รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในน้ำนมมารดา โดยเทคนิคไฮไดรด์เจเนอเรชันอะตอมมิคแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตเมตรี

Determination of Selenium in Breast Milk by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometry.

โดย

หัวหน้าโครงการ นายธวัชชัย คำรินทร์

ผู้ร่วมวิจัย นางโพธิ์ศรี ลีลาภัทร์

และ ดร.สุกัญญา ลินพิศาล

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รายงานนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ประจำปี 2543

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. คำนำ

ธาตุซิลีเนียมเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับร่างกายของคนเราคือ เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส มีหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นในปฏิกิริยาการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกำจัดสารพวกอินทรีย์เปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะทำลายเนื้อเยื่อต่างๆอันเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง ในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาพบว่าซิลีเนียมสามารถลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งที่กล้ามเนื้อหัวใจ(cardiovascular sclerosis)และที่ตับ(hepatic cirrhosis)ในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ซิลีเนียมยังทำงานร่วมกับวิตามินอี โดยจะทำหน้าที่เสริมกันในการต้านทาน ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidation)ในร่างกาย จะเห็นได้ว่าธาตุซิลีเนียมมีความจำเป็นต่อร่างกาย ปริมาณซิลีเนียมในเลือดและเนื้อเยื่อจะสัมพันธ์กับการบริโภคอาหาร ซึ่งประกอบด้วยธาตุซิลีเนียม ปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในอาหารและน้ำนมมารดา ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในน้ำนมมารดา จึงมีความสำคัญต่อการที่จะนำไปประเมินว่าทารกจะได้รับปริมาณซิลีเนียมจากน้ำนมมารดาเท่าใดและเพียงพอต่อความต้องการของร่างกายหรือไม่

คณะผู้ทำวิจัย

คำขอบคุณ

คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ให้ทุนสนับสนุนจากโครงการวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ในครั้งนี้และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาสูติศาสตร์และนารีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาอาสาสมัคร

คณะผู้วิจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดา โดยวิธีไฮไดรด์เจเนอเรชันอะตอมมิคแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตเมตรี(HG-AAS) ได้ตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาโดยใช้สารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน 2 ชนิดคือ standard reference material 1549 (non-fat milk powder) และstandard reference material 1577a (bovine liver) ได้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับค่าที่ระบุไว้บนฉลาก (ค่าเฉลี่ย $\pm$ 2 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ได้หาค่าร้อยละการกลับคืน โดยการเติมสารละลายมาตรฐานซิลีเนียมลงไปในนมซิมิแลค แอดว้านซ์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้ค่าอยู่ในช่วง 90.32 ถึง 109.50 และหาความแม่นยำของเทคนิคโดยวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในนมซิมิแลค แอดว้านซ์ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ coefficient of variance เท่ากับ 9.32 ได้ใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมทั้งหมดในตัวอย่างน้ำนมมารดาจากอาสาสมัครจำนวน 12 คน มาคลอดบุตรที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาเมื่อเวลา 2-7 วัน 1 , 3 , 6 และ 9 เดือน พบว่ามีปริมาณซิลีเนียมเฉลี่ยเท่ากับ 29.60$\pm$16.20(n=11) , 15.52$\pm$11.97(n=10) , 12.89$\pm$4.95(n=8) , 11.29$\pm$5.29(n=8) และ 14.53$\pm$7.04(n=6) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมที่เก็บเมื่อเวลา 2- 7วันมีค่าสูงที่สุดและแตกต่างจากน้ำนมมารดาที่เก็บเมื่อเวลา 1, 3 , 6 และ 9 เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) สำหรับน้ำนมมาดาที่เก็บเมื่อเวลา 1 , 3 , 6 และ 9 เดือนมีปริมาณซิลีเนียมไม่แตกต่างกัน

Abstract

The total selenium in human breast milk was determined by hydride generation atomic absorption spectrophotometry (HG – AAS).The accuracy of the method was verified by determining selenium in 2 types of standard reference material : standard reference material 1549 (non-fat milk powder) and standard reference material 1577a (bovine liver). The results were in good agreement with the certified values (mean $\pm$ 2 SD) .The recovery was done by addition various concentrations of selenium standard in Semilac Advance milk powder and the percentage of recovery ranged from 90.32 to109.50 . The precision of the technique was done by determining selenium in Semilac Advance powder milk, and the percentage of coefficient of variance was 9.32. This method had been applied to determine total selenium in breast milk obtained from 12 mothers delivering their babies at Maharach Nakorn Chiang Mai hospital. It was found that the average selenium contents in breast milk samples collected at 2-7 day 1, 3 , 6 and 9 month of lactation were 29.60$\pm$16.20(n=11) , 15.52$\pm$11.97(n=10) , 12.89$\pm$4.95(n=9) , 11.29$\pm$5.29(n=8) and14.53$\pm$7.04(n=6) ng/mL respectively. The concentration of selenium in the colostrum(the first week of lactation) was higher than those in the mature milk(after 2 weeks of lactation) significantly($p<0.05$). During 1 to 9 months the concentrations were insignificantly different.

สารบาญ

	หน้า
คำนำ	i
คำขอบคุณ	ii
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
สารบัญ	v
สารบัญอักษรย่อ	vi
สารบัญภาพ	vii
สารบัญตาราง	viii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	7
วิธีการทดลอง	16
ผลการทดลอง	19
การวิเคราะห์ข้อมูล	19
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	21
บรรณานุกรม	26
ภาคผนวก	28

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญอักษรย่อ

HG-AAS	hydride generation atomic absorption spectrophotometry
SRM 1549	standard reference material 1549 (non-fat milk powder)
SRM 1577a	standard reference material 1577a (bovine liver)
ng/mL	นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
ug/day	ไมโครกรัมต่อวัน
g	กรัม
Se	ซิลีเนียม
^{0}C	องศาเซลเซียส
%CV	percent coefficient of variance
SD	standard deviation
SE	standard error
Sig	significant
NS	non significant

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

1 ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาที่ระยะเวลาต่างๆ ของการให้นมบุตร 20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าปริมาณซิลิเนียมที่ร่างกายต้องการในช่วงอายุต่างๆ	2
2	แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาที่อาศัยของประเทศต่างๆ	6
3	การทำโปรแกรม อุณหภูมิ เวลา ในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีเผาแห้ง	12
4	ผลการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในตัวอย่าง SRM	16
5	ผลการหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของเทคนิคHG-AAS	16
6	ผลวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในนมซิมิแลค แอดว้านซ์	17
7	ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาที่เก็บเมื่อเวลาต่างๆของการให้นมบุตร	18
8	เปรียบเทียบปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาที่เก็บเมื่อเวลาต่างๆของการให้นมบุตร	19
9	ปริมาณซิลีเนียมที่ทารกได้รับจากการดื่มน้ำนมมารดาในแต่ละวัน	30

บทนำ

ธาตุซิลิเนียมเป็นธาตุในหมู่ที่ 6 ของตารางธาตุ ผู้ค้นพบคนแรกคือ Berzelius[1] ในปีคริสตศักราช 1818 สมบัติของธาตุซิลิเนียมจะคล้ายๆกับธาตุซัลเฟอร์ แต่ธาตุซิลิเนียมจะมีค่าอิเลกโตเนกาติวิตี(electronegativity)สูงกว่า ธาตุซิลิเนียมนั้นมีเลขออกซิเดชันอยู่หลายค่า เช่น ซิลีเนตหรือSe^{+6} ซิลีไนต์หรือSe^{+4} ซิลีไนด์หรือSe^{+2}และซิลิเนียมหรือSe^{0} เป็นต้น สารประกอบของธาตุซิลิเนียมที่พบบ่อยมากที่สุดในดินและน้ำ[2]ได้แก่ ซิลีเนต(SeO_4^{-2}) และซิลีไนต์(SeO_3^{-2}) สำหรับในสิ่งมีชีวิตมักจะพบธาตุซิลิเนียมอยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์[15]เช่น dimethyl selenide(DMSe), dimethyl diselenide (DMDSe) , dimethyl selenone , selenomethionine (SeME) , selenocysteine (SeCYS)และtrimethyl selenomium($TMSe^{+}$)อิออน[2] ซึ่งเกิดจากขบวนการเมตาบอริซึมของสารประกอบซิลิเนียมและจะถูกขับออกมาทางปัสสาวะ สำหรับสูตรโครงสร้างสารประกอบอินทรีย์ซิลิเนียมยกตัวอย่างแสดงได้ดังนี้

CH_3-Se-CH_3	CH_3-Se-Se-CH_3	CH_3-Se-CH_2-CH(NH$_2$)-COOH
dimethyl selenide	dimethyl diselenide	selenomethionine
(DMSe)	(DMDSe)	(SeME)

ที่มาและความสำคัญของปัญหานำไปสู่การค้นคว้าวิจัย

ธาตุซิลิเนียมจัดเป็นธาตุปริมาณน้อย (trace mineral)[3,4] ที่มีความจำเป็นสำหรับร่างกาย ในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่าร่างกายของคนเราต้องการปริมาณซิลิเนียม วันละเท่าใด ซึ่งในที่ประชุม Food And Nutrition Board (USA.) [5] และข้อกำหนดสารอาหารที่คนไทยควรได้รับประจำวันและแนวทางการบริโภคอาหารสำหรับคนไทย[6] ได้เสนอค่าปริมาณซิลิเนียมที่ร่างกายของคนเราควรได้รับในแต่ละวันโดยอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยดังแสดงในตาราง 1.1

ตารางที่ 1 ค่าปริมาณซิลิเนียมที่ร่างกายต้องการในช่วงอายุต่างๆ

ช่วงอายุ	ปริมาณซิลิเนียม (ไมโครกรัมต่อวัน)
0 - 6 เดือน	10
6 เดือน - 1 ปี	15
1 – 3 ปี	20-80
4 – 6 ปี	30-120
มากกว่า 7 ปี	50-200

หากร่างกายได้รับปริมาณธาตุซิลิเนียมจากอาหารเพียงพอ จะทำให้ร่างกายทำงานเป็นปกติสุขไม่เป็นโรคภัยไข้เจ็บ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณซิลิเนียมในเลือดและเนื้อเยื่อจะมีความสัมพันธ์กับการบริโภคอาหารที่มีซิลิเนียมเป็นองค์ประกอบอีกด้วย[7] สำหรับปริมาณซิลิเนียมในอาหารชนิดต่างๆ มีปริมาณซิลิเนียมมากน้อยแตกต่างกัน เช่น Tinggi[8] ได้รายงานการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในอาหารชนิดต่างๆ ของประเทศออสเตรเลียจำนวน 283 ตัวอย่าง พบว่าอาหารที่มีปริมาณซิลิเนียมสูงได้แก่ธัญพืช เนื้อสัตว์ ปลา และผลิตภัณฑ์จากข้าวสาลี อาหารที่มีปริมาณซิลิเนียมต่ำได้แก่ นมและผลิตภัณฑ์นม ส่วนผักและผลไม้แทบจะไม่มีซิลิเนียมเลย นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ Alaejois[5]ได้รวบรวมการผลวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในน้ำนมมารดาจากรายงานการศึกษาต่างๆ เช่น ปริมาณซิลิเนียมในน้ำนมมารดาที่ ประเทศสหรัฐอเมริกา และเยอรมันตะวันตก พบว่ามีปริมาณซิลิเนียมในน้ำนมเฉลี่ยเท่ากับ 18 และ 28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในตัวอย่างน้ำนมมารดาชนิดต่างๆ ซึ่งจะเห็นได้ว่ากระทรวงสาธารณสุขได้สนับสนุนและรณรงค์ให้เลี้ยงทารกด้วยน้ำนมมารดา ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในน้ำนมมารดาจึงมีความสำคัญที่จะสามารถนำองค์ความรู้ ไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อส่งเสริมสุขภาพของเด็ก ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์แก่ประชากรต่อไป และได้ทราบว่าทารกได้รับปริมาณซิลีเนียมเพียงพอต่อความต้องการของร่างกายหรือไม่

ความสำคัญและหน้าที่ของธาตุซิลิเนียมต่อร่างกาย

ธาตุซิลิเนียมในร่างกายจะอยู่ รูปของซิลีโนโปรตีนมากกว่า10ชนิด ที่ทำหน้าที่สำคัญทางชีวเคมี เช่น ซิลีเนียมเป็นองค์ประกอบของเอ็นไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ซึ่งมีหน้าที่เป็นตัวเร่ง(catalyze)ปฏิกิริยาการกำจัดสารไฮโดรเจนเปอร์

ออกไซด์ ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาเคมีของกรดไขมันต่าง ๆ ในร่างกาย ดังนั้นจึงเสมือนว่าธาตุซิลิเนียมทำหน้าที่ช่วยลดปัจจัยเสี่ยงไม่ให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย

สำหรับปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในร่างกายที่สำคัญ[9] ได้แก่ปฏิกิริยาในสมการเคมีต่อไปนี้

1. ปฏิกิริยาการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

$$2\,GSH + H_2O_2 \xrightarrow{\text{glutathione peroxidase}} GSSG + H_2O$$

GSH = reduce glutathione GSSG = oxidise glutathione

2. ปฏิกิริยากำจัดกรดไขมัน (ROOH)

$$2\,GSH + ROOH \longrightarrow GSSH + ROH + H_2O$$

3. ปฏิกิริยาที่เกิดจากผลกระทบของสารโลหะหนักที่เป็นพิษต่อร่างกาย[10]เช่น อาเซนิค(arsenic) แคดเมียม(cadmium) ปรอท(mercury) และดีบุก(tin)
4. จากการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา พบความสัมพันธ์ระหว่างการที่ร่างกายได้รับปริมาณซิลิเนียมต่ำจะเพิ่มปัจจัยเสี่ยงของการเป็นโรคมะเร็งสูงขึ้น[5]
5. ซิลีเนียมทำงานร่วมกับวิตามินอี โดยจะทำหน้าที่เสริมซึ่งกันและกันในการต้านทานปฏิกิริยาออกซิเดชัน(antioxidation)ขึ้นในร่างกาย ซึ่งจะช่วยลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง[11]
6. ซิลีเนียมเป็นองค์ประกอบของ Iodothyronine deiodinases จะควบคุมและผลิต[12] ธัยรอยด์ฮอร์โมน(thyroid hormone,T3)จากธัยรอกซิน (thyroxine,T4)

ผลจากการที่ร่างกายได้รับปริมาณซิลิเนียม น้อยเกินไป

จากการที่ธาตุซิลิเนียมเป็นธาตุที่สำคัญและจำเป็นต่อร่างกาย ดังนั้นถ้าหากร่างกายได้รับปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการร่างกาย จะทำให้ร่างกายไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ดังเช่นรายงานการวิจัยต่างๆดังต่อไปนี้

1. รายงานการวิจัยของ Diplock(1987) [13] พบว่าประชากรกลุ่มหนึ่งของประเทศจีนขาดธาตุซิลิเนียมอย่างรุนแรง เนื่องจากได้รับปริมาณซิลิเนียมในอาหารต่ำคือน้อยกว่า 3 ไมโครกรัมต่อวัน และมีปริมาณซิลิเนียมในเลือดน้อยกว่า 20ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [1] ทำให้เกิดโรค Keshan [1,6] ซึ่งหากเกิดขึ้นในวัยเด็กจะมีอาการหัวใจล้มเหลว กล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อลายทำงานผิดปรกติ ทำให้เป็นสาเหตุการตายของเด็กในประเทศจีนที่ขาดธาตุซิลิเนียมอย่างรุนแรง

2. Clark (1985) , Comb and Clark (1985) , Yu et al .(1985) และLevander (1987) ได้ศึกษางานวิจัยด้านระบาดวิทยา [5] พบว่าถ้าร่างกายของคนเราได้รับปริมาณธาตุซิลิเนียมต่ำจะเพิ่มปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง
3. Stuenzi (1988) และ Olson (1986) [3] ได้ศึกษางานวิจัยด้านอาหารสัตว์ พบว่าถ้าหากสัตว์เลี้ยงได้รับปริมาณธาตุซิลิเนียมน้อยกว่า0.1 พีพีเอ็ม หรือได้รับปริมาณธาตุซิลิเนียมมากกว่า 10 พีพีเอ็ม จะทำให้เกิดปัญหากับสัตว์เลี้ยง เช่น ถ้าสัตว์เลี้ยงได้รับปริมาณซิลิเนียมน้อยเกินไปจะทำให้สัตว์เลี้ยงเป็นโรคปากและเท้าเปื่อย ซึ่งโดยปรกติมักจะมีการเสริมธาตุซิลิเนียมในรูปโซเดียมซิลิเนตหรือโซเดียมซิลิไนท์ในอาหารสัตว์เพื่อจะช่วยลดการเกิดโรคปาก และเท้าเปื่อยได้ [14] สำหรับเกณฑ์ที่กฎหมายอนุญาตให้เติมสารซิลิเนียมในอาหารสัตว์คือไม่เกิน 0.3 พีพีเอ็ม[3] โดยมักจะเติมลงไปในอาหารสำหรับสัตว์จำพวกไก่ เป็ด วัว ควาย เป็นต้น

ผลจากการที่ร่างกายได้รับปริมาณซิลิเนียมมากเกินไป

จากรายงานวิจัยของ Foster และ Sumar [1] พบว่าประชากรของประเทศจีน เวเนซูเอลา และสหรัฐอเมริกา กลุ่มที่อาศัยอยู่บริเวณสิ่งแวดล้อมที่มีซิลิเนียมในดิน น้ำและอากาศสูง เมื่อร่างกายได้รับปริมาณซิลิเนียมสูงถึง 5 มิลลิกรัมต่อวันและมีปริมาณซิลิเนียมในเลือด 320 ไมโครกรัมต่อวันต่อมิลลิลิตรจะมีอาการผมร่วง เล็บมือเล็บเท้าหยาบ คลื่นไส้ และอ่อนเพลีย สำหรับความเป็นพิษของธาตุซิลิเนียมขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้น สูตรทางเคมี และพีเอช (pH)[2,15] เช่นสารละลายมีสภาพเป็นกรดจะสามารถรีดิวซ์ซิลิเนียม เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนร่วมกับโลหะอื่นๆได้แก่ อาเซนิค เงิน และทองแดงที่เป็นพิษ สำหรับเกณฑ์ที่กฎหมายกำหนดให้มีปริมาณซิลิเนียมสูงสุดในอากาศเท่ากับ 0.1 ถึง 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรและในน้ำ 8 ถึง 10มิลลิกรัมต่อลิตร [15]

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. M.R. L'abbe *et al.*(1996) [16] ได้วิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาที่อาศัยอยู่ในตอนเหนือของ Ontario ประเทศแคนนาดาโดยใช้เทคนิค fluorometry พบว่าปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาจำนวน 10 คนมีค่าระหว่าง 13 ถึง 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร(ค่าเฉลี่ยเท่ากับ17.7±3.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) หากทารกได้ดื่มน้ำนมวันละ 800 มิลลิลิตรทารกจะได้รับปริมาณซิลีเนียม 11 ถึง 20 ไมโครกรัมต่อวัน ซึ่งเพียงพอสำหรับปริมาณซิลีเนียมที่แนะนำให้บริโภคสำหรับทารกคือ 10 ไมโครกรัมต่อวัน

2. M.S.Alaeios และ C. D. Romero(1995) [5] ได้รวบรวมผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างๆ ที่เกียวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาในระยะเวลาของการให้น้ำนมบุตรต่างๆกัน ของแม่ที่อาศัยอยู่ในทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย พบว่ามีปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมแตกต่างกันระหว่าง 5.6 ถึง 204 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สาเหตุที่มีปริมาณซิลีเนียมต่างกันเนื่องมาจากสถานที่อาศัย ปริมาณซิลีเนียมที่ได้รับจากอาหารและระยะเวลาของการให้นมบุตรต่างกัน

3. U.Tinggi *et al.*(1992) [8] ได้วิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในอาหารชนิดต่างๆในออสเตรเลีย พบว่านมและผลิตภัณฑ์นมที่มีปริมาณซิลีเนียมต่ำคือ skim milk และ whole milk (homogenised) มีค่าเท่ากับ 0.03 $\pm$ 0.01(n=4) และ0.04$\pm$ 0.02(n=10) ไมโครกรัมต่อกรัมอาหารสดตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าน้ำนมวัวมีปริมาณซิลีเนียมต่ำเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่นที่มีปริมาณซิลีเนียมสูงเช่น ธัญพืช เนื้อสัตว์ ปลาและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพด

4 L' Abbe *et al.*(1996) [16] ได้รวบรวมผลงานการวิจัยเกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาที่อาศัยในประเทศต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาที่อาศัยในประเทศต่างๆ

Country	n	mean + SD (ng Se/mL)	Range (ng Se/mL)	Reference
USA, 17stage	241	18 ± 0.4	7 - 33	Shearer and Hadgimarkos, 1975
USA,Illinois	20	16.3 ± 4.9	8 - 34	Smith *et al.*, 1982
USA,Beltsville	10	15 ± 1	-	Levander*et al.*, 1987
England	-	-	10 - 20	Thorn *et al.*,1978
China,Beijing	15	20	-	Yang *et al.*,1987
China,Keshan disease affected area	5	-	2 - 6	Yang *et al.*,1987
West Germany	19	18 ± 8	13 - 33	Dorner *et al.*, 1990
Japan	15	18	6 - 33	Higashi *et al.*,1983
Sweden, 1978 1983	 34 15	 9.4 ± 0.5 11.9 ± 0.8	 - 	 Walivaara *et al.*,1986
Belgium	9	9.9 ± 3.4	5.6 - 15.4	Robbercht and Deelstra,1994
Australia	12	11.9 ± 3.5	8.4 - 17.1	Cumming*et al.*, 1992
Greece	16	15 ± 2	11 - 19	Bratakos and Ioannou,1991
Finland 1976 1980 1987	 13 15 172	 5.8 ± 1.2 10.0 ± 1.9 15.8	 - - 8.9 - 24.3	 Kumpulainen *et al.*, 1984 Kantola and Vartiainen,1991
New Zealand ,1990	13	13.4 ± 2.0	-	Dolamore *et al.*,1992
Canada,1992	10	17.7 ± 3.3	13 - 25	M.R.L'Abbe *et.al.*,1996

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาปริมาณซิลิเนียมในน้ำนมมารดาในระยะเวลา 2-7 วัน , 1 , 3 , 6 และ 9 เดือนของการให้นมบุตร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบปริมาณซิลิเนียมที่มีอยู่ในน้ำนมมารดา ในระยะเวลา 2-7 วัน , 1 , 3 , 6 และ 9 เดือนของการให้นมบุตร
2. เพื่อประเมินว่าทารกได้รับปริมาณซิลีเนียมจากน้ำนมมารดาเพียงพอต่อความต้องการของร่างกายหรือไม่

วิธีการทดลอง

1. **อาสาสมัคร**

มารดาอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยจำนวน 12 คน มาคลอดบุตรที่โรงบาลมหาราชนครเชียงใหม่ โดยมารดาแต่ละคนสามารถให้นมบุตรตลอดระยะเวลา 9 เดือน และมารดาอาศัยอยู่ในเขตอำเภอเมืองหรือใกล้อำเภอเมืองจังหวัดเชียงใหม่ เพื่อสะดวกต่อการเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดา

2. **วิธีเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดา**

การเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาเมื่อเวลา 2-7 วันจะเก็บที่โรงพยาบาลมหาราชและเมื่อเวลา 1 , 3 , 6 และ 9 เดือน จะออกเดินทางไปเก็บตัวอย่างน้ำนมที่บ้านอาสาสมัครโดยมีพยาบาลเดินทางไปเก็บตัวอย่างน้ำนมด้วย ก่อนเก็บตัวอย่างน้ำนมได้ทำความสะอาดหัวนมมารดาด้วยสำลีชุบน้ำสะอาด แล้วใช้มือบีบหัวนมให้น้ำนมลงไหลลงไปในหลอดทดลองปริมาตร10 มิลลิลิตรจำนวน 2 หลอด เก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาไว้ในกระติกน้ำแข็ง และนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อนำมาเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการวิเคราะห์

3. **การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมมารดา**

การวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาจะทำตามวิธีของ T.W. May [21] โดยการนำตัวอย่างน้ำนมมารดา มาย่อยสลายแบบเผาแห้งในเตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace)จนได้ขี้เถ้าที่สมบูรณ์ จากนั้นละลายขี้เถ้าด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมและวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในตัวอย่างน้ำนมโดยเทคนิค hydride generation atomic absorption spectrophotometry (HG-AAS) ดังในข้อ 3.1

3.1 หลักการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมโดยเทคนิค HG–AAS

เทคนิค HG–AAS จะใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุซิลิเนียม ซึ่งเป็นธาตุที่มีปริมาณน้อยมาก โดยวิธีวิเคราะห์อาศัยหลักการที่ธาตุซิลิเนียมสามารถเกิดสารประกอบไฮไดรด์กับสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์ได้สารซิลิเนียมไฮไดรด์ ซึ่งตัวมันเองเป็นสารประกอบที่ระเหยง่าย มีจุดเดือดที่ –42 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในตัวอย่างน้ำนมมารดา นั้นจำเป็นจะต้องเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการย่อยสลายสารตัวอย่างโดยทั่วไปนั้นมี 2 วิธี คือ โดยวิธีย่อยสลายเปียก(wet digestion) ด้วยกรดผสมของกรดไนตริก กรดเปอร์คลอริก และกรดซัลฟิวริก และย่อยสลายด้วยวิธีเผาแห้ง(dry ashing) โดยการนำสารตัวอย่างมาเผาในเตาเผาไฟฟ้าอุณหภูมิสูงที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียสจนได้เถ้าที่สมบูรณ์ เมื่อย่อยสลายสารตัวอย่างสมบูรณ์แล้วไม่ว่าจะใช้วิธีใดก็ตาม จะต้องรีดิวซ์สารประกอบซิลิเนียม(+6)ให้เป็นซิลิเนียม(+4) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม และสารประกอบซิลิเนียม(+4)จะถูกรีดิวซ์ต่อไปด้วยสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์ ($NaBH_4$)ในสภาพที่เป็นกรดก็จะได้สารประกอบซิลิเนียมไฮไดรด์ ซึ่งสารประกอบตัวนี้จะระเหยกลายเป็นไอได้ง่าย และถูกพาด้วยกระแสของก๊าซไนโตรเจนเข้าสู่เปลวไฟที่ควอร์ตซ์เซลล์(quartz cell) ของเครื่อง AAS สารประกอบซิลิเนียมจะสลายตัวกลายเป็นอะตอมอิสระ ซึ่งจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะทำให้สามารถวัดปริมาณธาตุซิลิเนียมในสารตัวอย่างได้ โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานซิลีเนียม

สำหรับปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นมีดังนี้

สารประกอบซิลิเนียม(+4)จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์ ($NaBH_4$) ในสภาพที่เป็นกรด

$$4\,NaBH_4 \rightarrow 4\,Na^+ + 4\,BH_4^-$$

$$4\,BH_4^- \rightarrow 2\,B_2H_6 + 2H_2 + 4e^-$$

$$Se^{2+} + 2H^+ + 4e^- \rightarrow SeH_2$$

นั่นคือ $4BH_4^- + Se^{2+} + 2H^+ \rightarrow 2B_2H_2 + 2H_2 + SeH_2$

สำหรับเทคนิค HG –AAS สามารถวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมได้ปริมาณต่ำสุดเท่ากับ 2.0 ng / mL

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

1) Atomic Absorption Spectrophometer, รุ่น 3100, ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer Coperation, USA.
2) Hollow cathode lamp of selenium, ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer Coperation, USA.
3) Hydride generation system , รุ่น MHS–10, ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer Coperation , USA.
4) Vortex genie mixer, รุ่น K–550 GE, ผลิตโดยบริษัท Scientific Industries Inc.,USA.
5) Analytical balance(accurate to $\pm$ 1 mg.), ยี่ห้อ Mettler, รุ่น H33, ผลิตโดยบริษัท Mettler Instrument Coperation, USA.
6) Muffle furnace, ยี่ห้อ Vulcan , Type 3-1750 , ผลิตโดยบริษัท NEY , USA .
7) Hotplate, ยี่ห้อ Thermolyne,Type 2200, ผลิตโดยบริษัท Thermolyne Coperation, USA .

3.3 สารเคมี

1) Hydrochloric acid 37%, analytical grade, E. Merck, Germany.
2) Nitric acid 68 %, analytical grade, E. Merck, Germany.
3) Sulfuric acid 98 %, analytical grade, E. Merck, Germany.
4) Titrisol of selenium standard solution 1.000 g $\pm$ 2 g ($SeCl_2$ in water), analytical grade, E. Merck, Germany.
5) Sodium hydroxide, proanalysi grade, E. Merck, Germany.
6) Sodium borohydride, Fluka A., Switerland.
7) Magnesium oxide, analytical grade, E. Merck, Germany.
8) Magnesium nitrate hexahydrate, analytical grade, E. Merck, Germany.
9) SRM 1549 non-fat milk powder , National Institute of Standard and Technology , Gaithersburg,USA .
10) SRM 1577a bovine liver , National Institute of Standard and Technology , Gaithersburg, USA .

3.4 การเตรียมสารละลายเคมี

1) ashing aid solution.

ชั่งสาร magnesium nitrate 80 g เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 mL เติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 200.0 mLและเติม magnesium oxide หนัก 10 กรัม แล้วเขย่าสารละลายให้เข้ากันและเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนให้มีปริมาตรครบ 500 mL

2) สารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์ 3 %(w/v)

ชั่งสารโซเดียมบอโรไฮไดรด์ 3.0 กรัม เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 %(w/v)ลงไปจนถึงขีดปริมาตรเขย่าขวดสารละลายให้เข้ากัน สำหรับสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์ 3% (w/v) ที่เตรียมใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง จะมีอายุการใช้งานเพียง 1 วันเท่านั้น

3) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0%(w/v)

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.0 กรัม เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 mL และเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนไปจนถึงขีดปริมาตรแล้วเขย่าขวดสารละลายให้เข้ากัน

4) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียม

4.1) สารละลายมาตรฐาน A (สารละลายมาตรฐานซิลีเนียมเข้มข้น1000 ng/mL)

ดูดสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมที่มีความเข้มข้น 1,000 ug/mL ปริมาตร 0.1 mL เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL และเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนจนถึงขีดปริมาตรแล้วเขย่าขวดสารละลายให้เข้ากัน

4.2) สารละลายมาตรฐาน B (สารละลายมาตรฐาน Se เข้มข้น100 ng/mL)

ดูดสารละลายมาตรฐาน A ปริมาตร 10.0 mL เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL และเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนจนถึงขีดปริมาตรแล้วเขย่าสารละลายให้เข้ากัน

3.5 การเตรียมสารตัวอย่างนมผง น้ำนมมารดา และสารละลายมาตรฐานซิลีเนียมก่อนทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค HG-AAS

1) ชั่งสารตัวอย่างนมผงที่มีน้ำหนักแน่นอนระหว่าง 0.5000 ถึง 1.0000 กรัม หรือปิเปตน้ำนมมารดาปริมาตร 5.0 mL และดูดสารละลายมาตรฐานซิลีเนียม B ปริมาตร 0, 0.5, 1.0,1.5 และ 2.0mL เทใส่ในบีกเกอร์ขนาด 30 mLสำหรับสารละลายมาตรฐานซิลีเนียมที่ใช้เป็น working standard จะมีความเข้มข้น 0 , 2 , 4 และ 8 ng / mL

2) เติมสารละลาย ashing aid10.0 mLลงไปในแต่ละบีกเกอร์และเขย่าหรือคนสารละลายของผสมให้เข้ากัน

3) นำสารผสมแต่ละบีกเกอร์ไปเข้าเตาอบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยสารละลายให้แห้งเป็นเวลา 1 คืน

4) นำบีกเกอร์ในข้อ 3 เข้าเตาเผาไฟฟ้าอุณหภูมิสูง(muffle furnace) โดยการทำโปรแกรม อุณหภูมิ เวลา ในการเผาแห้งดังแสดงในตารางที่ 3

5) นำบีกเกอร์ออกจากเตาเผาไฟฟ้าอุณหภูมิสูง ถ้าสารตัวอย่างเผาไหม้สมบูรณ์จะได้เถ้า(ash)สีขาว แต่หากสารตัวอย่างเผาไหม้ไม่สมบูรณ์จะได้สารสีขาวปนดำ ให้นำสารตัวอย่างมาเผาซ้ำอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำเถ้าที่ได้มาเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออน 10.0 mL และเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 15.0 mL

6) นำสารละลายตัวอย่างแต่ละบีกเกอร์ ไปต้มบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 204 องศาเซลเซียสจนกระทั่งตะกอนเถ้าละลายหมด ให้ยกสารละลายแต่ละบีกเกอร์ออกจากเตาไฟฟ้าแล้วตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

7) นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมด้วยเครื่อง HG-AAS โดยทำตามขั้นตอน 3.7

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ

ตารางที่ 3 การทำโปรแกรม อุณหภูมิ เวลา ในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีเผาแห้ง

อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (C^0/min)	อุณหภูมิ (C^0)	เวลา hold (ชั่วโมง)
R1 = 40	T1 = 200	H1 = 0.5
R2 = 40	T2 = 350	H2 = 0.5
R3 = 40	T3 = 500	H3 = 8.0

R(rate) คืออัตราการเพิ่มอุณหภูมิของเตาเผาไฟฟ้า

T(temperature) คืออุณหภูมิของเตาเผาไฟฟ้า

H(hold) คืออุณหภูมิของเตาเผาไฟฟ้าที่รักษาให้อุณหภูมิคงที่ระดับหนึ่ง

3.6 สภาวะเงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียม โดยเทคนิค HG-AAS

ในการทดลองครั้งนี้ได้วัดปริมาณซิลีเนียมโดยเครื่อง HG–AAS ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น 3100 ซึ่งมีพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้

ความยาวคลื่น 196 นาโนเมตร

slit 0.7 นาโนเมตร

diluent 1.5 % HCl

reductant 3 % $NaBH_4$ in 1 % NaOH

sensitivity check 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

MHS – 10 : air 110.0 ลิตรต่อนาที

acetylene 3.0 ลิตรต่อนาที

char. mass 2.2 (ng / 1%A)

signal type ; AA –BG signal measurement : peak height

read time (sec) : 15.0 (0.1 - 60)

BOC time(sec) : 0 (0-5)

read delay (sec) : 1.0 (0 – 20)

sample replicates ; 1 (1 – 99)

standard replicate :1 (1–99)

flame type : air / C_2H_2

3.7 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมโดยเทคนิค HG–AAS

1) เปิดสวิตช์เครื่องคอมพิวเตอร์และเครื่อง AAS

2) ทำการ align lamp โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ติดตั้งหลอด hollow cathod lamp สำหรับธาตุซิลิเนียม

2.1) ตั้งค่ากระแสไฟฟ้าเท่ากับ 16 มิลลิแอมแปร์ ความยาวคลื่นเท่ากับ 196 นาโนเมตร และปรับปุ่ม align lamp screws ให้มีค่าพลังงานสูงสุดซึ่งจะสังเกตได้จาก bar chart บนจอภาพจะแสดงค่าพลังงานสูงสุด

2.2) ใส่ค่าพารามิเตอร์ต่างๆสำหรับวิเคราะห์ธาตุซิลิเนียม ตามขั้นตอนที่ 3.6

3) เปิดวาล์วท่อ air และวาล์วท่อก๊าซ acetylene โดยปรับอัตราส่วน air : acetylene ให้มีสเกลเท่ากับ 4 : 2 หน่วย แล้วจึงจะจุดไฟโดยกดปุ่ม ignite(สีแดง) เมื่อเปลวไฟติดให้ปรับลดอัตราส่วนของสเกล air : acetylene เป็น 2 : 1 หน่วย

4) ค่อยๆ เอียงควอร์ตซ์เซลล์(quartz cell) เข้าหาเปลวไฟให้ warm up ประมาณ 10 ถึง 15 นาที ก่อนที่จะเริ่มทำการวัดปริมาณซิลิเนียมในสารละลายตัวอย่าง

5) เทสารละลายมาตรฐานซิลีเนียมที่เตรียมจากขั้นตอน 3.5 ใส่ในหลอดทำปฏิกิริยา(reaction flask) แล้วต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฮไดรด์(hydride generation system)

6) กดปุ่ม plunger ของเครื่องกำเนิดไฮไดรด์ (โดยกดแช่นาน 5 วินาที) พร้อมกับกดปุ่ม read ของเครื่อง AAS (กดปุ่ม read แล้วปล่อยทันที) สำหรับปุ่ม plunger ของเครื่องกำเนิดไฮไดรด์ จะทำหน้าที่ควบคุมการไหลของก๊าซไนโตรเจน ซึ่งจะเป็นตัวพาสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์ จากขวดภาชนะบรรจุสารละลาย (reductant reservoir) เข้าไปยังหลอดทำปฏิกิริยา

7) การวัดปริมาณซิลีเนียมในสารละลายตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้วจากขั้นตอน 3.5 โดยทำการทดลองซ้ำตามขั้นตอน 3.7.(5 ถึง 6)

3.8 เตรียมสารละลายตัวอย่างนมผงซิมิแลคแอดวานซ์

ชั่งนมซิมิแลคแอดวานซ์ 75.0 g เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 mL เติมน้ำอุ่น(ใช้น้ำกลั่นปราศจากอิออนต้ม)ปริมาณ 400 mLลงไป เขย่าจนนมผงละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและเติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนจนถึงขีดปริมาตร จะมีปริมาณซิลิเนียมเข้มข้น 18.0 ng/mL

3.9 การทดลองหาเปอร์เซ็นต์ recovery

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียม

เตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard ของซิลิเนียม โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 3.5 จะได้สารละลายมาตรฐานซิลิเนียมที่ใช้เป็น working standard มีความเข้มข้น 0 , 2 , 4 และ 8 ng / mL

2) การเตรียมตัวอย่างนมซิมิแลคแอดวานซ์

2.1) ชั่งนมผงซิมิแลคแอดวานซ์ ที่มีน้ำหนักที่แน่นอนระหว่าง 0.5000 ถึง 1.0000 กรัม เทใส่ในบีกเกอร์ขนาด 30 mL แล้วเติมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมเข้มข้น 4.14 หรือ 8.28 ng/mL ลงไปในแต่ละบีกเกอร์ดังในตารางที่ 5 แล้วเติมสารละลาย ashing aid ปริมาตร 10.0 mL ลงไปในแต่ละบีกเกอร์ แล้วคนสารผสมด้วยแท่งแก้วให้เข้ากัน

3) วัดปริมาณซิลีเนียม โดยทำตามขั้นตอน 3.7

3.10 การทดลองหาความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียม โดยเทคนิค HG–AAS

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียม

เตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard ของซิลิเนียม โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 3.5 จะได้สารละลายมาตรฐานซิลิเนียมที่ใช้เป็น working standard มีความเข้มข้น 0 , 2 , 4 และ 8 ng/mL

2) การเตรียมตัวอย่างนมซิมิแลคแอดวานซ์

ชั่งนมซิมิแลคแอดวานซ์ที่มีน้ำหนักแน่นอนระหว่าง 1.0000 ถึง 2.0000 กรัมจำนวน 11 ครั้ง แล้วทำการทดลองเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนที่ 3.5

4) วัดปริมาณซิลีเนียม โดยทำตามขั้นตอน 3.7

3.11 การวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในน้ำนมมารดา โดยเทคนิค HG-AAS

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียม

เตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard ของซิลีเนียมที่มีความเข้มข้นระหว่าง 2 ถึง 8 ng/mL โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 3.5

2) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.1) ชั่งตัวอย่างนมผงที่มีน้ำหนักที่แน่นอนระหว่าง 1.0000 ถึง 2.0000 g หรือน้ำนมมารดาปริมาตรที่แน่นอนระหว่าง 5.0 ถึง 10.0 mL ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 30 mLและเติมสารละลาย ashing aid ปริมาตร10.0 mL ลงไปในแต่ละบีกเกอร์ โดยสารตัวอย่างแต่ละตัวอย่างจะทำการทดลอง 2 ซ้ำ แล้วคนสารผสมด้วยแท่งแก้วให้เข้ากัน

2.2) ทำการเตรียมตัวอย่างทดลองตามขั้นตอน 3.5

2.3) วัดปริมาณซิลีเนียม โดยทำตามขั้นตอน 3.7

ผลการทดลอง

1. การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์

1.1 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ recovery ใน standard reference material (SRM)

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในตัวอย่าง SRM

SRM	ค่าcertified Se (ug/g)	ปริมาณ Se จากการทดลอง (ug/g)		ค่าเฉลี่ย Se จากการทดลอง (ug/g)	% recovery
		หลอดที่ 1	หลอดที่ 2		
SRM 1549 Non-fat milk powder	0.11 ± 0.1	0.13	0.12	0.12	109.09
SRM 1577 a bovine liver	0.71 ± 0.07	0.64	0.65	0.64	90.14

หมายเหตุ

สำหรับวิธีคำนวณ % recovery แสดงในภาคผนวกที่ 1

1.2 ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ recovery ในตัวอย่างนมซิมิแลค แอดว้านซ์

ตารางที่ 5 ผลการหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของเทคนิค HG-AAS

ปริมาณ Seในนมซิมิแลคแอดวานซ์ (ng/mL)	Added std. Se (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	Experimental value (ng/mL)	% recovery
6.66	4.14	10.80	10.87	100.65
6.21	4.14	10.35	11.31	109.28
5.23	4.14	9.37	10.26	109.50
7.57	4.14	11.71	10.93	93.34
4.76	8.28	13.05	13.14	100.69
5.07	8.28	13.36	12.43	93.04
5.24	8.28	13.53	12.22	90.32
mean ± SD				99.54 ± 7.77

หมายเหตุ 1. std. Se คือ สารละลายมาตรฐานซิลิเนียมที่เติมลงไปในสารตัวอย่างนมซิมิเลคแอดวานซ์ปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

2. สำหรับวิธีคำนวณ % recovery แสดงในภาคผนวกที่ 2

1.3 ผลการทดลองหาความแม่นยำของเทคนิค HG-AAS

ตารางที่ 6 ผลวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในนมซิมิเลค แอดว้านซ์

การทดลองครั้งที่	ปริมาณซิลีเนียม (ng/mL)
1	18.04
2	16.90
3	17.00
4	20.55
5	20.90
6	17.78
7	15.72
8	16.90
9	19.50
10	18.82
11	18.00
mean $\pm$ SD	18.23 $\pm$ 1.70
% CV	9.32

หมายเหตุ

1. สารตัวอย่างที่ใช้คือนมซิมิเลค แอดว้านซ์ มีปริมาณซิลีเนียมเข้มข้นเท่ากับ 18 ng/mL
2. สำหรับวิธีการคำนวณ % CV แสดงในภาคผนวกที่ 3

2. การวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดา

ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาจากมารดาอาสาสมัครจำนวน 12 คน มาคลอดบุตรที่โรงพยาบาลมหาราช แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียม ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 1

ตารางที่ 7 ปริมาณ Seในน้ำนมมารดาที่เก็บเมื่อเวลาต่างๆของการให้นมบุตร

Code	ความเข้มข้นของ Se (ng / mL)				
	2-7 วัน	1 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน
1	7.30	*	*	*	*
2	**	4.57	4.84	8.82	9.54
3	54.86	18.20	13.99	18.94	27.54
4	18.02	19.43	18.63	15.58	11.76
5	17.02	11.77	10.06	5.58	*
6	30.39	13.21	*	*	*
7	33.51	10.48	12.06	7.04	11.15
8	39.70	12.61	16.92	16.21	*
9	59.06	47.01	*	*	*
10	23.25	11.77	*	*	*
11	17.27	***	8.44	5.33	9.56
12	25.21	6.13	18.17	12.82	17.63
N	11	10	8	8	6
Mean	29.60	15.52	12.89	11.29	14.53
SD	16.20	11.97	4.95	5.29	7.04

หมายเหตุ

* หมายความว่าไม่สามารถเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาได้เพราะน้ำนมมารดาหมดหรือมารดาเลี้ยงนมชนิดอื่นแทนนมมารดา

** หมายความว่าไม่สามารถเก็บน้ำนมมารดาได้เพราะมารดาเข้าร่วมโครงการตั้งแต่เดือนที่ 1 หลังจากคลอดบุตร

*** หมายความว่าไม่สามารถเก็บน้ำนมมารดาได้เพราะมารดาได้ย้ายไปอยู่ต่างจังหวัดเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเปรียบเทียบปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดา(นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)เวลาต่างๆกันของการให้นมบุตร โดยใช้วิธี Pair t – test

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาที่เก็บเมื่อเวลาต่างๆ

Pair	Paired differences					t	df	Sig.(2- tailed)	
	mean	SD	SE	95%confidence interval of the difference					
				lower	upper				
2-7d –1 m	16.71	11.51	3.84	7.86	25.56	4.36	8	0.002	Sig
2-7d – 3 m	15.33	14.02	5.30	2.36	28.30	2.89	6	0.028	Sig
2-7d – 6 m	17.73	11.37	4.29	7.21	28.24	4.12	6	0.006	Sig
2-7d – 9 m	14.25	9.84	4.40	2.02	26.47	3.24	4	0.032	Sig
1 m – 3 m	-1.64	5.30	2.00	-6.54	3.26	-0.82	6	0.444	NS
1 m - 6 m	-0.26	4.84	1.83	-4.73	4.22	-0.14	6	0.893	NS
1 m – 9 m	-3.76	7.63	3.41	-13.23	5.71	-1.10	4	0.332	NS
3 m – 6 m	1.59	4.02	1.42	-1.76	4.96	1.12	7	0.298	NS
3 m – 9 m	-1.84	6.85	2.80	-9.03	5.35	-0.66	5	0.540	NS
6 m – 9 m	-3.11	4.22	1.72	-7.54	1.32	-1.80	5	0.131	NS

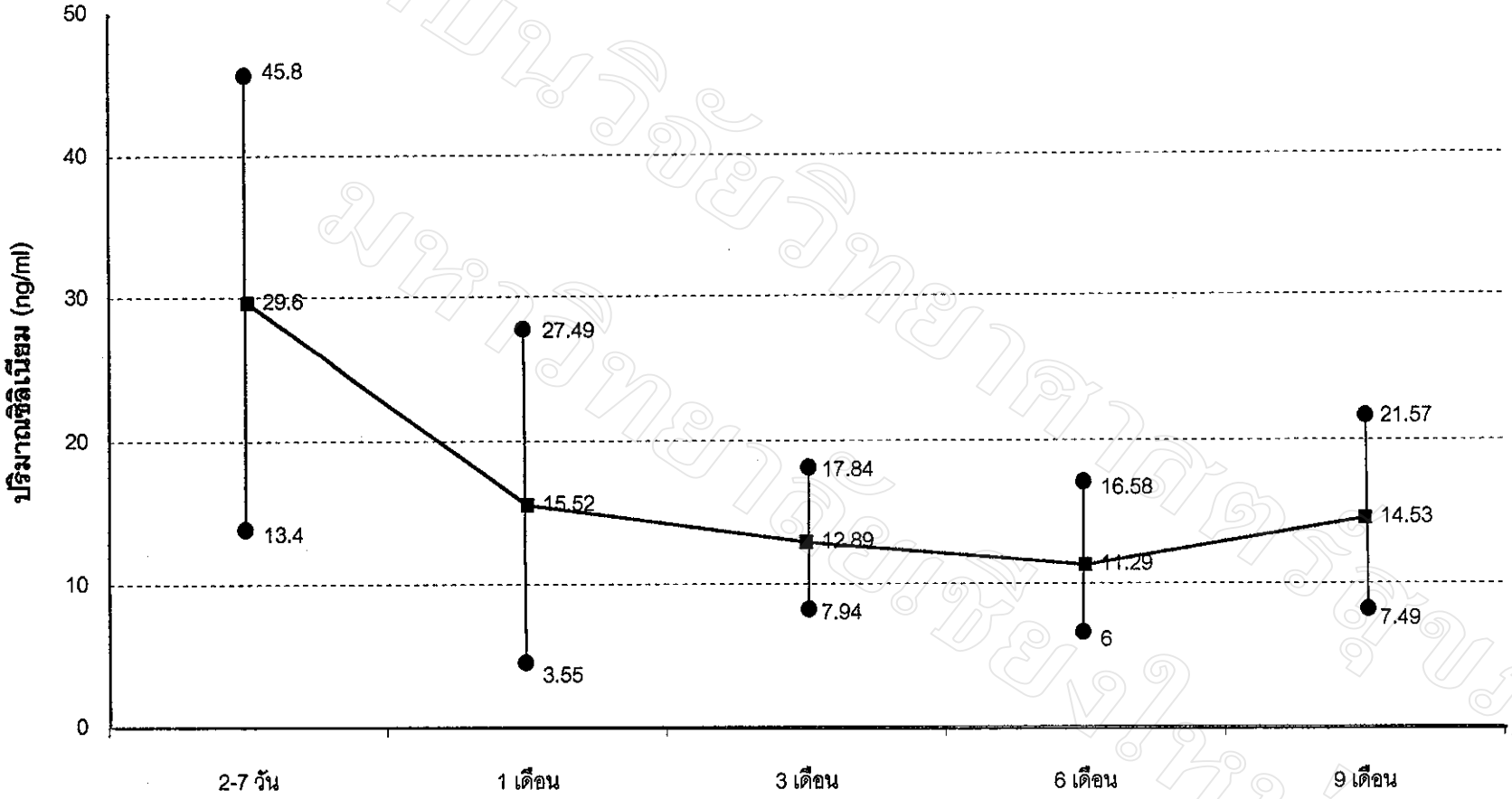
หมายเหตุ

2-7 d = 0 –7 วัน , 1 m = 1 เดือน , 3 m = 3 เดือน , 6 m = 6 เดือน , 9 m= 9 เดือน

SD = standard deviation SE = standard error

Sig = significant NS = non significant

ภาพที่ 1 ปริมาณซิลิเนียมในน้ำนมมารดาที่ระยะเวลาต่างๆของการให้นมบุตร (Mean ± SD, ng/ml)



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาครั้งนี้ได้ใช้สาร standard reference material (SRM) 2 ตัวคือ SRM1549 (nonfat milk powder) และ SRM1577a (bovine liver) ซึ่งมีค่า certified เท่ากับ 0.11 ± 0.1 และ 0.71 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อกรัม เมื่อนำไปทำการวิเคราะห์ได้เฉลี่ยเท่ากับ 0.12 และ 0.64 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ ซึ่งก็ได้ผลสอดคล้องกับค่า certified ที่ระบุข้างขวดคือมีค่าผลการวิเคราะห์อยู่ในช่วงไม่เกิน mean ± 2SD และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องได้เท่ากับ 109.09 และ 90.14 ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 4 และได้หาเปอร์เซ็นต์ recovery อีกโดยเติมสารละลายมาตรฐานซิลีเนียมลงในสารตัวอย่างนมผงซิมิแลค แอดว้านซ์ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ยเท่ากับ 99.54 ± 7.77(90.32 –109.50 , n =7) ดังแสดงในตารางที่ 5 นอกจากนั้นยังได้หาความแม่นยำของเทคนิค HG-AAS โดยวิเคราะห์ซิลีเนียมในตัวอย่างนมผงซิมิแลค แอดว้านซ์ที่เตรียมในรูปนมผงละลายน้ำความเข้มข้นของซิลีเนียมเท่ากับ 18 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมเฉลี่ยเท่ากับ 18.23 ± 1.70 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (n =11) และค่าเปอร์เซ็นต์ coefficient of variance เท่ากับ 9.32 ดังแสดงในตารางที่ 6 จะเห็นการตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำของการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียม โดยเทคนิค HG-AAS นั้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือได้ผลการวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพแตกต่างจากค่าจริงที่ระบุไว้ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ และเหมาะสมที่จะนำมาวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในตัวอย่างน้ำนมมารดาได้

จากการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในตัวอย่างน้ำนมมารดาที่เก็บเมื่อเวลาต่างๆกันคือ 2-7 วัน, 1, 3 , 6 และ 9 เดือนของการให้นมบุตรมีปริมาณซิลีเนียมเฉลี่ยเท่ากับ 29.60±16.20(n=11), 15.52±11.97(n=10),12.89±4.95(n=8) ,11.29±5.29(n=8) และ 14.53±7.04(n=6) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 7 เมื่อพิจารณาจำนวนมารดาอาสาสมัคร(n)ที่เข้าร่วมโครงการในครั้งนี้จำนวน 12 คน ที่มาคลอดบุตรโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ อาจจะมีจำนวน(n)น้อยไปก็เพราะงบประมาณบุคลากรและระยะเวลาทำวิจัยนั้นมีจำกัด และในการวิจัยครั้งนี้ก็เป็นการศึกษานำร่องเพื่อที่จะสามารถนำเอาข้อบกพร่องไปแก้ไขในการศึกษาครั้งต่อไป

จากการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง พบว่าปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมที่เก็บช่วง colostrum (0-7วัน) มีค่าสูงที่สุด และแตกต่างจากน้ำนมมารดาช่วง mature milk(หลังคลอด 2 สัปดาห์) ที่เก็บเมื่อระยะ1, 3 , 6 และ 9 เดือนของการให้นมบุตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p < 0.05$) สำหรับน้ำนมมาดาที่เก็บตัวอย่างเมื่อเวลา 1 , 3 , 6 และ 9 เดือนของ

การให้นมบุตรนั้นมีปริมาณซิลีเนียมไม่แตกต่างกัน ซึ่งได้ผลการวิจัยสอดคล้องกับรายงานการวิจัยฉบับต่างๆดังต่อไปนี้

1.Tamari Y. และ Kim E.S.(1999)[17] ได้วิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาเกาหลีจำนวน 51 คน (213 ตัวอย่าง) ในระยะเวลาของการให้นมบุตรต่างๆกัน พบว่าปริมาณน้ำนมในช่วง colostrum (น้อยกว่า 4 วัน) transition(4 -10 วัน)และมากกว่า 10 วัน มีปริมาณซิลีเนียมเฉลี่ยเท่ากับ 34± 11(n=44) , 21 ± 8 (n=78) และ13 ± 6 (n=91) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จะเห็นได้ว่ามีปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดามีค่าสูงในช่วง colostrum และจะมีปริมาณซิลีเนียมลดลงเมื่อเวลาผ่านไป เมื่อคำนวณปริมาณซิลีเนียมที่ทารกอายุ 0 -1 เดือนควรจะได้รับประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อวัน (3 ไมโครกรัมต่อ 1 กิโลกรัม) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายตามที่สมาคม American Cancer Society แนะนำไว้

2. Li F.*at al.*(1999) [18] ได้วิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาชาวออสเตรเลีย จำนวน 38 คน (78 ตัวอย่าง) โดยได้เก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาตั้งแต่หลังคลอดจนถึง 10 เดือน พบว่าปริมาณน้ำนมมารดาในช่วง colostrum(0-7 วัน) และช่วง mature milk (หลังคลอด 2 สัปดาห์) มีปริมาณซิลีเนียมเท่ากับ 23.9 ± 12.0และ 11.4 ± 3.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมจะสูงในช่วง colostrum และจะลดลงในช่วงแรกๆ จนกระทั่งคงที่ในช่วง mature milk

3. Zachara B.A. และ Pilecki A.(2000) [19] ได้วิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาจำนวน 950 คน ที่อาศัยอยู่ในทุกๆจังหวัดของประเทศโปแลนด์ โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาในช่วงระยะเวลา 12 – 75 วัน พบว่าปริมาณซิลีเนียมเฉลี่ยเท่ากับ 10.24 ± 2.82 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ช่วง 8.81-11.58 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่าปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาที่ศึกษาไม่แตกต่างกันตลอดในระยะเวลาการให้ให้น้ำนมบุตร สาเหตุที่ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดามีปริมาณค่อนข้างคงที่ เนื่องจากเขาไม่ได้ศึกษาน้ำนมมารดาในช่วง colostrum (0-7 วัน) ซึ่งเป็นน้ำนมที่มีปริมาณแร่ธาตุซิลีเนียมสูง

สาเหตุที่ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดามีค่าแตกต่างกันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆดังต่อไปนี้

1. ระยะเวลาการให้นมบุตรจะมีผลต่อความเข้มข้นของปริมาณซิลีเนียมในน้ำนม จากรายงานการวิจัยหลายๆฉบับ ได้กล่าวว่าปริมาณความเข้มข้นซิลีเนียมในน้ำนมมารดาจะมีค่าสูงในช่าง colostrum(0-7 วัน) และจะลดลงเกือบคงที่ในช่วง mature milk (หลังคลอด 2 สัปดาห์)

2. ปริมาณซิลีเนียมในดินมีผลกระทบต่อปริมาณซิลีเนียมในอาหารของพืช และสัตว์ เช่น J. Kumpulainen *et al.* (1985) [20] ได้ทำการศึกษาในเขตพื้นที่ ที่มีปริมาณซิลีเนียมในดินต่ำที่ประเทศ ฟินแลนด์ นิวซีแลนด์ และ จีน พบว่ามีความเข้มข้นปริมาณซิลีเนียมในซีรั่มและในน้ำนมมารดาที่อาศัยบริเวณนั้นมีค่าต่ำกว่าปกติ
3. พฤติกรรมการกินอาหารของแม่และฐานะเศรษฐกิจของครอบครัว ก็มีอิทธิพลต่อปริมาณความเข้มข้นของซิลีเนียมในน้ำนมมารดา ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาเจาะลึกถึงพฤติกรรมการกินและสถานะภาพของอาสาสมัคร
4. ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดามีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นในพลาสมาหรือซีรั่ม

ในการคำนวณหาปริมาณซิลีเนียมที่เด็กได้รับจากการดื่มน้ำนมมารดาต่อวัน ซึ่ง D.A.Jacksonและคณะ(1988) [22] ได้ทำการวิจัยและรายงานผลปริมาณการดื่มน้ำนมของทารกจากมารดาชนบทที่อาศัยในภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 25 คน เมื่อเวลาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 , 2-3 , 4-6 และ 7-9 เดือน พบว่าทารกดื่มน้ำนมมารดามีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 716.8±192.5 , 598.4±90.1 , 741.3±150.7 และ 498.0±182.0 กรัมต่อวันตามลำดับ เมื่อนำเอาค่าปริมาณการดื่มน้ำนมมารดาของทารกในการวิจัยครั้งนี้ มาคำนวณปริมาณซิลีเนียมที่ทารกได้รับจากการดื่มน้ำนมมารดาเพียงอย่างเดียวเมื่อเวลา 2–7 วัน 1 , 3 , 6 และ 9 เดือนของอาสาสมัครมารดาทั้งหมด 12 คน พบว่าทารกได้รับปริมาณซิลีเนียมเฉลี่ยเท่ากับ 21.22±11.61(n=11) , 11.12±8.58(n=10) , 7.71±2.96(n=8) , 8.37±3.92 (n=8) และ 7.24±3.50(n=6) ไมโครกรัมต่อวันตามลำดับ รายละเอียดดูได้ในภาคผนวก 4 จากข้อเสนอแนะของ Food and Nutrition Board, RDA,10 th ed., 1989 [5] กำหนดปริมาณซิลีเนียมที่ทารกควรรับได้คือ 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อวัน สำหรับทารกที่มีอายุ 0-6 เดือนและ 6–12 เดือนตามลำดับ ในการทำวิจัยครั้งนี้พบว่าในระยะ 1 เดือนแรกเด็กจะได้รับปริมาณซิลีเนียมเฉลี่ยที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย แต่เมื่อเวลา 3 ถึง 9 เดือนนั้นทารกจะได้รับปริมาณซิลีเนียมต่ำกว่าเกณฑ์ที่ควรจะได้รับ ดังนั้นทารกที่มีอายุหลัง 3 เดือนควรจะได้รับการพิจารณาเสริมอาหารชนิดอื่นๆที่มีปริมาณซิลีเนียมสูง เช่น เนื้อสัตว์ ปลา และผลิตภัณฑ์จากข้าวสาลี [8] เพิ่มเติมนอกเหนือจากการดื่มน้ำนมมารดา

สรุปผลการทดลอง

ได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำ ของการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมโดยเทคนิค HG-AAS ว่าเหมาะสม ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมมารดาอาสาสมัครจำนวน 12 คน ที่มาคลอดบุตรโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ เมื่อเวลาต่างๆกันของการให้นมบุตร พบว่าน้ำนมมารดาเมื่อเวลา 2-7 วันมีปริมาณซิลีเนียมเฉลี่ยสูงสุดและแตกต่างจากน้ำนมมารดาช่วง mature milk (1 , 3 , 6 และ 9 เดือน)อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนน้ำนมมารดาช่วง mature milk มีปริมาณซิลีเนียมไม่แตกต่างกัน เมื่อคำนวณปริมาณซิลีเนียมที่ทารกจะได้รับต่อวัน พบว่าน้ำนมมารดาในช่วง 1 เดือนแรกมีปริมาณซิลีเนียมเฉลี่ยเพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย แต่ปริมาณซิลีเนียมหลังระยะเวลา 3 ถึง 9 เดือน นั้นทารกจะได้รับปริมาณซิลีเนียมต่ำกว่าเกณฑ์ที่แนะนำเพียงเล็กน้อย ดังนั้นเด็กควรได้รับอาหารเสริมชนิดอื่นๆที่มีปริมาณซิลีเนียมสูง เช่น เนื้อสัตว์ ปลา และผลิตภัณฑ์จากข้าวสาลี เพิ่มเติมนอกเหนือจากการดื่มน้ำนมมารดา

ข้อเสนอแนะ

1) การเก็บตัวอย่างน้ำนม

การเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการครั้งนี้ ได้เก็บตัวอย่างน้ำนมที่เมื่อเวลา 2-7 วัน 1 , 3 , 6 และ 9เดือน โดยคณะผู้วิจัยพยายามเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาให้ได้ครบทุกครั้ง แต่ก็มีปัจจัยบางอย่างที่ทำให้ไม่สามารถที่จะเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาอาสาสมัครได้ครบตลอด 9 เดือน เนื่องมาจากมารดาออกบางคนนั้นออกไปทำงานนอกบ้าน ซึ่งจะมีโอกาสน้อยที่จะเลี้ยงดูบุตรด้วยน้ำนมมารดาได้ครบ 9 เดือน และเมื่อมารดาออกไปทำงานนอกบ้านนั้นจะมีการเลี้ยงนมผงชนิดอื่นเสริมน้ำนมมารดา ทำให้เป็นสาเหตุทำให้น้ำนมมารดาหมดเร็วก่อน 9 เดือน ดังนั้นในการทำวิจัยครั้งต่อไปควรจะเลือกอาสาสมัครที่เป็นแม่บ้านเหมาะสมกว่ามารดาที่ออกไปทำงานนอกบ้าน

2) ควรสัมภาษณ์พฤติกรรมการกินอาหารโดยโภชนากร เพื่อให้ได้ข้อมูลการบริโภคอาหารมาประกอบ การประเมินภาวะโภชนาการอาหารที่กินอาหารของมารดาว่าจะมีความสัมพันธ์ต่อปริมาณความเข้มข้นปริมาณซิลีเนียมเพียงไร แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาตรงจุดนี้ เนื่องจากมีขีดจำกัดในด้านบุคลากร งบประมาณ และเวลาในการทำวิจัย

3) ปริมาณตัวอย่างน้ำนมมารดาที่เก็บจากมารดาอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ พบว่าในการเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาหลังคลอดเมื่อเวลา 2-7 วัน จะมีปริมาณน้ำนมน้อยมาก ซึ่งในมารดาบางรายแทบเก็บตัวอย่างไม่ได้เลย ซึ่งการเก็บน้ำนมมารดาที่ระยะเวลา 2-7 วันนั้นมีความสำคัญต่อการแปลผลการทดลองมาก

4) การวิเคราะห์ปริมาณน้ำนมโดยเทคนิค HG-AAS ในการทำวิจัยครั้งนี้จะใช้น้ำนมตัวอย่างปริมาณ 10 mL ซึ่งจะเป็นปริมาณที่ค่อนข้างมากในการเก็บรวบรวมสารตัวอย่างแต่เทคนิคนี้มีขั้นตอนการทดลองไม่ยุ่งยากนัก ซึ่งหากวิเคราะห์โดยเทคนิค spectrofluorometry จะใช้สารตัวอย่างน้ำนมมารดาประมาณ 4 mL ซึ่งใช้ปริมาณน้อยกว่าเทคนิคนี้ ซึ่งจะแก้ไขปัญหาปริมาณสารตัวอย่างน้ำนมมารดาที่มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ และในการวิเคราะห์ซิลีเนียมด้วยเทคนิค spectrofluorometry มี sentivity ใกล้เคียงกับเทคนิค HG-AAS แต่ทางคณะผู้วิจัยไม่มีเครื่องมือ spectrofluorometer ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงใช้เทคนิค HG-AAS แทน

บรรณานุกรม

1. L. H. Foster and S. Sumar , *Food Chem.*, (1995) , 53 , 453 – 466.
2. K. Pyrzynska , *Anal. Sciences* , (1998) , 14 (6) , 479 – 483 .
3. J. A. Hurlbut , R. G. Burkepile and C. A.Geisler, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, (1992) , 75 (2), 269 – 271.
4. J. A. Hurlbut R. G. Burkepile and C. A. Geisler., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, (1997) , 80 (4) , 709 – 716.
5. M. S. Alaejos and C. D. Romero , *Food Chem.*, (1995) , 52 , 1 – 18 .
6. กรมอนามัยกระทรวงสาธารณสุข " ข้อกำหนดสารอาหารที่คนไทยควรได้รับประจำวัน และแนวทางการบริโภคอาหารสำหรับคนไทย " พิมพ์ครั้งที่ 1 : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก ปี 2532 หน้า 111 –112 .
7. J. R. Bellanger , *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, (1995) , 78(2) , 477 – 480.
8. U. Tinggi , C. Reilly , and C. M. Patterson , *J. Of Food. Comp.and anal.* (1992) , 5 , 269-280.
9. สุพิศ จินดาวณิค " ชีวเคมีคลินิค " เล่ม 2 : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย , หน้า 137.
10. L. Magos and M. Webb , *Crit . Rev. , Toxicol .*, (1990) , 8 , 1.
11. M. Navarro , H. Lopez and M. C. Lopez , *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, (1996) , 79 (3) , 773 – 776 .
12. M. P. Rayman, *The Lancet*, (2000), 356 (15) , 233-241.
13. A. T. Diplock , *Am. J. Clin. Nutr.*, (1987) , 45 ,1313 – 22 .
14. K. A. Anderson and B. Isaacs , *J. Assoc . Off. Anal . Chem .*, (1993) , 76 (4) , 910 –912 .
15. R. M. Olivas and O. F. X. Donard , *Anal. Chim . Acta* , (1994) , 286 , 357 – 370.
16. M. R. L'Abbe , K. D. Trick and A. Koshy , *J. Food Comp . and Anal.* , (1996) , 9 , 119 – 126.
17. Tamari Y. and Kim E. S., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 1999 Nov ; 13(3) :129 – 33.
18. Li F., Rossipal E., Irgolic K.J , *J. Agric Food Chem* , 1999 Aug ; 47(8) : 3265 – 8.
19. Zachara B.A., Pilecki A., *Environ Health Perspect* ., 2000 Nov ; 108(11) : 1043 - 6.

20. J. Kumpulainen , L. Salmenpera , M. A. Siimes , *et al* ., *Am. J. Clin. Nutr.* , 1985 ; 42 : 829 -35.

21. T . W. May , *J. Assoc. Off. Anal .Chem.*, (1982) ,65 (5) , 1140 – 1145 .

22. D. A. Jackson , S.M. Imong , A. silprasert , S. Preunglumpoo , P. Leelapat , Y. Yootabootr and K. Amatayakul , *British Journal of Nutrition.* (1988) , 59 , 365-371.

ภาคผนวก

1. ตัวอย่างการคำนวณการหาเปอร์เซ็นต์ recovery ใน standard reference material (SRM)

จากผลกาทดลองตารางที่ 4 SRM 1549 (Non-fat milk powder) มีค่าcertified เท่ากับ 0.11 $\pm$ 0.1 ug/g เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.12 ug/g

$$\% \text{ recovery} = \frac{(\text{ปริมาณซิลีเนียมที่ได้จากการทดลอง} \times 100)}{\text{ปริมาณซิลีเนียมค่าcertified}}$$

$$= \frac{(0.12 \times 100)}{0.11}$$

$$= 109.09$$

2. ตัวอย่างการคำนวณการหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของเทคนิค HG-AAS

การหาเปอร์เซ็นต์ recovery ทำโดยนำนมซิมิแลคแอดวานซ์ ที่มีปริมาณซิลีเนียมเข้มข้นเท่ากับ 6.66 ng/mL มาเติมสารมาตรฐานซิลีเนียม 4.14 ng/mL ได้ค่า expect value เท่ากับ 10.80 ng/mL (6.66 + 4.14) เมื่อทำการวิเคราะห์ได้ปริมาณซิลีเนียมโดยเทคนิค HG-AAS ได้เท่ากับ 10.87 ng/mL (ค่า experimental value) ดังแสดงในตารางที่ 5

$$\% \text{ recovery} = \frac{(\text{experimental value} \times 100)}{\text{expected value}}$$

$$= \frac{(10.87 \times 100)}{10.80}$$

$$= 100.65$$

3. ตัวอย่างการคำนวณการหาความแม่นยำของเทคนิค HG-AAS

ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในนมซิมิแลคแอดว้านซ์ จำนวน 11 ครั้ง ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ได้ค่าปริมาณซิลีเนียมเฉลี่ย(Mean)เท่ากับ18.23 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD)เท่ากับ 1.70 ดังแสดงในตารางที่ 6

$$\% \text{ coefficient of variance(\%CV)} = \frac{\text{SDx100}}{\text{Mean}}$$

$$= \frac{1.70 \times 100}{18.23}$$

$$= 9.32$$

4. การคำนวณปริมาณซิลีเนียมที่ทารกได้รับจากน้ำนมมารดาต่อวัน

การคำนวณปริมาณซิลีเนียมที่ทารกได้รับจากน้ำนมมารดาเมื่อเวลาต่างๆกันของการให้นมบุตร ซึ่ง D.A.Jackson และคณะ(1988) [22] ได้ทำการวิจัยและรายงานผลปริมาณการดื่มน้ำนมมารดา ของทารกจากมารดาที่อาศัยในชนบทภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 25 คน เมื่อเวลาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 , 2-3 , 4-6 และ 7-9 เดือน พบว่าทารกดื่มน้ำนมมารดามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 716.8±192.5 , 598.4±90.1 , 741.3±150.7 และ 498.0±182.0 กรัมต่อวันตามลำดับ เมื่อนำค่าปริมาณการดื่มน้ำนมของทารกจากรายงานฉบับนี้ มาคำนวณปริมาณซิลีเนียมที่ทารกได้รับจากน้ำนมมารดาเพียงอย่างเดียวในแต่ละวัน จะได้ดังแสดงในตารางที่ 9 และทารกที่มีอายุช่วง 0–6 เดือน และ 6-12 เดือนควรจะได้รับปริมาณซิลีเนียมมีค่าเท่ากับ 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อวันตามลำดับ [5,6]

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมที่ทารกได้รับต่อวัน

การคำนวณ เช่น น้ำนมมารดา code 1 ที่เก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาเมื่อเวลา 2-7 วัน นำมาวิเคราะห์ปริมาณซิลีเนียมในน้ำนมได้ค่าเท่ากับ7.30 ng/mL (จากตารางที่ 7) และคาดว่าทารกจะได้รับปริมาณน้ำนมมารดาเมื่อระยะเวลา 2-7 วันเท่ากับ 716.8 กรัมต่อวัน(ในการคำนวณคาดว่าน้ำนมมารดา 716.8 g มีค่าปริมาตรเท่ากับ 716.8 mL)

<u>วิธีการคำนวณ</u>

น้ำนมปริมาณ 1 mL มีปริมาณซิลีเนียมเท่ากับ	7.30	ng
น้ำนมปริมาณ 716.8 mL มีปริมาณซิลีเนียมเท่ากับ	7.30x716.8	
	= 5232 .64	ng
	= 5.23264	ug

นั่นคือทารกที่ดื่มน้ำนมมารดาจะได้รับปริมาณซิลีเนียม
เท่ากับ 5.23 ไมโครกรัมต่อวัน

ตารางที่ 9 ปริมาณซิลีเนียมที่ทารกได้รับจากการดื่มน้ำนมมารดาในแต่ละวัน

Code	ปริมาณซิลีเนียมที่เด็กได้รับ (ไมโครกรัมต่อวัน)				
	2-7 วัน	1 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน
1	5.23	*	*	*	*
2	**	3.28	2.90	6.54	4.75
3	39.32	13.05	8.37	14.04	13.71
4	12.92	13.93	11.15	11.55	5.86
5	12.02	8.44	6.02	4.14	*
6	21.78	9.47	*	*	*
7	24.02	7.51	7.22	5.22	5.55
8	28.46	9.04	10.12	12.02	*
9	42.33	33.70	*	*	*
10	16.67	8.44	*	*	*
11	12.38	***	5.05	3.95	4.76
12	18.07	4.39	10.87	9.50	8.78
N	11	10	8	8	6
Mean	21.22	11.12	7.71	8.37	7.24
SD	11.61	8.58	2.96	3.92	3.50

หมายเหตุ

* หมายความว่าไม่สามารถเก็บตัวอย่างน้ำนมมารดาได้เพราะน้ำนมมารดาหมดหรือมารดาเลี้ยงนมชนิดอื่นแทนนมมารดา

** หมายความว่าไม่สามารถเก็บน้ำนมมารดาได้เพราะมารดาเข้าร่วมโครงการตั้งแต่เดือนที่ 1 หลังจากคลอดบุตร

*** หมายความว่าไม่สามารถเก็บน้ำนมมารดาได้เพราะมารดาได้ย้ายไปอยู่ต่างจังหวัดเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน