

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. ปิเปต ทิป ขนาด 200 μ l และ 1000 μ l
2. แท่งแม่เหล็กขนาดเล็ก ของ BDH
3. หลอดทดลองแก้วแบบฝาเกลียว พร้อมฝาเกลียวที่มีแผ่น Teflon
4. เข็มฉีดยา (Micro Syringe) ขนาด 10 μ l ของ Hewlett-Packard
5. เข็มเจาะเลือด เบอร์ 21 แบบใช้ครั้งเดียว
6. กระบอกฉีดยาขนาด 5 ml แบบใช้ครั้งเดียว
7. GC Capillary Column (HP-5) ของ Agilent

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น 404A ของ Precisa
2. ตู้อบแบบควบคุมอุณหภูมิ (Electronically Controlled Incubators)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น Medifriger

BL-S ของ P-SelectR[®]

4. เครื่องดูดสารเคมีแบบอัตโนมัติ (Auto Pipettes) ของ BioRad
5. เตาความร้อนแบบปรับอุณหภูมิ และผสมสารเคมีแบบสนามแม่เหล็กได้ (Hot Plate & Stirrer) รุ่น 1000 ของ JENWAY
6. อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น DT Hetotherm ของ Heto
7. ตู้ทำความเย็น -80°C รุ่น CL Hetofrig ของ Heto
8. เครื่องผสมสารเคมี (Vortex) รุ่น ZX³ ของ VELP[®] Scientifica
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น V-530 ของ Jasco
10. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น 6890 ของ Agilent

ประกอบด้วย Injector แบบ Split/Split Less และ Detector แบบ Flame Ionization Detector (FID)

สารเคมี

1. Isopropanol, AR Grade ของ Carlo Erba
2. Methanol, AR Grade ของ Carlo Erba
3. Acetone, AR Grade ของ Carlo Erba
4. Hexane, AR Grade ของ Carlo Erba
5. Alumina, AR Grade ของ Carlo Erba
6. Potassium Hydroxide, AR Grade ของ Carlo Erba
7. Acetylacetone, AR Grade ของ Carlo Erba
8. Acetic Acid, AR Grade ของ Carlo Erba
9. Metaperiodate, AR Grade ของ Carlo Erba
10. Ferric Chloride, AR Grade ของ Carlo Erba
11. Sodium Carbonate, AR Grade ของ Carlo Erba
12. Dichloromethane, AR Grade ของ Fisher Scientific
13. Concentrated Phosphoric Acid, AR Grade ของ Carlo Erba
14. Concentrated Sulphuric Acid, AR Grade ของ Carlo Erba
15. L-Ascorbic Acid, AR Grade ของ Sigma
16. Cholesterol, Standard Grade ของ Carlo Erba
17. Dextran Sulfate, AR Grade ของ Sigma
18. Magnesium Chloride, AR Grade ของ Sigma
19. Tripalmitate, Standard Grade ของ Sigma
20. Fatty Acid Methyl Ester Standard: (C14-24) Standard Grade ของ Sigma
21. Internal Standard : Cis-11,14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester Standard Grade
ของ Sigma
22. แก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ 99.99%
23. แก๊สฮีเลียมบริสุทธิ์ 99.99%
24. แก๊สไฮโดรเจน 99.99%

กลุ่มตัวอย่าง

บุคคลทั่วไปที่สมัครใจเข้าร่วมงานวิจัย จากประชาชนในเขตอำเภอบ่อทอง จ.ชลบุรี และ
นักศึกษา และบุคลากรของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี โดยมีอายุ

ตั้งแต่ 20 ปีขึ้นไป จำนวนทั้งสิ้น 200 คน (โดยตัดออก 111 คน จากจำนวน 311 คน เพราะมีคุณสมบัติไม่ตรงตามเกณฑ์การคัดเลือก) โดยในกลุ่มที่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ จำนวน 100 คน เป็นบุคคลทั่วไป ที่มีสุขภาพปกติ และมีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ อย่างน้อย 3 ครั้งต่อสัปดาห์ นานครั้งละ 30-45 นาที และต่อเนื่องมาเป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือน และกลุ่มที่ไม่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ จำนวน 100 คน เป็นบุคคลทั่วไป ที่มีสุขภาพปกติ และไม่มีการออกกำลังกายเลยหรือไม่มีการออกกำลังกายแบบแอโรบิคอย่างสม่ำเสมอ อย่างน้อย 3 เดือนมาแล้ว หรือน้อยกว่า 30 นาทีต่อครั้ง หรือน้อยกว่า 3 ครั้งต่อสัปดาห์ และในแต่ละกลุ่มแบ่งตามเพศ โดยเพศชายที่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ 50 คน เพศหญิงที่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ 50 คน และในเพศชายที่ไม่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ 50 คน ส่วนในเพศหญิงที่ไม่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ 50 คน ในแต่ละเพศ แบ่งตามกลุ่มอายุ ได้ 5 ช่วง ได้แก่ 20-29 ปี, 30-39 ปี, 40-49 ปี, 50-59 ปี และมากกว่า 60 ปีขึ้นไป ซึ่งในแต่ละช่วงอายุ มีจำนวน 10 คน โดยกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มจะต้องมีคุณสมบัติดังนี้

1. ไม่เป็น โรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน โรคความดันเลือดสูง โรคหัวใจ
2. ไม่ได้อยู่ในระหว่างได้รับยาลดไขมันในเลือด ยาคุมกำเนิด ยาขับปัสสาวะหรือยาประเภท Steroid
3. งดการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อย่างน้อย 3 วันก่อนเจาะเลือด

การเก็บข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

กำหนดให้กลุ่มตัวอย่างกรอกแบบสอบถามด้วยตัวเอง โดยใช้แบบสอบถามที่ประกอบด้วย 3 ส่วน (ดัดแปลงจาก วรธนา วัฒนกุล, 2546) คือ

ส่วนที่ 1 เป็นข้อมูลส่วนตัวของกลุ่มตัวอย่าง เพื่อศึกษาข้อมูลทั่วไป และข้อมูลด้านปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อไขมันในเลือด

ส่วนที่ 2 เป็นข้อมูลเกี่ยวกับการออกกำลังกาย เพื่อจัดแบ่งกลุ่มตัวอย่าง ออกเป็นกลุ่มที่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ และกลุ่มที่ไม่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ

ส่วนที่ 3 เป็นข้อมูลเกี่ยวกับการรับประทานอาหาร (Food Frequency) เพื่อประเมินปริมาณสารอาหารที่กลุ่มตัวอย่างได้รับ

วิธีการเก็บซีรัมจากกลุ่มตัวอย่าง

เจาะเลือดจากกลุ่มตัวอย่าง ที่งดอาหารหลังจากรับประทานอาหารเย็นจนถึงเวลาเจาะเลือด เป็นจำนวน 5 มิลลิตร (ml) จากนั้นตั้งเลือดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไป

ปั่นเหวี่ยงที่ 1000 xg และเก็บส่วนใสด้านบนหรือซีรัมไว้ใน Eppendroff นำไปเก็บไว้ที่ -80°C เพื่อใช้ในการหาปริมาณของไขมันในซีรัมต่อไป

วิธีการหาปริมาณไขมันและไลโปโปรตีนในซีรัม

1. วิธีการหาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในซีรัม (ดัดแปลงจาก Hainline, Karon, & Lippel, 1982)

นำซีรัม 100 ไมโครลิตร(μl) ใส่หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง แล้วเติม Isopropanol ปริมาณ 4 ml และเติม Washed Alumina ปริมาณ 400 มิลลิกรัม (mg) แล้วใส่แท่งแม่เหล็ก ขนาดเล็ก หลอดละ 1 แท่ง แล้วปิดฝาให้แน่น จากนั้นนำไปวางบน เครื่องผสมสารเคมีแบบสนามแม่เหล็ก เพื่อกวนสารผสมเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านบนปริมาณ 2 ml ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียวอันใหม่ จากนั้นเติม Saponifying Reagent ปริมาณ 0.6 ml ปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปแช่ใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมสารละลาย Sodium Metaperiodate Reagent ปริมาณ 1 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย Acetylacetone Reagent ปริมาณ 0.5 ml เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งด้วยเครื่องผสมสารเคมี แล้วปิดฝาให้แน่น จากนั้นนำไปแช่ใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Tripalmitate (0-300 mg/dl)

2. วิธีการหาปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัม (ดัดแปลงจาก Hainline, Karon, & Lippel, 1982)

นำซีรัมปริมาณ 20 μl ใส่ในหลอดฝาเกลียว แล้วเติม Ethanol ปริมาณ 2 ml และเขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย Acid-Ferric Chloride Reagent ปริมาณ 2 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเคมี (Vortex) เป็นเวลาประมาณ 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Cholesterol (0-500 mg/dl)

3. วิธีการหาปริมาณไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (HDL-C) (Warnick, Benderson, & Albers, 1982)

นำซีรัมปริมาณ 50 μl ใส่ในหลอด Eppendroff แล้วเติม Combine Working Solution 5 μl แล้วนำไปเขย่า ด้วยเครื่องผสมสารเคมี เป็นเวลา 30 วินาทีทันที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 xg เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านบน นำไปหาปริมาณโคเลสเตอรอลตามวิธีในข้อ 2. จะได้ค่าเป็น HDL-C

4. วิธีหาปริมาณไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL-C) (Friedewald, Levy, & Fredrickson, 1972)

ใช้วิธีการคำนวณ โดยใช้สูตร

$$\text{LDL-C} = \text{Total Cholesterol} - (\text{HDL-C} + \text{Triglyceride}/5)$$

วิธีการชนิดและปริมาณของกรดไขมันจำเป็นในซีรัม

1. การเตรียมกรดไขมันในซีรัม (Esterification) (ดัดแปลงจาก Christie, 1982)

นำซีรัมปริมาณ 100 μl ใส่ในหลอดแก้วที่มีฝาเกลียว ชนิด Teflon แล้วเติม 5% H_2SO_4 ใน Methanol ในปริมาณ 200 μl จากนั้นเติม L-Ascorbic Acid เล็กน้อย แล้วใส่แท่งแม่เหล็กขนาดเล็ก จากนั้นปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปให้ความร้อน โดยแช่ในน้ำเดือด เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยที่มีการกวนผสมตลอดเวลาด้วย จากนั้นเมื่อครบเวลา ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อน แล้วจึงเติม 6% Na_2CO_3 ปริมาณ 200 μl อย่างช้า ๆ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม Hexane ปริมาณ 100 μl ปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 2000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น เก็บชั้น Hexane ด้านบน เป็นจำนวน 50 μl ใส่ในหลอด Eppendroff แล้วเติม Internal Standard ปริมาณ 1 μl (2 mg/dl) แล้วนำไปเป่าด้วยแก๊ส N_2 ให้แห้ง จากนั้นละลายกรดไขมันใน Eppendroff ด้วย Hexane 50 μl อีกครั้ง แล้วนำไปเก็บในตู้ -80°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) ต่อไป

2. การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดไขมันจำเป็นด้วยเครื่อง Gas

Chromatography (GC)

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1. มาฉีดเข้าเครื่อง GC โดยกำหนดสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ ดังนี้

สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลอง

คอลัมน์	Capillary Column ยาว 10 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm เคลือบด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane หนา 0.25 μm (HP-5)
ปริมาตรที่ฉีด	1 μl
แก๊สพา	แก๊สฮีเลียม
Injector	Split (Split Ratio 20:1) ที่อุณหภูมิ 200°C

Oven	ความดันที่ 24.25 psi (Constant Pressure) อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 58 °C คงที่ 2 นาที เพิ่มขึ้น 10 °C ต่อเนื่องถึง 200 °C คงที่ 3 นาที แล้วเพิ่มขึ้น 5 °C ต่อเนื่องจนถึง 250 °C คงที่ 5 นาที รวมเวลา 34.2 นาที
Detector	Flame Ionization Detector (FID) ที่อุณหภูมิ 250 °C แก๊สไฮโดรเจน มีอัตราการไหล 45 ml ต่อนาที และ อากาศ มีอัตราการไหล 450 ml ต่อนาที
Make Up Gas	แก๊สไนโตรเจน อัตราการไหล 45 ml ต่อนาที

นำโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ได้จากซีรัมของกลุ่มตัวอย่างมาเปรียบเทียบ ชนิดและปริมาณจากโครมาโตแกรมของกรดไขมันมาตรฐาน โดยใช้วิธี External Standardization Method (0-1 mg/dl)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยในครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Inc., 1989-1999 (Statistical Package for Social Science Version 10.0.) ในการวิเคราะห์ผลการทดลองดังนี้

1. สถิติพรรณนา ใช้ค่าเฉลี่ย (Mean±S.D.) ในการอธิบายความเข้มข้นของระดับไขมันไลโปโปรตีน และกรดไขมันจำเป็นในซีรัม
2. สถิติเชิงอนุมาน
 - 2.1 การเปรียบเทียบค่า BMI ในกลุ่มที่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ และกลุ่มที่ไม่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ ของเพศชาย และเพศหญิง ในช่วงอายุต่าง ๆ
 - 2.1.1 วิเคราะห์ความแปรปรวน 3 ปัจจัย คือ การออกกำลังกาย เพศ และอายุ โดยใช้การทดลองแบบ Three-Fix Factor ANOVA ทดสอบความแตกต่างของแต่ละปัจจัย
 - 2.2 การเปรียบเทียบระดับไขมันและไลโปโปรตีนในซีรัม ในกลุ่มที่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ และกลุ่มที่ไม่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ ของเพศชาย และเพศหญิง ในช่วงอายุต่าง ๆ
 - 2.2.1 วิเคราะห์ความแปรปรวน 3 ปัจจัย คือ การออกกำลังกาย เพศ และอายุ โดยใช้การทดลองแบบ Three-Fix Factor ANOVA ทดสอบความแตกต่างของแต่ละปัจจัย

2.3 การเปรียบเทียบระดับกรดไขมันจำเป็นในซีรัม ในกลุ่มที่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ และกลุ่มที่ไม่มีการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอของเพศชาย และเพศหญิง ในช่วงอายุต่าง ๆ

2.3.1 วิเคราะห์ความแปรปรวน 3 ปัจจัย คือ การออกกำลังกาย เพศ และอายุ โดยใช้การทดลองแบบ Three-Fix Factor ANOVA ทดสอบความแตกต่างของแต่ละปัจจัย

2.4 ใช้ค่าสถิติ Regression Correlation ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TC ในซีรัม กับระดับ TG, HDL-C, LDL-C และกรดไขมันจำเป็นในซีรัม