บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1. ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู BALB/c

การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c ด้วย E_2-6-CMO-BSA ในทุก 14 วัน คือ วันที่ 0, 14, 28 และ 42 ทำการเก็บเลือดเพื่อนำมาวัดหาระดับแอนติบอดีต่อ E_2 โดยวิธี indirect ELISA พบว่า ระดับแอนติบอดีทั้งต่อ E_2-6-CMO-BSA และ BSA หลังจากฉีดกระตุ้น 14 วัน เพิ่มขึ้นถึง 60-70 % ของวันที่ 0 หลังจากนั้นในวันที่ 28, 42 และ 56 เพิ่มขึ้นเพียง 5- 10 % ของวันที่ 14 ยกเว้นระดับแอนติบอดีต่อ BSA วันที่ 56 ที่ ลดลงในหนูทั้ง 3 ตัว แต่หนูเบอร์ 3N ลดลงทั้งแอนติบอดีต่อ E_2-6-CMO-BSA และ BSA ได้ค่าผลต่างการดูดกลืนแสงระหว่าง E_2-6-CMO-BSA และ BSA ของหนูเบอร์ 1N, 2N และ 3N ในวันที่ 56 เท่ากับ 0.200, 0.253 และ 0.168 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกหนูเบอร์ 2N ซึ่งมีค่าผลต่างการดูดกลืนแสงระหว่าง E_2-6-CMO-BSA และ BSA มากที่สุดมาทำการเชื่อมเซลล์ (รูปที่ 4-1)

4.2. ผลการเชื่อม (fusion) เซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมา

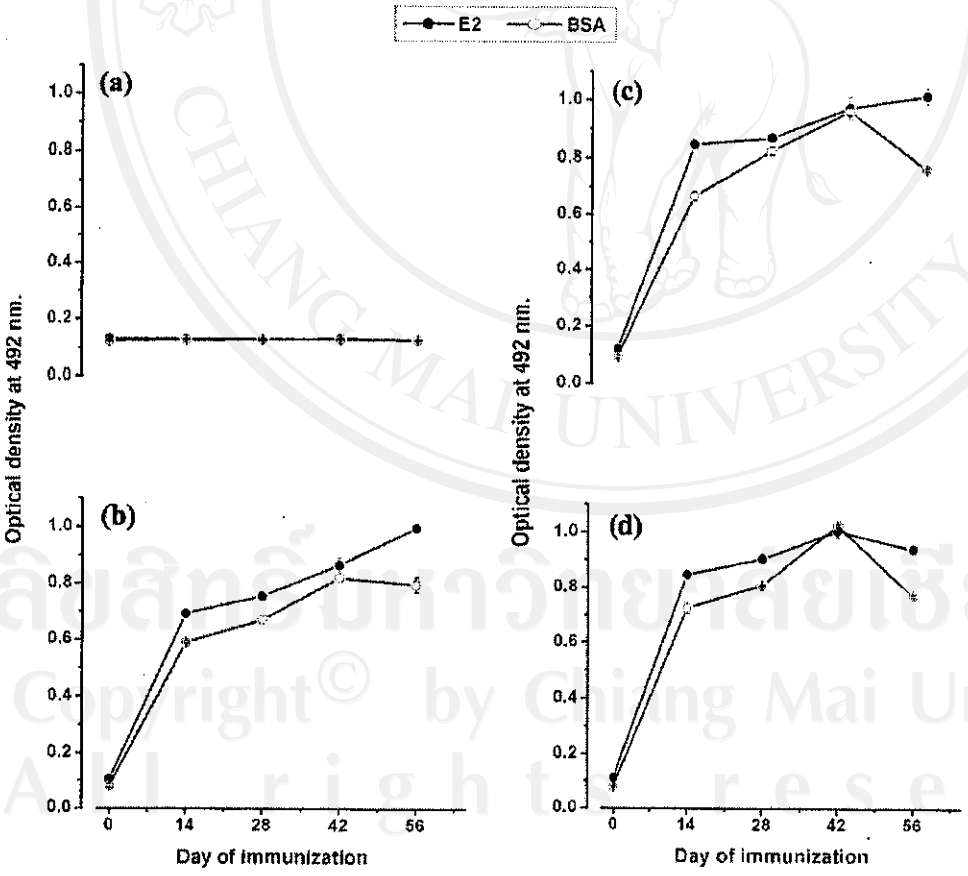
หลังจากการ fusion ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย E_2-6-CMO-BSA กับเซลล์ไมอิโลมา จากทั้งหมด 6 เพลท (เพลท 96 หลุม) โดยให้คอลัมน์ที่ 1 (8 หลุม) ของทุกเพลทเป็น control คือใส่เฉพาะเซลล์ไมอิโลมา และเซลล์ไมอิโลมาต้องตายหมดก่อนเปลี่ยนเป็นสารละลาย HT เพื่อให้โคลนที่เกิดหลังจากนั้นเป็นกลุ่มเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้น เมื่อเปลี่ยนเป็นสารละลาย HT แล้ว 7 วัน พบว่า เกิดกลุ่มโคลนไฮบริโดมา (hybridomas) 29 หลุม คิดเป็น 5.5 % ของทั้งหมด 528 หลุม เมื่อนำกลุ่มโคลนที่ได้ทั้ง 29 หลุม มาทำการตรวจหาการผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 พบว่า มี 12 หลุม (ตารางที่ 1 ภาคผนวก) ที่ผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 คิดเป็น 41.4 % ของกลุ่มโคลนทั้งหมด (รูปที่ 4-2) โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (Min – Max, n) ของค่าผลต่างการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ระหว่าง E_2-6-CMO-BSA และ BSA เท่ากับ 1.20 ± 0.92 (0.13 – 2.29, n = 12) ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มโคลน 12 หลุม เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 ระดับสูง 2.25 ± 0.04 (2.20 – 2.29, n = 5) ระดับกลาง 0.66 ± 0.42 (0.33 – 1.27, n = 4) และระดับต่ำ 0.164 ± 0.05 (0.13 – 0.22, n = 3) ซึ่งใน 12 หลุม มีกลุ่มโคลนที่เกิดในแต่ละหลุม 1-3 โคลน เพื่อทำให้ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคลนเดี่ยวที่จำเพาะเจาะจงต่อ E_2 มากขึ้น จึงเลือกหลุม 4B9 ที่มีค่าผลต่างการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร สูงที่สุดคือ 2.29 มาทำการแยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

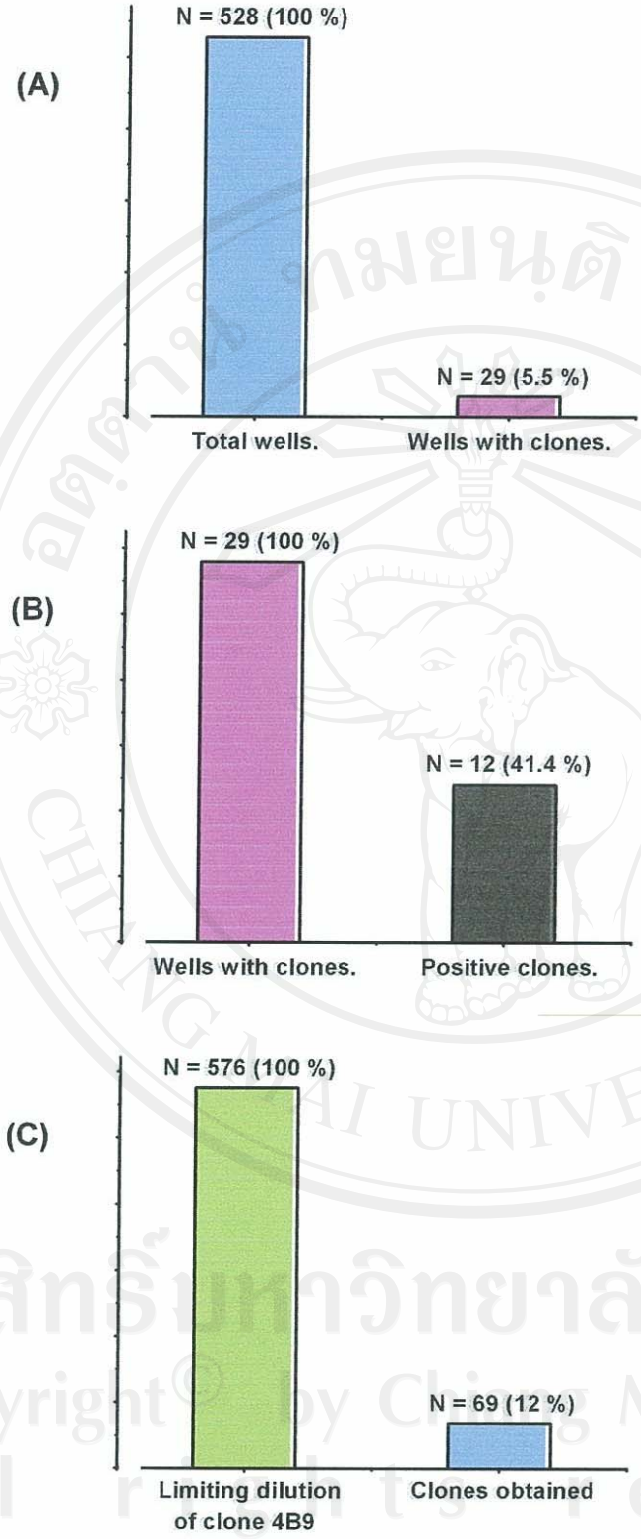
4.3. ผลการแยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี Limiting dilution

ทำการแยกโคลนเดี่ยวได้ประมาณ 10 วัน เกิดโคลนเดี่ยว 69 โคลน จากทั้งหมด 576 หลุม คิดเป็น 12 % (รูปที่ 4-2) และเป็นโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 ได้ทั้งหมด คิดเป็น 100 % แสดงในตารางที่ 2 ภาคผนวก โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (Min – Max, n) ของค่าผลต่างการดูดกลืนแสงระหว่าง E_2-6-CMO-BSA และ BSA เท่ากับ 2.63 ± 0.36 (1.796 – 3.137, n = 69) จากโคลนที่ได้ มี 24 โคลนที่มีสุขภาพดี ลักษณะเซลล์กลมและมีการเติบโตของเซลล์ดี โคลนที่เกิดหลังจากนั้นเลือกโคลนเดี่ยวเบอร์ 4B9 1E4 และ 4B9 2D9 ซึ่งเป็นโคลนที่มี antibody titer สูงที่สุด คือ 3.317 และ 2.829 ตามลำดับ มาทำการเพิ่มจำนวนเซลล์และเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อสกัดโมโนโคลนอลแอนติบอดี



ภาพที่ 4-1. ผลการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ของหนู BALB/c 3 ตัว ที่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย E_2-6-CMO-BSA แสดงเปรียบเทียบกับ BSA; กลุ่มควบคุม (a), เบอร์ 1N (b), เบอร์ 2N (c), และเบอร์ 3N (d).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4-2. แสดงผลการเชื่อมรวมเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมา; จำนวนหลุมที่เกิดโคลนหลังจากเชื่อมเซลล์ (A), จำนวนหลุมที่ผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 (B), จำนวนโคลนหลังจากแยกโคลนเดี่ยว (C).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4. ผลการจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (isotype)

โคลนเดี่ยวทั้ง 69 โคลน เป็น Immunoglobulin G (IgG) ทั้งหมด และจากการจำแนกชนิดของโคลนเดี่ยวเบอร์ 4B9 1E4 และ 4B9 2D9 ซึ่งเป็นโคลนที่เลือกมาเพื่อใช้ในการผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 พบว่าเป็นแอนติบอดีชนิด IgG1 (ตารางที่ 4-1) ส่วนโคลนเดี่ยวทั้งหมดที่เหลือได้เก็บรักษาไว้ในตู้ –80 °C

ตารางที่ 4-1. แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตรวจชนิด (isotype) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ E_2

ชนิดแอนติเจนเคลือบหลุม	BSA		E_2-6CMO-BSA	
โมโนโคลนอลแอนติบอดี	4B9 1E4	4B9 2D9	4B9 1E4	4B9 2D9
ค่า O.D. ที่ทำปฏิกิริยากับ goat anti-mouse IgG1	0.082	0.087	3.291	3.299
ค่า O.D. ที่ทำปฏิกิริยากับ goat anti-mouse IgG2a	0.079	0.082	0.137	0.326
ค่า O.D. ที่ทำปฏิกิริยากับ goat anti-mouse IgG2b	0.088	0.091	0.194	0.253
ชนิด Immunoglobulin			IgG1	IgG1

4.5. ปริมาณแอนติบอดีจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

การแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากน้ำเลี้ยงเซลล์ของโคลน 4B9 1E4 และ 4B9 2D9 แต่ละโคลนได้ปริมาณแอนติบอดี 10-15 มก.ต่อ 100 มิลลิลิตร ของน้ำเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นได้เลือกแอนติบอดีจากโคลน 4B9 1E4 มาทำการผ่านคอลัมน์ให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ในข้อ 3.4.11 แล้วนำสารละลายจากการผ่านคอลัมน์ที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ 280 nm ขึ้นไป มาทำการตรวจซ้ำด้วยวิธี ELISA นำกลุ่มที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ 492 nm สูงตั้งแต่ 2.00 ขึ้นไปมารวมกัน ทำการผ่านคอลัมน์ทั้งหมด 4 ครั้ง ได้แอนติบอดีรวมกันทั้งหมด 60 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 nm ได้ 0.682 คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm}}{1.4} \text{ mg/ml}$$

ได้ความเข้มข้นแอนติบอดีเท่ากับ 0.487 mg/ml เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ E_2 ในน้ำนมในขั้นตอนต่อไป

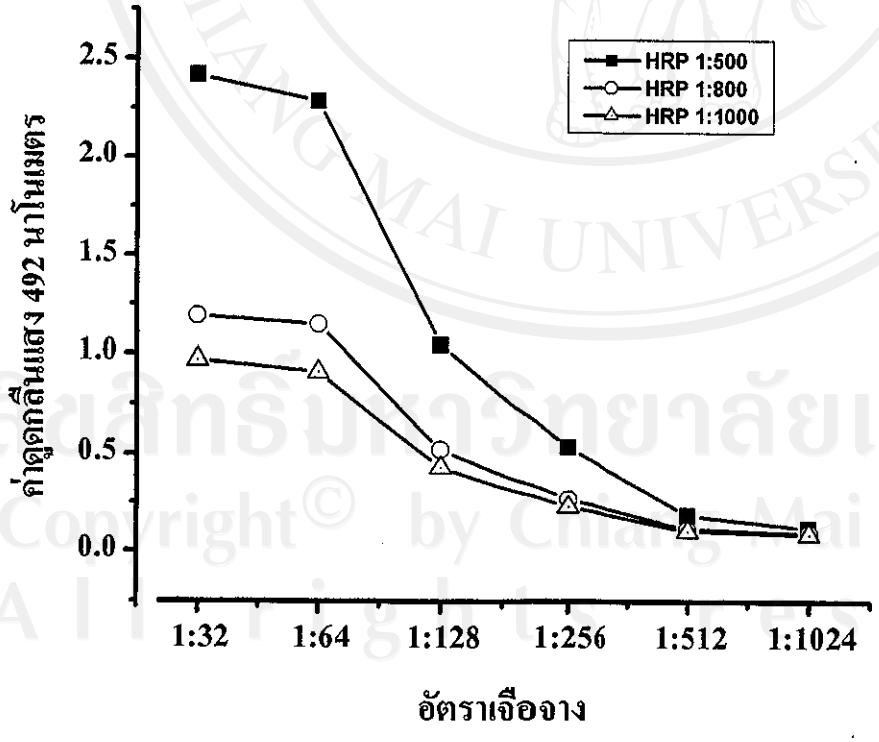
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6. อัตราเจือจางที่เหมาะสมของ $MAbE_2$ และ E_2-HRP สำหรับใช้ในวิธี competitive ELISA

ในการหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมนี้เลือก $MAbE_2$ จากโคลน 4B9 1E4 ซึ่งเป็นโคลนที่มีค่า antibody titer สูงที่สุด สุขภาพดี เพิ่มจำนวนเร็ว และสามารถเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ปริมาณมาก ทำให้ได้ $MAbE_2$ ในปริมาณมาก มาทำการไตเตรท (titrate) หาอัตราการเจือจางของ $MAbE_2$ ที่เหมาะสมกับอัตราการเจือจางของ E_2-HRP ที่เหมาะสม โดยเลือกจากอัตราการเจือจางของทั้งสองสัมพันธ์กัน และมีค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.0-1.5 ถ้าหากเลือกใช้ในอัตราส่วนที่มากเกินไปจะทำให้สิ้นเปลือง อัตราเจือจางของ $MAbE_2$ ที่เหมาะสมคือ 1:64 และ E_2-HRP ที่เหมาะสมคือ 1:800 ดังภาพที่ 4-3

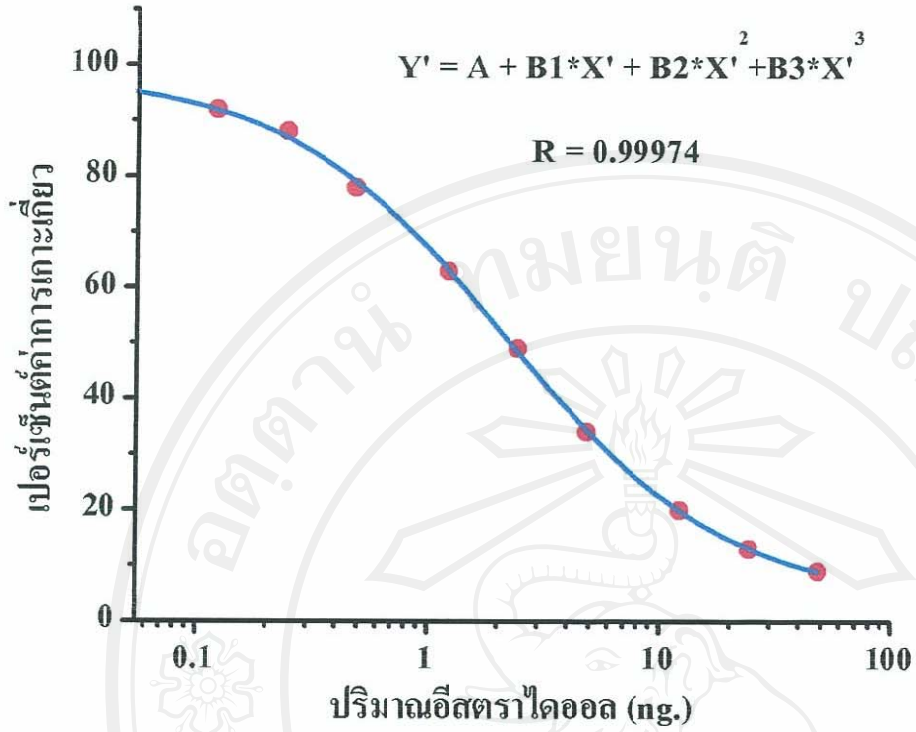
4.7. การสร้างกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนอีสตราไดออล

ในการนำ MAb ที่ได้จากโคลน 4B9 1E4 อัตราส่วนเจือจางที่ 1:64 และ E_2-HRP อัตราส่วนเจือจางที่ 1:800 มาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนอีสตราไดออลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังภาพที่ 4-4 พบว่าความไวของการทำปฏิกิริยาที่ 50 % binding ได้ 2.5 ng ($R^2 = 0.99$) แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวสูงในการตรวจหา E_2 ปริมาณต่ำ ๆ ได้



ภาพที่ 4-3. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการหาอัตราการเจือจางของ $MAbE_2$ จากโคลน 4B9 1E4 กับ E_2-HRP ที่เหมาะสม.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4-4. กราฟมาตรฐานฮอร์โมนอีสตราไดออลโดยวิธี competitive ELISA ที่ใช้ $MAbE_2$ จากโคลน 4B9 1E4.

4.8. การวัดปฏิกิริยา Cross reaction ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อนำ $MAbE_2$ ไปทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนสเตียรอยด์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ Estrone, Testosterone, Androstenedione, Progesterone, Pregnenolone, 11α-Hydroxyprogesterone, 17α-Hydroxyprogesterone และ Hydrocortisone ผลดังตารางที่ 4-2 พบว่า $MAbE_2$ มี % Cross reaction กับฮอร์โมน Estrone มากที่สุด เนื่องจากเป็นอนุพันธ์กับ E_2 จึงมีโครงสร้างใกล้เคียงกันมาก ส่วนฮอร์โมนสเตียรอยด์ชนิดอื่น ๆ มี % Cross reaction กับ E_2 น้อยกว่า 0.5 % ซึ่งระดับรองลงมาจาก Estrone คือ Testosterone และน้อยที่สุดคือ Hydrocortisone

4.9. การหา Intra coefficient assay

การคำนวณหาค่า Coefficient of variation จากสูตร $CV = \sigma/\mu$ โดยแทนค่า σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และ μ คือ ค่าเฉลี่ย (mean) โดยเลือกตัวอย่างที่มีความเข้มข้น E_2 เฉลี่ยประมาณ 3 ng/ml มาทำการวิเคราะห์ เมื่อนำตัวอย่างมาหาค่า intra coefficient assay คือ การวิเคราะห์ภายในเพลทเดียวกัน มีค่า CV เท่ากับ 9.83 % และนำตัวอย่างมาหาค่า inter coefficient assay คือ การวิเคราะห์คนละเพลท มีค่า CV เท่ากับ 8.15 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4-2. แสดงผลปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยวของ MAbE_2 โคลน 4B9 1E4 กับฮอร์โมนสเตียรอยด์ชนิดต่าง ๆ

Steroids	% Cross reaction		
	at 50% displacement	at 31% displacement	at 7% displacement
17beta-Estradiol	100	100	100
Estrone	15	6.66	2.83
Testosterone	0.43	0.23	0.17
Androstenedione	0.078	0.022	0.013
Progesterone	0.140	0.040	0.035
Pregnenolone	0.011	0.0043	0.0058
11α-Hydroxyprogesterone	0.067	0.033	0.024
17α-Hydroxyprogesterone	0.040	0.028	0.021
Hydrocortisone	0.0048	0.002	0.0034

4.10. ปริมาณ E_2 จากการวัดโดยวิธี competitive ELISA ที่เตรียมจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการวัดระดับ E_2 ในน้ำนมโคนมโดยวิธี competitive ELISA พบว่าระดับ E_2 ในน้ำนมวันก่อนผสมเทียม (-1) และวันผสมเทียม (0) ในโคกลุ่มที่ผสมติดสูงกว่าโคกลุ่มที่ผสมไม่ติดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (Min – Max, n) คือ วันที่ -1 โคกลุ่มผสมติดมีความเข้มข้น E_2 เฉลี่ย 1.58 ± 1.79 (0.12 - 4.65, n = 6) ng/ml โคกลุ่มผสมไม่ติดเฉลี่ย 0.26 ± 0.24 (0.04 - 0.81, n = 13) และวันที่ 0 โคกลุ่มที่ผสมติดมีความเข้มข้น E_2 เฉลี่ย 1.30 ± 0.88 (0.33 - 2.66, n = 6) และโคกลุ่มผสมไม่ติดเฉลี่ย 0.51 ± 0.43 (0.03 - 1.36, n = 13) ng/ml ส่วนวันที่ +1 ความเข้มข้น E_2 เฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติและความเข้มข้น $E_2 < 1$ เมื่อเปรียบเทียบจากภาพที่ 4-8, 4-9 และ 4-10 ความเข้มข้น E_2 ในแต่ละครั้งที่ผสมของแต่ละตัวแตกต่างกันส่วนใหญ่โคที่ผสมติดมีความเข้มข้น E_2 มากกว่า 1 ng/ml แต่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น E_2 ของโคตัวนั้น ๆ ด้วย ในกลุ่มที่ผสมติดมีโค 2 ตัว (ภาพที่ 4-5 และ 4-6 ที่มีเครื่องหมาย ⇩) ในวันที่ 0 มีความเข้มข้น E_2 ต่ำลงกว่าวันที่ -1 แต่ยังเป็นปริมาณที่ยังคงสูงกว่า 1 ng/ml คือ จากค่าสูงสุด 2.77 ลดลงเป็น 1.70 ng/ml และอีกตัวจาก 4.65 เป็น 2.66 ng/ml ถือว่าเป็นค่าที่สูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับโคอีก 2 ตัว เป็นโคที่ผสมติดเหมือนกันแต่วันที่มี E_2 ขึ้นสูงสุดในรอบการเป็นสัดของโคทั้งสองตัว (ภาพที่ 4-5 และ 4-6 ที่มีเครื่องหมาย ⇧) มี

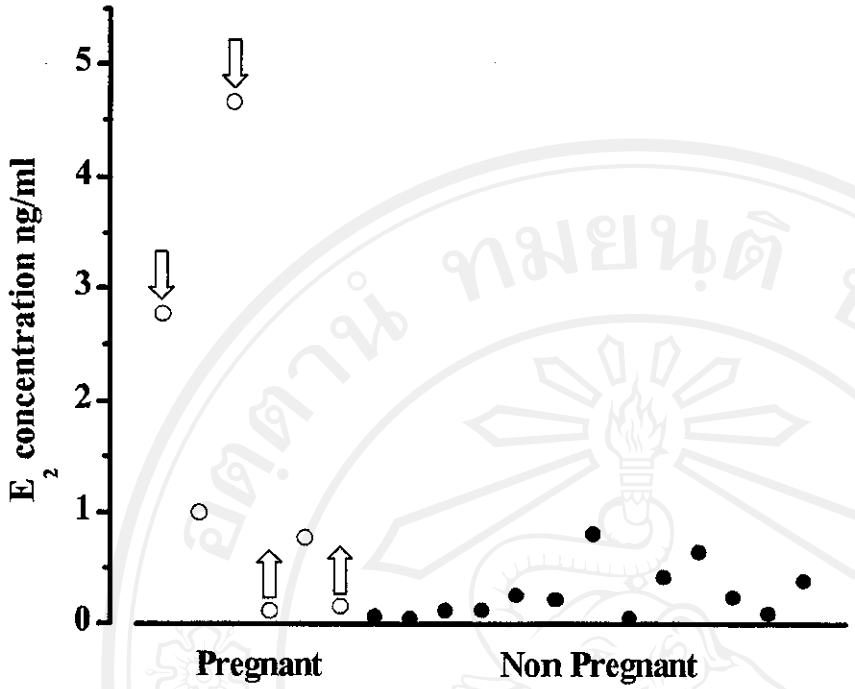
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณ E_2 ต่ำกว่า 1 ng/ml ดังนั้นหากจะกำหนดว่าปริมาณ E_2 ในน้ำนมที่ผสมแล้วทำให้ผสมติดคือมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ng/ml จะสามารถนำไปใช้กำหนดวันผสมเทียมโคได้ 67 .% ซึ่งไม่สามารถนำไปใช้ได้กับโคทุกตัว เนื่องจากโคบางตัวมีปริมาณ E_2 ที่ต่ำโดยพื้นฐานอยู่แล้ว ค่าที่สูงสุดอาจเป็นค่าพื้นฐานของโคอีกกลุ่มหนึ่งได้ นอกจากนี้ในโคกลุ่มที่ผสมไม่ติด จากภาพที่ 4-6 และ 4-7 ที่มีเครื่องหมาย ⇨ พบว่าวันที่ 0 ที่ผสมมีความเข้มข้น E_2 น้อยกว่าวันที่ +1 ซึ่งการผสมผิดวันเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้โคตัวนี้ผสมไม่ติด จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการผสมเทียมโคในวันที่มีระดับความเข้มข้น E_2 สูงที่สุดและหลังจากวันสูงสุดภายใน 1 วัน มีโอกาสผสมติดมากกว่าการผสมก่อนถึงระดับสูงสุด 1 วัน

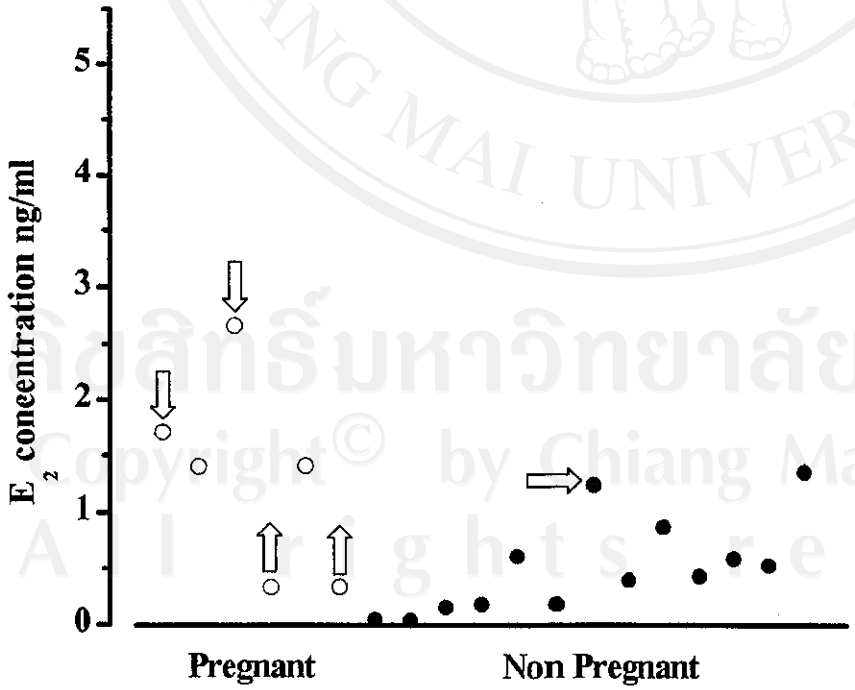
เมื่อนำความเข้มข้น E_2 ของแต่ละวันในรอบการเป็นสัดของโคนมมาทำกราฟ พบว่าในการเป็นสัดแต่ละรอบมีคลื่น E_2 ขึ้นลง 2 คลื่น, 3 คลื่น และ 4 คลื่น มีช่วงห่างของคลื่นขึ้นลงจากมากไปหาน้อย คือ 2 คลื่น มีช่วงคลื่นยาว 10 – 12 วัน, 3 คลื่น มีช่วงคลื่นยาว 6 - 9 วัน และ 4 คลื่นมีช่วงคลื่นยาวเพียง 6 – 8 วันเท่านั้น แสดงลักษณะคลื่นที่ได้ 2 คลื่น, 3 คลื่น และ 4 คลื่น ดังภาพที่ 4-8, 4-9 และ 4-10 ตามลำดับ หากเปรียบเทียบระหว่างโคที่ผสมติดและผสมไม่ติดโดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (Min – Max, n) มีจำนวนคลื่นในกลุ่มโคที่ผสมติดมีคลื่น E_2 เฉลี่ย 3.00 ± 0.00 (3.00 – 3.00, n=4) ส่วนโคกลุ่มที่ผสมไม่ติดมีคลื่น E_2 เฉลี่ย 2.83 ± 0.62 (2.00 – 4.00, n=18) (ตารางที่ 4-5) ซึ่งทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ในการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าให้เห็นว่าระดับ E_2 ในน้ำนมโคนมมีความสัมพันธ์กับการผสมติดจริง การผสมเทียมโคในวันที่มีระดับความเข้มข้น E_2 มากกว่า 1 ng หรือวันที่มี E_2 สูงที่สุดในรอบการเป็นสัดนั้น ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

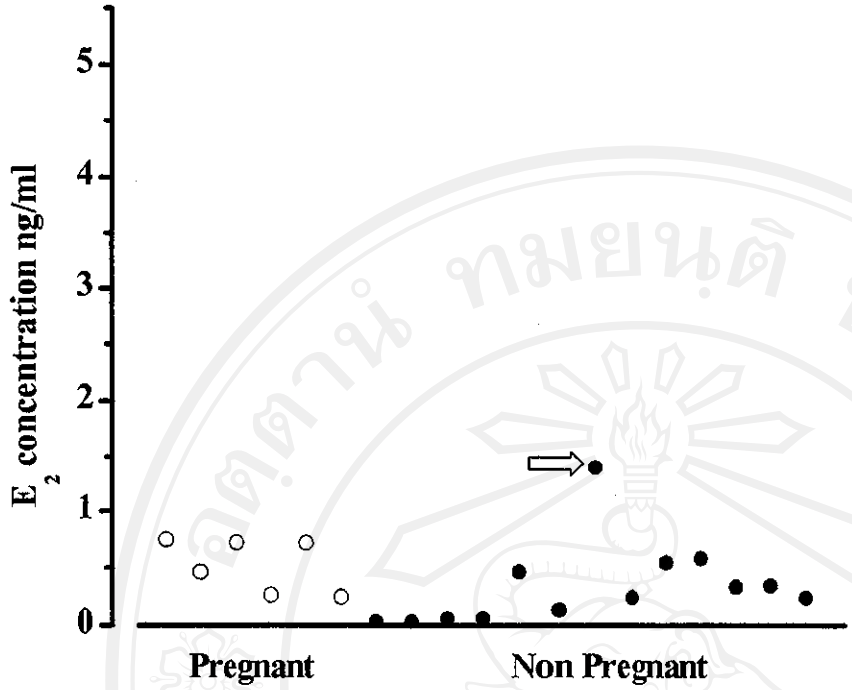


ภาพที่ 4-5. เปรียบเทียบปริมาณ E_2 กลุ่มที่ผสมติด (○) และผสมไม่ติด (●) ในวันที่ -1.

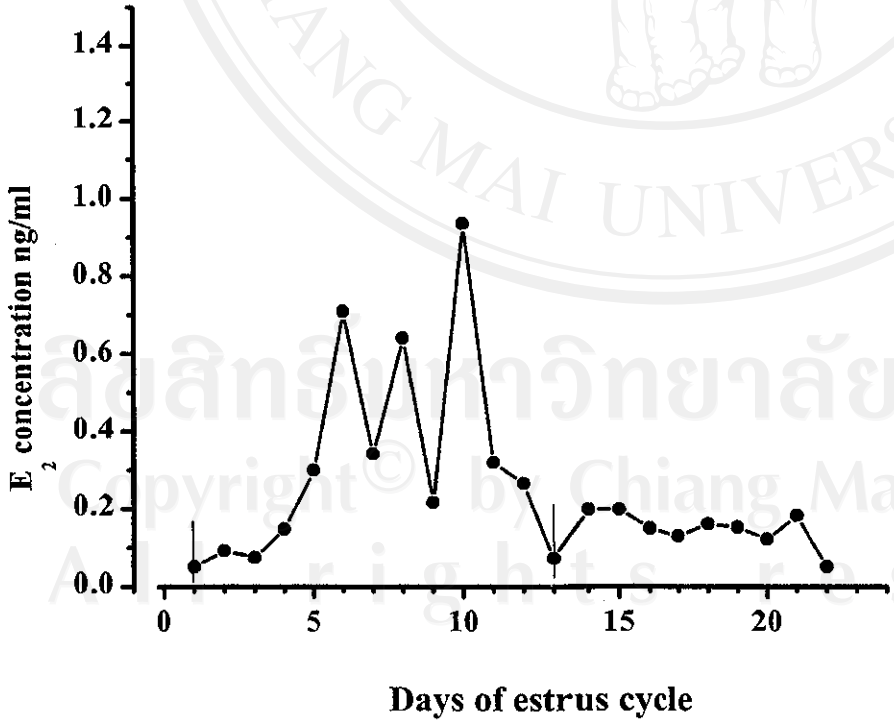


ภาพที่ 4-6. เปรียบเทียบปริมาณ E_2 กลุ่มที่ผสมติด (○) และผสมไม่ติด (●) ในวันที่ 0.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

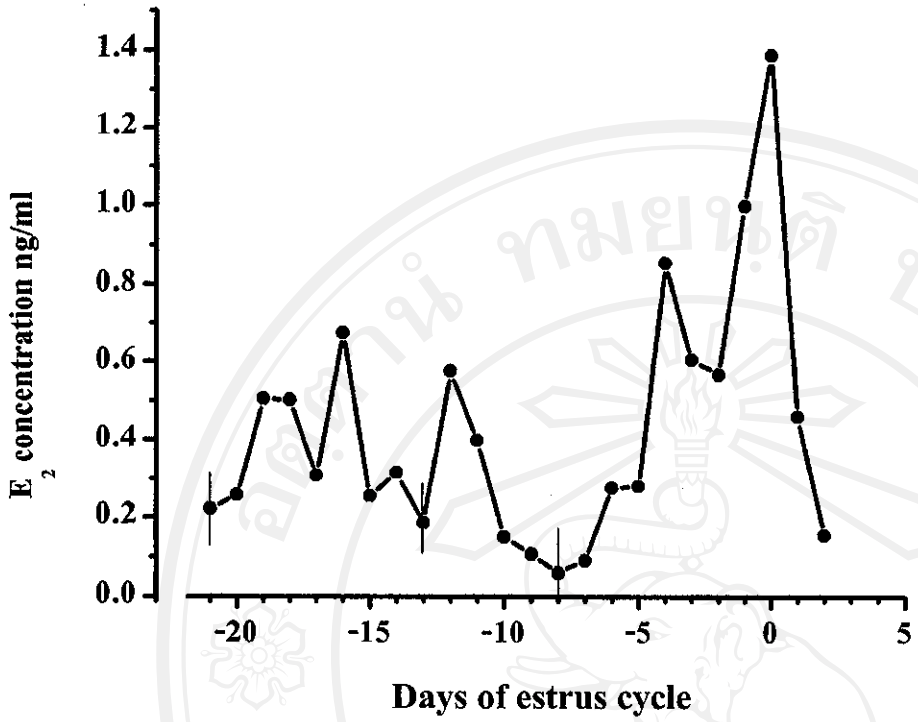


ภาพที่ 4-7. เปรียบเทียบปริมาณ E_2 กลุ่มที่ผสมติด (○) และผสมไม่ติด (●) ในวันที่ +1.

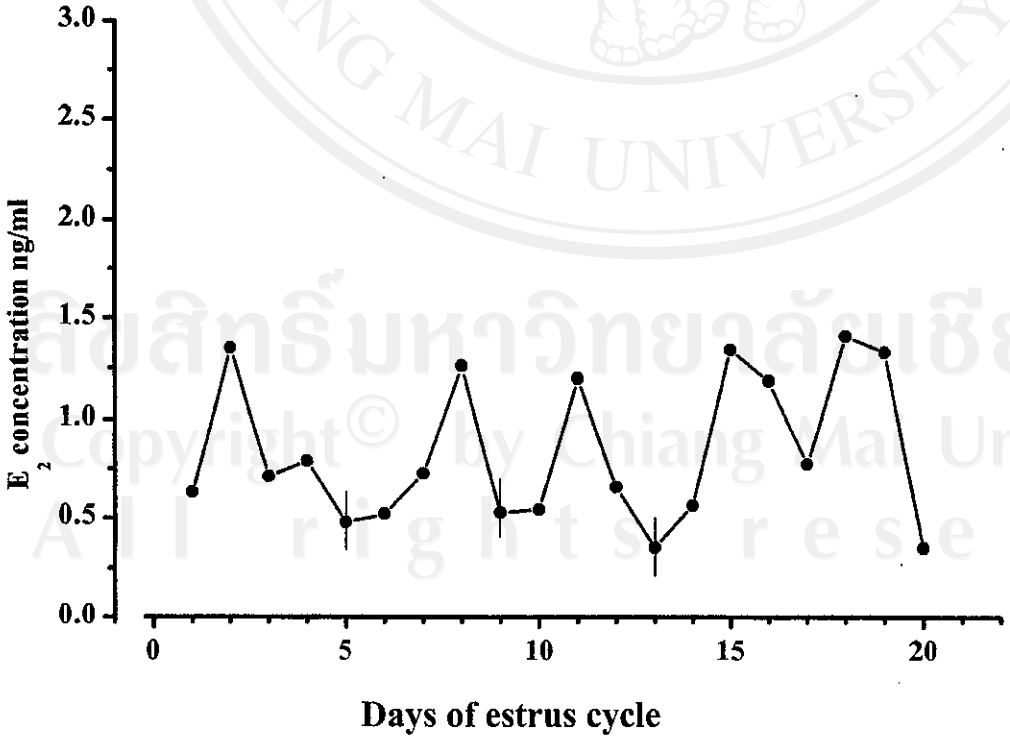


ภาพที่ 4-8. แสดงคลื่น E_2 จำนวน 2 คลื่นในรอบการเป็นสัด.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4-9. แสดงคลื่น E_2 จำนวน 3 คลื่นในรอบการเป็นสัด.



ภาพที่ 4-10. แสดงคลื่น E_2 จำนวน 4 คลื่นในรอบการเป็นสัด.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4-3. แสดงจำนวนคลื่นและระดับ E_2 ในน้ำนม (ng/ml) ในวันก่อนผสมเทียม (-1), วันผสมเทียม (0) และวันหลังผสมเทียม (+1) ของโคกลุ่มที่ผสมติดและผสมไม่ติด

		จำนวนคลื่น	ระดับ E_2 วันที่ -1	ระดับ E_2 วันที่ 0	ระดับ E_2 วันที่ +1
ผสมติด	เช้า	3.00 ± 0.00 (3.00 – 3.00, n = 2)	2.77 ± 0.00 (2.77 – 2.77, n = 1)	1.70 ± 0.00 (1.70 – 1.70, n = 1)	0.74 ± 0.00 (0.74 – 0.74, n = 1)
	เย็น	3.00 ± 0.00 (3.00 – 3.00, n = 2)	1.34 ± 1.89 (0.12 - 4.65, n = 5)	1.22 ± 0.96 (0.33 - 2.66, n = 5)	0.48 ± 0.23 (0.25 - 0.71, n = 5)
	เฉลี่ย	3.00 ± 0.00 (3.00 – 3.00, n = 4)	1.58 ± 1.79 (0.12 - 4.65, n = 6)^{a*}	1.30 ± 0.88 (0.33 - 2.66, n = 6)^{a*}	0.52 ± 0.23 (0.25 - 0.74, n = 6)
ผสมไม่ติด	เช้า	3.00 ± 0.71 (2.00 – 4.00, n = 9)	0.12 ± 0.08 (0.04 - 0.25, n = 5)	0.20 ± 0.24 (0.03 - 0.61, n = 5)	0.12 ± 0.20 (0.01 - 0.47, n = 5)
	เย็น	2.67 ± 0.50 (2.00 – 3.00, n = 9)	0.36 ± 0.27 (0.05 - 0.81, n = 8)	0.70 ± 0.42 (0.18 - 1.36, n = 8)	0.48 ± 0.40 (0.14 - 1.40, n = 8)
	เฉลี่ย	2.83 ± 0.62 (2.00 – 4.00, n = 18)	0.26 ± 0.24 (0.04 - 0.81, n = 13)^{b*}	0.51 ± 0.43 (0.03 - 1.36, n = 13)^{b*}	0.34 ± 0.37 (0.01 - 1.40, n = 13)

* อักษรต่างกันหมายถึงความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved