บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการศึกษาในผู้ป่วย
   - Caffeine anhydrous B.P. Grade, batch no 71015
   - เข็ม เบอร์ 20, Syringe ขนาด 5 ม.ล., I.V catheter เบอร์ 20, Injection plug ทั้งหมดจาก TERUMO CORPORATION
   - ถุงมือ ขนาดเล็ก
   - หลอดพลาสติก ขนาด 10 และ 5 ม.ล

2. สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ในการวิเคราะห์แคฟเฟอีน

   2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แคฟเฟอีน

ชื่อ	บริษัท
- 8- chlorotheophylline	Sigma Chemical CO, USA.
- Zinc sulfate	Mallinckrodt Chemical Works, USA
- Methyl alcohol HPLC grade	Mallinckrodt Chemical Works, USA
- Acetronitrile HPLC grade	Lab-Scan CO., Ireland
- Sodium acetate	Fluka Chemic
- Double distill water	

   2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์แคฟเฟอีน

   2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

ชื่อ	บริษัท
Vortex-2-Genic	Scientific Industries, USA
Autopipette	
Pipetman P1000 , P 200 มค.ล	GilsonMeaical Electronis,France
Biohit Proline ขนาด 10มค.ล	Biohit, Finland
Angle Centrifuge 4235A	Biosystem

ชื่อ	บริษัท
pH meter SA 520	Orion, USA
degassor model 2200	Brandson Europa B.V, Netherland
เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์	Precisa Instruments, Switzerland
อุปกรณ์ในการกรองสารละลาย	Water associates, USA

2.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- Spectra System Isocratic pump (PC1000) Thermo separation product
- Spectra System Autosimplers (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 HP Laserjet 6L Hewlett packard
- Analytical column ได้แก่ μ bonapak C18 แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาด 300 x 3.9 mm บรรจุด้วย ซิลิก้า C18 ขนาด10 ไมครอน ของ Waters associates Massachusetts, USA
- Guard-column แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ความยาว 2 ซม.เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ม.ม. บรรจุด้วย Bondapak C18 ของ Water associates, Massachusetts, USA

3. การเตรียมสารละลายสำหรับผู้ป่วย

- 0.35% caffeine solution

ชั่งแคฟเฟอีนมา 3.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (DDW) และปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ม.ล. ใน volumetric flask

4. การเก็บ Pool serum

นำเลือดที่ได้จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง และงดเครื่องดื่มที่มีแคฟเฟอีนทุกชนิดอย่างน้อย 3 วันก่อนการเจาะเลือด มาปั่นด้วยความเร็ว 3500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกเก็บซีรั่มไว้ที่อุณหภูมิ –20 ^{0}C

5. การคัดเลือกผู้ป่วย (Subjects)

เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย

คัดเลือกผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งตับ โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกดังนี้

1. ผู้ป่วยอยู่ในเกณฑ์เข้ารับการรักษาด้วยวิธี TOCE โดย

1.1 ผู้ป่วยได้รับการประเมินแล้วพบว่าไม่สามารถทำการผ่าตัดได้และมีก้อนมะเร็งใหญ่กว่า 5 เซนติเมตร

1.2 ผู้ป่วยที่ได้รับการประเมินแล้วพบว่าสามารถทำการผ่าตัดได้และมีก้อนมะเร็งใหญ่กว่า 5 เซนติเมตรแต่ผู้ป่วยปฏิเสธการผ่าตัด

1.3 ไม่มีประวัติแพ้ contrast media

1.4 ไม่มี portal vein thrombosis

1.5 มี tumor involvement ไม่เกิน 70 %

2. ไม่เคยมีประวัติแพ้เครื่องดื่มที่มีแคฟเฟอีน

3. งดสูบบุหรี่ ดื่มชา กาแฟ เครื่องดื่มที่มีแคฟเฟอีนเช่นเครื่องดื่มชูกำลัง น้ำอัดลม เป็นต้น และแอลกอฮอล์ ก่อนการศึกษาอย่างน้อย 3 วันและระหว่างการศึกษา

4. ไม่รับประทานยาใดที่รบกวนเมตาบอลิสมของแคฟเฟอีน ได้แก่ cimetidine ยากลุ่ม quinolone , oral contraceptive , rifampin, omeprazole

วิธีการศึกษาทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การวิเคราะห์แคฟเฟอีนในสารตัวอย่าง

การวิเคราะห์แคฟเฟอีนในซีรั่มใช้เทคนิค HPLC แบบ Isocratic reversed phase ดังนี้

1. การเตรียม Standard solution ของแคฟเฟอีน

เตรียม standard solution ของแคฟเฟอีนความเข้มข้น 800, 400, 100, 50 มค.ก./ม.ล. โดยการทำ serial dilution ซึ่งมีวิธีดังนี้

ชั่งแคฟเฟอีนมา 40 ม.ก เติม น้ำกลั่น จนได้ปริมาตร 25 ม.ล. ใน volumetric flask จะได้ความเข้มข้น 1600 มค.ก./ม.ล. ใช้เป็น stock solution ของแคฟเฟอีน

1.1 นำ stock solution ของแคฟเฟอีนมา 5 ม.ล. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ม.ล. ใน volumetric flask เขย่าให้เข้ากันจะได้แคฟเฟอีนความเข้มข้น 800 มค.ก./ม.ล.

1.2 ใช้ pipette ดูดสารละลายในข้อ 1.1 มา 5 ม.ล. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ม.ล. ใน volumetric flask เขย่าให้เข้ากันจะได้แคฟเฟอีนความเข้มข้น 400 มค.ก./ม.ล.

1.3 ใช้ pipette ดูดสารละลายในข้อ 1.2 มา 5 ม.ล. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ม.ล. ใน volumetric flask เขย่าให้เข้ากันจะได้แคฟเฟอีนความเข้มข้น 200 มค.ก./ม.ล.

1.4 ใช้ pipette ดูดสารละลายในข้อ 1.3 มา 5 ม.ล. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ม.ล. ใน volumetric flask เขย่าให้เข้ากันจะได้แคฟเฟอีนความเข้มข้น 100 มค.ก./ม.ล.

1.5 ใช้ pipette ดูดสารละลายในข้อ 1.4 มา 5 ม.ล. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ม.ล. ใน volumetric flask เขย่าให้เข้ากันจะได้แคฟเฟอีนความเข้มข้น 50 มค.ก./ม.ล.

2. การเตรียมสารละลายแคฟเฟอีนในซีรั่มเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

นำสารละลายมาตรฐานของแคฟเฟอีนความเข้มข้น 800, 400, 200, 100 และ 50 มค.ก/ม.ล. มาปิเปต 10 มค.ล. ใส่ลงในซีรั่ม 1ม.ล. จะได้ซีรั่มที่มีแคฟเฟอีนความเข้มข้น 8, 4, 2, 1, และ 0.5 มค.ก./ม.ล.

3. การเตรียมสารละลาย Standard ใช้ 8 – chlorotheophylline เป็น Internal standard

ชั่ง 8- chlorotheophylline มา 0.01 กรัมละลายด้วย MeOH ปริมาตรครบ 25 ม.ล. จะได้ความเข้มข้น 400 มค.ก./ม.ล.ใช้เป็น stock solution

นำ stock solution ของ8- chlorotheophylline มา 0.5 ม.ล. เติม MeOH ให้ครบ 50 ม.ล.ใน volumetric flask จะได้ความเข้มข้น 4 มค.ก./ม.ล.

4. การวิเคราะห์แคฟเฟอีนจากซีรั่ม

1. ปิเปตซีรั่มที่มีแคฟเฟอีนในแต่ละความเข้มข้นมา 500 มค.ล
2. ปิเปต 10% $ZnSO_4$ 100 มค.ล. ใส่ลงในซีรั่ม
3. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer 10 วินาที
4. เติม 8- chlorotheophylline ที่เตรียมไว้จำนวน 750 มค.ล.
5. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer 30 วินาที
6. นำไป centrifuge โดยใช้ความเร็ว 4000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที
7. นำสารละลายส่วนใสฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยฉีดครั้งละ 50 มค.ล.

5. วิธีการเตรียม mobile phase

1. ชั่ง Sodium acetate มา 0.4102 g แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 500 ม.ล. ใน volumetric flask
2. นำไปปรับ pH โดยใช้เครื่อง pH meter ให้ได้ pH 4.0 โดยใช้ acetic acid
3. เมื่อปรับ pH ได้แล้ว ตวงสารละลายนี้ 475 ม.ล. ผสมกับ acetonitrile 75 ม.ล. แล้วนำไปกรอง
4. ไล่อากาศออกด้วยเครื่อง sonicator ประมาณ 20 นาที

ภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Mobile phase	:	Acetonitrile : 0.01 M Sodium acetate pH 4.0 (15:85)
Column		μ bonapack C18
flow rate	:	1 ม.ล./นาที
detector	:	UV wavelength 273 nm
injection volume	:	50 μl

2. การยืนยันความเหมาะสมของการวิเคราะห์ (Validation method)

1. การศึกษาหาขีดจำกัดที่จะวิเคราะห์แคฟเฟอีนได้ต่ำสุดในซีรั่มตัวอย่าง (Lowest limit of detection)

ความเข้มข้นต่ำสุดของแคฟเฟอีนที่สามารถวิเคราะห์ได้

วิธีทำ

- หาความเข้มข้นต่ำสุดของแคฟเฟอีนที่สามารถวิเคราะห์ได้ การศึกษานี้ได้ทดลองที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5 มค.ก/ม.ล. ในซีรั่ม
- เตรียมและวิเคราะห์แคฟเฟอีนในซีรั่มโดยเติมแคฟเฟอีนในความเข้มข้นต่ำสุดที่กล่าวไว้ข้างต้น 10 หลอดการทดลอง ทำการวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของค่าที่ได้ในรูปของเปอร์เซ็นต์ Relative Standard Deviation (%RSD)

2. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์สามารถแสดงได้ในเทอมของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% analytical recovery) ของแคฟเฟอีนในซีรั่มที่เตรียมขึ้น

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างซีรั่มที่มีแคฟเฟอีนถูกเตรียมขึ้นเพื่อเลียนแบบตัวอย่างซีรั่มที่ได้จากตัวผู้ป่วยและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคฟเฟอีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมในเวลาเดียวกัน

$$\% \text{ analytical recovery} : \frac{\text{ความเข้มข้นของยาแคฟเฟอีนที่ได้}}{\text{ความเข้มข้นของยาแคฟเฟอีนที่เติม}} \times 100$$

ค่า % analytical recovery ที่คำนวณได้ไม่ควรน้อยกว่า 80% จึงจะยอมรับได้

I19005983

การศึกษาหาประสิทธิภาพของการสกัดยาของวิธีการวิเคราะห์ในเทอมของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Physical recovery)

วิธีการทำ

ทำการวิเคราะห์คาเฟอีนในซีรั่มที่มีความเข้มข้น 1,2,8 มค.ก./ม.ล. การเปรียบเทียบค่าของ peak area ratio ที่ได้จากการวิเคราะห์กับที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแคฟเฟอีนเข้าเครื่องHPLC โดยตรง

$$\%\text{Physical recovery} = \frac{\text{Peak area ratio ของแคฟเฟอีนจากการวิเคราะห์}}{\text{Peak area ratio ของแคฟเฟอีนในสารละลายมาตรฐาน}} \times 100$$

3. ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

เตรียมแคฟเฟอีนในซีรั่มในช่วงความเข้มข้น 0.5-8 มค.ก./ม.ล.จำนวน 5 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง มาคำนวณหาค่า ความแปรปรวนของการวิเคราะห์ในเทอมของเปอร์เซ็นต์ % Relative standard deviaion (%RSD) ของการวิเคราะห์ (Intraday precision)

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้างต้น แต่เป็นการแยกวิเคราะห์ในต่างวันกัน (Intraday precision) จะต้องมากกว่า 3 วันขึ้นไป และนำมาคำนวณค่า (%RSD)

ค่าความแปรปรวนของ%RSDต้องไม่เกิน 15 % จึงจะเป็นที่ยอมรับได้

4. ความจำเพาะของการวิเคราะห์ (Specificity)

ความจำเพาะของการวิเคราะห์แสดงได้ด้วย Retention time ของแคฟเฟอีนในซีรั่มเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

วิธีการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะกับแคฟเฟอีนจะต้องไม่ถูกรบกวนด้วยสารธรรมชาติในร่างกายและค่า Retention time ต้องไม่แตกต่างจากสารละลายมาตรฐานทั้งแคฟเฟอีนและ 8- chlorotheophylline

5. ช่วงความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์กับค่า Peak area ratio (linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานของแคฟเฟอีนจาก stock ให้มีความเข้มข้นของแคฟเฟอีนในซีรั่ม 0.5,1,2,4, และ 8 มค.ก./ม.ล. นำไปวิเคราะห์ สร้างกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค (PAR) ของ แคฟเฟอีนกับ Internal standard และค่าความเข้มข้นของแคฟเฟอีนซึ่งจะต้องครอบคลุมความเข้มข้นของแคฟเฟอีนในผู้ป่วย ค่า linearity แสดงด้วยค่า Coefficient of determination (R^2)

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาในผู้ป่วย

2.1 การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

2.2 การศึกษานำร่อง

ทำการศึกษานำร่องมีจุดประสงค์เพื่อหาจำนวนผู้ป่วยที่ทำการศึกษา โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ได้รับการรักษาด้วยวิธี TOCE จำนวน 5 คน

2. หลัง 24.00 น. ก่อนทำการศึกษาผู้ป่วยจะต้องงดอาหารและเครื่องดื่มที่มีแคฟเฟอีนทุกชนิดเช่น กาแฟ ชา น้ำอัดลม เครื่องดื่มชูกำลัง เป็นต้น

3. ผู้ป่วยได้รับแคฟเฟอีนในขนาด 3.5 มก./กก. ที่เวลา 8.00 น. จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 0.5, 1.5, 3, 5, 10 และ 24 ชั่วโมงหลังได้รับแคฟเฟอีน โดยเก็บตัวอย่างเลือดครั้งละ 4 ม.ล.

4. ผู้ป่วยได้รับการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวิเคราะห์หาแคฟเฟอีนอีกในวันที่ 1 และ 5 สัปดาห์หลังทำ TOCE โดยเก็บวิธีเดียวกับขั้นตอนข้างต้น

5. นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาขนาดตัวอย่างตามสูตร (แสดงในภาคผนวก)

$N = (Z_\alpha + Z_\beta)^2 \sigma^2/d^2$

σ^2 = Variance of difference

d = Difference of treatment

$Z_\alpha = Z\ 0.05/2 = 1.96$

$Z_\beta = Z0.1 = 1.28$

2.3 การศึกษาในผู้ป่วย

ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับและได้รับการรักษาด้วยวิธี TOCE โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ผู้ป่วยจะเข้ารับไว้ในโรงพยาบาลอย่างน้อย 1 วันก่อนทำ TOCE พร้อมผล CT

2. แพทย์ประจำตึกจะทำการซักประวัติและตรวจร่างกายผู้ป่วยอย่างละเอียด

3. ผู้ป่วยจะได้รับการชี้แจงรายละเอียดเกี่ยวกับโครงการการศึกษาที่ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทย์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ้าผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจจะให้ลงชื่อในใบยินยอม (ภาคผนวก) เข้าร่วมโครงการเป็นลายลักษณ์อักษร

4. หลัง 24.00 น. ก่อนทำการศึกษาผู้ป่วยจะต้องงดอาหารและเครื่องดื่มที่มีแคฟเฟอีนทุกชนิดเช่น ชา กาแฟ น้ำอัดลม เครื่องดื่มชูกำลัง เป็นต้น

5. ผู้ป่วยได้รับแคฟเฟอีนในขนาด 3.5 มก./กก. ที่เวลา 8.00 น. จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 0.5, 1.5, 3, 5, 10 และ 24 ชั่วโมงหลังได้รับแคฟเฟอีน โดยเก็บตัวอย่างเลือดครั้ง

ละ 4 ม.ล. ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว จึงนำไป centrifuge ความเร็ว 3500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที และแยกซีรั่มเก็บที่อุณหภูมิ –20 ^{0}C การวิเคราะห์แคฟเฟอีนโดยวิธี HPLC

6. ขณะที่เก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 30 นาทีหลังรับประทานแคฟเฟอีนจะเก็บเลือดเพื่อตรวจการทำงานของตับได้แก่ AST,ALT, serum total bilirubin, alkaline phosphatase, albumin, prothrombin time และ AFP หลัง 24.00 น. ผู้ป่วยงดอาหารและน้ำ เพื่อได้รับการรักษาด้วยวิธี TOCE ในเช้าวันรุ่งขึ้น

7. เวลาประมาณ 8.30 น. ส่งผู้ป่วยไปทำ TOCE

8. ผู้ป่วยจะได้รับการตรวจการทำงานของตับโดยศึกษาแคฟเฟอีนเคลียร้านซ์อีกสองครั้ง คือในวันที่ 1 และ 5 สัปดาห์หลังทำ TOCE ตามขั้นตอนข้างต้นและตรวจสอบการทำงานของตับด้วยสารชีวเคมีอีกครั้งใน 5 สัปดาห์ หลังทำ TOCE

9. ช่วงเวลา 5 สัปดาห์จะนัดผู้ป่วยมาทำเอกซเรย์คอมพิวเตอร์เพื่อประเมินการรักษาในสัปดาห์ที่ 4 หลังทำ TOCE

การรวบรวมข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลประวัติของผู้ป่วย ผลการตรวจร่างกายของผู้ป่วย และผลการตรวจหน้าที่ของตับ ได้แก่ AST,ALT, serum total bilirubin (TB), alkaline phosphatase (AP), albumin, prothrombin time (PT) และ AFP

2. หาค่า Child Pugh's score , Okuda 's stage (แสดงในภาคผนวก)

3. คำนวณหาระดับแคฟเฟอีนในซีรั่ม เป็น มค.ก./ม.ล. จากกราฟมาตรฐานของแคฟเฟอีน

4. หาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ได้แก่ AUC , Vd , Kel ,$T_{1/2}$, Cl

รวบรวมข้อมูลโดยผู้ทำวิจัย กรอกลงในแบบฟอร์มที่จัดทำไว้ (แสดงในภาคผนวก)

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ได้แก่ AUC, Vd, T1/2, Kel, Cl

2. ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของแคฟเฟอีนในซีรั่ม

2.1 Trapezoidal method สำหรับคำนวณหาค่าพื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้มข้นของแคฟเฟอีนในซีรั่มกับเวลา (AUC) จากเวลาที่ 0 – 24 ชั่วโมง (AUC_{0-24}) และ AUC จากเวลาสุดท้ายที่เก็บสารตัวอย่าง (ที่ 24 ชั่วโมง) ถึง infinity ($AUC_{24-\infty}$) หาได้จากสูตร

$(AUC_{24-\infty})$ = C/Kel

C = ความเข้มข้นสุดท้ายที่เก็บสารตัวอย่าง

Kel = Slope ของกราฟ ln- linear regression ระหว่างความเข้มข้นกับเวลาช่วงกำจัดยา

AUC_{total} = AUC_{0-t} + C/Kel

หาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนของค่า AUC และ Kel ของแคฟเฟอีนในผู้ป่วยทั้ง 12 คน และเปรียบเทียบค่า $AUC_{0-\infty}$ ก่อนและหลังการรักษาด้วยวิธี TOCE ทดสอบความแตกต่างทางสถิติที่นัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดย One-Way Analytical Of Variance (ANOVA) ในโปรแกรม SPSS ถ้ามีความแตกต่างเกิดขึ้น ก็จะทำการติดตามหาความแตกต่างต่อไป โดยใช้ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ค่าแคฟเฟอีนเคลียร์ร้านซ์ของผู้ป่วยแต่ละคนคำนวณได้จากสูตร

Cl = Dose X F / AUC

Cl = อัตราการกำจัดยา

Dose = ขนาดของแคฟเฟอีนที่ผู้ป่วยแต่ละรายได้รับ

F = bioavailability of drug = 1

เปรียบเทียบค่า Vd, $T_{1/2}$ และ Cl ก่อนและหลังการรักษาด้วยวิธี TOCE ทดสอบความแตกต่างทางสถิติที่นัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดยใช้ One-Way Analytical Of Variance (ANOVA) ในโปรแกรม SPSS ถ้ามีความแตกต่างเกิดขึ้น ก็จะทำการติดตามหาความแตกต่างต่อไป โดยใช้ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3. หาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนของสารชีวเคมีในเลือดที่ใช้ประเมินการทำงานของตับได้แก่ AST, ALT, Total bilirubin, albumin, AP, PT และค่า AFP และเปรียบเทียบค่าสารชีวเคมีก่อนและหลังการรักษาด้วยวิธี TOCE ทดสอบความแตกต่างทางสถิติที่นัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดยใช้ Paired T-Test ในโปรแกรม SPSS