คณะ, 2544; วงศ์พันธ์ และคณะ, 2543) และยังเป็นพิษอย่างร้ายแรงต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง tetramethyl lead [$Pb(CH_4)_4$] และ tetraethyl lead [$Pb(C_2H_5)_4$] เป็นสารประกอบอินทรีย์ของตะกั่วที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมากที่สุด

ทิพวรรณ และคณะ (2538) รายงานว่า ระดับตะกั่วในเลือดของเจ้าหน้าที่ตำรวจจราจรในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ มีสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเจ้าหน้าที่ตำรวจจราจรมีความเสี่ยงสูงต่อการสัมผัสตะกั่วเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากมีการสัมผัสมลสารทางอากาศอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานขณะปฏิบัติงาน ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vaglenov และคณะ (2001) ที่ศึกษาความผิดปกติของยีนในคนงานที่สัมผัสตะกั่วเป็นระยะเวลานานโดยใช้วิธี lymphocyte micronucleus test พบว่ามีการเกิดไมโครนิวเคลียสขึ้นสัมพันธ์กับระดับตะกั่วในเลือดที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

แคดเมียม

แคดเมียมเป็นโลหะหนักแต่เนื้ออ่อนมีน้ำหนักอะตอม 112.4 อยู่ในกลุ่ม II b ของตารางธาตุ มีวาเลนซี 2 มีจุดหลอมเหลวต่ำ จึงระเหิดกลายเป็นไอด้วยความร้อนได้ง่าย

แหล่งที่เกิด : ได้มีการนำโลหะแคดเมียมมาใช้แทนอะลูมิเนียม เหล็กสแตนเลส และสังกะสีในการฉาบวัสดุที่เป็นโลหะต่าง ๆ เช่นเครื่องมือไฟฟ้า อุปกรณ์การผลิตพลาสติกพีวีซี โลหะผสมต่าง ๆ ท่อโลหะทองแดง น้ำยาเคลือบไม้ สีและน้ำยากันสนิม เป็นต้น

เมตะบอลิสม์และความเป็นพิษ

แคดเมียมจะเข้าปอดในลักษณะของฝุ่นละอองหรือไอโลหะ ในทางเดินอาหาร แคดเมียมจะถูกดูดซึมเข้าไปได้ประมาณร้อยละ 8 เมื่อเข้าสู่กระแสเลือดแคดเมียมร้อยละ 84 จะถูกพาไปที่ไตและตับ ที่เหลือจะไปที่กระดูกและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ทำให้มีอาการบวมที่ปอด ไต และหัวใจ เข้าใจว่าแคดเมียมคงไปรวมกับหมู่ –SH ในโปรตีนของเซลล์ต่าง ๆ

ที่ไต แคดเมียมจะรวมกับโปรตีนของเซลล์ส่วนที่เป็น cortex มากกว่าส่วน medulla โดยแคดเมียมจะจับกับ metallothionine ในกรณีที่เริ่มมีความผิดปกติของหลอดไต ถ้าตรวจเลือดจะพบปริมาณแคดเมียมในเลือดสูงถึง 200 ส่วนต่อล้านส่วน ระดับนี้เป็นระดับต่ำสุดที่แสดงความเป็นพิษของแคดเมียม การที่แคดเมียมจับกับโปรตีนหรือเอ็นไซม์ในหน่วยกรองและหลอดไตนี่เอง จึงทำให้หน้าที่ของไตทั้งระบบ ได้แก่การกรองสารและการดูดสารกลับคืนเสียหายและขาดการควบคุม ผลก็คือมีภาวะ proteinuria, glucosuria และ aminoaciduria (ไมตรี, 2534)

แคดเมียมในบรรยากาศส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปฝุ่นหรือไอ และอยู่ในรูปอนุภาคมลสารซึ่งมีขนาดเล็ก จึงมีการผ่านเข้าสู่ระบบหายใจส่วนล่างและคงอยู่ในส่วนนั้นได้นาน อันตรายจากการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หายใจเอาฝุ่น ควัน และไอของแคดเมียมเข้าไปสามารถส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ โดยแคดเมียมสามารถสะสมอยู่ในไต ทำลายเซลล์ท่อไต และมีผลต่อกระดูกทำให้กระดูกผุกร่อน หักง่าย เกิดอาการปวดอย่างรุนแรง (สุธีลา และคณะ, 2544; วงศ์พันธ์ และคณะ, 2543) นอกจากนี้ สามารถทำให้เกิดอาการแพ้แบบเฉียบพลัน ซึ่งเกิดที่ระบบทางเดินหายใจ ทำให้จมูกและคออักเสบ แน่นหน้าอก หายใจขัด ปอดบวม และเสียชีวิตได้ สำหรับพิษเรื้อรังจะมีความผิดปกติที่ปอด เยื่อปอดถูกทำลาย ถุงลมโป่งพองรวมถึงส่งผลต่อการเกิดโรคมะเร็งปอดได้ (สุธีลา และคณะ, 2544; วงศ์พันธ์ และคณะ, 2543) จากรายงานของ Fatur และคณะ (2002) ซึ่งทำการศึกษาความผิดปกติของยีนส์ใน human hepatoma cells (HepG2) เมื่อได้รับแคดเมียม พบว่าแคดเมียมสามารถทำให้เกิด DNA damage ใน HepG2 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาไมโครนิวเคลียสใน human diploid fibroblasts (MRC-5) ของ Seoane และคณะ (2001) ที่พบว่าแคดเมียมสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสะสมตะกั่วและแคดเมียมในร่างกาย

มีรายงานแสดงว่า (สุธีลา และคณะ, 2544; วิยะดา และคณะ, 2544; วงศ์พันธ์ และคณะ, 2543) ฝุ่นละอองที่เกิดจากแร่หินและโลหะหนัก รวมทั้งตะกั่วและแคดเมียมสามารถพบได้ตามถนนหนทางที่มีการก่อสร้างและในเมืองที่มีการจราจรคับคั่ง ซึ่งมีระดับตะกั่วสูงเมื่อเปรียบเทียบกับนอกเมือง รายงานของ Buckley และคณะ (1997) ได้ศึกษาปริมาณของมลสารหลายชนิดในเขตเมือง Lower Gio Grande Valley มลรัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1993 พบว่ามีระดับตะกั่วและแคดเมียมปริมาณสูงในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของประชากรที่อาศัยอยู่ในเขตเมือง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2001) ที่ศึกษาความเข้มข้นของโลหะหนักในฝุ่น ในเขตเมืองปักกิ่ง ประเทศจีน ในปี ค.ศ. 1997 พบว่ามีระดับตะกั่วและแคดเมียมในปริมาณสูงเช่นกัน

Fortoul และคณะ (1996) ได้ศึกษาปริมาณโลหะหลายชนิดที่สะสมในปอดของคนที่เสียชีวิตทั้งหญิงและชาย ที่อาศัยในย่านชุมชนของเมืองเม็กซิโก ในช่วงปี ค.ศ. 1980s พบว่ามีระดับของตะกั่วและแคดเมียมในปริมาณที่สูงแตกต่างจากระดับที่ตรวจพบในปอดของประชากรที่อาศัยในช่วงปี ค.ศ.1950s อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบตะกั่วและแคดเมียมในเลือด ตับ ไต และปอดของนกพิราบที่อาศัยในบริเวณการจราจรพลุกพล่านว่ามีปริมาณสูงกว่าในนกพิราบที่อาศัยอยู่บริเวณอื่น (Schilderman *et al.*, 1997)

Wasiak และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาโลหะหนักที่สะสมในเส้นผมของประชากรที่อาศัยอยู่ในเขตที่มีมลภาวะทางอากาศในการทำงาน พบว่ามีระดับตะกั่วและแคดเมียมในปริมาณสูง โดยพบตะกั่วสูงถึง 288.7 ไมโครกรัมต่อเส้นผม 1 กรัม และระดับแคดเมียมสูงถึง 40.0 ไมโครกรัมต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เส้นผม 1 กรัม สอดคล้องกับการศึกษาของ Kubova และคณะ (1997) ที่ตรวจวัดโลหะหนักที่สะสมในเส้นผมของประชากรที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่มีความแตกต่างกันของมลภาวะทางอากาศในเมือง Banska Stiavnica ประเทศโปแลนด์ พบว่ามีระดับตะกั่วและแคดเมียมปริมาณสูงแตกต่างกันอย่างชัดเจน

Appleton และคณะ (2000) ได้ศึกษาความเข้มข้นของโลหะหนักในฟันของหนูชนิด bank vole (*Clethrionomys glareolus*) ในประเทศโปแลนด์ ระหว่างปี ค.ศ.1996-1997 พบว่ามีตะกั่วและแคดเมียมสูงในฟันของหนู Bank Voles ที่อาศัยอยู่ในเขตที่มีมลภาวะทางอากาศ โดยระดับตะกั่วสูงถึง 80.2±5.6 ไมโครกรัมต่อฟัน 1 กรัม และระดับแคดเมียมสูงถึง 2.80±0.99 ไมโครกรัมต่อฟัน 1 กรัม

Thompson และคณะ (1999) ได้ศึกษาพบว่าตะกั่วและแคดเมียมในเลือดนก *Haematopus ostralegus finschi* ในประเทศนิวซีแลนด์ ที่อาศัยในแหล่งที่มีปัญหามลภาวะทางอากาศ มีระดับตะกั่วปริมาณสูงถึง 143.1 นาโนกรัม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dmuchowski และคณะ (1995) ที่ศึกษาระดับโลหะหนักในพืชชนิด Scots pine needles ระหว่างปี ค.ศ. 1983-1985 ในประเทศโปแลนด์ พบว่ามีตะกั่วและแคดเมียมในปริมาณสูงในพืชจากแหล่งชุมชนที่มีมลภาวะทางอากาศ นอกจากนี้ Viksna และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาระดับตะกั่วและแคดเมียมในกลุ่มแม่และเด็กของประเทศโปแลนด์ ในปี ค.ศ. 1994 พบว่าระดับตะกั่วและแคดเมียมมีปริมาณสูงแตกต่างในกลุ่มแม่และเด็กในประเทศสวีเดน ซึ่งคาดว่าอาจจะเป็นผลจากการสะสมตะกั่วและแคดเมียมที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม

การตรวจวิเคราะห์ตะกั่วและแคดเมียม

การวิเคราะห์ตะกั่วและแคดเมียมมีหลายวิธี แต่วิธีที่แน่นอนและใช้กันมากที่สุดคือ graphite furnace atomic absorption spectrometry เป็นวิธีการที่อาศัยการเปล่งแสงของอะตอมเมื่อถูกความร้อนสูง ๆ และการวัดการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่นช่วงใดช่วงหนึ่งอย่างจำเพาะ โดยอะตอมอิสระจะสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับธาตุที่อยู่ในสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ความไวในการวิเคราะห์จะดีขึ้นเมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ทั้งหมดถูกทำให้เป็นอะตอมอิสระได้ในเวลาเดียวกัน และอยู่ในเส้นผ่านของลำแสงนานขึ้น ในการตรวจวัดสารละลายปริมาณน้อยหลังจากการบรรจุสารละลายตัวอย่างเข้าไปในหลอดกราไฟท์แล้ว หลอดกราไฟท์ในเตาเผาจะถูกทำให้ร้อนโดยกระแสไฟฟ้าใน argon chamber เพื่อกำจัดตัวทำละลายและสารอื่นที่ปนเปื้อนออกในขั้นตอนของการทำให้สารละลายตัวอย่างแห้งและเป็นเถ้า ก๊าซอาร์กอนจะป้องกันหลอดกราไฟท์จากการถูกออกซิไดซ์เมื่ออุณหภูมิสูง และช่วยกำจัดสิ่งปนเปื้อนอันเนื่องมาจากเมทริกซ์ (matrix)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และสารอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องออกจากเส้นทางเดินของลำแสงได้ดี และขั้นสุดท้ายคือทำให้เกิดอะตอมที่สภาวะ ground state การแตกตัวของโมเลกุลเป็นอะตอมนี้ (atomization) ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ทำให้เกิดอะตอมอิสระและระยะเวลาของอุณหภูมิในแต่ละขั้นของการปรับอุณหภูมิให้สูงขึ้นทำให้ธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ถูกเปลี่ยนเป็นอะตอมได้หมดอยู่ภายในหลอดกราไฟท์ในเส้นทางที่ลำแสงผ่าน

ความร้อนจากกระแสไฟฟ้าที่ทำให้อุณหภูมิของการเผาสารตัวอย่างในหลอดกราไฟท์มีค่าแตกต่างกันในระยะเวลาต่าง ๆ จะทำให้เกิดปฏิกิริยาขึ้น 3 ขั้นตอน คือ

1. การทำให้แห้ง (drying stage) : โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 80-200 องศาเซลเซียส นานประมาณ 20-30 วินาที เพื่อระเหยตัวทำละลายหรือเมทริกซ์ที่ระเหยง่าย สารตัวอย่างจะเป็นแผ่นบางเคลือบอยู่บนผนังด้านในของหลอดกราไฟท์

2. การทำให้เป็นเถ้า (ashing stage) : ขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิสูงขึ้น เพื่อกำจัดเมทริกซ์ออกให้มากที่สุดโดยไม่สูญเสียธาตุที่จะวิเคราะห์ โดยโมเลกุลของสารตัวอย่างจะแตกสลายออกไปเหลือแต่สารอนินทรีย์ที่เสถียรเท่านั้น อุณหภูมิขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 350-1,600 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนนี้อาจมีการสูญเสียสารที่วิเคราะห์ถ้าใช้อุณหภูมิที่เผาสูงเกินไปหรือเผานานเกินไป

3. การทำให้เกิดอะตอม (atomizing stage) : เป็นขั้นตอนสุดท้าย หลอดกราไฟท์จะถูกทำให้ร้อนขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิสูงถึง 2,000-3,000 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เกิดการแตกตัวเป็นอะตอมอิสระซึ่งเกิดขึ้นในช่องทางที่แสงผ่าน ทำให้สามารถวัดสัญญาณการดูดกลืนแสงได้ ปริมาณการดูดกลืนแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณธาตุในสารตัวอย่างนั้น

การทดสอบไมโครนิวเคลียส

การสัมผัสตะกั่วและแคดเมียมแบบต่อเนื่องอย่างเรื้อรังสามารถทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมได้ (WHO, 1995a ; 1995b) โดยส่งผลทำให้โครโมโซมขาด และชิ้นส่วนของโครโมโซมมีการแตกหักแยกหลุดออกจากโครโมโซมตัวใดตัวหนึ่ง เมื่อมีการแบ่งเซลล์ได้เซลล์ลูกจะพบว่าเซลล์ลูกมีนิวเคลียสเล็ก ๆ อยู่ในไซโตพลาสซึม นอกเหนือจากนิวเคลียสใหญ่ซึ่งเป็นที่รวมกลุ่มของโครโมโซมส่วนใหญ่ นิวเคลียสเล็ก ๆ ที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า ไมโครนิวเคลียส (micronucleus) การทดสอบไมโครนิวเคลียสจึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ทดสอบการเกิดความผิดปกติของโครโมโซม

จากรายงานของ Ieradi และคณะ (1996) ที่ได้ศึกษาถึงความผิดปกติของยีน โดยใช้การทดสอบไมโครนิวเคลียสพบว่าหนูที่อาศัยในบริเวณที่มีการจราจรคับคั่ง มีความถี่ของการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่อาศัยในบริเวณที่มีการจราจรเบาบาง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhou และคณะ (1998) ที่เหนี่ยวนำการเกิดไมโครนิวเคลียสโดยอนุภาคฝุ่นจากท่อไอเสียของยานพาหนะ พบว่าในอนุภาคฝุ่นมีสารพิษที่สำคัญที่สามารถทำให้เกิดความผิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปกติของโครโมโซมและเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสสูงขึ้นได้ โดยโลหะสำคัญที่ปนเปื้อนในอากาศเนื่องจากยวดยานพาหนะและสามารถก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้หากมีการสัมผัสเป็นระยะเวลานาน รวมถึงโรคระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ ตะกั่วและแคดเมียมซึ่งปนเปื้อนรวมกับอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน (สุธีรา และคณะ, 2544)

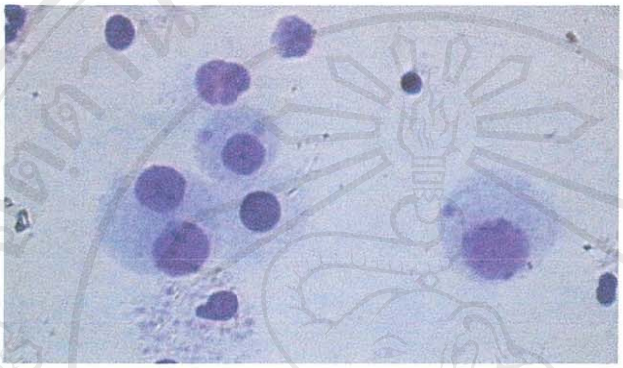
จากรายงานของ Humfrey และคณะ (1996) ที่ได้ศึกษาการเหนี่ยวนำไมโครนิวเคลียสของอนุภาคฝุ่นโดยใช้ human cell line พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มสูงขึ้นได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Guimaraes และคณะ (2000) ที่ทำการศึกษา *Trasdescantia*-micronucleus (Trad-MCN) ในประเทศบราซิลในปี ค.ศ. 1998 ถึง 1999 พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสสูงขึ้นในพืชเขตบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่นเมื่อเปรียบเทียบกับเขตที่มีการจราจรเบาบาง รวมถึงรายงานของ Zhao และคณะ (2002) ที่ได้ทำการศึกษาความผิดปกติของยีนในหนูขาวโดยอนุภาคฝุ่นบริเวณเขตที่มีการจราจรหนาแน่นในประเทศจีน ในปี ค.ศ. 1992 ถึง 1993 พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มสูงขึ้น

การทดสอบไมโครนิวเคลียสเป็นวิธีทดสอบการกลายพันธุ์ซึ่งเป็นการทดสอบโดยอ้อมเพื่อดูความเสียหายที่เกิดขึ้นกับโครโมโซม เมื่อเซลล์สัตว์หรือคนได้รับสารเคมี วิธีนี้สามารถที่จะตรวจสอบได้ทั้งสารเคมีชนิดที่ไม่มีผลทำให้โครโมโซมแตกหัก คือสารพวก clastogens และสารเคมีที่มีผลต่อสายใย (spindle apparatus) ทำให้สายใยทำหน้าที่ไม่ดีหรือไม่ก่อรูปขึ้นมา สารพวกนี้คือพวก spindle poison การทดสอบวิธีนี้ทำได้ง่าย สะดวก รู้ผลเร็ว ประหยัด และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง สามารถทำได้ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) วิธีทดสอบในหลอดทดลองนั้นสามารถทำได้ในเซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่แบ่งตัวได้ดี ทั้งเซลล์พืช สัตว์ และคน ในสัตว์ทดลองไมโครนิวเคลียสสามารถเกิดได้ในเซลล์ที่ยังไม่มีการแบ่งตัว เช่น เซลล์บุช่องปาก เซลล์สืบพันธุ์ของตัวผู้ เซลล์บุลำไส้ใหญ่ส่วน Crypt of Liberkhun และเซลล์จากไขกระดูกโดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นต้น ในหลอดทดลองเซลล์ที่นิยมใช้ได้แก่ เซลล์บุช่องปาก และเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต ซึ่งสามารถนำมาทดสอบได้ง่าย

หลักการทดสอบไมโครนิวเคลียสซึ่งเป็นนิวเคลียสที่มีขนาดเล็ก เป็นส่วนหนึ่งของนิวเคลียสใหญ่ แตกและหลุดออกมาอยู่ในไซโตพลาสซึม เกิดขึ้นเมื่อนิวเคลียสได้รับอันตรายจากสารเคมี ดังนั้นเนื้อของนิวเคลียสเล็กคือ นิวเคลียสโครมาตินนั่นเอง ไมโครนิวเคลียสเกิดจากการที่โครโมโซมบางส่วนมีการแตกหัก หลุดออกมาโดยส่วนที่แตกหักนี้จะไม่กลับไปเชื่อมต่อกับส่วนของโครโมโซมที่หลุดออกมา เมื่อโครโมโซมมีการซ่อมแซมจึงทำให้โครโมโซมส่วนนี้หลุดลอยออกไปอยู่ในไซโตพลาสซึมเห็นเป็นนิวเคลียสเล็ก ๆ นอกจากนี้ยังเกิดได้โดยโครโมโซมตัวใดตัวหนึ่งไม่เคลื่อนที่ไปยังขั้วของมัน หรือเคลื่อนตัวไปช้ากว่าปกติในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว อยู่ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระยะ anaphase ซึ่งเกิดเนื่องจากสายใยของมันได้รับความเสียหาย ทำหน้าที่บกพร่อง ทำให้โครโมโซมตัวนี้ลอยอยู่ในไซโตพลาสซึม ไม่เข้าไปรวมตัวกับนิวเคลียสใหญ่ของเซลล์ ไมโครนิวเคลียสส่วนใหญ่จะเห็นเป็นลักษณะกลม อาจมีลักษณะอื่นได้เช่นกันแต่น้อย ขอบเขตชัดเจน และเรียบ ติดสีเช่นเดียวกับนิวเคลียสใหญ่ แต่มีขนาดเล็กมาก ดังตัวอย่างในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

การเพิ่มขึ้นของยวดยานพาหนะในจังหวัดเชียงใหม่จนเป็นสาเหตุให้เกิดการจราจรหนาแน่นในปัจจุบัน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ย่อมมีผลกระทบต่อสุขภาพของชาวเชียงใหม่ ปริมาณโลหะที่ปนเปื้อนก็อาจมีมาก และอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ประชากรจังหวัดเชียงใหม่มีปัญหาด้วยโรคทางเดินหายใจ และเป็นมะเร็งปอดเพิ่มขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาดังนี้

1. ทดสอบอนุภาคฝุ่นรวมที่เก็บจากบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่นในจังหวัดเชียงใหม่ว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ได้หรือไม่
2. วัดปริมาณโลหะตะกั่วและแคดเมียมที่มีปนเปื้อนในอากาศจังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี Zeeman-graphite furnace atomic absorption spectrometry
3. ทดสอบหาปริมาณโลหะตะกั่วและแคดเมี่ยมที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์การวิจัยและสารเคมี

อุปกรณ์การวิจัย

1. Graphite furnace atomic absorption spectrometer แบบ Zeeman-background correction (Zeeman-GFAAS) รุ่น Varian SpectraA800Z พร้อมทั้ง GTA-100 graphite tube atomizer และ autosampler โดยมี SpectraAA sofe-ware ควบคุมร่วมกับ soft-ware OS/2 ผ่านระบบคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์และเก็บข้อมูล (Varian®, Autralia)
2. Hollow cathode lamp สำหรับตะกั่วและแคดเมียม (Varian®, Autralia)
3. Pyrolytically coated partition grahite tube (Varian®, Germany)
4. Hot plate (HS-115, Thailand)
5. Automatic pipette ขนาด 1-10, 1-100 และ 100-1,000 ไมโครลิตร (Socorex®, Switzerland)
6. Screw cap tube ขนาด 50 มิลลิลิตร (Pyrex®, USA)
7. Beaker ขนาด 250 มิลลิลิตร (Pyrex®, USA)
8. Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร (Pyrex®, USA)
9. Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร (Pyrex®, USA)
10. Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร (TPP®, Switzerland)
11. Syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 22 (Nipro®, Thailand)
12. Glass slide ขนาด 1 x 3 นิ้ว (Soil Brand®, China)
13. Pasture pipette (Pyrex®, USA)
14. Couplin jar (Pyrex®, USA)
15. Paminar flow (NuAire®, USA)
16. Vortex (VM-300®, Taiwan)
17. Centrifuge (Kubota® 5920, Japan)
18. CO_2 incubator (NuAire®, USA)
19. Light microscope, phase contrast (Olympus®, Japan)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี

1. Standard lead solution (Merck®, Germany)
2. Standard cadmium solution (Merck®, Germany)
3. Concentrated Nitric Acid (Merck®, Germany, trace metal analysis grade)
4. Ammonium dihydrogen phosphate (Sigma®, USA)
5. Hydrogen peroxide (Merck®, Germany)
6. Triton X-100 (Merck®, Germany)
7. RPMI 1640 (Seromed®, Germany)
8. Fetal calf serum (Starrate®, Australia)
9. Phytoheamagglutinin (Seromed®, Germany)
10. Mitomycin C (Kyowa®, Japan)
11. Cytochalasin B (Sigma®, USA)
12. Sodium chloride (Sigma®, USA)
13. Potassium chloride (Sigma®, USA)
14. Di-sodium hydrogenphosphate dihydrate (Sigma®, USA)
15. Potassium dihydrogenphophate (Sigma®, USA)
16. Sodium bicarbonate (Sigma®, USA)
17. Gracial acetic acid (Merck®, Germany)
18. Penicilin (M&H®, Thailand)
19. Streptomycin (M&H®, Thailand)
20. Heparin (Leo®, Denmark)
21. 95% Ethanol (Merck®, Germany)
22. Giemsa stain (Merck®, Germany)
23. Lead acetate (Merck®, Germany)
24. Cadmium acetate (Ajax®, Australia)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารละลาย

Working modifier

ใช้ 10 % Triton X-100 25 ml , 20 % $NH_4H_2PO_4$ หรือ 20% $(NH_4)_2HPO_4$ 5 ml, HNO_3 เข้มข้น 1 มิลลิลิตร เติมน้ำบริสุทธิ์ปราศจากอิออนให้ได้ 500 มิลลิลิตร

Rinse solution

ใช้ 0.01% HNO_3 ผสมกับ 0.005% Triton X-100

การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ และสารละลายที่ใช้ในการวิจัย

เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic techique) ซึ่งน้ำยาเพาะเลี้ยงประกอบด้วยสารละลาย RPMI 1640 ผสมยาปฏิชีวนะ streptomysin และ penicilin และ fetal calf serum 20% ซึ่งมีวิธีเตรียมดังนี้

RPMI 1640

เตรียมผงสำเร็จรูป RPMI 1640 น้ำหนัก 10.4 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติม sodium bicarbonate 1.2 กรัม เติม pennicillin 100,000 IU เติม Streptomycin 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองน้ำยาเลี้ยงเซลล์ด้วย sterile filter 0.2 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

20% fetal calf serum

นำ fetal calf serum ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาผสมกับ RPMI 1640 ที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว จำนวน 80 มิลลิลิตร

Phytoheamagglutinin

ละลายผง PHA-L 1 ขวด ขนาด 5 มิลลิกรัมด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Mitomycin C

ละลายผง mitomycin C 1 ขวด ขนาด 10 มิลลิกรัมด้วยน้ำกลั่น sterile 10 มิลลิลิตร เพื่อเป็น stock solution เตรียม mytomycin C เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เป็น positive control สำหรับเติมในหลอดเลี้ยงเซลล์ 50 ไมโครลิตรเพื่อที่จะให้ได้สาร mitomycin C ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Lead acetate

ละลายด้วยน้ำกลั่น เพื่อเตรียมสารละลายตามความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วกรองด้วย sterile filter 0.2 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Cadmium acetate

ละลายด้วยน้ำกลั่น เพื่อเตรียมสารละลายตามความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วกรองด้วย sterile filter 0.2 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Phosphate buffer solution (PBS)

ละลายสารต่อไปนี้ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NaCl	8 กรัม
KCl	0.2 กรัม
$Na_2HPO_4.2H_20$	1.15 กรัม
KH_2PO_4	0.2 กรัม

Hypotonic solution (0.075 M KCl)

ละลายผง KCl 5.62 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

Cornoy fixative

ผสม 95% ethanol กับ acetic acid อัตราส่วน 3: 1 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

Weise buffer solution (สำหรับเซลล์)

ละลายสารต่อไปนี้ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

$Na_2HPO_4.2H_20$	1.14 กรัม
KH_2PO_4	0.49 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวิจัย

การกำหนดเขตศึกษา

ทำการสำรวจการจราจรในพื้นที่เขตเทศบาลนครเชียงใหม่เพื่อศึกษาความหนาแน่นของการจราจรว่ามีมากน้อยเพียงไร เพื่อนำมากำหนดเป็นเขตควบคุมและเขตศึกษา

เขตควบคุม คือเขตที่มีการจราจรเบาบางกว่าเขตศึกษา และมีประชากรอยู่อาศัยเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมงต่อวัน ลักษณะความเป็นอยู่ของประชากรในเขตควบคุมมีความคล้ายคลึงกับประชากรเขตศึกษา โดยเขตศึกษากับเขตควบคุมมีลักษณะแตกต่างกันที่ความหนาแน่นของการจราจรเท่านั้น

เขตศึกษา คือเขตที่มีการจราจรคับคั่ง และมีประชากรอยู่อาศัยเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมงต่อวันเช่นเดียวกับเขตควบคุม

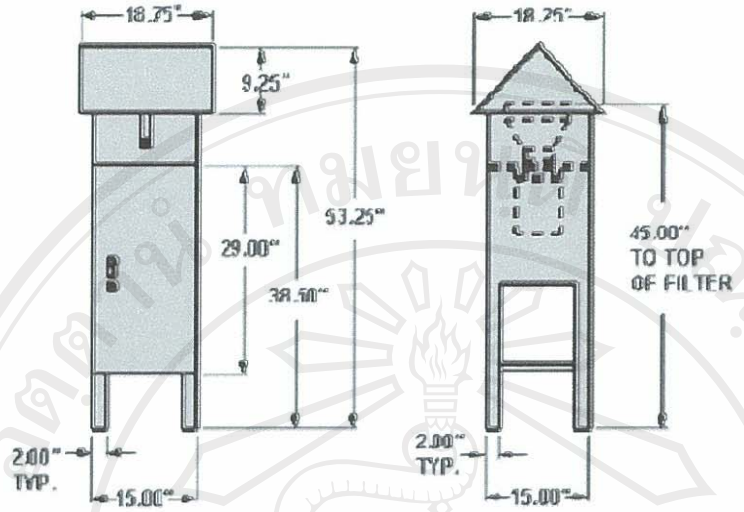
การสำรวจความหนาแน่นของการจราจรว่ามีมากน้อยเพียงใดทำโดยการนับจำนวนรถยนต์ที่แล่นผ่านไปมาบริเวณเขตควบคุมและเขตศึกษา รวมทั้งรถมอเตอร์ไซค์และรถยนต์ที่แล่นผ่านไปมามีทั้งรถ 3 ล้อ 4 ล้อ และ 6 ล้อขึ้นไป การนับนับติดต่อกันเป็นเวลา 1 อาทิตย์ทุกวัน ๆ ละ 1 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 11.00 – 12.00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีการจราจรปกติ 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 เขตในวันเดียวกัน 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

รูปที่ 3 การตั้งเครื่องเก็บอากาศจุดที่ 1 บริเวณตลาดหางดงซึ่งเป็นเขตควบคุม

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 วาง ณ บริเวณทางเท้าริมแม่น้ำปิงใกล้ป้อมตำรวจจราจร (รูปที่ 5) ซึ่งเป็นบริเวณที่โล่งห่างจากชายคา 3 เมตร และเป็นบริเวณที่มีการจราจรหนาแน่น การเคลื่อนตัวของรถไปตามถนนช้ามาก จุดตั้งเครื่องที่ 2 เป็นบริเวณทางเท้าฝั่งตรงข้ามริมแม่น้ำปิงใกล้ป้อมตำรวจ (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) ในเครื่อง ใช้สำหรับการวิเคราะห์ตะกั่วและแคดเมียม ภายในหลอดไฟ hollow cathode บรรจุก๊าซนีออน และใช้ pyrolytically coated partition grahite tube (Varian®, Germany) เป็น atomizer

การเตรียมเครื่องแก้ว

การวิเคราะห์ตะกั่วและแคดเมียมซึ่งมีปริมาณน้อยมากในอนุภาคฝุ่นรวมต้องทำความสะอาดเครื่องแก้วให้สะอาดอย่างดีก่อนการใช้งาน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารตะกั่วและแคดเมียมจากสิ่งแวดล้อม โดยการแช่เครื่องแก้วในสารละลายกรดไนตริก 20% (analytical grade) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ปราศจากไอออน จนกรดออกหมด แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ต้องระวังไม่ให้มีฝุ่นปนเปื้อนลงในเครื่องแก้ว ถ้าเป็นพลาสติกควรแช่สารละลายกรดไนตริกเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างกรดออกให้หมดด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ปราศจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 4 การตั้งเครื่องเก็บอากาศจุดที่ 2 บริเวณตลาดหางดง (เขตควบคุม)

รูปที่ 5 การตั้งเครื่องเก็บอากาศจุดที่ 1 บริเวณตลาดวโรรส (เขตศึกษา)

รูปที่ 6 การตั้งเครื่องเก็บอากาศจุดที่ 2 บริเวณตลาดวโรรส (เขตศึกษา)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไอออน เสร็จแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนเก็บและเก็บให้มิดชิดก่อนนำมาใช้

การสกัดตัวอย่างอนุภาคฝุ่นรวม (total suspended particles,TSPs) ด้วยวิธี hot acid extraction

ประยุกต์วิธีการสกัดจากวิธีของ U.S.EPA (1999a; 1999b) และ อรุบล และคณะ (2541) โดยมีขั้นตอนการสกัดดังนี้

ตัดกระดาษกรองที่เก็บอนุภาคฝุ่นรวมซึ่งมีขนาดกว้างยาว 8 x 10 นิ้ว ออกเป็นชิ้นยาวขนาด 1 x 10 นิ้ว ดังนั้นกระดาษกรอง 1 แผ่นตัดได้ 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 เติมลงไปในแผ่นกระดาษกรองเปล่าที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำไปสกัดด้วยวิธี hot acid extraction ดังรายละเอียดข้างต้น โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้งต่างวันกัน และในแต่ละครั้งวันเดียวกันทำการวิเคราะห์อีก 3 ครั้ง นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปคำนวณหา % recovery ของโลหะทั้งสองที่ความเข้มข้นต่ำและสูง

วิธีวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วด้วย Zeeman-GFAAS

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายตะกั่วมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เป็นความสูงของพีก (peak height) อ่านความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานนี้

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ตะกั่วทำได้โดยเตรียมสารละลายตะกั่วมาตรฐาน 3 ความเข้มข้น คือ 30, 60 และ 100 ส่วนในพันล้านส่วน (ppb) โดยการ ใช้โปรแกรม auto m

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved