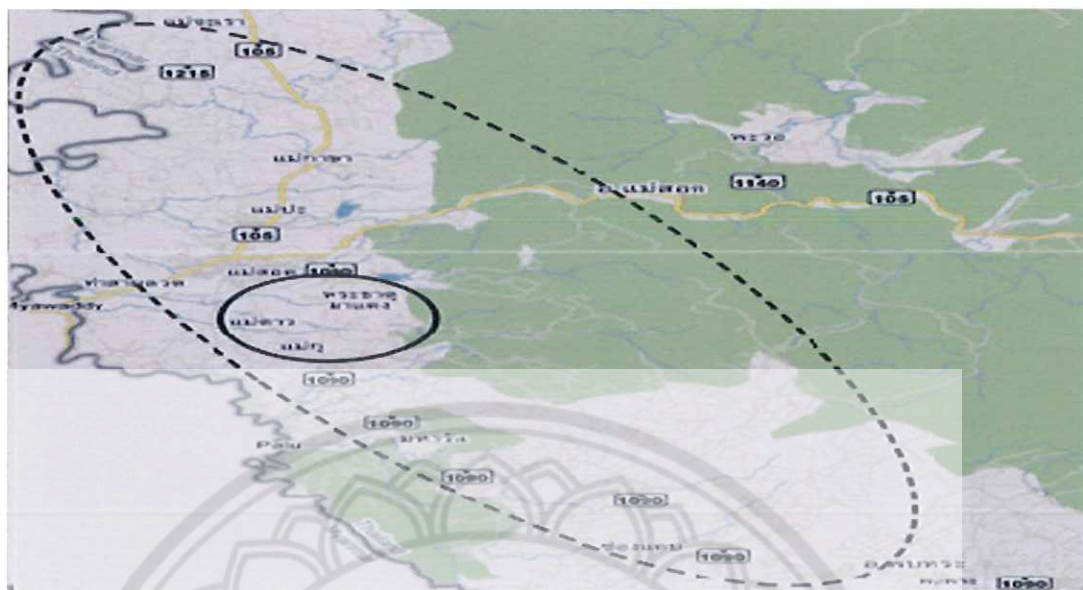


บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมในเลือดทองแดงในพลาสมาและสังกะสีในพลาสมา โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมและกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม โดยแบ่งกลุ่มหญิงตั้งครรภ์จากการศึกษาวิจัยร่วมระหว่างองค์การนานาชาติศึกษาเกี่ยวกับทรัพยากรน้ำและดินสหภาพยุโรปหรือ IWMI กับกรมวิชาการเกษตร เมื่อปี พ.ศ.2548 จากการศึกษาวิจัยพบว่าพื้นที่ใน 12 หมู่บ้านของ 3 ตำบล คือ ตำบลแม่ตาว ตำบลแม่กุ และตำบลพระธาตุผาแดง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก มีแคดเมียมปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมสูงและจากการตรวจปริมาณแคดเมียมในร่างกายพบว่าปริมาณแคดเมียมในร่างกายสูงเช่นกัน จึงได้แบ่งพื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่ที่มีแคดเมียมปนเปื้อน และกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่ในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ซึ่งอาศัยอยู่นอกพื้นที่ 3 ตำบลดังที่ได้กล่าวมาแล้วเป็นกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมโดยมีรายละเอียดดังนี้



ภาพ 6 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่าง อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

หมายเหตุ: ○ พื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม ○ พื้นที่ที่อยู่นอกการปนเปื้อนแคดเมียม

ที่มา: ธงชัย หน่อแก้ว, 2554

1. กลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม

กลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม เป็นหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่ใน 12 หมู่บ้านของ 3 ตำบล คือ ตำบลพระธาตุผาแดง ตำบลแม่ดาว และตำบลแม่กุ อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก โดยหญิงตั้งครรภ์อาศัยอยู่ในพื้นที่อย่างน้อย รวมระยะเวลา 5 ปี และมีอายุระหว่าง 15 – 40 ปี จำนวน 22 ราย ซึ่งได้ฝากครรภ์ที่สถานีอนามัยประจำตำบลหรือโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก และมาคลอดบุตรที่โรงพยาบาลแม่สอด ซึ่งมีอายุครรภ์ ประมาณ 36-38 สัปดาห์ ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง จำนวน 5 เดือน ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ ปี 2553 โดยการเลือกกลุ่มตัวอย่างพิจารณาจากคุณสมบัติดังนี้

- 1.1 หญิงตั้งครรภ์ต้องมีสุขภาพแข็งแรง
- 1.2 ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรม เช่น โรคธาลัสซีเมีย เบาหวาน และกลุ่มอาการดาวน์
- 1.3 ไม่มีโรคประจำตัว ได้แก่ โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิตสูง โรคต่อมธัยรอยด์ โรคมะเร็ง
- 1.4 ไม่เป็นโรคติดเชื้อขณะตั้งครรภ์ ได้แก่ โรคเอดส์ ไวรัสตับอักเสบบี หงอนไก่ และวัณโรค
- 1.5 ไม่มีโรคแทรกซ้อนขณะตั้งครรภ์

1.6 ไม่สูบบุหรี่ขณะตั้งครรภ์

1.7 ไม่ดื่มแอลกอฮอล์ขณะตั้งครรภ์

2. กลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม

กลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม คือ หญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่ในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ซึ่งไม่ได้อาศัยอยู่ใน 3 ตำบล คือ ตำบลพระธาตุผาแดง ตำบลแม่ดาวและตำบลแม่กุ และมีอายุระหว่าง 15-40 ปี จำนวน 25 ราย โดยหญิงตั้งครรภ์ต้องอาศัยอยู่ในพื้นที่ดังกล่าว รวมระยะเวลาไม่น้อยกว่า 5 ปี และมีสภาพเศรษฐกิจและสังคมใกล้เคียงกันกับกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมซึ่งได้ฝากครรภ์ที่สถานีอนามัยประจำตำบลหรือโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก และมาคลอดบุตรที่โรงพยาบาลแม่สอด ซึ่งมีอายุครรภ์ ประมาณ 36-38 สัปดาห์ ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง จำนวน 5 เดือน ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2552 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ ปี 2553 โดยการเลือกกลุ่มตัวอย่างพิจารณาจากคุณสมบัติดังนี้

2.1 หญิงตั้งครรภ์ต้องมีสุขภาพแข็งแรง

2.2 ไม่เป็นโรคทางพันธุกรรม เช่น โรคธาลัสซีเมีย เบาหวาน และกลุ่มอาการดาวน์

2.3 ไม่มีโรคประจำตัว ได้แก่ โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิตสูง โรคต่อมไทรอยด์

และโรคมะเร็ง

2.4 ไม่เป็นโรคติดเชื้อขณะตั้งครรภ์ ได้แก่ โรคเอดส์ ไวรัสตับอักเสบบี หนองใน และวัณโรค

2.5 ไม่มีโรคแทรกซ้อนขณะตั้งครรภ์

2.6 ไม่สูบบุหรี่ขณะตั้งครรภ์

2.7 ไม่ดื่มแอลกอฮอล์ขณะตั้งครรภ์

3. ทารกแรกเกิดที่เกิดจากมารดาที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม

ทารกกลุ่มนี้ คือ ทารกที่เกิดจากหญิงที่มาคลอดบุตรที่โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ซึ่งอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมและมารดาต้องมีคุณสมบัติตามที่กำหนดไว้ทุกประการ

4. ทารกแรกเกิดที่เกิดจากมารดาที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม

ทารกกลุ่มนี้ คือ ทารกที่เกิดจากหญิงที่มาคลอดบุตรที่โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ซึ่งอาศัยอยู่นอกพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมและมารดาต้องมีคุณสมบัติตามที่กำหนดไว้ทุกประการ

การเก็บตัวอย่างเลือดของหญิงที่มาคลอดบุตร

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ส่วนแรก คือ ตัวอย่างเลือดครบส่วน (whole blood) ของหญิงตั้งครรภ์ที่มาคลอดบุตรที่โรงพยาบาลและเลือดของทารกแรกเกิดที่ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมในเลือด เป็นตัวอย่างเลือดที่เก็บมาสำหรับตรวจหาปริมาณแคดเมียมโดยเฉพาะของการศึกษานี้ ที่ดำเนินการเก็บโดยกลุ่มวิจัยโลหะ มหาวิทยาลัยนเรศวร ภายใต้โครงการ "ผลของแคดเมียมต่อหญิงตั้งครรภ์และทารกที่เกิดจากมารดาที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก" ส่วนที่สอง คือตัวอย่างพลาสมาสำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสังกะสีและทองแดง เป็นตัวอย่างที่เหลือจากโครงการ "ผลของแคดเมียมต่อหญิงตั้งครรภ์และทารกที่เกิดจากมารดาที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก" ซึ่งได้ผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ครั้งที่ 11/2550 ลงวันที่ 20 พฤศจิกายน 2550 และได้ขอใช้ตัวอย่างที่เหลือจากโครงการดังกล่าวโดยขอจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เพิ่มเติมในส่วนของการตรวจหาปริมาณทองแดงในพลาสมา ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิจัยนี้ และได้ผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร COA No.63/2013 IRB No.129/56 วันที่รับรอง 28 สิงหาคม 2556 เรียบร้อยแล้ว

การเก็บตัวอย่างเลือดของหญิงที่มาคลอดบุตรกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมและกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม เก็บตัวอย่างเลือด ณ เวลาที่หญิงตั้งครรภ์มาคลอดบุตร โดยเก็บตัวอย่างเลือดจาก vein puncture แล้วใส่ในหลอดทดสอบพลาสติก ชนิดฝาเกลียว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สะอาด และใส่ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่างเลือด จำนวน 2 หลอด หลอดแรก เป็นเลือดครบส่วน (whole blood) เพื่อใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมในเลือด ส่วนหลอดที่ 2 บั่นเพื่อแยกเก็บพลาสมา เพื่อใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสังกะสีและทองแดงในพลาสมาประมาณ หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นช่องแช่แข็ง อุณหภูมิ ประมาณ -20°C จนกว่าจะนำมาตรวจวิเคราะห์

การเก็บตัวอย่างเลือดทารกแรกเกิดจากสายสะดือ (umbilical cord blood)

เก็บตัวอย่างเลือดของทารกแรกเกิดจากสายสะดือ ซึ่งเก็บทันทีหลังจากที่คลอดทารก ใส่ในหลอดทดสอบพลาสติก ชนิดฝาเกลียว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สะอาด และใส่ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เก็บตัวอย่างเลือด จำนวน 2 หลอด หลอดแรก เป็นเลือดครบส่วน (whole blood) เพื่อใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมในเลือด ส่วนหลอดที่ 2 บั่นเพื่อแยกเก็บพลาสมา

เพื่อใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงในพลาสมา ประมาณ หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นช่องแช่แข็ง อุณหภูมิ ประมาณ -20°C จนกว่าจะนำมาตรวจวิเคราะห์ ส่วนการตรวจหาปริมาณสังกะสีในพลาสมาของทารกแรกเกิดไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากปริมาณตัวอย่างพลาสมาไม่เพียงพอในการตรวจวิเคราะห์

จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการขอจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร COA No. 63/2013 IRB No.129/56 วันที่รับรอง 28 สิงหาคม 2556 รายละเอียดดังเอกสารแนบในภาคผนวก จ

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในเลือด สังกะสีในพลาสมาและทองแดงในพลาสมา โดยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโตรเมตรี (atomic absorption spectrometry) ซึ่งเป็นวิธีที่มีการทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยมีความแม่นยำ (% accuracy) ของทั้ง 3 วิธี อยู่ในช่วง 90-110 %, 80-115 % และ 90-110 % ตามลำดับ และความเที่ยง (% RSD) ของทั้ง 3 วิธี $\leq 10\%$ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) เท่ากับ $0.01\ \mu\text{g/L}$, $0.1\ \text{mg/L}$ และ $0.02\ \text{mg/L}$ ตามลำดับ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ) เท่ากับ $0.5\ \mu\text{g/L}$, $0.3\ \text{mg/L}$ และ $0.25\ \text{mg/L}$ ตามลำดับ

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในเลือด

ตัวอย่างเลือดและสารมาตรฐานแคดเมียมในเลือด (ขอสนับสนุนจากกองพิษวิทยา สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ช่วงความเข้มข้น ($0.5-10.0\ \mu\text{g/L}$) วิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมในเลือด โดยปิเปต matrix modifier 0.2% (v/v) magnesium nitrate + 0.2% (v/v) ammonium dihydrogen phosphate ปริมาตร $200\ \mu\text{L}$ ลงใน sample cup หลังจากนั้น ปิเปตสารมาตรฐานแคดเมียมในเลือด, เลือดตัวอย่าง, Internal Quality Control (IQC) ใช้สำหรับควบคุมคุณภาพของกระบวนการวิเคราะห์ โดยใช้ Reference Material (RM) ยี่ห้อ Seronorm™ Trace elements whole blood Lot 0503109 (ค่าอยู่ในช่วง $5.4-6.2\ \mu\text{g/L}$) ปริมาตร $50\ \mu\text{L}$ ใส่ลงใน sample cup ที่ใส่ matrix modifier ไว้แล้ว ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer (GFAAS) ของ Perkin elmer รุ่น AAnalyst 600 ระบบ Zeeman background correction โดยมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 90-110 % และ $\text{RSD} \leq 10\%$

และมีการควบคุมคุณภาพจากภายนอก (external quality control) โดยเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ การตรวจวิเคราะห์ (Proficiency testing, PT) โปรแกรม Lead and Multielement Proficiency Program (LAMP) กับ Center for Disease Control (CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกา และเป็นสมาชิก PT โลหะในเลือดของกองพิษวิทยา สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งผลการทดสอบตัวอย่าง PT เป็นที่ยอมรับของ PT Provider อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ z-score น้อยกว่า 2 (ค่า Z-score ที่ได้ = 1.0)

2. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณทองแดงในพลาสมา

การหาปริมาณทองแดงในพลาสมา มีวิธีการดังนี้ ปิเปตน้ำ ultrapure 18.2 Mohm ลงใน microcentrifuge tube ปริมาตร 450 ไมโครลิตร และปิเปตตัวอย่าง สารมาตรฐาน spike standard ในน้ำ ช่วงความเข้มข้น 0.25 ถึง 2.5 mg/L และ IQC ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เจือจางตัวอย่างอีกครั้งด้วยน้ำ ultrapure 18.2 Mohm ปริมาตร 450 ไมโครลิตร และตัวอย่างที่ เตรียมไว้ในข้างต้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หา ปริมาณทองแดงในพลาสมาโดยเทียบกับสารมาตรฐานด้วยเครื่อง GFAAS ในการตรวจวิเคราะห์ทุกครั้ง มีการควบคุมคุณภาพโดยการใช้ RM เป็น IQC ยี่ห้อ Seronom™ Trace Elements Serum Lot no 0903106 (ค่าอยู่ในช่วง 1.5 – 1.9 mg/L) โดยมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 90-110 % และ RSD ≤ 10 %

3. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสังกะสีในพลาสมา

ตัวอย่างพลาสมาและสารมาตรฐานสังกะสีในพลาสมา เตรียมโดยการ spike standard สังกะสีในพลาสมา ช่วงความเข้มข้น 0.3-2.0 mg/L วิเคราะห์หาปริมาณสังกะสีใน พลาสมาโดยปิเปต ตัวอย่างพลาสมา สารมาตรฐาน และ IQC ยี่ห้อ Seronom™ Trace elements serum Lot no 0903106 (ค่าอยู่ในช่วง 1.6-1.9 mg/L) ตามลำดับ ปริมาตร 0.5 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตรที่ใส่น้ำ ultrapure ไว้ครึ่งหนึ่ง หลังจากนั้นปรับปริมาตร ด้วยน้ำ ultrapure ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrometer (FAAS) ของ Perkin elmer รุ่น 3100 (Perkin Elmer, 1982) โดยมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 80-115 % และ RSD ≤ 10 %

ถ้าผลการวิเคราะห์ระดับสังกะสีและทองแดงในพลาสมาตัวอย่างมีค่าสูงกว่า calibration curve ให้เจือจาง (dilute) ตัวอย่างเพื่อให้ผลวิเคราะห์อยู่ในช่วงเส้นตรง โดยการวิเคราะห์ โลหะทั้ง 3 ชนิด มีค่าความเป็นเส้นตรง (correlation coefficient; r) มากกว่า 0.995

ตาราง 7 แสดงค่า LOD, LOQ และ correlation coefficient (r) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์
แคดเมียม สังกะสีและทองแดง

| ชนิดโลหะ | ค่า LOD | ค่า LOQ | correlation coefficient (r) |
|----------|-----------|-----------|-------------------------------|
| แคดเมียม | 0.01 µg/L | 0.5 µg/L | > 0.995 |
| สังกะสี | 0.1 mg/L | 0.3 mg/L | > 0.995 |
| ทองแดง | 0.02 mg/L | 0.25 mg/L | > 0.995 |

การควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์

การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์แคดเมียม สังกะสีและทองแดง ดำเนินการโดยการทำการควบคุมคุณภาพภายใน (IQC) โดยใช้วัสดุมาตรฐานอ้างอิง (RM) ตามที่ระบุไว้แล้วข้างต้น และการวิเคราะห์แคดเมียมในเลือดได้ประเมินผลการเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญในโปรแกรม Lead and multielement proficiency program (LAMP) ของ CDC ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบระหว่างข้อมูล 2 ชุด คือ เปรียบเทียบระหว่างปริมาณแคดเมียมในเลือด ปริมาณทองแดงในพลาสมา ปริมาณสังกะสีในพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์กลุ่มที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมและกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่นอกพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนแคดเมียม สถิติที่ใช้ คือ Wilcoxon signed rank test และเปรียบเทียบระหว่างปริมาณแคดเมียมและทองแดงในเลือดของมารดาและทารกแรกเกิด โดยใช้สถิติ Wilcoxon matched- pairs signed rank test และหาความสัมพันธ์โดยใช้ correlation coefficient (r) โดยพิจารณาจากค่า $p < 0.05$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (95 % confidence interval)