บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เลือดที่ได้จากผู้ป่วยและคนปกติ เครื่องมือ สารเคมี

1. **เลือดที่ใช้ในการทดลอง และอุปกรณ์สำหรับการเก็บเลือด**
   - 1.1 เลือดจากผู้ป่วยโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ได้รับการรักษาด้วยยา nitroglycerin
   - 1.2 เลือดจากคนปกติมีสุขภาพแข็งแรงที่มาบริจาคโลหิตให้กับสภากาชาดไทย
   - 1.3 Syring ขนาด 3 มล.
   - 1.4 หัวเข็มเบอร์ 21
   - 1.5 แอลกอฮอล 70% สำหรับฆ่าเชื้อ
   - 1.6 Tube ใส่เลือดที่มี EDTA ขนาด 3 มล.

2. **เครื่องมือ** (Materials)
   - 2.1 เครื่องชั่งละเอียด (A200S, Sartorious)
   - 2.2 Standard pH meter (Ea920, Orion research)
   - 2.3 High-speed centrifuge (IE CB-22M)
   - 2.4 UV-visible recording spectrophotometer (UV-1600A, Shimadzu)
   - 2.5 Test tube ขนาด 10 มล.
   - 2.6 Cuvette ขนาด 3 ml.

3. **สารเคมี**
   - 3.1 Acetic acid (E.Merck)
   - 3.2 Citric acids (E.Merck)
   - 3.3 Drabkin's solution (Life Science Dynamics Division of Arnaparn CO.,LTP)
   - 3.4 Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) (E.Merck)
   - 3.5 Dry diethylaminoethyl-Cellulose (DEAE, DE-52) (Whatman)
   - 3.6 Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (Farmitalia Carlio Erba)
   - 3.7 Hydrochloric acids (E.Merck)

I 19172114

3.8 Monopotassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4) (E.Merck)

3.9 NADH (Sigma 340-101) (Sigma Chemical Company)

3.10 Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) (E.Merck)

3.11 Sodium chloride (E.Merck)

3.12 Sodium cyanide (NaCN) (E.Merck)

3.13 Sodium hydroxide (E.Merck)

3.14 Trisodium citrate (E.Merck)

4. การเตรียมสารเคมี

4.1 สารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Potassium phosphate buffer)0.15 M, pH 6.6

เตรียมโดยละลายไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 13.2 กรัม (หรือ $K_2HPO_4 .H_2O$ 17.1 กรัม) ในน้ำกลั่น 500 มล. และละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 10.2 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล. ผสมสารละลายทั้งสองในอัตราส่วนเท่าๆกัน ปรับ pH ให้ได้ 6.6 โดยเติมสารละลายไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเมื่อสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์มี pH น้อยกว่า 6.6 หรือเติมสารละลายโมโนโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเมื่อสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์มี pH มากกว่า 6.6 บรรจุขวดเก็บภายใต้ในอุณหภูมิ 4 ^{0}ซ มีอายุการใช้ได้นาน 14 วัน

4.2 สารละลายซิเตรดบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) 0.05 M, pH 4.7

เตรียมโดยละลายซิตริกแอซิค 0.5กรัม และไตรโซเดียมซิเตรท 0.76 กรัมในน้ำกลั่น 90 มล. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 M หรือไฮดรอคลอริกแอซิค 1M เพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 4.7 หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในสารละลายซิเตรดบัฟเฟอร์จนได้ปริมาตร 100 มล. บรรจุขวดเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ มีอายุการใช้ได้นาน 14 วัน

4.3 สารละลายโปแตสเซียมเฟอริไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide) 20%

เตรียมโดยละลายโปแตสเซียมเฟอริไซยาไนด์ 2 กรัมในน้ำกลั่น 10 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 20% {20% $K_3Fe(CN)_6$ } บรรจุในขวดสีชาภายใต้อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ มีอายุการใช้ได้นาน 7 วัน

4.4 สารละลายโปแตสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide) 0.5 mM

เตรียมโดยละลายโปแตสเซียมเฟอริไซยาไนด์ 16.4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 100 มล. บรรจุในขวดสีชาเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ มีอายุการใช้ได้นาน 7 วัน

4.5 สารละลายโซเดียมไซยาไนด์ (Sodium cyanide) 0.77 M

เตรียมโดยละลายโซเดียมไซยาไนด์ 0.38 กรัมในน้ำกลั่น 10 มล. การเตรียมสารละลายโซเดียมไซยาไนด์ต้องผสมอย่างระมัดระวังในตู้ควัน (hood) สารละลายที่เตรียมได้บรรจุในขวดสีชาเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ มีอายุการใช้ได้นาน 7 วัน

4.6 NADH 2 mM

เตรียมโดยละลาย NADH 0.001 กรัม ในน้ำกลั่น 0.7 มล. จะได้สารละลาย NADH 2 mM บรรจุในขวดสีชาเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ เมื่อผสมแล้วต้องใช้ภายใน 24 ชั่วโมง

4.7 EDTA 0.27 M, pH 7

เตรียมโดยละลาย EDTA 10 กรัมในน้ำกลั่น 90 มล. แล้วค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 M เพื่อปรับ pH ให้ได้ 7 เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มล. บรรจุขวดเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ มีอายุการใช้ได้นาน 14 วัน

4.8 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 M

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล. บรรจุขวดเก็บภายใต้อุณหภูมิห้อง

4.9 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride solution) 0.15 M

เตรียมโดยละลายโซเดียมคลอไรด์ 8.8 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มล. จะได้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 M บรรจุขวดเก็บภายใต้อุณหภูมิ4 ^{0}ซ มีอายุการใช้งานได้นาน 14 วัน

4.10 ฮีโมโกลบินสับสเตรท (Hemoglobin substrate) 0.18 mM

ขั้นตอนการเตรียมฮีโมโกลบินสับสเตรทจะต้องเตรียมที่อุณหภูมิ 25^{0}ซ ดังนี้

4.10.1 นำ whole blood ที่เคลือบ EDTA สารกันเลือดแข็ง ใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 3 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 25 – 30 °ซ แยกเอาส่วนใส (plasma) ออกเหลือเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง (pack cells ,erythrocytes)

4.10.2 นำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้มาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.15 M โดยที่เซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวน 1 มล. เติมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 มล.(1:10) ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 25 – 30 °ซ เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง ขั้นตอนนี้ให้ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

4.10.3 นำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้าสู่กระบวนการสกัดเอาเอนไซม์ NADH- cytochrome b_5 reductase ออกจากเซลล์เม็ดเลือด โดยนำเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวน 10 มล.ใส่ในน้ำกลั่น 60 มล.และเติม Dry diethylaminoethyl-Cellulose (DEAE, DE-52) 1.6 กรัม เขย่าให้เข้ากันนาน 10 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 25 – 30 °ซ เป็นเวลา 3 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอดเซนติฟิวส์หลอดใหญ่แล้วเติม DEAE จำนวนเท่าเดิมและทำซ้ำอีก 3 ครั้ง

4.10.4 นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณฮีโมโกลบินโดยการวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (optimal density, OD.) ที่ 540 นาโนเมตร

4.10.5 นำส่วนใสข้อ 4.10.4 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินสับสเตรท เท่ากับ 0.18 mM เมื่อผสมแล้วจะต้องใช้ภายใน 24 ชั่วโมง

4.10.6 ฮีโมโกลบินสับสเตรท จะต้องผ่านการทดสอบว่าไม่มีเอนไซม์ NADH - cytochrome b_5 reductase โดยใช้วิธีการวัดสมรรถนะเอนไซม์ NADH-cytochrome b_5 reductase (Hegesh, Calmanovici and Avon, 1968) ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลอง

4.10.7 Hemoglobin substrate ที่สกัดได้บรรจุในขวดสีชาภายใต้อุณหภูมิ 4 °ซ มีอายุการใช้ได้นาน14 วัน

5. วิธีการทดลอง

5.1 เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดลอง

5.1.1 กลุ่มตัวอย่างเป็นผู้ป่วยที่ได้รับยา nitroglycerin

5.1.1.1 เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion)

ก. ผู้ป่วยชาย หรือหญิง ที่เข้ามารักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีอายุระหว่าง 20-65 ปี จำนวน 40 คนโดยแบ่งเป็นผู้ป่วยชายจำนวน 20 คน และผู้ป่วยหญิงจำนวน 20 คน

ข. ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา nitroglycerin ทางหลอดเลือดดำเท่านั้น

ค. ขนาดยาที่ผู้ป่วยได้รับในการรักษาอยู่ในช่วง 24,000 – 104,000 ไมโครกรัม โดยให้อัตราเร็ว 0.1 – 3 µg/Kg/min เป็นระยะเวลา 1 – 2 วัน

5.1.1.2 เกณฑ์การไม่คัดเลือกเข้าศึกษา (Exclusion)

ก. ผู้ป่วยที่มีระบบการไหลเวียนโลหิตไม่คงที่ (Hemodynamic unstable) เช่น ผู้ป่วยมีความดันโลหิตต่ำ ภาวะช็อคเนื่องจากการเสียเลือด ภาวะหัวใจล้มเหลวรุนแรง

ข. ผู้ป่วยที่มีภาวะโลหิตจาง เช่น มีค่าฮีมาโตคริตต่ำกว่า 30%และจำเป็นจะต้องให้เลือดทดแทน

ค. ผู้ป่วยที่เป็นโรคติดต่อร้ายแรง เช่น โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคไวรัสตับอักเสบ โรคเริม หรือโรคที่ติดต่อทางเลือดต่างๆ

ง. ผู้ป่วยที่ได้รับยา เช่น ยากลุ่ม organic nitrates ในรูปแบบอื่นๆ และได้มีการทำ informed consent (ในภาคผนวก ค) ไม่ได้รับยาอื่นที่ไม่ได้มีผลต่อฮีโมโกลบิน (ตารางที่ 3) ร่วมกับยา nitroglycerin ทางหลอดเลือดดำ

5.1.2 กลุ่มตัวอย่างที่เป็นคนปกติ

5.1.2.1 เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion)

ชายและหญิงไทยที่มีร่างกายแข็งแรงอายุระหว่าง 20 – 65 ปี ที่มาบริจาคโลหิตให้กับสภากาชาดไทยและเคยบริจาคเลือดมากกว่า 1 ครั้งเพื่อป้องกันโรคติดต่อที่อาจได้จากผู้รับบริจาค จำนวน 114 ท่านโดยแบ่งเป็นเพศชาย 57 คนและเพศหญิงจำนวน 57 คน ได้มีการทำ informed consent (ในภาคผนวก ค) ไม่ได้รับยาอื่นที่มีผลต่อฮีโมโกลบิน (ตารางที่ 3)

5.1.2.2 เกณฑ์การไม่คัดเลือกเข้าศึกษา (Exclusion)

ผู้ที่มาบริจาคโลหิตที่รับประทานวิตามินซีและวิตามินบี 2 เป็นประจำและกำลังได้รับยาที่มีผลต่อฮีโมโกลบิน (ตารางที่ 3)

5.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

เลือดที่เจาะได้จากคนปกติและผู้ป่วยจำนวน 3 มล.ใส่ในหลอดทดลองที่เคลือบ EDTA สารกันเลือดแข็ง นำเลือดไปเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4^{0}ซ และต้องทำการทดลองหาระดับเมท-ฮีโมโกลบินภายใน 6 ชั่วโมง และทำการทดลองหาปริมาณเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส ภายใน 12 ชั่วโมง

5.3 การวัดปริมาณความเข้มข้นของเมทฮีโมโกลบินในเลือดทั้ง 2 กลุ่ม

ทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของเมทฮีโมโกลบินในเลือด โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Hegesh, 1970 มีขั้นตอนการวัดดังนี้ คือ

5.3.1 การเตรียมแบลงค์ (Blank)

ใช้ปิเปตดูดสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.15 M , pH 6.6 จำนวน 1.5 มล. และน้ำกลั่นจำนวน 1.5 มล. ใส่ในคิวเวตต์ผสมให้เข้ากัน (C1)

5.3.2 ใช้ปิเปตดูดเลือด (whole blood) จำนวน 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองเซนติฟิวส์ที่มีน้ำกลั่น 3.9 มล.ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นดูดสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์(0.15 M , pH 6.6) จำนวน 4 มล.ผสมให้เข้ากัน

5.3.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ5.3.2 ปั่นด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 3,200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 25 - 30^{0}ซ เป็นเวลา 5 นาที

5.3.4 แบ่งฮีโมลัยเสกต์ที่ได้จากข้อ 5.3.3 ใช้ปิเปตดูดใส่ในคิวเวตต์ 2 หลอดเท่าๆกัน หลอดละ 3 มล. (C2 และ C3)

5.3.5 นำคิวเวตต์ C3 มาเติมสารละลาย 20% $K_3Fe(CN)_6$ จำนวน 100 ไมโครลิตรปิดด้วยแผ่นพาราฟิลล์ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 2 นาที (เพื่อให้ฮีโมโกลบินเปลี่ยนเป็นเมทฮีโมโกลบิน) ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง

5.3.6 นำคิวเวตต์ C2 และ C3ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตรโดยใช้คิวเวตต์ C1 เป็นแบลงค์ กำหนดค่าสัญญลักษณ์ ที่วัดได้ C2 = A_2a และ C3 = A_3a (ก่อนทำการวัดต้องปรับค่าเริ่มต้นที่ 0 ก่อน)

5.3.7 เติมสารละลายโซเดียมไซยาไนด์ (0.77 M) จำนวน 100 ไมโครลิตรลงในคิวเวตต์ C2 และ C3 (เพื่อเปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินเป็นไซยาโนเมทฮีโมโกลบินและไม่ดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร) ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที ก่อนทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง

5.3.8 นำคิวเวตต์จากข้อ5.3.7 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตรโดยใช้คิวเวตต์ C1 เป็นแบลงค์ กำหนดค่าสัญญลักษณ์ที่วัดได้ C2 = A_2b และ C3 = A_3b

การคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นเมทฮีโมโกลบิน

$$\text{เปอร์เซนต์เมทฮีโมโกลบิน (\% methemoglobin)} = \frac{(A_2a - A_2b)}{(A_3a - A_3b)} \times 100$$

5.4 **การหาค่าฮีโมโกลบิน** (Hemoglobin assay)

5.4.1 ดูดเลือด (whole blood) จำนวน 40 ไมโครลิตร (ถ้าเป็นฮีโมโกลบิน สับสเตรท จำนวน 250 ไมโครลิตร) ใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ที่มีสารละลาย Drabkin จำนวน 5 มล ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 25 – 30 ^{0}ซ นาน 2 – 3 นาที

5.4.2 ใช้ปิเปตดูดสารละลายส่วนที่ใสหรือฮีโมลัยเสกต์ใส่ในคิวเวตต์จำนวน 3 มล.

5.4.3 นำคิวเวตต์ที่ใส่ฮีโมลัยเสกต์จากข้อ 5.4.2 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้คิวเวตต์ ที่มีน้ำกลั่นเป็นแบลงค์ บันทึกค่าการดูดกลืนแสง (ก่อนทำการวัดต้องปรับค่าเริ่มต้นที่ 0 ก่อน)

การคำนวณหาฮีโมโกลบิน ประยุกต์โดยใช้วิธีการของ Hegesh และคณะ (1970)

ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) = OD.540 x 0.207 μM in sample

5.5. **การวัดสมรรถนะเอนไซม์** NADH-cytychrome b5 reductase

5.5.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายตามลำดับต่อไปนี้ลงในหลอดทดลองเซนติฟิวส์ขนาด 10 มล.

- สารละลาย EDTA (0.27 M, pH 7) จำนวน 20 ไมโครลิตร
- สารละลายซิเตรดบัฟเฟอร์(0.05 M, pH 4.7) จำนวน 100 ไมโครลิตร
- สารละลายโปแตสเซียมเฟอริไซยาไนด์ (0.5 mM) จำนวน 3 มล.
- ฮีโมโกลบินสับสเตรท (0.18 mM) จำนวน 2 มล
- น้ำกลั่นจำนวน 3.48 มล.
- เลือดจำนวน 10 ไมโครลิตร

หมายเหตุ : ในการตรวจสอบฮีโมโกลบินสับสเตรทที่สกัดได้ว่าไม่มีเอนไซมไซโตโครมบีห้ารีดักเตสเหลืออยู่ในฮีโมโกลบินสับสเตรท ใช้ปิเปตดูดฮีโมโกลบินสับสเตรทจำนวน 4.2 มล.แทนเลือด)

5.5.2 นำสารละลายทั้งหมดในข้อ 5.1 ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ที่อุณหภูมิ 25 – 30 ^{0}ซ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์เมนเบรนแตกและตกตะกอน

5.5.3 ใช้ปิเปตดูดสารละลายฮีโมลัยเสกต์จำนวน 950 ไมโครลิตรใส่ในคิวเวตต์ทั้ง 2 หลอด เท่าๆกัน โดยกำหนดให้หลอดที่ 1 เป็นหลอดตัวอย่าง (Sample) และอีกหลอดแทนแบลงค์

5.5.4 หลอดที่เป็นแบลงค์ใช้ปิเปตดูดนำกลั่นจำนวน 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน

5.5.5 นำคิวเวตต์ทั้ง 2 หลอดใส่เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ปรับความยาวคลื่นอยู่ที่ 575 นาโนเมตรและปรับค่าเริ่มต้นที่ 0

5.5.6 เติมสาร NADH (Sigma 340-101) จำนวน 50 ไมโครลิตรลงในหลอดตัวอย่างแล้ว ผสมให้เข้ากัน

5.5.7 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 575 นาโนเมตร หลังจากที่เติม NADH เป็นเวลา 30 วินาที นำค่าการเปลี่ยนแปลงคลื่นแสงที่ได้ไปคำนวณ

คำนวณหาสมรรถนะเอนไซม์ NADH-cytochrome b_5 reductase โดยประยุกต์ใช้วิธีของ Hegesh และคณะ (1968)

$$\text{NADH- cytochrome } b_5 \text{ reductase (ferrihemoglobin reductase)} = \frac{\Delta OD.575/min}{42} \times \frac{1{,}000}{OD.540 \times 0.207 \times 68}$$

$$= \frac{\Delta OD.575/min}{OD.540} \times 17 \text{ Units}$$

โดยที่ 1 Unit = 1 mμmole of NADH- methemoglobin reductase per minute per milligram of sample hemoglobin

0.207 = The molar extinction coefficient of ferrihemoglobin cyanide at 540 nm. is 48.2×10^3

42×10^3 = The difference in absorption between ferri- and ferrohemoglobin at 575 and pH 5.2 for a molar solution

The molecular weight of hemoglobin is 68,000

6. ขั้นตอนการทดลอง

6.1 ก่อนทำการเจาะเลือดผู้ป่วยทำการซักประวัติผู้ป่วยตามเกณฑ์การคัดผู้ป่วยเข้าศึกษาและแผนการให้ยาตามการรักษาของแพทย์ตามเกณฑ์ที่กล่าวมาแล้วในข้อ 5.1.1.1 และ5.1.1.2

6.2 คนปกติที่มาบริจาคเลือดต้องผ่านการซักประวัติตามเกณฑ์ที่กล่าวมาแล้วในข้อ 5.1.2.1 และ 5.1.2.2

6.3 นำเลือดที่ได้ทั้ง 2 กลุ่มไปหาปริมาณเมทฮีโมโกลบิน และสมรรถนะเอนไซม์ NADH-cytochrome b_5 reductase

7. การหาความแม่นยำของการตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสในเลือดคนปกติ

ทำการวัดสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส โดยทำการเจาะเลือดจากคนปกติที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง 1 คน ใส่ในหลอดทดลองที่เคลือบด้วย EDTA สารกันเลือดแข็งทำการวัดทั้งหมด 10 ครั้ง นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (%CV)

$$\% CV = \frac{\text{Standard deriation (SD)}}{\text{mean } (\bar{X})} \times 100$$

8. สถิติที่ใช้ในการทดลอง

เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มตัวอย่างที่อิสระต่อกัน โดยใช้ Independent Sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,) สูตรดังต่อไปนี้ กำหนดความเชื่อมั่นที่ $p< 0.05$

$$\text{correlation coefficient (r)} = \frac{n\Sigma xv - \Sigma x\Sigma v}{\sqrt{[n\Sigma X^2 - (\Sigma x)^2][n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2]}}$$