บทที่ 3

สัตว์ทดลอง อุปกรณ์ สารเคมี และการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

ใช้ลิงหางยาว (Macaca fascicularis) เพศเมียจากหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีอายุประมาณ 3-4 ปี และไม่เคยพบมีประจำเดือนครั้งแรกมาก่อนจำนวน 7 ตัว ประกอบด้วยลิงสีตัวปกติเกิดในหน่วยวิจัยไพรเมทที่มีบรรพบุรุษดั้งเดิมจากป่าชายเลนใกล้ดอนหอยหลอด จังหวัดสมุทรสงครามจำนวน 4 ตัว (625, 626, 627, 628) ลิงเหลืองที่ได้จากอุทยานโกสัมพี จังหวัดมหาสารคาม จำนวน 2 ตัว (YFM1, YFM2) และลิงจากเขาบู จังหวัดราชบุรี จำนวน 1 ตัว (NG 2) ลิงทุกตัวที่เริ่มศึกษามีน้ำหนักตัว อยู่ระหว่าง 2.2-3.5 กิโลกรัม โดยได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางเพศที่ปรากฏให้เห็นทุก ๆ วันนับตั้งแต่มีอายุประมาณ 3 ปี หากเริ่มมีอาการใดที่แสดงให้เห็นว่ามีลักษณะที่เริ่มเป็นสาวเกิดขึ้นจึงติดตามศึกษาโดยละเอียดต่อไประหว่างศึกษาจะชั่งน้ำหนักลิงทุกๆ 4 สัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลอง ลิงแต่ละตัวถูกเลี้ยงในกรงเดี่ยวทำด้วยเหล็กอาบสารกันสนิมขนาดกว้าง 24 นิ้ว สูง 34 นิ้ว และลึก 28 นิ้ว อยู่ภายในเรือนเลี้ยง ที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก มีสวิตช์ไฟปิดเปิดอัตโนมัติโดยจะเปิดในระหว่าง 6.00-18.00 น. อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารสำเร็จรูปจาก บริษัทเจริญโภคภัณฑ์ อาหารสัตว์ และเสริมด้วยกล้วย มันเทศ แตงกวา ข้าวโพด และถั่วฝักยาว ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 8.00-9.00 น.และ 14.00-15.00 น.

3.2 การตรวจการเปลี่ยนแปลงของ phenotypic sex และการมีประจำเดือน

ตรวจดูจากลักษณะของnipple perineum และบริเวณ vagina ทุกวันสังเกตมการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกที่เห็นชัด เช่น การบวมและ/หรือความเข้มของสี sex skin ที่จะปรากฏขึ้นในช่วงก่อนมี menarche ตลอดจนรอบประจำเดือนครั้งต่อ ๆ ไป การมีประจำเดือนครั้งแรก และรอบประจำเดือนของลิงในช่วงพิวเบอร์ตี้ที่ศึกษานั้น มีเลือดประจำเดือนออกมาไม่มากสามารถตรวจดูจากถาดรองเศษอาหารได้ แต่จะสังเกตได้จากเลือดที่ติดอยู่บริเวณด้านนอกช่องคลอด นับวันแรกที่พบเลือดประจำเดือนเป็นวันที่ 1 และวันก่อนที่จะพบประจำเดือนครั้งใหม่เป็นวันสุดท้ายของรอบประจำเดือน

ตารางที่ 1 แสดงประวัติโดยสังเขปของลิงหางยาวที่ศึกษา

หมายเลขลิง	วัน เดือน ปีเกิด	วัน เดือน ปีที่เริ่มศึกษา	อายุ (ปี)	น้ำหนักที่เริ่มศึกษา (กิโลกรัม)
625	13 กค 2529	27 ตค 2533	4 ปี 3 เดือน	2.2
626	11 พย 2529	10 พย 2533	4	3.5
627	11 มค 2531	23 พย 2533	2 ปี 10 เดือน	3.4
628	9 พย 2530	29 พย 2533	2 ปี 6 เดือน	3.0
YFM 1	*	29 พย 2533	~3	3.2
YFM 2	*	8 มค 2534	~3	2.6
NG 2	*	4 มค 2535	~3	3.0

หมายเหตุ * ไม่ทราบวันเดือนปีเกิดจริง

3.3 อุปกรณ์

1. เข็มฉีดยาเบอร์23G 1 : Terumo Corporation,Tokyo,Japan.
2. Syringeขนาด5มิลลิลิตร : Terumo Corporation,Tokyo,Japan.
3. Micropipets : Pipetman H-81-11912 Gilson France;Eppendorf3130 Germanney.
4. Syringe Dispenser : Model 8100 Nichiyo, Co , Ltd , Tokyo, Japan.
5. Vortex Mier : M-16715,Thermolyne Corporation, Iowa,U.S.A.

6. Dubnoff incubator-shaker : Model 3575-1,Lab-line instruments Inc.,U.S.A.

7. Refrigerated centrifuge : Model PR-J International Equipment Company,U.S.A.

8. Foam Decanting Rack : Diagnostic Products Corporation,U.S.A.

9. Polypropylene test tubes 12x75 mm : Elkay Products, Inc., U.S.A.

10. Gamma Counter : Model 1282 Compugamma LKB Wallac,Finland.

11. Dynac Centrifuge : Clay adams,Bacton Dickinson and Company Parsippany,U.S.A.

12. Beta Counter : Model BPL,Packard Instrument, Co.,U.S.A.

13. Driblock heater : Model DB-3,Tecam laburatory and Industrial Equipment,U.S.A.

14. Counting vial

2.4 สารเคมี

1. Total T4 Double Antibody : Commercial Kit Diagnostic Products Coporation, U.S.A.

2.4.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนไทรอกซินโดยวิธี RIA

1. สารละลายไทรอกซินมาตรฐาน (T_4 Calibrators : Lot.No.T_4DB-T_4D_8 0040) เป็นสารละลายไทรอกซินมาตรฐานของ human serum ความเข้มข้นตั้งแต่ 0,1,4,10,16 และ

24 ไมโครกรัม/เดซิลิตร เก็บไว้ที่อุณภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

2. สารละลายไทรอกซินติดสลากไอโอดีน-125 (^{125}I-T4 :Lot.No.T_4D2 0226) อยู่ในสภาพเป็นผงนำมาเติมน้ำกลั่น 11 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

3. สารละลายแอนติบอดีของไทรอกซิน (T_4 antiserum:Lot.No.T_4D1 0042) อยู่ในสภาพที่เป็นผงจาก lyophilization นำมาเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส (ห้ามนำไปแช่แข็ง) มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

4. Goat Anti- Rabbit Gamma Globulin (Precipitating Solution : Lot. No. N6 0262) อยู่ในสภาพสารละลายเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสเตอรอยด์ฮอร์โมนโดยวิธี RIA

1. ฮอร์โมน

Estradiol Standard : Batch No.K079610,WHO RIA Reagent Programme,Switzerland.

Progesterone Standard : Batch No.K079410, WHO RIA Reagent programme,Switzerland.

2. แอนติซีรัม

Antiserum to Oestradiol : Batch No.K158330,WHO RIA Reagent Programme,Switzerland.

Antiserum to Progesterone : Batch No.K873610,WHO RIA Reagent Programme,Switzerland.

3. สารติดสลากรังสี

^{3}H-Oestradiol Oestrogen : Amersham International,Plc, England.

^{3}H-Progesterone Progesterone : Amersham International, Plc,England.

4. สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสเตอรอยด์ฮอร์โมนโดยวิธี RIA

- Charcoal reagent: WHO RIA Reagent Programme,Switzerland.
- Dextran reagent : WHO RIA Reagent Programme,Switzerland.
- Diethyl ether : E.Merck,Darmstadt,Germany.
- Sodium dihydrogen phosphate-monohydrate($NaH_2PO_4H_2O$) : E.Merck,Germany.

- Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4): E.Merck, Germany.
- Sodium chloride (NaCl) : E.Merck,Germany.
- Thiomersal : Sigma chemical company,U.S.A.
- Toluene : E.Merck,Germany.
- Dioxane : E.Merck,Germany.
- PPO (2,5-Diphenyloxazole)($C_{15}H_{11}NO$) : E.Merck,Germany.
- POPOP (1,4-bis[2-(5-phenyl oxazolyl)]-Benzene) : Sigma Chemical Company,U.S.A.

3.5 วิธีดำเนินการทดลอง

3.5.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดจาก femoral vein ครั้งละ 4-5 ml ในช่วงก่อนอาหารเช้าโดยจะเจาะเลือดทุก ๆ 8 วัน เมื่อพบมีการเปลี่ยนแปลงของ sexual skin บริเวณรอบ ๆ ช่องคลอด และทวารหนัก (geneto-anal region) โดยมีการบวมน้ำ และ/หรือเปลี่ยนเป็นสีแดง และจะเจาะเลือดทุกๆ 6 วันเมื่อเริ่มมีประจำเดือนครั้งแรก และติดตามต่อไปจนพบมีรอบประจำเดือนปกติ หรือประมาณ 100 วันหลังเกิด menarche เลือดที่เจาะได้แต่ละครั้งเก็บไว้ในหลอดทดลองที่ปิดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-2 ชั่วโมงจึงเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 2800 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นแยกซีรัมที่ได้แบ่งใส่หลอดเล็ก ๆ ในปริมาณที่พอเพียงสำหรับการวิเคราะห์ฮอร์โมนแต่ละฮอร์โมน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนที่ต้องการ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2 การตรวจหาปริมาณฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์(RIA)

3.5.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ Total T_4

การดำเนินการตาม Diagnostic Products Coporation (1988) ดังนี้

1. ทำเครื่องหมายข้างหลอดทดลองสำหรับ T (total counts), NSB (non-specific binding), A (maximum binding) และ B ถึง F ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (standard) และสารตัวอย่าง (sample) อย่างละ 2 ชุด ดังตารางข้างล่าง

หมายเลขหลอดทดลอง	สารละลายที่บรรจุ
T1,T2	Total counts (Tracer-buffer)
NSB1, NSB2	Non-specific binding blank,0 µg/dl
A1,A2	Maximum binding,0 µg/dl
B1,B2	T_4 serum standard,1 µg/dl
C1,C2	T_4 serum standard,4 µg/dl
D1,D2	T_4 serum standard,10 µg/dl
E1,E2	T_4 serum standard,16 µg/dl
F1,F2	T_4 serum standard,24 µg/dl
1, 1	serum sample
2, 2	serum sample

019732

2. ปิเปต 10 ไมโครลิตร ของสารละลายแต่ละชนิดลงในหลอดทดลองยกเว้นหลอด total counts

3. เติม [^{125}I]T_4 (tracer-buffer reagents) 50 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่า test tube rack เบา ๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

4. เติม T_4 antiserum 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ยกเว้น หลอด NSB และ total counts นำไปปั่นให้สารละลายผสมกันด้วย vortex mixer และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

5. เติม cold precipitating solution 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ปั่นด้วย vortex mixer (ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกครั้งนาน 5 นาที)

6. นำไปปั่นที่ 3000 g นาน 15 นาที เทสารละลายทิ้งน้ำตะกอนที่เหลือไปนับรังสีด้วย gamma counter นานหลอดละ 1 นาที

2.5.2.2. การวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออลและโปรเจสเตอโรน

1. สารละลายและวิธีเตรียม

1.1. Assay buffer เตรียมโดยใช้

Sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$)	3.1 กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	11.6 กรัม
Sodium chloride(NaCl)	8.8 กรัม
Thimerosal	0.1 กรัม
Gelatin	1.0 กรัม

ละลาย Gelatin 1 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร อุ่นให้ Gelatin ละลายจนหมด ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมสารอื่นลงไป เมื่อละลายหมดนำไปปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

1.2. Charcoal suspension เตรียมโดยใช้ Dextran 0.0625 กรัม ละลายใน assay buffer 100 มิลลิลิตร แล้วเติม charcoal reagent 0.625 กรัม เขย่าอย่างแรงนาน 30 วินาที เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการใช้งาน 1 เดือน เมื่อจะใช้ต้องนำไปกวนที่ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลาที่ใช้

1.3. Counting solution

PPO	5	กรัม
POPOP	0.3	กรัม
Toluene	1	ลิตร
1, 4-Dioxan	200	มิลลิลิตร

ละลาย PPO (2, 5-diphenyloxazole) 5 กรัม, POPOP 0.9 กรัม ใน Toluene 1 ลิตร และ 1, 4-Dioxan 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ละลายเข้ากันดีแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

1.4. สารละลายฮอร์โมนมาตรฐาน

Oestradiol standard

เตรียมโดยใช้ osetradiol standard จาก WHO ซึ่งมีความเข้มข้น 150 นาโนโมลต่อลิตร ปิเปตสารละลายนี้ 100 ไมโครลิตรเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร mix เบา ๆ แล้วนำไปตั้งใน waterbath ที่อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีจะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1.5 พิโคโมล/ลิตร เป็น stock solution จากนั้นทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 750 เฟมโตโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ถึง 11.5 เฟมโตโมลต่อ 500 ไมโครลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

Progesterone standard

เตรียมโดยใช้ progesterone standard จาก WHO ซึ่งมีความเข้มข้น 220 นาโนโมลต่อลิตร ปิเปตสารละลายนี้ 100 ไมโครลิตร เติม assay buffer 10 มิลลิลิตร mix เบา ๆ แล้วนำไปตั้งใน waterbath ที่อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 2.5 พิโคโมล/ลิตร เป็น stock solution จากนั้นทำ

serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1250 เฟมโตโมลต่อ 500 ไมโครลิตร ถึง 9.5 เฟมโตโมลต่อ 500 ไมโครลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

1.5 สารละลายฮอร์โมนติดสลากรังสี

เตรียมโดยใช้ stock tracer ซึ่งมีปริมาณกัมมันตภาพรังสี จำนวน 10 ไมโครคูรี่ต่อมิลลิลิตร ดูดมา 100 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ working tracer ซึ่งมีปริมาณกัมมันตรังสี 100 นาโนคูรี่ต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.6 สารละลายแอนติบอดี

เตรียมโดยใช้แอนติบอดีซึ่งอยู่ในสภาพที่ระเหยแห้งจาก WHO นำมาเติม assay buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลาย เตรียมแล้วใช้ทันที

2. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออล และโปรเจสเตอโรน ตามวิธีขององค์การอนามัยโลก (Sufi et al., 1986) ดังนี้

2.1 การสกัดฮอร์โมนจากซีรัม

เอาตัวอย่างซีรัมที่แช่แข็งออกมาทำให้ละลาย แล้วดูดลงใส่หลอดทดลองที่ใช้ในการสกัด โดยใช้ปริมาณซีรัมดังนี้คือ

การหาอีสตราไดออล 500 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง

การหาโปรเจสเตอโรน ปริมาณซีรัมเพศเมียที่คาดว่าจะเป็น luteal phase ใช้ 250 ไมโครลิตร และในช่วงที่คาดว่าจะเป็น follicular phase ใช้ 500 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง

ใส่ตัวอย่างซีรัมลงในหลอดทดลองอย่างละ 2 หลอด รวมทั้งซีรัมสำหรับควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ด้วย เติม diethyl ether ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงแต่ละหลอดแล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 1 นาที จากนั้นนำไปใส่ในถาดที่มี ethanol กับ dry ice ชั้นล่างซึ่งเป็นน้ำจะแข็งตัว รินส่วนชั้นบนซึ่งเป็นชั้นอีเทอร์ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปทำให้แห้งโดยใช้ driblock heater ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส นำหลอดทดลองที่ทำให้

อีเทอร์แห้งสนิทมาเติม assay buffer 500 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และเขย่าซ้ำอีกครั้งก่อนนำหลอดทดลองนี้ไปแอสเสย์ต่อไป

2.2. วิธีการแอสเสย์

เติมสารละลายออร์โมนติดสลากรังสี 100 ไมโครลิตรลงใน counting vial เพื่อหา total counts และหลอดแอสเสย์ทุกหลอดรวมทั้ง NSB, Bo (Maximum binding) ฮอร์โมนมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ และ Qc (Quality control) เติมแอนติบอดี 100 ไมโครลิตรลงทุกหลอด ยกเว้น NSB และ total counts นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ในถาดน้ำแข็งเติม chacoal suspension จำนวน 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปปั่นด้วย refrigerated centrifuge ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที รินส่วนใสลงใน vial และนำไปเติม scintillation fluid 5 มิลลิลิตร รวมทั้ง recovery vial ด้วย นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer อีกครั้ง และนำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่องเบต้าเคาร์เตอร์

ตารางที่ 2 ปริมาตรของสารละลายในหลอดทดลองต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอีสตราไดออลและโปรเจสเตอโรน

สารละลาย หลอดทดลอง	Tracer (µl)	Antiserum (µl)	Buffer (µl)	Standard (µl)	Total (µl)
Tc	100	-	600	-	700
NSB	100	-	600	-	700
Bo	100	100	500	-	700
Standard	100	100	-	500	700
Q.C.	100	100	500	-	700
Sample	100	100	500	-	700

2.3 % recovery

ใส่ตัวอย่างซีรัม 50 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง 6 หลอดเติมสารละลายฮอร์โมนติดสลากรังสีลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปสกัดด้วย diethyl ether 5 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับตัวอย่างอื่น ๆ จากนั้นนำส่วนที่แห้งแล้วมาเติม assay buffer 700 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer เสร็จแล้วเทใส่ counting vial เติม counting solution แล้วเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer อีกครั้ง นำไปตรวจวัดกัมมันตภาพรังสี เปรียบเทียบปริมาณรังสีที่วัดได้กับปริมาณรังสีที่ไม่ได้ถูกสกัดก็จะทราบประสิทธิภาพของการสกัดได้

$$\text{ประสิทธิภาพของการสกัด} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย CPMของ RCE(Recovery)}}{\text{ค่าเฉลี่ยCPMของTCR(Total count recovery)}} \times 100\%$$

ประสิทธิภาพในการสกัดของการตรวจวัด อีสตราไดออล และโปรเจสเตอโรน ดูจากตารางที่ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4. การคำนวณ

1. กราฟมาตรฐาน นำค่า CPM ของ steroid hormone standard (oestradiol standard หรือ progesterone standard) ในแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยแล้วลบออกด้วย CPM ของ NSB นำค่าที่ได้ไป plot กับความเข้มข้นของค่า standard บนกระดาษกราฟ semilog

2. ตัวอย่างซีรัม นำค่า CPM ของตัวอย่างซีรัมแต่ละค่าลบด้วย CPM ของ NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานได้ค่าเป็นเฟมโตโมลต่อหลอดทดลอง เปลี่ยนเป็นเฟมโตโมลต่อมิลลิลิตร โดยคิดตามปริมาณที่ใช้

3. Quality Control (Q.C.) คำนวณเช่นเดียวกับตัวอย่างซีรัมนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกันในแต่ละแอสเสย์ (intra assay) และระหว่างแอสเสย์ (inter assay) เพื่อทดสอบความแม่นยำในการวัด (precision)

2.6 การประเมินความเชื่อถือได้ของการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

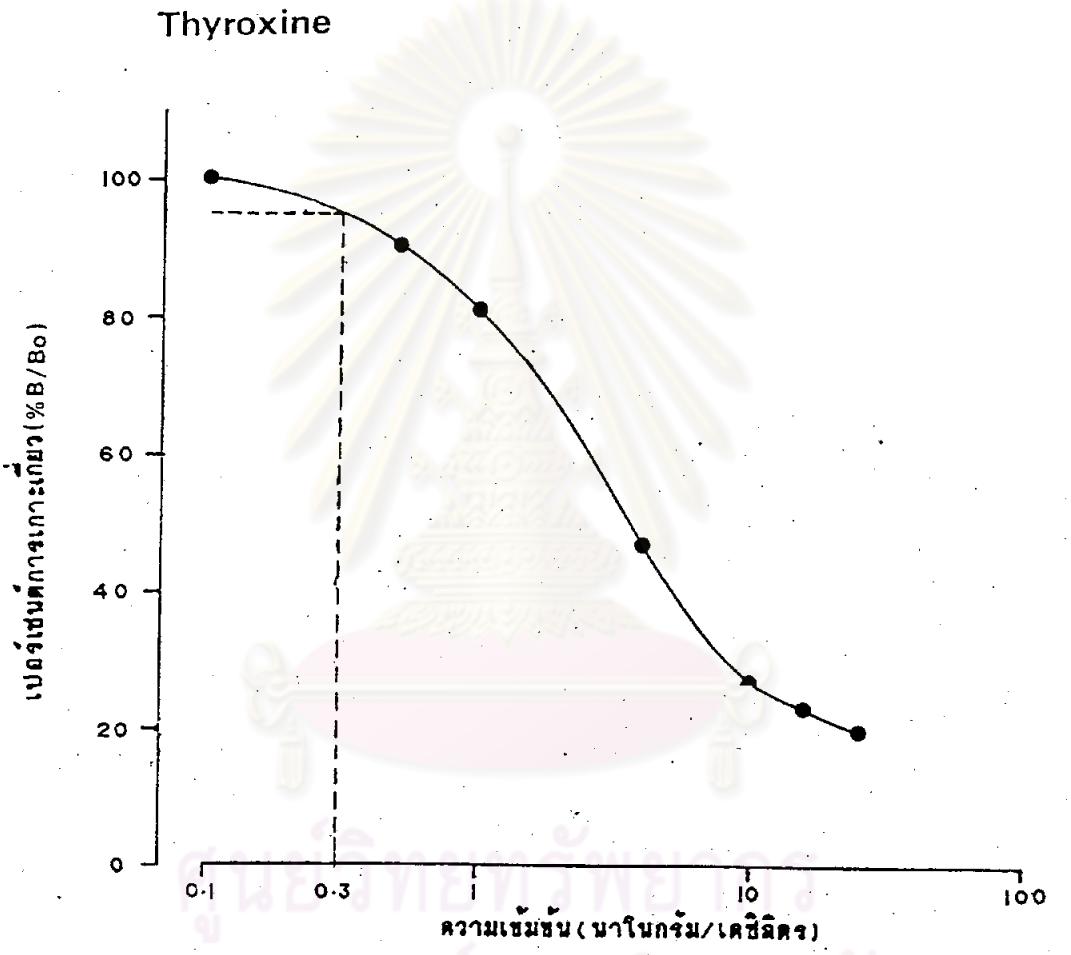
2.6.1. การประเมินความเชื่อถือได้ของชุดวิเคราะห์ฮอร์โมน Thyroxine (T_4) ตามวิธีของ Ekin,1981

1. <u>ความไว</u> (sensitivity)

ค่าที่น้อยที่สุดของฮอร์โมนที่สามารถตรวจวัดได้ และแยกออกมาจากค่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ โดยกำหนดจากค่าปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ระดับเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว 95 เปอร์เซนต์จากกราฟมาตรฐานที่ตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนความเข้มข้นศูนย์ (blank) ซ้ำกันอย่างน้อย 10 ครั้ง

ความไวของการตรวจวัด T_4 มีค่า = 0.3 ไมโครกรัม/เดซิลิตร

กราฟรูปที่ 1. แสดงความไวในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนไทรอกซินในซีรัมลิงทดลอง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ความจำเพาะ (specificity)

ความสามารถของแอนติซีรัมที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับสารที่ต้องการวัดโดยไม่ถูกรบกวนกับสารอื่น ซึ่งทำได้โดยการหา cross reaction ระหว่างแอนติบอดีที่ใช้กับสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวัดปริมาณ ชุดวิเคราะห์ฮอร์โมนต่าง ๆ ได้มีการตรวจสอบไว้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว (Total T_4 Double Antibody Kit) ตามตารางที่ 1 ในภาคผนวก

3. ความแม่นยำในการวัด (precision)

ความแม่นยำในการวิเคราะห์สารแต่ละครั้งจะทดสอบได้จากเปอร์เซนต์สัมประสิทธิของความแปรปรวน (% CV) ดังนี้

$$\% \text{ CV} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสาร (SD)}}{\text{มัชฌิมเลขคณิต (X)}} \times 100$$

การหา % CV มีอยู่ 2 ส่วน คือภายในการตรวจวัดในการทดลองเดียวกัน (intra assay) และระหว่างการทดลอง (inter assay) ทำได้โดยนำ Pool serum สำหรับควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน ซึ่งมีความเข้มข้น 3 ระดับคือสูง กลาง และต่ำ มาทำการตรวจสอบหาปริมาณฮอร์โมนพร้อมกับการหาปริมาณฮอร์โมนในตัวอย่างซีรัม (ตารางที่ 4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงความแม่นยำของการตรวจวัด ปริมาณไทรอกซินในการตรวจวัดครั้งเดียว และการตรวจวัดแต่ละครั้ง

	การตรวจวัดครั้งเดียวกัน(n=10)		การตรวจวัดแต่ละครั้ง(n=9)	
	Mean ± SD (ug/dl)	% CV	Mean ± SD (ug/dl)	% CV
ระดับสูง	19.42±1.15	5.92	19.05±1.62	8.50
ระดับกลาง	7.46±0.24	3.22	7.53±0.31	4.07
ระดับต่ำ	2.02±0.16	7.52	2.08±0.19	9.13

4. ความถูกต้อง (accuracy)

เป็นการแสดงความสามารถในการตรวจวัดหาปริมาณฮอร์โมนจากสารตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุด โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนเติมลงในสารตัวอย่างที่ทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนแน่นอนแล้ว ผ่านการตรวจวัดพร้อมกับสารตัวอย่างแล้ว เปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นที่ได้กับปริมาณความเข้มข้นจริงที่ทราบ (ตารางที่ 5) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซนต์ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่วัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนที่ใส่ลงไปจริง}} \times 100$$

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ T_4 ($\mu g/dl$)

ความเข้มข้นของฮอร์โมนในสารมาตรฐาน	ความเข้มข้นของฮอร์โมนในสารตัวอย่าง	ค่าจริง	ค่าจากการตรวจวัด	% ความถูกต้อง
2	3.5	5.5	5.33	95
5	3.5	8.5	9.04	105.2
8	3.5	11.5	11.96	103.1

3.6.2. การประเมินความเชื่อถือได้ของการวิเคราะห์หาอีสตราไดออลและโปรเจสเตอโรนตามวิธีของ Ekins (1970) และ Abraham (1974)

1. ความไว (Sensitivity)

ทำเช่นเดียวดังกล่าวมาแล้วข้างต้นในหน้า 26 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

2. ความจำเพาะ (Specificity)

ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งได้มีการตรวจสอบไว้เรียบร้อยแล้วโดยองค์การอนามัยโลก (WHO) ตามตารางที่ 2 และ 3 ในภาคผนวก

3. ความแม่นยำ (precision)

ทำเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้นในหน้า 26 สำหรับ steroid hormone นี้ทำโดยใช้ pool serum ของลิงซึ่งทราบค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนที่แน่นอนแล้วนำมาวิเคราะห์หาความแม่นยำของฮอร์โมนอีสตราไดออลและโปรเจสเตอโรนทั้ง intra assay อย่างละ 10 ตัวอย่าง และ inter assay ของการทดลอง 8 ครั้งตามลำดับ ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่าความแม่นยำ ความถูกต้อง ความไว และประสิทธิภาพในการสกัดของการวิเคราะห์หาสเตียรอยด์ฮอร์โมน

ฮอร์โมน	ความแม่นยำ(%CV)		ความไว	ประสิทธิภาพในการสกัด
	Intra assay	Inter assay	(fmol/tube)	(% Recovery)
อีสตราไดออล	12.7	13.8	9	82.96
โปรเจสเตอโรน	4.48	5.94	14	77.15

4. ความถูกต้อง (accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์หาได้จากการนำสาร หรือฮอร์โมนที่ทราบปริมาณที่แน่นอน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแล้วเทียบกับปริมาณฮอร์โมนที่แท้จริงคิดเป็นเปอร์เซนต์ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (ตารางที่ 6)

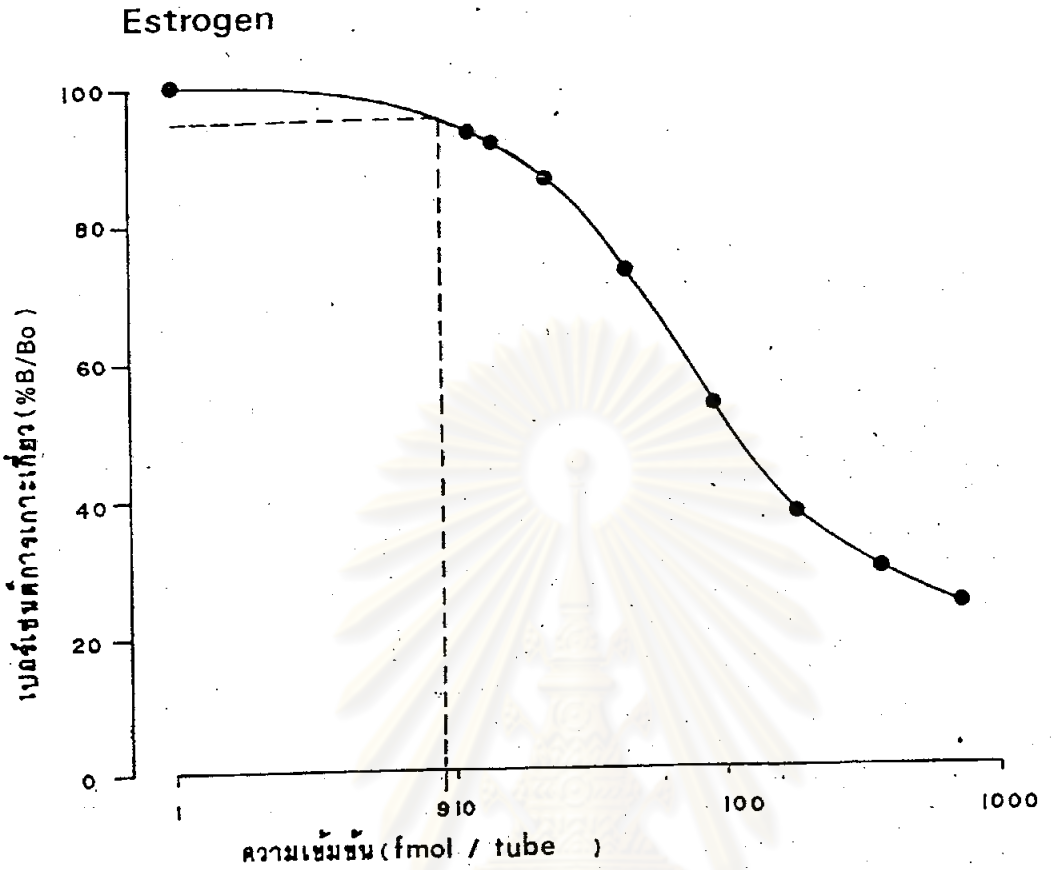
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

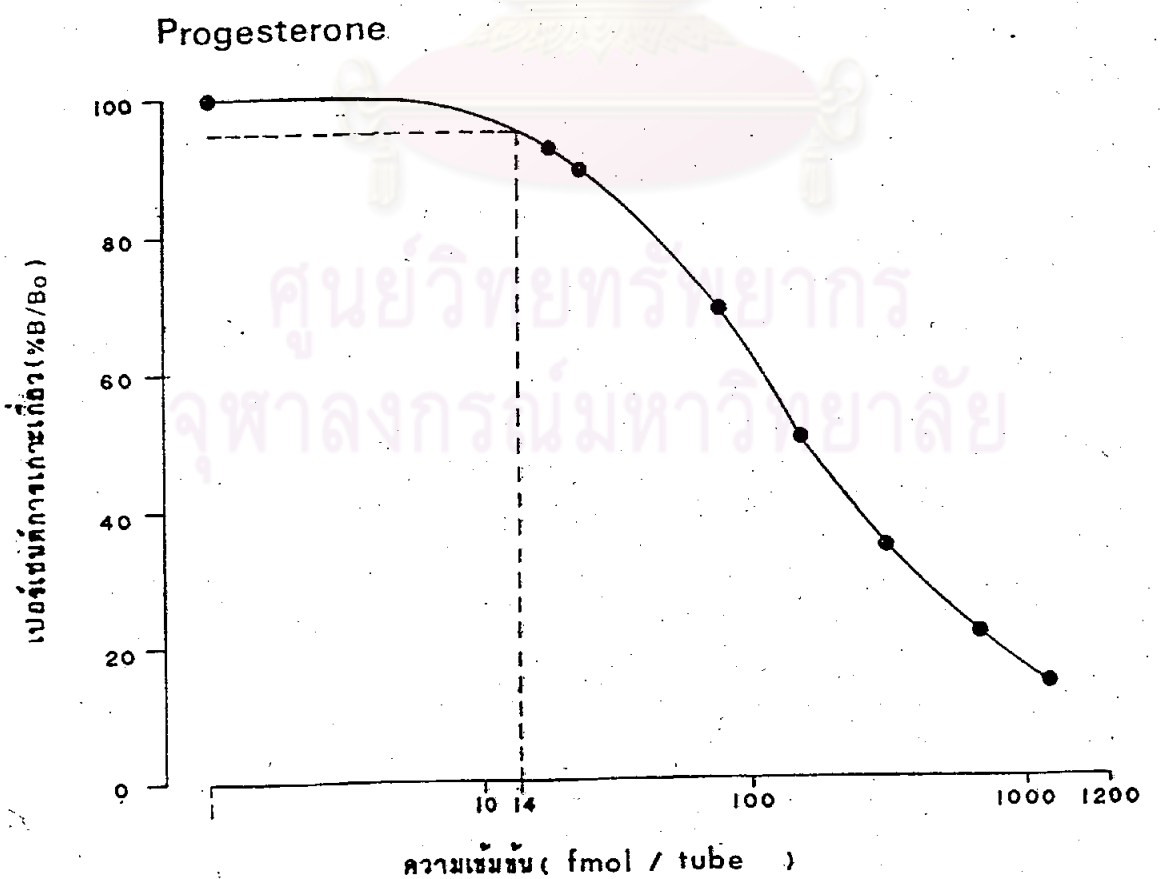
ตารางที่ 6 แสดงความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณอีสตราไดออล และโปรเจสเตอโรน

ฮอร์โมน	ความเข้มข้นของฮอร์โมนในสารมาตรฐาน(fmol/tube)	ค่าจากการตรวจวัด (fmol/tube)	% ความถูกต้อง
อีสตราไดออล	75.00	67.88	90.51
	187.50	176.44	94.10
	300.00	331.40	110.47
โปรเจสเตอโรน	150.00	162.98	108.65
	375.00	417.61	111.36
	600.00	589.82	98.30

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟรูปที่ 2. แสดงความไวในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนอิสตราดิออลและโปรเจสเตอโรนในชีรัมลิงทดลอง





ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย