บทที่ 2

วิธีการวิจัย

การกำหนดเขตศึกษา

ทำการสำรวจการจราจรในพื้นที่เขตเทศบาลนครเชียงใหม่เพื่อศึกษาความหนาแน่นของการจราจรว่ามีมากน้อยเพียงไร เพื่อนำมากำหนดเป็นเขตควบคุมและเขตศึกษา

เขตควบคุม คือเขตที่มีการจราจรเบาบางกว่าเขตศึกษา และมีประชากรอยู่อาศัยเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมงต่อวัน ลักษณะความเป็นอยู่ของประชากรในเขตควบคุมมีความคล้ายคลึงกับประชากรเขตศึกษา โดยเขตศึกษากับเขตควบคุมมีลักษณะแตกต่างกันที่ความหนาแน่นของการจราจรเท่านั้น

เขตศึกษา คือเขตที่มีการจราจรคับคั่ง และมีประชากรอยู่อาศัยเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมงต่อวันเช่นเดียวกับเขตควบคุม

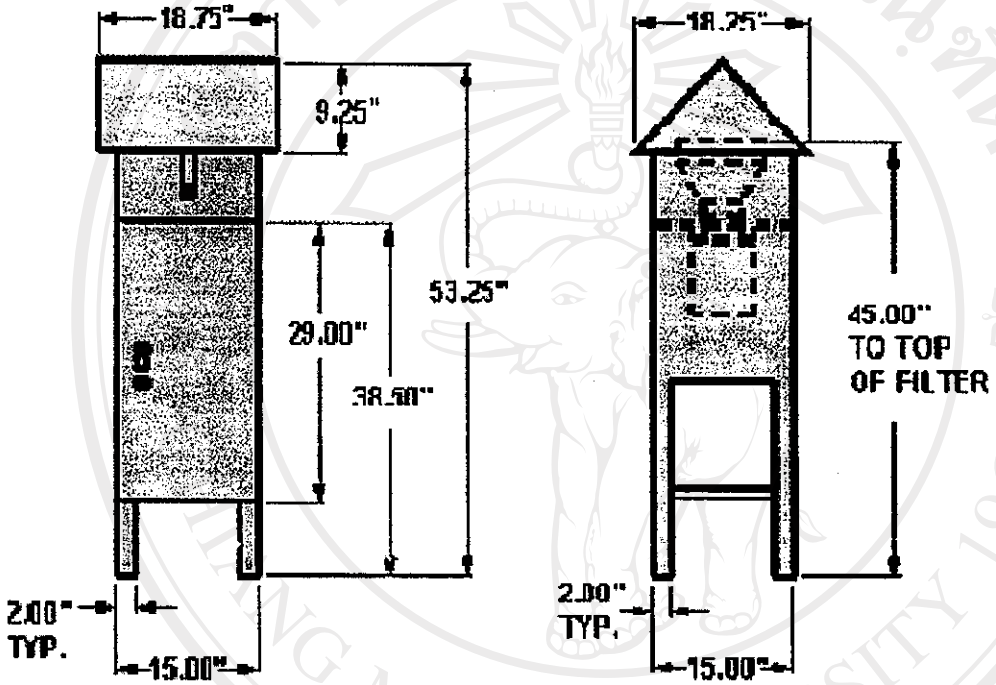
การสำรวจความหนาแน่นของการจราจรว่ามีมากน้อยเพียงใดทำโดยการนับจำนวนรถยนต์ที่แล่นผ่านไปมาบริเวณเขตควบคุมและเขตศึกษา รวมทั้งรถมอเตอร์ไซค์และรถยนต์ที่แล่นผ่านไปมามีทั้งรถ 3 ล้อ 4 ล้อ และ 6 ล้อขึ้นไป การนับนับติดต่อกันเป็นเวลา 1 อาทิตย์ทุกวัน ๆ ละ 1 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 11.00 – 12.00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีการจราจรปกติ โดยหลีกเลี่ยงช่วงเร่งรีบซึ่งมีการจราจรหนาแน่นผิดปกติในแต่ละเขต ทั้งนี้ได้กำหนดเขตควบคุมคือบริเวณตลาดหางดง อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ และเขตศึกษาคือบริเวณตลาดวโรรส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

การเก็บตัวอย่างอากาศ

เก็บตัวอย่างอากาศโดยใช้ high volume air sampler (รูปที่ 2) ซึ่งมี filter ชนิด glass fiber โดยใช้เครื่องเก็บอากาศ 2 เครื่อง ตั้งในแต่ละเขต ให้เครื่องเก็บอากาศอยู่ในบริเวณที่โล่งแจ้งห่างจากชายคา 3 เมตร เก็บตัวอย่างอากาศเป็นเวลาติดต่อกัน 24 ชั่วโมง 1 วัน (วันจันทร์) ต่อสัปดาห์ ทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 ของเดือนธันวาคม 2545 ถึง สัปดาห์ที่ 2 ของเดือนเมษายน 2546 โดยเก็บอากาศเว้นสัปดาห์ในแต่ละเขตเนื่องจากมีเครื่องเก็บอากาศ 2 เครื่อง ทำให้ไม่สามารถเก็บทั้ง 2 เขตได้ในวันเดียวกัน บริเวณตั้งเครื่องในแต่ละเขต มีรายละเอียดดังนี้

เขตควบคุม : บริเวณตลาดหางดง อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ จุดตั้งเครื่องที่ 1 เป็นบริเวณทางเท้าหน้าร้านหมอกานดา (รูปที่ 3) เป็นบริเวณที่โล่งห่างจากชายคา 3 เมตร บริเวณพื้นใกล้เคียง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2 ลักษณะและขนาดของ high volume air sampler (Graseby/GMWL-2000) ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างอากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 3 การตั้งเครื่องเก็บอากาศจุดที่ 1 บริเวณตลาดหางดงซึ่งเป็นเขตควบคุมของงานวิจัยนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นพื้นดิน จุดตั้งเครื่องที่ 2 เป็นบริเวณทางเท้าหน้าป้อมตำรวจหางดง (รูปที่ 4) เป็นบริเวณที่ห่างจากชายคา 3 เมตร แต่ใกล้เสาไฟฟ้า บริเวณที่ตั้งเครื่องเก็บอากาศเป็นพื้นซีเมนต์

เขตศึกษา : บริเวณตลาดวโรรส อ.เมือง จ.เชียงใหม่ จุดตั้งเครื่องที่ 1 ณ บริเวณทางเท้า ริมแม่น้ำปิงใกล้ป้อมตำรวจจราจร (รูปที่ 5) ซึ่งเป็นบริเวณที่โล่งห่างจากชายคา 3 เมตร และเป็นบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่น การเคลื่อนตัวของรถไปตามถนนช้ามาก จุดตั้งเครื่องที่ 2 เป็นบริเวณทางเท้า ฝั่งตรงข้ามริมแม่น้ำปิงใกล้ป้อมตำรวจ (รูปที่ 6) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการจราจรคับคั่ง และมีผู้คนเดินทางสัญจรผ่านไปมาตลอดทั้งวัน มีการขายสินค้าที่บริเวณทางเท้า และเป็นบริเวณที่ใกล้กับท่ารถเดินทางไปต่างอำเภอ

ก่อนการเก็บตัวอย่างอากาศทำการชั่งแผ่นกรองเปล่าโดยใช้เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่งในห้องที่มีเครื่องปรับอากาศควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 25 องศาเซลเซียส หลังจากชั่งแผ่นกรองเสร็จเก็บแผ่นกรองโดยใช้แผ่นอะลูมิเนียมฟลอยด์ห่อหุ้มก่อนนำไปใช้กับเครื่องเก็บอากาศ และเมื่อเก็บอากาศครบ 24 ชั่วโมงแล้วนำกระดาษกรองห่อหุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟลอยด์ก่อนเก็บในตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการชั่งน้ำหนัก เสร็จแล้วเก็บแผ่นกรองด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟลอยด์อีกครั้ง ก่อนนำไปสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักตะกั่วและแคดเมียมต่อไป

การวิเคราะห์ตะกั่วและแคดเมียมในตัวอย่างอากาศ

ใช้เครื่องวิเคราะห์ธาตุ graphite furnace atomic absorption spectrometer (GFAAS) แบบ Zeeman background correction (Zeeman GFAAS) รุ่น Varian® SpectraA800Z พร้อมทั้ง GTA-100 graphite tube atomizer และ autosampler โดยมี SpectraAA soft-ware ควบคุมร่วมกับ soft-ware OS/2 ผ่านระบบคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์และเก็บข้อมูล ติดตั้ง hollow cathode lamp (Varian, Australia) ในเครื่องสำหรับการวิเคราะห์ตะกั่วหรือแคดเมียม ภายในหลอดไฟ hollow cathode บรรจุก๊าซนีออน และใช้ pyrolytically coated partition grahite tube (Varian, Germany) เป็น atomizer

การเตรียมเครื่องแก้ว

การวิเคราะห์ตะกั่วและแคดเมียมซึ่งมีปริมาณน้อยในอนุภาคฝุ่นรวมต้องทำความสะอาดเครื่องแก้วให้สะอาดอย่างดีก่อนการใช้งาน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารตะกั่วและแคดเมียมจากสิ่งแวดล้อม โดยการแช่เครื่องแก้วในสารละลายกรดไนตริก 20% (analytical grade) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ปราศจากไอออน จนกรดออกหมด แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ต้องระวังไม่ให้มีฝุ่นปนเปื้อนลงในเครื่องแก้ว ถ้าเป็นพลาสติกควรแช่สารละลายกรด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 4 การตั้งเครื่องเก็บอากาศจุดที่ 2 บริเวณตลาดหางดงซึ่งเป็นเขตควบคุมของงานวิจัยนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 5 การตั้งเครื่องเก็บอากาศจุดที่ 1 บริเวณตลาดวโรรส ซึ่งเป็นเขตศึกษาของงานวิจัยนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 6 การตั้งเครื่องเก็บอากาศจุดที่ 2 บริเวณตลาดวโรรสซึ่งเป็นเขตศึกษาของงานวิจัยนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไนตริกเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างกรดออกให้หมดด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ปราศจากไอออนเสร็จแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนเก็บและเก็บให้มิดชิดก่อนนำมาใช้

การสกัดตัวอย่างอนุภาคฝุ่นรวม (total suspended particles,TSPs) ด้วยวิธี hot acid extraction ประยุกต์วิธีการสกัดจากวิธีของ U.S.EPA (1999a : 1999b) และ อรุบล และคณะ (2541) โดยมีขั้นตอนการสกัดดังนี้

ตัดกระดาษกรองที่เก็บอนุภาคฝุ่นรวมซึ่งมีขนาดกว้างยาวคือ 8x10 นิ้ว ออกเป็นชิ้นยาวขนาด 1x10 นิ้ว ดังนั้นกระดาษกรอง 1 แผ่นจะได้ 10 ชิ้น เลือก 2 ชิ้นกลางเพื่อเป็นตัวแทนมาใช้ในการวิเคราะห์สำหรับแต่ละตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ 2 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง และหาค่าเฉลี่ยของตะกั่วและแคดเมียมที่วัดได้ ใช้กรรไกรตัดแผ่นกรองเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่จานแก้ว เสร็จแล้วนำกระดาษที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ใน screw cap tube เติมกรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม H_2O_2 2 ไมโครลิตร ปิดฝา screw cap tube พอแน่น ต้มเพื่อย่อยกระดาษกรองนานเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น นำสารสกัดกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วล้างตามด้วย 0.1 M HNO_3 2 ครั้ง ๆ ละ 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M HNO_3 ให้ได้ 25 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า absorbance เพื่อหาปริมาณตะกั่วและแคดเมียม การสกัดตัวอย่างอนุภาคฝุ่นรวมมีการสกัดแผ่นกรองเปล่าด้วยเพื่อใช้เปรียบเทียบ

การหาความถูกต้อง (accuracy) ของการสกัดตะกั่วและแคดเมียมในตัวอย่างฝุ่น

เตรียมสารมาตรฐานตะกั่วให้ได้ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อลิตร และเตรียมสารมาตรฐานแคดเมียมเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อลิตร ตัดกระดาษกรองเปล่าซึ่งมีขนาดกว้างยาวคือ 8x10 นิ้วออกเป็นชิ้นยาวขนาด 1x10 นิ้ว ดังนั้นกระดาษกรอง 1 แผ่นจะได้ 10 ชิ้น เลือกชิ้นกลางเพื่อเป็นตัวแทนมาใช้ในการวิเคราะห์ เติมสารละลายมาตรฐานตะกั่วและแคดเมียมที่เตรียมไว้ 2 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นระดับต่ำ (20 ไมโครกรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นระดับสูง (40 ไมโครกรัมต่อลิตร) ของสารละลายตะกั่วและแคดเมียม แล้วสกัดแผ่นกรองเปล่าด้วยวิธี hot acid extraction โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้งต่างวันกัน และในแต่ละครั้งวันเดียวกันทำการวิเคราะห์สารละลายตะกั่วและแคดเมียมที่ทราบค่าความเข้มข้นเดียวกันอีก 3 ครั้ง และนำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปคำนวณหา % recovery ของโลหะทั้งสอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วด้วย GFAAS

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายตะกั่วมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดด้วยความสูงของพีก (peak height) เพื่อใช้อ่านความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์แล้วคำนวณหาปริมาณของสารตะกั่วในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ตะกั่วทำได้โดยเตรียมสารละลายตะกั่วมาตรฐาน 3 ความเข้มข้น คือ 30, 60 และ 100 ส่วนในพันล้านส่วน (ppb) โดยการ ใช้โปรแกรม auto mix ซึ่งเครื่องวิเคราะห์ทำการผสมสารละลายตะกั่วมาตรฐานให้ตามที่กำหนดความเข้มข้น มี 0.1% HNO_3 (trace element grade) เป็น blank สำหรับ set ศูนย์ กำหนด ค่า parameter ต่าง ๆ ดังนี้

bulk standard concentration	100	ppb
sample volume	10	ไมโครลิตร
total volume	15	ไมโครลิตร

โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในสารสกัดฝุ่นมีรายละเอียดในตารางที่ 1

วิธีวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมด้วย GFAAS

สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์แคดเมียม ทำโดยเตรียมสารละลายแคดเมียมมาตรฐานความเข้มข้นเดียวคือ 10 ppb ใช้โปรแกรม auto mix ซึ่งเครื่องวิเคราะห์จะทำการผสมสารละลายแคดเมียมมาตรฐานกับ modifier (10 % Triton X-100 25 มิลลิลิตร, 20 % $NH_4H_2PO_4$ หรือ $(NH_4)_2HPO_4$ 5 มิลลิลิตร, HNO_3 1 มิลลิลิตร เติมน้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออนให้ได้ 500 มิลลิลิตร) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่กำหนด คือ 1, 3, และ 5 ppb มี modifier เป็น blank สำหรับ set ศูนย์ โดยกำหนด parameter ต่าง ๆ ดังนี้

bulk standard concentration	10	ppb
sample volume	10	ไมโครลิตร
total volume	12	ไมโครลิตร

โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในสารสกัดอนุภาคฝุ่นรวม มีรายละเอียดในตารางที่ 2

ปริมาณความเข้มข้นของตะกั่วและแคดเมียมในอากาศสามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$X = (25xBxA)/9\ xV$$

โดยที่ X = ความเข้มข้นของโลหะในอากาศ (ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เมตร)

B = ความเข้มข้นของโลหะที่วัดได้จาก AAS (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในสารละลายกรดไนตริก 0.1 M ที่เป็นตัวทำละลายสารตัวอย่างหลังการสกัดอนุภาคฝุ่นรวมด้วยวิธี hot acid etrxaction โดยใช้เครื่อง Zeeman GFAAS (Varian®)

Stage	Temperature (^{0}C)	Time (second)	Gas flow (second)	Read (L/min)
1	85	5	3.0	NO
2	95	40	3.0	NO
3	120	10	3.0	NO
4	400	5	3.0	NO
5	400	1	3.0	NO
6	400	2	0.0	NO
7	2100	1	0.0	Yes
8	2100	2	0.0	Yes
9	2100	2	3.0	NO

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในสารละลายกรดไนตริก 0.1 M ที่เป็นตัวทำละลายสารตัวอย่างหลังการสกัดอนุภาคฝุ่นรวมด้วยวิธี hot acid extraction โดยใช้เครื่อง Zeeman GFAAS (Varian®)

Stage	Temperature (^{0}C)	Time (second)	Gas flow (second)	Read (L/min)
1	85	5	3.0	NO
2	95	40	3.0	NO
3	120	10	3.0	NO
4	250	5	3.0	NO
5	250	1	3.0	NO
6	250	2	0.0	NO
7	1800	0.8	0.0	Yes
8	1800	2	0.0	Yes
9	1800	2	3.0	NO

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

A = พื้นที่กระดาษกรองทั้งหมด (ตารางนิ้ว)

V = ปริมาตรอากาศที่ผ่านเครื่อง (ลูกบาศก์เมตร)

การทดสอบความผิดปกติของโครโมโซมโดยวิธี micronucleus assay

การเหนี่ยวนำการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ใช้เม็ดเลือดขาวที่แยกจากเลือดของอาสาสมัครชาย อายุ 20-30 ปี จำนวน 5 ราย ที่มีสุขภาพสมบูรณ์ ไม่เป็นโรคเรื้อรัง ไม่ได้รับยารักษาโรคเป็นประจำ ไม่เคยได้รับการฉายรังสี ไม่ติดเชื้อไวรัส และไม่เป็นโรคที่มีความผิดปกติของโครโมโซม โดยเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำที่ข้อพับแขนด้านใดด้านหนึ่งประมาณ 5-10 มิลลิลิตร มี heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัวเคลือบที่กระบอกฉีดยา เก็บเลือดที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ก่อนนำเม็ดเลือดไปเลี้ยงและแยกเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์เพื่อทำ micronucleus assay ต่อไป

การเหนี่ยวนำการเกิดไมโครนิวเคลียสด้วย lead acetate

lead acetate เป็นสารประกอบตะกั่วที่เลือกมาทดสอบการเหนี่ยวนำการเกิดไมโครนิวเคลียส เนื่องจากเกลืออะซีเตดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ การกำหนดความเข้มข้นของ lead acetate อิงตามผลการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วที่ตรวจวัดได้จากอากาศทั้งในเขตควบคุมคือบริเวณตลาดหางดง และเขตศึกษาคือบริเวณตลาดวโรรส ซึ่งมีปริมาณตะกั่วเฉลี่ยอยู่ในช่วง 106.89 $\pm$ 6.94 ถึง 336.6 $\pm$ 4.24 ไมโครกรัมต่อลิตร จึงเลือกความเข้มข้นของ lead acetate ที่ 75, 150 และ 300 ไมโครกรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลาย lead acetate ตามความเข้มข้นที่ต้องการโดยละลายด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออน เสร็จแล้วนำสารละลายกรองด้วย sterile filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทดสอบ โดยมีตัวอย่างที่ทำการทดสอบดังนี้

1 negative control ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออน

2 positive control ใช้ mitomycin C ซึ่งเป็น potent mutagen ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3 lead acetate ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อลิตร

4 lead acetate ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อลิตร

5 lead acetate ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเหนี่ยวนำการเกิดไมโครนิวเคลียสด้วย cadmium acetate

cadmium acetate เป็นสารประกอบแคดเมียมที่เลือกนำมาทดสอบการเหนี่ยวนำการเกิดไมโครนิวเคลียส โดยกำหนดความเข้มข้นของ cadmium acetate อิงตามผลการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมที่ตรวจวัดได้จากอากาศทั้งในเขตควบคุมคือบริเวณตลาดหางดง และเขตศึกษาคือบริเวณตลาดวโรรสซึ่งมีปริมาณแคดเมียมเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.33 $\pm$ 0.19 ถึง 8.99 $\pm$ 0.12 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงใช้ cadmium acetate ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 ไมโครกรัมต่อลิตร เตรียมสารละลาย cadmium acetate ตามความเข้มข้นที่ต้องการโดยละลายด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออน เสร็จแล้วนำสารละลายกรองด้วย sterile filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทดสอบ โดยมีตัวอย่างที่ทำการทดสอบดังนี้

1 negative control ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออน

2 positive control ใช้ mitomycin C ซึ่งเป็น potent mutagen ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3 cadmium acetate ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อลิตร

4 cadmium acetate ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อลิตร

5 cadmium acetate ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตร

การเหนี่ยวนำการเกิดไมโครนิวเคลียสด้วยสารสกัดอนุภาคฝุ่นรวม

สกัดตัวอย่างอนุภาคฝุ่นรวมจากกระดาษกรองที่เก็บอากาศโดยนำมาตัดให้ได้ขนาด 1x10 นิ้ว กระดาษกรอง 1 แผ่นตัดได้ 8 ชิ้น เลือก 2 ชิ้นกลางของทุกแผ่นนำมาสกัด ใช้กรรไกรซอยแผ่นกรองเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่จานแก้ว นำกระดาษที่ซอยเป็นชิ้นเล็ก ๆ นี้ใส่ใน screw cap tube เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออนพอท่วม ปิดฝา screw cap tube พอแน่น

ต้มเพื่อย่อยกระดาษกรองนานเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น นำสารสกัดกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วล้างตามด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 มิลลิลิตร นำสารสกัดอนุภาคฝุ่นรวมที่ได้ไประเหย ทำให้แห้ง แล้วนำไปละลายด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออน ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการคือ 1, 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (การกำหนดความเข้มข้นนี้อิงจากผลการทดลองของ Hamfrey และคณะ, 1996) เสร็จแล้วนำสารสกัดที่ได้กรองด้วย sterile filter ขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อกรองจุลชีพ เช่น แบคทีเรีย ออกจากตัวอย่างสารสกัดอนุภาคฝุ่นรวม และ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทดสอบ โดยมีตัวอย่างที่ทำการทดสอบดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 negative control ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออน

2 positive control ใช้ mitomycin C ซึ่งเป็น potent mutagen ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3 สารสกัดอนุภาคฝุ่นรวมที่เก็บได้จากอากาศบริเวณตลาดหางดง ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4 สารสกัดอนุภาคฝุ่นรวมที่เก็บได้จากอากาศบริเวณตลาดหางดง ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5 สารสกัดอนุภาคฝุ่นรวมที่เก็บได้จากอากาศบริเวณตลาดหางดง ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6 สารสกัดอนุภาคฝุ่นรวมที่เก็บได้จากอากาศบริเวณตลาดวโรรส ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7 สารสกัดอนุภาคฝุ่นรวมที่เก็บได้จากอากาศบริเวณตลาดวโรรส ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8 เติมสารสกัดอนุภาคฝุ่นรวมที่เก็บได้จากอากาศบริเวณตลาดวโรรส ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Micronucleus assay : ประยุกต์ใช้วิธีของ Vaglenov และคณะ, 2001 มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

- ใช้สารละลายเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย RPMI 1640 ซึ่งมี fetal calf serum 20% และมี streptomycin และ penicillin เป็น antibiotics
- เติมเลือดที่ได้จากอาสาสมัครลงในหลอดเลี้ยงเซลล์หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร
- เติม phytohaemagglutinin เพื่อกระตุ้นให้ lymphocytes แบ่งตัว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- เขย่าหลอดเลี้ยงเซลล์ให้เลือดและสารละลายต่าง ๆ เข้ากันดี ปิดจุกให้แน่นนำไปเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- เมื่อครบ 24 ชั่วโมงเติมสารละลาย lead acetate หรือ cadmium acetate หรือสารสกัดอนุภาคฝุ่นรวมที่ต้องการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมี mitomycin c ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น positive control และ มีน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออน เป็น negative control

หลังจากนั้นเขย่าหลอดเลี้ยงเซลล์ให้เลือดและสารละลายต่าง ๆ เข้ากันดี ปิดจุกให้แน่น นำไปเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 44 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เติม cytochalasin B 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดเลี้ยงเซลล์เพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ เสร็จแล้วปิดจุกนำไปเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

- นำเซลล์ที่ได้มาปั่นและเติม phosphate buffer saline solution (PBS) ประมาณ 3-4 มิลลิลิตร และนำไปปั่นที่ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเติม 0.075M KCl 3-4 มิลลิลิตรเพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จากนั้นนำไปปั่นและดูดส่วนใสข้างบนทิ้งไป

- เติม 95% ethanol:acetic acid (3:1) 5 มิลลิลิตร (ก่อนใช้เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ –20 องศาเซลเซียส) เพื่อเป็น fixative จากนั้นนำไปปั่นที่ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูดส่วนใสข้างบนทิ้งไป (ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง) ผสมเซลล์ที่ก้นหลอดให้เข้ากัน

- นำเซลล์ที่ได้เตรียมบนสไลด์ เมื่อสไลด์แห้งนำไปย้อมด้วยสี Giemsa 10% นาน 10 นาที นำสไลด์ไปล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

- วิเคราะห์หาไมโครนิวเคลียส โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 1,000 เท่า

- การตรวจวิเคราะห์ไมโครนิวเคลียสทำโดยนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ จำนวน 1,000 เซลล์ โดยทำการนับเซลล์ดังต่อไปนี้ด้วยได้แก่ apoptotic cell, necrosis cell, mononucleated cell, binucleated cell, trinucleated cell, tetranucleated cell แล้วนำมาคำนวณหาค่าจากสูตรดังนี้

Nuclear division cytotoxicity index (NDCI) = (ap+nec+M1+2M2+3M3+4M4)/N

โดยที่ ap = apoptotic cell (ลักษณะเซลล์เม็ดเลือดขาวส่วนไซโตพลาสซึมจะติดสีไม่สม่ำเสมอเกาะกลุ่มกันเป็นจุด ๆ)

nec = necrosis cell (ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวเห็นเฉพาะนิวเคลียสไม่พบไซโตพลาสซึม)

M1 = mononucleated cell (เซลล์เม็ดเลือดขาวที่มี 1 นิวเคลียส)

M2 = binucleated cell (เซลล์เม็ดเลือดขาวที่มี 2 นิวเคลียส)

M3 = trinucleated cell (เซลล์เม็ดเลือดขาวที่มี 3 นิวเคลียส)

M4 = tetranucleated cell (เซลล์เม็ดเลือดขาวที่มี 4 นิวเคลียส)

แล้วนับจำนวน binucleated cell จำนวน 1,000 เซลล์เพื่อหาจำนวน micronucleus ซึ่งพบลักษณะกลม ขอบเขตชัดเจนและเรียบติดสีเช่นเดียวกับนิวเคลียสใหญ่ แต่มีลักษณะเล็กมาก ถ้าพบว่าสารที่ทดสอบมีผลทำให้จำนวน micronucleus เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสารนั้นเป็น human mutagen (Fenech, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ข้อมูล

- ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 8.0 for Window วิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนา (descriptive statistics) แสดงข้อมูลในรูปร้อยละ mean $\pm$ SD และเปรียบเทียบค่า mean $\pm$ SD ของปริมาณตะกั่วและแคดเมียมในอากาศของเขตศึกษาและเขตควบคุมโดยใช้ unpaired *t*-test
- เปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิด micronucleus ระหว่างหลอดทดสอบกับหลอดควบคุม และเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิด micronucleus ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยอนุภาคฝุ่นรวมระหว่างเขตควบคุมและเขตศึกษาโดยใช้ paired *t*-test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved