บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่ม

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาทดลองในกลุ่มตัวอย่าง
   - caffeine anhydrous B.P. grade
   - เข็มเบอร์ 21 และ syringe ขนาด 10 ml
   - สำลี แอลกอฮอล์
   - ถุงมือ
   - หลอดพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่างเลือด
   - กาแฟผงที่สกัด caffeine ออก (decaffeinated)
2. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่ม

   2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

ชื่อสาร	บริษัท
- paraxanthine	Sigma Chemical Co, USA
- caffeine anhydrous	Sigma Chemical Co, USA
- 8–chlorotheophylline	Sigma Chemical Co, USA
- methyl alcohol HPLC grade	Lab Guard
- acetonitrile HPLC grade	Scharlau Chemie S.A
- trichloroacetic acid	MERCK
- tetrahydrofuran	Farmitalia carloerba
- acetic acid	MERCK
- double distill water	

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างและใช้ในการวิเคราะห์

2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

ชื่อ	บริษัท
- Vortex –2- Genic	Scientific Industries, USA
- Autopipette	
Pipetteman P1000, P200 ul	Gilson Meacal Electronic, France
Biohit Proline 10 ul	Biohit, Finland
- Angle Centrifuge 4235A	Biosystem
- pH meter SA 520	Orian, USA
- Degassor model 220	Brandson Europa B.V. Netherland
- เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์	Precisa Instrument, Switzerland
- อุปกรณ์ในการกรองสารละลาย	Water Associates, USA

2.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์คือเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งประกอบด้วย

Spectra System Isocratic Pump (P1000)	Thermo Separation Product
Spectra System Autosamplers (AS3000)	Thermo Separation Product
Spectra System detector UV 1000	Thermo Separation Product
Spectra System SN 4000	Thermo Separation Product
Computer และ soft ware program P1000	Thermo Separation Product
Printer Laserjet 6L	Hewlett Packard

Analytical column ได้แก่ μ - bondapak C_{18} แบบเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 300 x 3.9 mm. บรรจุด้วยซิลิก้า C_{18} ขนาด 10 ไมครอนของ Water Associates Massachusettes, USA

Guard Column แบบเหล็กกล้าไร้สนิมความยาว 2 cm เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm บรรจุด้วย bondapak C_{18} ของ Water Associates Massachusettes, USA

วิธีการหาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่ม

1. การเก็บตัวอย่างเลือดที่ปราศจาก caffeine (pool serum)

นำเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพปกติซึ่งงดอาหารและเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของ caffeine อย่างน้อย 3 วันก่อนเจาะเลือดมาปั่นแยกซีรั่มด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บซีรั่มที่แยกได้ที่อุณหภูมิ – 70^{o}C

2. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มตัวอย่างที่เตรียมขึ้น โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ caffeine ความเข้มข้น 1,600 μg/ml เพื่อใช้เป็น stock solution โดยชั่ง caffeine 0.016 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ml ใน volumetric flask จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานของ caffeine ความเข้มข้น 50, 100, 200, 400 และ 800 μg/ml โดยการทำ serial dilution ดังนี้

1.นำ stock solution ของ caffeine ความเข้มข้น 1,600 μg/ml มา 0.5 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ml จะได้ caffeine ความเข้มข้น 800 μg/ml

2.นำสารละลายในข้อ 1 มา 0.5 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ml จะได้ caffeine ความเข้มข้น 400 μg/ml

3. นำสารละลายในข้อ 2 มา 0.5 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ml จะได้ caffeine ความเข้มข้น 200 μg/ml

4.นำสารละลายในข้อ 3 มา 0.5 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ml จะได้ caffeine ความเข้มข้น 100 μg/ml

5. นำสารละลายในข้อ 4 มา 0.5 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ml จะได้ caffeine ความเข้มข้น 50 μg/ml

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ paraxanthine ความเข้มข้น 1,600 μg/ml เพื่อใช้เป็น stock solution โดยชั่ง paraxanthine 0.016 g เติม 50 % MeOH ให้ครบ 10 ml ใน volumetric flask จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานของ paraxanthine ความเข้มข้น 50, 100, 200, 400 และ 800 μg/ml โดยการทำ serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ caffeine ในข้อ 2.1

2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 μg/ml โดยการเตรียม blank ซีรั่มและนำสารละลายมาตรฐานของ paraxanthine และ caffeine ความเข้มข้น 50, 100, 200, 400 และ 800 μg/ml ความเข้มข้นละ 10 μl เติมลงในซีรั่ม 980 μl จะได้ซีรั่มที่มีสารละลายมาตรฐานของ paraxanthine และ caffeine ตามต้องการ

2.4 การเตรียมสารละลาย 8-chlorotheophylline ความเข้มข้น 8 μg/ml เพื่อใช้เป็น internal standard

ชั่ง 8-chlorotheophylline 0.02 g เติม 50% MeOH ให้ครบ 25 ml จะได้ stock solution ของ 8-chlorotheophylline ความเข้มข้น 800 μg/ml

นำ stock solution 0.5 ml เติม 50% MeOH ให้ครบ 50 ml ใน volumetric flask จะได้ 8-chlorotheophylline ความเข้มข้น 8 μg/ml

3. การเตรียมตัวอย่างให้พร้อมสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC ใช้วิธีตกตะกอนโปรตีนดังนี้[106]

1. นำซีรั่มที่มี paraxanthine และ caffeine ความเข้มข้นต่าง ๆ มา 500 μl
2. เติม internal standard 200 μl, MeOH 500 μl, 10% TCA 500 μl
3. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer 1 นาที
4. ปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
5. นำสารละลายส่วนใส 50 μl ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

4. การเตรียม mobile phase

1. ตวงสารละลาย acetic acid , tetrahydrofuran, acetonitrile และน้ำ อัตราส่วน 1:3:40:456 ผสมให้เข้ากัน
2. ปรับ pH 5.6 ด้วย 10% NaOH โดยใช้เครื่อง pH meter
3. กรองด้วยกระดาษกรองและไล่อากาศด้วยเครื่อง sonicator 20 นาที

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

mobile phase : acetic acid : tetrahydrofuran : acetonitrile : water (1:3:40:456) pH 5.6

column : μ - bondapak C_{18}

flow rate : 1.2 ml/min

detector : UV wavelength 273 nm

injection volume : 50 μl

การศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และcaffeine ในซีรั่มตัวอย่าง (Method validation)[106,118]

1. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มตัวอย่าง (Lower Limit of Detection)

วิธีการทดลอง เตรียม paraxanthine และ caffeine ที่ความเข้มข้นระดับต่ำอย่างละ 10 หลอดการทดลองและหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยต้องมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% Relative Standard Deviation : % RSD) ไม่เกิน 20%[118]

2. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์แสดงในรูปของเปอร์เซนต์การคืนกลับ (%recovery) ซึ่งควรมีค่าระหว่าง 85 – 115 %[106] แบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วนคือ

2.1 Analytical recovery เตรียม paraxanthine และ caffeine ความเข้มข้น 1, 2 และ 8 μg/ml ความเข้มข้นละ 5 หลอดการทดลอง นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารดังกล่าวในซีรั่ม นำความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากการเทียบกับกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบกับ paraxanthine และ caffeine ความเข้มข้นจริง

$$\%\text{Analytical recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ paraxanthine (caffeine) ที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของ paraxanthine (caffeine) จริง}} \times 100$$

2.2 Physical recovery เตรียม paraxanthine และ caffeine ความเข้มข้น 1, 2 และ 8 μg/ml ในซีรั่มและในน้ำ ความเข้มข้นละ 5 หลอดการทดลอง นำ peak area ratio ของการวิเคราะห์ในซีรั่มเปรียบเทียบกับ peak area ratio ของการวิเคราะห์ในน้ำ

$$\%\text{ Physical recovery} = \frac{\text{PAR ของ paraxanthine(caffeine) ที่ได้จากการวิเคราะห์ในซีรั่ม}}{\text{PAR ของ paraxanthine(caffeine) ที่ได้จากการวิเคราะห์ในน้ำ}} \times 100$$

I20396569

3. ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (precision) แบ่งเป็น

3.1 Intraday precision เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มในวันเดียวกันโดยเตรียม paraxanthine และ caffeine ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 8 μg/ml ความเข้มข้นละ 5 หลอดการทดลอง นำความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในรูปของ %RSD ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 10 %[118]

3.2 Interday precision เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มในต่างวันกันโดยเตรียมการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ทำการวิเคราะห์ต่างวันกัน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในรูปของ %RSD ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 15 %[118]

4. ความจำเพาะของการวิเคราะห์ (specificity)

เป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบ retention time ของ paraxanthine และ caffeine ที่เตรียมในซีรั่ม แสดงในรูปของ chromatogram ดูการแยกของ peak paraxanthine และ caffeine เปรียบเทียบกับ blank ซีรั่มว่ามี peak อื่นมารบกวนหรือไม่

5. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความเป็นเส้นตรงเป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้ peak ของสารมาตรฐานกับ internal standard แสดงเป็นค่า coefficient of determination (R^2) โดยเตรียมซีรั่มที่มี paraxanthine และ caffeine ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 μg/ml นำค่า peak area ratio ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน

6. ความคงตัว (stability)

เตรียม paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มความเข้มข้น 2 μg/ml เก็บที่อุณหภูมิ –70 ^{o}C นำตัวอย่างซีรั่มมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine หลังจากเก็บที่เวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 และ 24 สัปดาห์ นำค่า area ratio ที่ได้แต่ละครั้งมาเปรียบเทียบกับค่า area ratio ที่เวลาเริ่มต้น

ส่วนที่ 2 การศึกษานำร่อง (pilot study)

การศึกษานี้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาขนาดของ caffeine ที่เหมาะสมที่สามารถวัดระดับได้ในชีรั่มและไม่ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ใด ๆ ต่อกลุ่มตัวอย่าง โดยทดลองที่ 180 mg
2. หาเวลาที่เหมาะสมในการเจาะเลือดหาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในชีรั่มโดยจะต้องเป็นเวลาที่ caffeine ถูกเปลี่ยนแปลงเป็น paraxanthine ได้มากที่สุด และ paraxanthine ยังไม่ถูกเปลี่ยนแปลงเป็นสารตัวอื่น กล่าวคือเป็นเวลาในช่วงแรกและได้ระดับความเข้มข้นของ paraxanthine สูงสุด

การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเพื่อศึกษา pilot study จำนวน 3 คน

Inclusion criteria

1. เพศหญิง อายุระหว่าง 25 – 45 ปี
2. สุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคเกี่ยวกับตับ ไต โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคแผลในกระเพาะอาหาร
3. ไม่สูบบุหรี่ ไม่ดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์
4. ไม่มีประวัติแพ้ caffeine
5. ไม่ได้รับยาหรือสารที่มีผลรบกวนการเปลี่ยนแปลงของ caffeine เช่น omeprazole, cimetidine ranitidine, ยาในกลุ่ม tricyclic antidepressant, ยาคุมกำเนิด
6. ไม่ตั้งครรภ์และใช้วิธีการคุมกำเนิดโดยไม่ใช้ยา
7. เป็นผู้ที่งดอาหารและเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของ caffeine เช่น ชา กาแฟ ไมโล โอวัลติน ช็อกโกแลต เครื่องดื่มชูกำลังจำพวก เอ็ม-100 เอ็ม-150 กระทิงแดง ลิโพ สปอนเซอร์ และ น้ำอัดลม เป็นเวลา 3 วันก่อนเจาะเลือด

Exclusion criteria

1. มีผลการตรวจการทำงานของตับ และไต ผิดปกติ
2. ไม่ได้งดอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของ caffeine
3. ใช้ยาคุมกำเนิดหรือยาที่มีผลรบกวนการเปลี่ยนแปลงของ caffeine
4. สูบบุหรี่ ดื่มสุรา
5. แพ้ caffeine

วิธีการทดลอง

1. ซักประวัติตามแบบสอบถามที่กำหนด (แสดงในภาคผนวก ก.)
2. ชี้แจงรายละเอียดและขั้นตอนการวิจัย
3. งดอาหารและเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของ caffeine 3 วันก่อนการทดลอง
4. ในวันทดลองให้อาสาสมัครลงชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (ภาคผนวก ค.)
5. เจาะเลือดก่อนรับประทาน caffeine เพื่อตรวจสอบว่าไม่มี caffeine และ paraxanthine ในเลือด
6. ให้รับประทาน caffeine 180 mg ผสมในกาแฟ 2 g ซึ่งสกัด caffeine ออก เติมน้ำ 150 ml น้ำตาล 1 ซอง
7. เจาะเลือดหลังรับประทาน caffeine 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 8 ชั่วโมง
8. นำเลือดมาปั่นแยกซีรั่มวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่มโดยวิธี HPLC
9. นำผลที่ได้จากการศึกษา pilot study ไปประยุกต์ใช้กับกลุ่มตัวอย่างเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของ paraxanthine และความเข้มข้นของ caffeine (paraxanthine / caffeine ratio)

ส่วนที่ 3 การศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง

วัตถุประสงค์ เพื่อหา paraxanthine / caffeine ratio ในซีรั่มในกลุ่มตัวอย่างที่มีโอกาสหรือความเสี่ยงต่อการได้รับสาร PAHs จากควันท่อไอเสียรถยนต์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีโอกาสได้รับสารดังกล่าวน้อยกว่า

การคิดจำนวนตัวอย่างโดยการคำนวนจากสูตร (ภาคผนวก ช)

$$N = 2(Z_\alpha + Z_\beta)^2\delta^2/(X_1-X_2)^2$$

เมื่อ X_1 เป็นค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 1

X_2 เป็นค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 2

δ^2 = pool varience

$$= \frac{(n_1-1)S_1^2 + n_2-1)S_2^2}{n_1+n_2-2}$$

กำหนด α =0.05 ; Z_α =1.96

β =0.10 ; Z_β =1.28

คำนวนกลุ่มตัวอย่างได้กลุ่มละ 15 คน

inclusion criteria

1. เพศหญิง อายุ 25-45 ปี
2. กลุ่มทดลองเป็นกลุ่มที่มีโอกาสหรือความเสี่ยงต่อการได้รับสาร PAHs จากควันท่อไอเสียรถยนต์ 1 ปีขึ้นไป ตัวอย่างกลุ่มนี้เป็นพนักงานเก็บค่าโดยสาร รถประจำทางไม่ปรับอากาศขององค์การขนส่งมวลชนกรุงเทพฯ ทำงานมาเป็นเวลา 1 ปีขึ้นไป
3. กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่มีโอกาสหรือความเสี่ยงต่อการได้รับสาร PAHs จากควันท่อไอเสียรถยนต์น้อยกว่ากลุ่มทดลอง ตัวอย่างกลุ่มนี้เป็นชาวบ้านตำบลหนองยาวและตำบลบ้านช่อง อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา อยู่ในชนบทห่างไกลจากการจราจรแออัด ไม่ได้รับควันจากท่อไอเสียรถยนต์เป็นเวลา 1 ปีขึ้นไป มีอาชีพทำนา ทำสวน แม่บ้าน เป็นต้น
4. มีสุขภาพปกติ ไม่มีโรคเกี่ยวกับตับ ไต โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคแผลในกระเพาะอาหาร
5. มีผลการตรวจการทำงานของตับ และไตอยู่ในเกณฑ์ปกติ
6. ไม่มีประวัติแพ้ caffeine
7. ไม่สูบบุหรี่ ไม่ดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์
8. ไม่ใช้ยาที่มีผลรบกวนการเปลี่ยนแปลงของ caffeine เช่น omeprazole, ranitidine, cimetidine, ยาในกลุ่ม tricyclic antidepressant, ยาคุมกำเนิด
9. ไม่ตั้งครรภ์และใช้วิธีการคุมกำเนิดโดยไม่ใช้ยา
10. เป็นผู้ที่งดอาหารและเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของ caffeine เช่น ชา กาแฟ ไมโล โอวัลติน ช็อกโกแลต น้ำอัดลม เครื่องชูกำลังจำพวก ลิโพ กระทิงแดง เอ็ม-100 เอ็ม-150 สปอนเซอร์ เป็นต้น

Exclusion criteria

1. เป็นผู้ที่ได้รับหรือไม่ได้รับควันจากท่อไอเสียรถยนต์น้อยกว่า 1 ปี
2. มีผลการตรวจการทำงานของตับและไต ผิดปกติ
3. สูบบุหรี่ ดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์
4. ไม่ได้งดอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของ caffeine
5. มีโรคประจำตัว
6. แพ้ caffeine
7. ตั้งครรภ์หรือใช้ยาคุมกำเนิด

วิธีการทดลอง

1. ซักประวัติตามแบบสอบถามที่กำหนด (แสดงในภาคผนวก ก.)
2. สำหรับผู้ที่ผ่านการคัดเลือกตามแบบสอบถามจะได้รับการเจาะเลือด 10 ml เพื่อส่งตรวจการทำงานของตับและไตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และตรวจวัดระดับcarbonmonoxide ในเลือด
3. แจ้งผลการตรวจการทำงานของตับและไตให้อาสาสมัครทราบ และคัดเลือกอาสาสมัครที่ผ่านเกณฑ์
4. ชี้แจงรายละเอียดและขั้นตอนการวิจัย
5. ให้อาสาสมัครงดอาหารและเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของ caffeine 3 วันก่อนการทดลอง
6. ให้อาสาสมัครลงชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (ภาคผนวก ค.)
7. เจาะเลือดก่อนรับประทาน caffeine เพื่อตรวจสอบว่าไม่มี caffeine และ paraxanthine ในเลือด
8. ให้รับประทาน caffeine 180 mg ผสมในกาแฟ 2 g ซึ่งสกัด caffeine ออก เติมน้ำ 150 ml น้ำตาล 1 ซอง
9. เจาะเลือดหลังรับประทาน caffeine 5 ชั่วโมง
10. ปั่นแยกซีรั่มนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine โดยวิธี HPLC

ส่วนที่ 4 การศึกษาเพื่อหาระดับ carbonmonoxide ในเลือด

วัตถุประสงค์ หาระดับ carbonmonoxide ในเลือดเพื่อนำผลที่ได้ยืนยันว่ากลุ่มตัวอย่างได้รับควันจากท่อไอเสียรถยนต์จริงโดยแปลผลเป็นค่า % carboxyhemoglobin

สารเคมี
1. sodium dithionite
2. 25 % ammonia
3. 3.2 % sodium citrate
4. double distill water

อุปกรณ์
1. เครื่อง spectrophotometer
2. separating funnel
3. pipette และ pipette tip
4. beaker
5. เครื่อง centrifuge

วิธีการทดลอง

ดัดแปลงมาจากการทดลองของ Flanagan R.J. และคณะ[119]

1. เขย่าน้ำกลั่น 250 ml ใน separating funnel นาน 5 นาที
2. เติม 25 % ammonia 1 ml เขย่าให้เข้ากัน
3. แบ่งสารละลายมา 100 ml เติมเลือด 1 ml คนให้เข้ากัน
4. นำไปปั่นด้วยเครื่อง cantrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
5. นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 541, 560 และ 576 nm
6. เติม sodium dithionite จำนวนเล็กน้อยในตัวอย่างเลือดหลอดเดิม เขย่าให้ละลาย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538, 555, 568 nm
7. เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 กับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ฌ-ญ) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แต่ละความยาวคลื่นมาคำนวณอัตราส่วนการดูดกลืนแสงดังนี้ 541/560 และ 576/560 นำอัตราส่วนที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟที่ 1 คำนวณอัตราส่วนของความยาวคลื่นภายหลังเติม sodium dithionite โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แต่ละความยาวคลื่นมาคำนวณอัตราส่วน 555/538 และ 555/568 นำอัตราส่วนที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟที่ 2 แปลผลเป็น % carboxyhemoglobin

การรวบรวมข้อมูล

1. ซักประวัติตามแบบสอบถาม
2. บันทึกผลการตรวจการทำงานของตับและไต ระดับ carbonmonoxide ในเลือด ความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่ม ลงในแบบฟอร์มที่กำหนด (ภาคผนวก ข.)
3. คำนวณหา paraxanthine/caffeine ratio ในซีรั่มพร้อมทั้งบันทึกผลในแบบฟอร์มที่กำหนด (ภาคผนวก ข.)
4. วัดระดับ carbonmonoxide ในเลือดและนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ฌ-ญ)

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรั่ม ได้แก่ การหาความเข้มข้นต่ำสุดของ paraxanthine และ caffeine ใน ซีรั่มตัวอย่าง การหาความถูกต้อง ความเที่ยงตรง ความจำเพาะ ความเป็นเส้นตรง และความคงตัว

2. วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) และค่าพิสัย (range)
3. วิเคราะห์ความแตกต่างของค่า paraxanthine / caffeine ratio ระหว่างทั้งสองกลุ่มโดยใช้สถิติ unpaired student ' t - test ในโปรแกรม SPSS ที่ระดับนัยสำคัญ P <0.05 แสดงข้อมูลของค่า paraxanthine / caffeine ratio เป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)
4. วิเคราะห์ความแตกต่างของระดับ carbonmonoxide ในเลือด โดยแสดงเป็นค่า % carboxyhemoglobin (%COHb) นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ unpaired student 't - test ในโปรแกรม SPSS ที่ระดับนัยสำคัญ P < 0.05 แสดงข้อมูลของค่า % carboxyhemoglobin เป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)