หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีทำการทดลอง

3.1 การทดลองติดสลากโปรแลคตินด้วยไอโอดีน-125

วิธีที่ใช้ในการติดสลากโปรแลคติน ด้วยไอโอดีน-125 โดยการใช้ $Na^{125}I$ และ chloramine-T เป็น oxidizing agent เมื่อ $Na^{125}I$ อยู่ในภาวะที่เป็นด่าง จะแตกตัวออกเป็น $^{125}I^+$ และ $^{125}I^-$ ซึ่ง $^{125}I^+$ จะเข้าจับในตำแหน่ง ortho ของ tyrosine molecule ซึ่งประกอบอยู่ในโมเลกุลของโพลีเปปไทด์เชน

วิธีที่ใช้สำหรับการติดสลากในครั้งนี้ อาศัยวิธีการของ Sinha และคนอื่น ๆ (1973) และ Aubert และคนอื่น ๆ(1974) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Greenwood, Hunter and Glover (1963) ทำการติดสลากที่อุณหภูมิ 4 °C (Redshaw and Lynch 1974) ดังมีขั้นตอนต่อไปนี้

006762

3.1.1 การเตรียมเครื่องมือ และสารละลายก่อนการติดสลาก

ก. นำโปรแลคตินมาตรฐานจากข้อ 2.3.5 ก. หน้า 12 แช่ที่ 4°C

ข. นำไอโอดีน-125 อย่างน้อย 0.5 มิลลิคิวรี แช่ที่ 4 °C

ค. เตรียมคลอรามีน-ที ความเข้มข้น 35 ไมโครกรัมในน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร เตรียมโดยละลายคลอรามีน-ที 0.0035 กรัมในน้ำกลั่น 1 มล. แช่ที่ 4 °C

ง. เตรียมโซเดียมเมตตาไบซัลไฟต์ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมในน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร เตรียมโดยละลายโซเดียมเมตตาไบซัลไฟต์ 0.0050 กรัมในน้ำกลั่น 1 มล. แช่ที่ 4 °C

จ. นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ข้อ 2.3.2หน้า 12 ประมาณ 1 มล. แช่ที่ 4 °C

ฉ. นำแอสเสบัฟเฟอร์ ข้อ 2.3.3 หน้า 12 ประมาณ 100 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ช. เตรียม 5 % BSA ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ประมาณ 20 มล.

ซ. เตรียมเซฟาเดกซ์คอลัมน์ ขนาด 0.9 X 23 ซม. โดยแช่เซฟาเดกซ์ประมาณ 5 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ประมาณ 100 มล. ค้างคืน แล้วบรรจุเซฟาเดกซ์นี้ลงในคอลัมน์ที่สะอาด เมื่อได้เซฟาเดกซ์คอลัมน์แล้ว ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์หลายครั้ง จนคอลัมน์ไม่ลดต่ำลงอีก แล้วทำการหา voided volume เมื่อต้องการแยกสาร ให้ผ่าน 5 % BSA เพื่อให้เซฟาเดกซ์อิ่มตัว แล้วให้เหลือสารละลาย อยู่เหนือกว่าระดับความสูงของเซฟาเดกซ์เพียงเล็กน้อย

ฌ. เตรียม เครื่องเขย่าอัตโนมัติ, นาฬิกาจับเวลา, capillary pipette, เตรียมหลอดขนาด 8 X 50 มม. จำนวน 60 หลอด เขียนเลขเรียงตามลำดับ เติมแอสเสบัฟเฟอร์ลงหลอดละ 0.7 มล.

3.1.2 การดิดสลาก และการทำให้สารที่ดิดสลากบริสุทธิ์

ในขณะทำการดิดสลาก ให้ควบคุมอุณหภูมิของน้ำยาให้เป็น 4°C ตลอดเวลา และทุกขั้นตอนจะต้องทำอย่างรวดเร็วและถูกต้อง ดังนี้

ก. เติมไอโอดีน-125 0.5 มิลลิคิวรี ลงในหลอดโปรแลคตินมาตรฐานเขย่า

ข. เติมคลอรามีน-ที ลงไป 10 ไมโครลิตร เขย่า จับเวลา 10 วินาที พอดีแล้ว

ค, เติมโซเดียมเมตตาไบซัลไฟต์ 10 ไมโครลิตร เขย่า

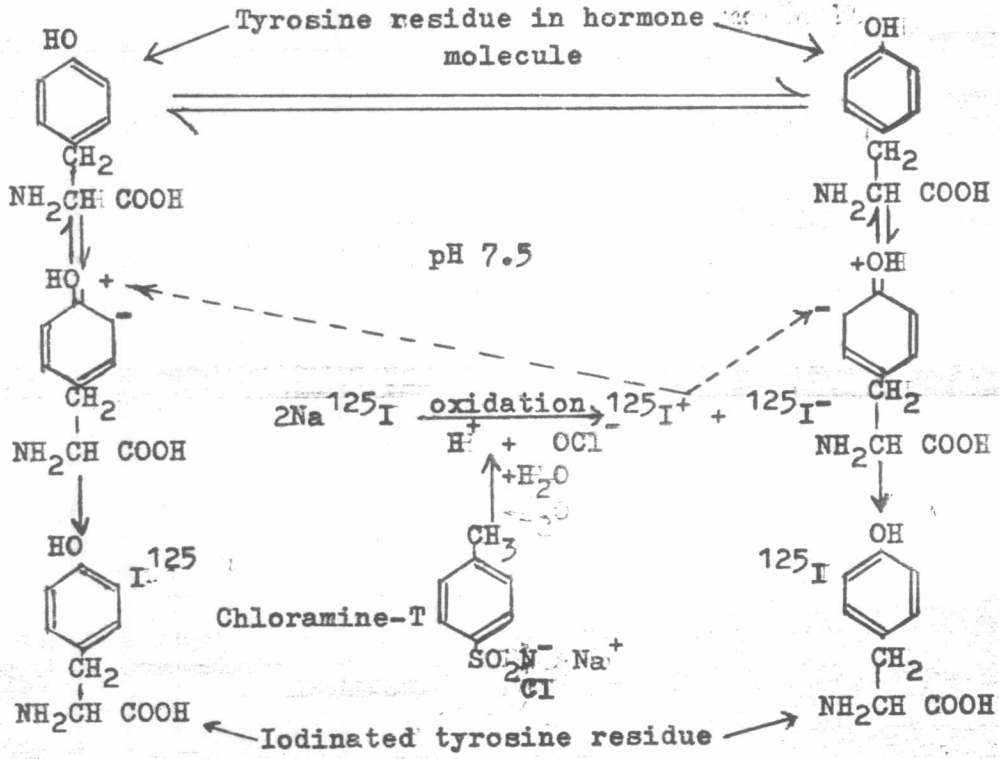
ง. เติมบัฟเฟอร์ลงไป 50 ไมโครลิตร เขย่า

จ. นำส่วนผสม ไปผ่านเซฟาเดกซ์คอลัมน์ที่เตรียมไว้พร้อม ทันที เก็บ 60 fractions โดยเก็บ fraction ละ 10 หยด (ประมาณ 0.3 มล.)

ฉ. นำแต่ละ fraction ไปนับปริมาณรังสี แล้วเขียนกราฟระหว่างปริมาณ

รังสีกับลำดับของ fraction ซึ่งมีกลไกการติดสลากดังแสดงไว้ในรูปที่ 2

รูปที่ 2 แสดงกลไกการติดสลากโปรแลคตินด้วยไอโอดีน-125 (Boltan 1977)



3.1.3 การทดสอบ immunoreactivity ของ ^{125}I-hPRL (tracer)

(การทดสอบ binding)

ก. นำ peak แรกที่เป็นโปรตีนมาทดสอบ โดยให้ทำปฏิกริยากับแอนตีบอดี โดยมี tracer ประมาณ 10,000 cpm/0.1ml และแอนตีบอดีมีความเข้มข้น 1 : 1,000 ใน 0.1 มล.แอสเสบัฟเฟอร์ และให้ส่วนผสมสุดท้ายเป็น 0.5 ml

ข. อินคิวเบท 24 ชม.ที่อุณหภูมิ 25°C

ค. แยก free form ออกจาก bound form ด้วยน้ำยาแขวนตะกอนผงถ่านความเข้มข้น 1% (1% charcoal suspension)

ง. นำ free form และ bound form ไปนับปริมาณรังสี แล้วนำมา

คำนวณ % bound เลือก % bound ที่มี immunoreactivity หลังจากหัก non-specific binding แล้วมี % bound สูงอยู่ในเกณฑ์ใช้งานได้คือประมาณ 20-30%bound

ในการทดลองติดสลาก ดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น เมื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่าใช้ได้ดี แต่เนื่องจากโปรแลคตินมาตรฐาน ที่ได้รับบริจาคจาก NIH ครั้งหลังเป็นโปร-แลคตินคนละตัวกับที่ได้รับมาครั้งแรก ซึ่งทำให้มีปัญหาในการติดสลาก จึงต้องงดการติดสลากแล้วมาใช้ ^{125}I-hPRL จากฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้มาจากองค์การอนามัยโลก สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การเลือกความเข้มข้นของ anti-hPRL เพื่อใช้ในการทดลอง

นำ anti-hPRL ที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3.5 หน้า 13 มา 1 หลอด ละลายด้วยแอสเสบัฟเฟอร์ 1.25 มล. สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของแอนตีบอดี 1 : 5,000 แล้วจึงนำมาทำให้มีความเข้มข้นต่าง ๆกัน ดังนี้คือ 1 : 10,000 1 : 20,000 1 : 40,000 1 : 80,000 1 : 160,000 และ 1 : 320,000 ตามลำดับ นำมาทำปฏิกริยากับ ^{125}I-hPRL 2 ชุด คือชุดแรกเติมโปรแลคตินมาตรฐาน 8.0 เนโนกรัม/ 0.1 มล. กับอีกชุดไม่เติมโปรแลคตินมาตรฐาน แล้วอินคิวเบทนาน 24 ชม. ที่ 25 °C หลังจากนั้นจึงแยก free และ bound ออกจากกันหลังจากคำนวณและเขียนกราฟจึงเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม (1 : 400,000) แล้วทำการทดลองขั้นต่อไป

3.3 การเลือกความเข้มข้นของผงถ่าน เพื่อความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลอง

นำผงถ่านมาแขวนตะกอนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 - 3.0% แล้วให้ดูดซับ ^{125}I-hPRL อิสระที่เหลือจากการทำปฏิกริยาของ ^{125}I-hPRL กับ anti-hPRL ความเข้มข้นสุดท้ายของ anti-hPRL 1 : 400,000 ทำการทดลอง 2 ชุด คือชุดหนึ่งเติมโปรแลคตินมาตรฐาน 2 เนโนกรัม/0.1 มล. กับอีกชุดหนึ่งไม่เติมโปรแลคตินมาตรฐาน

3.4 การศึกษาเพื่อเตรียมกราฟมาตรฐาน

3.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน hPRL เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้หลอดละ 1 ไมโครกรัม จากข้อ 2.3.4 หน้า 12 มา 1 หลอด ละลายในแอสเสบัฟเฟอร์ให้มีปริมาตร 10 มล. สารละลายนี้มีความเข้มข้นเป็น 10.00 นาโนกรัม/ 0.1 มล. จากนั้นทำให้มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งตามลำดับ ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

ก. เขียนหลอดทดลอง ตั้งแต่เบอร์ 1 - 7

ข. ดูดแอสเสบัฟเฟอร์ใส่ หลอดละ 0.5 มล.

ค. ดูดสารละลายมาตรฐาน hPRL ที่มีความเข้มข้น 10.00 นาโนกรัม / 0.1 มล. จำนวน 0.5มล. ใส่ลงในหลอดที่ 1 ผสมกับแอสเสบัฟเฟอร์ แล้วดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 จำนวน 0.5มล.ผสมกับแอสเสบัฟเฟอร์ในหลอดที่ 2 แล้วดูดสารละลายจากหลอดที่ 2 จำนวน 0.5มล.ผสมกับแอสเสบัฟเฟอร์ในหลอดที่ 3 ทำเช่นนี้เรื่อย ๆไปจนครบ 7 หลอด แต่ละหลอดจะมีความเข้มข้นดังนี้

หลอดที่	ความเข้มข้นของโปรแลคติน (นาโนกรัม/0.1 มล.)
1	5.00
2	2.50
3	1.25
4	0.62
5	0.31
6	0.16
7	0.08

3.4.2 การเลือกเวลาในการอินคิวเบท เตรียมสารละลายมาตรฐานตามข้อ 3.4.1 หน้า 19 ทำกราฟมาตรฐาน 3 ชุด อินคิวเบทแต่ละชุดเป็นเวลา 4, 24 และ48 ชม. ที่อุณหภูมิ 25°C นำกราฟมาตรฐานทั้ง 3 ชุดมาเขียนเปรียบเทียบกัน เพื่อ

หาเวลาอินคิวเบทที่เหมาะสม

3.4.3 อิทธิพลของ charcoaled serum ต่อกราฟมาตรฐาน ทำกราฟมาตรฐาน 2 ชุด ชุดหนึ่งเติม charcoaled serum 0.1 มล.ลงในแต่ละหลอดของแต่ละความเข้มข้นของสารมาตรฐาน อีกชุดหนึ่งมีแต่สารละลายมาตรฐาน และให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 0.5มล. เขียนกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบกัน

3.4.4 การทำกราฟมาตรฐาน ทำได้ดังมีรายละเอียดแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 วิธีการทำกราฟมาตรฐาน สำหรับการหาปริมาณโปรแลคติน

หลอด	แอสเสบัฟเฟอร์ (มล.)	charcoaled serum (มล.)	standard hPRL (มล.)	anti-hPRL (มล.)	^{125}I-hPRL (มล.)
Nonspecific binding	0.3	0.1	-	-	0.1
0.00 ng	0.2	0.1	-	0.1	0.1
10.00 ng	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
5.00 ng	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2.50 ng	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
1.25 ng	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.62 ng	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.31 ng	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.16 ng	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.08 ng	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

อินคิวเบทนาน 24 ชม.ที่ 25 °C

เติมน้ำยาแขวนตะกอนผงถ่านความเข้มข้น 1% เคลือบด้วยเดกซ์แตรน ปริมาตร 0.5 มล.(หรือความเข้มข้นของผงถ่านเท่ากับ 5มิลลิกรัม)เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที

ปั่นแยกด้วย refrigerated centrifuge ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใส (bound form) ออกโดยการเท ส่วนตะกอนผงถ่าน (free form) จะยังคงค้างที่ก้นหลอด นำทั้งสองส่วนไปนับปริมาณรังสี ซึ่ง

อ่านออกมาเป็น count per minute (cpm) นำ cpm ที่อ่านได้จาก bound form มาคำนวณ % bound โดยเทียบกับcpm ที่ได้จากผลรวมของ bound และfree form ของแต่ละความเข้มข้น นำค่า % bound ที่คำนวณได้มาเขียนกราฟมาตรฐานบนกระดาษเซมิ-ลอคการิทมิค(semi-logarithmic) ชนิด 2 หรือ 3cycles โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้น และแกน Y เป็น % bound

3.5 การเลือกปริมาตรของซีรัม เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณ hPRL

นำซีรัมที่ทราบค่าปริมาณโปรแลคตินแล้ว ได้จากองค์การอนามัยโลก เรียกว่า Quality control pools serum (Q C P serum) ปริมาตร 0.05 และ0.1 มล. อินคิวเบทกับ anti-hPRL และ ^{125}I-hPRL ให้มีปริมาตรสุดท้ายรวม 0.5 มล. ทำตามวิธีการเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน (ตามตารางที่ 1) ขณะเดียวกันก็ทำกราฟมาตรฐานด้วย เพื่อใช้สำหรับอ่านค่า hPRL

3.6 การทำมาตรฐานควบคุมการทดลอง

นำ pooled serum ที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.3.7 หน้า 13 มีค่าต่ำ ค่ากลาง และค่าสูง มาอย่างละ 1 หลอด นำมาตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินอย่างละ 10 ค่าเก็บข้อมูลไว้ ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง จะได้ข้อมูลทั้งหมด 30 ค่า นำค่าทั้งหมดมาหาค่าmean และ SD

ทุกครั้งที่ทำการตรวจหาปริมาณโปรแลคตินในซีรัม ก็ตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินทั้งค่าสูง ค่ากลาง และค่าต่ำทุกครั้ง แล้วนำมาเทียบกับค่าที่เคยทำไว้แล้ว โดยให้ค่าเฉลี่ยไม่เกิน $\pm$ 2SD ซึ่งถือว่าการทดลองของแต่ละครั้งเชื่อถือได้

3.7 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการทดลอง (Reliability of method)

ในการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการทดลองแต่ละวิธีนั้น Ekins (1970) และ Abraham (1974) กล่าวว่า ควรจะมีการทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) และความไวของการวัดปริมาณ (sensitivity) เพื่อเป็นเครื่องบ่งชี้ว่า วิธีการนั้น ๆ มีความเชื่อถือได้มากน้อยแค่ไหน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ได้ทำการทดลองดังนี้

3.7.1 ทดสอบความจำเพาะ ทดสอบโดยการนำฮอร์โมนมาตรฐาน Luteinizing hormone (LH) Follicle-stimulating hormone (FSH) Human chorionic gonadotrophin (hCG) Human growth hormone (hGH) และ Human placental lactogen (hPL) มาทดสอบ ทำปฏิกริยากับ anti-hPRL ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการในตารางที่ 1 โดยให้ความเข้มข้นของฮอร์โมนมาตรฐานแต่ละชนิด ตั้งแต่ 5 - 1,000 ng/ 0.1 ml พร้อมกันนี้ก็ทำกราฟมาตรฐานควบคู่กันไป คำนวณ % cross reaction ตามวิธีคำนวณข้อ 3.9.2หน้า 23

3.7.2 ทดสอบความแม่นยำของการวัด hPRL การทดสอบความแม่นยำของการหาปริมาณ Abraham (1971,1974)เสนอให้ทดสอบความแม่นยำของการทดลองหลาย ๆ ครั้ง แล้วคิดความแม่นยำจากเปอร์เซนต์ของสัมประสิทธิ์ของความแปรเปลี่ยน(%CV) ซึ่งเท่ากับค่าSD คูณด้วย 100 แล้วหารด้วยค่าเฉลี่ย ซึ่งทดสอบได้โดยตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินใน charcoaled serum ที่มีส่วนผสมของสารละลายมาตรฐานโปรแลคติน 3 ระดับคือ ค่าสูง ค่ากลาง และค่าต่ำ เช่นเดียวกับการทำมาตรฐานควบคุมการทดลองข้อ 3.6 ซึ่งแต่ละครั้ง ที่วัดค่าโปรแลคติน 10 ค่า จะเป็นความแม่นยำของการวัด within assay และสามครั้งรวมกันเป็นความแม่นยำของการวัด between assay

3.7.3 ทดสอบความถูกต้องของการวัด hPRL การทดสอบความถูกต้องของการวัดปริมาณสาร Abraham (1971,1974) เสนอให้ใช้การทดสอบ โดยการเติมฮอร์โมนมาตรฐานที่ทราบปริมาณลงในซีรัม แล้วทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนตามวิธีที่ใช้ แล้วคำนวณ % recovery และ/หรือ % deviation ได้ทดลองเติม hPRL มาตรฐานลงใน charcoaled serum ปริมาณ 6.0, 20.0และ50.0 ng/ml แล้วนำไปตรวจหาปริมาณโปรแลคติน นำค่าโปรแลคตินที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน มา

คำนวณหา % deviation และ % recovery ตามวิธีคำนวณข้อ 3.9.3 หน้า 24

3.7.4 ทดสอบความไวของการวัด hPRL โดยการทำกราฟมาตรฐานของแต่ละความเข้มข้น 10 ครั้ง แล้วคำนวณค่า mean และ SD ของ % bound นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน ปริมาณโปรแลคตินที่อ่านได้จากหลอดที่ไม่เติมโปรแลคตินมาตรฐาน (หลอด 0 ng) ที่ -2 SD จะเป็นค่าความไวของวิธีการวัด hPRL

3.8 การทดสอบหาอายุการใช้งานของ ^{125}I-hPRL (Stability of ^{125}I-hPRL)

ทดสอบได้โดยการเตรียมกราฟมาตรฐาน โดยใช้ ^{125}I-hPRL มีอายุการใช้งานระหว่างสัปดาห์ที่ 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 ตามลำดับ แล้วเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง สำหรับใช้ในการเลือกระยะเวลา ในการใช้ ^{125}I-hPRL เพื่อให้เหมาะสมแก่การนำมาใช้ในการทดลอง

3.9 การคำนวณที่ใช้

3.9.1 Percent(%) bound คำนวณได้ดังนี้

ให้ปริมาณรังสีของ bound form = a cpm

และปริมาณรังสีของ free form = b cpm

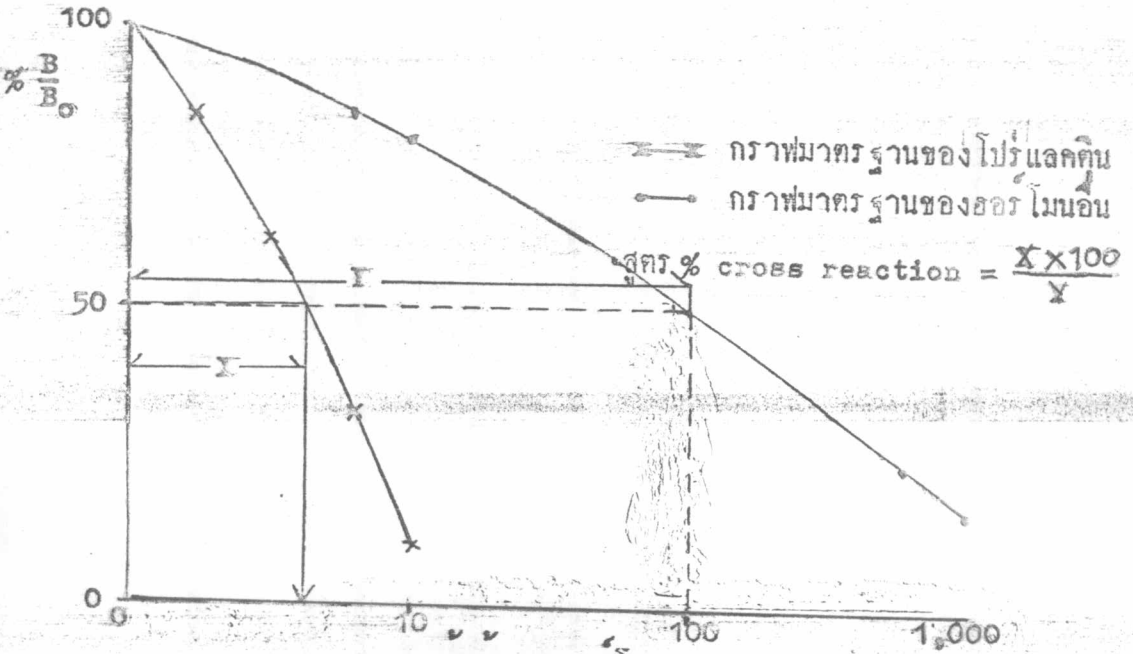
ดังนั้นปริมาณรังสีรวมที่ใช้ในปฏิกริยา (a+b) เกิด bound form = a

" " " " " 100 " " " = $\frac{a \times 100}{(a+b)}$ %

3.9.2 Percent(%) cross reaction คำนวณตามวิธีของ Doerr, Goebel and Kuss (1973) โดยการเขียนกราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลองข้อ 3.7.1 หน้า

22 แล้วคำนวณค่า % cross reaction ตามสูตรที่แสดงไว้ในรูปที่ 3

รูปที่ 3 แสดงการเขียนกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่า % cross reaction



X เป็น ปริมาณความเข้มข้นของโปรแลคติน ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานของโปรแลคติน เมื่อ % $\frac{B}{Bo}$ เท่ากับ 50 %

Y เป็น ปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนอื่น ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนนั้น เมื่อ % $\frac{B}{Bo}$ เท่ากับ 50 %

B = cpm ของ bound form

Bo = cpm ของ bound form ที่ไม่ได้เติมโปรแลคตินมาตรฐาน

3.9.3 Percent(%) deviation และ Percent(%) recovery คำนวณดังนี้

ให้ ปริมาณโปรแลคตินจากกราฟมาตรฐาน = a ng/0.1 ml.

และ ปริมาณโปรแลคตินที่เติมลงไปจริง = b ng/0.1 ml.

% Deviation :-

ปริมาณโปรแลคตินที่วัดได้ ผิดไปจากที่เติมลงไป = $\pm$ (b − a) ng/0.1 ml.

ปริมาณจริง b ng/0.1ml.มีคลาด ±(b - a) ng/0.1ml.

" "100 ". " " "= $\pm \frac{100(b - a)}{b}$ %

% Recovery :-

ปริมาณจริง b ng/0.1ml.วัดได้ a ng/0.1ml.

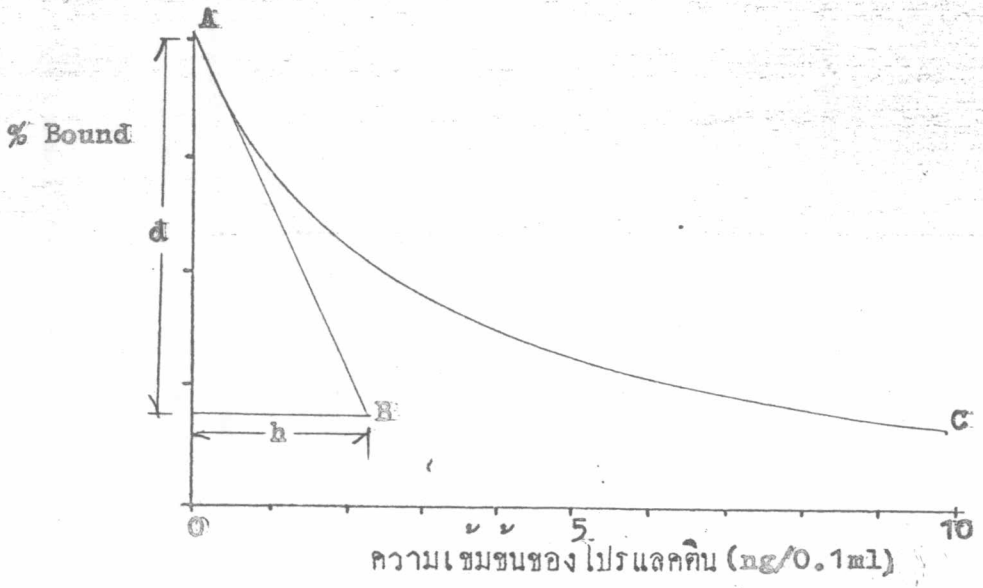
" "100 ". " " "= $\frac{a \times 100}{b}$ %

3.9.4 วิธีการคำนวณ slope ของกราฟมาตรฐาน Ekins and Newman (1970) ได้เสนอให้คำนวณดังมีวิธีดังนี้ (ดูรูปที่ 4 ประกอบ)

ก. ทำการทดลองทำกราฟมาตรฐาน นำ %bound และความเข้มข้นมาเขียนกราฟบนกระดาษกราฟธรรมดา ให้แกน X เป็นความเข้มข้น และแกน Y เป็น % bound จะได้เส้นกราฟ A C

ข. ลากเส้นตรง A B ให้แนบกราฟ ให้ยาวพอสมควรเพื่อที่จะสามารถอ่านค่า d และ h ได้ แล้วคำนวณหาค่า slope ได้จากสูตร slope = $\frac{d}{h}$

รูปที่ 4 แสดงกราฟมาตรฐานที่เขียนบนกระดาษกราฟธรรมดา เพื่อใช้ในการคำนวณ



3.9.3 การคำนวณทางสถิติ ค่าทางสถิติที่ใช้ในการทดลอง มีดังต่อไปนี้

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{N} X_i}{N}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} (X_i - \bar{X})}{N - 1}}$$

$$\% CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

เมื่อ X_i เป็นข้อมูลของปริมาณสารที่วัดได้

N เป็นจำนวนครั้งของการตรวจวัด

$\bar{X}$ เป็นค่าเฉลี่ย

SD เป็นความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

และ $\% CV$ เป็นเปอร์เซนต์ของสัมประสิทธิ์ของความแปรเปลี่ยน.