หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 รูปแบบและขั้นตอนการศึกษา

การศึกษาแบ่งเป็น 5 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่หนึ่ง ศึกษาการเก็บตัวอย่าง

ขั้นที่สอง ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์แอคติวิตีหรืออัตราการทำงานของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน (oxidase activity of ceruloplasmin) โดยการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสับเสตรต พาราฟีนิลีนไดอะมีน ความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมเอไซด์ที่ใช้ยับยั้งปฏิกิริยา ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial velocity) ผลของเฮปารินที่ใช้เก็บตัวอย่างต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินและความเสถียร (stability)

ขั้นที่สาม ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิดดีไฮดราเตส (activity of aminolevulinic acid dehydratase) ได้แก่ความเข้มข้นของสับเสตรตอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ปริมาณเลือดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเหมาะสมและอยู่ในความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดสีกับเออริชรีเอเจนต์และความเสถียร

ขั้นที่สี่ ศึกษาผลของตะกั่วความเข้มข้นต่างๆ ต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินและแอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสบริสุทธิ์

ขั้นที่ห้า ตรวจวัดปริมาณตะกั่วในเลือด แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินและแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส จากตัวอย่างเลือดคนปกติ คนงานโรงพิมพ์ และคนงานโรงงานแบตเตอรี โดยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบสหสัมพันธ์และการถดถอย

3.2 เครื่องมือ-อุปกรณ์ และสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1 กราไฟต์เฟอแนซอะตอมมิกแอบซอบชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Graphite furnance atomic absorption spectrophotometer)

2 สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (DU 650 Becman, U.S.A) ใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงแสงที่มองเห็น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร

3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ชนิดความเร็วไม่เกิน 3,000 รอบต่อนาที ใช้สำหรับปั่นแยกซีรัมจากเลือด และชนิดความเร็วสูง 12,000-15,000 รอบต่อนาทีใช้ปั่นหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

4 เครื่องอ่านค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Microcapillary reader)

5 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

6 เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaker Water Bath)

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ตะกั่วต้องล้างตะกั่วออกโดยแช่ด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปเป็นเวลา 1 คืนแล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งเก็บอุปกรณ์ที่ล้างและแช่กรดแล้วในภาชนะปิดที่สะอาดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของตะกั่วหรือโลหะหนักอื่นๆ ที่ติดมากับฝุ่นซึ่งมีผลต่อการวิเคราะห์ ภายหลังเสร็จปฏิบัติการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่สัมผัสกับเลือดหรือซีรัมด้วยคลอรอก (Chlorox) ก่อนทิ้งหรือล้างกลับมาใช้ใหม่เสมอ

3.2.2 สารเคมี

สำหรับเก็บตัวอย่างเลือด

1 เฮปาริน (Heparin) ความเข้มข้น 1,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (unit/ml) เพื่อป้องกันการเกิดลิ่มเลือด

เตรียมโดยเจือจางเฮปารินความเข้มข้น 5000 ยูนิตต่อมิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร เมื่อยังไม่ใช้งานเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

สำหรับล้างตะกั่ว

1 กรดไนตริกเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ใช้แช่เครื่องแก้ว

เตรียมโดยเจือจางกรดไนตริก 70 เปอร์เซ็นต์ 430 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

สำหรับวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว

1 สารละลายตะกั่วมาตรฐานที่รู้ค่าแน่นอนแล้วซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ Seronorm trace element (Whole blood) ของบริษัท Nycomed as Pharma & Sero as, Norway ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับทำกราฟมาตรฐาน (Standard graph)

2 ไนตริกแอซิด 1.6 โมลาร์ ใช้เจือจางสารละลายตะกั่ว

เตรียมโดยเจือจางกรดไน ตริก 70 เปอร์เซ็นต์ (ความหนาแน่น 1.42 กรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1.265 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่นจนครบ 20 มิลลิลิตร

สำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

1 อะซิเตตบัฟเฟอร์ (Acetate buffer) 0.1 โมลาร์ (M) พีเอช 6.0 (เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสและใช้ภายใน 1 สัปดาห์)

- อะซิติกแอซิด (Acetic acid) 0.1 โมลาร์ใช้ปรับพีเอช เตรียมจากกลาเชียลอะซิติก (Glacial acetic) 100 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 0.57 มิลลิลิตรผสมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

- โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) 0.1 โมลาร์ เตรียมจากโซเดียมอะซิเตต 4.102 กรัมผสมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้วปรับพีเอชด้วย 0.1 โมลาร์ อะซิติกแอซิด

2 โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide) 0.1 เปอร์เซ็นต์ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 สำหรับยับยั้งปฏิกิริยา เมื่อเตรียมแล้วต้องใช้ทันที

เตรียมโดยละลายโซเดียมเอไซด์ 0.065 กรัมในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร

3 สับเสตรตพาราฟีนิลีนไดอะมีนหรือพีพีดี (PPD, p-phenylene diamine) 0.426 เปอร์เซ็นต์ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 (เตรียมและเก็บในที่มืดใช้ภายใน 2 ชั่วโมง)

เตรียมโดยละลายพาราฟีนิลีนไดอะมีน 0.426 กรัมในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร

สำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส

1 ไตรตอนเอกซ์ -100 (Triton X-100) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ใช้ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก

เตรียมโดย ผสมไตรตอนเอกซ์-100 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

2 ฟอสเฟต-ซิเตตบัฟเฟอร์ (Phosphate-citate buffer) 0.25 โมลาร์ พีเอช 6.65 (เตรียมและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้ 1 สัปดาห์)

- ซิตริกแอซิด (Citric acid) 1.0 โมลาร์ สำหรับปรับพีเอช เตรียมโดยละลายกรดซิตริก 2.10 กรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

- ไดเบซิกโซเดียมฟอสเฟต (Diabasic sodium phosphate) 0.25 โมลาร์ เตรียมโดยละลายไดเบซิกโซเดียมฟอสเฟต 6.703 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรปรับพีเอชด้วยซิตริกแอซิด จนได้พีเอช 6.65 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3 สับเสตรตอะมิโนเลวูลินิกแอซิด (ALA.HCl , aminolevulinic acid) 0.01 โมลาร์ (เตรียมแล้วต้องใช้ทันที)

เตรียมโดยละลาย อะมิโนเลวูลินิกแอซิด 0.0034 กรัมในฟอสเฟตซิเตตบัฟเฟอร์ 0.25 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร

4 สารละลายไตรคลอโรอะซิติกแอซิด (TCA Reagent, trichloroacetic acid) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ในเอนเอทธิลมัลลิไมด์ (N-ethylmaleimide) ใช้ยับยั้งปฏิกิริยา เมื่อเตรียมแล้วใช้ทันที

เตรียมโดยละลายเอนเอทธิลมัลลิไมด์ 0.0125 กรัมในน้ำอุ่น 1.5 - 2.0 มิลลิลิตรจนละลายหมด จึงเติมสารละลายไตรคลอโรอะซิติกแอซิดความเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร

5 เออริชรีเอเจนต์(Ehrlish `s Reagent) 2 โมลาร์ในเปอร์คลอริกแอซิด (Perchloric acid) ใช้ทำสี

เตรียมสารละลายพาราไดเมธิลเบนซัลดีไฮด์ (DMBA, p-dimethylaminobenzaldehyde) โดยละลายพาราไดเมธิลเบนซัลดีไฮด์ 10.0 กรัมในกลาเชียลอะซิติกแอซิด 420 มิลลิลิตร (เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ถ้าเป็นผลึกให้อุ่นก่อนใช้) จากนั้นผสมสารละลายดีเอมบีเออะซิติกแอซิด 4.2 มิลลิลิตรกับ 70 เปอร์เซ็นต์ เปอร์คลอริกแอซิด (Percloric acid) จนครบ 5 มิลลิลิตร

3.3 วิธีทำการทดลอง

3.3.1 การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง

สารป้องกันการเกิดลิ่มเลือดที่ใช้คือเฮปารินเข้มข้น 1,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตรปริมาตร 15 ไมโครลิตร (15 ยูนิต) ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร สารป้องกันการเกิดลิ่มเลือดอื่นๆ เช่นอีดีทีเอ (EDTA, Ethylene diamine tetraacetic acid) ไม่อาจนำมาใช้ได้เพราะมีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินและแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส

การเก็บตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณตะกั่วในเลือดกับแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินและแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิดดีไฮดราเตส ทำโดยเจาะเลือดจากตัวอย่างคนปกติ คนงานโรงพิมพ์ และคนงานโรงงานแบตเตอรี่ซึ่งคาดว่าน่าจะมีปริมาณตะกั่วในเลือดจากน้อยไปหามากตามลำดับ แบ่งใส่หลอดเก็บตัวอย่างตัวอย่างละ 2 หลอด หลอดแรก 3 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากับสารป้องกันการเกิดลิ่มเลือด 0.04 มิลลิลิตรเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและในหลอดที่ 2 ใส่เลือด 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากับสารป้องกันการเกิดลิ่มเลือด 0.06 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินและแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ทั้งนี้แช่เย็นตัวอย่างเลือดที่ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลานับตั้งแต่ทำการเจาะเลือดเพื่อป้องกันการลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสอง เมื่อเก็บตัวอย่าง

เลือดแล้วทำการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองทันที ภายใน 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในเลือดภายใน 1 สัปดาห์

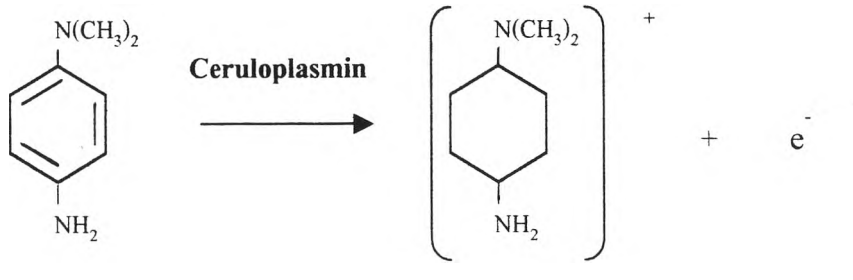
การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน ทำได้โดยแยกซีรัมจากตัวอย่างเลือดทั้งหมดปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เก็บซีรัมที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสได้นานถึง 2 สัปดาห์ (รูปที่ 4.6)

3.3.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

หมายถึงการวัดความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสับเสตรตของเซอรูโลพลาสมินโดยการติดตามอัตราการเกิดสีม่วงของผลิตภัณฑ์โดยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จากนั้นนำไปคำนวณค่าแอคติวิตีกับคาลิเบรชันกราฟของแบรนโดสกีเบส (Brandowski 's base) ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงคล้ายกับการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเซอรูโลพลาสมิน โดย 1 ยูนิตหมายถึงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นไมโครโมลต่อเวลาบ่ม (Incubate) 10 นาทีต่อซีรัม 1 ลิตร

3.3.2.1 วิธีวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

วิธีวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีของ Wolf, P. *et al.* (1973) หลักการคือวัดอัตราการออกซิไดซ์ (Oxidize) สับเสตรตพาราฟีนิลีนไดอะมีนที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 โดยติดตามอัตราการเกิดสีม่วงของผลิตภัณฑ์โดยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร



N,N-dimethyl-p-phenylenediamine N,N-dimethyl-p-phenylenediamine $_{ox}$

(λ = 530 nm)

หลอดทดสอบประกอบด้วย อะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 0.68 มิลลิลิตร เติมสับเสตรตพาราฟีนิลีนไดอะมีนความเข้มข้น 0.428 เปอร์เซ็นต์ 0.34 มิลลิลิตรแล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีเพื่อทำให้สับเสตรตพร้อมทำงาน เติมซีรัม 0.020 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มต่ออีก 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นตั้งเครื่องที่ 0 ทุกครั้ง สำหรับหลอดควบคุมใช้โซเดียมเอไซด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 0.34 มิลลิลิตรแทนอะซิเตตบัฟเฟอร์ในปริมาตรเดียวกัน โดยโซเดียมเอไซด์จะทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาระหว่างเซอรูโลพลาสมินในซีรัมกับสับเสตรต

การเกิดปฏิกิริยามีการเปลี่ยนแปลงรวดเร็วมากดังนั้นผู้ปฏิบัติการต้องระมัดระวังเรื่องเวลาในการบ่มและเวลาในการวัดค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากันทุกหลอดเนื่องจากการวิเคราะห์ใช้สารปริมาณน้อยในหน่วยไมโครกรัมจึงต้องระมัดระวังความเที่ยงตรงในการชั่งและวัดปริมาตรให้เที่ยงตรงทุกครั้ง

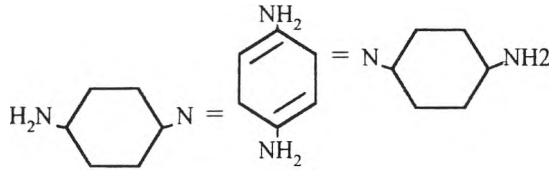
3.3.2.2 การคาลิเบรชัน

การคาลิเบรชันจะช่วยขจัดปัญหาความคลาดเคลื่อนของสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แต่ละเครื่องซึ่งอาจให้ค่าการดูดกลืนแสงต่างกันทั้งที่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นเท่ากัน

การคาลิเบรชันตามวิธีของ Wallace ซึ่งดัดแปลงจาก Houchin มีหลักการคือติดตามการดูดกลืนแสงของแบรนโดสกีเบส (Brandowski 's base) ความเข้มข้นต่างๆ (spectral absorption curve) ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงเหมือนกับสีที่เกิดขึ้นจากแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน ดังนั้นเมื่อนำมาทำคาลิเบรชันกราฟและคำนวณความสามารถในการดูดกลืนแสงของแบรนโดสกีเบสเป็นไมโครโมลต่อมิลลิลิตร (Molar absorptivity) แล้วก็สามารถคำนวณจำนวนไมโครโมลของผลิตภัณฑ์ของแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินที่เกิดขึ้นต่อเวลาต่อมิลลิลิตรของซีรัมที่ต้องการได้ แต่ละห้องปฏิบัติการต้องทำคาลิเบรชันกราฟเพื่อใช้คำนวนค่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินของตนเอง

1 การเตรียมแบรนโดสกีเบส

แบรนโดสกีเบสเป็นสารประกอบผลึกบริสุทธิ์น้ำหนักโมเลกุล 318.5 และมีสูตรโครงสร้าง (empirical formula) ดังนี้



ค่าการดูดกลืนแสงของแบรนโดสกีเบสความเข้มข้นต่างๆ มี spectral absorption curve เหมือนกับสีที่เกิดขึ้นจากแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน และเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรค่าที่ได้จะเป็นเส้นตรงตาม Beer 's law จนถึงความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 3.1)

การเตรียมแบรนโดสกีเบสทำได้โดยการออกซิไดซ์พาราฟีนิลีนไดอะมีนด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ในสารละลายแอมโมเนียดังนี้

1.1 ละลายพาราฟีนิลีนไดอะมีน 10 กรัมในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตรที่มีน้ำยาแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide) 3 มิลลิลิตร เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) 3 เปอร์เซ็นต์ 125 มิลลิลิตรแล้วบ่มน้ำยาที่ผสมแล้วในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

1.2 กรองโดย Buchner funnel แล้วล้างผลึกที่กรองด้วยน้ำกลั่นที่ขจัดไอออนและเย็น 4-10 องศาเซลเซียส

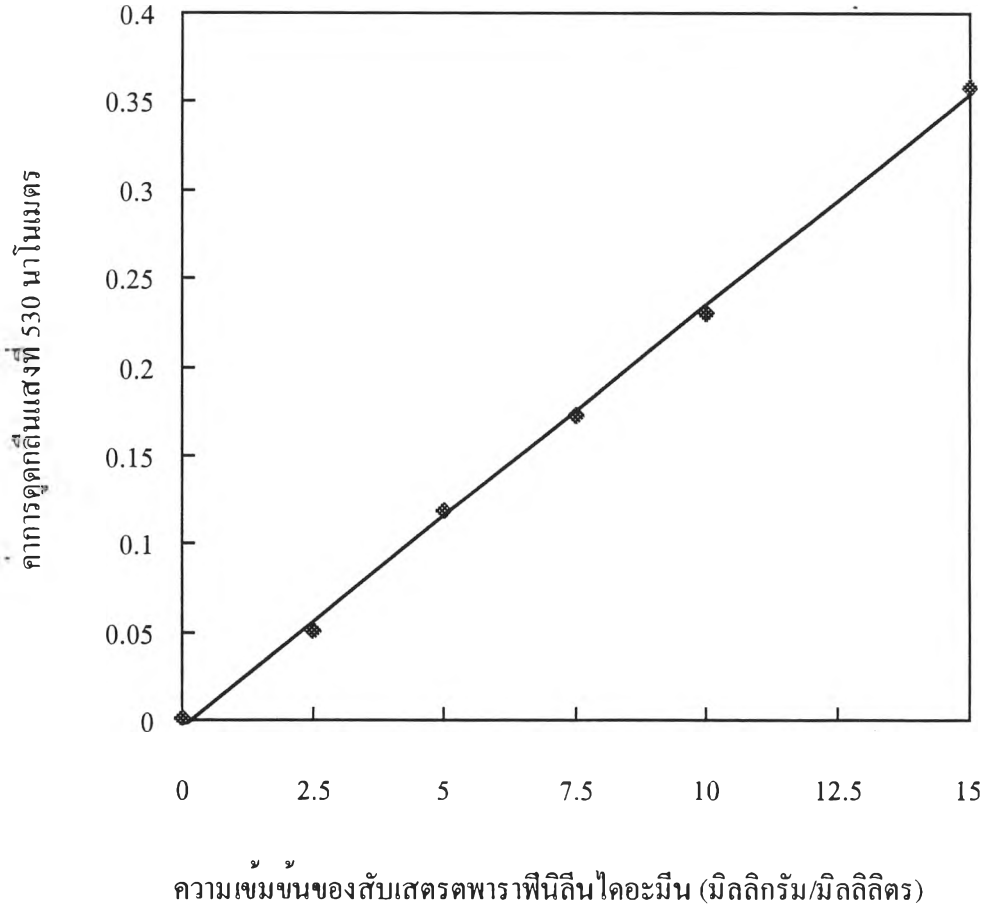
1.3 ทำผลึกให้แห้งใน Vacuum desicator ในที่มืดจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงต่อไป

2 การเตรียมสารละลายแบรนโดสกีเบสความเข้มข้นต่างๆ

ชั่งผลึกแบรนโดสกีเบส 5 มิลลิกรัมผสมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 75 มิลลิลิตรนำไปเขย่าด้วยเครื่องในที่มืดนาน 2 ชั่วโมงเพื่อให้สีอิ่มตัวเต็มที่ เติมอะซิเตตบัฟเฟอร์จนครบ 100 มิลลิลิตรจะได้สารละลายแบรนโดสกีเบสเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้น้ำยานี้ทำคาลิเบรชันกราฟภายใน 1 ชั่วโมง โดยเจือจางสารละลายแบรนโดสกีเบสให้มีความเข้มข้น 2.5 , 5.0 , 7.5 , 10.0 , 15 , 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0

3 วิธีวิเคราะห์

นำหลอดควบคุมและสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมซีรัมที่ไม่มีเม็ดเลือดแดงแตก 20 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรทันทีโดยหลอดควบคุมประกอบด้วยโซเดียมเอไซด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 0.34 มิลลิลิตร ผสมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 0.66 มิลลิลิตร นำผลที่ได้เขียนคาลิเบรชันกราฟได้ดังรูปที่ 3.1



<u>รูปที่ 3.1</u> แสดงคาลิเบรชันกราฟของแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

3.3.2.3 การคำนวณค่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินจากคาลิเบรชันกราฟ

คาลิเบรชันกราฟมีประโยชน์ในการใช้เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์ให้เป็นไมโครโมลต่อเวลาต่อปริมาณซีรัม ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้จากค่าการดูดกลืนแสงของแบรนโดสกีเบสความเข้มข้นต่างๆ

การคำนวนค่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินทำได้โดยคำนวณความสามารถในการดูดกลืนแสงของแบรนโดสกีเบส (ε) เป็นไมโครโมลต่อซีรัม 20 ไมโครลิตรแล้วนำค่า ε มาคำนวณแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินเป็นยูนิตซึ่งหมายถึงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นไมโครโมลต่อเวลา 10 นาทีต่อซีรัม 1 ลิตร

1 การคำนวณความสามารถในการดูดกลืนแสงของแบรนโดสกีเบส (Molar absorptivity) เป็นไมโครโมล ต่อมิลลิลิตร

ทำโดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงต่อความเข้มข้นของสารละลายแบรนโดสกีเบสแต่ละความเข้มข้นจากคาลิเบรชันกราฟเป็นกรัมต่อลิตร (g/l) (จากรูปที่ 3.1)

$$a = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย} \times \text{light part (cm)}}{\text{ความเข้มข้นของสารละลายนั้น (g/l)}}$$

$$a_{2.5} = \frac{0.055}{0.0025} \times 1.0 = 22$$

$$a_{5.0} = \frac{0.120}{0.005} \times 1.0 = 24$$

$$a_{7.5} = \frac{0.175}{0.0075} \times 1.0 = 23.33$$

$$a_{10.0} = \frac{0.235}{0.010} \times 1.0 = 23.5$$

$$a_{15.0} = \frac{0.357}{0.015} \times 1.0 = 23.8$$

$$a_{25.0} = \frac{0.650}{0.025} \times 1.0 = 24.2$$

หาค่าเฉลี่ย a = $\frac{22.0 + 24.0 + 23.33 + 23.5 + 23.8 + 24.2}{5}$

= 23.472

หาค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของแบรนโดสกีเบส (Molar absorptivity , ε)

ε = a x น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight)

$\varepsilon/1000$ = $\frac{23.472 \times 318.4}{1,000}$ ไมโครโมลต่อลิตร

$\varepsilon/1000$ = 7.473 ไมโครโมลต่อลิตร

2 วิธีคำนวณแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินในหน่วยสากล (International unit)

$$\text{International unit (IU)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดทดสอบ - หลอดควบคุม}) \times 50,000}{\varepsilon/1,000 \times \text{เวลา (นาที)}}$$

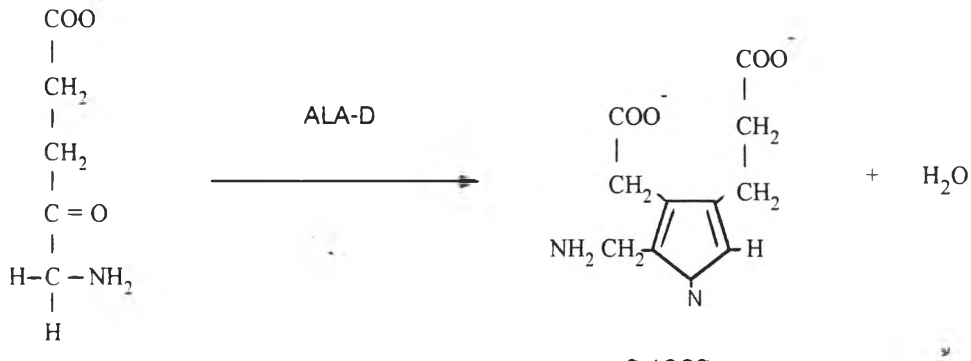
International unit คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นไมโครโมลต่อเวลา 10 นาทีต่อซีรัม 1 ลิตร

50,000 คือ ค่าที่ใช้ปรับปริมาณซีรัมที่ใช้ทดลอง 0.020 มิลลิลิตรให้เป็น 1 ลิตร

<u>หมายเหตุ</u> การคำนวณค่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินในทุกปฏิบัติการยกเว้นข้อ 4.5 ใช้ค่า ε = 7.473 เสมอ เนื่องจากเป็นซีรัมของคนคนเดียวกันและช่วงเวลาที่ทำปฏิบัติการห่างกันไม่เกิน 2 เดือน

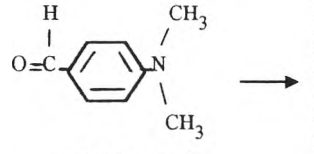
3.3.3 วิธีวิเคราะห์แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส

การวิเคราะห์แอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสตามวิธีของ Burch and Siegel ทำโดยติดตามการดูดกลืนแสงของพอโฟบิลิโนเจน (Porphobilinogen, PBG) ที่ทำให้เกิดสีชมพูกับเออริชรีเฉจนต์ โดยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่าแอคติวิตีเป็นหน่วยสากลโดย 1 ยูนิตหมายถึงการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อเวลา 1 ชั่วโมงต่อเปอร์เซ็นต์เม็ดโลหิตแดงอัดแน่น

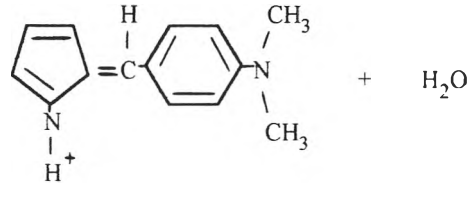


อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส

พอโฟบิลิโนเจน + น้ำ



เออริชรีเฉจนต์



(ผลิตภัณฑ์, λ = 555 nm)

3.3.3.1 วิธีวิเคราะห์แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส

ผสมเลือด 0.2 มิลลิลิตรกับไตรตอนเอกซ์-100 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เม็ดเลือดแดงแตกจนหมดเติมสับเสตรตอะมิโนเลวูลินิกแอซิด 0.01 โมลาร์ 1 มิลลิลิตรแยกสารผสม

ใส่ในหลอด 4 หลอดๆ ละ 0.5 มิลลิลิตรแบ่งเป็นหลอดควบคุม 2 หลอดและหลอดทดสอบ 2 หลอดโดยใส่สารผสมในหลอดควบคุมที่มีไตรคลอโรอะซิติกแอซิด 0.02 โมลาร์อยู่แล้ว 0.5 มิลลิลิตรเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาทันที จากนั้นนำสารผสมใน 2 หลอดที่เหลือบ่มที่ 38 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายไตรคลอโรอะซิติกแอซิด 0.02 โมลาร์หลอดละ 0.5 มิลลิลิตรทันที นำหลอดควบคุมและหลอดทดสอบมาปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีให้ตกตะกอน จากนั้นดูดสารใสด้านบน (Supernatant) 0.5 มิลลิลิตรทำสีกับเออริชรีเอเจนต์ 0.5 มิลลิลิตรบ่มให้เกิดสีชมพูนาน 13 นาทีจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร

3.3.3.2 วิธีหาค่าเม็ดโลหิตแดงอัดแน่น (hematocrit)

การคำนวณแอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส จำเป็นต้องรู้ค่าเม็ดโลหิตแดงอัดแน่นซึ่งแตกต่างกันในแต่ละคน ปริมาณเม็ดโลหิตแดงอัดแน่นหมายถึงปริมาตรของเม็ดโลหิตแดงเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรโลหิตทั้งหมด การหาค่าเม็ดโลหิตแดงอัดแน่นทำได้ 2 วิธีคือ แมคโครฮีมาโตคริต (Macrohematocrit) และไมโครฮีมาโตคริต (Microhematocrit) ในที่นี้จะกล่าวถึงแต่วิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ ไมโครฮีมาโตคริตซึ่งสะดวก ใช้เลือดปริมาณน้อยและใช้เลือดที่เจาะจากผิวหนังได้ด้วย

วิธีหาค่าเม็ดโลหิตแดงอัดแน่นแบบไมโครฮีมาโตคริต คือการวัดปริมาณเม็ดโลหิตแดงอัดแน่นโดยใช้หลอดแคปปิลารี (Microhematocrit tube) ขนาดยาว 75 มิลลิเมตรและมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในหลอด 1.0-1.2 มิลลิเมตร หลอดไมโครฮีมาโตคริตมี 2 ชนิดคือแบบเคลือบเฮปารินป้องกันการเกิดลิ่มเลือดใช้สำหรับเลือดที่เจาะจากผิวหนังและหลอดเปล่าใช้สำหรับเลือดที่ใส่เฮปารินอยู่แล้ว การบรรจุเลือดทำโดยแตะปลายหลอดด้านหนึ่งเข้าไปที่หยดเลือดเอียงหลอดเล็กน้อยเลือดจะวิ่งเข้าหลอดเองโดย Capillary attraction ประมาณ 3 ใน 4 หลอด เสร็จแล้วใช้นิ้วอุดปลายด้านที่ไม่มีเลือดบรรจุอยู่เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดไหลออกจากหลอด แล้วกดปลายหลอดอีกด้านหนึ่งลงในดินน้ำมันโดยให้หลอดอยู่ในลักษณะตั้งฉากจนดินน้ำมันอุดอยู่ด้านในหลอดสูงขึ้นมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร

หลังจากอุดปลายหลอดแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นพิเศษความเร็ว 12,000-15,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที บรรจุหลอดลงในจานปั่นโดยหันปลายด้านที่อุดดินน้ำมันออกจากจุดศูนย์กลางของเครื่องให้แตะชิดขอบจานปั่นไม่เช่นนั้นขณะปั่นเลือดจะหนีออกจากหลอดจนหมด

หลังจากปั่นเสร็จแล้วนำออกมาอ่านค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นด้วยเครื่อง อ่านค่าที่ทำขึ้นพิเศษโดยวางหลอดไมโครฮีมาโตคริตที่ปั่นแล้ว ให้ด้านที่มีดินน้ำมันอยู่ด้านล่างตรงกับขีดที่กำหนดไว้ในช่องใส่หลอดปรับค่าไปที่ 100 เปอร์เซ็นต์แล้วดึงเส้นโค้งที่ขีดไว้บนจานด้านในมาตัดที่ระดับสูงสุดของพลาสมาในหลอดไมโครฮีมาโตคริต จากนั้นดึงทั้งจานด้านในและจานอ่านค่าเปอร์เซ็นต์พร้อมกันโดยให้เส้นโค้งเดิมนั้นไปตัดที่ระดับสูงสุดของเลือดที่อัดแน่นอ่านค่าตัวเลขที่ปรากฏบนเครื่องอ่านค่าเป็นเปอร์เซ็นต์

3.3.3.3 วิธีคำนวณค่าแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส

$$\text{International unit (IU)} = \frac{\text{Corrected A} \times 100 \times \text{dilution facter} \times 100}{\text{hematocrit}}$$

International unit (IU) หมายถึงการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ 555 นาโนเมตร (1 cm light path) ทีละ 0.1 ต่อมิลลิลิตรเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ชั่วโมงที่ 38 องศาเซลเซียส

Corrected A หมายถึงค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ของหลอดทดสอบ – หลอดควบคุม

Dilution factor เป็นค่าอัตราส่วนของปริมาณเลือดที่ใช้ต่อปริมาตรของสารผสมทั้งหมด เช่นใช้เลือด 0.2 มิลลิลิตรต่อปริมาตรรวมในการวิเคราะห์ 2.5 มิลลิลิตร จะได้ dilution factor เท่ากับ 12.5

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในเลือด

การวิเคราะห์ใช้วิธีของ Jacobson, Lockitch and Quigley (1991) ซึ่งมีความถูกต้องคลอบคลุมช่วง 99 - 101 เปอร์เซ็นต์ โดยมีหลักการคือติดตามค่าการดูดกลืนแสงของตะกั่วที่ถูกทำให้เป็นอิสระจากเครื่องกราไฟต์เฟอร์แนซอะตอมมิกแอบซอบชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Graphite furnance atomic absorption spectrophotometer) ซึ่งจะอ่านค่าออกมาเป็น area absorption หรือ Height absorption จากนั้นนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายตะกั่วมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ดังรูปที่ 3.2

3.3.4.1 การเตรียมตัวอย่างเลือดและสารละลายตะกั่วมาตรฐาน

งานวิจัยนี้วิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในเลือดภายใน 1 สัปดาห์นับตั้งแต่เก็บตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างเลือดทำโดยเจือจางตัวอย่างเลือดลง 10 เท่าโดยผสมเลือด 1 มิลลิลิตรกับ 4 มิลลิลิตรไตรตอนเอกซ์ - 100 ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (2.5 มิลลิลิตรไตรตอนเอกซ์ 100 ผสมกับ 5 มิลลิลิตร antifoam B แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น) เมื่อเม็ดเลือดแดงแตกจนหมดแล้วเติม 1.6 โมลาร์กรดไนตริก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่เตรียมดังกล่าวที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสและจะละลายเมื่อจะทำการวิเคราะห์เท่านั้น โดยนำมาปั่นที่ 9,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 นาทีแยกเฉพาะสารใสด้านบนซึ่งเป็นโปรตีนอิสระมา 10 ไมโครลิตรผสมกับ 0.16 โมลาร์กรดไนตริกจนครบ 25 ไมโครลิตร

การเตรียมสารละลายตะกั่วมาตรฐานเพื่อทำกราฟมาตรฐานทำโดยเจือจางสารละลายตะกั่วมาตรฐานที่รู้ค่าแน่นอนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ Seronorm trace element (Whlole blood) ของบริษัท Nycomed as

Pharma & Sero as , Norwey (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2 , 4 , 8 ,12 เจือจางกับ 0.16 โมลาร์กรดไนตริกจนครบ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้สารละลายตะกั่วมาตรฐานความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

3.3.4.2 การเตรียมเครื่องกราไฟต์เฟอแนซอะตอมมิกแอบซอบชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ตารางที่ 3.1 แสดงการเตรียมเครื่องกราไฟต์เฟอร์แนซอะตอมมิกแอบซอบชันสำหรับวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในเลือด

Stage	Temp °C	Ramp time , s	Hold time , s	Gas Flow,L/min
Dry	75	2.0	-	3.0
	95	10.0	-	3.0
	140	25.0	-	3.0
Ash	300	5.0	5.0	3.0
	450	5.0	7.0	0.5
	450	-	10.0	3.0
	700	2.0	10.0	3.0
	700	-	2.0	0
Atomize	2,000	0.7	2.0	0
Clean	2,500	2.0	-	3.0
Cool down	40	12.8	-	3.0

การทำงานของเครื่องกราไฟต์เฟอแนซอะตอมมิกแอบซอบชันประกอบไปด้วยขั้นตอนสำคัญคือเมื่อฉีดสารผสมที่เตรียมตามข้อ 3.3.4.1 เข้าเครื่องที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสแล้วจะเกิดการทำให้ตัวทำละลายในสารผสมแห้ง (dry) ตั้งแต่อุณหภูมิ 75-95-140 องศาเซลเซียสซึ่งแต่ละช่วงเวลาต้องใช้เวลาในการปรับ (Ramp time) จากอุณหภูมิปกติไปสู่อุณหภูมิที่ต้องการดังกล่าวเป็น 2.0 , 10.0 และ 25.0 วินาทีตามลำดับจากนั้นจะเข้าสู่การทำให้เป็นเถ้า (ash) และทำให้เป็นธาตุอิสระ (Atomize) คือทำให้สารอินทรีย์สลายตัวกลายเป็นธาตุในรูปอนินทรีย์อิสระหรือการทำให้ตะกั่วแตกตัวออกเป็นอะตอมอิสระเพื่อที่จะขึ้นไปดูดกลืนแสงนั่นเอง ขั้นตอนนี้ต้องใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 300-2,000 องศาเซลเซียสและใช้เวลาปรับเครื่องดังปรากฏในตาราง โดยเมื่อปรับอุณหภูมิได้แล้วต้องทิ้งระยะเวลาที่อุณหภูมินั้น (Hold time) ตามที่กำหนด

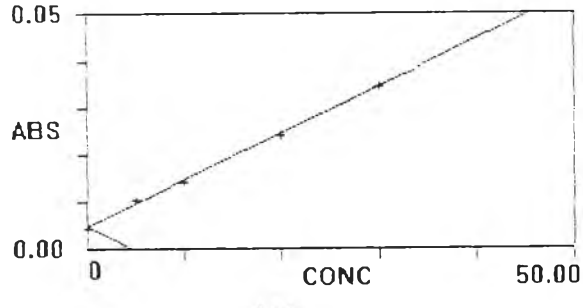
แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 2,000 องศาเซลเซียส จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนทำความสะอาดคือการกำจัดสารผสมที่ไม่อาจสลายตัวที่อุณหภูมิ 2,000 องศาเซลเซียสได้เพื่อเตรียมสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างในครั้งต่อไป การขับไล่สารที่ถูกสลายออกมาในแต่ละขั้นตอน (Gas flow) มักใช้ก๊าซอากอน (argon) เป็นตัวขับไล่ซึ่งในขั้นสุดท้ายของการทำให้เป็นเถ้าและการทำให้เป็นธาตุอิสระไม่มีการขับไล่ด้วยก๊าซ เพราะต้องการให้ตะกั่วอิสระขึ้นไปดูดกลืนแสงนั่นเอง

3.3.4.3 วิธีวิเคราะห์ และกราฟมาตรฐานของสารละลายตะกั่วมาตรฐาน

เมื่อเตรียมเครื่อง กราไฟต์เฟอแนซอะตอมมิกแอบซอบชันตังตาราง 3.1 แล้ว นำตัวอย่างเลือดและสารละลายตะกั่วมาตรฐานที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.4.1 อย่างละ 10 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่องโดยหัวฉีดอัตโนมัติ (autosampler) แล้วจัดให้อ่านค่าหลอดควบคุมเป็น 0 โดยหลอดควบคุมประกอบด้วยแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogen phosphate) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ 5 ไมโครลิตรกับ 0.16 โมลาร์กรดไนตริกปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำค่า area absorption หรือ height absorption ของสารละลายตะกั่วมาตรฐานมาเขียนกราฟมาตรฐานโดยให้ แกน x เป็นความเข้มข้นของตะกั่ว เมื่อนำค่าแอบซอบชันของตัวอย่างที่อ่านได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานก็จะรู้ปริมาณตะกั่วในเลือด

Element :Pb
Cond.Name:blood lead

Date :05/25/98 10:09 AM
Sample :Blood Lead test
Analyst:Prapin



W.Curve Order : 1st
Curve Coef. : a1=9.844828E-004 a0=4.801724E-003
Determ. Coef. : 0.9988

1	1.93	0.0029	05/25/98 10:11 AM 0.0000
2	-0.31	0.0026	05/25/98 10:13 AM 0.0022

รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายตะกั่วมาตรฐาน (คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล)

I 15336917

3.3.5 วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ

3.3.5.1 วิธีวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation)

เมื่อเส้นแนวโน้มจากแผนภาพขจายแสดงความสัมพันธ์ในลักษณะเป็นเส้นโค้งใดๆ ก็ตาม ก่อนการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ต้องปรับแกน x และ y ให้เส้นโค้งนั้นเป็นเส้นตรงก่อนเช่น เส้นโค้งแบบเอกซ์โปเนนเชียลสามารถปรับเป็นเส้นตรงโดยการทำให้เป็น log จากนั้นนำค่าที่ปรับใหม่นั้น คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson product moment correlation coefficient) คือการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวแปรที่เป็นข้อมูลต่อเนื่อง (Continuous) เป็นอิสระต่อกัน (Independent) และมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงดังสูตรนี้ (วิไล กุศลวิศิษฏ์กุล, 2535)

$$r_{xy} = \frac{n\sum xy - \sum x\sum y}{\sqrt{[n\sum x^2 - (\sum x)^2][n\sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

r_{xy} คือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร x และ y

$\sum x$, $\sum y$ คือผลรวมที่วัดได้จาก x และ y

$\sum xy$ คือผลรวมของผลคูณระหว่าง x และ y

$\sum x^2$, $\sum y^2$ คือผลรวมของกำลัง 2 ของข้อมูลจาก x และ y

n คือจำนวนตัวอย่าง

สูตรดังกล่าวเป็นการคำนวณจากข้อมูลดิบนอกจากนี้ยังมีสูตรซึ่งคำนวณจากค่ามาตรฐาน ค่าเบี่ยงเบน และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานอีกซึ่งทุกสูตรจะให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากันจึงไม่ขอกล่าวถึงในที่นี้

เมื่อคำนวณสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แล้ว ต้องทดสอบสมมติฐานว่าตัวแปรมีความสัมพันธ์กันอย่างแท้จริงทุกครั้ง เนื่องจากความคลาดเคลื่อนของการสุ่มตัวอย่างเช่นถ้าจำนวนตัวอย่างน้อยเกินไป อาจทำให้แปลผลเป็นไม่มีความสัมพันธ์ การทดสอบสมมติฐานทำได้ 2 วิธีดังนี้

1 ทดสอบจากสูตร

$$t = \frac{r\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1 - r^2}}$$

t ค่าสถิติการทดสอบที่มีการแจกแจงแบบ t ด้วย df (degree of freedom) = n – 2

r ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

n ขนาดตัวอย่าง หรือจำนวนชุดของข้อมูล

กำหนดสมมติฐาน Ho : $\rho xy = 0$ (ตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กัน)

Ha : $\rho xy \neq 0$ (ตัวแปรทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน)

ρxy คือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

หาค่าวิกฤต t จากตารางที่ $\alpha = 0.05$ (ภาคผนวก) และ df = n – 2 นำค่า t คูณ 2 (เนื่องจากเป็นการทดสอบ 2 ทาง) เปรียบเทียบกับค่าที่คำนวณได้จากสูตรถ้า t คำนวณน้อยกว่า t ตารางแสดงว่ายอมรับ Ho คือตัวแปรทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน

2 ทดสอบโดยเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในตารางสำเร็จรูป

นำค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่คำนวณได้เปรียบเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในตารางค่าวิกฤตของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (ภาคผนวก ค) ที่ df = n – 2 ตามระดับนัยสำคัญที่ต้องการ ($\alpha = 0.1 , 0.05 , 0.01$) สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์จากตารางเป็นค่าที่ใช้ตัดสินใจว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่คำนวณได้ต้องมีค่าต่ำที่สุดเท่าใด (ρxy) จะไม่เท่ากับ 0 (Ha : $\rho xy \neq 0$) คือถ้าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์คำนวณมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในตาราง แสดงว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่คำนวณนั้นมีนัยสำคัญทางสถิติยอมรับ Ha คือตัวแปรมีความสัมพันธ์กันอย่างแท้จริง

ความถูกต้องในการคาดคะเนค่า y ของตัวแปรอิสระพบว่ายิ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากแสดงว่าข้อมูลมีความสัมพันธ์กันมากการคาดคะเนยิ่งถูกต้องมาก วิธีคำนวณทำโดยการนำค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r_{xy} ยกกำลัง 2 คูณด้วย 100 จะบอกให้ทราบความแปรปรวนของตัวแปรทั้งสองว่าซ้อนทับกันอยู่กี่เปอร์เซ็นต์ หมายถึงสามารถคาดคะเนค่า y จากการรู้ค่า x ได้ถูกต้องเท่ากับ $r_{xy}^{\ 2} \times 100$ เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่ได้บอกความเป็นเหตุเป็นผลกันคือไม่ได้หมายความว่าตัวแปรใดเป็นเหตุทำให้เกิดผลกับอีกตัวแปรหนึ่ง และไม่ได้บอกว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นความมากน้อยเป็นกี่เท่าของกันและกัน เช่น ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ = 0.6 ไม่ได้มีความสัมพันธ์เป็น 2 เท่าของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ = 0.3 เป็นต้น

3.3.5.2 วิธีวิเคราะห์การถดถอย (Regression)

การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นโค้งใดๆ ก็ตามมีหลักการเดียวกัน คือต้องแปลงรูปสมการโดยการกำหนดค่าใหม่ เพื่อให้สมการถดถอยเชิงเส้นโค้งแบบต่างๆ อยู่ในรูปสมการถดถอยเชิงเส้นตรง แล้วทำการวิเคราะห์เชิงเส้นตรงต่อไป (มยุรี ศรีชัย, 2540)

วิธีวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นโค้งแบบเอกซ์โปเนนเชียล

ตัวแบบสมการ $Y = ab^{x} . e$

สามารถแปลงเป็นตัวแบบสมการเชิงเส้นตรง ($Y' = b_0 + b_1X$) ได้โดยการใส่ log เข้าไป

$$\log Y = \log a + X \log b + \log e \quad \text{---------- (1)}$$

ถ้ากำหนด $Y' = \log Y$

$b_0 = \log a$

$b_1 = \log b$

$e' = \log e$

แทนใน (1) ได้ $Y' = b_0 + b_1X + e'$ ---------- (2)

สมการ (2) อยู่ในรูปสมการถดถอยเชิงเส้นตรงจึงสามารถหาค่า b_0 และ b_1 โดยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (Least square method) ดังนี้

$$b_1 = \frac{\sum XY' - nXY'}{X^2 - nX^2}$$

$$b_0 = Y' - b_1$$

หรือ $$b_0 = \frac{\sum \log Y}{n} - \frac{b_1 \sum X}{n}$$