านั้น

- Acetyl - acetone reagent

เตรียมได้จาก 2,4 – pentanedione 0.75 มิลลิลิตร Isopropanol 2.5 มิลลิลิตร ผสมใน 2 M. Ammonium Acetate 100 มิลลิลิตร pH 6.0 ใส่ขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

- เตรียม Ammonium Acetate 2 M.pH 6.0

ชั่ง Ammoniunm Acetate 30.84 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล 77.1) และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายแล้วนำไปวัด pH ปรับ pH ให้ได้ pH เท่ากับ 6.0 เก็บใส่ไว้ในขวดสีชาในตู้เย็น

- Triolein standard solution

ใช้ Triolein standard solution ขวดละ 1 กรัม ละลายใน Isopropanol 200 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้เป็น Triolein standard 300 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิเมตร สำหรับเป็น standard ในการหาค่า serum triglyceride โดยแบ่งสารละลายจำนวน 60 มิลลิลิตร เติมลงใน Isopropanol จำนวน 40 มิลลิลิตรก็จะได้ Triolein standard solution 300 มิลลิกรัมใน Isopropanol 100มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้สำหรับตรวจหาค่าระดับ Serum choles - terol.

- Extract Reagent

ผสม Ethyl Acetate ($CH_3 COOC_2 H_5$) กับ Ethanol ($C_2 H_5 OH$) จำนวนเท่า ๆ กัน โดยใช้ Ethyl Acetate ที่ไม่มี Acetic acid เจือปน และใช้ Ethanol absolute 100% หรือใกล้เคียง 100 % เก็บไว้ในขวดสีชา

- $H_2SO_4$ Concentration

ใช้กรดกำมะถันเข้มข้นในการทดลองนี้

- Color reagent

ละลาย Ferric chloride ($Fe_3 Cl_4.6H_2O$) 250 มิลลิกรัม ใน Ethyl acetate 250 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

- Calibration Referrence Serachol serum calibration Reference

เตรียมโดยการนำ Serachol ทั้งขวดมาอุ่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 50° C นานประมาณ 10 นาที แล้วจึงนำขึ้นมาเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ จนละลาย เก็บไว้ในตู้เย็น

วิธีทำการวิจัย

แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ทำการทดลองเป็นผู้หญิงวัยเจริญพันธุ์ที่มารับบริการ ณ หน่วยวางแผนครอบครัวโรงพยาบาลประจำอำเภอหนองบัวลำภู จังหวัดอุดรธานี โดยแบ่งกลุ่มผู้หญิงที่ทำการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นผู้หญิงที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงดี ไม่เคยได้รับยาคุมกำเนิดทั้งชนิดยาเม็ดคุมกำเนิด และยาฉีดคุมกำเนิดมาก่อนเลย เป็นกลุ่ม Control จำนวนทั้งหมด 10 คน มีอายุระหว่าง 18 – 40 ปี ผู้หญิงทั้งหมดในกลุ่มนี้มีภาวะเศรษฐกิจที่ใกล้เคียงกัน ทำการวัดส่วนสูง และชั่งน้ำหนักตลอดจนวัดความดันโลหิต ค่าเฉลี่ยของส่วนสูง คือ 153.8 เซนติเมตร (ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 144 – 164 เซนติเมตร) และน้ำหนัก 47.9 กิโลกรัม (ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 41 – 55 กิโลกรัม) ส่วนค่าเฉลี่ยของความดันโลหิตอยู่ระหว่าง 110/60 มิลลิเมตรปรอท – 130/90 มิลลิเมตรปรอท และจำนวนการตั้งครรภ์มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1 – 5 คน

กลุ่มที่ 2 เป็นผู้หญิงที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงดี ไม่เคยมีประวัติการเจ็บป่วยในอดีตเกี่ยวกับโรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคตับ โรคเกี่ยวกับหลอดโลหิต และโรคทางกรรมพันธุ์ต่าง ๆ ไม่เคยได้รับยาเม็ดคุมกำเนิดชนิดต่าง ๆ และยาฉีดคุมกำเนิดมาก่อน ส่วนใหญ่เป็นผู้หญิงที่อยู่ในระยะหลังคลอดมากกว่า 6 สัปดาห์ และไม่เคยได้รับยาจำพวกสเตอรอยด์อื่น ๆ มาอย่างน้อย 3 เดือน ก่อนที่จะทำการทดลองมารับบริการคุมกำเนิด ณ หน่วยวางแผนครอบครัว โรงพยาบาลประจำอำเภอ เป็นกลุ่ม Experimental จำนวนทั้งหมด 50 คน มีอายุระหว่าง 16 – 35 ปี แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม จำนวนกลุ่มละ 10 คน ได้รับยาคุมกำเนิดทั้งหมด 5 ชนิด กลุ่มละ 1 ชนิด ผู้หญิงทั้งหมดในกลุ่มนี้มีภาวะเศรษฐกิจที่ใกล้เคียงกันทำการวัดส่วนสูงและชั่งน้ำหนักตลอดจนวัดความดันโลหิต ค่าเฉลี่ยของส่วนสูง คือ 154.7 เซนติเมตร (ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 144 – 165 เซนติเมตร" และน้ำหนัก 48.4 กิโลกรัม (ค่าเฉลี่ย

I16493837

อยู่ระหว่าง 36 – 58.6 กิโลกรัม) ส่วนค่าเฉลี่ยของความดันโลหิตอยู่ระหว่าง 100/60 มิลลิเมตรปรอท – 130/90 มิลลิเมตรปรอท และจำนวนการตั้งครรภ์มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1 – 6 คน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

<u>วิธีการเตรียมกลุ่มตัวอย่างสำหรับทดลอง</u>

– ทำการเจาะโลหิตผู้หญิงกลุ่ม Control ที่บริเวณเส้นโลหิตดำภายหลังจากอดอาหาร จำนวน 5 มิลลิลิตร ทำให้โลหิตแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง และนำโลหิตมาปั่นด้วยเครื่องปั่น ( Centrifuge) ที่ 1,500 rpm. ประมาณ 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นซีรัม ( Serum) ออกมา

– ทำการเจาะเลือดผู้หญิงกลุ่ม Experimental ที่บริเวณเส้นโลหิตดำ ภายหลังจากอดอาหาร จำนวนประมาณ 5 มิลลิลิตร ทำให้โลหิตแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง และนำโลหิตมาปั่นด้วยเครื่องปั่น ( Centrifuge) ที่ 1,500 rpm. ประมาณ 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นซีรัมออกมา ทำการเจาะเลือดจำนวน 1 ครั้ง ทุก ๆ เดือนในผู้หญิงกลุ่มนี้ทั้งก่อนและหลังจากที่ได้รับยาคุมกำเนิดทั้งชนิดที่เป็นยาเม็ดคุมกำเนิดและยาฉีดคุมกำเนิดเป็นเวลาทั้งหมด 5 เดือนติดต่อกันไป แต่ในกลุ่ม Experimental ที่ใช้ยาฉีดคุมกำเนิดจะทำการฉีดทุก ๆ 3 เดือน โดยทำการเจาะโลหิตก่อน และหลังจากที่ทำการฉีดทุก ๆ ครั้ง

– นำเอาส่วนที่เป็นซีรัมทั้งหมดที่เก็บรวบรวมได้จากผู้หญิงทั้งในกลุ่ม Control และกลุ่ม Experimental มาทำการตรวจหาค่าของระดับ Serum triglyceride และ Serum cholesterol

<u>ยาคุมกำเนิดที่ใช้ในการทดลอง</u> ประกอบด้วยยาเม็ดคุมกำเนิดทั้งหมด 4 ชนิด และยาฉีดคุมกำเนิด 1 ชนิด คือ

– <u>ยาเม็ดคุมกำเนิด</u> ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่

Norinyl® - 1 - Fe (Schering) : Lot. 03598
ประกอบด้วย Mestranol 0.05 mg. & Norethrindrome 1 mg.
Eugynon (Scering) : Lot. 047412

ประกอบด้วย Ethinylestradiol 0.05 mg. & Norgestrel 0.5 mg.

Gynovlar (Scering) : Lot. 0177029

ประกอบด้วย Ethinylestradiol 0.05 mg. & Norethisterone Acetate 3 mg.

Anovlar (Scering) : Lot. 0177012

ประกอบด้วย Ethinylestradiol 0.05 mg. & Norethisterone Acetate 4 mg.

– ยาฉีดคุมกำเนิด ทั้งหมด 1 ชนิด ได้แก่

Depo - provera (Upjohn) : Lot. B224C

ประกอบด้วย Depo - medroxyprogesterone acetate (DMPA) 150 mg.

วิธีทำการทดลองตรวจหาคาระดับต่าง ๆ

วิธีตรวจหาคาระดับ Serum triglycerides

การหาค่า Serum triglycerides ทำได้โดยใช้เทคนิควิธีการของ Fletcher, M.J., et al. (150)

หลักการ Triglycerides จะถูกสกัดด้วย Isopropanol ส่วน Phospholipid จะถูกแยกออกโดยการดูดซับด้วย Zeolite แล้ว Triglycerides ที่เหลือในน้ำสกัด (Phospholipid - free - extract) จะถูก Saponified ต่อไปได้ Free glycerol แล้ว Glycerol จะถูก oxidized ต่อไปให้เป็น Fromal dehyde แล้ววัดปริมาณของ Formadehyde ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีปฏิกริยาของ Hantzsch (8)

วิธีทำ

1) ทำการหา Precision between assays คำนวณหาค่าเฉลี่ย Mean ± 2 S.D. ของค่า Control serum ซึ่งทำได้จากการนำซีรั่มของคนปกติจำนวนหลาย ๆ คน มาผสมรวมกัน แล้วกลองเทใส่ขวดเล็ก ๆ จำนวนทั้งหมด 30 ขวด แล้วนำแต่ละขวดมาหาค่า Serum triglyceride ครั้งละ 10 ขวดในแต่ละวัน และนำค่าที่หาได้ทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณหาค่า Control value ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$\text{Control value} = \frac{\text{Standard deviation}}{\text{Mean}} \times 100$$

ค่า Control value ที่ได้จะต้องมีค่าไม่เกิน 10%

2) นำเลือดที่ต้องการหาค่า Serum triglyceride ทั้งกลุ่ม Control ที่ไม่ได้รับยาคุมกำเนิดชนิดต่าง ๆ และกลุ่ม Experimental ที่ได้รับยาคุมกำเนิดชนิดต่าง ๆ มาปั่น โดยใช้เครื่องปั่น ( Centrifuge) ที่ 1,500 rpm. เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นซีรั่มออกมาหลังจากทำให้โลหิตแข็งตัว นำซีรั่มที่ได้จากทั้งกลุ่ม Control และกลุ่ม Experimental 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด และเติม Isopropanol 9.8 มิลลิลิตร ลงไปในทุกหลอด ปิดจุกให้แน่นเขย่าแรง ๆ นาน 1 นาที แล้วจึงเติม Zeolite mixture จำนวน 2 กรัมลงไปในแต่ละหลอด โดยคอย ๆ เทผ่านกรวย ปิดจุกให้แน่นเขย่าแรง ๆ นาน 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที

3) ใส่ Triolein Standard Solution จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ลงไปในหลอด "Standard$_1$" และเติม Isopropanol 8.8 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรลงไป ปิดจุกให้แน่นเขย่าแรง ๆ นาน 1 นาที แล้วจึงเติม Zeolite mixture จำนวน 2 กรัม ลงไป ปิดจุกให้แน่นเขย่าแรง ๆ นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที

4) นำซีรั่มจาก Control serum ที่ทำการหาค่า Precision between assay แล้วจำนวน 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด "Control$_1$" และเติม Isopropanol 9.8 มิลลิลิตรลงไป ปิดจุกให้แน่นเขย่าแรง ๆ นาน 1 นาที จึงเติม Zeolite mixture จำนวน 2 กรัมลงไป ปิดจุกให้แน่นเขย่าแรง ๆ นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที

5) นำหลอดทดลองทั้งหมด คือ หลอด "Standard$_1$", "Control$_1$" และตัวอย่างที่ต้องการหาค่า (กลุ่ม Control หรือกลุ่ม Experimental ไปปั่นโดยใช้เครื่องปั่น ( Centrifuge) ที่ 3,500 rpm. นาน 5 นาที แล้ว

ดูดส่วนที่ใส ( Supernatant) จากหลอดทั้งหมดจำนวน 2 มิลลิลิตรลงใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ คือ หลอด "Control$_2$" และหลอดตัวอย่างที่ต้องการหาค่า (กลุ่ม Control หรือกลุ่ม Experimental และจำนวน 0.8 มิลลิลิตร ลงในหลอด "Standard$_2$"

6) เติม Isopropanol ลงไปในหลอด "Standard$_2$" 1.2 มิลลิลิตร และเติมลงไปในหลอดอันใหม่อีกหลอดหนึ่ง เรียกว่า หลอด "Blank" จำนวน 2 มิลลิลิตร

7) เติม Potassium hydroxide 5% จำนวน 0.6 มิลลิลิตรลงไปทุกหลอด ปิดจุกให้แน่นและเขย่า นำไปวางใน Water - Bath ที่อุณหภูมิ 60° – 70°C นาน 15 นาที แล้วนำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องโดยแช่ในน้ำ

8) เติม Working sodium metraperiodate solution ที่เตรียมใหม่ ๆ โดยเขย่าก่อนใช้ จำนวน 1 มิลลิลิตรลงใส่ทุกหลอด ปิดจุกเขย่า แล้วเติม Acetyl - acetone จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงไปทุกหลอดปิดจุกเขย่า จึงนำหลอดทั้งหมดใส่ลงใน Water - Bath อีกครั้งหนึ่งที่อุณหภูมิ 50°C นาน 30 นาที แล้วนำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องโดยแช่ในน้ำ

9) นำไปวัดหาค่า Serum Triglyceride โดยใช้ Spectro - photometer ที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยให้หลอด "Blank" ตั้ง Absorbance เท่ากับ 0 และคำนวณหาความเข้มข้นของ Serum Trigly - ceride ออกมาเป็น mg. %

<u>วิธีคำนวณ</u>

คิดจาก Standard Solution มีความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรหรือมีค่าเท่ากับ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร

ในหลอด Standard มีสารละลายทั้งหมด 10 มิลลิลิตรจะมีไตรกลีเซอไรด์อยู่ 3 x 0.2 = 0.6 มิลลิกรัม

ถ้าในหลอด Standard เอามา 0.8 มิลลิลิตรมีไตรกลีเซอไรด์อยู่ $\frac{3 \times 0.2 \times 0.8}{10}$ = 0.048 มิลลิกรัม

เมื่อ Absorbance ของหลอด Standard ที่อ่านได้จะมีไตรกลีเซอไรด์ 0.048 มิลลิกรัม

ซึ่ง Absorbance ของหลอดที่ต้องการหาค่าที่อ่านได้ก็จะมีไตรกลีเซอไรด์ $\frac{OD_u}{OD_u}$ x 0.048 มิลลิกรัม

สารละลายที่ต้องการหาค่า 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีซีรั่มอยู่ 0.2 มิลลิลิตร

ถ้าสารละลายที่ต้องการหาค่ามีจำนวน 2 มิลลิลิตรจะมีซีรั่มอยู่

$\frac{0.2 \times 2}{10}$ = 0.04 มิลลิลิตร

Absorbance ของหลอดที่ต้องการหาค่ามาจากซีรั่มที่ใช้ทั้งหมด 0.04 มิลลิลิตร ดังนั้นซีรั่มจำนวน 0.04 มิลลิลิตรจะมีไตรกลีเซอไรด์อยู่ $\frac{OD_u}{OD_u}$ x 0.048 มิลลิกรัม

ถ้าซีรั่มทั้งหมด 100 มิลลิลิตรจะมีไตรกลีเซอไรด์อยู่ $\frac{OD_u}{OD_u} \times \frac{0.048}{0.04} \times 100$ มิลลิกรัม

$= \frac{OD_u}{OD_s} \times 120$ มิลลิกรัม

<u>สรุป</u> การคำนวณหาค่าไตรกลีเซอไรด์ หาได้จาก

$$\text{mg. \% Serum Triglyceride} = \frac{\text{Absorbance of Serum}}{\text{Absorbance of Standard}} \times 120$$

<u>วิธีตรวจหาค่าระดับ Serum Cholesterol</u>

การหาค่า Serum Total Cholesterol ทำได้โดยใช้เทคนิควิธีการของ Bebson, et. al. (151)

<u>หลักการ</u> โฆเลสเตอรอลถูกสกัดจากซีรั่ม ด้วย Ethanol - ethyl acetate แล้วนำส่วนที่สกัดได้ภายหลังจากที่นำไปปั่นแยกส่วนแล้วมาเติมด้วย

Ferric Chloride และ Sulfuric acid เกิดปฏิกริยาทำให้เกิดสี นำมาวัดปริมาณของสีที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Colorimetric Adaptation ส่วน Serachol serum calibration reference ทำแต่ละครั้งที่ทำการทดลองเพื่อใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเหมือนกับ Serum calibration reference สำหรับคำนวณหาค่าโฆเลสเตอรอล

วิธีทำ

1) ทำการหา Precision between assays คำนวณหาค่าเฉลี่ย Mean $\pm$ 2 S.D. ของค่า Control serum ซึ่งทำได้จากการนำซีรั่มของคนปกติจำนวนหลาย ๆ คน มาผสมรวมกันแล้วกรองเทใส่ขวดเล็ก ๆ จำนวนทั้งหมด 30 ขวด แล้วนำแต่ละขวดมาหาค่า Serum total cholesterol ครั้งละ 10 ขวดในแต่ละวัน และนำค่าที่หาได้ทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณหาค่า Control value ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$\text{Control value} = \frac{\text{Standard deviation}}{\text{Mean}} \times 100$$

ค่า Control value ที่ได้จะต้องมีค่าไม่เกิน 10%

2) นำเลือดที่ต้องการหาค่า Serum total cholesterol ทั้งกลุ่ม Control ที่ไม่ได้รับยาคุมกำเนิดชนิดต่าง ๆ และกลุ่ม Experimental ที่ได้รับยาคุมกำเนิดชนิดต่าง ๆ กันมาปั่นโดยใช้เครื่องปั่น (Centrifuge) ที่ 1,500 rpm. เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นซีรั่มออกมา

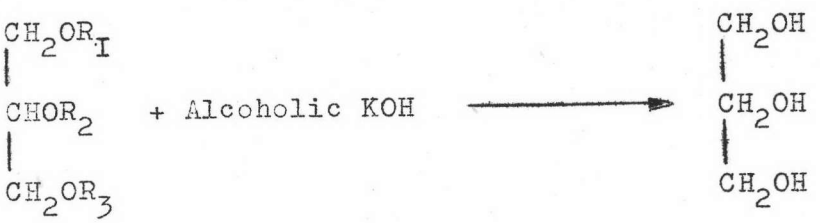
3) เติม Extraction Reagent (Ethanol : Ethyl Acetate) จำนวน 3 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอดทดลอง คือ หลอด "Blank", หลอด "Standard", หลอด "Control" และหลอดตัวอย่างที่ต้องการหาค่า (กลุ่ม Control หรือกลุ่ม Experimental)

4) ในหลอด "Blank" เติมน้ำกลั่นจำนวน 0.2 มิลลิลิตรลงไป ปิดจุกให้แน่น เขย่าแรง ๆ นาน 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 2 – 3 นาที

รูปที่ 8 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของการตรวจหา Serum Triglyceride โดยวิธี

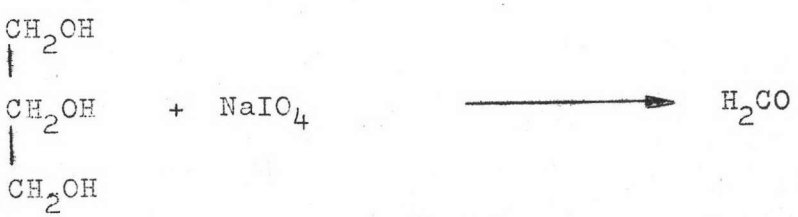
Hantzsch reaction of Serum Triglyceride (Color Reaction) (150)

(I) Saponification of the Triglycerides with Alcoholic KOH to from free glycerol




Triglycerides Glycerol

(2) Oxidation of glycerol to from Formaldehyde




Sodium metaperiodate Formaldehyde

(3) Formaldehyde + Acetyl acetone —Hantzsch reaction→ Color products

5) เติม Serachol (Standard Cholesterol) จำนวน 0.2 มิลลิลิตรลงไปในหลอด "Standard" ปิดจุกให้แน่น เขย่าแรง ๆ นาน 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 2 – 3 นาที

6) ดูด Serum Control (ที่ทำการหาค่า Precision between assays แล้ว) จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ลงไปในหลอด "Control" ปิดจุกให้แน่นเขย่าแรง ๆ นาน 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 2 – 3 นาที

7) ดูดซีรั่มของตัวอย่างที่ต้องการหาค่า (กลุ่ม Control หรือกลุ่ม Experimental จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดตัวอย่าง ปิดจุกให้แน่น เขย่าแรง ๆ นาน 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 2 – 3 นาที เช่นเดียวกัน

8) นำหลอดทดลองทั้งหมดมาปั่นด้วยเครื่องปั่น (Centrifuge) ที่ 3,500 rpm. นาน 2 – 3 นาที แล้วดูดเอาส่วนที่ใส (Supernatant) จากแต่ละหลอดที่ปั่นแล้วจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงใส่ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ที่เขียนหมายเลขให้ตรงกันกับหมายเลขของหลอดทดลองแต่ละหลอด

9) เติม Ferric Chloride reagent จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ลงไปทุกขวด เขย่าขวดแล้วจึงเติมกรดกำมะถันเข้มข้น จำนวน 2 มิลลิลิตรลงไปทุกขวด เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

10) เมื่อแต่ละขวดเย็นแล้ว จึงนำไปวัดโดยใช้ Spectophotro - meter ที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยให้หลอด "Blank" ตั้ง Absorbance เท่ากับ 0 และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ Serum Total Cholesterol ตัวอย่างที่ต้องการหาค่าออกมาเป็น mg. ของ Cholerterol / 100 ml. ของ Serum

$$\text{mg. Cholesterol / 100 ml. Serum} = \text{Cone. of Cholesterol Standard} \times \frac{\text{Absorbance of serum}}{\text{Absorbance of Standard}}$$

รูปที่ 9 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของการตรวจหา Serum Cholesterol โดยวิธี

Color Reaction of Cholesterol (151)