บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างเป็นสตรีที่มารับบริการตรวจรักษาสุขภาพที่ศูนย์ส่งเสริมสุขภาพเขต 4 ราชบุรี อายุระหว่าง 15-40 ปี แบ่งกลุ่มตัวอย่างวิจัยเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละประมาณ 30 คน ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สตรีไม่ตั้งครรภ์ซึ่งไม่รับประทานยาเม็ดคุมกำเนิด
กลุ่มที่ 2 สตรีไม่ตั้งครรภ์ซึ่งรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิด
กลุ่มที่ 3 สตรีตั้งครรภ์ซึ่งไม่เคยรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดก่อนตั้งครรภ์
กลุ่มที่ 4 สตรีตั้งครรภ์ซึ่งเคยรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดก่อนตั้งครรภ์

2. หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง

คัดเลือกจากการสัมภาษณ์ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง ประวัติการเจ็บป่วย และยาที่ได้รับตามแบบสอบถามประเมินข้อมูลส่วนตัวและสุขภาพ ดังแสดงในภาคผนวก ก โดยมีหลักเกณฑ์ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สตรีไม่ตั้งครรภ์ซึ่งไม่รับประทานยาเม็ดคุมกำเนิด

1.1 สุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว
1.2 ไม่อยู่ในภาวะการตั้งครรภ์ หรือให้นมบุตร และไม่อยู่ในระหว่างมีประจำเดือน
1.3 ไม่สูบบุหรี่ ไม่ดื่มเครื่องดื่มมีแอลกอฮอล์
1.4 ไม่ได้รับการถ่ายหรือบริจาคโลหิต ถ้าได้รับการถ่ายหรือบริจาคโลหิตต้องมีระยะเวลาผ่านมาแล้วมากกว่า 4 เดือน ก่อนเข้าสู่การวิจัย
1.5 ไม่ได้รับการเสริมวิตามินหรือยาที่มีผลต่อระดับโฟเลต เช่น ยาเม็ดคุมกำเนิด ยาต้านชัก
1.6 ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ ถ้าได้รับต้องหยุดยามาแล้วไม่น้อยกว่า 7 วัน เนื่องจากยามีผลต่อการเจริญเติบโตของ เชื้อ *Lactobacillus casei* ATCC, No. 7469 ซึ่งใช้วิเคราะห์ปริมาณโฟเลต

1.7 รับประทานอาหารครบ 5 หมู่ (ไม่รับประทานอาหารมังสวิรัติหรืออาหารเจเป็นประจำ)

กลุ่มที่ 2 สตรีไม่ตั้งครรภ์ซึ่งรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิด

เกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเหมือนกลุ่มที่ 1 แต่รับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 3 เดือนก่อนเข้าสู่การวิจัย

กลุ่มที่ 3 สตรีตั้งครรภ์ซึ่งไม่เคยรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดก่อนตั้งครรภ์

เกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเหมือนกลุ่มที่ 1 แต่อยู่ในภาวะตั้งครรภ์และมีอายุครรภ์ไม่เกิน 3 เดือน และไม่เคยรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดก่อนตั้งครรภ์ ถ้าเคยรับประทานต้องหยุดรับประทานก่อนตั้งครรภ์อย่างน้อย 3 เดือน

กลุ่มที่ 4 สตรีตั้งครรภ์ซึ่งเคยรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดก่อนตั้งครรภ์

เกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเหมือนกลุ่มที่ 3 แต่รับประทานยาเม็ดคุมกำเนิดอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 3 เดือนก่อนตั้งครรภ์

3. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโฟเลตในซีรัมและในเม็ดเลือดแดง

3.1.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic 21 , Bausch & Lumb.)

3.1.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง
(International portable Refrigerated Centrifuge, Model PR - 2)

3.1.3 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator), (Thelco, Model 6M)

3.1.4 ตู้อบแห้ง (Hot air oven),(Thelco, Model 17)

3.1.5 หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave)

3.1.6 หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 20 x125 มิลลิลิตร และขวดขนาดต่าง ๆ

3.1.7 หลอดเก็บตัวอย่างเลือดเคลือบด้วยซิลิโคน ขนาด 10 มิลลิลิตร (Venoject, บริษัท Terumo, ประเทศญี่ปุ่น)

3.1.8 ปิเปตอัตโนมัติ (Eppendrof pipette) ขนาด 50 ไมโครลิตร และปิเปตขนาดต่าง ๆ ที่ปรับปริมาตรได้ตามต้องการ

3.1.9 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า (Deep freezer)

3.1.10 เครื่องปั่นผสมไฟฟ้า (Vertex genie, Scientific Industries)

3.1.11 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (Corning, ion - analyzer 250)

3.1.12 กล่องรักษาความเย็น (Ice box)

3.1.13 Nephelometer (Bausch & Lomb.)

3.1.14 ตะเกียงบุนเซน (Bunsen)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการหาค่าฮีมาโตคริต

3.2.1 เครื่องอ่านค่าฮีมาโตคริต (Microhematocrit reader)

3.2.2 เครื่องปั่นหลอด Microcappillary tube
(Micro - hematocrit centrifuge, Sigma 201 M)

3.2.3 microhematocrit tube

3.3 เชื้อ *Lactobacillus casei*, ATCC. (American Type Culture Collection) No.7469 จาก American Type Collection , 2112 M Street, Washington, D.C.

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

4.1 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณโฟเลตในซีรัมและในเม็ดเลือดแดง

4.1.1 กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)
(A.R. ของ E. Merk ,Germany)

4.1.2 กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid)
(A.R. ของ E. Merk ,Germany)

4.1.3 น้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออน (Deionized double distilled water)

4.1.4 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4),
(E.Merck, D - 6100 armstadt, F. R. Germany, analytical grade)

4.1.5 Ethanol (Sigma Chemical Co.)

4.1.6 Folic Acid Casei Media (Difco, Detroit, USA)

4.1.7 Gardinol Type Detergents (Teepol)

4.1.8 Micro Inoculum Broth (Difco, Detroit, USA)

4.1.9 Pteroylglutamic acid No.F - 7876 (Sigma Chemical Co.)

4.1.10 Potassium dichromate (Sigma Chemical Co.)

4.1.11 Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($NaH_2PO_4.2H_2O$),
(May and Baker, analytical grade)

4.1.12 Sodium hydroxide (Sigma Chemical Co.)

5. ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

5.1 ขั้นตอนการสัมภาษณ์เพื่อคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง

5.1.1 ทำการสัมภาษณ์สตรีอาสาสมัครตามแบบสอบถามประเมินส่วนตัวและสุขภาพหลังจากการตรวจรักษาสุขภาพตามขั้นตอนของศูนย์ส่งเสริมสุขภาพเขต 4 ราชบุรี เรียบร้อยแล้ว โดยสตรีอาสาสมัครทุกคนจะต้องตอบแบบสอบถามเพื่อให้ได้ข้อมูลดังนี้

5.1.1.1 <u>ข้อมูลส่วนตัว</u> ได้แก่ ชื่อ อายุ ส่วนสูง น้ำหนัก เลขที่บัตรประจำตัวผู้ป่วย ที่อยู่ปัจจุบัน ภาวะการตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร และประวัติการรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิด ข้อมูลเหล่านี้ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้

5.1.1.2 <u>ข้อมูลด้านสุขภาพ</u> ผู้เข้าร่วมการวิจัยต้องมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว ไม่ได้รับการถ่ายเลือดหรือบริจาคเลือด (ถ้าได้รับการถ่ายเลือดหรือบริจาคเลือดต้องมีเวลานานกว่า 4 เดือน ก่อนเข้าสู่การวิจัย) และไม่อยู่ระหว่างการมีประจำเดือน ไม่สูบบุหรี่ ไม่ดื่มเครื่องดื่มมีแอลกอฮอล์ ไม่ได้รับการเสริมวิตามิน อาหารเสริม และยาใด ๆ โดยเฉพาะยาที่มีผลต่อระดับโฟเลตในร่างกาย เช่น ยาต้านชัก คอร์ติโคสเตียรอยด์ และต้องไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ เนื่องจากอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus casei*, ATCC. No.7469 ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโฟเลต

5.2 ขั้นตอนการสัมภาษณ์ข้อมูลด้านภาวะโภชนาการและข้อมูลด้านฐานะทางสังคมและการเงิน

5.2.1 <u>ข้อมูลด้านภาวะโภชนาการ</u> สัมภาษณ์ข้อมูลด้านพฤติกรรมการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงโดยเปรียบเทียบระหว่างพฤติกรรมการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงก่อนเข้าสู่การวิจัย (ระยะเวลาผ่านมาประมาณ 3 เดือน) กับพฤติกรรมการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงในช่วงเวลาที่ได้รับการสัมภาษณ์ประมาณ 1 สัปดาห์ อาหารที่มีปริมาณโฟเลตสูงที่สัมภาษณ์ ได้แก่ ตับ ผักใบเขียว นม ไข่ ผลไม้ (กล้วย ส้ม) เป็นต้น

พฤติกรรมการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูง แบ่งออกเป็น

1. บริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงในปริมาณสูงกว่าปกติก่อนเข้าสู่การวิจัยประมาณ 3 เดือน
2. บริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงในปริมาณปกติเหมือนก่อนเข้าสู่การวิจัยประมาณ 3 เดือน
3. บริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงในปริมาณต่ำกว่าปกติก่อนเข้าสู่การวิจัยประมาณ 3 เดือน
4. ไม่บริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูง

โดยให้คะแนนในแต่ละพฤติกรรมเป็น 3, 2, 1 และ 0 ตามลำดับ (รายละเอียดแบบประเมินพฤติกรรมการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงแสดงในภาคผนวก ก)

การคิดคะแนนจากพฤติกรรมการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงคำนวณจากจำนวนอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงที่สัมภาษณ์ทั้งหมด 5 ชนิด คูณกับคะแนนสูงสุดถ้ามีการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงในปริมาณสูงกว่าปกติคือ 3 คะแนน ได้คะแนนรวมสำหรับพฤติกรรมการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงเท่ากับ 15 คะแนน

ถ้าคะแนนของพฤติกรรมการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงของสตรีรายหนึ่งในการวิจัยมากกว่าหรือเท่ากับ 8 คะแนน ให้ถือว่าสตรีรายนี้มีการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงในปริมาณปานกลางถึงสูง แต่ถ้าคะแนนรวมของข้อมูลการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงน้อยกว่า 8 คะแนน ให้ถือว่ามีการบริโภคอาหารชนิดที่มีปริมาณโฟเลตสูงในปริมาณต่ำ

I20022189

5.2.2 ข้อมูลทางด้านฐานะทางสังคมและการเงิน ประเมินตามแบบสอบถามข้อมูลทางด้านฐานะสังคมได้แก่ ข้อมูลด้านการศึกษาและอาชีพ และข้อมูลด้านฐานะทางการเงินได้แก่ ข้อมูลด้านรายได้ของครอบครัวต่อเดือน (รายละเอียดแบบประเมินข้อมูลด้านฐานะทางสังคมและการเงินแสดงในภาคผนวก ก) เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาร่วมกับพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่มีปริมาณโฟเลตสูงในการประเมินความแตกต่างของปริมาณโฟเลตในซีรัมและในเม็ดเลือดแดงตามพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่มีปริมาณโฟเลตสูง

5.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณ Antecubital vein จากสตรีอาสาสมัครคนละ 5 มิลลิลิตร นำมาแบ่งเป็น 3 ส่วน เพื่อวิเคราะห์หาค่าฮีมาโตคริต ปริมาณโฟเลตในซีรัมและในเม็ดเลือดแดงดังนี้

5.3.1 ส่วนที่1 สำหรับการหาค่าฮีมาโตคริต ดูดเลือดปริมาณเล็กน้อยด้วยหลอด microcapillary tube ให้ได้ปริมาณเลือดไม่น้อยกว่าสามในสี่ส่วนของหลอด microcapillary tube แล้วปิดก้นปลายหลอดด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมันเพื่อป้องกันการรั่วของเลือดจากหลอด จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาค่าฮีมาโตคริต โดยดำเนินการตามข้อ 6.2

5.3.2 ส่วนที่ 2 สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโฟเลตในซีรัม นำเลือดประมาณ 3 - 4 มิลลิลิตร มาปั่นเพื่อแยกซีรัมด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที เก็บตัวอย่างซีรัมที่ได้นี้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์หาปริมาณโฟเลตในซีรัมโดยวิธีทางจุลชีววิทยา [51-55]

5.3.3 ส่วนที่ 3 สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโฟเลตในเม็ดเลือดแดง นำเลือดปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว (heparin 5,000 I.U. 1 หยดต่อปริมาตรเลือด 0.5 มิลลิลิตร) ปิเปตตัวอย่างเลือดปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดหรือขวดที่มีสารละลายร้อยละ 1 ของกรดแอสคอร์บิก (กรดแอสคอร์บิก 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร) จำนวน 4.9 มิลลิลิตร (ขณะนี้ได้สัดส่วนของการเจือจางเลือดเท่ากับ 1:50)

จากนั้นปิเปตเลือดที่เจือจาง 1:50 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายกรดแอสคอร์บิกใน phosphate buffer พีเอช 6.1 ปริมาณ 7.5 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของโฟเลตใน

ขณะนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที และป้องกันการสูญเสียประสิทธิภาพของเชื้อ *Lactobacillus casei,* ATCC. No.7569 (ขณะนี้ได้สารละลายเลือดเจือจาง 1:800) เก็บตัวอย่างเลือดที่เจือจางที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์หาปริมาณโฟเลตในเลือดทั้งหมด (whole blood) โดยวิธีทางจุลชีววิทยา แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณโฟเลตในเม็ดเลือดแดงต่อไป [51-52, 55]

6. การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

6.1 การทำความสะอาดเครื่องแก้วและฝาพลาสติก

6.1.1 <u>เครื่องแก้ว</u>

ต้มเครื่องแก้วในน้ำกลั่นที่มีน้ำยา Teepol 1 ช้อนโต๊ะต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร เป็นเวลาไม่น้อยกว่าครึ่งชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง (rinse) แล้วแช่ใน Cleansing solution อย่างน้อย 12 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออน นำไปอบแห้งในตู้อบแห้ง (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทก่อนใช้

6.1.2 <u>ฝาพลาสติก</u>

การทำความสะอาดฝาพลาสติก ต้มเหมือนเครื่องแก้วประมาณครึ่งชั่วโมง และล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออน นำไปอบแห้งในตู้อบแห้ง (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และนึ่งด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ก่อนใช้

6.2 การหาค่าฮีมาโตคริต

นำเลือดที่ได้จากข้อ 5.3.1 จำนวน 2 หลอดต่อตัวอย่างเลือดแต่ละรายไปปั่นด้วยเครื่องปั่นหลอด (micro - hematocrit centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที และอ่านค่าฮีมาโตคริตด้วยเครื่องอ่านค่าฮีมาโตคริต (micro-hematocrit reader)

ค่าของฮีมาโตคริตที่วัดได้เป็นร้อยละของปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เกาะกันแน่น (pack cell volume) ต่อปริมาตรเลือดทั้งหมดที่วิเคราะห์เมื่อปั่นในอัตราความเร็วและเวลาที่กำหนด โดยใช้ค่าเฉลี่ยของค่าฮีมาโตคริต ถ้าค่าฮีมาโตคริตที่ได้ทั้ง 2 หลอดมีความแตกต่างกันมากกว่าร้อยละ 2 ต้องทำการหาค่าฮีมาโตคริตซ้ำอีกครั้ง

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโฟเลตในซีรัมและเม็ดเลือดแดง

6.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Maintenance media)

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ Micro inoculum broth 18.5 กรัม ในน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออน (Deionized double distilled water) ปริมาณ 500 มิลลิลิตร โดยอุ่นเล็กน้อยพร้อมกวนเบา ๆ จนละลายหมดแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง ปิเปตส่วนที่กรองได้แบ่งใส่หลอดที่มีจุกเกลียว (Screw cap tube) หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อตรวจดูว่าอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องใสจึงไม่มีการปนเปื้อน จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.3.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 2 เท่า (Double strength Media)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโฟเลต โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อ Folic acid casei media 9.4 กรัม มาละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร อุ่นอาหารเลี้ยงเชื้อให้ละลายแล้วปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติมกรดแอสคอร์บิก 50 มิลลิกรัม เพื่อเป็นตัวรักษาความคงตัวของกรดโฟลิก คนให้ละลายแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง What man เบอร์ 1

6.3.3 การเตรียมสต๊อกคัลเจอร์ (Stock culture)

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei*, ATCC. No. 7469 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Micro inoculum broth และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ทุก 2 สัปดาห์ โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เติมเชื้อตั้งต้นจาก Liquid culture จากปลายปิเปตขนาด 0.50 มิลลิลิตร 1 หยด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ นำไปบ่ม

ในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.3.4 การเตรียมอินนอคคูลัม (Inoculum)

เตรียมในตอนบ่ายก่อนวันวิเคราะห์ 1 วัน โดยเติม Stock culture 1 หยด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง นำเชื้อที่บ่ม 18 ชั่วโมง นี้ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง

อินนอคคูลัมที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้เรียกว่า " L.C. " (*Lactobacillus casei*) เตรียมโดยเติมเชื้อที่บ่ม 6 ชั่วโมง ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้วิเคราะห์ 18 มิลลิลิตร

6.3.5 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.1

6.3.5.1 สารละลายกรด 0.2 M เตรียมโดยละลาย Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($NaH_2PO_4.2H_2O$) 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออนจนครบ 1 ลิตร

6.3.5.2 สารละลายด่าง 0.2 M เตรียมโดยละลาย Di–sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) 28.4 กรัม ในน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออนจนครบ 1 ลิตร

นำสารละลายข้อ 6.3.5.1 ปริมาณ 215.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ข้อ 6.3.5.2 ปริมาณ 37.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออนจนครบ 1 ลิตร สารละลายที่ได้นี้ควรมีพีเอช 6.1 สามารถเก็บสารละลายนี้ที่อุณหภูมิห้องไว้ใช้ได้นานกว่า 1 เดือน

6.3.6 การเตรียมสารละลายกรดโฟลิกมาตรฐาน

1. <u>การเตรียมสารละลายกรดโฟลิกมาตรฐาน</u> 1.0 x 10^{-5} กรัม/มิลลิลิตร

ชั่งกรดโฟลิกมาตรฐาน 100 มิลลิกรัม นำมาละลายในน้ำ 20 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติมสารละลาย NaOH 0.1 N ลงไปช้า ๆ จนได้สารละลายสีเหลืองใส ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ปราศจากไอออนให้เป็น 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายความเข้มข้น 1.0 x 10^{-3} กรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายนี้มา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอธานอลร้อยละ 20 ให้เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายความเข้มข้น 1.0 x 10^{-5} กรัม/มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดเล็ก ๆ หลอดละ 2 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. <u>การเตรียมสารละลายกรดโฟลิกมาตรฐาน</u> 1.0 x 10^{-9} กรัม/มิลลิลิตร และ 1.0 x 10^{-10} กรัม/มิลลิลิตร

นำสารละลายกรดโฟลิกมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 x 10^{-5} กรัม/มิลลิลิตร ที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยเติมน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออน ได้สารละลายมีความเข้มข้น 1.0 x 10^{-7} กรัม/มิลลิลิตร

สารละลายกรดโฟลิกความเข้มข้น 1.0 x 10^{-9} กรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยปิเปตสารละลายมีความเข้มข้น 1.0 x 10^{-7} กรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2 ครั้งปราศจากไอออนให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดโฟลิกความเข้มข้น 1.0 x 10^{-9} กรัม/มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายกรดโฟลิกความเข้มข้น 1.0 x 10^{-9} กรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลายกรดโฟลิกความเข้มข้น 1.0 x 10^{-10} กรัม/มิลลิลิตร

6.3.7 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีกรดแอสคอร์บิก

ละลายกรดแอสคอร์บิก 150 มิลลิกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6.1 (จากข้อ 6.3.5) โดยสารละลายนี้จะต้องเตรียมขึ้นใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์

6.3.8 การเตรียมสารละลายคลีนซิง (Cleansing solution)

ชั่งโพแทสเซียมไดโครเมต 10 กรัม ละลายในน้ำ 75 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร ลงช้า ๆ ผสมให้เข้ากัน

6.3.9 การวิเคราะห์ปริมาณโฟเลตในซีรัม

6.3.9.1 เตรียมขวดสำหรับวิเคราะห์สารละลายกรดโฟลิกมาตรฐาน โดยเขียนเรียงหมายเลขและเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยการเติมน้ำเติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1.0 x 10^{-9} กรัม/มิลลิลิตร และ1.0 x 10^{-10} กรัม/มิลลิลิตร ตามปริมาตรที่แสดงในตารางที่ 3 ขวดวิเคราะห์มาตรฐานนี้แต่ละขวดมีปริมาตรเท่ากับ 6 มิลลิลิตร

6.3.9.2 เขียนเรียงหมายเลขขวดที่ใช้วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างซีรัม และเติมน้ำตามปริมาตรดังแสดงในตารางที่ 4

6.3.9.3 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า (เตรียมได้จากข้อ 6.3.2) ลงในขวดวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างโดยใช้ไซริ้งค์อัตโนมัติ (automatic syringe) ขวดละ 3 มิลลิลิตร

6.3.9.4 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อของ Assay medium ลงในขวด L.C. 18 มิลลิลิตร เพื่อเป็นตัวเจือจางแบคทีเรีย

6.3.9.5 ปิดจุกขวดแล้วนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6.3.9.6 เติมอินนอคคูลัม 1 หยด ลงในขวด L.C. เขย่าให้เข้ากัน ดูดด้วยหลอดหยดแล้วเติมลงในขวดวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างทุก ๆ ขวด ขวดละ 1 หยด

6.3.9.7 เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 40-48 ชั่วโมง

6.3.9.8 อ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในหลอดหรือวัดความขุ่น (turbidity) โดยแสดงเป็นค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 655 นาโนเมตร

6.3.9.9 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดโฟลิก (พิโคกรัม/มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในหลอดวิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง (absorbance) แล้วหาความเข้มข้นของปริมาณโฟเลตในซีรัมจากตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ดังแสดงในรูปที่ 15 จากนั้นคำนวณหาปริมาณโฟเลตจากตัวอย่างซีรัมดังนี้

ปริมาณโฟเลตในซีรัม = ปริมาณโฟเลตจากกราฟมาตรฐาน x 0.12 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

(ที่มาของสูตรการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข.)

6.3.10 การวิเคราะห์ปริมาณโฟเลตในเม็ดเลือดแดง

ใช้วิธีการเดียวกันกับวิธีวิเคราะห์ปริมาณโฟเลตในซีรัม แต่เขียนเรียงหมายเลขขวดที่ใช้วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างเลือด และเติมน้ำตามปริมาตรที่แสดงในตารางที่ 5 โดยปริมาตรเลือดนี้ได้จากการปิเปตสารละลายเจือจางเลือด 1 : 800 จากตัวอย่างเลือดที่เจาะไว้ในข้อ 6.2.3 และคำนวณหาปริมาณโฟเลตในเซลล์เม็ดเลือดดังนี้ (แสดงที่มาของสูตรการคำนวณในภาคผนวก ข.)

ปริมาณโฟเลตในเซลล์เม็ดเลือดแดง (นาโนกรัม/มิลลิลิตร) =

$$\frac{\text{ปริมาณโฟเลตในเลือดทั้งหมด (whole blood folate)}-(\text{ค่าฮีมาโตคริต}/100)\times\text{ปริมาณโฟเลตในซีรัม}}{\text{ค่าฮีมาโตคริต}/100}$$

(ปริมาณโฟเลตในเลือดทั้งหมด (whole blood folate) = ปริมาณโฟเลตจากกราฟมาตรฐาน x 9.6 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)

ตารางที่ 3 ปริมาตรสารละลายในขวดวิเคราะห์มาตรฐาน [51-55]

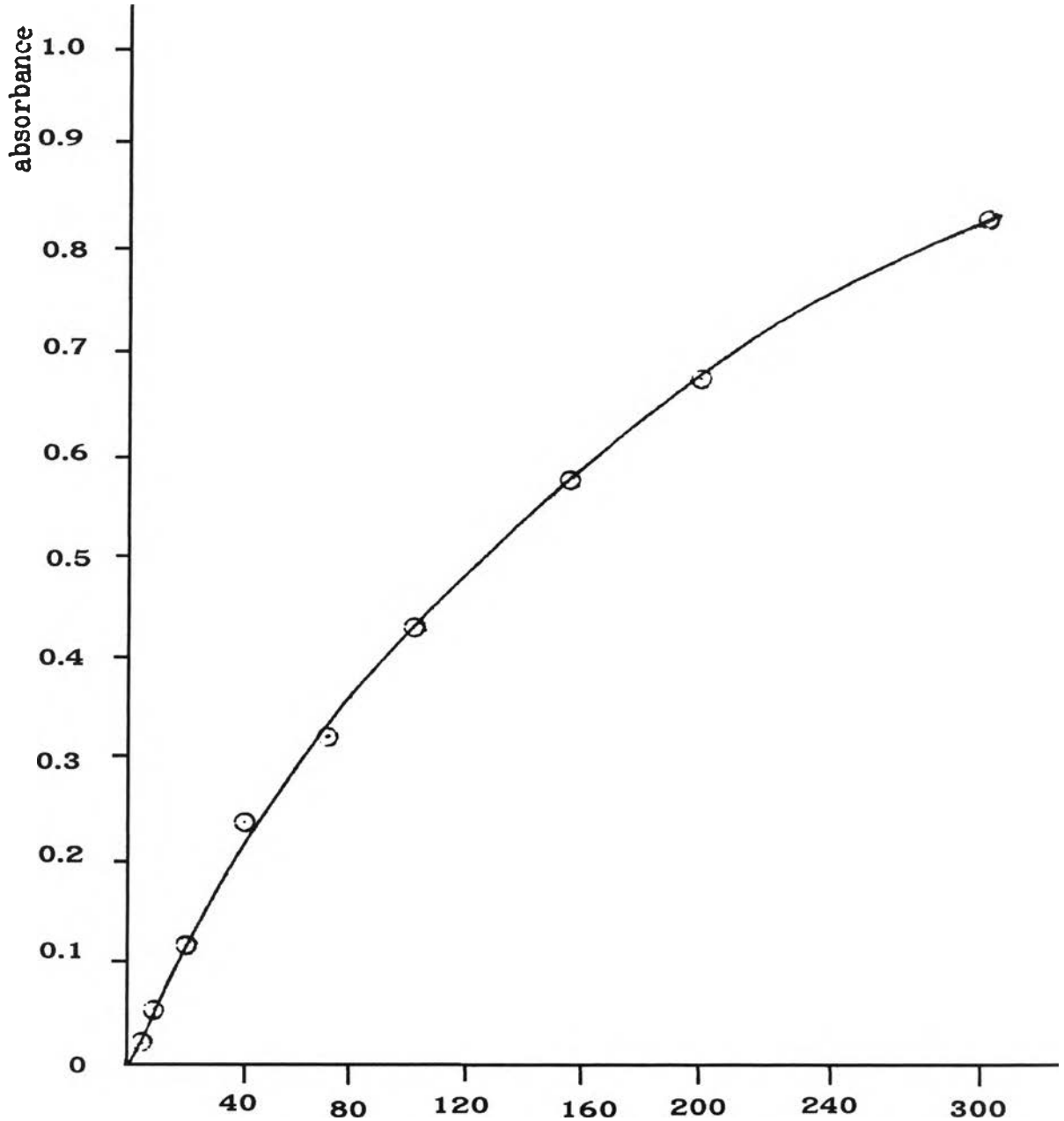
หมายเลข	จำนวนขวด	ความเข้มข้นสุดท้าย (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกรดโฟลิกมาตรฐาน (มิลลิลิตร)		ปริมาตรน้ำ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)
			1.0×10^{-10} (กรัม/มิลลิลิตร)	1.0×10^{-9} (กรัม/มิลลิลิตร)		
ควบคุม	1	0	-	-	3.00	3.00
0	2	0	-	-	3.00	3.00
1	2	5	0.30		2.70	3.00
2	2	10	0.60		2.40	3.00
3	2	20	1.20		1.80	3.00
4	2	40	2.40		0.60	3.00
5	2	70	0.20	0.40	2.40	3.00
6	2	100	-	0.60	2.40	3.00
7	2	150	-	0.90	2.10	3.00
8	2	200	-	1.20	1.80	3.00
9	2	300	-	1.80	1.20	3.00

ตารางที่ 4 ปริมาตรสารละลายตัวอย่างในขวดวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัม [51-53]

หมายเลข	จำนวนขวด	ปริมาตรซีรัม	ปริมาตรน้ำ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรรวมในขวดวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)
1	2	0.05	2.95	3.00	6.00
2	2	0.05	2.95	3.00	6.00
3	2	0.05	2.95	3.00	6.00
4	2	0.05	2.95	3.00	6.00
5	2	0.05	2.95	3.00	6.00
6	2	0.05	2.95	3.00	6.00
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.

ตารางที่ 5 ปริมาตรสารละลายในขวดวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด (เม็ดเลือดแดง) [51-52, 55]

หมายเลข	จำนวนขวด	ปริมาตรเลือด (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรรวมในขวดวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)
1	2	0.50	2.50	3.00	6.00
2	2	0.50	2.50	3.00	6.00
3	2	0.50	2.50	3.00	6.00
4	2	0.50	2.50	3.00	6.00
5	2	0.50	2.50	3.00	6.00
6	2	0.50	2.50	3.00	6.00
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.



ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานของกรดโฟลิก

7. **การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ** ใช้โปรแกรม SPSS for Windows 10.0 Version. [55] ดังนี้

7.1 การตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูล ได้แก่

7.1.1 การตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลใช้สถิติทดสอบ Shapiro-Wilk Test

7.1.2 การตรวจสอบความแปรปรวนของข้อมูลใช้สถิติทดสอบ Levene's Test

ข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์ทางสถิติที่เป็นพารามิเตอร์ต้องมีการกระจายแบบปกติและมีความแปรปรวนไม่แตกต่างกันจึงสามารถนำมาวิเคราะห์ทางสถิติได้อย่างถูกต้อง

7.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ 2 ทางหรือ 2 ปัจจัยใช้สถิติ 2-WAY Analysis of Variance (2-WAY ANOVA)

7.3 การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณโฟเลตในซีรัมและเม็ดเลือดแดงใช้สถิติ Least–Significant Different (LSD) ในการเปรียบเทียบเชิงซ้อน (Multiple comparison) โดยมีเงื่อนไขว่าความแปรปรวนของข้อมูลทุกกลุ่มต้องเท่ากัน

7.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโฟเลตในซีรัมกับปริมาณโฟเลตในเม็ดเลือดแดงและความสัมพันธ์ระหว่างค่าฮีมาโตคริตกับปริมาณโฟเลตในซีรัมและในเม็ดเลือดแดงโดยสถิติ Pearson correlation

7.5 การเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณโฟเลตในซีรัมและในเม็ดเลือดแดงตามภาวะโลหิตจางหรือปกติ โดยสถิติ Independent sample T- test

7.6 การเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณโฟเลตในซีรัมและในเม็ดเลือดแดงตามพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่มีปริมาณโฟเลตสูง โดยสถิติ Independent sample T- test