ว ทันต จุฬาฯ 2545;25:175-83

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการดึงเกลือแร่

วิจิตรา วิพิศมากูล[1]
จุลจักร ตั้งยิ่งยง[2]
สุชีรา พงษ์พันธ์[2]

[1] ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2] นิสิตคณะทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารที่ใช้ดึงเกลือแร่ 3 ชนิด คือ เอทิลีน ไดเอมีน เตตรา อะซิติก แอซิด (อีดีทีเอ) กรดฟอร์มิก และกรดไนตริกฟอร์มาลีน โดยพิจารณาจากระยะเวลาที่ใช้ ราคา วิธีการเตรียมสาร และการสูญเสียของเนื้อเยื่อ

วัสดุและวิธีการ ใช้ฟันกรามใหญ่ซี่ที่สาม จำนวน 12 ซี่ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ดึงเกลือแร่โดยใช้อีดีทีเอ กลุ่มที่ 2 ใช้กรดฟอร์มิก และกลุ่มที่ 3 ใช้กรดไนตริกฟอร์มาลีน เปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ดึงเกลือแร่จนสมบูรณ์ซึ่งตรวจสอบโดยวิธีการใช้สารเคมี เปรียบเทียบราคาของสารแต่ละชนิดและศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อฟันหลังจากถูกดึงเกลือแร่

ผลการศึกษา กรดไนตริก ฟอร์มาลีนดึงเกลือแร่จากฟันได้เร็วที่สุดคือ 102.0 ชั่วโมง รองลงมาคือ กรดฟอร์มิก 148.5 ชั่วโมง และ อีดีทีเอ 696.8 ชั่วโมง การเปรียบเทียบราคาต่อขบวนการ คือ อีดีทีเอ 395.43 บาท กรดฟอร์มิก 89.10-148.50 บาท และกรดไนตริกฟอร์มาลีน 21.17-30.26 บาท กรดไนตริกฟอร์มาลีนเป็นสารเพียงชนิดเดียวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีและเกิดการสูญเสียเนื้อเยื่อฟัน

สรุป กรดไนตริกฟอร์มาลีนใช้เวลาน้อยที่สุดในการดึงเกลือแร่และมีราคาถูกที่สุดแต่มีข้อเสีย คือ อาจทำให้มีการสูญเสียเนื้อเยื่อฟัน กรดฟอร์มิกซึ่งใช้เวลามากกว่า และมีราคาสูงกว่า เหมาะสมในการใช้งานด้านบริการ เนื่องจากไม่ทำให้เกิดการสูญเสียเนื้อเยื่อ แต่อีดีทีเอไม่เหมาะในการใช้งานด้านบริการเพราะใช้เวลานานมากและมีราคาสูง

(ว ทันต จุฬาฯ 2545;25:175-83)

บทนำ

กระดูกเป็นเนื้อเยื่อยึดต่อชนิดพิเศษ[1,2] ที่มีองค์ประกอบทั้งส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ ในส่วนของสารอินทรีย์นั้นมีประมาณ 50% ของปริมาตรกระดูกหรือ 25% ของน้ำหนักกระดูก โดยมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) ประมาณ 90-95% และส่วนที่เหลือเป็นโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collageneous protein) ได้แก่ ออสทีโอแคลซิน (osteocalcin) ไซแอลโลโปรตีน (sialoprotein)

ฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) ออสทีโอเนกติน (osteonectin) และโปรตีนที่มีจำเพาะต่อกระดูก (bone specific protein) เป็นต้น สำหรับสารอนินทรีย์นั้นมีประมาณ 50% ของปริมาตรกระดูก หรือ 75% ของน้ำหนักกระดูก โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น แคลเซียม (calcium) และฟอสฟอรัส (phosphorus) แต่สามารถพบ ไบคาร์บอเนต (bicarbonate) ซิเตรต (citrate) แมกนีเซียม (magnesium) โพแทสเซียม (potassium) และโซเดียม (sodium) ด้วย[3] โดยแคลเซียมและฟอสฟอรัสจะอยู่ในรูปของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) สำหรับฟันนั้นเป็นเนื้อเยื่อที่มีการสะสมของเกลือแร่เช่นเดียวกับกระดูก[4-7] โดยในส่วนของเคลือบฟัน (enamel) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีความแข็งมากที่สุดของร่างกายก็มีสารอนินทรีย์ถึง 96% น้ำ 3% และสารอินทรีย์น้อยกว่า 1% ในขณะที่เนื้อฟัน (dentin) มีสารอนินทรีย์ 70% สารอินทรีย์ 20% และน้ำ 10% ทำให้เนื้อฟันมีความนิ่มและยืดหยุ่นมากกว่าเคลือบฟัน[4,5] สำหรับเคลือบรากฟัน (cementum) นั้นมีสารอนินทรีย์ 45-50% และสารอินทรีย์ 50-55% จึงมีความแข็งน้อยกว่าเคลือบฟัน เนื้อฟันและกระดูก

การที่เนื้อเยื่อแข็งได้แก่กระดูกและฟันมีสารอนินทรีย์เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ทำให้ประสบปัญหายุ่งยากในการทำสไลด์เพื่อวินิจฉัยโรคให้แก่ผู้ป่วยมากกว่าเนื้อเยื่ออื่น ๆ ซึ่งเป็นเนื้อเยื่ออ่อน เนื่องจากเนื้อเยื่อที่มีการสะสมของเกลือแร่มีความแข็งมาก และไม่สามารถตัดเพื่อทำสไลด์ได้ทันทีหลังจากได้รับชิ้นเนื้อของผู้ป่วย ต้องมีการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อนั้นโดยกำจัดเอาส่วนของสารอนินทรีย์ออกก่อนด้วยสารละลายกรดแก่หรือกรดอ่อนที่นิยมใช้กันคือ[8] กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดไนตริก (nitric acid) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) และกรดไตรคลอร์อะซีติก (trichloracetic acid) นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารที่สามารถดึงเอาแคลเซียมอิออนออกจากเนื้อเยื่อ (calcium chelating agent) เช่น กรด เอทีลิน ไดเอมีน เตตราอะซีติก : อีดีทีเอ (Ethylene-diamine tetra-acetic acid : EDTA) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถกำจัดเอาส่วนของสารอนินทรีย์ออกจากกระดูกหรือฟันได้ ให้เหลือเพียงเซลล์และสารอินทรีย์ ซึ่งเรียกวิธีการกำจัดสารอนินทรีย์นี้ว่า "การดึงเกลือแร่" (decalcification) ขั้นตอนการดึงเกลือแร่นี้ต้องใช้เวลาพอสมควร เพื่อให้เนื้อเยื่อกระดูกหรือฟันถูกดึงเกลือแร่ออกโดยสมบูรณ์

สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในการดึงเกลือแร่ออกจากเนื้อเยื่อแข็งมี 6 ข้อคือ[9] ***ข้อแรก*** การดึงเกลือแร่ออกจากเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่ใช้เวลามากกว่าในเนื้อเยื่อชิ้นเล็ก และการดึงเกลือแร่นั้นเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับปริมาณของเกลือแร่ในเนื้อเยื่อกับองค์ประกอบในน้ำยาที่ใช้ ดังนั้นการดึงเกลือแร่อาจเกิดปฏิกิริยาแบบสมดุลได้ จึงมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนสารเคมีสำหรับดึงเกลือแร่ใหม่อยู่เสมอ ***ข้อสอง*** ขนาดของชิ้นเนื้อเยื่อควรมีความหนาไม่เกิน 0.5 ซม. และมีขนาดพื้นที่หน้าตัดไม่เกิน 1.5 x 1.5 ซม.^{2} ถ้ามีความหนามากเกินไปจะทำให้การทำปฏิกิริยาของน้ำยาที่ใช้ดึงเกลือแร่ไม่ดี และอาจมีการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณใกล้กับผิวหน้าของชิ้นกระดูกหรือฟันมากขึ้น ***ข้อสาม*** น้ำยาแช่ตรึง (fixative) ที่ใช้ก่อนการดึงเกลือแร่มีข้อที่ควรคำนึงถึงคือ ควรใช้ฟอร์มาลีน (formalin) ในการจะย้อมสไลด์ด้วยสีต่อไปนี้คือ ฮีมาท็อกซิลิน อีโอซิน (Hematoxylin-eosin) ปรัสเซียน บลู (Prussian blue) ฟูทส์เรทิคูลิน (Foote's reticulin) แวน กีสัน (Van Gieson) แมสซองส์ ไตรโครม (Masson's trichrome) และเพริโอดิก แอซิด ชิฟฟ์ (Periodic Acid-Schiff) หากต้องการตรวจดูเซลล์และโครงสร้างของไขกระดูก ควรใช้ น้ำยาแช่ตรึงเซ็งเคอร์ (Zenker's fixative) ***ข้อสี่*** ตำแหน่งของชิ้นเนื้อเยื่อเมื่อวางในน้ำยาดึงเกลือแร่ โดยชิ้นเนื้อเยื่อไม่ควรอยู่ชิดกับขอบด้านใดด้านหนึ่งหรือก้นของภาชนะ เพื่อให้น้ำยาดึงเกลือแร่ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อทุกด้านเท่า ๆ กัน ทำได้โดยการแขวนกระดูกหรือฟัน หรือ รองก้นภาชนะด้วยผ้าก๊อซ ***ข้อห้า*** ปริมาตรของน้ำยาดึงเกลือแร่ต่อปริมาตรของชิ้นเนื้อเยื่อควรจะอยู่ที่ 50:1 ***ข้อหก*** ในการดึงเกลือแร่นั้นต้องทำการควบคุมและตรวจสอบผลเป็นประจำ ซึ่งในการตรวจสอบการดึงเกลือแร่ว่าสมบูรณ์หรือไม่นั้นมีหลายวิธี ได้แก่ การใช้เข็มลองเกี่ยวชิ้นเนื้อเยื่อหรือการประเมินความยืดหยุ่น แต่วิธีทั้งสองนี้อาจทำให้เกิดการเสียหายของชิ้นเนื้อเยื่อ วิธีที่ดีที่สุด คือ การใช้ภาพรังสี หรือใช้วิธีการทางเคมี

ในห้องปฏิบัติการทั่วไปในปัจจุบัน มีการเลือกสารเคมีที่ใช้ในการดึงเกลือแร่ต่างกันหลายชนิด[8,9] ดังได้กล่าวข้างต้น ซึ่งสารเคมีแต่ละชนิดนั้น จะให้ผลดีหรือผลเสียกับชิ้นกระดูกหรือฟันแตกต่างกัน ถ้าสารนั้นมีความเป็นกรดรุนแรง ก็จะใช้เวลาน้อยในการดึงเกลือแร่แต่ก็ทำให้เกิดผลเสียหายกับชิ้นกระดูกหรือฟันด้วย ทำให้การวินิจฉัยโรคเป็นไปได้ยาก และอาจเกิดการแปลผลที่ผิดพลาดได้ แต่ถ้าใช้สารที่เป็นกรดอ่อนในการดึงเกลือแร่แม้จะต้องใช้เวลามาก แต่ชิ้นเนื้อเยื่อเสียหายน้อย ผลของสไลด์ที่ได้ออกมาดี เห็นขอบเขตของเซลล์ชัดเจน การติดสีของเซลล์ชัด ทำให้การวินิจฉัยเป็นไปได้ง่ายและถูกต้อง แต่จากการที่ต้องใช้เวลานานในการดึงเกลือแร่นั้น ทำให้สารดังกล่าว

ไม่ค่อยเหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการมากนัก เนื่องจากผลที่ได้จะช้า ทำให้การวางแผนการรักษาผู้ป่วยนั้นเกิดการล่าช้าตามไปด้วยซึ่งอาจเกิดผลเสียแก่ผู้ป่วยได้ และสารบางชนิดก็ไม่เหมาะสมในทางปฏิบัติเนื่องจากต้องตรวจสอบบ่อยๆ เพราะสารนั้นดึงเกลือแร่ได้รวดเร็วมาก หากตรวจสอบช้าไปก็เกิดการสูญเสียเนื้อเยื่อได้ ทำให้การแปลผลผิดพลาด ซึ่งถ้าชิ้นกระดูกนั้นเป็นรอยโรคที่ร้ายแรง ก็จะส่งผลโดยตรงต่อผู้ป่วยได้ โดยสารที่ใช้ในการดึงเกลือแร่ออกจากเนื้อเยื่อแข็งที่ดีนั้น[8] ต้องสามารถดึงเกลือแร่พวกแคลเซียมออกได้หมด โดยไม่ทำอันตรายต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อ และไม่ทำให้เกิดความเสียหายภายหลังการย้อมสี นอกจากนี้ความเร็วในการดึงเกลือแร่ออกจากเนื้อเยื่อยังขึ้นกับความเข้มข้น, อุณหภูมิ, และปริมาตรของสารที่ใช้ดึงเกลือแร่

การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบสารละลายที่ใช้ดึงเกลือแร่จากเนื้อเยื่อแข็ง 3 ชนิด คือ อีดีทีเอ กรดฟอร์มิก และ กรดไนตริกฟอร์มาลีน ว่าชนิดใดมีความเหมาะสมในการนำไปใช้งานบริการด้านการวินิจฉัยโรคในแง่ของระยะเวลาที่ใช้ ราคา วิธีการเตรียมสารที่ไม่ยุ่งยากและไม่มีการสูญเสียของเนื้อเยื่อ โดยมุ่งหวังจะเป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกใช้สารที่ใช้ดึงเกลือแร่และสามารถนำมาเป็นข้อมูลสำหรับใช้ในงานบริการได้

วัสดุและวิธีการ

วัสดุที่ใช้ทดลอง ชิ้นตัวอย่าง คือ ฟันกรามใหญ่ซี่ที่สาม (permanent third molar teeth) จำนวน 12 ซี่ ที่ไม่มีรอยผุซึ่งตรวจโดยใช้เครื่องมือตรวจฟัน

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การวัดความแข็งผิวของชิ้นตัวอย่าง

นำฟันมาทำความสะอาดโดยการกำจัดเศษสิ่งสกปรกและเศษเนื้อเยื่อที่เกาะติดอยู่กับฟันออกให้หมด แล้วนำไปแช่ในสารฟอร์มาลีน 10% จากนั้นนำฟันไปฝังในแม่พิมพ์พลาส-เตอร์หิน โดยให้ส่วนที่แบนราบที่สุดของซี่ฟัน เฉพาะบริเวณของตัวฟันวางขนานกับแนวระนาบ นำฟันไปขัดกับเครื่องขัดให้เรียบ โดยทำให้บริเวณที่ถูกขัดที่จะใช้วัดความแข็งผิว อยู่ในแนวขนานกับแนวราบ แล้วนำฟันไปทำการวัดความแข็งผิวด้วยเครื่อง micro-hardness tester โดยฟันแต่ละซี่จะถูกวัดความแข็งผิวของเคลือบฟันจำนวน 3 ตำแหน่ง ภายใต้แรงกด 500 กรัม เป็นเวลา 15 วินาที นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA)

ตอนที่ 2 การทดลองดึงเกลือแร่ออกจากชิ้นตัวอย่าง

แบ่งกลุ่มของฟันที่วัดความแข็งผิวไว้แล้วเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ซี่โดยให้ กลุ่มที่ 1 ใช้กรดไนตริกฟอร์มาลีนเป็นสารดึงเกลือแร่ กลุ่มที่ 2 ใช้กรดฟอร์มิก และกลุ่มที่ 3 ใช้อีดีทีเอ สารทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นผลิตโดยบริษัท Merck, Darmstadt, Germany และเป็น AR grade การเตรียมสารละลายที่จะใช้ดึงเกลือแร่[8,9] มีวิธีการดังนี้

1) สารละลายกรดไนตริกฟอร์มาลีน (ใช้กรดไนตริก 7% ในฟอร์มาลีน 10%) วิธีเตรียมใช้สารฟอร์มาลีน 10% ปริมาตร 93 มิลลิลิตร ผสมกับกรดไนตริก (ความถ่วงจำเพาะ 1.41) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร

2) สารละลายกรดฟอร์มิก (ใช้กรดฟอร์มิก 25% ในฟอร์มาลีน 0.5%) วิธีเตรียมใช้สารฟอร์มาลีน 10% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับกรดฟอร์มิกปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

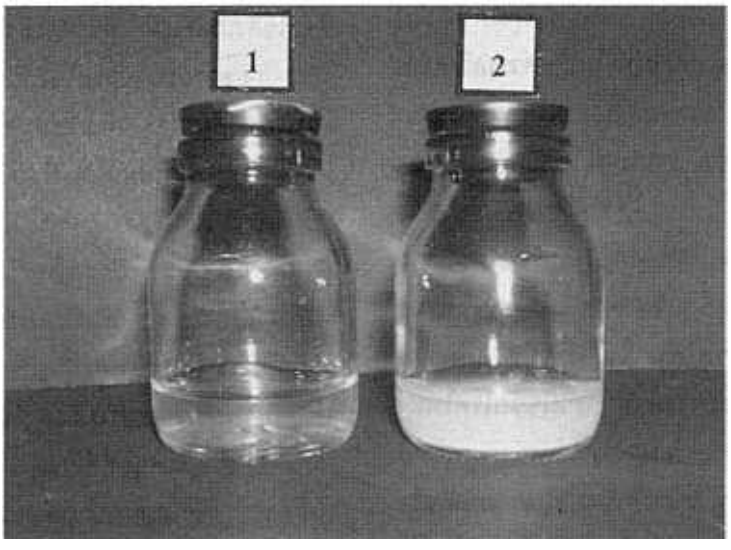
3) สารละลายอีดีทีเอ 5.5% เตรียมโดยละลายอีดีทีเอหนัก 5.5 กรัมผสมกับน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

จากนั้นนำฟันตัวอย่างที่แบ่งกลุ่มแล้ว แช่ลงในสารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งฟันแต่ละซี่จะแช่ลงในขวดที่มีสารดึงเกลือแร่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยฟันที่นำมาแช่จะต้องห่อด้วยผ้าก๊อซ เพื่อให้ทุกบริเวณของฟันสัมผัสกับสารดึงเกลือแร่ได้ทั่วถึง และฟันทั้งซี่ต้องจมอยู่ในสารดึงเกลือแร่ทั้งหมด เริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มหย่อนฟันลงในสารดึงเกลือแร่ ตรวจผลของการดึงเกลือแร่ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยใช้ใบมีดหมายเลข 24 ผ่าที่กึ่งกลางของฟันทางด้านใกล้แก้ม (buccal) หรือด้านใกล้ลิ้น (lingual) ในแนวด้านบดเคี้ยวไปยังปลายราก (occluso-radical) โดยใช้แรงกดน้อยที่สุด ถ้าไม่สามารถตัดฟันได้ ให้ผสมสารดึงเกลือแร่ขึ้นใหม่ และเปลี่ยนทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกว่าจะสามารถผ่าฟันซี่นั้นๆ ได้ ถ้าสามารถผ่าฟันได้แล้วก็นำฟันซี่นั้นไปตรวจสอบว่ามีการดึงเกลือแร่ได้สมบูรณ์หรือไม่ (end point of decalcifcation) ด้วยวิธีทางเคมี

ตอนที่ 3 การทดสอบการดึงเกลือแร่ได้สมบูรณ์ด้วยวิธีทางเคมี[8]

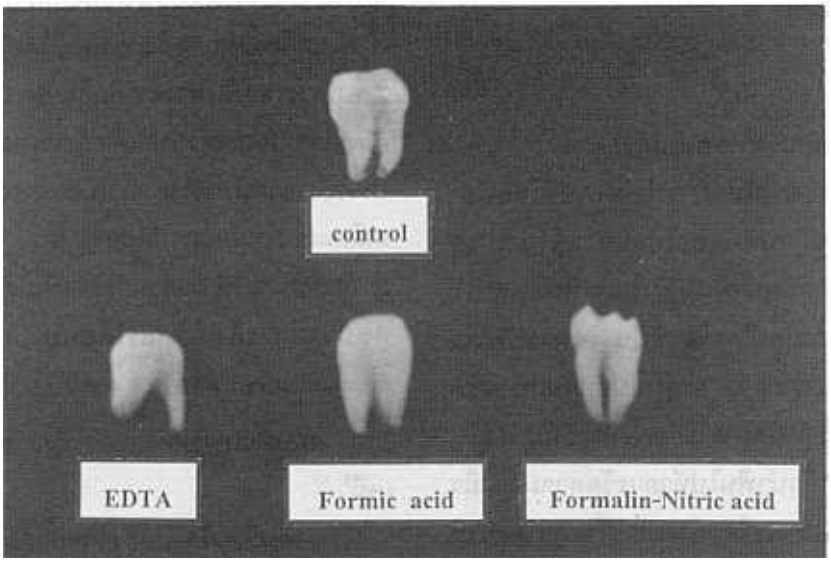
นำฟันที่ตัดได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด จากนั้นแช่ฟันที่ตัดได้ลงในสารดึงเกลือแร่ที่เตรียมใหม่ แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วนำสารดึงเกลือแร่ที่แช่ฟันปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่

ในหลอดทดลอง เติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide) 5 มิลลิลิตร และแอมโมเนียมออกซาเลต (ammonium oxalate) 5 มิลลิลิตร (เตรียมได้จากการละลายแอมโมเนียมออกซาเลต 5 กรัมกับน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร) เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ถ้าสารละลายที่ได้มีลักษณะขุ่นขาวเหมือนน้ำนม แสดงว่ายังมีแคลเซียมหลงเหลืออยู่ในสารดึงเกลือแร่ ซึ่งหมายถึง การดึงเกลือแร่ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ ให้แช่ฟันในสารดึงเกลือแร่ชนิดนั้นๆ ที่เตรียมใหม่เป็นเวลาอีก 3 ชั่วโมง ทำการทดสอบซ้ำไปเรื่อยๆ จนได้สารละลายใส แสดงว่า การดึงเกลือแร่เสร็จสมบูรณ์แล้ว (รูปที่ 1) จึงบันทึกเวลาตั้งแต่เริ่มหย่อนฟันจนกระทั่งมีการดึงเกลือแร่ออกจากชิ้นตัวอย่างเสร็จสมบูรณ์ นำผลการทดลองที่ได้ มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว และ Scheffe's test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$



รูปที่ 1 ขวดที่หนึ่งแสดงการดึงเกลือแร่โดยสารเคมีได้สมบูรณ์
ขวดที่สองการดึงเกลือแร่โดยสารเคมียังไม่สมบูรณ์

Fig. 1 Bottle no. 1 : The end-point of the decalcification by chemical procedure in shown.
Bottle no. 2 : The decalcification process is not completed.



รูปที่ 2 เปรียบเทียบการเปลี่ยนสีของเนื้อเยื่อฟัน โดยสารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด

Fig. 2 Compare of tooth discoloration by 3 decalcifying agents

ผลการศึกษา

ตอนที่ 1 การวัดความแข็งผิวของชิ้นตัวอย่างฟันทั้ง 2 ซี่ แสดงตามตารางที่ 1 และจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ พบว่าฟันทั้ง 12 ซี่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตอนที่ 2 การทดลองดึงเกลือแร่ออกจากชิ้นตัวอย่าง ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้ดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด คือ กรดฟอร์มิก, อีดีทีเอ และกรดไนตริกฟอร์มาลีน มีดังนี้

ขั้นตอนในการเตรียมและคุณสมบัติของสารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด พบว่า อีดีทีเอใช้เวลาในการเตรียมสารนานที่สุดคือ 4.20 นาที รองลงมาคือ กรดฟอร์มิกใช้เวลา 2.35 นาที และเร็วที่สุด คือ กรดไนตริกฟอร์มาลีน ใช้เวลา 2.18 นาที สำหรับขั้นตอนในการเตรียมสาร อีดีทีเอและกรดไนตริกฟอร์มาลีน มี 2 ขั้นตอน แต่กรดฟอร์มิกมี 3 ขั้นตอน และอีดีทีเอเป็นสารเพียงชนิดเดียวที่ไม่มีอันตรายและไม่มีกลิ่น แต่กรดฟอร์มิกและกรดไนตริกฟอร์มาลีน มีอันตรายและมีกลิ่นที่เหม็นฉุนซึ่งเป็นอันตราย ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงค่าความแข็งผิวของฟันทั้ง 12 ซี่ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

Table 1 Surface hardness of 12 teeth show non-significant differences ($P < 0.05$)

ฟัน	ตำแหน่งกดที่ 2	ตำแหน่งกดที่ 3	เฉลี่ย (kg/mm^2)	SD.	Std. Error
	306.4	318.2	321.1	315.2	7.786	4.495
2	298.8	309.5	308.6	305.6	5.935	3.427
	324.5	310.2	314.6	316.4	7.324	4.229
	17.9	328.7	306.8	314.5	12.339	7.124
	310.2	307.0	318.6	311.9	5.991	3.459
6	332.3	308.4	305.1	315.3	14.843	8.570
	120.8	295.4	308.2	308.1	12.700	7.332
8	305.9	309.1	314.4	309.8	4.293	2.479
	328.3	307.5	320.8	318.9	10.534	6.082
10	302.0	316.4	309.7	309.4	7.206	4.160
11	334.6	303.4	311.1	316.4	16.253	9.384
12	297.2	315.6	316.5	309.8	10.892	6.289
		รวม		312.6	9.426	1.571

ตารางที่ 2 ขั้นตอนในการเตรียมและคุณสมบัติของสารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด (100 มิลลิลิตร)

Table 2 Preparation and properties of 3 decalcifying agents (100 ml.)

ข้อเปรียบเทียบ	อีดีทีเอ	กรดฟอร์มิก	กรดไนตริกฟอร์มาลีน
		✔	✔
		✔	✔

ระยะเวลาที่ใช้ในการดึงเกลือแร่จนสมบูรณ์ของสารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด พบว่า อีดีทีเอใช้เวลานานที่สุด คือ 696.8 ชั่วโมง (SD. = 1.500) รองลงมาคือ กรดฟอร์มิก ใช้เวลา 148.5 ชั่วโมง (SD. = 1.732) และเร็วที่สุดคือ กรดไนตริกฟอร์มาลีน ใช้เวลา 102.0 ชั่วโมง (SD. = 2.449) ตามตารางที่ 3 จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว และ Scheffe's test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$ พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการดึงเกลือแร่ของสารทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ราคาต่อขบวนการของสารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิดมีดังนี้ อีดีทีเอมีราคาสูงที่สุดคือ 395.43 บาท รองลงมาคือ กรดฟอร์มิก 89.10-148.50 บาท และถูกที่สุดคือ กรดไนตริกฟอร์มาลีน 21.17-30.26 บาท ตามตารางที่ 4

การเปลี่ยนสีและการสูญเสียของเนื้อเยื่อฟันของสารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิดพบว่า กรดไนตริกฟอร์มาลีนเป็นสารดึงเกลือแร่เพียงชนิดเดียว ที่ทำให้เนื้อเยื่อฟันมีการเปลี่ยนสี (รูปที่ 2) และเกิดการสูญเสียของเนื้อเยื่อ ในขณะที่ในอีดีทีเอและกรดฟอร์มิกไม่พบผลดังกล่าวตามตารางที่ 5

ตารางที่ 3 ระยะเวลาที่ใช้ในการดึงเกลือแร่จนสมบูรณ์ของสารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

Table 3 Duration of 3 decalcifying agents show significant differences ($P < 0.05$)

สารเคมี	ชิ้นตัวอย่างที่				เฉลี่ย	SD.	Std. Error
	1	2	3	4	(ชั่วโมง)		
อีดีทีเอ	696	696	699	696	696.8	1.500	0.750
	150	147	150	147	148.5	1.732	0.866
กรดไนตริกฟอร์มาลีน	105	102	102	99	102.0	2.449	1.225

ตารางที่ 4 ราคาของสารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด

Table 4 Cost of 3 decalcifying agents

สารเคมี	ราคา/ชิ้น/24 ชม. (บาท)	ระยะเวลาที่ดึงเกลือแร่จนสมบูรณ์ (ชม.)	ราคา/ขบวนการ (บาท)
อีดีทีเอ	13.62	696.8	395.43
	14.40-24.00	148.5	89.10-148.50
กรดไนตริกฟอร์มาลีน	4.98-7.12	102.0	21.17-30.26

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนสีและการสูญเสียของเนื้อเยื่อของสารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด

Table 5 Discoloration and deterioration of tissue 3 decalcifying agents

ข้อเปรียบเทียบ	อีดีทีเอ	กรดฟอร์มิก	กรดไนตริกฟอร์มาลีน
			✔
			✔

บทวิจารณ์

การทดลองตอนที่ 1 เป็นการทดสอบความแข็งผิวของฟันทั้ง 12 ซี่ที่นำมาใช้ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้สามารถลดความแปรปรวนที่อาจเกิดจากกลุ่มตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบได้ และในการดึงเกลือแร่ได้กำหนดให้ใช้สารดึงเกลือแร่แต่ละชนิด 100 มิลลิลิตร เพื่อให้อัตราส่วนของปริมาตรฟันต่อปริมาตรสารดึงเกลือแร่ไม่ต่ำกว่า 1 ส่วนต่อ 50 ส่วน

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารดึงเกลือแร่ทั้ง 3 ชนิด นั้นมีประสิทธิภาพและความเหมาะสมในการใช้งานในแง่ต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน โดยถ้าคำนึงถึงในแง่การเตรียมสารพบว่ากรดฟอร์มิกและกรดไนตริกฟอร์มาลีน แม้ว่าขั้นตอนการเตรียมจะต่างกัน แต่ระยะเวลาที่ใช้เตรียมก็ไม่ต่างกันนัก เนื่องจากสารที่ใช้ในการเตรียมนั้นเป็นของเหลวทั้งหมดจึงทำการผสมได้ง่าย สำหรับอีดีทีเอนั้นแม้ว่าขั้นตอนการเตรียมจะเท่ากับกรดไนตริก-ฟอร์มาลีน แต่ใช้ระยะเวลานานกว่ามาก เนื่องจากอีดีทีเอเป็นสารที่ละลายได้อย่างช้า ๆ[8]

ถ้าคำนึงถึงในแง่ของระยะเวลาที่ใช้ในการดึงเกลือแร่ พบว่า กรดไนตริกฟอร์มาลีนใช้เวลาเร็วที่สุด จึงเหมาะสมจะนำมาใช้ในงานบริการที่ต้องการผลโดยเร็วหรือด่วน สำหรับกรดฟอร์มิกจะใช้เวลามากกว่ากรดไนตริกฟอร์มาลีน แต่ก็ไม่นานจนเกินไป สามารถนำมาใช้ในงานบริการได้เช่นกัน เนื่องจากต้องใช้เวลาพอสมควรในการดึงเกลือแร่จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในงานที่เร่งด่วน แต่ก็สามารถที่จะเร่งอัตราของการดึงเกลือแร่ของกรดฟอร์มิกได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟอร์มิกหรือทำการเพิ่มอุณหภูมิของสารละลาย[8,9] แต่การเร่งอัตราการดึงเกลือแร่นี้ จะไปมีผลกับการตรวจวัดจุดสิ้นสุดของการดึงเกลือแร่ คือ จะไม่มีความเที่ยงตรงเหมือนการใช้ปริมาตรของกรดฟอร์มิกปกติ สำหรับอีดีทีเอเป็นสารที่ใช้เวลาในการดึงเกลือแร่นานมาก จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานบริการหรืองานที่ต้องการผลโดยเร่งด่วน แต่เหมาะจะนำมาใช้ในงานที่ไม่มีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลา แต่ต้องการรายละเอียดของเนื้อเยื่ออย่างมาก เช่น ในงานวิจัยต่าง ๆ ที่มีการใช้สารดึงเกลือแร่[11-17] การศึกษารายละเอียดของเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน[8] และยังสามารถนำมาใช้ละลายสิ่งอุดตันในคลองรากฟันได้อีกด้วย[12] นอกจากนี้ในทางปฏิบัติแล้ว การตัดชิ้นกระดูกให้มีขนาดไม่เกิน 1.5 x 1.5 ตารางเซนติเมตร ก็มีความจำเป็นที่จะทำให้เวลาที่ใช้ในการดึงเกลือแร่เร็วขึ้น

เมื่อพิจารณาถึงราคาต่อชุดวนการ หรือค่าใช้จ่าย พบว่ากรดไนตริกฟอร์มาลีนมีราคาต่ำที่สุด และกรดฟอร์มิกเสียค่าใช้จ่ายปานกลาง จึงเหมาะจะนำมาใช้ในงานบริการซึ่งค่าใช้จ่ายไม่ควรมากเกินไป จนเกินความสามารถที่ผู้ใช้บริการจะจ่ายได้ แต่สำหรับอีดีทีเอนั้นเป็นสารที่เสียค่าใช้จ่ายสูงที่สุด ไม่เหมาะจะนำมาใช้ในงานบริการ แต่ในกรณีที่เป็นงานวิจัยที่มีเงินทุนสูง และต้องการสารดึงเกลือแร่ที่มีประสิทธิภาพดี อีดีทีเอมีความเหมาะสมมาก

ในแง่ของการสูญเสียเนื้อเยื่อที่ทำการดึงเกลือแร่นั้น พบว่ากรดฟอร์มิกจะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีและไม่มีการสูญเสียของเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างมากในการตรวจวินิจฉัยรอยโรคของเนื้องอกในกระดูก เพราะการที่จะทราบว่าชิ้นกระดูกที่ได้ทำการผ่าตัดออกมานั้น ได้นำเอาส่วนที่เป็นเนื้องอกออกมาได้หมดหรือไม่ ต้องตรวจดูตามบริเวณขอบของชิ้นกระดูกหรือเนื้อเยื่อ ฉะนั้นถ้ามีการสูญเสียของเนื้อเยื่อบริเวณขอบของกระดูกไป จะไม่สามารถทราบผลที่แน่นอนได้ ซึ่งอาจทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดได้ ทำให้กรดฟอร์มิกเป็นสารดึงเกลือแร่ที่เหมาะจะนำมาใช้ในงานบริการ แต่สำหรับกรดไนตริกฟอร์มาลีนนั้นจะให้ผลของเนื้อเยื่อไม่ดีนัก เนื่องจากทำให้เนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนสีเหลืองและมีการสูญเสียเนื้อเยื่อด้วย โดยการสูญเสียของเนื้อเยื่อจะเกิดขึ้นจากการแช่เนื้อเยื่อในกรดไนตริกฟอร์มาลีนนานเกินไป จึงควรหยุดแช่เมื่อการดึงเกลือแร่เสร็จสมบูรณ์พอดี ไม่ควรแช่ทิ้งไว้ ต้องตรวจสอบบ่อย ๆ ในช่วงที่ใกล้จะดึงเกลือแร่เสร็จสมบูรณ์ ซึ่งการสูญเสียเนื้อเยื่อนั้นจะเป็นปัญหาอย่างมากโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เป็นเนื้องอก เพราะจะทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดได้ ฉะนั้นการจะนำกรดไนตริกฟอร์มาลีนมาใช้ในการบริการนั้นทำได้ เพียงแต่ต้องใส่ใจในการตรวจวัดการดึงเกลือแร่ว่าจะสมบูรณ์เมื่อไร เพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสียของเนื้อเยื่อ และสำหรับอีดีทีเอนั้นให้ผลของเนื้อเยื่อที่ดี ไม่มีการเปลี่ยนสีและไม่มีการสูญเสียของเนื้อเยื่อ ไม่มีฟองของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งจะทำให้เกิดการเสียหายต่อรูปแบบของเซลล์[8] ให้รายละเอียดของเซลล์ดีมาก ทำให้ผลการย้อมสีออกมาดีเช่นกัน

ความเป็นพิษและอันตรายของสารที่ใช้ดึงเกลือแร่ พบว่าอีดีทีเอเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายและไม่มีกลิ่นรุนแรงเหมือนสารชนิดอื่น ๆ[18] จึงเหมาะที่จะนำมาใช้งานสำหรับกรดฟอร์มิก[19] มีความเป็นกรดรุนแรง หากสัมผัสถูกผิวหนัง จะทำให้เกิดผิวหนังพุพอง นอกจากนี้ยังระเหยง่าย มีกลิ่นเหม็นฉุน ซึ่ง

การสูดดมเอาไอของกรดฟอร์มิกเข้าไป จะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อเมือกที่บุอยู่ในช่องปาก, โพรงจมูก, ดวงตา และระบบทางเดินหายใจส่วนบนได้ ซึ่งอาจทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อของผู้เตรียมสารได้ และสำหรับกรดไนตริกฟอร์มาลีนเป็นสารดึงเกลือแร่ที่มีอันตรายมากที่สุด เนื่องจากกรดไนตริกมีความเป็นกรดรุนแรง[19,21] มีฤทธิ์ในการกัดกร่อน สามารถระเหยได้ไนโตรเจนออกไซด์ซึ่งมีความเป็นพิษ จึงควรหลีกเลี่ยงจากการสัมผัสและสูดดม ถ้าหากไปสัมผัสถูกกรดไนตริกจะทำให้ผิวหนังเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง แต่ถ้าสัมผัสในปริมาณมาก ๆ นั้น สามารถทำให้เกิดการไหม้พองได้ การสูดดมหรือกลืนกรดไนตริกเข้าไปนั้น สามารถก่อให้เกิดอันตรายได้อย่างรุนแรง อาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ โดยจะมีฤทธิ์ในการทำลายเยื่อเมือกในช่องปาก, โพรงจมูก, ตา และระบบทางเดินหายใจส่วนบนได้ ข้อควรระวังอีกอย่างคือ การควบคุมการใช้กรดไนตริกที่ไม่ถูกต้อง อาจทำให้เกิดการระเบิดได้ นอกจากนี้สารฟอร์มาลีนซึ่งใช้ในกรดไนตริกฟอร์มาลีนและกรดฟอร์มิก ก็มีกลิ่นฉุนรุนแรง ระคายเคืองต่อเยื่อเมือก และยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย[20] ดังนั้นในการเตรียมสารต้องระมัดระวังเป็นอย่างดี การใส่ถุงมือและหน้ากากทุกครั้งขณะเตรียมสารจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น

ในการศึกษาครั้งนี้ทดลองโดยใช้ฟันกรามซี่ที่สามเนื่องจากเก็บตัวอย่างได้ง่ายและขนาดของฟันอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม นอกจากนี้สามารถนำผลการศึกษามาปรับใช้กับการดึงเกลือแร่ในกระดูก เนื่องจากองค์ประกอบของสารอนินทรีย์ในกระดูกมีค่าอยู่ระหว่างค่าขององค์ประกอบต่าง ๆ ของสารอนินทรีย์ในฟัน ได้แก่ เคลือบฟัน เนื้อฟัน และเคลือบรากฟัน

สรุป

กรดไนตริกฟอร์มาลีนใช้เวลาน้อยที่สุดในการดึงเกลือแร่และมีราคาถูกที่สุด แต่เกิดผลเสียคือ เนื้อเยื่อเกิดการเปลี่ยนสีและอาจทำให้มีการสูญเสียของเนื้อเยื่อ กรดฟอร์มิกซึ่งใช้เวลามากกว่าและมีราคาสูงกว่า เหมาะสมในการใช้งานด้านบริการ เนื่องจากไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีและการสูญเสียของเนื้อเยื่อ สำหรับอีดีทีเอไม่เหมาะในการใช้งานด้านบริการ เพราะใช้เวลานานมากและมีราคาสูง แต่เป็นสารที่ไม่มีกลิ่นเหม็นและไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย กรดฟอร์มิกและกรดไนตริกฟอร์มาลีนนั้นมีกลิ่นเหม็นฉุนและทำอันตรายต่อเยื่อบุต่าง ๆ ของร่างกายได้ จึงต้องระมัดระวังในขั้นตอนการเตรียมสาร

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณภาควิชาศัลยศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี ศูนย์วิจัยทันตวัสดุศาสตร์ ศูนย์ทันตสารสนเทศ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลองนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Cate RT. Oral histology : development, structure, and function. 5th ed. St.Louis : Mosby, 1998:150.
2. Paulsen DF. Basic histology : examination and board review. Norwalk : Appleton & Lange, 1990:86-7.
3. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic histology. 8th ed. Connecticut : Prentice-Hall International, Inc., 1995:135.
4. Avery JK, ed. Oral development and histology. Baltimore : Williams & Wilkins, 1987:140-271.
5. Avery JK. Essentials of oral histology and embryology : a clinical approach. 2nd ed. St. Louis : Mosby, 2000:85-95.
6. Atkinson ME, White FH. Principles of anatomy and oral anatomy for dental students. Edinburgh : Churchill Livingstone, 1992:417-8.
7. Mjor IA, Fejerskov O, eds. Human oral embryology and histology. Copenhagen : Munksgaard, 1986:50-1.
8. Baker FJ, Silverton RE. Introduction to medical laboratory technology. 6th ed. London : Butterworths, 1985:186-90.
9. Anderson C. Manual for the examination of bone : decalcification. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1982:13-23.
10. Scheuer PJ. Histopathology : clinical tests. London : Wolfe Medical Publications Ltd., 1986:125.
11. Sculean A, Donos N, Windisch P, Reich E, Gera I, Brecx M, et al. Presence of oxytalan fibers in human regenerated periodontal ligament. J Clin Periodontol 1999;26:318-21.
12. Verdelis K, Eliads G, Oviir T, Margelos J. Effect of chelating agents on the molecular composition and extent of decalcification at cervical, middle and apical root dentin locations. Endod Dent Traumatol 1999;15:164-70.
13. Simpson MS. Effects of Demineralizing Tetracycline-Stained Human Dentine. Calcif. Tissue Int. 1981;33:101-4.
14. Perez VC, Cardenas MEM, Planells US. The possible role of pH changes during EDTA demineralization of teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1989;68:220-2.
15. Araujo MG, Berglundh T, Lindhe J. On the dynamics of periodontal tissue formation in degree III furcation defects. J Clin Periodontol 1997;24:738-46.
16. Araujo MG, Berglunch T, Lindhe J. The periodontal tissues in healed degree III furcation defects : an experimental study in dogs. J Clin Periodol 1996;23:532-41.
17. Hall RC, Embery G, Waddington RJ. Modification of the proteoglycans of rat incisor dentin-predentin during in vivo fluorosis. Eur J Oral Sci 1996;104:285-91.
18. Flaschka HA. EDTA titrations : an introduction to theory and practice. 2nd ed. London : Pergamon Press, 1964 : 16-8.
19. Reich HJ, Rigby JH, eds. Handbook of reagents for organic synthesis : Acidic and Basic Reagents. New York : John Wiley & Sons Ltd., 1999:155-6.
20. Coates RM, Denmark SE, eds. Handbook of reagents for organic synthesis : reagents, auxiliaries, and catalysts for C-C bond formation. New York : John Wiley & Sons Ltd., 1999:394-9.
21. Chilton TH. Strong water : nitric acid : sources, method of manufacture, and uses. Cambridge : The M.I.T. Press, 1968:59.

Comparative study of an effectiveness of the decalcifying agents

Vichittra Vipismakul[1]
Jullajak Tangyingyong[2]
Sucheera Pongpan[2]

[1] Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Chulalongkorn University
[2] Dental student, School of Dentistry, Chulalongkorn University

Abstract

Objective The purpose of this study was to compare an effectiveness of 3 decalcifying agents; Ethylene-diamine tetra-acetic acid (EDTA), Formic acid and Formalin-Nitric acid. The duration of decalcification, the price, the preparation of the agents and the deterioration of the tissue were studied.

Materials and Methods Twelve third molars were devided into 3 groups; the first group was decalcified by EDTA, the second by Formic acid and the third by Formalin-Nitric acid. The end-point of the decalcification was determined by chemical procedure.

Results The results yielded that it took 696.8 hours by EDTA, 148.5 hours by Formic acid and 102.0 hours by Formalin-Nitric acid for decalcification. The cost of EDTA was the most expensive whereas Formalin-Nitric acid was the least. Among the three decalcifying agents, only Formalin-Nitric acid discolored the tooth and destroyed some part of the tooth morphology.

Conclusion Formalin-Nitric acid was the most rapid decalcifying solution and the cost was the lowest but it may cause tissue damage. Formic acid took more time and the cost was more expensive but it was suitable for routine diagnostic work. EDTA was not recommended for routine work due to the length of time and the cost.

(CU Dent J 2002;25:175-83)

Key words: Decalcifying agent; EDTA; Formalin-nitric acid; Formic acid.