

03/0033/32

นิพนธ์ต้นฉบับ

เปรียบเทียบการวัดเอสตราไดโอรในน้ำเหลืองโดยตรง
กับวิธีสกัดแยกด้วยอีเทอร์*
**Comparative study of unextracted and extracted
assay of estradiol in serum***

ฉัตรพร อุณาจิตต์** สมัย ลีพัฒน์ไพบุลย์** ขลทิชา แซ่กัว** ประมวล วีรุตมเสน**

Abstract : Chatporn Usanachitt, Smai Leepipatpaiboon, Chonticha Kua, and Pramuan Virutamasen. 1989. Comparative study of unextracted and extracted assay of estradiol in serum. Thai J Hlth Resch 3(1) : 1-11

The conventional RIA method for estradiol (E_2) determination is required extraction of E_2 from serum protein with organic solvent which is complicated, time consuming and high cost. It is appropriate for research project due to high precision and accuracy but not for medical service which faster result is required. This bring the research team to develop the new method. Add 5α -dihydro-testosterone (DHT) and danazol in serum to react with binding protein which will protect serum protein interfere the reaction. The ether extraction is omitted and result can be achieved within 5 hours.

The validity of the new method are follows :-

Within assay variation values ($n = 10$) for low, medium and high concentration of E_2 are 22.48%, 7.80% and 5.36% respectively. Between assay variation values ($n = 30$) for the same pool serum are 20.54%, 9.89% and 8.12% respectively. The accuracy $\bar{X}$ is 95.56% (76.37 - 108.73%) and sensitivity is 3.09 pg/tube.

The comparative result of E_2 analysis between this new method and the conventional method by using Student Paired t-test is not shown statistically difference ($p < 0.05$). Use the linear regression line studied the correlation between these 2 methods. The correlation coefficient "r" is 0.99 and the regression equation is $Y = 0.05 + 1.009 X$.

The result is shown that this new method is relatively high reproducibility as conventional method. It can help the gynecologists to diagnose and treat the patients more efficiency.

* รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการที่ได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ปี พ.ศ. 2529

This work was a part of the research project supported by the Rachadapiseksompoj-China Medical Board Fund, Faculty of Medicine, year 1986.

** ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330

Dept of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

บทคัดย่อ : ฉัตรพร อุณาจิตต์, สมัย ถีพพัฒน์ไพบุลย์, ชลธิชา แซ่กัว และ ประมวล วีรุตมเสน. 2532. เปรียบเทียบ การวัดเอสตราไดโอดในน้ำเหลืองโดยตรงกับวิธีสกัดแยกด้วยอีเทอร์. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 3 (1) : 1-11

การวิเคราะห์หาปริมาณเอสตราไดโอด [estradiol (E_2)] โดย radioimmunoassay ในปัจจุบัน จำเป็น ต้องผ่านขั้นตอนในการสกัดแยก E_2 ออกจากโปรตีนในน้ำเหลืองด้วยสารละลายอินทรีย์ ทำให้สิ้นเปลืองทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย วิธีนี้เหมาะสำหรับงานด้านวิจัย เพราะให้ความแม่นยำถูกต้องสูง แต่ไม่เหมาะสำหรับใช้ในงานบริการทางการแพทย์ ซึ่ง ต้องการทราบผลเร็ว ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงได้คิดค้นวิธีการใหม่ โดยการลดขั้นตอนการสกัดด้วยอีเทอร์ โดยการเติม 5 α -dihydrotestosterone (DHT) และ danazol ลงในน้ำเหลือง สารสองชนิดนี้จะทำปฏิกิริยากับ binding protein ทำให้ โปรตีนในน้ำเหลืองไม่เข้ารบกวนปฏิกิริยาการวัด และได้ผลการทดลองภายใน 5 ชั่วโมง

จากการทดลองความแม่นยำ (precision) ของการวัดวิธีใหม่ ได้ค่าเฉลี่ยของสัมประสิทธิ์ของการเบี่ยงเบนใน ชุดเดียวกัน (within assay variation, $n = 10$) ของ pool serum ที่มีความเข้มข้น E_2 ต่ำ, กลางและสูง เท่ากับ 22.48%, 7.80% และ 5.36% ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์ของการเบี่ยงเบนระหว่างชุด (between assay variation, $n = 30$) ของ pool serum เดียวกันนี้ได้เท่ากับ 20.54%, 9.89% และ 8.12% ตามลำดับ ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (accuracy, $n = 10$) เฉลี่ยเท่ากับ 95.56% (76.37 - 108.73%) ความไวในการวัด (sensitivity) เท่ากับ 3.09 พิโคกรัม/หลอดทดลอง

ในการวิเคราะห์ค่าตามวิธีทางสถิติ ได้เปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธีมาตรฐานและวิธีใหม่ โดยใช้ Student Paired t -test พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$ และหาความสัมพันธ์ของสองวิธีโดยใช้สถิติถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression line) เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ได้ค่า $r = 0.99$ และสมการเส้นถดถอย (regression equation) ได้ $Y = 0.05 + 1.009 X$

บทนำ

เอสตราไดโอด (E_2) เป็นฮอร์โมนที่มีหน้าที่สำคัญ เกี่ยวข้องกับการทำงานของรังไข่ในสตรีวัยเจริญพันธุ์ ปริมาณ E_2 ในน้ำเหลืองจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยภาวะการทำงานของรังไข่ พยาธิสภาพของมดลูกและทารก ในระหว่างการตั้งครรภ์ ในอดีตวิธีการวิเคราะห์ E_2 ทำโดยใช้ colorimetric methods (Roy, 1962) ซึ่งเป็นวิธีที่ ความไวในการวัดต่ำ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ E_2 ในสตรีปกติซึ่งมีปริมาณ E_2 อยู่ในระดับพิโคกรัมได้ (Preedy, 1965) ต่อมาปี 1969 Abraham ได้พัฒนาการวิเคราะห์ steroid hormones ด้วยวิธี radioimmunoassay (RIA) ซึ่งมีความไวในการวัดสูงมาก แต่มีข้อเสียคือสารกัมมันตภาพรังสีเป็นสารที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงมีผู้ พยายามดัดแปลงวิธีการอื่น ๆ มาแทนที่ RIA โดยในปี 1978 Van Weemen *et al.* ได้นำเอนไซม์ immunoassay มาใช้แทน RIA เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฮอร์โมน แต่พบว่าความไวในการวัดยังไม่ดีเท่า RIA และ stability ของ enzyme ที่ใช้ไม่ดีเท่ากับสารรังสี ในปี 1980 Kohen *et al.* ได้นำวิธี chemiluminescence immunoassay (CIA) เข้ามาแทน RIA โดยการใส่สาร luminol แทนสารรังสี พบว่าความไวในการวัดใกล้เคียงกับ RIA แต่ข้อเสียคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่ stable Luminol เมื่อถูก oxidise จะเรืองแสงในช่วงเวลาสั้นมากประมาณ 10 วินาที หลังจากนั้น จะสลายตัวไป จึงต้องใช้เครื่องมือเฉพาะราคาแพง และไม่สะดวกในด้านปฏิบัติงาน กล่าวคือไม่สามารถจะนำมา count ซ้ำได้เหมือนกับวิธี RIA เพราะบางครั้งความผิดพลาดมักเกิดจากการใช้เครื่อง counter และการเรียงตำแหน่ง หลอดทดลองผิด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเห็นว่า RIA ยังคงเป็นวิธีการที่ดีที่สุดในขณะนี้ แต่วิธีการวิเคราะห์หา E_2 โดยวิธี RIA ในปัจจุบันจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการกำจัดสารต่าง ๆ ที่เจือปนอยู่ในน้ำเหลืองที่เข้ารบกวนปฏิกิริยา

RIA เช่นใช้การผ่าน thin layer chromatography (TLC) (Doerr, 1973) หรือการนำเอา น้ำเหลืองมาทำการปั่นเพื่อแยกชั้นของไขมันออก (Mac Donald *et al.*, 1982) หรือการสกัดแยก E_2 ออกจากโปรตีนในน้ำเหลืองด้วยสารละลายอินทรีย์ (Loriaux *et al.*, 1973) ซึ่งวิธีสุดท้ายนี้ยังเป็นวิธีที่ทาง WHO Match Reagent Program for RIA of Hormones (Sufi *et al.*, 1986) และทางห้องปฏิบัติการชีววิทยาการเจริญพันธุ์ได้ใช้อยู่ วิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วนี้สิ้นเปลืองทั้งค่าใช้จ่ายและเวลา จึงไม่อาจนำมาประยุกต์ใช้ในด้านบริการทางการแพทย์ ซึ่งต้องการผลเร็ว ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้พยายามคิดค้นวิธีวิเคราะห์ปริมาณ E_2 โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนต่าง ๆ เหล่านี้ ในปี 1975 Jurjens *et al.* ได้ทำการเติม Testosterone (T) ปริมาณสูงถึง 1 ไมโครกรัม ลงไปในทุกหลอดทดลอง เพื่อให้ T เข้าไปแย่งจับกับโปรตีน sex hormone binding globulin (SHBG) ทำให้ SHBG ไม่เข้าไปรบกวนต่อปฏิกิริยา RIA ในปี 1980 Huber *et al.* ได้ใช้ 5α -dihydrotestosterone (DHT) ปริมาณ 1 ไมโครกรัมเช่นกัน ใส่ลงในทุกหลอดทดลอง เพื่อจุดประสงค์เดียวกัน ทั้ง 2 วิธีนี้สิ้นเปลืองทั้ง T และ DHT ที่มีราคาค่อนข้างแพง ในปี 1985 De Boever *et al.* (1986) ได้เปลี่ยนวิธีการวิเคราะห์โดยใช้วิธี CIA แล้วเติม DHT และ danazol อย่างละ 5 นาโนกรัม ลงในทุกหลอดทดลองเพื่อเข้าไปแย่งจับกับ SHBG binding site โดยอาศัยหลักการที่ว่า DHT ซึ่งเป็น derivative ของ testosterone และ danazol เป็น synthetic testosterone มีความสามารถจับกับ SHBG ได้ดีกว่า E_2 (Dunn *et al.*, 1981 ; Pugeat *et al.*, 1981) ทำให้ SHBG ไม่เข้ามารบกวนต่อปฏิกิริยาการวิเคราะห์ และนอกจากนี้ยังพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่ทำปฏิกิริยากับ Ab E_2 ที่ใช้ในปฏิกิริยา RIA

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ดัดแปลงวิธีการของ De Boever (1986) มาทำการวิเคราะห์ E_2 แต่ใช้เทคนิคของ RIA ซึ่งผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับวิธี RIA ที่สกัดแยก E_2 ด้วยอีเทอร์ และวิธีที่พัฒนานี้สามารถประยุกต์ใช้ในงานด้านบริการวิเคราะห์ E_2 ในคลินิกการมีบุตรยาก เพื่อบริการการผสมเทียมหรือ *in vitro* fertilization (IVF) ที่ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

วัสดุและวิธีการ

1) การศึกษานี้ทำในหญิงที่มีรอบประจำเดือนปกติจำนวน 35 ราย อายุระหว่าง 18-35 ปี ในแต่ละรายเจาะเลือดรวม 3 ครั้ง ๆ ละ 5 มล. ในช่วงวันที่ 5, 15 และ 25 ของประจำเดือน จำนวนน้ำเหลืองตัวอย่างรวม 100 ตัวอย่าง น้ำเหลืองที่ได้ไม่ใส่สารกันเสีย นำไปเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณ E_2 ด้วย 2 วิธีดังกล่าว

2) วัสดุเคมีที่ใช้ในขบวนการ RIA

2.1) สารมาตรฐาน estradiol, 5α -dihydrotestosterone และ danazol จาก Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

2.2) Antisera ของ estradiol ชนิด monoclonal ได้รับอนุเคราะห์จากองค์การอนามัยโลก ส่วน polyclone จาก Steranti Research Ltd, St. Albans, Herts, UK.

2.3) สารติดสลากรังสีของ estradiol 2, 4, 6, 7, ^3H estradiol specific activity 104 ci/m mol จาก Amersham International, PLC, Amersham, UK.

2.4) Assay buffer (0.1 M phosphate gelatin buffer in saline pH = 7.2 ± 0.1).

2.5) 0.625% และ 1.5% suspension charcoal in phosphate gelatin buffer.

2.6) Diethyl ether, methyl alcohol จาก E. Merck, Darmstadt, Germany.

2.7) Scintillator ประกอบด้วย

- Triton X-100, toluene จาก E. Merck, Germany.

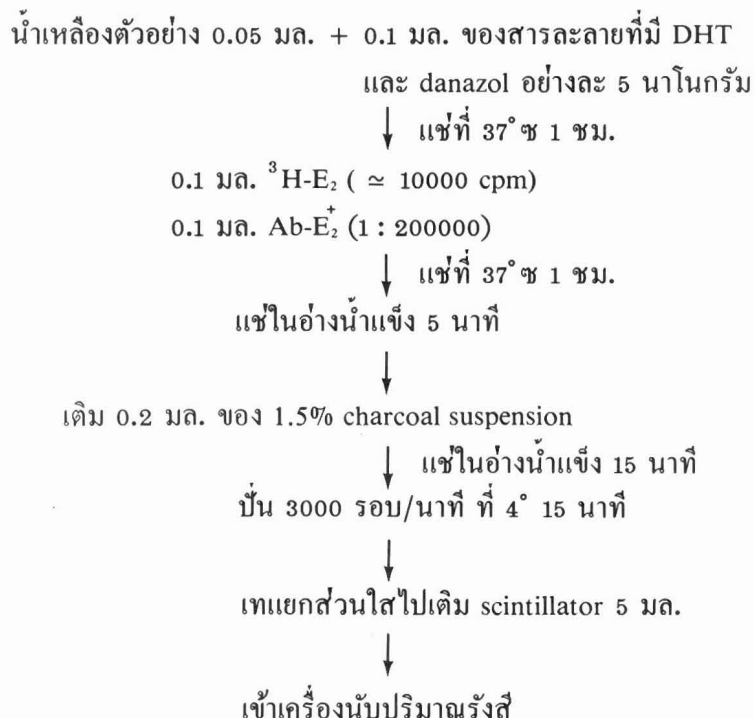
- Liquiflour จาก New England Nuclear, Boston, USA.

3) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ E_2

3.1) วิชามาตรฐาน ดำเนินการตามวิธีของ WHO Special Programme of Research Development and Research Training in Human Reproduction, 10th ed, pp 54-65, 1986

3.2) วิธีใหม่ เตรียมสารละลายมาตรฐาน E_2 ให้มีความเข้มข้น 23, 47, 94, 188, 375 และ 750 เฟมโตโมล/0.4 มล.

วิธีวิเคราะห์ E_2



4) การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เป็นกราฟที่ plot ระหว่างความเข้มข้นของสาร E_2 มาตรฐานกับ percent bound ซึ่งได้จาก count per minute (cpm) ของสารละลายมาตรฐานหารด้วย cpm ของหลอดที่ไม่มีสารละลายมาตรฐานคูณด้วย 100 นำไป plot ลงในกระดาษ logit-logarithm graph ให้แกน y เป็นค่า percent bound แกน X เป็นความเข้มข้น จะได้กราฟเส้นตรง (รูปที่ 1) ค่าความเข้มข้นของ E_2 ในน้ำเหลืองตัวอย่างจะอ่านได้จากกราฟมาตรฐานนี้ (Moss, 1976)

5) การเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของ E_2 ระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีใหม่

เตรียมกราฟมาตรฐาน 2 เส้น โดยเส้นแรกทำตามวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ E_2 ข้อ 3.1 และเส้นที่ 2 ทำตามวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ E_2 ข้อ 3.2 นำผลที่ได้ทั้ง 2 วิธี มาสร้างกราฟมาตรฐานบนกระดาษกราฟ logit-logarithm graph แผ่นเดียวกัน (รูปที่ 2)

6) การทดสอบเพื่อแสดงให้เห็นว่า DHT และ danazol ไม่ทำปฏิกิริยากับ $\text{Ab}-E_2$ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

การศึกษาทำเช่นเดียวกับวิธีหาความจำเพาะ (specificity) ของ $\text{Ab}-E_2$ ต่อ DHT และ danazol โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของ E_2 (ตามวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ 3.1) เปรียบเทียบกับกราฟอีกสองเส้นที่ได้จากสารมาตรฐาน DHT และ danazol ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันจาก 500 พิโคกรัม - 500 ไมโครกรัม ต่อ 0.5 มล. แล้วทำปฏิกิริยากับ $^3\text{H}-E_2$ และ $\text{Ab}-E_2$ ที่ปริมาณความเข้มข้นเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองของกราฟมาตรฐาน E_2 วิธีคำนวณหาความจำเพาะ ให้ X เป็นปริมาณความเข้มข้นของ E_2 ที่ใช้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยากับ $\text{Ab}-E_2$ ที่จุด percent bound เท่ากับครึ่งหนึ่งของที่ %B และ Y เป็นปริมาณความเข้มข้นของ DHT หรือ danazol ที่ใช้ เพื่อ

ให้เกิดปฏิกิริยากับ Ab-E₂ ที่จุดเดียวกัน ดังนั้นความจำเพาะของ Ab-E₂ ต่อ DHT หรือ danazol คิดเป็นร้อยละ

$$= \frac{X}{Y} \times 100$$

7) ทดสอบความเชื่อถือได้ของการวัด (validity of assay)

การทดสอบความเชื่อถือได้ของการวัด ได้จากการทดสอบความแม่นยำในการวัด (precision) และความถูกต้องของการวัด (accuracy) โดยทำการศึกษาทั้งของวิธีมาตรฐานและวิธีใหม่ควบคู่กันไป

7.1 ความแม่นยำในการวัด

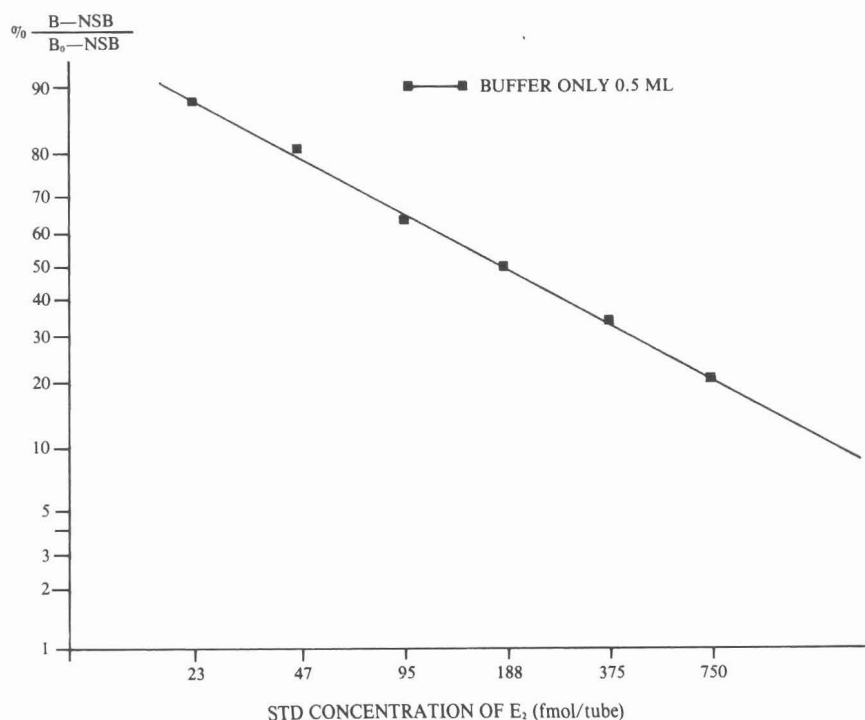
ทำได้โดยการวัด pool serum ซึ่งมีความเข้มข้นของ E₂ ต่างกันสามระดับ คือความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง แล้วทำการวัด pool ละ 10 ตัวอย่าง ในชุดเดียวกัน หาค่าสัมประสิทธิ์ของความเบี่ยงเบน (coefficient of variation = CV) ในแต่ละ pool เรียกว่า within assay variation วันต่อมาก็ดำเนินการเช่นเดียวกับวันแรกเป็นเวลาสามวัน หาค่า CV ที่วัดได้ในระหว่างวันจะได้ค่า between assay variation

7.2 ความถูกต้องของการวัด

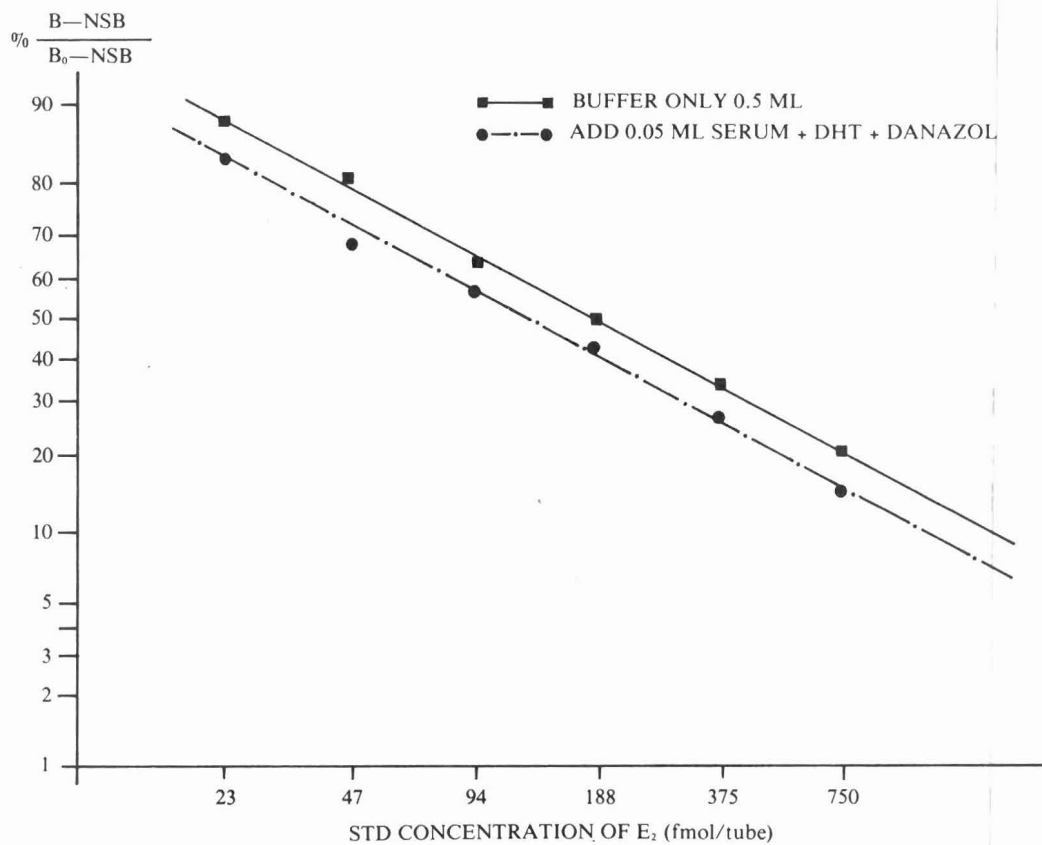
โดยการเติมสารมาตรฐานที่ทราบค่าแน่นอน ลงในน้ำเหลืองผู้ชาย ให้ได้ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง เช่นกัน แล้วทำการวัดกลุ่มละ 10 ตัวอย่าง คำนวณหา percent bound และหาค่าเฉลี่ยของความถูกต้องของการวัด

8) การวิเคราะห์และการประเมินผล

ทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธีใหม่ โดยนำผลการวิเคราะห์ E₂ ของทั้งสองวิธี มาเปรียบเทียบและวิเคราะห์ผลตามวิธีทางสถิติ โดยใช้ Student Paired t-test ซึ่งจะพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และหาความสัมพันธ์ระหว่างสองวิธี โดยใช้สถิติถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression line) เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ (correlation coefficient = r) และรายงานผลในรูปของสมการเส้นถดถอย (regression equation) $Y = a + bX$ (a = intercept, b = slope)



รูปที่ 1. TYPICAL STANDARD CURVE OF E₂

รูปที่ 2. TYPICAL STANDARD CURVE OF E₂

ผลการวิจัย

เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีการใหม่ ต่างจากวิธีมาตรฐาน จึงได้ทำกราฟมาตรฐานทั้งสองวิธีเปรียบเทียบกัน พบว่ากราฟที่ได้ทั้งสองเส้นขนานกัน อยู่ใกล้ชิดกัน และมี slope เหมือนกัน (รูปที่ 2) และเมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงว่ากราฟมาตรฐานทั้งสองนี้ ใช้อ่านผลการวิเคราะห์ E₂ ในน้ำเหลืองได้ไม่แตกต่างกัน สำหรับ DHT และ danazol ที่ใช้เป็นตัวแย่งจับกับ binding protein ในน้ำเหลือง เพื่อป้องกันไม่ให้โปรตีนในน้ำเหลืองรบกวนปฏิกิริยาการวิเคราะห์ E₂ นั้น ได้ทำการทดสอบต่อว่า สารทั้งสองนี้ ไม่มีปฏิกิริยากับ Ab-E₂ ที่ใช้ในปฏิกิริยาการวิเคราะห์ โดยศึกษาพบว่าความจำเพาะของ Ab-E₂ ที่มีต่อ DHT และ danazol เท่ากับ 0.02 และ 0.002% ตามลำดับ

สำหรับความเชื่อถือได้ของการวัด ได้ศึกษาทั้งวิธีมาตรฐานและวิธีใหม่ควบคู่กันไป โดยศึกษาเกี่ยวกับความแม่นยำในการวัด ความถูกต้องของการวัด และความไวในการวัด ซึ่งผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 Reproducibility ของวิธีมาตรฐาน

Pool Serum	Precision of assay				Accuracy (%)
	Within assay (n = 10)		Between assay (n = 30)		
	$\bar{X} \pm SD$	% CV	$\bar{X} \pm SD$	% CV	
Low	337.16 $\pm$ 58.30	17.29	350.86 $\pm$ 69.46	19.80	80.49
Medium	2187.36 $\pm$ 93.62	4.28	2177.68 $\pm$ 115.92	5.32	96.42
High	4181.14 $\pm$ 227.38	5.44	4137.22 $\pm$ 263.34	6.37	99.67

Sensitivity = 2.46 pg/tube

ตารางที่ 2 Reproducibility ของวิธีใหม่

Pool Serum	Precision of assay				Accuracy (%)
	Within assay (n = 10)		Between assay (n = 30)		
	$\bar{X} \pm SD$	% CV	$\bar{X} \pm SD$	% CV	
Low	297.67 $\pm$ 66.91	22.48	287.83 $\pm$ 59.12	20.45	76.37
Medium	2214.16 $\pm$ 172.81	7.80	2259.51 $\pm$ 223.52	9.89	108.73
High	4273.00 $\pm$ 229.11	5.36	4221.60 $\pm$ 342.90	8.12	101.60

Sensitivity = 3.09 pg/tube

การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ E_2 จากทั้งสองวิธีโดยใช้น้ำเหลืองจากสตรีปกติจำนวน 100 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากสตรีจำนวน 35 ราย ในแต่ละรายเจาะเลือดรวมสามครั้ง ในช่วงวันที่ 5, 15 และ 25 ของรอบประจำเดือน ซึ่งประมาณว่าเป็นช่วง follicular phase, mid cycle และ luteal phase ของแต่ละราย จุดประสงค์ของการเจาะเลือดวิธีนี้ เพื่อต้องการกระจายระดับความเข้มข้นของ E_2 ให้อยู่ในช่วงต่ำ กลาง และสูง ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ E_2 ของวิธีใหม่ ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวกับวิธีมาตรฐาน เพราะการพัฒนาวิธีการใหม่บางวิธีอาจจะใช้ได้กับข้อมูลบางระดับเท่านั้น ซึ่งถ้านำวิธีนั้นมาใช้ อาจทำให้ได้ค่าที่ไม่ถูกต้องในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น ดังนั้นจึงเก็บตัวอย่างน้ำเหลืองตามลักษณะข้างต้น และนำข้อมูลที่ได้จากทั้งสองวิธีมาทำการวิเคราะห์โดยใช้ Student Paired t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยแบ่งการวิเคราะห์ ออกเป็นสองลักษณะคือ

- ก) แยกการวิเคราะห์ออกเป็นสามช่วงตามระดับความเข้มข้นของ E_2
 ระดับที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 400 พิโคโมล/ลิตร (follicular phase)
 ระดับที่ความเข้มข้นระหว่าง 401-699 พิโคโมล/ลิตร (luteal phase)
 ระดับที่ความเข้มข้นสูงกว่า 700 พิโคโมล/ลิตร (mid cycle)

นำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้นี้มาทำการประเมินผลทางสถิติ โดยใช้ Student Paired t-test ปรากฏผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 ก.

ข) วิเคราะห์โดยรวมข้อมูลทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากข้อ ก. ผลที่ได้ปรากฏว่าข้อมูลจากวิธีใหม่มีความสอดคล้องต้องกันกับวิธีมาตรฐานทั้งสามระดับความเข้มข้น ดังนั้นจึงนำข้อมูลทั้งหมดมารวมกันและหาค่า Student Paired t-test ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 ข.

ตารางที่ 3 ประเมินผลการวิเคราะห์ E_2 ทั้ง 2 วิธีโดยวิธีการทางสถิติ

	ความเข้มข้น ของ E_2	ค่า t ที่ได้	ค่า t จากตาราง	Degree of freedom	Statistical significance
3 ก	< 400	- 0.99	$\pm$ 2.030	32	NS
	401 - 699	- 0.03	$\pm$ 2.030	32	NS
	> 700	- 0.65	$\pm$ 2.030	33	NS
3 ข	< 400 - > 700	- 1.30	$\pm$ 1.982	99	NS

NS = Non significance

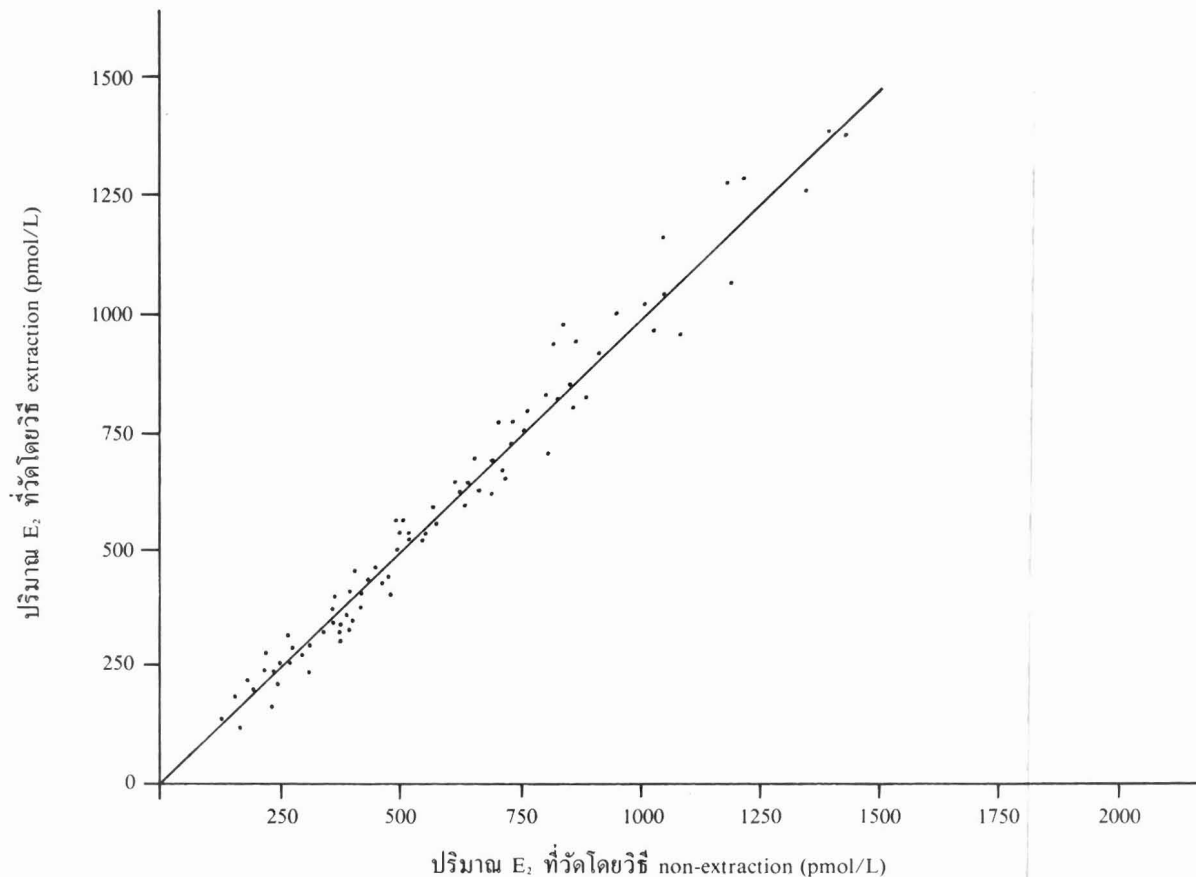
และเมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้างต้น มาหาความสัมพันธ์โดยใช้สถิติถดถอยเชิงเส้นตรง เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ ได้ค่า $r = 0.99$ (รูปที่ 3)

ค่าสมการของเส้นถดถอย

$$Y = a + bX$$

$$Y = 0.05 + 1.009 X$$

แสดงให้เห็นว่าทั้งสองวิธีนี้ให้ผลการวิเคราะห์ E_2 ได้สอดคล้องกันโดยไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 3. ความสัมพันธ์ของปริมาณ E_2 ที่วัดโดยวิธี non-extraction และ extraction

วิจารณ์

การวิเคราะห์ปริมาณ E_2 ในน้ำเหลืองด้วยวิธีมาตรฐาน จะต้องใช้สารละลายอินทรีย์เช่น อีเทอร์ สกัดแยก E_2 ออกจากโปรตีนในน้ำเหลือง ทำให้สิ้นเปลืองทั้งค่าใช้จ่ายและเวลา จึงไม่เหมาะที่จะนำมาให้บริการทางการแพทย์ คณะผู้วิจัยจึงคิดค้นและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ E_2 จากน้ำเหลืองโดยตรง การวิเคราะห์ E_2 โดยวิธีนี้ จะต้องเติมสาร 2 ชนิด คือ DHT และ danazol อย่างละ 5 นาโนกรัมลงในน้ำเหลืองตัวอย่าง ก่อนการวิเคราะห์ E_2 โดยวิธี RIA DHT และ danazol มีคุณสมบัติในการ saturate protein binding site เช่น SHBG ทำให้โปรตีนในน้ำเหลืองไม่เข้าระบบปฏิบัติการ RIA แต่เนื่องจากได้มีการเติม DHT และ danazol ลงในหลอดทดลอง ที่จะนำไปทำปฏิกิริยา RIA เพื่อวิเคราะห์ E_2 ในขั้นตอนต่อไป คณะผู้วิจัยจึงต้องพิสูจน์ให้เห็นว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้ ไม่ทำปฏิกิริยากับ Ab- E_2 โดยการเติม danazol ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 500 พิโคกรัม – 500 ไมโครกรัม ผลปรากฏว่า danazol ทำปฏิกิริยากับ Ab- E_2 เพียง 0.002% ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับผลของ Schwarz and Boyd (1982) ส่วน DHT ยังไม่มีรายงานมาก่อนแต่ก็ได้ทำการทดลองแบบเดียวกับ danazol และพบว่าไม่มีปฏิกิริยากับ Ab- E_2 เพียง 0.02% เท่านั้น แสดงให้

เห็นว่าสาร 2 ชนิดนี้ แม้จะให้ความเข้มข้นสูงมาก ๆ ประมาณหมื่นเท่าของความเข้มข้นที่ใช้อยู่ ก็ไม่รบกวนปฏิกิริยาการวิเคราะห์ E_2 ส่วน $Ab-E_2$ ที่ใช้สำหรับวิธีใหม่นี้ คณะผู้วิจัยได้ใช้เป็นชนิด monoclonal Ab และใช้ antibody dilution คือ 1 : 200000 (initial dilution) ส่วนวิธีมาตรฐานยังคงใช้ polyclonal Ab และใช้ antibody dilution 1 : 10000 (initial dilution) ทั้งนี้เนื่องจากพบว่า ถ้าใช้ polyclonal Ab กับวิธีใหม่ ผลการวิเคราะห์ E_2 จะต่ำกว่าวิธีมาตรฐานมาก โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ ซึ่ง Hoffmann (1978) ก็ได้กล่าวว่า ปฏิกิริยา RIA จะ sensitive เกินไป ขึ้นกับความจำเพาะของ Ab ที่ใช้ และ Eshhar (1985) กล่าวว่า monoclonal Ab มีความจำเพาะสูงกว่า polyclonal Ab นอกจากนี้การใช้ monoclonal Ab ก็ใช้ในความเข้มข้นที่เจือจางกว่า polyclonal Ab ถึง 20 เท่า ซึ่งส่งผลคือทำให้อิทธิพลของโปรตีนอื่นใน Ab ที่อาจมีผลต่อปฏิกิริยาการวิเคราะห์เจือจางลงด้วย ทำให้การวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำขึ้น

จากการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างวิธีใหม่กับวิธีมาตรฐานพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.99 และการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีใหม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน ดังตารางที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งเป็นข้อสนับสนุนว่าวิธีการใหม่นี้สามารถใช้ได้เท่าเทียมกับวิธีมาตรฐาน

ด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น ทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารละลายอินทรีย์ และยังทำให้การวิเคราะห์ได้ผลเร็วขึ้นด้วย คือใช้เวลาเพียง 5 ชม. เท่านั้น นอกจากนี้ยังลดปริมาณน้ำเหลืองตัวอย่างลงถึง 10 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน (วิธีมาตรฐานใช้น้ำเหลือง 0.5 มล.) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อคนไข้ เพราะทำให้ภาวะกดดัน (stress) ลดน้อยลง คนไข้บางรายต้องส่งตรวจ E_2 ติดต่อกันหลายวัน เช่นการติดตามการตกไข่ในคนไข้ที่มารักษาภาวะการมีบุตรยาก (Cheesman *et al.*, 1982) การลดภาวะกดดันทำให้ระดับฮอร์โมนไม่ถูกรบกวน ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการพยากรณ์พยาธิสภาพรังไข่ได้ถูกต้อง และนอกจากนี้การลดปริมาณน้ำเหลืองที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเป็นผลดีต่อคนไข้คือเสียเลือดน้อยลง เพราะการเจาะเลือดในปริมาณที่มาก (10 มล. ขึ้นไป) หลาย ๆ ครั้งติดต่อกัน อาจทำให้เกิดภาวะโลหิตจางชั่วคราวได้

ส่วนข้อเสียของวิธีใหม่มีสาเหตุมาจากการใช้ปริมาณน้ำเหลืองน้อย ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณ E_2 ที่อยู่ในระดับต่ำกว่า 5.44 พิโคกรัม/มล. แต่ข้อบกพร่องนี้สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มปริมาณน้ำเหลืองที่ใช้เป็น 0.1 มล. ในขณะที่ปริมาณ $^3H-E_2$ และ $Ab-E_2$ ยังคงใช้เท่าเดิม อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มข้นนี้จะพบได้น้อยมาก และไม่มีผลสำคัญต่อการวิเคราะห์โรคทางสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ข้อเสียอีกอย่างหนึ่งของวิธีใหม่คือ จะพบว่าการเชื่อถือได้ของวิธีการทดลอง (validity of assay) ในระดับความเข้มข้นต่ำนั้น จะมีค่าสัมประสิทธิ์ของความเบี่ยงเบนในการวัด (CV) สูงกว่าวิธีมาตรฐานเล็กน้อย ทั้งนี้สาเหตุมาจากปริมาณน้ำเหลืองที่ใช้น้อยมาก ทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้มากกว่าวิธีมาตรฐาน แต่ก็อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (CV = 20.54%) สำหรับค่าความเข้มข้นระดับกลางและสูง % CV ไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐานมากนัก ซึ่งสอดคล้องกับจุดประสงค์ของการพัฒนาหาวิธีใหม่ คือหาวิธีที่จะนำมาใช้ในการบริการทางการแพทย์ เพื่อพยากรณ์พยาธิสภาพของรังไข่ในสตรีที่มีบุตรยาก และการวิเคราะห์ E_2 เพื่อหาระยะเวลาการตกไข่ สำหรับใช้ในการบริการผสมเทียมหรือทำ IVF จากรายงานพบว่าระดับ E_2 มากกว่า 200 พิโคกรัม/มล. ขึ้นไป จึงสามารถทำให้เกิดการตกไข่ (Roy *et al.*, 1965) ซึ่งวิธีใหม่นี้สามารถวัดความเข้มข้นที่ระดับนี้ได้ถูกต้องแม่นยำเท่าเทียมกับวิธีมาตรฐาน ดังนั้นวิธีใหม่นี้จึงนำมาใช้บริการเพื่อหาระยะเวลาการตกไข่สำหรับการทำการผสมเทียมและ IVF ในหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งปรากฏว่าได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจ

จากผลการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยคิดว่าวิธีการวิเคราะห์ E_2 โดยวิธีใหม่นี้จะเป็นประโยชน์ต่อสูติ-นรีแพทย์ ที่จะวิเคราะห์และพยากรณ์โรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ และรวดเร็วทันการ ซึ่งไม่เพียงแต่แพทย์เท่านั้นที่จะได้ประโยชน์ ยังเป็นผลดีต่อคนไข้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะกรรมการทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ที่อนุมัติให้เงินอุดหนุนโครงการวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาสูติ-นรีเวชวิทยา ที่อนุมัติให้ใช้อุปกรณ์ สถานที่ และบุคลากรของหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบคุณอาจารย์พาวิษฐ์ รัตนโกมล แห่งมหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต ที่ได้ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูลเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- Abraham GE. 1969. Solid phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . *J Clinical Endocrin and Metab* **29** : 866-870.
- Cheesman KL, Ben-nun I, Chatterton Jr RJ, and Cohen MR. 1982. Relationship of luteinizing hormone, pregnandiol-3 α -glucuronide and estradiol-16 α -glucuronide in urine of infertile women with endometriosis. *Fert and Steril* **38** : 542-548.
- De Boever J, Kohen F, Usanachitt C, Vandekerckhove D, Leyseeie D, and Vandewalle L. 1986. Direct chemiluminescence immunoassay of estradiol in serum. *Clin Chem* **32**(10) : 1895-1900.
- Doerr P. 1973. Hapten radioimmunoassay of plasma estradiol. *Acta Endocrin (KBH)* **72** : 330-344.
- Dunn JF, Nisula BC, and Rodbard D. 1981. Transport of Steroid Hormones : Binding of 21 endogenous steroids to both testosterone binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrin and Metab* **53**(1) : 58-68.
- Eshhar Z. 1985. Introduction in "Embo practical course on hybridomas and monoclonal antibody". The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel. pp 3-5.
- Hoffmann B. 1978. Use of radioimmunoassay for monitoring hormonal residues in edible animal products. *J Assoc of Anal Chem* **61**(5) : 1263-1273.
- Huber PR, Helfer M, and Vitins P. 1980. Radioimmunoassay of estradiol on unextracted human plasma. (Abstract). *Clin Chem* **26** : 960.
- Jurjens H, Pratt JJ, and Woldring MG. 1975. Radioimmunoassay of plasma estradiol without extraction and chromatography. *J Clin Endocrin and Metab* **40**(1) : 19-25.
- Kohen F, Kim JB, Barnard G, and Lindner HR. 1980. An immunoassay for urinary estriol-16 α -glucuronide based on antibody enhanced chemiluminescence. *Steroids* **36** : 405-419.
- Loriaux DL, Guy R, and Lipsett MB. 1973. A sample, quick, solid-phase method for radioimmunoassay of plasma estradiol in late pregnancy and of plasma cortisol. *J Clin Endocrin and Metab* **36** : 788-790.
- Mac Donald BJ, Sauer MJ, and Watson ED. 1982. Estradiol-17 β profiles in defatted bovine milk as determined by direct radioimmunoassay. *Br Vet J* **138** : 449-453.
- Moss Jr AJ, and Gammill J. 1976. Chemical principles important in radioimmunoassay. In "Practical Radioimmunoassay." (Moss Jr AJ, Dalrymple GV, and Boyd CM. The C.V. Mosby Company, St. Louis) pp 34-37.
- Preedy JRK. 1965. Estrogen assay in clinical medicine. CA Paulsen (ed.) University of Washington Press, Seattle. pp 162-167.
- Pugeat MM, Dunn JF, and Nisula BG. 1981. Transport of Steroid Hormones : Interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrin and Metab* **53**(1) : 69-75.

- Roy EJ. 1962. Application of the Ittrich extraction procedure to the fluorometric measurement of estrogen in blood. *J Endocrin* **25** : 361.
- Roy EJ, Harkness RA, and Kerr MG. 1965. The concentration of estrogens in the peripheral blood of women during the normal menstrual cycle and in the first trimester of pregnancy. *J Endocrin* **31** : 177-178.
- Schwarz S, and Boyd J. 1982. Interference of danazol with the radioimmunoassay of steroid hormones. *J Steroid Biochem* **16** : 823-826.
- Sufi SB, Donaldson A, and Jeffcoate SL. 1986. WHO special programme of research, development and research training in human reproduction. 10th ed, pp 54-65.
- Van Weemen BK, Bosch AMG, Dawson EC, Van Hell H, and Schuurs AHWM. 1978. Enzyme immunoassay of hormones. *Scand J Immunol and Suppl* **7** : 73-82.