บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ประชากรที่ใช้ศึกษา

แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม เป็นคนที่มีภูมิลำเนาปัจจุบันอยู่ในกรุงเทพ และได้มาบริจาคโลหิต ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นผู้มีคุณสมบัติดังนี้ คือมีอายุครบ 17 ปีบริบูรณ์ ถึง 60 ปี น้ำหนัก 45 กิโลกรัมขึ้นไป ไม่มีประวัติเป็นโรคตับอักเสบหรือดีซ่าน ตัวเหลือง ตาเหลือง ไม่เป็นไข้มาลาเรียในระยะ 3 ปีที่ผ่านมา ไม่เป็นโรคดังนี้ กามโรค คุดทะราด อาการแพ้อื่น ๆ ชัก เป็นลมบ่อย ๆ โรคผิวหนังเรื้อรัง หัวใจ ไต และเบาหวาน ไม่อยู่ในระหว่างน้ำหนักลดมากในระยะสั้นโดยไม่ทราบสาเหตุ ไม่มีพฤติกรรมรักร่วมเพศ ไม่มีประวัติฉีดยาเสพติด ผู้บริจาคควรมีสุขภาพทั่วไปสมบูรณ์ นอนหลับพักผ่อนเต็มที่ก่อนมาบริจาคอย่างน้อย 5 ชั่วโมง และเว้นระยะ 3 เดือน ถ้าเคยบริจาคมาก่อน ในกลุ่มหนึ่งนี้มีประชากรทั้งหมด 32 คน

2. กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มศึกษา เป็นคนที่มีภูมิลำเนาปัจจุบันอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นกลุ่มคนเมืองที่มาบริจาคโลหิต ที่คลังเลือดกลาง โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 25 คน ซึ่งเป็นผู้ที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับประชากรในกลุ่มที่ 1

3. กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มศึกษาอีกกลุ่มหนึ่ง และเป็นคนที่มีภูมิลำเนาอยู่ในเขตชนบทรอบ ๆ จังหวัดขอนแก่น นอกจากนี้มีประวัติว่าเป็นญาติสายตรงของคนไหลตาย โดยมีข้อมูลและคัดเลือกจากงานศึกษาระบาดวิทยาของอาการไหลตายในชุมชนชนบทของจังหวัดขอนแก่น (เกรียงตั้งสง่า และคณะ 2534) จำนวนประชากรที่ศึกษาในกลุ่มที่ 3 นี้มี 30 คน และคัดเลือกโดยการตรวจร่างกาย ซักประวัติว่าไม่มีโรคประจำตัว ตรวจวัดความดันเลือด และตรวจปัสสาวะด้วยแถบสี (reagent strip) ก่อนเข้าโครงการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงแรงสูงที่ปรับอุณหภูมิได้ (Refrigerated Centrifuge) เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ Sorvall RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge และ Tomy Seiko Superspeed Refrigerated Centrifuge

2. เครื่องวัดการดูดแสงของสาร สำหรับหาปริมาณโปรตีนและฟอสฟอรัส (Spectophotometer Shimadzu model UV-120-01)

3. เครื่องวัดปริมาณแร่ธาตุได้แก่ Corning Flame photometer และ Atomic absorption spectophotometer

4. เครื่องมือสำหรับวัดความเป็นกรดด่างของสารละลาย ใช้เครื่อง Orion pH meter

5. เครื่องปั่นฮีมาโตคริท (Hettich Haematocrit)

6. เครื่องชั่งไฟฟ้าสำหรับเตรียมน้ำยาที่ใช้วิเคราะห์สาร (Shimadzu-Libor EB-33H)

7. เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vortex mixer)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Acetic acid	Merck
Adenosine 5-triphosphate disodium salt	Sigma
Ammonium molybdate	Mallinckrodt
Bovine serum albumin	Sigma
Citric acid	Merck
Ethylene Glycol-bis (β -aminoethyl ether) N,N,N,N-tetraacetic acid (EGTA)	Sigma
D-Glucose	BDH

ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Heparin	Leo
Histidine dichloride	Merck
Hydrazine sulphate	Merck
Hydrochloric acid	Merck
Hydroxymethyl aminomethane hydrochloride	Sigma
Lithium nitrate	Mallinckrodt
Magnesium chloride	M&B
Ouabain	Sigma
Potassium chloride	Merck
Saponin	Calbiochem
Sodium chloride	Mallinckrodt
Sodium citrate	BDH
Sodium hydroxide	Merck
Sodium lauryl sulphate	BDH
Stannous chloride	Mallinckrodt
Sulphuric acid	Merck
Trichloroacetic acid	Merck

บัฟเฟอร์และสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์โซเดียม โพแทสเซียม ใช้สารละลายดังต่อไปนี้คือ 112 mM $MgCL_2$, 10% กรดน้ำส้ม, 15 mM $LiNO_3$

2. การวิเคราะห์ ATPase ใช้บัฟเฟอร์และสารละลายดังต่อไปนี้คือ 0.155 M NaCl, 0.033M Histidine, 10% Saponin, 0.1mM Ouabain, 2 mM $MgCl_2$ 2mM Na_2 ATP, 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 1mM EGTA, 100mM Tris

3. การวิเคราะห์ฟอสฟอรัส ใช้สารละลายดังต่อไปนี้ 1% SDS, Acid molybdate, $SnCl_2$-hydrazine solution

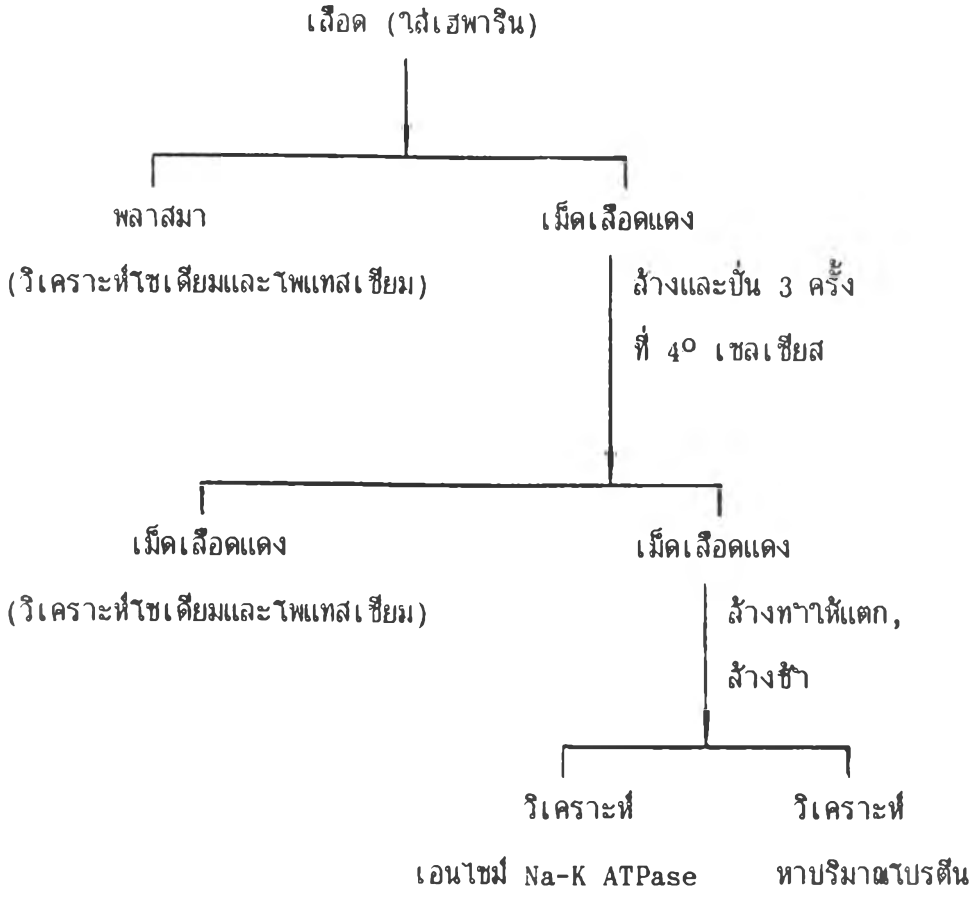
4. การวิเคราะห์โปรตีนใช้สารละลายดังต่อไปนี้ Folin reagent

วิธีการศึกษานำร่อง

ก่อนที่จะเก็บตัวอย่างเลือดของประชากรที่ใช้ศึกษา ผู้วิจัยต้องทำการศึกษานำร่องเพื่อพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ที่ถูกต้องรวมทั้งศึกษาความคงทนของสารตัวอย่าง พัฒนาขั้นตอนการวิเคราะห์ให้เหมาะสม และให้มีความแปรปรวนน้อยที่สุด โดยได้ทำการศึกษาวิธีการวิเคราะห์โซเดียม โพแทสเซียมและเอนไซม์ Na-K ATPase ในเม็ดเลือดแดง โดยเก็บตัวอย่างเลือดสด (Fresh blood) จากผู้บริจาคโลหิตที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในเบื้องต้นก่อน โดยมีแผนผังการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดที่สะดวกและถูกต้องตามรูปที่ 8

การวิเคราะห์โซเดียมและโพแทสเซียมในพลาสมา

เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดที่เจาะมาใหม่ ๆ ใส่หลอดทดลองที่มีแอมโมเนียมเฮพาริน 2 มิลลิกรัม ต่อเลือด 10 มิลลิลิตรได้แล้ว นำมาเข้าเครื่องปั่นที่ปรับอุณหภูมิ 4^{o} เซลเซียส (Refrigerated centrifuge) แยกเอาพลาสมาออกทันทีใส่หลอดที่สะอาดและแห้ง ปิดจุกเก็บที่ 4^{o} เซลเซียส เพื่อส่งวิเคราะห์โซเดียมและโพแทสเซียมในวันเดียวกันด้วยเครื่อง Flame photometer แบบอัตโนมัติของหน่วยไรคไต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์



รูปที่ 8 แสดงแผนผังการวิเคราะห์การศึกษาตัวอย่างเลือด

การวิเคราะห์โซเดียมและโพแทสเซียมในเม็ดเลือดแดง

สำหรับการวิเคราะห์ระดับโซเดียมและโพแทสเซียมในเม็ดเลือดแดงจากสารตัวอย่างภายหลังที่แยกพลาสมาออกแล้วทำตามวิธีของ Fortes Mayer และ Starkey (1977) มีรายละเอียดการวิเคราะห์เป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การล้างเม็ดเลือด จากเม็ดเลือดแดงสดที่แยกพลาสมาออกแล้ว นำมาล้างด้วย 112 mM $MgCl_2$ ที่แช่เย็น 4° เซลเซียส เพื่อเอาส่วนของเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือด (buffy coat) ออก เขย่าหลอดก่อนที่จะปั่นแยกเอาน้ำใสทิ้งไปด้วยเครื่องปั่นที่ 4° เซลเซียส ล้างซ้ำอีก 2 ครั้ง แบ่งเม็ดเลือดแดงที่ล้างสะอาดนี้มาประมาณ 0.5 มิลลิลิตร เติม 112 mM $MgCl_2$ ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันเบา ๆ หาค่าฮีมาโตคริต บันทึกค่าไว้

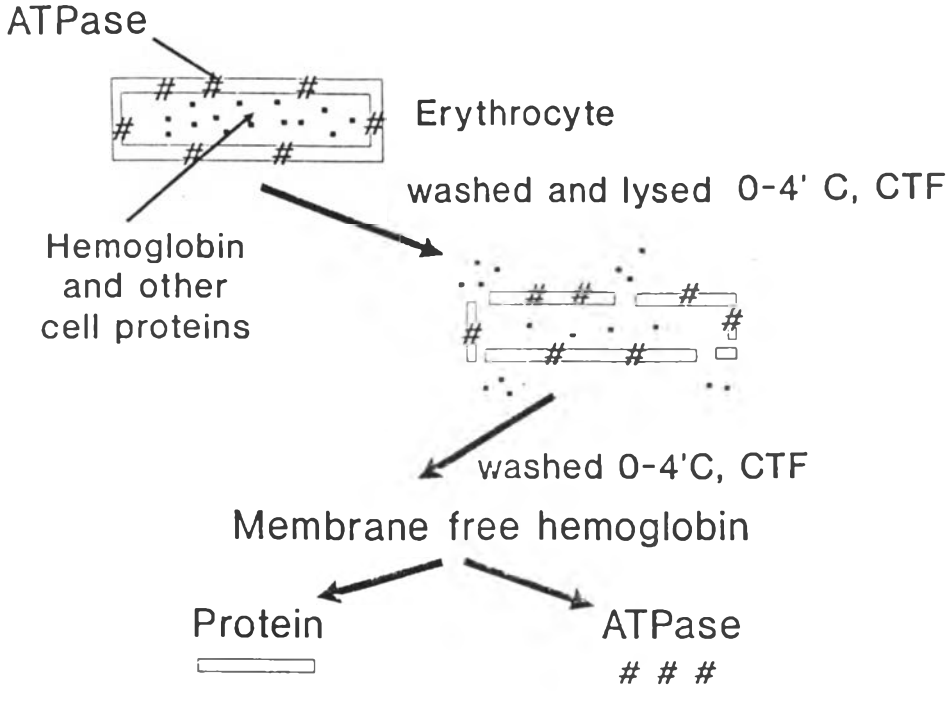
2.การทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและการวิเคราะห์หาปริมาณ โซเดียมและโพแทสเซียม ดูดน้ำเม็ดเลือดแดงที่รู้ค่าฮีมาโตคริตแล้วที่ได้จากข้อ 1. จำนวน 50 ไมโครลิตร (ul) ใส่ลงในหลอดทดลองที่สะอาด เติม 1% กรดน้ำส้ม จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดด้วยเครื่องเขย่า เม็ดเลือดแดงจะแตก (Hemolysis) เติมสารละลาย 15 mM $LiNO_3$ ลงไปอีก 4.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่น เก็บเฉพาะส่วนที่ใสใส่หลอด ส่งไปวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง Flame photometer เปรียบเทียบกับสารละลายโซเดียมและโพแทสเซียมมาตรฐานที่เจือจางด้วยลิเทียมไนเตรทชนิดเดียวกันนี้

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและแม่นยำของการวิเคราะห์โซเดียมและโพแทสเซียมจากเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่อง Flame photometer ผู้วิจัยได้นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานเดียวกันนี้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer และเมื่อผลการวิเคราะห์ตรงกันแล้ว ได้เลือกใช้เครื่อง Flame photometer เพื่อวัดสารตัวอย่างอื่น ๆ ต่อไป

การเตรียมเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Na-K ATPase

ใช้เม็ดเลือดแดงที่ได้ผ่านการล้างตามวิธีในข้อ 2 ที่เหลือทั้งหมดหลังจากแบ่งไปวิเคราะห์ โซเดียมและโพแทสเซียม มาเตรียมเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีเอนไซม์ Na-K ATPase อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์จำนวนมากมาย การเตรียมเยื่อหุ้มเซลล์จากเม็ดเลือดแดงต้องทำที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียสตลอดเวลา โดยทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ล้างและปั่นด้วยเครื่องปั่นที่มีความเร็วสูงเพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์ตกตะกอน นอกจากนี้ต้องล้างเยื่อหุ้มเซลล์จนกระทั่งปราศจากเฮโมโกลบินและโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในไซโทพลาสซึมด้วย ดังรูปที่ 9

การเตรียมเยื่อหุ้มเซลล์สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ Na-K ATPase ใช้วิธีของ Hanahan (1978) ซึ่งได้ปรับปรุงเล็กน้อย เริ่มด้วยการเทเม็ดเลือดแดงทั้งหมดใส่หลอดทดลองที่ทนแรงเหวี่ยงสูง เมื่อปั่นที่ 15000 รอบต่อนาทีได้ จากนั้นใส่ Sodium chloride Histidine buffer pH 7.5 (SCH buffer) ที่แช่เย็นไว้ประมาณ 1.5 เท่าของเม็ดเลือดแดงทั้งหมด เขย่าด้วยเครื่องเขย่านำไปปั่นด้วยเครื่อง Sorvall RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้งไป เติม SCH buffer ลงไปอีกประมาณ 9 เท่าของเม็ดเลือดแดง เขย่าให้เข้ากัน เติมซาโปนิน 0.1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ที่ 4° เซลเซียส นาน 20 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 15000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดน้ำใสสีแดงตอนบนทิ้งให้หมด ล้างตะกอนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งอยู่ก้นหลอดซ้ำด้วย SCH buffer อีก 5-6 ครั้ง จนกระทั่งได้เยื่อหุ้มเซลล์ที่ขาว เติมบัฟเฟอร์นี้ลงไปประมาณ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ไว้ประมาณ 6 หลอด นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20° เซลเซียส



รูปที่ 9 หลักการแยกและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงบริสุทธิ์ สำหรับวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ Na-K ATPase

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเยื่อหุ้มเซลล์

เยื่อหุ้มเซลล์ที่ล้างสะอาดสำหรับใช้วิเคราะห์เอนไซม์ ATPase ทุกครั้งต้องหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธีของ Lowry (1951) นำหลอดทดลองที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร ที่แช่แข็งออกมาตั้งไว้ให้ละลาย เติมน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี เติมสารละลาย Alkaline copper ที่เตรียมใหม่ ๆ ลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย Folin (ใช้ 2N Phenol 1 ส่วนผสมกับน้ำ 5 ส่วน) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที วัดการดูดแสงที่ 660 nm โดยใช้สารละลายปรับเครื่องให้เป็นศูนย์ และทำการทดลองโดยใช้สารละลายแอลบูมินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 ไมโครกรัมต่อหลอด ด้วยวิธีการเหมือนกันทุกครั้งที่มีการหาปริมาณโปรตีน

2. การวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ Na-K ATPase

การวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ ATPase จากเยื่อหุ้มเซลล์ต้องใช้สับสเตรทเป็น ATP ซึ่งจะประกอบด้วยบัฟเฟอร์และตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Deluise และคณะ (1982) โดยปรับปรุงเล็กน้อย สำหรับหลักการวิเคราะห์ทำโดยนำเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีเอนไซม์ ATPase มา incubate กับ ATP จะสลายฟอสเฟตออกมา 1 ไมเลกุลต่อ ATP และเอนไซม์ 1 ไมเลกุล เมื่อปล่อยให้เอนไซม์ทำงานที่ 37° เซลเซียส นาน 90 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย TCA เขย่าแล้วนำไปปั่น วัดฟอสฟอรัสในน้ำใส นำค่ามาคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ ATPase ได้

2.1 ATP medium และการวัดการทำงานของ Na-K ATPase

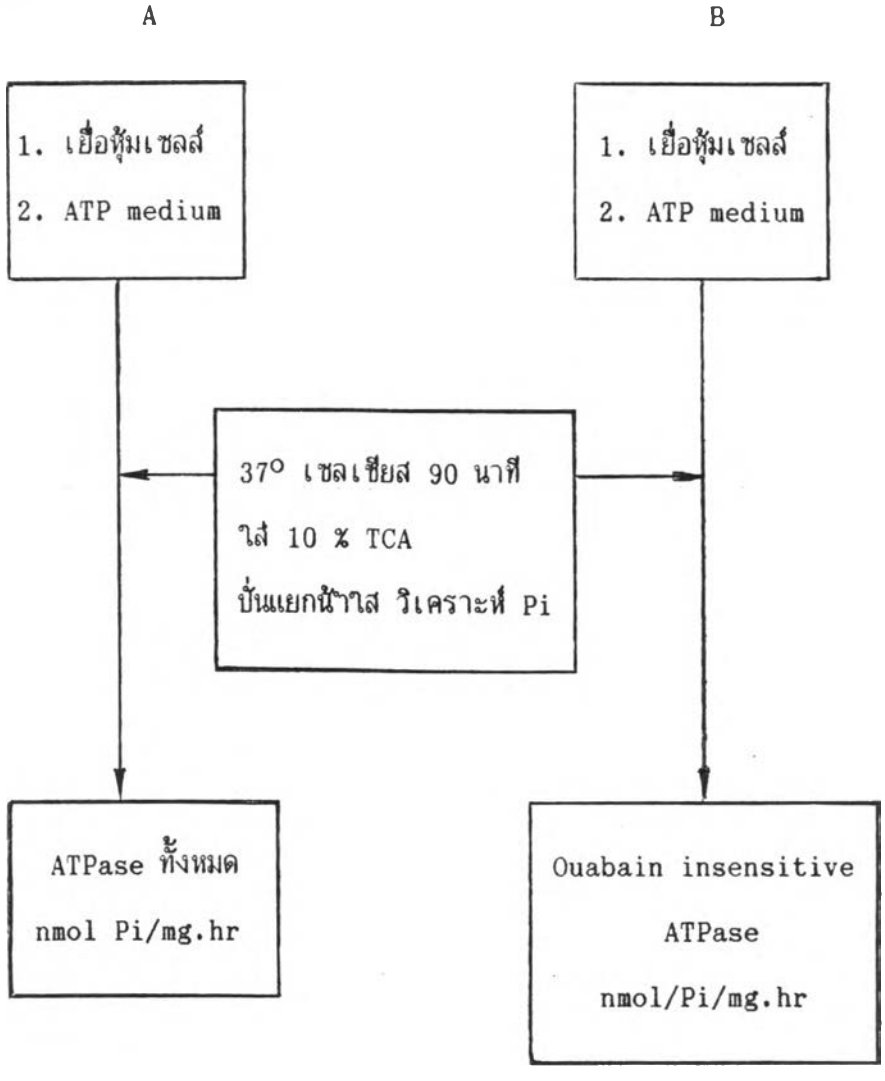
การวัดการทำงานของเอนไซม์ ATPase ใน ATP medium จะประกอบด้วย Tris บัฟเฟอร์ โดยมี NaCl, KCl และ $MgCl_2$ เป็นตัวกระตุ้น การทำงานของเอนไซม์ Na-K ATPase ขณะที่มี EGTA เป็นตัวจับแคลเซียม หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Ca-ATPase โดยเหตุที่เอนไซม์ ATPase ทั้งหมดบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงส่วนใหญ่จะเป็นเอนไซม์ Na-K ATPase ประมาณร้อยละ 60-75 ที่เหลือจะเป็นเอนไซม์ Ca-ATPase

และ Mg-ATPase ดังนั้นในการวิเคราะห์จะประกอบด้วยหลอดทดลอง 2 หลอด หลอดแรก (A) เป็นการวิเคราะห์เอนไซม์ ATPase ทั้งหมด ในหลอดนี้มีเยื่อหุ้มเซลล์และ ATP medium ทั้งหมด หลอดที่สอง (B) มีเยื่อหุ้มเซลล์ในปริมาณที่เท่ากัน และมี ATP medium ที่เหมือนกัน แต่มี 0.1 mM Ouabain เพิ่มขึ้นมา (Ouabain ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Na-K ATPase) ซึ่งในหลอดนี้ค่าที่วัดได้จะเป็น เอนไซม์ Mg-ATPase หรือเอนไซม์ Ouabain insensitive ATPase เมื่อเอาค่าเอนไซม์ ATPase ทั้งหมดในหลอดแรก ลบด้วยค่าเอนไซม์ในหลอด Ouabain insensitive ATPase จะได้ค่าเอนไซม์ Na-K ATPase หรือ Ouabain sensitive ATPase ออกมา ดังแสดงในรูปที่ 10

2.2 การวิเคราะห์ฟอสฟอรัสหรือฟอสเฟต

ฟอสฟอรัสหรือฟอสเฟต วิเคราะห์โดยวิธีเคมี หรือ คัลเลอริเมตรี (colorimetry) ดัดแปลงใช้วิธีของ Lawrence (1974) ซึ่งใช้ปฏิกิริยารีดักชั่นด้วย Stannous chloride-hydrazine และทำปฏิกิริยากับสารละลาย molybdic acid ได้ molybdinum blue วัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 640 nm ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ดังนี้

ใช้น้ำใส (supernate) ของฟอสฟอรัสที่ได้จากข้อ 2.1 ภายหลังการทำงานของ ATPase จำนวน 0.05 มิลลิลิตร เติม 1% SDS 2 มิลลิลิตร เขย่า เติมสารละลาย Stannous chloride-hydrozine 1 มิลลิลิตร เขย่า และเติม scid ammonium molybdate 1 มิลลิลิตร เขย่า ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที วัดการดูดแสง 640 nm โดยใช้สารอ้างอิงที่ทำการทดลองเหมือนกัน แต่ใช้ 5% TCA แทนน้ำใส ปรับเครื่องให้เป็นศูนย์ และทำการทดลองหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ของสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสเข้มข้น 2, 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีและน้ำยาชุดเดียวกันทุกครั้ง



Ouabain sensitive ATPase = ATPase ทั้งหมด-Ouabain insensitive
(Na-K ATPase) ATPase

รูปที่ 10 แสดงแผนผังการวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ ATPase ทั้งหมด เอนไซม์ Ouabain insensitive ATPase และเอนไซม์ Ouabain sensitive ATPase

การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีการวิเคราะห์ ATPase

ได้ศึกษาทดลองคุณสมบัติด้านความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ ATPase โดยการวิเคราะห์เอนไซม์จากเยื่อหุ้มเซลล์ที่แยกได้ซ้ำ 10 ครั้งในวันเดียวกัน (intraassay) โดยคำนวณสัมประสิทธิ์การแปรปรวน (coefficient of variations, % CV) และวิเคราะห์เอนไซม์จากเยื่อหุ้มเซลล์ที่แช่แข็งไว้ทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน (interassay) โดยคำนวณสัมประสิทธิ์การแปรปรวนและดูความคงทน (stability) ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้ตัวอย่างเลือด 2 ชุดในการวิเคราะห์ทั้ง 2 แบบดังกล่าว

การวิเคราะห์ในวันเดียวกัน นำเยื่อหุ้มเซลล์ที่ล้างสะอาดและได้จากสารตัวอย่างเลือดของคนปกติ 2 คน หรือ 2 ชุดดังกล่าว แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร 10 ชุด ในแต่ละชุดจะใส่ ATP medium ทั้งที่มี ouabain และไม่มี ouabain ตามวิธีในข้อ 2.1 นำไปอุ่นที่ 37° เซลเซียส นาน 90 นาที วิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำใสที่ได้หลังจากหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ คำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ เป็น nmol Pi/hr/mg. Protein จากเยื่อหุ้มเซลล์ ทั้ง 10 ชุด นี้ หา % CV จากค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนต่อไป (% CV = SDx100/X)

สำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์ระหว่างวันทำการทดลองโดยใช้หลักการเดียวกันคือแบ่งเยื่อหุ้มเซลล์ เก็บแช่แข็ง 10 ชุด และนำออกมาวิเคราะห์วันละชุดทุกวันติดต่อกัน 10 วัน คำนวณ % CV จากค่าการทำงานของเอนไซม์ตามจำนวนวันที่เอนไซม์ยังคงทำงานได้ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลจะเปรียบเทียบในรูป mean และ standard error of mean (SEM) ระหว่างกลุ่มที่ศึกษาทั้ง 3 กลุ่ม ทดสอบความแตกต่างของค่าฮีเล็กโทรไลต์และเอนไซม์ระหว่างกลุ่มที่ศึกษาโดยใช้ Unpaired t-test เมื่อ P-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและยังได้เปรียบเทียบค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear correlation) ระหว่างค่าฮีเล็กโทรไลต์กับการทำงานของเอนไซม์ Na-K ATPase (Y)

ระหว่างกลุ่มที่ศึกษา โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ด้วยเครื่อง ไมโครคอมพิวเตอร์ โปรแกรม SPSS/PC (Norusis MA,1986)

1172HA236