บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรศึกษา

หญิงหลังวัยหมดประจำเดือน

กลุ่มตัวอย่าง

ศึกษาในตัวอย่างจำนวน 60 คน แบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน (กลุ่มทดลอง) 30 คน และ กลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมนทดแทน (กลุ่มควบคุม) 30 คน โดยมีเกณฑ์ในการคัดเข้า และคัดออก ดังนี้

<u>หลักเกณฑ์ในการคัดเข้า</u>

คัดเลือกตัวอย่างโดยการสัมภาษณ์ และทำแบบสอบถาม (รายละเอียดในภาคผนวก) โดยมีเกณฑ์ในการคัดเข้า ดังนี้

1. หญิงหลังวัยหมดประจำเดือนที่หมดประจำเดือนแล้วไม่เกิน 10 ปี และมีอายุระหว่าง 45-60 ปี

2. ไม่ได้รับแคลเซียมเสริมก่อนและระหว่างการศึกษา

3. มีสุขภาพดี (healthy) ไม่มีโรคของต่อมน้ำลาย ไม่เคยได้รับการฉายรังสีรักษามะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอ และไม่มีโรคประจำตัวที่อาจมีผลต่ออัตราการหลั่งของน้ำลาย เช่น เบาหวาน (diabetes) ภาวะขาดแคลนน้ำคัดหลั่งจากต่อมไทรอยด์ (hypothyreosis) โลหิตจาง (anemia) โรครูมาติค (rheumatic diseases) ความผิดปกติของระบบไหลเวียนเลือด (circulatory disorders) หรือ โรคจิต (psychosis) เป็นต้น (Ericsson, and Hardwick, 1978)

4. ไม่ได้รับประทานยาใด ๆ ที่อาจมีผลต่ออัตราการหลั่งของน้ำลาย (Sreebny and Schwartz, 1997) อย่างน้อย 1 เดือน ก่อนและระหว่างเข้าร่วมโครงการ

5. ไม่สูบบุหรี่

หลักเกณฑ์ในการคัดออก

1. ไม่สามารถมาติดตามผลการวิจัยได้

2. ไม่ใช้ยาตามที่แพทย์สั่ง

การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยของ รพ. พระมงกุฎเกล้า และผู้เข้าร่วมโครงการลงชื่อในแบบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (รายละเอียดในภาคผนวก)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. น้ำแข็ง และกระติกน้ำแข็ง
2. น้ำกลั่น (distilled water) และน้ำปราศจากไอออน (deionized water)
3. กรดไนตริกความเข้มข้น 10 % สำหรับแช่ภาชนะพลาสติกรูปทรงกระบอกก่อนใช้เก็บตัวอย่าง
4. แลนทานัมคลอไรด์ ($LaCl_3$) (Aldrich Chemical Company, U.S.A) โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Merck, Germany) และซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) (Merck, Germany)
5. ชุดน้ำยาตรวจโปรตีนดัดแปลงจากของ Lowry (Modified Lowry Protein Assay Reagent) (Product # 23240, Pierce, U.S.A)
6. อัลบูมินจากซีรัมวัว (BSA) (Product # 23209, Pierce, U.S.A)
7. สารละลายแคลเซียมมาตรฐาน (Merck, Germany) ความเข้มข้น 1, 3, 5, และ 8 ppm.
8. สารละลายโซเดียมมาตรฐาน (Merck, Germany) ความเข้มข้น 5, 10, 30, 50, และ 80 ppm.
9. สารละลายโปแตสเซียมมาตรฐาน (Merck, Germany) ความเข้มข้น 30, 50, 100, 150, และ 200 ppm.
10. ภาชนะพลาสติกรูปทรงกระบอกที่มีฝาปิด เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 1.5 และ 3 เซ็นติเมตร
11. นาฬิกาจับเวลา
12. เครื่องชั่งน้ำหนักวัดทศนิยมได้ 4 ตำแหน่ง (Sartørius, BP 110 S, Sartørius AG, Göettingen, Germany)

13. **เครื่องชั่งน้ำหนักวัดทศนิยมได้ 2 ตำแหน่ง** (Sartørius, BP 3100 S, Sartørius AG, Göettingen, Germany)

14. **เครื่องปั่นเหวี่ยง** (Refrigerated Tabletop Superspeed Centrifuge, Sorvall® Super T 21, Dupont, Connecticut, U.S.A)

15. **หลอดใส่สารปั่นเหวี่ยง** (centrifuge tube) **ขนาด** 15 **มิลลิลิตร**

16. **หลอดใส่สารปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก** (microcentrifuge tube) **ขนาด** 1.5 **มิลลิลิตร สำหรับเก็บน้ำลายเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป**

17. **ตู้ควบคุมอุณหภูมิ** –80° **เซลเซียส** (Cryostar, Harris Manufacturing, U.S.A)

18. **เครื่องผสม** (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, U.S.A)

19. **ปิเปตพลาสติก**

20. **ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด** 20, 100, 200, 1000 **ไมโครลิตร** (Transferpette, Brand, Germany) **และ** 2000 **ไมโครลิตร** (Pipet-Lite, Rainin Instrument Co., Inc., U.S.A)

21. **ปลายปิเปตพลาสติกชนิดใช้แล้วทิ้ง สำหรับปิเปตอัตโนมัติแต่ละขนาด**

22. **ถ้วยบีกเกอร์ ขนาด** 50 **และ** 2000 **มิลลิลิตร**

23. **ตะแกรงใส่หลอดทดลอง** (rack)

24. **คิวเวท** (cuvette) **พลาสติก**

25. UV-VIS **สเปคโทรโฟโตมิเตอร์** (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotch, England)

26. **อะตอมมิกแอบซอบชั่นสเปกโทรโฟโตมิเตอร์** (atomic absorption spectrophotometer) (SpectrA A 300, Varian, Australia)

การรวบรวมข้อมูล

1. **ข้อมูลทั่วไปด้านประชากรศาสตร์ เช่น อายุ ระยะเวลาหมดประจำเดือน รวมทั้งประวัติโรคประจำตัว ประวัติการฉายรังสีรักษามะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอ และประวัติการได้รับยาในช่วง** 1 **เดือนที่ผ่านมา (รายละเอียดในภาคผนวก)**

2. **น้ำลายทั้งหมดในภาวะพักโดยวิธีการบ้วน** (spitting method)

2.1 **ให้ผู้ป่วยงดน้ำและอาหารก่อนทำการเก็บน้ำลายอย่างน้อย** 1 **ชั่วโมง** (Dawes, and Chebib, 1972)

2.2 **ให้ผู้ป่วยกลืนน้ำลายที่มีในปากก่อนเริ่มเก็บน้ำลาย** (Navazesh, and Christensen, 1982)

2.3 ขณะเก็บน้ำลายให้ผู้ป่วยนั่งก้มหน้าเล็กน้อย ห้ามเคลื่อนไหวลิ้นหรือกลืนน้ำลาย ให้อมน้ำลายไว้ในปากและบ้วนลงในภาชนะพลาสติกรูปทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซ็นติเมตร ที่มีการชั่งน้ำหนักไว้ก่อน (pre-weighed) โดยใช้แรงน้อยที่สุดทุก ๆ 2 นาที (Sreebny, 1996) ตามสัญญาณนาฬิกาที่ตั้งไว้ เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที หากได้น้ำลายน้อยจะเก็บน้ำลายต่อไปจนกว่าจะได้ปริมาณที่ต้องการประมาณ 3 มิลลิลิตร พร้อมทั้งจับเวลา

2.4 ปิดฝาภาชนะแล้วเก็บไว้ในกระติกน้ำแข็ง นำกลับมายังห้องปฏิบัติการ

3. ชั่งน้ำหนัก และคำนวณอัตราการหลั่งของน้ำลาย

3.1 นำภาชนะใส่น้ำลายออกจากกระติกน้ำแข็ง เช็ดให้แห้งก่อนชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักวัดทศนิยมได้ 2 ตำแหน่ง บันทึกค่าที่ได้

3.2 คำนวณอัตราการหลั่งของน้ำลาย โดยใช้ค่าที่ได้ลบด้วยค่าน้ำหนักภาชนะที่ชั่งได้ครั้งแรก หารด้วยเวลาที่ใช้ในการเก็บน้ำลาย จะได้ค่าที่มีหน่วยเป็น กรัม/นาที

3.3 เปลี่ยนค่าที่ได้เป็นหน่วย มิลลิลิตร/นาที ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ กรัม/นาที (Navazesh, and Christensen, 1982) เนื่องจากน้ำลายมีค่าความถ่วงจำเพาะใกล้เคียงกับน้ำ คือ 1.002-1.008 (Whelton, 1996)

4. ปั่นเหวี่ยงน้ำลาย

4.1 ตั้งโปรแกรมเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยมีค่าแรงที่ใช้ในการหมุน (Relative centrifuged force, RCF) เป็น 18,000 g อุณหภูมิ 4° เซลเซียส และตั้งเวลา 10 นาที (Leimola-Virtanen, Helenius, and Laine, 1997)

4.2 เทน้ำลายทั้งหมดที่ได้จากผู้ป่วยแต่ละรายลงในหลอดใส่สารปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร แต่ละหลอด แล้วทำการปั่นเหวี่ยงตามโปรแกรมที่ตั้งไว้

4.3 ใช้ปิเปตพลาสติกดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ออกจากส่วนที่ตกตะกอนด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ได้ส่วนของตะกอนปนมา

4.4 เก็บของเหลวส่วนบน ลงในหลอดใส่สารปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยแบ่งเป็นส่วน ๆ ก่อนนำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80° เซลเซียส จนกว่าจะถูกนำมาวิเคราะห์ ต่อไป

5. เตรียมน้ำลายเพื่อส่งตรวจหาความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียมและโปแตสเซียมด้วยวิธีอะตอมมิกแอบซอบชั่นสเปกโทรสโคปี (AAS) โดยแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป (กำหนดให้ค่าที่ใช้ในการหาค่า

I20920850

เฉลี่ยแตกต่างกันได้ไม่เกินร้อยละ 5 ในกรณีที่มีความแตกต่างกันมากกว่าค่าที่กำหนดจะทำการเตรียมตัวอย่างและส่งตรวจใหม่อีกครั้ง)

5.1 นำน้ำลายออกจากตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้ต่อไป หลังจากละลายแล้วถ้าพบว่ามีตะกอนปะปนอยู่จะทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยวิธีการเดิม เพื่อนำเฉพาะของเหลวส่วนบนมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

5.2 เตรียมน้ำลายเพื่อส่งตรวจหาความเข้มข้นของแคลเซียม โดยการเจือจางน้ำลาย 10 เท่า ในแลนทานัม 1% (Varian Techtron Pty Limited, 1989)

5.2.1 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารละลายแลนทานัมคลอไรด์ (10% $LaCl_3$) 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในภาชนะพลาสติกรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซ็นติเมตร

5.2.2 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดน้ำปราศจากไอออน 1,200 ไมโครลิตรใส่ลงไป

5.2.3 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดน้ำลาย 150 ไมโครลิตร ใส่ลงไป แล้วดูดของเหลวขึ้นลง 3 ครั้ง เพื่อชะล้างน้ำลายที่ติดภายในปลายพลาสติก ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

5.3 เตรียมน้ำลายเพื่อส่งตรวจหาความเข้มข้นของโซเดียม โดยการเจือจางน้ำลาย 10 เท่า ในโปแตสเซียม 0.2% (Varian Techtron Pty Limited, 1989) โดยการทำเช่นเดียวกับการเตรียมน้ำลายเพื่อตรวจหาความเข้มข้นของแคลเซียม แต่ใส่โปแตสเซียมคลอไรด์ (2% KCl) แทนแลนทานัมคลอไรด์

5.4 เตรียมน้ำลายเพื่อส่งตรวจหาความเข้มข้นของโปแตสเซียม โดยการเจือจางน้ำลาย 10 เท่า ในซีเซียม 0.1% (Varian Techtron Pty Limited, 1989) โดยการทำเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อตรวจหาความเข้มข้นของแคลเซียม แต่ใส่ซีเซียมคลอไรด์ (1% CsCl) แทนแลนทานัมคลอไรด์

5.5 นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 5.2, 5.3, และ 5.4 ส่งศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม และโปแตสเซียม โดยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแคลเซียม โซเดียม และโปแตสเซียมมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังกล่าวมาแล้ว ตามลำดับต่อไป จะได้ค่าความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม และโปแตสเซียมในตัวอย่าง มีหน่วยเป็น ppm.

5.6 คำนวณค่าความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม และโปแตสเซียมในน้ำลาย โดยมีหน่วยเป็น มิลลิโมล/ลิตร ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารในน้ำลาย} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง} \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจาง}}{\text{น้ำหนักอะตอมของธาตุ}}$$

6. ตรวจหาโปรตีนทั้งหมดในน้ำลาย ด้วยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ชุดตรวจโปรตีนที่ดัดแปลงจาก Lowry (Product # 23240, Pierce, U.S.A) โดยปฏิบัติตามคู่มือ (Pierce, 1999) ดังนี้

6.1 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ คือ อัลบูมินจากซีรัมของวัว (Bovine serum albumin, BSA) กับค่าการดูดกลืนแสง โดยมีความเข้มข้นของโปรตีน 50, 100, 150, 200, และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแต่ละความเข้มข้นจะทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ทั้ง 3 ค่า มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยเพื่อใช้ในการเขียนกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงต่อไป

6.1.1 เตรียมอัลบูมินจากซีรัมของวัว 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดน้ำกลั่น 195, 190, 185, 180, และ 175 ไมโครลิตร ใส่ในภาชนะพลาสติกรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซ็นติเมตร แต่ละอัน แล้วใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดอัลบูมินจากซีรัมของวัว 5, 10, 15, 20, และ 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในภาชนะแต่ละอัน ตามลำดับ พร้อมทั้งดูดของเหลวขึ้นลง 3 ครั้ง เพื่อชะล้างอัลบูมินจากซีรัมของวัวที่ติดในปลายพลาสติก

6.1.2 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารดัดแปลงจากของ Lowry (Modified Lowry reagent) 1,000 ไมโครลิตร ใส่ในภาชนะแต่ละอัน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

6.1.3 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารฟีนอล (phenol reagent) 1 N ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในภาชนะแต่อัน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จะเกิดสารสีน้ำเงิน (blue)

6.1.4 เทสารที่ได้แต่ละหลอดใส่ในคิวเวทพลาสติกแต่ละอัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และบันทึกค่าที่ได้

6.1.5 เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกน X) หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น (แกน Y) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำลายจากตัวอย่างต่อไป

6.2 หาความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำลาย โดยจะทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละครั้งมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานต่อไป

6.2.1 เจือจางน้ำลาย 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดน้ำกลั่น 180 ไมโครลิตร ใส่ในภาชนะพลาสติกรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซ็นติเมตร

แล้วใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดน้ำลาย 20 ไมโครลิตร ใส่ลงไป พร้อมทั้งดูดของเหลวขึ้นลง 3 ครั้ง เพื่อชะล้างน้ำลายที่ติดในปลายพลาสติก

6.2.2 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารที่ดัดแปลงจากของ Lowry 1,000 ไมโครลิตร ใส่ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

6.2.3 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารฟีนอล 1 N ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในภาชนะแต่ละอัน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จะเกิดสารสีน้ำเงิน

6.2.4 เทสารที่ได้ใส่ในคิวเวทพลาสติก นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และบันทึกค่าที่ได้

6.2.5 เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่าความชัน (slope) ของเส้นกราฟมาตรฐานในการคำนวณ จะได้ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง มีหน่วยเป็น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

6.2.6 คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำลาย โดยมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำลาย} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง X จำนวนเท่าของการเจือจาง}}{1000}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทำโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.0 สำหรับวินโดว์ โดย

1. สถิติพรรณา ใช้ค่าเฉลี่ยเลขคณิต และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับข้อมูลอายุ ระยะเวลาการหมดประจำเดือน อัตราการหลั่งของน้ำลาย ความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และโปรตีน

2. ทดสอบการกระจายของประชากรของตัวแปรอายุ ระยะเวลาการหมดประจำเดือน อัตราการหลั่งของน้ำลายทั้งหมดในภาวะพัก ความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และโปรตีนก่อนการศึกษา โดยใช้ Kolmogorov-Smirnov test ถ้ามีการกระจายของประชากรแบบปกติ ($p > 0.05$) ใช้สถิติอนุมานดังต่อไปนี้ในการทดสอบสมมุติฐานการวิจัย

3. สถิติอนุมาน เพื่อทดสอบสมมุติฐานการวิจัยที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

3.1 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวแปรต่าง ๆ ก่อนการศึกษา

3.1.1 อายุ ระยะเวลาการหมดประจำเดือน และอัตราการหลั่งของน้ำลายทั้งหมดในภาวะพักระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้ทีเทสต์ (t-test) เพื่อทดสอบสมมุติฐานทางสถิติ ดังนี้

$H_O1: \mu_{i,\ HRT} = \mu_{i,\ control}$ $H_A1: \mu_{i,\ HRT} \neq \mu_{i,\ control}$

โดย i แทนอายุ ระยะเวลาการหมดประจำเดือน และอัตราการหลั่งของน้ำลายทั้งหมดในภาวะพักก่อนการศึกษา

3.1.2 ความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และโปรตีนระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรตามหลายตัว (Multivariate Analysis of Variance, MANOVA) ด้วยสถิติ Pillai's Trace เนื่องจากตัวแปรเหล่านี้มีความสัมพันธ์กัน เพื่อทดสอบสมมุติฐานทางสถิติ ดังนี้

$H_O2: \mu_{i,\ HRT} = \mu_{i,\ control}$ $H_A2: \mu_{i,\ HRT} \neq \mu_{i,\ control}$ อย่างน้อย 1 คู่

โดย i แทน ความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และโปรตีนก่อนการศึกษา

3.2 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการหลั่งของน้ำลายทั้งหมดในภาวะพัก ความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และโปรตีนระหว่างก่อนและภายหลัง 3 เดือน โดยใช้แพร์ทีเทสต์ (paired t-test) เพื่อทดสอบสมมุติฐานทางสถิติ ดังนี้

$H_O3: \mu_{i1} = \mu_{i2}$ $H_A1: \mu_{i1} \neq \mu_{i2}$

โดย i1 แทนค่าเฉลี่ยอัตราการหลั่งของน้ำลายทั้งหมดในภาวะพัก ความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และโปรตีนก่อนการศึกษา

และ i2 แทนค่าเฉลี่ยอัตราการหลั่งของน้ำลายทั้งหมดในภาวะพัก ความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และโปรตีนภายหลัง 3 เดือน

3.3 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวแปรต่าง ๆ ภายหลัง 3 เดือน ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

3.3.1 อัตราการหลั่งของน้ำลายทั้งหมดในภาวะพัก โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (Analysis of Covariance, ANCOVA) โดยใช้อัตราการหลั่งของน้ำลายทั้งหมดในภาวะพักก่อนการศึกษาเป็นตัวแปรร่วม (covariate) เพื่อทดสอบสมมุติฐานทางสถิติ ดังนี้

$H_O4: \mu_{i,\ HRT} = \mu_{i,\ control}$ $H_A4: \mu_{i,\ HRT} \neq \mu_{i,\ control}$

โดย i แทน อัตราการหลั่งของน้ำลายทั้งหมดในภาวะพักภายหลัง 3 เดือน

3.3.2 ความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และโปรตีน โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรตามหลายตัว ด้วยสถิติ Pillai's Trace โดยมีความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และโปรตีนก่อนการศึกษาเป็นตัวแปรร่วม เพื่อทดสอบสมมุติฐานทางสถิติ ดังนี้

$H_O5: \mu_{i,\ HRT} = \mu_{i,\ control}$ $H_A5: \mu_{i,\ HRT} \neq \mu_{i,\ control}$ อย่างน้อย 1 คู่

โดย i แทน ความเข้มข้นของแคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และโปรตีน ภายหลัง 3 เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย