

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัยและวัสดุอุปกรณ์

ส่วนที่ 1 การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation) ความเข้มข้นของ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะตัวอย่าง

วัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจระดับ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะ โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

สารเคมี

ชื่อสาร	บริษัท
- 1-Hydroxypyrene	Dr.Ehrenstorfor GmbH, Germany
- Acetonitrile HPLC grade	MERCK, Germany
- Methyl alcohol HPLC grade	MERCK, Germany
- Hydrochloric acid	Sigma Chemical Co, USA
- Double distill water	Elga
- Sodium acetate anhydrous	Fluka
- Anthracene	Sigma Chemical Co, USA
- Beta-glucuronidase	Sigma Chemical Co, USA

เครื่องมือและอุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์	บริษัท
- Vortex-2-Genic	Scientific Industries, Inc., USA
- Autopipette Pipetman P5000, P1000, P200, P20 µl	Gilson Meacal Electronic, France
- เครื่องชั่งสารสำหรับการวิเคราะห์	Sartorius AG, Germany
- Centrifuge รุ่น Rotanta 460 R	Hettich zentrifugen, Germany
- pH meter รุ่น CG 842 Schott	Schott Gerate GmbH, Germany
- เครื่องทำน้ำกลั่นบริสุทธิ์	Elga
- เครื่องสกัดสาร SPE Manifold	J&W Scientific Incorporated
- Supelclean LC-18	Supelco

- Speed vacuum รุ่น SS22	Savant
- Angle centrifuge 4235 A	Biosystem
- Cavitator ultrasonic cleaner	Mettler electronics, USA
- Waterbath	Memmert GmbH, Germany
- อุปกรณ์ในการกรองสารละลาย	Sigma Chemical Co, USA
- Vacuum pump	Gast manufacturing

เครื่องมือ HPLC ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย

ชื่ออุปกรณ์	บริษัท
- SCL-10A VP System controller	Shimadzu
- LC-10AD VP Liquid chromatography	Shimadzu
- DGU-12A Degasser	Shimadzu
- RF-10A XL Fluorescence detector	Shimadzu
- SIL-10AD VP Auto injector	Shimadzu
- CTO-10A VP Column oven	Shimadzu
- Computer และ Software program Shimadzu Class-VP Version 6.12 SP1	Shimadzu
- Printer รุ่น hp LaserJet 1200 series	Hewlett packard
- Analytical column ได้แก่ Inertsil ODS-3 แบบเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 4.6x250 mm บรรจุด้วยซิลิกา C ₁₈ ขนาด 5 µm ของ GL Sciences Inc., Japan	
- Guard column แบบเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 4.0x10 mm บรรจุด้วยซิลิกา C ₁₈ ขนาด 5 µm ของ GL Sciences Inc., Japan	

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะ

1. การเก็บตัวอย่างปัสสาวะที่ปราศจาก 1-hydroxypyrene

นำปัสสาวะจากอาสาสมัครสุขภาพปกติซึ่งไม่ได้รับควันพิษจากแหล่งต่างๆ เช่น ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ ควันจากโรงงานอุตสาหกรรม ควันจากการเผาหญ้า ฟาง ฟืน ถ่าน และไม่รับประทานอาหารประเภทแป้ง อย่าง ทอด รมควัน อย่างน้อย 3 วันก่อนการเก็บปัสสาวะ ทำการเก็บปัสสาวะในภาชนะที่ปิดมิดชิด ป้องกันไม่ให้โดนแสง และเก็บปัสสาวะที่อุณหภูมิ -20 °C

2. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะตัวอย่าง โดยวิธี HPLC

2.1 การเตรียม standard solution ของ 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 ng/ml โดยปิเปต 1-hydroxypyrene จากความเข้มข้น 10,000 ng/ml มา 0.8 ml เติม acetonitrile จนได้ปริมาตร 5 ml จะได้ 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 1,600 ng/ml ใช้เป็น stock solution จากนั้นเตรียม 1-hydroxypyrene ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น ด้วยการทำ serial dilution ดังนี้

2.1.1 ปิเปต stock solution ของ 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 1,600 ng/ml 50 μ l เติม acetonitrile ให้ครบ 100 μ l จะได้ 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 800 ng/ml

2.1.2 ปิเปตสารละลายในข้อ 2.1.1 50 μ l เติม acetonitrile 50 μ l จะได้ 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 400 ng/ml

2.1.3 ปิเปตสารละลายในข้อ 2.1.2 50 μ l เติม acetonitrile 50 μ l จะได้ 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 200 ng/ml

2.1.4 ปิเปตสารละลายในข้อ 2.1.3 50 μ l เติม acetonitrile 50 μ l จะได้ 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 100 ng/ml

2.1.5 ปิเปตสารละลายในข้อ 2.1.4 50 μ l เติม acetonitrile 50 μ l จะได้ 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 50 ng/ml

2.1.6 ปิเปตสารละลายในข้อ 2.1.5 50 μ l เติม acetonitrile 50 μ l จะได้ 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 25 ng/ml

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

นำปัสสาวะปริมาณ 5 ml มาดูดปัสสาวะออก 10 μ l เติมสารละลายมาตรฐานของ 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 1,600, 800, 400, 200, 100, 50 และ 25 ng/ml อย่างละ 10 μ l ใส่ลงในปัสสาวะ จะได้ปัสสาวะที่มี 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 ng/ml ตามลำดับ

2.3 การเตรียมสารละลาย anthracene ความเข้มข้น 2.72 μ g/ml เพื่อใช้เป็น internal standard

ซึ่ง anthracene 0.0136 g เติม acetonitrile ให้ครบ 10 ml จะได้ stock solution ของ anthracene ความเข้มข้น 1,361.5 $\mu\text{g/ml}$

นำ stock solution ของสารละลาย anthracene 10 μl เติมลงในบัลลูนที่มีสารละลายมาตรฐานของ 1-hydroxypyrene จะได้สารละลาย anthracene ความเข้มข้น 2.72 $\mu\text{g/ml}$

3. การเตรียมบัลลูนตัวอย่างให้พร้อมสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้วิธีการสกัดผ่านคอลัมน์ การเตรียมบัลลูนตัวอย่าง

3.1 นำบัลลูนที่เตรียมไว้ข้างต้น 5 ml ผสมกับ sodium acetate 0.2 M (pH 5.0) 5 ml ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer

3.2 เติมเอนไซม์ β -glucuronidase 25 μl

3.3 นำบัลลูนไป incubate ใน water bath ประมาณ 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C

3.4 ตั้งบัลลูนทิ้งไว้ให้เย็น

3.5 นำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที

การสกัด 1-hydroxypyrene จากบัลลูน

3.6 นำ acetonitrile 2.5 ml กรองผ่านคอลัมน์ ซึ่งต่ออยู่กับ vacuum pump

3.7 ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น 10 μl

3.8 นำสารละลายส่วนใสจากตัวอย่างบัลลูน 10 ml กรองผ่านคอลัมน์โดยใช้ flow rate 2.5 ml/min

3.9 ล้างคอลัมน์ด้วย 1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) 5 ml

3.10 สกัด 1-hydroxypyrene ด้วย acetonitrile 2 ml

3.11 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง speed vacuum

3.12 reconstitute สารด้วย acetonitrile 1 ml

3.12 นำสารละลายที่สกัดได้ 10 μl ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Mobile phase	:	acetonitrile : H ₂ O (65:35)
Flow rate	:	1.0 ml/min
Column	:	ODS-C18
Detector	:	Fluorescence ; excitation 270 nm, emission 387 nm
Injection volume	:	10 μl

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation) ความเข้มข้นของ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะตัวอย่าง

1. การประเมินความเข้มข้นต่ำสุดของ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะตัวอย่าง (Lower Limit of Quantitation) ที่วิธีการวิเคราะห์สามารถตรวจวัดได้

เตรียม 1-hydroxypyrene ที่ความเข้มข้นระดับต่ำอย่างละ 5 หลอดการทดลองจำนวน 3 ความเข้มข้น และหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยวิธีการวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวัดความเข้มข้นนั้นต้องมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%Coefficient of Variation, %CV) ไม่เกิน 20%

2. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

เตรียม 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 0.05, 0.2 และ 1.6 ng/ml ความเข้มข้นละ 5 หลอดการทดลอง นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารดังกล่าวในปัสสาวะ นำค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน เปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นจริงของ 1-hydroxypyrene โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ ค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ควรเบี่ยงเบนได้ไม่เกิน 15% จากความเข้มข้นจริง

$$\text{Accuracy} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของสารจริง}} \times 100 \%$$

3. การคืนกลับ (Recovery)

เตรียม 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 0.05, 0.2 และ 1.6 ng/ml ในปัสสาวะ สกัดผ่านคอลัมน์ กับเตรียม 1-hydroxypyrene ใน mobile phase ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยไม่ต้องผ่านการสกัด ความเข้มข้นละ 5 หลอดการทดลอง นำ peak area ratio (PAR) ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างปัสสาวะเปรียบเทียบกับ PAR ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างใน mobile phase

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{PAR ของสารที่ได้จากการวิเคราะห์โดยผ่านการสกัด} \times 100}{\text{PAR ของสารที่ได้จากการวิเคราะห์ใน mobile phase โดยไม่ผ่านการสกัด}}$$

3. ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision) แบ่งเป็น

3.1 Intraday precision เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะในวันเดียวกัน โดยเตรียม 1-hydroxypyrene ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.2 และ 1.6 ng/ml ความเข้มข้นละ 5 หลอดการทดลอง นำความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%Coefficient of Variation, %CV) ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 15%

3.2 Interday precision เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะต่างวันกัน โดยเตรียมการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ทำการวิเคราะห์ต่างวันกันเป็นเวลา 5 วัน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%Coefficient of Variation, %CV) ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 15%

4. ความจำเพาะของการวิเคราะห์ (Specificity)

เป็นการวิเคราะห์ retention time ของ 1-hydroxypyrene ที่เตรียมในปัสสาวะ แสดงในรูปแบบ Chromatogram เปรียบเทียบกับ blank urine ว่ามี peak อื่นมารบกวนหรือไม่

5. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความเป็นเส้นตรงเป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ได้ peak ของสารมาตรฐานกับ internal standard แสดงเป็นค่า coefficient of determination (R^2) โดยเตรียมปัสสาวะที่มี 1-hydroxypyrene ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 และ 3.2 ng/ml นำค่า peak area ratio ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน

ส่วนที่ 2 การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation) ความเข้มข้นของ creatinine ในปัสสาวะตัวอย่าง

วัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการหาระดับ creatinine ในปัสสาวะในการใช้เทียบเป็นหน่วยของระดับ 1- hydroxypyrene / mol creatinine

สารเคมี

ชื่อ	บริษัท
1. Creatinine anhydrous	Sigma Chemical Co, USA
2. Picric acid-saturated solution, 1.3%	Sigma Chemical Co, USA
3. Sodium hydroxide	Fluka

เครื่องมือ

ชื่อ
เครื่อง Spectrophotometer รุ่น V-530 UV/VIS

บริษัท
Jasco Corporation, Japan

วิธีการทดลอง

ดัดแปลงมาจากการทดลองของ Lusgarten, J. A. และ Wenk, R. E. (1972)

1. ผสมน้ำยา alkaline picrate โดยใช้ 0.5 M NaOH และ saturated picric acid ผสมกันในอัตราส่วน 1:1
2. เตรียมหลอดขนาด 12 x 75 mm (cuvette) 2 หลอด [Standard:S , Test:T]
3. เติม alkaline picrate หลอดละ 2 ml
4. ใช้ air blank ปรับ zero ที่ 515 nm
5. ใช้ปิเปตดูดปัสสาวะ หรือสารละลายมาตรฐาน creatinine 100 μ l ใส่ลงในหลอด T หรือ S (ทำครั้งละ 1 หลอด)
6. ผสมทันทีโดยใช้ cyclomixer
7. ภายหลัง 20 วินาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงครั้งแรก (A_1)
8. ต่อจากนั้นอีก 60 วินาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงครั้งหลัง (A_2)
9. หาค่าแตกต่างของ A_1 และ A_2 (ΔA) ของหลอด T และ S แล้วนำไปคำนวณ

หมายเหตุ ปัสสาวะ หรือ สารละลายมาตรฐาน จะเติมเมื่อพร้อมที่จะทำการวัด (ภายหลังจากการปรับ zero)

วิธีคำนวณ

$$\Delta A = A_2 - A_1$$

$$\text{ครีเอตินีน (mg/dl)} = \frac{\Delta A_T}{\Delta A_S} \times C_S$$

เมื่อ ΔA_T คือ ความแตกต่างของการดูดกลืนแสงครั้งแรกและครั้งหลังของสารทดลอง

ΔA_S คือ ความแตกต่างของการดูดกลืนแสงครั้งแรกและครั้งหลังของสารละลาย

มาตรฐาน

C_S คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน creatinine 5 mg/dl

การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation) ความเข้มข้นของ creatinine ในปัสสาวะตัวอย่าง

1. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

เตรียม creatinine ความเข้มข้น 10, 20 และ 80 mg/dl ความเข้มข้นละ 5 หลอดการทดลอง นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารดังกล่าวในปัสสาวะ นำค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน เปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นจริงของ creatinine โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ ค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ควรเบี่ยงเบนได้ไม่เกิน 15% จากความเข้มข้นจริง

$$\text{Accuracy} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของสารจริง}} \times 100 \quad \%$$

2. ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision) แบ่งเป็น

2.1 Intraday precision เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ creatinine ในปัสสาวะในวันเดียวกัน โดยเตรียม creatinine ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 80 mg/dl ความเข้มข้นละ 5 หลอดการทดลอง นำความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%Coefficient of Variation, %CV) ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 15%

2.2 Interday precision เป็นการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ creatinine ในปัสสาวะต่างวันกัน โดยเตรียมการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ทำการวิเคราะห์ต่างวันกันเป็นเวลา 5 วัน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%Coefficient of Variation, %CV) ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 15%

3. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความเป็นเส้นตรงเป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น creatinine ในปัสสาวะกับค่าผลต่างของการดูดกลืนแสง แสดงเป็นค่า coefficient of determination (R^2) โดยเตรียมปัสสาวะที่มี creatinine ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, และ 80 mg/dl นำค่าผลต่างของการดูดกลืนแสงที่วิเคราะห์ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน

ส่วนที่ 3 การศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง

วัตถุประสงค์ เพื่อหาระดับ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะในกลุ่มตัวอย่างที่มีโอกาสหรือความเสี่ยงต่อการได้รับสาร PAHs จากควันท่อไอเสียรถยนต์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีโอกาสได้รับสารดังกล่าวน้อยกว่า

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาทดลองในกลุ่มตัวอย่าง

1. เข็มเบอร์ 21 และกระบอกฉีดยาขนาด 5 ml
2. สำลี
3. แอลกอฮอล์
4. ถุงมือ
5. เครื่องมือวัดความดันโลหิต
6. หลอดพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่างเลือด
7. vacutainer สำหรับใส่ซีรัม
8. ถ้วยเก็บปัสสาวะ
9. อลูมิเนียมฟอยล์

วิธีการทดลอง

การคิดจำนวนตัวอย่างโดยการคำนวณจากสูตร (ภาคผนวก ง)

ประชากรตัวอย่างคำนวณจากสูตร $2(Z_\alpha + Z_\beta)^2 \sigma^2 / (X_1 - X_2)$

เมื่อ X_1 เป็นค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 1

X_2 เป็นค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 2

σ^2 = pooled variance

$$= \frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$n_1 + n_2 - 2$$

กำหนดค่า $\alpha = 0.05$; $Z_\alpha = 1.96$

$\beta = 0.10$; $Z_\beta = 1.28$

คำนวณกลุ่มตัวอย่างได้กลุ่มละประมาณ 43 คน

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

1. เพศหญิง อายุระหว่าง 20-47 ปี
2. กลุ่มทดลอง เป็นกลุ่มที่มีโอกาสหรือความเสี่ยง ต่อการได้รับสาร PAHs จากควันท่อไอเสียรถยนต์ 1 ปีขึ้นไป ตัวอย่างกลุ่มนี้ เป็นพนักงานเก็บค่าโดยสาร รถประจำทางไม่ปรับอากาศ ขององค์การขนส่งมวลชนกรุงเทพ ทำงานมาเป็นเวลานาน 1 ปีขึ้นไป
3. กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่มีโอกาสหรือความเสี่ยง ต่อการได้รับสาร PAHs จากควันท่อไอเสียรถยนต์น้อยกว่ากลุ่มทดลอง ตัวอย่างกลุ่มนี้ เป็นชาวบ้าน ตำบลช่องแค อำเภอตาคลี จังหวัดนครสวรรค์ อยู่ในเขตชนบทหรือชานเมือง ห่างไกลจากการจราจรแออัด ไม่ได้รับควันจากท่อไอเสียรถยนต์เป็นเวลานาน 1 ปีขึ้นไป มีอาชีพแม่บ้าน ทำนา ทำสวน เป็นต้น
4. มีสุขภาพปกติ ไม่เป็นโรคเกี่ยวกับตับและไต
5. ไม่สูบบุหรี่ และคนรอบข้างไม่สูบบุหรี่ หรือมีโอกาสน้อยมากต่อการได้รับควันบุหรี่
6. ไม่ดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์
7. ไม่รับประทานอาหารประเภทปิ้งย่าง ทอด ร่มควัน อาหารที่ไหม้เกรียม เป็นประจำทุกวันหรือค่อนข้างบ่อย
8. ไม่มีรอบเดือนในวันที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

1. เป็นผู้ที่ได้รับหรือไม่ได้รับควันจากท่อไอเสียรถยนต์น้อยกว่า 1 ปี
2. มีผลการตรวจการทำงานของตับหรือไต เกินค่าที่กำหนด
3. สูบบุหรี่ หรือมีความเสี่ยงสูงต่อการได้รับควันบุหรี่ในปริมาณมาก
4. ดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์
5. รับประทานอาหารประเภทปิ้งย่าง ทอด ร่มควัน อาหารที่ไหม้เกรียม เป็นประจำทุกวันหรือค่อนข้างบ่อย
6. มีรอบเดือนในวันที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ

วิธีการทดลอง

1. ชักประวัติตามแบบสอบถามที่กำหนด (แสดงในภาคผนวก ก)
2. คัดเลือกอาสาสมัคร และชี้แจงรายละเอียดและขั้นตอนการวิจัย
3. ให้เซ็นติบายนยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (แสดงในภาคผนวก ค)

4. สำหรับผู้ที่ผ่านการคัดเลือกตามแบบสอบถาม จะได้รับการเจาะเลือด 5 ml และเก็บปัสสาวะ ปริมาณ 60 ml
5. ปั่นแยกซีรัมเพื่อนำไปส่งตรวจการทำงานของตับและไต โดยตรวจวัดระดับสารชีวเคมีในเลือด ได้แก่ BUN, Creatinine, Total bilirubin, SGOT, SGPT, Albumin และ Alkaline phosphatase ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
6. นำปัสสาวะที่เก็บได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ 1-hydroxypyrene และ creatinine โดยวิธี HPLC และวิธี Spectrophotometry ตามลำดับ ที่ได้พัฒนาและทำการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์แล้ว

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ชักประวัติตามแบบสอบถาม
2. บันทึกผลการตรวจการทำงานของตับ ไต ระดับ 1-hydroxypyrene และ creatinine ในปัสสาวะ ลงในแบบฟอร์มที่กำหนด (แสดงในภาคผนวก ข)
3. คำนวณหาระดับ 1-hydroxypyrene / mol creatinine ในปัสสาวะพร้อมทั้งบันทึกผลในแบบฟอร์มที่กำหนด (แสดงในภาคผนวก ข)

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะ ได้แก่ การหาความเข้มข้นต่ำสุดของ 1-hydroxypyrene ในปัสสาวะตัวอย่าง การหาความถูกต้อง ความเที่ยงตรง ความจำเพาะ และความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์
2. วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม โดยแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) และช่วงของค่าต่างๆ (range)
3. วิเคราะห์ความแตกต่างของค่า 1-hydroxypyrene / mol creatinine ระหว่างกลุ่ม โดยใช้สถิติ unpair student's t-test ในโปรแกรม SPSS ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ แสดงข้อมูลของค่า 1-hydroxypyrene / mol creatinine รายงานผลเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD)