

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินการวิจัย

3.1.1 หมู่บ้านและเกษตรกร

หมู่บ้านในการศึกษาครั้งนี้ เป็นหมู่บ้านที่ร่วมอยู่ในโครงการปลูกพืชสลับทุ่งหญ้า ที่มี การเลี้ยงโคนมอยู่แล้ว มีเกษตรกรเลี้ยงโคนม 2-5 ตัวต่อครัวเรือน ซึ่งระบบการเลี้ยง เป็นแบบปล่อยให้หากินในทุ่งหญ้าธรรมชาติสลับกับแปลงหญ้าที่ปลูก พร้อมกับอาหารเสริมบ้าง ขึ้นกับอาหารที่ผลิตได้ในท้องถิ่นซึ่งเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล หมู่บ้านดังกล่าวคือ หมู่บ้านใน นิคมสร้างตนเองเขื่อนอุบลรัตน์ อ.อุบลรัตน์ จ.ขอนแก่น และหมู่บ้านเขวา อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม หมู่บ้านนิคมเขื่อนอุบลรัตน์ มีเกษตรกรเลี้ยงโคนม 17 ครัวเรือน และ หมู่บ้านเขวา มีเกษตรกรเลี้ยงโคนม 16 ครัวเรือน รวมทั้ง 2 หมู่บ้านมีเกษตรกรทั้งหมด 33 ครัวเรือน

3.1.2 การตรวจสอบสมรรถนะทางการสืบพันธุ์ของโคนมลูกผสม

แบ่งโคนมที่ศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสม จากบันทึกพันธุ์ประวัติเพื่อทราบ ถึงอายุแม่โคเมื่อให้ลูกตัวแรก ระยะเวลาตั้งท้อง ช่วงห่างการตกไข่ ระยะเวลาหลังคลอด การกลับมาเป็นสัดหลังคลอด การผสมครั้งแรกหลังคลอด การผสมติดหลังคลอด

กลุ่มที่ 2 การติดตามการหางานของรังไข่ โดยการวัดระดับ P4 ในน้ำนมเป็น เวลานาน 5 เดือนหลังคลอด เก็บตัวอย่างน้ำนมสัปดาห์ละ 1 ครั้ง หลังจากการรีดนม ในตอนเช้า

กลุ่มที่ 3 การชั่งน้ำหนักโคสาวที่ทราบวันเกิด เพื่อศึกษาอายุและน้ำหนักเมื่อโคเป็นหนุ่มสาว โดยสังเกตจากการเป็นสัดและผสมพันธุ์ครั้งแรก

3.1.3 การเก็บตัวอย่างน้ำนม เก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคที่คลอดทั้งหมดในช่วงเดือนเมษายน 2531 ถึงเดือนเมษายน 2532 โดยเริ่มเก็บจาก 15 วันหลังคลอด ทิ้งกันสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา นาน 5 เดือนหลังคลอด

3.1.4 การวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนม การวัดระดับ P4 ในน้ำนม ทำโดยวิธี radioimmunoassay (RIA) ในห้องปฏิบัติการรังสี คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2 วัสดุทดลอง

3.2.1 สัตว์ทดลอง โคแม่ลูกผสมที่เลี้ยงโดยเกษตรกรรายย่อยในหมู่บ้าน ประกอบด้วย โคสาวอายุ 1.5-2 ปี จำนวน 19 ตัว แม่โคแม่ที่คลอดลูกในช่วงเมษายน 2531-เมษายน 2532 จำนวน 47 ตัว เกษตรกรบางรายได้ขายแม่โคแม่ก่อนที่สิ้นสุดระยะการเก็บตัวอย่าง และเกษตรกรบางรายหยุดรีดนมเพราะโคให้ม่น้อย ดังนั้นจึงเหลือโคแม่ที่เก็บตัวอย่างน้ำนมได้สมบูรณ์ 31 ตัว เมื่อสิ้นสุดระยะการเก็บน้ำนม และแม่โคแม่ทั้งหมดใน 2 หมู่บ้าน ใช้ศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ในโคแม่

3.2.2 เครื่องชั่งน้ำหนัก เป็นเครื่องแบบยกไปประกอบได้(portable) ของบริษัท Dalgety Winchcombe FQC รุ่น Ruddweight model KM1 microprocessor

3.2.3 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำนม ขนาด 20 มล. สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำนมของโคแม่ตัวละ 7-10 มล. ภายในขวดบรรจุวัสดุกันเสีย lactab mark II (26.4 mg potassium dichromate and 6.1 mg mercuric chloride in a salt base) ของบริษัท Thompson & Capper จำกัด

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรเจสเตอโรน

antitobody progesterone
 standard progesterone
 tritiated progesterone
 charcoal suspension
 phosphate-buffered saline (PBS)
 counting solution (scintillant)

3.2.5 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

หลอดทดลอง ขนาด 12x75 มล.

หลอดทดลอง ขนาด 13x100 มล.

เครื่อง Vortex mixer ใช้ในการปั่นน้ำมันและผสมสารเคมีต่าง ๆ ให้เข้ากัน

ขณะวิเคราะห์

pipette ขนาด 20 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l และ 250 μ l

ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำมันและสารเคมีในการวิเคราะห์

refrigerated centrifuge

test tube racks

sonicfier ใช้สำหรับตีไขมันในน้ำมันให้กระจายไปทั่วในตัวอย่างน้ำมัน

liquid scintillation counter รุ่น LKB 1800

scintillation vials

magnetic stirrer

3.3 สถานที่ทำการศึกษา

3.3.1 สถานที่เก็บข้อมูลของโคมลูกผสม ทำในหมู่บ้านนิคมสร้างตนเองเขื่อนอุบลรัตน์ จ.ขอนแก่น และหมู่บ้านเขวา อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม

3.3.2 สถานที่ทำการวิเคราะห์ฮอว์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนม ของโคมที่ทำการศึกษาคำเนินการที่ห้องปฏิบัติการรังสี อาคารศูนย์ศึกษาค้นคว้าและพัฒนาการเกษตรกรรมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.4 ระยะเวลาในการศึกษา

มกราคม 2531 - สิงหาคม 2532

3.5 วิธีการศึกษา

3.5.1 การบันทึกข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับเกษตรกรและสภาพการเลี้ยงโคม ทำโดยใช้แบบสอบถามดังแสดงไว้ในภาคผนวก ในระหว่างการศึกษา มกราคม 2531- สิงหาคม 2532

3.5.2 การบันทึกพันธุประวัติของโคมลูกผสมใน 2 หมู่บ้าน โดยการรวบรวมจากบันทึกที่มีอยู่เดิม และข้อมูลที่เก็บเพิ่มเติมในช่วงที่ทำการศึกษา ข้อมูลที่บันทึกได้แก่ พันธุ์ วันเกิด วันเป็นสัด วันผสมพันธุ์ครั้งแรก วันที่ให้ลูกตัวแรก การเป็นสัดหลังคลอด การผสมพันธุ์หลังคลอด ช่วงห่างการคลอด ระยะเวลาตั้งท้อง เพศของลูก ทำการจดบันทึกการผสมพันธุ์และการคลอด จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

3.5.3 อายุและน้ำหนักโคสาว ได้จากโคที่เกิดในหมู่บ้านนิคมสร้างตนเองเขื่อนอุบลรัตน์ ที่ทราบวันเกิดที่ถูกต้อง ซึ่งน้ำหนักเมื่อโคอายุ 1.5-2 ปี เดือนและครั้งจนกว่าโคเป็นสัด และได้รับการผสมพันธุ์

3.5.4 อายุแม่โคที่ให้ลูกตัวแรก ได้จากโคที่เกิดในหมู่บ้านที่ทำการศึกษที่สามารถตรวจวันที่แม่โคเกิด และให้ลูกตัวแรกได้ถูกต้อง โดยการตรวจสอบประวัติย้อนหลังไป

3.5.5 ช่วงห่างการให้ลูก ศึกษาจากโคทั้ง 2 หมู่บ้าน ร่วมกับการตรวจสอบประวัติย้อนหลังไป 3 ปี เพื่อหาช่วงห่างการตกลูกระหว่างลูกตัวที่ 1 กับตัวที่ 2 และระหว่างลูกตัวที่ 2 กับตัวที่ 3 และช่วงอื่น ๆ

3.5.6 ระยะเวลาตั้งท้อง นับจากวันที่โคได้รับการผสมพันธุ์และตั้งท้องไปจนถึงวันที่โคคลอดลูก จากการจดบันทึกวันผสม และวันคลอด การสังเกตการไม่กลับมาเป็นสัดหลังผสม 1-3 รอบการเป็นสัด แสดงว่าโคผสมติดและตั้งท้อง

3.5.7 การกลับมาเป็นสัดหลังคลอด ศึกษาจากโคที่คลอดลูกทั้งหมด โดยนับเวลาจากคลอดลูกถึงกลับมาเป็นสัด การตรวจการเป็นสัดทำโดยให้เกษตรกรผู้เลี้ยงเป็นผู้สังเกต ถ้ามีการเป็นสัดตัวอื่นหรือยอมให้ตัวอื่นทับแล้วยืนนิ่ง มีน้ำเมือกไหล ถือว่าเป็นสัด หรือประกอบกับการตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนม

3.5.8 อัตราการผสมติด คำนวณจาก อัตราส่วนของจำนวนแม่โคที่ผสมติดต่อจำนวนโคที่ผสมพันธุ์ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ

3.5.9 ระยะเวลาหลังคลอด ใช้ข้อมูลจากการเป็นสัดครั้งแรก และการผสมติดหลังคลอด โดยศึกษาระยะห่างจากคลอดถึงเป็นสัดครั้งแรก ระยะห่างจากคลอดถึงผสมพันธุ์ครั้งแรก ระยะห่างจากคลอดถึงผสมติดหลังคลอด และระยะห่างระหว่างการผสมครั้งแรกถึงการผสมติดหลังคลอด สำหรับการผสมติดหลังคลอด สังเกตจากโคไม่กลับมาเป็นสัดหลังผสม 60-90 ประกอบกับการตรวจวัดระดับ P4 ในน้ำนมที่มีระดับสูงนานไม่น้อยกว่า 3 สัปดาห์ หลังจากผสมพันธุ์ หรือจากโคที่คลอดลูกในช่วงเวลาที่ศึกษา โดยนับเวลาย้อนหลังตามวันคลอดวันที่ผสมหลังคลอดจากบันทึกการผสมพันธุ์

3.5.10 การเก็บตัวอย่างน้ำนม เก็บตัวอย่างน้ำนมบริสุทธิ์(whole milk) จากโคที่คลอดทั้งหมดโดยเริ่มเก็บ 15 วันหลังคลอด และห่างกันสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 5 เดือน วิธีการเก็บใช้ขวดเก็บตัวอย่างขนาด 20 มล. ที่บรรจุวัตถุกันเสีย (lactab) เกษตรกรเป็นผู้เก็บตัวอย่างน้ำนม โดยใช้โซริงค์พลาสติก ดูดตัวอย่างน้ำนม ขนาด 7-10 มล. จากน้ำนมทั้งหมด ที่รีดในตอนเช้า ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาขวดให้แน่น บันทึกเบอร์โควันที่ เดือน ปีที่เก็บ ก่อนนำไปแช่เย็นในกระติกน้ำแข็ง หรือในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 °C ได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น จึงเอาไปเก็บแช่แข็งในตู้เย็น (-20 °C) จนกว่าจะทำการวิเคราะห์หาระดับ P4

3.5.11 การวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนม

การวิเคราะห์ P4 ในน้ำนม ใช้วิธีการของมัตริวเรดและคณะ(2531) มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม phosphate-buffered saline (PBS) ที่ pH 7.0 ประกอบด้วย 0.01 M phosphate, 0.14 M sodium chloride และ 0.01% merthiolate

- สารละลาย ก (0.5 M sodium phosphate = monobasic) เตรียมจาก sodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 78.005 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

- สารละลาย ข (0.1 M sodium phosphate = dibasic) เตรียมได้จาก disodium hydrogen phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 17.84 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

- สารละลาย ค (1.05 M sodium chloride) เตรียมได้จาก sodium chloride (NaCl) 61.425 กรัม และ merthiolate 0.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

นำสารละลาย ก 6.66 มล. สารละลาย ข 66.67 มล. และสารละลาย ค 133.3 มล. มาผสมกัน เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร เติม gelatin 0.1% โดยละลาย gelatin 1 กรัมในน้ำอุ่น 50 มล. หวังไว้ให้เย็นใส่ลงในสารละลายที่ผสมกันแล้ว ใช้ magnetic stirrer คนตลอด ปรับค่า pH ให้เป็น 7.0 โดยใช้ NaOH 1 M เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำ 4 °C

2. การเตรียม counting solution (scintillant) โดยชั่งน้ำหนัก PTP 7.5 กรัม และ POPOP 0.25 กรัม ละลายใน toluene 2500 มล. ทิ้งไว้อย่างน้อย 3 วันก่อนใช้เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากันดี เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลได้นาน ไม่ต้องเข้าตู้เย็น

3. การเตรียม charcoal suspension โดยชั่ง Norit A 0.625 กรัม และ dextran T 60 0.0625 กรัม ผสมให้เข้ากันในสารละลาย PBS 100 มล. คนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลานาน 30 นาที นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ในขณะใช้ต้องใช้อุณหภูมิ 4 °C เสมอ และต้องคนอยู่ตลอดเวลา

4. การเตรียม tritiated progesterone ($^3\text{H-P}$) โดยใช้ $^3\text{H-P}$ บรรจุใส่ขวด 5 มล. มีความแรง 250 ไมโครคูรี (μCi) ในตัวทำละลาย benzene:ethanol 9:1 โดยปริมาตร จนได้สารละลายขนาด 5 มล. ที่มีความเข้มข้น $50 \mu\text{Ci/ml}$ เรียกสารละลายนี้ว่า stock solution A

5. การเตรียม $^3\text{H-P}$ เพื่อใช้ในการวัดปริมาณ นำ stock solution A 20 ไมโครลิตร (μl) มาระเหยให้แห้งภายใต้ในโตรเจนที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม PBS 10 มล. เขย่าให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้นของ $^3\text{H-P}$ 100 นาโนคูรีต่อมิลลิลิตร (nCi/ml) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C (ควรมีการทดสอบค่า cpm เสมอคือ ใน $100 \mu\text{l}$ ควรมีค่า $\text{cpm} = 8,000-12,000$)

6. การเตรียม progesterone antiserum (As-P) โดยใช้ progesterone antiserum P/040 (stock) มาเจือจางให้ได้อัตราส่วน 1:1500 โดยใช้ stock $20 \mu\text{l}$ เจือจางด้วย PBS 20 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

7. การเตรียมสารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน

สารละลาย I เตรียมโดยใช้ P4 10 มก. และเมทานอลบริสุทธิ์ 10 มล. ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายที่มีปริมาณ P4 1 มก. ต่อเมทานอลบริสุทธิ์ 1 มล.

สารละลาย II เตรียมโดยใช้สารละลาย I 10 ไมโครลิตร และ PBS 10 มล. ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายที่มีปริมาณโปรเจสเตอโรน 1 ไมโครกรัมต่อมล.

การเติมโปรเจสเตอโรนมาตรฐานให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1000 พิโคกรัมต่อมล. ดังรายละเอียดในตารางที่ 6

สารละลาย II เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ได้ตลอด

สารละลายมาตรฐานเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ได้ประมาณ 1 เดือน

8. การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อควบคุมมาตรฐานและตัวอย่างน้ำมัน สารตัวอย่างที่ใช้ควบคุมมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์มี 3 ระดับคือ

ตัวอย่างเบอร์ 1 เก็บน้ำมันจากแม่โคในวันที่เป็นสัด ซึ่งมีระดับโปรเจสเทอโรนต่ำ

ตัวอย่างเบอร์ 2 เก็บน้ำมันจากแม่โคในวันที่ 5 หลังจากวันผสม ซึ่งมีโปรเจสเทอโรนอยู่ในระดับปานกลาง

ตัวอย่างเบอร์ 3 เก็บน้ำมันจากแม่โคที่ท้องประมาณ 5 เดือน ซึ่งมีโปรเจสเทอโรนอยู่ในระดับสูง

เก็บตัวอย่างน้ำมันทั้ง 3 ระดับ ให้มีปริมาณเพียงพอต่อการทดลอง นำตัวอย่างน้ำมันแต่ละระดับให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนทำการวิเคราะห์ โดยใช้ vortex mixer และเครื่อง sonicfier

9. การเตรียมหลอดทดลองเพื่อนำเข้าวัด เตรียมหลอดทดลองขนาด 12x75 มล. เพื่อทำเครื่องหมายดังนี้

หลอดมาตรฐาน (A ถึง J) เพื่อใช้เทียบหาปริมาณโปรเจสเทอโรน

หลอด NSB (non specific binding) คือหลอดที่ใช้เป็นตัวตรวจระบบการแยกโปรเจสเทอโรนอิสระออกจากที่ รวมตัวกับ antibody โดยใช้ charcoal ในหลอดนี้ ไม่มี antiserum ผสมอยู่ ทั้งหลอดมาตรฐานและหลอด NSB ทำ 3 ซ้ำ (triplicate)

หลอดควบคุมมาตรฐาน โดยทำ 4 ซ้ำ (tetra tube) ในแต่ละระดับของสารตัวอย่างที่มีค่าสูง ปานกลาง และต่ำ

หลอดตัวอย่างที่ใช้วัดหาระดับฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน ทำ 2 ซ้ำ (duplicate)

ตารางที่ 6 แสดงการเตรียมสารละลายโปรเจสเทอโรนมาตรฐาน

สารละลาย	สารละลายที่ใช้ผสม		ปริมาณ PBS	ปริมาณสารละลายที่ต้องการ
ที่ต้องการ	ชื่อสาร	ปริมาณ (มล.)	ที่ใช้ผสม (มล.)	(พิโคกรัมต่อ 0.05 มล.)
A	II	0.1	5.0	1000
B	A	2.5	2.5	500
C	B	2.5	2.5	250
D	C	2.0	3.0	100
E	D	2.5	2.5	50
F	E	2.5	2.5	25
G	F	2.0	3.0	10
H	G	2.5	2.5	5
I	H	2.5	2.5	2.5
J	-	-	5.0	-

10. ขั้นตอนการวิเคราะห์โปรเจสเทอโรนในน้ำนม

10.1 เติมสารละลาย A ถึง J 50 ไมโครลิตร ในหลอด A ถึง J ที่เตรียมไว้ตามลำดับ สำหรับหลอด NSB ใส่ PBS 50 ไมโครลิตรแทน เติมห่วงน้ำนมในวันที่เป็นสัปดาห์ 20 ไมโครลิตรทุกหลอด เติม PBS 250 ไมโครลิตรทุกหลอด

10.2 เติมห่วงน้ำนมที่ใช้ควบคุมมาตรฐาน โดยหลอด ก ใช้ในวันที่เป็นสัปดาห์หลอด ข ใช้ในวันในวันที่ 5 หลังจากเป็นสัปดาห์ และหลอด ค ใช้ในวันอาทิตย์ที่ 5 เดือนเป็นหลอดควบคุมมาตรฐานในระดับต่ำ ปานกลาง และสูง ตามลำดับ เติมน้ำนมดังกล่าว 20 ไมโครลิตร ในหลอดที่เตรียมไว้ เติม PBS 250 ไมโครลิตร ทุกหลอด

10.3 เติมตัวอย่างน้ำมันที่ต้องการวิเคราะห์หาโปรเจสเทอโรน 20 ไมโครลิตร ในหลอดที่เตรียมไว้ และเติม PBS 250 ไมโครลิตร ทุกหลอด

10.4 เติม As-P 100 ไมโครลิตรทุกหลอด ในข้อ 1, 2 และ 3 ยกเว้น หลอด NSB ไข่ PBS 100 ไมโครลิตรแทน ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

10.5 เติม ^3H -P 100 ไมโครลิตรทุกหลอด ผสมให้เข้ากันบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ค้างคืน

10.6 เตรียมภาคน้ำแข็งสำหรับ charcoal suspension ซึ่งคนด้วย magnetic stirrer ตลอดเวลา เตรียมภาคน้ำเย็นสำหรับวาง test tube rack เติม charcoal suspension 200 ไมโครลิตรทุกหลอด

10.7 ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที แล้วปั่นด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที (rpm) นาน 15 นาที

10.8 แยกส่วนที่ใส่ข้างบนใส่ใน scintillation vial เติม scintillant 4 มล. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน

10.9 นำหลอดทุกหลอดไปเข้าเครื่องวัดปริมาณรังสี liquid scintillation counter (ประสิทธิภาพ 58%) ในเวลานับหลอดละ 5 นาที

10.10 ทำการคำนวณ % binding จากหลอดที่ทำการวิเคราะห์ที่วัดออกมาเป็น cpm

ตัวอย่างการคำนวณค่าความเข้มข้นของโปรเจสเทอโรน

1. คำนวณหา % binding ดังสูตรการคำนวณดังนี้

$$\% B/B_0 = \frac{B - B_1}{B_0 - B_1} \times 100$$

$$\% B/B_0 = \text{เปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของสารกัมมันตภาพรังสี}$$

$$B = \text{cpm ของสารรังสีที่เกาะเกี่ยวกับ antibody ในสารมาตรฐานและสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์}$$

$$B_0 = \text{cpm ของสารรังสีในหลอดมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0}$$

$$B_1 = \text{cpm ของสารรังสีในหลอด NSB}$$

2. นำค่า % B/B₀ ที่วัดจากสารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 พิโคกรัมต่อ 0.05 มล. มาเขียนกราฟในกระดาษกราฟ logit-log เพื่อเป็นกราฟมาตรฐาน ใช้ในการหาค่าความเข้มข้นโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างน้ำมัน

3. นำค่า cpm ของตัวอย่างน้ำมันที่ไม่ทราบค่าทั้งหมด มาหาค่า % B/B₀ เช่นเดียวกับของโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน แล้วคิดปริมาณเป็นพิโคกรัมต่อ 0.02 มล. โดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน

ความเชื่อถือได้ของวิธีการวัดฮอร์โมน

1. ความจำเพาะ (specificity) ของ progesterone antiserum (P/040) เตรียมจาก progesterone 11 cc hemisuccinate-bovine serum albumin ในกระต่ายที่อาศัยชีวิตเคมี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งทดสอบโดยหาค่าร้อยละ cross-reaction กับ steroids ชนิดต่าง ๆ ได้ผลดังตารางที่ 7

2. ความเที่ยงตรง (precision) ความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์เดียวกัน (intra assay) ได้ใช้ตัวอย่างน้ำมัน 3 ระดับความเข้มข้น

ก. ใช้ตัวอย่างน้ำมันจากโคที่ตั้งท้อง ที่มีระดับโปรเจสเตอโรนในระดับสูง (control H)

ข. ใช้ตัวอย่างน้ำมันจากโคหลังจากเป็นสัตว์ 5 วัน มีระดับโปรเจสเตอโรนปานกลาง (control M)

ค. ใช้ตัวอย่างน้ำมันจากโคในวันที่เป็นสัตว์ ที่มีระดับโปรเจสเตอโรนในระดับต่ำ (control L)

ตารางที่ 7 แสดงความจำเพาะของ progesterone antiserum ทดสอบโดยการ
หาค่าร้อยละ cross-reaction กับ steroids ชนิดต่าง ๆ

Steroids	ร้อยละ
progesterone	100
17-hydroxyprogesterone	0.74
corticosterone	0.68
cortisol	0.001
1-androsterone	0.001
testosterone	0.001
estradiol 17 β	0.001
estrone	0.001
estriol	0.001
9, 17 β - estradiol	0.001

นำตัวอย่างทั้ง 3 ระดับไปทำการวิเคราะห์ระดับละ 15 ตัวอย่าง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าร้อยละของความแปรปรวน (CV) ปรากฏว่าค่าร้อยละของความแปรปรวนในการวิเคราะห์ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น มีค่าอยู่ระหว่าง 7-19 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 8

ความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง (inter assay) ได้ใช้ตัวอย่างน้ำมัน 3 ระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดลองความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์เดียวกัน ความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์แต่ละครั้งมีค่า CV อยู่ระหว่าง 12-19% ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 8 แสดงความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรน
ในน้ำนมในการวิเคราะห์เดียวกัน

milk sample	n	mean	SD	CV (%)
control H	15	14.98	1.10	7.34
control M	15	2.62	0.51	19.29
control L	15	0.58	0.07	11.64

3. ความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) เป็นค่าความเข้มข้นของ P4 ที่ต่ำสุดที่สามารถวัดได้ หาโดยใช้ standard zero 40 หลอด ทำ assay ในครั้งเดียวกัน พร้อมกับทำ calibrators อื่น ๆ และ controls เหมือน assay ปกติ หาค่าเฉลี่ย และค่า SD ของ cpm จาก standard zero 40 หลอด ใช้ ค่าเฉลี่ยที่ได้นี้เป็นค่า 0 ของกราฟมาตรฐาน หาค่า apparent progesterone concentration ที่ $\bar{X}-2SD$ ได้ค่าประสิทธิภาพต่ำสุดในการวัดระดับโปรเจสเตอโรน 0.16 ng/ml

ตารางที่ 9 แสดงความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรน
ในน้ำนมในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง

milk sample	n	mean	SD	CV (%)
control H	23	15.30	1.85	12.11
control M	23	2.81	0.55	19.57
control L	23	0.61	0.12	19.30