



บทที่ 3

วัสดุและวิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. กลุ่มตัวอย่าง

1.1 บุคคลทั่วไปที่มาบริจาคโลหิต ที่โรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช พอ. และอาสาสมัครที่มีสุขภาพสมบูรณ์โดยคัดเลือกจากการสัมภาษณ์ อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง ประวัติการเจ็บป่วย อาหารและยาที่บริโภคโดยมีหลักเกณฑ์ในการคัดเลือก ดังนี้

ชายปกติจำนวน 50 ราย สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว ไม่สูบบุหรี่ ไม่ดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ไม่ได้รับการเสริมสังกะสีและทองแดง ไม่ได้รับยาที่มีผลต่อปริมาณสังกะสีและทองแดง เช่น คอร์ติโคสเตียรอยด์ เพนนิซิลลามีนวิตามินรวม รับประทานอาหารครบ 5 หมู่ (ไม่รับประทานอาหารมังสวิรัต หรืออาหารเจเป็นประจำ)

หญิงปกติจำนวน 50 ราย ใช้เกณฑ์คัดเลือกเหมือนชายปกติและไม่อยู่ในภาวะตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร ไม่รับประทานหรือฉีดยาคุมกำเนิด ไม่อยู่ในระหว่างมีประจำเดือน

1.2 ผู้ป่วยในโรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช พอ. ที่ได้รับอาหารผ่านทางเดินอาหาร (enteral nutrition, EN) สูตรปั่นผสมอย่างน้อยเป็นเวลา 1 สัปดาห์

1.3 ผู้ป่วยในโรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช พอ. ที่ได้รับอาหารทั้งหมดทางหลอดเลือดดำ (total parenteral nutrition) เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ และไม่ได้รับยาที่มีผลต่อปริมาณสังกะสีในร่างกาย

2. การเก็บตัวอย่างเลือด (Smith และคณะ, 1979; Milne และ Jonhson, 1993; Young และ Bermes, 1994)

2.1 บุคคลทั่วไปและอาสาสมัครจะต้องอดอาหารข้ามคืนอย่างน้อยตั้งแต่เวลา 24.00 นาฬิกาก่อนทำการเจาะเลือด เก็บตัวอย่างเลือดครั้งละ 20 มิลลิลิตร ตั้งหลอดเลือดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกซีรัม โดยใช้ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทซีรัมใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างเลือดนำไปปั่นแยกอีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที แยกซีรัมใส่ในขวดพลาสติกที่ปราศจากแร่ธาตุต่าง ๆ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์หาปริมาณสังกะสีและทองแดง

2.2 ผู้ป่วยในโรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช พอ. ที่ได้รับอาหารทั้งหมดทางหลอดเลือดดำหรือผ่านทางเดินอาหาร โดยทำการเก็บเลือดก่อนเริ่มให้อาหารครั้งแรกและหลังให้อาหารสัปดาห์ละครั้ง โดยเก็บตัวอย่างเลือดครั้งละ 20 มิลลิลิตร เลือดที่ได้นำมาปั่นแยกซีรัมและเก็บแช่แข็งเช่นเดียวกับข้อ 2.1

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge รุ่น H-11D ของบริษัท Kokusan corporation ประเทศญี่ปุ่น)

3.2 หลอดเก็บตัวอย่างเลือดเคลือบด้วยซิลิโคน ขนาด 10 มิลลิลิตร (Venoject, ของบริษัท Terumo, ประเทศญี่ปุ่น)

3.3 กล่องรักษาความเย็น (ice box)

3.4 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (deep freezer อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส)

3.5 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์วัดการดูดกลืนแสงโดยอะตอม (Atomic - Absorption Spectrophotometer, Varian Model Spectr AA-300)

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

4.1 สารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ไนเตรต (copper nitrate) สำหรับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์วัดการดูดกลืนแสงโดยอะตอม ความเข้มข้นของทองแดง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba

4.2 สารละลายมาตรฐานซิงค์ไนเตรต (zinc nitrate) สำหรับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์วัดการดูดกลืนแสงโดยอะตอม ความเข้มข้นของสังกะสี (zinc) 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba

4.3 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (concentrated hydrochloric acid) AR Grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมันนี

4.4 กลีเซอริน (Glycerin USP XX) ขององค์การเภสัชกรรม

4.5 น้ำกลั่น 2 ครั้งจัดไอออน (deionized double distilled water)

วิธีการวิจัย

อุปกรณ์ทุกชิ้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น เครื่องแก้วและขวดพลาสติกพอลิเอทิลีน (polyethylene) สำหรับบรรจุสารละลายตัวอย่างต้องแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง เพื่อให้อุปกรณ์ปราศจากการปนเปื้อนของแร่ธาตุทุกชนิด จากนั้นล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งจัดไอออน (Smith และคณะ, 1979; Milne และ Johnson, 1993)

1. การวิเคราะห์หาปริมาณสังกะสี โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์วัดการดูดกลืนแสงโดยอะตอม (Smith และคณะ, 1979; Milne และ Johnson, 1993)

1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิงค์ไนเตรตให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานซิงค์ไนเตรตเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ด้วยสารละลายกลีเซอรินเข้มข้น ร้อยละ 5 จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นเทียบเท่ากับสังกะสีในซีรัมเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อเดซิลิตร

1.2 การเตรียมตัวอย่าง

นำซีรัมที่เก็บแช่แข็งไว้ออกมาวางนอกตู้เย็นให้ละลายจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ผสมตัวอย่างให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน โดยกลับภาชนะไปมาอย่างน้อย 6 ครั้ง บีบตซีรัม 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดพลาสติก เติมน้ำกลั่น 2 ครั้งขจัดไอออน 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.3 การวิเคราะห์

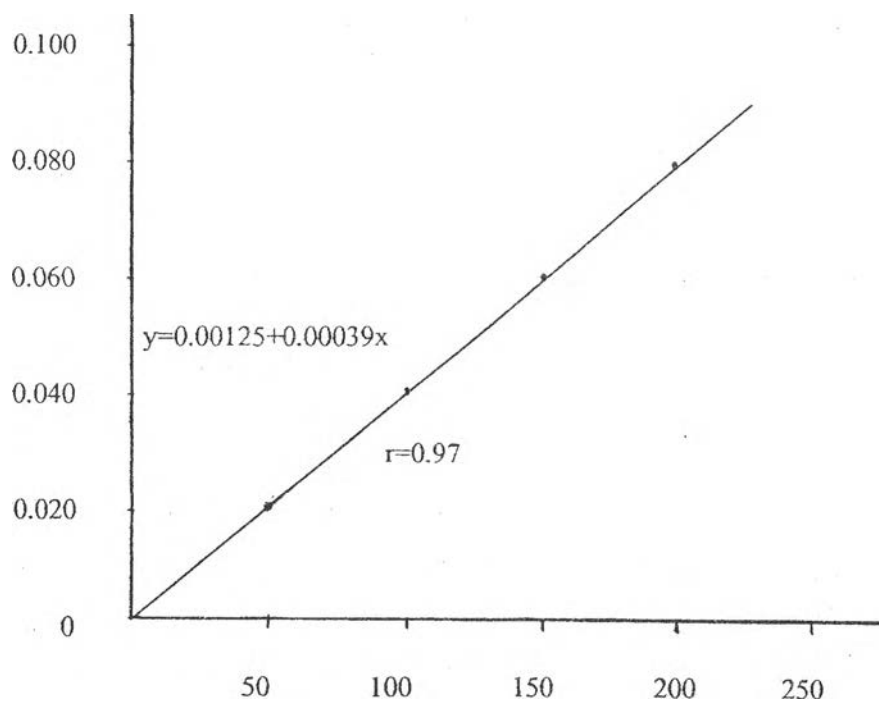
วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยอะตอมของสารละลายมาตรฐานซึ่งค้ในเตรตและสารละลายตัวอย่าง โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์วัดการดูดกลืนแสงโดยอะตอมที่สภาวะดังต่อไปนี้

กระแสไฟฟ้า (lamp current)	5	มิลลิแอมแปร์
ความกว้างช่องแสงผ่าน (slit width)	1.0	นาโนเมตร
ความยาวคลื่น (wave length)	213.9	นาโนเมตร
เปลวไฟ (flame)	อากาศและอะเซทิลีน (air-acetylene)	
เวลาในการวัด	2.0	วินาที
ความเร็วอากาศ (air flow)	13.5	ลิตรต่อนาที
ความเร็วอะเซทิลีน (acetylene flow)	2.0	ลิตรต่อนาที
ใช้ระบบการแก้ภูมิหลัง (background correction)		

1.4 การหาปริมาณสังกะสีในซีรัม

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสังกะสี สารละลายมาตรฐานซึ่งมีในเตรตที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อเดซิลิตร (รูปภาพที่ 3) ความเข้มข้นของสังกะสีในซีรัมตัวอย่างคำนวณได้จากกราฟดังกล่าวโดยใช้สมการเส้นตรง

ค่าการดูดกลืนแสง (213.9 นาโนเมตร)



ความเข้มข้นของสังกะสี (มคก./ดล.)

ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสังกะสี

2. การวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงโดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์วัดการดูดกลืนแสงโดยอะตอม (AOAC, 1990)

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ไนเตรตให้มีความเข้มข้น 0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายกลีเซอรินเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นตัวเจือจาง

2.2 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 1.2 แต่ใช้ซีรัม 1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2 ครั้งขจัดไอออน 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.3 การวิเคราะห์

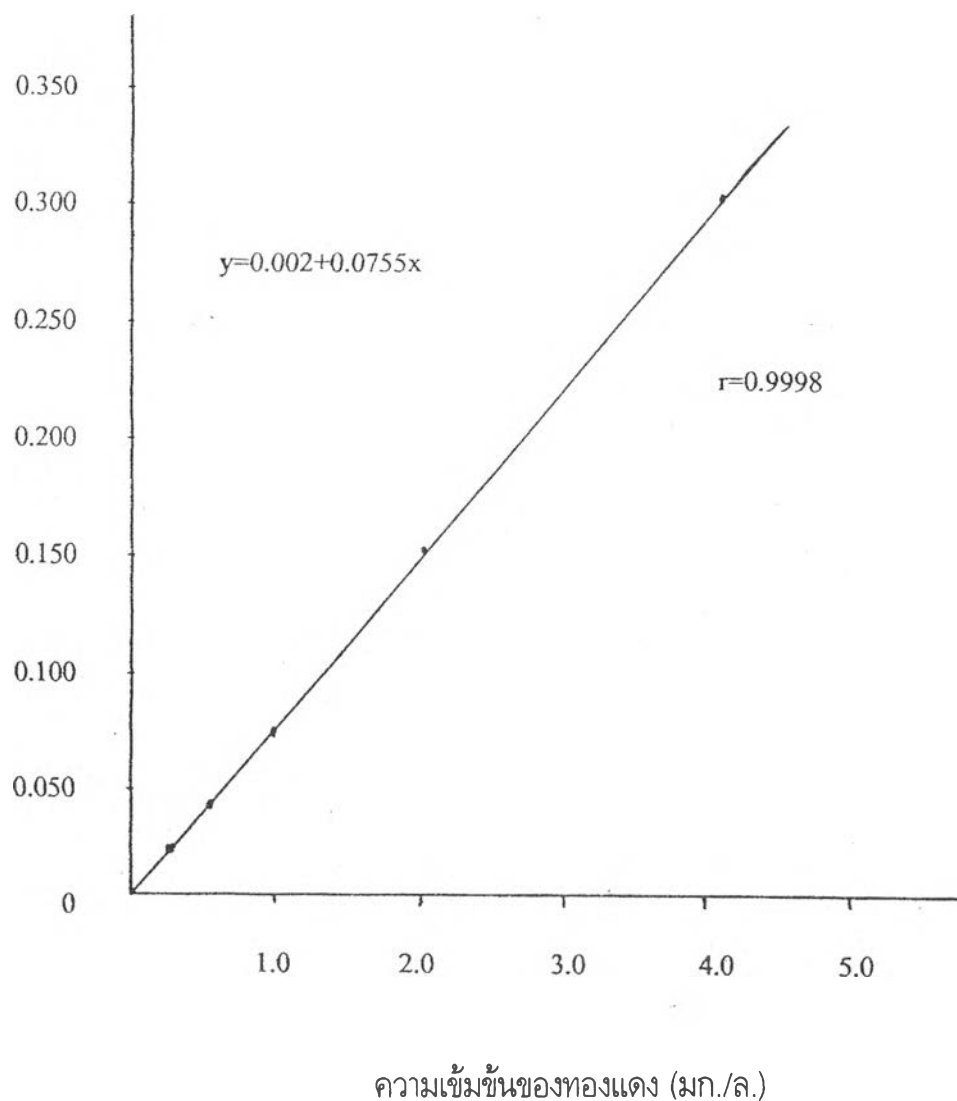
วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยอะตอมของสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ไนเตรตและสารละลายตัวอย่างที่เตรียมแล้ว โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์วัดการดูดกลืนแสงโดยอะตอมที่สภาวะดังต่อไปนี้

กระแสไฟฟ้า (lamp current)	4	มิลลิแอมแปร์
ความกว้างช่องแสงผ่าน (slit width)	0.5	นาโนเมตร
ความยาวคลื่น (wave length)	324.8	นาโนเมตร
เปลวไฟ (flame)		อากาศและอะเซทิลีน (air-acetylene)
เวลาในการวัด (measurement time)	2.0	วินาที
ความเร็วอากาศ (air flow)	13.5	ลิตรต่อนาที
ความเร็วอะเซทิลีน (acetylene flow)	2.0	ลิตรต่อนาที

2.4 การหาปริมาณทองแดงในซีรัม

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงโดยอะตอมกับความเข้มข้นของทองแดง จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ในเตรตที่มีความเข้มข้น 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4) ความเข้มข้นของทองแดงในซีรัมหาค่าจากสมการเส้นตรงที่คำนวณจากกราฟ คุณด้วย 200 จะได้ค่าทองแดงเป็นไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร หรือไมโครกรัมต่อเดซิลิตร

ค่าการดูดกลืนแสง (324.8 นาโนเมตร)



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของทองแดง

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (เต็มศิริ ชำนิจารกิจ, 2531)

ใช้ Paired t-test เปรียบเทียบปริมาณสังกะสีและทองแดงในซีรัมของผู้ป่วยก่อนและหลังจากให้อาหารผ่านทางเดินอาหารหรืออาหารทั้งหมดทางหลอดเลือดดำ (enteral nutrition หรือ total parenteral nutrition)