วิธีดำเนินการทดลอง

ได้ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Oakey และคณะ [1967] ซึ่งมีขั้นตอนการดังนี้ Free estrogens รวมทั้งสารประกอบอื่น ๆ ใน acid hydrolysed urine ถูกสกัดด้วยอีเธอร์ แล้วล้างด้วย sodium carbonate solution pH 10.5 เพื่อสกัดเอาสารที่ไม่ต้องการออก เหลือแต่เอสโตรเจนอยู่ในอีเธอร์ เอสโตรเจนที่เหลืออยู่นี้ถูกทำให้เกิดสีโดย modified Kober reaction วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นใน Spectrophotometer โดยเทียบกับ control แล้วคำนวณ วิธีดำเนินการทดลองเป็นลำดับมีดังนี้

ใช้ pipette ดูดปัสสาวะที่เตรียมไว้แล้วใส่ใน Kober tube 3 หลอด ๆ ละ 2 มล. [ถ้าหา percentage recovery ก่อนเติมกับกรด ต้องเติมสารละลายเอสตริออล (100 ไมโครกรัม ต่อ มล.) ปริมาตรเท่ากับ ลงไปทุกหลอด แล้วนำไประเหยไล่ esthanol ออกให้หมดก่อนเติมปัสสาวะ] เติม conc. HCl ลงทุก ๆ หลอด หลอดละ 0.3 มล. ปิดจุกแล้วใส่ในน้ำเดือด 1 ชั่วโมง ทำให้เย็น [ถ้าหา percentage recovery ภายหลังต้มกับกรด เติมสารละลายเอสตริออล (100 ไมโครกรัม ต่อ มล.) ปริมาณเท่ากันลงไปทุกหลอด หลังจาก acid hydrolysis แล้ว] เติมสารละลายเอสตริออล [100 ไมโครกรัม ต่อ มล.] ลงในหลอดที่ 3 เพียง 0.2 มล. สำหรับเป็น " Internal standard " เติมอีเธอร์หลอดละ 10 มล. ทุกหลอด ปิดจุกเขย่า 1 - 1 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดเอาชั้นล่างทิ้ง จากนั้นล้าง ๆ ด้วยน้ำใส่หลอดแล้วใหม่ ที่สะอาด เติม sodium carbonate solution pH 10.5 ลงไปทุกหลอด ๆ ละ 0.5 มล. เพื่อสกัด impurities ออก เขย่าเหมือนเดิม เติม Na_2SO_4 anhydrous ลงไปหลอดละ 1 - 2 กรัม เพื่อดูดน้ำ ปิดจุกแล้วเขย่า ดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 ใส่หลอดใหม่แยกกันหลอดละ 3 มล. ส่วนหลอดที่ 3 ดูดมาใส่ 2 หลอด ๆ ละ 3 มล. เติม 2 % quinol in ether ผสมลงไปในหลอดที่ 1,2,3,4,6 [เพื่อกันไม่ให้เอสโตรเจนถูก oxidise ในระหว่างระเหยไล่อีเธอร์ออก] หลอดที่ 6 ใช้เป็น "control" ส่วนหลอดที่ 5 ใส่ 0.05 มล. ของสารละลาย

เอสทริออล [100 ไมโครกรัม ต่อ มล.] ใช้เป็น external standard [ไว้สำหรับคำนวณหา percentage recovery] แล้วเติมอีเธอร์ลงไป ในหลอดที่ 5 เพียง 3 มล. จากนั้นเอาหลอดทั้ง 6 ไประเหยใจ อีเธอร์ในตู้ water bath ที่ 55 °C

เติม Kober reagent ลงไปทั้ง 6 หลอด ๆ ละ 2 มล. แล้วนำไปใส่ในน้ำเดือด 40 นาที ทำให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป หลอดละ 1.7 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ไม่ให้ถูกแสง 15 นาที สีที่เกิดขึ้นเป็นสีชมพูอมส้ม ความเข้มของสีจะขึ้นอยู่กับจำนวนของเอสโทรเจนที่มีอยู่ในนั้น อ่านค่า optical density [OD] ที่ช่วงคลื่น 472,514 และ 556 mμ ตามลำดับ โดยเทียบกับ "control" และนำค่าที่ได้ไปคำนวณต่อไป

วิธีดำเนินการหา absorption peak ของ estriol,estrone, estradiol และสารที่สกัดออกมาได้จากปัสสาวะสตรีมีครรภ์ปกติ สำหรับสารที่ได้จากปัสสาวะ แทนที่จะอ่านค่า OD เพียง 3 ช่วงคลื่น ก็อ่านค่า OD ตั้งแต่ 460 mμ ถึง 540 mμ ส่วน estriol, estrone และ estradiol ใช้ pipette ดูด สารละลายที่เตรียมไว้แล้ว ใส่อย่างละหลอด หลอดละ 10 ไมโครกรัม นำไประเหยไล่ ethanol ออกให้หมด แล้วเติม 2 % quinol in ether ลงทุกหลอด ๆ ละ 0.2 มล. นำไประเหยไล่อีเธอร์ออกให้หมด แล้วเติม Kober reagent ลงไปหลอดละ 2 มล. นำไปใส่น้ำเดือด 40 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 1.7 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาที นำไปอ่านค่า OD ที่ช่วงคลื่นตั้งแต่ 460 mμ จนถึง 540 mμ โดยเทียบกับ "control"