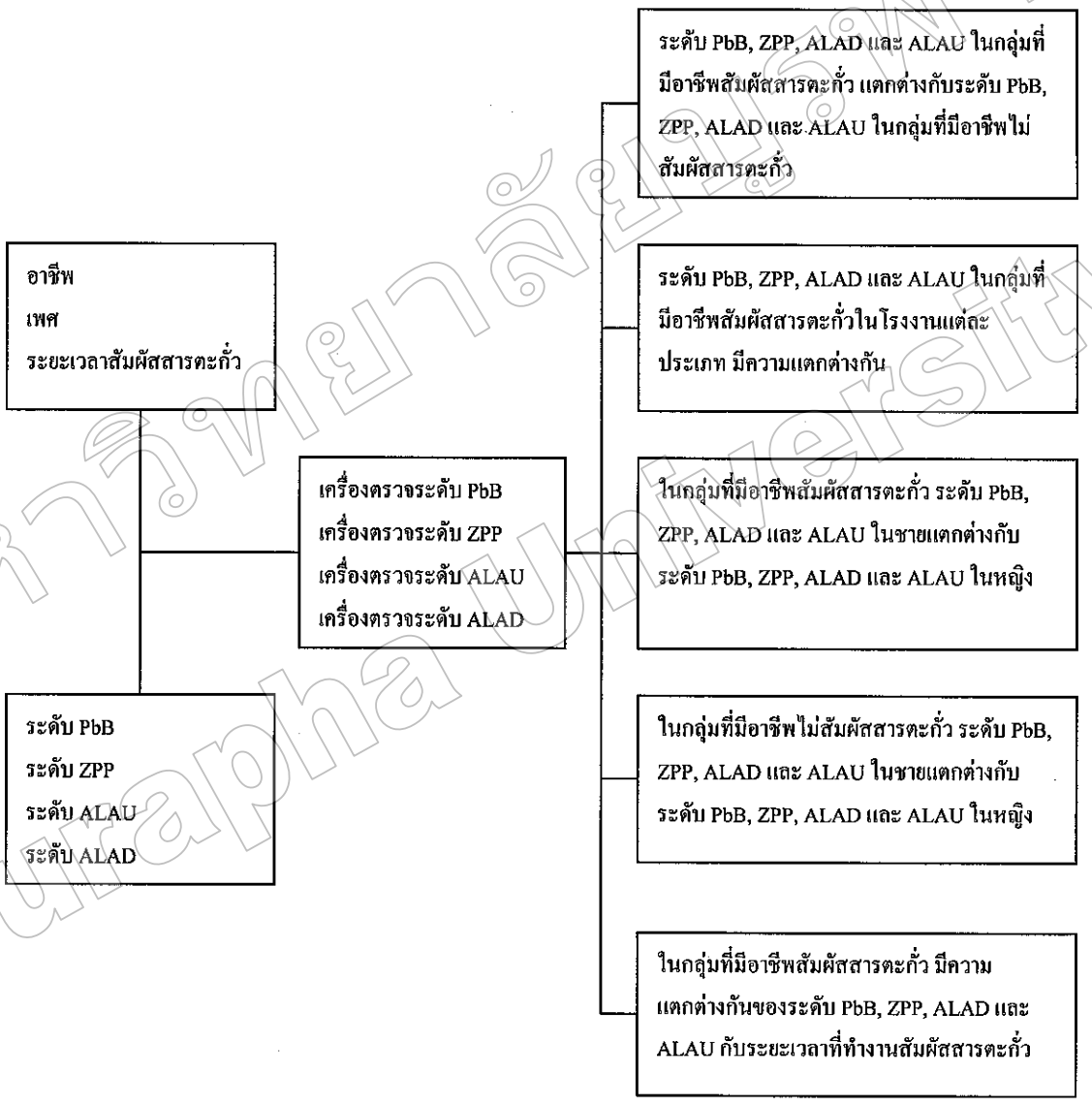
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ภาพที่ 10 แสดงกรอบแนวคิดในการศึกษา

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. แบบสอบถามข้อมูลส่วนบุคคล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. อุปกรณ์เจาะเลือด ได้แก่ สำลี แอลกอฮอล์ ภาชนะเจาะและเก็บเลือดระบบสุญญากาศ ซึ่งประกอบด้วย เข็ม และหลอดเก็บเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดเฮพาริน (Heparin)

3. ภาชนะพลาสติกสำหรับเก็บปัสสาวะ

4. เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (AAS) แบบไร้เปลวไฟ ชนิดหัวกราไฟต์ ที่มีระบบของ Zeeman Background Correction เพื่อวิเคราะห์ระดับตะกั่วในเลือด ยี่ห้อ Varian รุ่น SpectrAA 640Z

5. เครื่อง Hematofluorometer เพื่อวิเคราะห์ ระดับ ZPP ในเลือด ยี่ห้อ AVIV รุ่น 206D

6. เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer เพื่อวิเคราะห์ระดับ ALAD Activity และ ALAU ยี่ห้อ Unicam รุ่น HEλIOSβ

7. เครื่องนับเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติ

8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

9. เครื่องหมุนเหวี่ยง

10. เครื่องชั่งแบบละเอียด

11. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ

12. อุปกรณ์เก็บรักษาสภาพตัวอย่างขณะขนส่ง (กระติก หรือกล่องโฟม)

วิธีดำเนินการวิจัย

กำหนดตัวแปรในการศึกษา

1. เพศ

2. อาชีพ

3. ระยะเวลาสัมผัสสารตะกั่ว

4. ระดับ PbB

5. ระดับ ALAD

6. ระดับ ALAU

7. ระดับ ZPP

เพศ หมายถึง เพศของกลุ่มที่นำมาศึกษาระดับ PbB, ZPP, ALAD และ ALAU มี 2 เพศ คือ เพศชาย และเพศหญิง

อาชีพ หมายถึง อาชีพของกลุ่มที่นำมาศึกษาระดับ PbB, ZPP, ALAD และ ALAU มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอาชีพไม่สัมผัสสารตะกั่ว ได้แก่ คนงานในโรงงานหรือสถานประกอบการทั่วไป และกลุ่มที่มีอาชีพสัมผัสสารตะกั่ว ได้แก่ คนงานในโรงงานแบตเตอรี่, โรงงานถลุงตะกั่ว และ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โรงงานอีเล็กโทรนิกส์

ระยะเวลาสัมผัสสารตะกั่ว หมายถึง ระยะเวลาที่มีอาชีพสัมผัสกับสารตะกั่ว มีหน่วยเป็นปี

ระดับ PbB หมายถึง ปริมาณความเข้มข้นของตะกั่วในเลือดที่มาจากเส้นเลือดดำ มีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อเดซิลิตร (Microgram/ deciliter: µg/ dl)

ระดับ ALAD หมายถึง สถานะการทำงานของเอ็นไซม์ ALAD ในเม็ดเลือดแดงที่มาจากเส้นเลือดดำ มีหน่วยเป็น หน่วยต่อมิลลิลิตรของเม็ดเลือดแดง (Units/ milliliter of Red Blood Cell: Units/ ml of RBC)

ระดับ ZPP หมายถึง ปริมาณความเข้มข้นของ ZPP ในเม็ดเลือดแดงที่มาจากเส้นเลือดดำ มีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อเดซิลิตรของเลือดทั้งหมด (Microgram/ deciliter of Whole Blood)

ระดับ ALAU หมายถึง ปริมาณความเข้มข้นของ ALA ในปัสสาวะ มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (Milligram/ deciliter: mg/ dl)

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มคนที่ทำงานไม่สัมผัสสารตะกั่ว ได้แก่ คนที่ทำงานในโรงงานหรือสถานประกอบการทั่ว ๆ ไป ซึ่งไม่มีสารตะกั่วมาเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการทำงาน และกลุ่มคนที่ทำงานสัมผัสสารตะกั่ว ได้แก่ คนที่ทำงานในโรงงานแบตเตอรี โรงงานถลุงตะกั่ว และโรงงานอีเล็กโทรนิกส์ ซึ่งมีสารตะกั่วเกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต โดยเลือกเก็บตัวอย่างตามความสมัครใจของพนักงาน

การคำนวณจำนวนตัวอย่างจากสูตร ดังนี้ (เติมศรี ชำนิจารกิจ, 2537)

$$n = \frac{Z^2 . p\, q}{d^2}$$

โดย n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

Z = 1.96 (กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% หรือเท่ากับ 0.05)

p = กลุ่มคนที่ไม่ได้สัมผัสสารตะกั่ว คิดเป็นร้อยละ 80-90 ของคนทั้งหมด

p = 0.85

q = 0.15

d = ความคลาดเคลื่อนสูงสุดที่ยอมให้เกิดขึ้น = 0.1

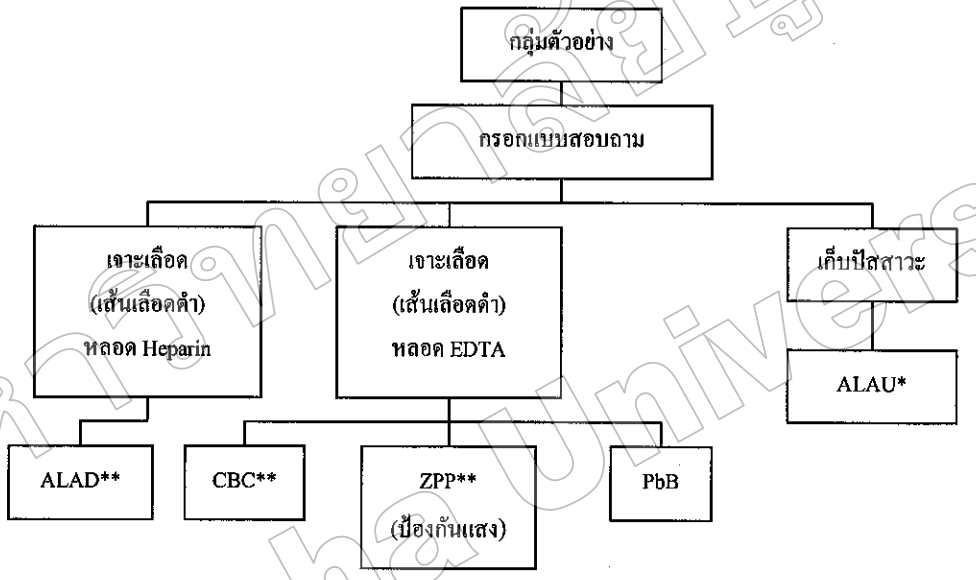
จากสูตร คำนวณ ขนาดกลุ่มตัวอย่างได้ กลุ่มละ 50 ตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

คาดว่า จะคัดแยกตัวอย่างที่มีภาวะโลหิตจางจากการขาดเหล็กออกได้ 20 เปอร์เซ็นต์
ดังนั้น จำนวนตัวอย่างที่ต้องนำมาศึกษา = ขนาดตัวอย่างที่คำนวณได้/ 0.8
= 50/ 0.8
= 63 คน

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. ผังการทำงานและการรวบรวมข้อมูล



* ถ้ายังไม่ทำเก็บไว้ที่ -70 °C

** ต้องทำภายใน 12-24 ชั่วโมง

ภาพที่ 11 แสดงผังการทำงานและการรวบรวมข้อมูล

2. การเก็บข้อมูลและวิธีการวิเคราะห์

2.1 แบบสอบถาม

สร้างแบบสอบถาม สำหรับเก็บข้อมูลส่วนบุคคลของเจ้าของตัวอย่าง เช่น ชื่อ-สกุล, เพศ, อายุ, แผนกที่ทำงาน, ระยะเวลาการทำงาน, โรคประจำตัว, ประวัติ และอาการป่วยที่พบบ่อย ๆ เป็นต้น เพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ร่วมกับผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ (สำหรับตัวอย่างแบบสอบถาม ได้แสดงไว้ใน ภาคผนวก ข)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 การวิเคราะห์ระดับตะกั่วในเลือดโดยเครื่อง GFAAS (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2546)

หลักการ

การวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GFAAS เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Paschal, Fernandez และ Scinclair โดยตัวอย่างเลือดจะถูกเจือจางด้วยสารละลาย Triton X-100 (ทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก) และ Ammonium Dihydrogen Phosphate (ทำหน้าที่เป็นตัวปรับสภาพของเมทริก คือทำให้เป็นสารประกอบตะกั่วฟอสเฟต ทนอุณหภูมิได้สูงและช่วยให้สามารถกำจัดสิ่งรบกวนจากเมทริก (Interference Matrix) ในระหว่างขั้นตอนการ Drying และ Ashing) จากนั้นนำไปวัดหาปริมาณสารตะกั่วโดยใช้เครื่อง GFAAS โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารมาตรฐานตะกั่วในเลือดแกะ เพื่อให้มีเมทริกเหมือนตัวอย่างเลือด

สารเคมี

1. Triton X-100
2. Ammonium Dihydrogen Phosphate หรือ Diammonium Hydrogen Phosphate
3. สารละลายตะกั่วมาตรฐาน ความเข้มข้น 1000 µg/ ml
4. น้ำกลั่นชนิด Ultrapure Water (18 Mohm) หรือน้ำที่ผ่านกระบวนการ Reverse Osmosis หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง หรือน้ำที่ไม่มีการรบกวนของสารตะกั่ว

วิธีเตรียมน้ำยาเคมี

Matrix Modifier เตรียมโดยชั่ง Triton X-100 หนัก 0.1 กรัม และ Ammonium Dihydrogen Phosphate หนัก 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรใน Volumetric Flask

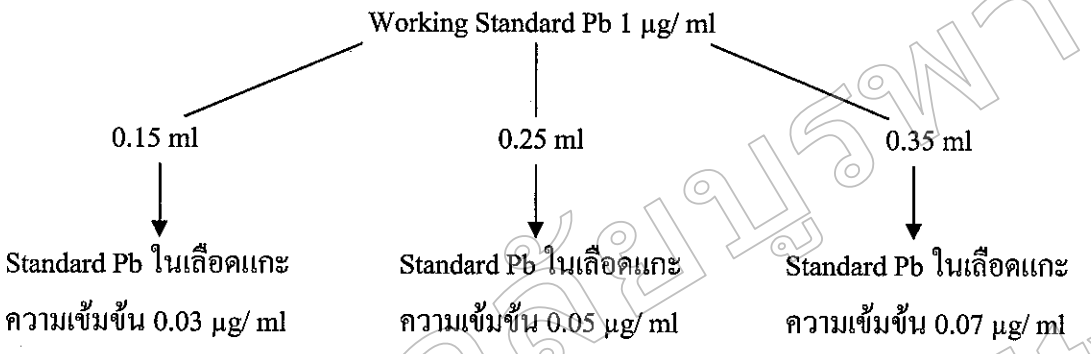
สารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Working Standard) จาก Stock Standard โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามขั้นตอน ดังนี้

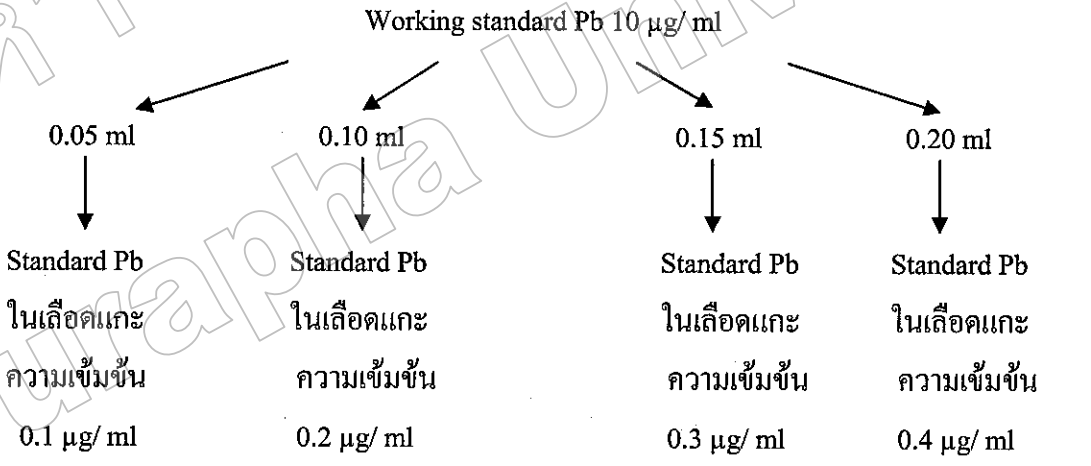
Stock Standard 1000 µg/ ml
↓ 1 ml ใน Volumetric Flask 10 ml
Working Standard 100 µg/ ml
↓ 1 ml ใน Volumetric Flask 10 ml
Working Standard 10 µg/ ml
↓ 1 ml ใน Volumetric Flask 10 ml
Working Standard 1µg/ ml

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เตรียมสารมาตรฐานที่จะใช้วิเคราะห์ความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 µg/ ml โดยที่ความเข้มข้น 0.03, 0.05, 0.07 µg/ ml เตรียมจาก Working Standard ความเข้มข้น 1 µg/ ml เจือจางด้วยเลือดแกะให้มีปริมาตร 5 ml ใน Volumetric Flask ขนาด 5 ml ดังนี้



ส่วนที่ความเข้มข้น 0.1 µg/ ml ขึ้นไป เตรียมโดยใช้ Working Standard ความเข้มข้น 10 µg/ ml เจือจางด้วยเลือดแกะ ให้มีปริมาตร 5 ml ใน Volumetric Flask ขนาด 5 ml ดังนี้



สำหรับการเตรียมสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น เพื่อทำ Standard Calibration Curve สามารถทำ Dilution ด้วยโปรแกรมจากเครื่องได้

วิธีทำ

1. นำตัวอย่างเลือดจากตู้เย็นมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เพื่อให้อุณหภูมิของตัวอย่างเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ในอ่างน้ำความถี่สูง (Ultrasonic Bath) นานประมาณ 5 นาที แล้วนำไปปั่นด้วย Vortex Mixer เพื่อทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

2. ดูดสารละลาย Matrix Modifier 450 µl ผสมกับตัวอย่างเลือด 50 µl

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. ดูดสารละลาย Matrix Modifier 450 µl ผสมกับ Blank, Standard อย่างน้อย 4 ความเข้มข้น และ Control Sample ควบคู่ไปพร้อมกับการเตรียมตัวอย่าง โดย Blank ใช้เลือดแกะที่ไม่ได้เติมสารตะกั่วลงไป

4. นำไปวิเคราะห์ระดับตะกั่วด้วยเครื่อง GFAAS ยี่ห้อ Varian รุ่น SpectrAA 640Z โดยมีสภาวะเครื่อง ดังแสดงในตารางที่ 5

การคำนวณ

พลอตกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) คำนวณปริมาณตะกั่วโดยใช้ สมการ Linear Regression (y = ax+b) ตอบผลเป็นหน่วย µg/ dl

ตารางที่ 5 แสดงสภาวะเครื่อง (Furnace Conditions) สำหรับเครื่อง GFAAS ยี่ห้อ Varian รุ่น SpectrAA 640Z ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ระดับตะกั่วในเลือด

Step	Temp (^{o}C)	Time (sec)	Gas Flow (l/ min)	Gas Type	Read
1	85	5.0	3.0	normal	No
2	95	40.0	3.0	normal	No
3	120	10.0	3.0	normal	No
4	400	5.0	3.0	normal	No
5	400	10.0	3.0	normal	No
6	700	10.0	3.0	normal	No
7	700	5.0	3.0	normal	No
8	700	1.0	0.0	normal	No
9	1800	0.6	0.0	normal	Yes
10	1800	2.0	0.0	normal	Yes
11	2400	2.0	3.0	normal	No
12	2400	2.0	3.0	normal	No

การควบคุมคุณภาพ

1. ใช้ Lyophillized Human Blood เป็นตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (QC Sample) ซึ่งเตรียมโดยกลุ่มงานพิษวิทยาและสิ่งแวดล้อม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข หรือใช้ CRM ของ Seronorm® หรือ Biorad® นำไปวิเคราะห์ควบคู่พร้อมกันกับตัวอย่างคั่นทุก ๆ 20 ตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ซึ่งผลการวิเคราะห์อยู่ในช่วงไม่เกิน ± 2 SD กรณีใช้ QC Sample ที่ไม่ได้ระบุค่า SD กำหนดให้ผลการวิเคราะห์อยู่ในช่วงไม่เกิน 95–105 % ของค่า QC Sample ที่ระบุ หากไม่ได้ตามเกณฑ์จะต้องปรับเครื่อง ทำกราฟมาตรฐานใหม่ จนกระทั่งได้ผลตามที่กำหนด

2. ทำซ้ำ (Duplicate) ทุกตัวอย่างที่ 20 และค่า RPD ที่ได้จากการทำซ้ำต้อง ≤ 10 %

3. ก่อนนำเครื่องแก้วและภาชนะพลาสติกมาใช้ จะต้องผ่านการล้างตาม SOP การล้างเครื่องแก้วและภาชนะพลาสติกสำหรับงานโลหะ

4. ค่า r ของกราฟมาตรฐานที่ได้ ต้องไม่น้อยกว่า 0.99

รายละเอียดอื่น ๆ

1. คุณสมบัติของเลือดแกะที่นำมาใช้เตรียม Working Standard ต้องไม่มีการปนเปื้อนของตะกั่ว หรือมีการปนเปื้อนน้อย ควรมีค่าการดูดกลืนแสงของ Blank อยู่ระหว่าง 0.004-0.012

2. การเก็บรักษาตัวอย่าง ตัวอย่างเลือดที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 10 สัปดาห์ หากนำไปแช่ในอ่างน้ำความถี่สูง และแช่แข็ง สามารถเก็บไว้ได้นานจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

3. ถ้าผลวิเคราะห์ระดับตะกั่วในเลือดตัวอย่าง มีค่ามากกว่า 80 µg/ dl ให้ทำการเจือจางตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์ใหม่ เพื่อให้ผลวิเคราะห์อยู่ในช่วงเส้นตรง

4. ค่า % RPD ของการทำตัวอย่างซ้ำ คำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ RPD} = \left| \frac{2 (C_1 - C_2)}{C_1 + C_2} \right| \times 100$$

C_1 = ค่าความเข้มข้นหรือ Peak Area หรือ Peak Height ที่วัดได้ครั้งที่ 1

C_2 = ค่าความเข้มข้นหรือ Peak Area หรือ Peak Height ที่วัดได้ครั้งที่ 2

2.3 การตรวจการทำงานของเอ็นไซม์ ALAD (Burch, & Siegel, 1971)

หลักการ

ทำเม็ดเลือดแดงให้แตก (Hemolyse) (เพราะ ALAD อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง) และใส่ Buffer Substrate ที่มีสารมาตรฐาน ALA แล้วนำไปบ่มแช่ (Incubate) ในอ่างน้ำร้อน (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วย TCAซึ่ง PBG ที่เกิดขึ้น วัดได้โดยเติม Ehrlich's Reagent แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer นำค่าที่ได้มาคำนวณโดยนำค่าของ Hct มาคำนวณด้วย จะได้เป็นค่าการทำงานของเอ็นไซม์ ALAD มีหน่วยเป็น Units/ ml of RBC

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตัวอย่าง

เลือดประมาณ 2 มิลลิลิตร ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดเฮพาริน (Heparin Blood)

สารเคมีและรีเอเจนต์

1. Triton X–100

2. Buffer ALA Substrate

3. TCA Reagent (ผสม N-ethylmaleimide)

4. Modified Ehrlich's Reagent (มี Perchloric Acid 2 mol/ l)

วิธีทำ

1. ไปเปตเลือด (ตัวอย่าง), น้ำกลั่น (Blank) 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม Triton X-100 1.3 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมเข้ากัน

2. เติม Buffer ALA Substrate 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้ผสมเข้ากัน

3. นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. เติม TCA Reagent 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมเข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5. ไปเปตส่วนใส 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่เติม Ehrlich's Reagent ไว้แล้ว 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมเข้ากัน

6. ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีเป็นเวลา 13 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสง ที่ 555 นาโนเมตร (ภายใน 10 นาที)

การคำนวณ

$$\text{Units of ALAD Activity} = \frac{\text{Corrected A} \times 100 \times 12.5 \times 10}{\text{Hct (\%)}}$$

โดย Corrected A = A test - A blank

100 = Units of Enzyme Activity is expressed as an increase in ABS at 555 nm

12.5 = Dilution Factor of Blood

ค่าปกติ

ในคนปกติ ควรอยู่ในช่วง 108– 99 Units/ ml of RBC

หมายเหตุ

1. ควรใช้หลอดเก็บตัวอย่างที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดเฮพาริน เพราะมีรายงานว่าสารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ จะยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ ALAD

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. เลือดตัวอย่างที่ทิ้งค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ค่าการทำงานของเอ็นไซม์ ALAD จะลดลงประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณ ALA ในปัสสาวะ (จินตนา โมกขะเวส, 2536)

หลักการ

ALA ในปัสสาวะทำปฏิกิริยากับอะซิธิลอะซิโตน (Acetylacetone) ได้เป็นพัยร์โรล์ (Pyrrole) และทำปฏิกิริยาต่อไปกับพาราไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีฮัยด์ (p-Dimethyl Amino Bezaldehyde) ในสารละลายกรด (Acid Solution) เกิดสีส้มแดง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร

ตัวอย่าง

ปัสสาวะที่ใช้ควรเป็นปัสสาวะที่เก็บมาใหม่ ๆ ถ้าปัสสาวะต้องทิ้งไว้ค้างคืนควรทำให้ปัสสาวะเป็นกรด โดยหยดกรดแกลเชียลอะซิติกและเก็บใส่ตู้แช่แข็งไว้ในที่มืดจนกว่าจะนำมาทดสอบ

สารเคมีและรีเอเจนต์

1. Acetylacetone
2. Acetate buffer pH 4.6
3. Modified Ehrlich's Reagent
4. Standard ALA solution 1 mg/ ml

วิธีทำ

1. นำปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติม Acetylacetone 0.2 มิลลิลิตร
3. เติม Acetate Buffer 8.8 มิลลิลิตร
4. เขย่าให้ผสมเข้ากัน และแช่ในน้ำเดือด 10 นาที
5. เอาหลอดออกจากในหม้อน้ำเดือด และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
6. ดูดส่วนผสมมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่
7. เติม Ehrlich's Reagent ที่เตรียมใหม่ ๆ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
8. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 553 นาโนเมตร โดยเทียบกับ Blank ของแต่ละตัวอย่างที่เตรียมไว้
9. การเตรียม Blank ทำแบบเดียวกับการทำปัสสาวะที่ต้องการหาค่า ALA ยกเว้นไม่ต้องทำในข้อ 2 คือไม่ต้องเติม Acetylacetone

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

10. นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปหาค่าความเข้มข้นจากเส้นกราฟมาตรฐาน

การทำเส้นกราฟมาตรฐาน

1. นำสารละลายมาตรฐาน (Stock Standard) มาทำการเจือจาง ตามตารางที่ 6

2. นำสารละลายมาตรฐาน (Working Standard) มา ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร และทำตามวิธีเดียวกับตัวอย่าง

ตารางที่ 6 แสดงการทำ Working Standard โดยการทำ Dilution จาก Stock Standard

Stock Standard	Normal Urine	ALA (mg/ l)
0	100.0	0
0.5	99.5	5
1.0	99.0	10
2.0	98.0	20
3.0	97.0	30
4.0	96.0	40
5.0	95.0	50

ค่าปกติ

0-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.5 การตรวจระดับ ZPP โดยเครื่อง Hematofluorometer (จินตนา โมกขะเวส, 2536)

ในการตรวจดังกล่าว อุปกรณ์ที่สะดวก มีประสิทธิภาพและเป็นที่นิยมกันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ วิธี Hematofluorometry เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และความไวดี จึงทำให้มีความนิยมใช้ในทางคลินิคอย่างมาก ด้วยวิธีนี้สามารถนำมาใช้วัด ZPP, ฮีโมโกลบิน และบิลลิลูบินในเลือดได้ จึงมีการนำวิธีการดังกล่าวไปใช้ในทางคลินิคเพื่อการวินิจฉัย รักษา และติดตามผู้ป่วยโรคพิษตะกั่ว และโรคดีซ่าน

Hematofluorometry เป็นการวัดทางปริมาณวิเคราะห์โดยหลักการทางฟลูออเรสเซนส์สำหรับตัวอย่างเลือด ปัจจุบันนิยมใช้ในการตรวจพอร์ฟัยริน และบิลลิลูบิน ด้วยเลือดเพียงหยดเดียว และพบว่า ให้ความสัมพันธ์กับอาการแสดงทางคลินิคของโรคพิษตะกั่วเรื้อรังได้ดีกว่าการใช้การตรวจระดับตะกั่วในเลือด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เนื่องจากตะกั่วอนินทรีย์ จะจับอย่างแข็งแรงกับกลุ่มซัลฟ์ฮัยดริลย์ ของโปรตีน ซึ่งจะทำให้เกิดการยับยั้งเอ็นไซม์หลายชนิดซึ่งที่เกี่ยวข้องในที่นี้คือเอ็นไซม์เฟอโรคีราเทส ซึ่งจะถูกยับยั้งโดยตะกั่ว เอ็นไซม์นี้จะนำอะตอมของเหล็กใส่เข้าไปในโปรโตพอร์พัยรินที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ ๆ (Newly Synthesized Protoporphyrin) ซึ่งจะกลายเป็น ฮีม และเป็นฮีโมโกลบินต่อไป ไอออนของสังกะสี ที่มีมากในเรติคูโลไซต์ (Reticulocytes) จะถูกคีเลต ด้วยโปรโตพอร์พัยริน ในยามปกติอัตราส่วนที่สังกะสีจะเข้าไปแทนที่เหล็ก จะน้อยมาก แต่ในสภาพที่เอ็นไซม์นี้ถูกยับยั้งโดยตะกั่ว จะทำให้ ZPP ถูกผลิตมากขึ้น ในคนที่มีตะกั่วในร่างกาย ZPP จะรวมกับโกลบิน เกิดเป็น ZPP-globin ซึ่งจะมีความผิดปกติในการจับกับออกซิเจน

วิธีการ

ใส่แผ่นสไลด์ลงในช่องใส่ตัวอย่างของเครื่อง หยดเลือด 1 หยด ปิดกระจก แล้วกดปุ่มวัดของเครื่อง เครื่องจะทำการวัดค่า ZPP โดยอัตโนมัติ

ระดับของการวัด

CDC กำหนดใช้ค่า ZPP ที่ระดับเท่ากับหรือมากกว่า 35 ไมโครกรัมต่อเดซิลิตร ในการแสดงความเป็นพิษของตะกั่ว

2.6 การคัดแยกตัวอย่างที่มีภาวะโลหิตจางจากการขาดเหล็ก

เนื่องจากการแปลผลเกี่ยวกับพิษตะกั่วโดยใช้ระดับ ZPP และ ALAU นั้น ต้องคำนึงถึงด้วยว่า ระดับ ZPP และ ALAU ที่ผิดปกติ อาจมีสาเหตุมาจากโรคหรือความผิดปกติอื่น ๆ ได้ มิใช่มาจากพิษของสารตะกั่วเพียงอย่างเดียว ซึ่งสาเหตุอื่นที่สำคัญและเป็นปัญหามากในประเทศไทยคือ ภาวะขาดเหล็ก ภาวะพร่องเหล็ก และภาวะติดเชื้อเรื้อรัง ดังนั้นการแยกกลุ่มที่จะศึกษาระดับความเป็นพิษของสารตะกั่วออกจากกลุ่มที่มีความผิดปกติเหล่านี้จึงมีความจำเป็น ทั้งนี้ทำได้โดยการตรวจหาระดับเฟอริตินในซีรั่ม (Serum Ferritin), เหล็กในซีรั่ม (Serum Iron), Total Iron-binding Capacity (TIBC) และ Transferrin Saturation (ธานินทร์ อินทรกำธรชัย, 2542; นันทรัตน์ โฆมานะสิน, นพมาศ เข็มทองหลาง, มณเฑียร พันธุเมธากุล และสุทธิพรรณ กิจเจริญ, 2544; พรเทพ เทียนสิวากุล, 2541) โดยใช้เกณฑ์ดังแสดงในตารางที่ 7

แม้ว่าการตรวจ SF เพื่อบ่งชี้ถึงภาวะขาดเหล็ก จะเป็นการตรวจที่ถูกต้องและดีที่สุด แต่ในกรณีที่มีปัญหาเรื่องค่าใช้จ่ายในการตรวจ SF, SI, TIBC และ Transferrin Saturation (กนกวรรณ แสนไชยสุริยา และกุลนภา ฟู่เจริญ, 2543) ดังกล่าว อาจใช้ค่า MCV (Mean Corpuscular Volume) และ RDW (Red Blood Cell Distribution Width) ซึ่งเป็นพารามิเตอร์อยู่ในการตรวจ CBC (Complete Blood Count) โดยสามารถตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Automated Blood Cell Analyzer) โดยมีเกณฑ์การวินิจฉัย (Cut off Values) ดังแสดง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในตารางที่ 8 และ 9 (CDC, 1998)

ตารางที่ 7 แสดงการประเมินภาวะผิดปกติจากการขาดเหล็ก (พรรณี พิเดช และคณะ, 2539)

กลุ่ม	SF (ng/ ml)	SI (µmol/ l)	TIBC (µmol/ l)	Transferrin Saturation (%)
คนปกติ	12 – 300	9 – 29	45 – 70	30 – 50
ภาวะขาดเหล็ก	< 12	ลดลง	เพิ่มขึ้น	< 15
ภาวะพร่องเหล็ก	12 – 20	ปกติ	ปกติ	< 15
ภาวะติดเชื้อเรื้อรัง	เพิ่มขึ้น	ลดลง	ลดลง	ปกติ

หมายเหตุ: ค่าที่เป็นตัวเลขอาจเปลี่ยนแปลงได้ โดยขึ้นอยู่กับเครื่องมือและน้ำยาที่ใช้วิเคราะห์ของแต่ละบริษัท

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

1. การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนา เพื่อแสดงลักษณะการกระจายของข้อมูล ในรูปร้อยละ, ตัวกลางเลขคณิต, มัธยฐาน, ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ความเบ้ (Skewness), ความโด่ง (Kurtosis) และเปอร์เซ็นต์ไทล์ (Percentile)

2. ดูลักษณะการแจกแจงความถี่ของตัวแปรในตัวอย่าง ว่าแจกแจงแบบปกติเหมือนในประชากรหรือไม่ โดยวิธี One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test กำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05 และสังเกตจากภาพฮีสโตแกรม

3. การเปรียบเทียบผลการวิจัยระหว่างกลุ่ม (ศิริชัย กาญจนวาสี, 2545)

3.1 ตัวอย่างสองชุดที่ประชากรแจกแจงแบบไม่ปกติใช้ Wilcoxon-Mann Whitney กำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05

3.2 ตัวอย่างหลายชุดที่ประชากรแจกแจงแบบไม่ปกติใช้ Kruskal – Wallis One-way Analysis of Variance กำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร

4.1 ประชากรแจกแจงแบบไม่ปกติ วิเคราะห์โดย Spearman's Rank Correlation กำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05

วิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS for Windows (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2548; ดำรงค์

ทิพย์โยธา, 2547)

ตารางที่ 8 เกณฑ์การวินิจฉัย (Cut off Values) สำหรับภาวะขาดเหล็ก (CDC, 1998)

Test	Cut off Value
Hemoglobin Concentration	See Table 9 for Cut off for Anemia
Hematocrit	See Table 9 for Cut off for Anemia
Mean Cell Volume (MCV)	Cut off for Microcytic Anemia at Age: 1–2 Years: <77 fl 3–5 Years: <79 fl 6–11 Years: <80 fl 12–15 Years: <82 fl >15 Years: <85 fl
Red Blood Cell Distribution Width (RDW)	Cut off for Iron Deficiency Anemia*: >14.0%
Erythrocyte Protoporphyrin Concentration	Cut off for Iron Deficiency: Adults: >30 µg/ dl of Whole Blood or >70 µg/ dl of Red Blood Cell Children aged 1–2 years: >80 µg/ dl of Red Blood Cell
Serum Ferritin Concentration	Cut off for Iron Deficiency in Persons aged >6 Months: ≤15 µg/ l
Transferrin Saturation	Cut off for Iron Deficiency: <16%

*The Cut off is Instrument Specific and May not Apply in All Laboratories.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 9 Maximum Hemoglobin Concentration and Hematocrit Values for Anemia* (CDC, 1998)

	Hemoglobin Concentration (mg/ dl)	Hematocrit (<%)
Children (Age, in Years)		
1-<2	11.0	32.9
2-<5	11.1	33.0
5-<8	11.5	34.5
8-<12	11.9	35.4
Man (Age, in Years)		
12-<15	12.5	37.3
15-<18	13.3	39.7
≥18	13.5	39.9
Nonpregnant Woman and Lactating Woman (Age, in Years)		
12-<15	11.8	35.7
15-<18	12.0	35.9
≥18	12.0	35.7
Pregnant Woman		
Weeks' gestation		
12	11.0	33.0
16	10.6	32.0
20	10.5	32.0
24	10.5	32.0
28	10.7	32.0
32	11.0	33.0
36	11.4	34.0
40	11.9	36.0
Trimester		
First	11.0	33.0
Second	10.5	32.0
Third	11.0	33.0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University