

### บทที่ 3

#### ขั้นตอน และวิธีดำเนินการวิจัย

##### 1. ตัวอย่างประชากร

เป็นผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลิน โดยเป็นผู้ป่วยนอกของศูนย์บริการสาธารณสุข 47 คลองขวาง และต้องมีคุณสมบัติต่อไปนี้

1. ผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด สูงกว่า 180 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
2. ผู้ป่วยได้รับยา Glibenclamide และ Metformin เท่านั้น ทั้งนี้ขึ้นกับดุลยพินิจของแพทย์ที่ทำการรักษา โดยขนาดของยาที่ใช้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วยแต่ละราย (ปกติจะให้ขนาดคงที่ออกเว้นผู้ป่วยที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดต่ำมาก)
3. การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าแต่ละกลุ่มการศึกษา ใช้วิธีสุ่มตัวอย่าง
4. ผู้ป่วยยินดีเข้าร่วมโครงการโดยความสมัครใจ

##### 2. วิธีดำเนินการวิจัย

1. เริ่มต้นการเก็บข้อมูลด้วยการบันทึกจากทะเบียนประวัติผู้ป่วยแต่ละคน และจากการสัมภาษณ์ โดยผู้วิจัยเป็นผู้สัมภาษณ์และบันทึกข้อมูลเองทั้งหมดมีการ ทดสอบความรู้เกี่ยวกับโรคเบาหวานและอาหาร 2 ครั้ง คือ เมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการวิจัย

ผู้ป่วยจะได้รับการเจาะเลือดตรวจหาระดับน้ำตาลกลูโคส โคลเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ เอชดีแอลโคเลสเตอรอล แอลดีแอลโคเลสเตอรอลและกลัยโคฮีโมโกลบิน (เจาะเลือดเฉพาะครั้งที่ 2 และ 4 เท่านั้น) ทุกครั้งที่ผู้ป่วยพบแพทย์ จะได้รับขนาดน้ำตาลกลูโคสไปรับประทานด้วย การนัดผู้ป่วยมาพบแพทย์ จะนัดห่างกันครั้งละ 4 สัปดาห์ ทั้งหมด 5 ครั้ง (ตารางที่ 4)

2. แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม โดยวิธีสุ่มตัวอย่างจากระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วย

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม 12 คน เป็นกลุ่มที่ได้รับขนาดน้ำตาลเพียงอย่างเดียว และได้รับการปฏิบัติเหมือนผู้ป่วยเบาหวานทั่วไปที่มารับบริการที่ศูนย์ฯ 47 คลองขวาง เป็นเช่นนี้ทุกครั้งที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์

กลุ่มที่ 2 กลุ่มศึกษา 24 คน เป็นกลุ่มที่ได้รับขนาดน้ำตาล และคำแนะนำเรื่องอาหาร โรคเบาหวานและวิธีควบคุมระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด การให้คำแนะนำจะแบ่งเป็นกลุ่มๆละ 5-6 คน เพื่อให้ผู้ป่วยมีโอกาสแสดงความคิดเห็น มีความสนุกสนาน เป็นกันเอง สำหรับคำแนะนำเรื่องอาหาร ผู้วิจัยจะคำนวณปริมาณพลังงานที่ผู้ป่วยแต่ละคนควรได้รับ พร้อมทั้งจัดทำรายการอาหารตามบริโภคนิสัยของแต่ละคน เพื่อให้ผู้ป่วยนำไปปฏิบัติจริง ในการพบแพทย์ครั้งที่ 3 ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะได้รับเม็ดแมงลัก (ซึ่งจากตลาดสดวัดโชนิมพลี ซอยเจริญสุขนิทวงศ์ 13 ในราคา กิโลกรัมละ 80 บาท ) กลับไปรับประทานร่วมกับมี้อาหาร ทั้ง 3 มี้อ ละ 10 กรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4 แสดงการพบแพทย์ของผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินทั้ง 2 กลุ่ม

การพบแพทย์	กลุ่มควบคุม	กลุ่มศึกษา
ครั้งที่ 1	เจาะเลือด , ได้รับยา*	เจาะเลือด , ได้รับยา*
ครั้งที่ 2	เจาะเลือด , ได้รับยา*	เจาะเลือด , ได้รับยา* , โภชนบำบัด
ครั้งที่ 3	เจาะเลือด , ได้รับยา*	เจาะเลือด , ได้รับยา* , โภชนบำบัด , เม็คแมงตัก
ครั้งที่ 4	เจาะเลือด , ได้รับยา*	เจาะเลือด , ได้รับยา* , โภชนบำบัด
ครั้งที่ 5	เจาะเลือด , ได้รับยา*	เจาะเลือด , ได้รับยา* , โภชนบำบัด

\* ขาดน้ำตาลในเลือด

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3. การเก็บตัวอย่างเลือด

ผู้ปวยงคอาหารแตะน้ำहतังเทียงคินก่อนที่จะมาตรวจในคองเข้า เก็บตัวอย่างเลือด 9 มิลลิลิตร แบ่งเป็น 3 ส่วน

ส่วนที่ 1 2 มิลลิลิตร ตรวจระดับน้ำตาลในเลือด

ส่วนที่ 2 5 มิลลิลิตร ตรวจระดับไขมันในเลือด (โคเลสเตอรอล ไครกทีเซอไรด์ เอชดีแอลโคเลสเตอรอล และแอลดีแอลโคเลสเตอรอล )

ส่วนที่ 3 2 มิลลิลิตร ตรวจระดับกลัยโคฮีโมโกลบิน (HbA1c)

### 4. การวิเคราะห์เลือด

การวิเคราะห์เลือดของศูนย์บริการสาธารณสุข 47 คคองขวงตรวจวิเคราะห์โดยฝ่ายชันสูตรโรค ตำนังกอนาม้อ

#### อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เครื่อง Automatic analyser " Hitashi 704 " บริษัทบอริงเกอร์ ม้านน์ไฮม์กรุ๊ป จำกัด เป็นผู้แทนจำหน่าย
- เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น " Clement 2000 "
- หลอดทดลองเก็บตัวอย่างเลือด
- ตู้อบ hot air oven รุ่น " Memmert 4236A "
- ปีเปด

## สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- sodium fluoride ARgrade ของบริษัทเอฟแอนด์อี ซัพพลายส์ จำกัด
- potassium oxalate ARgrade ของบริษัทเอฟแอนด์อี ซัพพลายส์ จำกัด
- EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid)
- GLUCOSE liquicolor ของบริษัทเอฟแอนด์อี ซัพพลายส์ จำกัด
- cholesterol reagent ของบริษัทคลาสวัน แลบบอราตอรี จำกัด
- triglycerides reagent ของบริษัทคลาสวัน แลบบอราตอรี จำกัด
- HDL reagent ของบริษัทคลาสวัน แลบบอราตอรี จำกัด
- haemolyzing reagent ของบริษัทเบอร์ริงเกอร์ ม้านน์ไฮม์กรุ๊ป จำกัด
- Tina-quant Haemoglobin A1c ของบริษัทเบอร์ริงเกอร์ ม้านน์ไฮม์กรุ๊ป จำกัด

### 4.1 การวิเคราะห์ระดับน้ำตาลในเลือด

#### 4.1.1. วิธีเตรียมหลอดเก็บตัวอย่างเลือด

- ก. ชั่ง sodium fluoride 1.20 กรัม ผสมกับ potassium oxalate 6.0 กรัม ละลายด้วย น้ำกลั่น ปรับให้เป็น 100 มิลลิลิตร (เตรียมเป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว)
- ข. นำสารละลาย 0.10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างเลือด
- ค. อบแห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

#### 4.1.2. วิธีวิเคราะห์เลือด (Barham และ Trinder , 1972)

ก. เจาะเลือด 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่เตรียมไว้

ข. เติมน้ำยา GLUCOSE liquicolor 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ค. incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ง. นำมาวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance ,A) ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Automatic analyser " Hitashi 704 "

(ทำ standard โคโยใช้น้ำยาที่ได้จากบริษัทและ blank โคโยใช้น้ำกลั่น )

จ. นำมาคำนวณค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส(มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)จากสูตร

$$C = 100 (A \text{ sample}) / (A \text{ standard})$$

ค่าปกติของระดับน้ำตาลในเลือด 70-110 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

#### 4.2 การวิเคราะห์โคเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือด (Trinder , 1969)

##### 4.2.1. วิธีเตรียมซีรัม (serum)

ก. เจาะเลือด 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างเลือด

ข.ปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที

ค. นำส่วนน้ำใสที่เหลือมาวิเคราะห์

4.2.2. การวิเคราะห์ระดับโคเลสเตอรอลในเลือด ( Trinder , 1969 ; Jacob และ Vandemark ,1960)

ก. บีเปตซีรัมที่ได้จากข้อ 4.2.1. 20 ไมโครลิตร

ข. เติมน้ำ cholesterol reagent 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ค. incubate เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ง. นำมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรด้วยเครื่อง

Automatic analyser " Hitashi 704 "

(ทำ standard และ blank)

จ. คำนวณค่าความเข้มข้นของโคเลสเตอรอล(มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)จากสูตร

$$\text{cholesterol concentration} = 200 (A \text{ sample}) / (A \text{ standard})$$

ค่าปกติของระดับโคเลสเตอรอลในเลือด 150-250 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

4.2.3. การวิเคราะห์ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด(Jacob และ Vandemark , 1960)

ก. บีเปตซีรัมที่ได้จากข้อ 4.2.1. 20 ไมโครลิตร

ข. เติมน้ำ triglyceride reagent 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ค. incubate เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ง. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรด้วยเครื่อง

Automatic analyser " Hitashi 704 " (ทำ standard และ blank)

จ. คำนวณค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์(มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)จากสูตร

$$\text{triglycerides concentration} = 200 (A \text{ sample}) / (A \text{ standard})$$

ค่าปกติของระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด 30-180 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

#### 4.3 การวิเคราะห์ เอชดีแอลโคเลสเตอรอล (Trinder, 1969)

- ก. ใช้ส่วนที่เป็นซีรัมจากข้อ 4.2.1. 2 มิลลิลิตร
- ข. เติม HDL- reagent 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- ค. ปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที
- ง. นำส่วนน้ำใส มาเติม cholesterol reagent 2 มิลลิลิตร
- จ. ทำตามขั้นตอนของข้อ 4.2.2.

#### 4.4 การวิเคราะห์แอลดีแอลโคเลสเตอรอล

จะใช้วิธี คำนวณแทนการวิเคราะห์ เนื่องจากมีขั้นตอนที่ยุ่งยากโดยใช้สูตร  
คำนวณของ Friedwald (Consensus conference , 1985) ดังนี้

$$\text{LDL (มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)} = \text{Cholesterol} - \text{TG} / 5 - \text{HDL}$$

โดยมีข้อกำหนดว่า TG (triglyceride) ต้องไม่มากกว่า 400 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

#### 4.5 การวิเคราะห์ระดับกลัยโคซิโมโกดบิน (HbA1c)

- ก. เจาะเลือด 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่มี EDTA 2 มิลลิกรัม
- ข. ปิเปตเลือดจากข้อ ก. 10 ไมโครลิตร เติม haemolyzing reagent 1 มิลลิลิตร
- ค. เขย่า อย่างน้อย 5 นาที
- ง. เติม Tina-quant haemoglobin A1c ลงในช่องน้ำยาที่เครื่องกำหนดให้
- จ. นำมาวิเคราะห์โดยวัดความขุ่นที่เกิดขึ้น (Turbidimetry) ที่ความยาวคลื่น 700 และ 340 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Automatic analyser "Hitashi 704"



๖ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ( เดิมศรี ชำนิจารกิจ , 2537 )

1. หาค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาล โคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ เอชดีแอล โคเลสเตอรอล และ แอลดีแอลโคเลสเตอรอล และ ค่ากลัยโคฮีโมโกลบินในเลือด

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ในการวิจัยนี้ เป็นการทดสอบหาความแตกต่างของระดับน้ำตาล โคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ เอชดีแอลโคเลสเตอรอล และ แอลดีแอลโคเลสเตอรอลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน ชนิดไม่พึ่งอินซูลิน เมื่อได้รับการรักษาต่าง ๆ ได้แก่ การได้รับขนาดน้ำตาล การใช้โภชนาบำบัด การได้รับเม็ดแมงลัก และหลังจากหยุดเม็ดแมงลัก

3. ใช้ Student t - test ทดสอบความแตกต่างของระดับกลัยโคฮีโมโกลบิน ในเลือดของผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มก่อนและหลังการรักษา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย