บทที่ 2

วิธีการวิจัย

การศึกษา ระดับบอแรกซ์ในอาหารและในปัสสาวะนักเรียนโรงเรียนประถมศึกษาในจังหวัดนครศรีธรรมราช : กรณีศึกษา โรงเรียนอนุบาลนครศรีธรรมราช ณ นครอุทิศ มีสารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย ดังนี้

สารเคมี

1.	absolute alcohol	99% , Merck , Germany
2.	activated charcoal	purum , Fluka , Switzerland
3.	ammonium hydroxide	AR , Merck , Germany
4.	ammonium sulfate	AR , Merck , Germany
5.	borax	puriss pa. , Fluka , Switzerland
6.	boric acid	AR , Merck , Germany
7.	carminic acid	standard , Fluka , Switzerland
8.	hydrochloric acid	AR , Merck , Germany
9.	sodium hydroxide	AR , Merck , Germany
10.	sulfuric acid	AR , Fisher Science , UK
11.	ผงขมิ้น	

เครื่องมือและอุปกรณ์

1.	spectrophotometer	uv 1601 , Shimadzu , Japan
2.	homogenizer	Staufen , Germany
3.	centrifuge	Sorvall Super t 21, Dupont , USA
4.	เครื่องเขย่าสารละลาย	Fisher Scientific , USA
5.	เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง	Ohaus , USA
6.	เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Ohaus , Switzerland

7. เครื่องวัดความถ่วงจำเพาะ (urinometer)
8. ขวดเก็บตัวอย่างปัสสาวะ
9. หลอดเซนตริฟิวส์
10. micro pipette
11. magnetic stirrer
12. magnetic bar
13. filter paper whatman No. 1
14. filter paper whatman No. 2
15. pH paper (pH 0-10)
16. ขวดสีชาสำหรับเก็บกระดาษขมิ้น
17. เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ประชากรวิจัย

ประชากรวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1.1 อาหารที่จำหน่ายในโรงอาหารของโรงเรียนและอาหารที่จำหน่ายบริเวณหน้าโรงเรียนอนุบาลนครศรีธรรมราช ณ นครอุทิศ จังหวัดนครศรีธรรมราช

โดยเก็บตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายในโรงอาหารและบริเวณหน้าโรงเรียนอนุบาลนครศรีธรรมราช ณ นครอุทิศ ทุกชนิดที่สงสัยว่าอาจมีการเจือปนของบอแรกซ์หรืออาหารที่เคยมีรายงานการตรวจพบบอแรกซ์ชนิดละ 1 ซ้ำ รวมทั้งสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับแหล่งขายส่งที่ผู้ประกอบการซื้ออาหารมาจำหน่าย ระยะเวลาที่ตั้งรถเข็นหรือแผงลอยจำหน่ายอาหารหน้าโรงเรียนเพื่อเป็นข้อมูลประกอบ

1.2 นักเรียนชั้นประถมศึกษาปีที่ 1-6 โรงเรียนอนุบาลนครศรีธรรมราช ณ นครอุทิศ จังหวัดนครศรีธรรมราช

การกำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่างนักเรียน

$$n = Z^2P(1-P) / d^2$$ (เติมศรี ชำนิจารกิจ, 2537 : 147)

โดยจะประมาณจากการศึกษาอัตราเสี่ยงอันตรายต่อการได้รับสารบอแรกซ์ของนักเรียนเขตกรุงเทพมหานครและต่างจังหวัด จากการศึกษาของอัมพร ซอฐานุนาศักดิ์ (2534) พบอัตราการมีสารบอแรกซ์ของนักเรียนเขตภูธรร้อยละ 16.58

เมื่อ n = ขนาดตัวอย่างนักเรียน

Z = 1.96 เมื่อกำหนดให้ $\alpha = 0.05$

P = อัตราส่วนของการพบสารบอแรกซ์ในปัสสาวะ

= 0.1658

= 0.17

d = ข้อผิดพลาดที่ยอมรับได้

= 0.05

ดังนั้น $n = (1.96)^2 (0.17) (0.83) / (0.05)^2$

= 216.82

ขนาดตัวอย่างในการวิจัยอย่างน้อยจะต้องมีจำนวนตัวอย่าง 217 ตัวอย่าง

2. การเก็บรวบรวมข้อมูล

การเก็บรวบรวมข้อมูล โดยปฏิบัติตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 ประสานงานกับโรงเรียนอนุบาลนครศรีธรรมราช ณ นครอุทิศ เพื่อขอความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการวิจัย

2.2 อธิบายและชี้แจงรายละเอียดงานวิจัยให้ครูประจำชั้นและนักเรียนชั้นประถมศึกษาปีที่ 1-6 ที่เป็นกลุ่มตัวอย่างทราบ พร้อมทั้งแจกใบแจ้งผู้ปกครองทราบและใบรับทราบการตรวจปัสสาวะนักเรียนในปกครอง (ภาคผนวก จ)

2.3 เก็บตัวอย่างอาหาร โดยเก็บตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายในโรงอาหารและบริเวณหน้าโรงเรียนอนุบาลนครศรีธรรมราช ณ นครอุทิศ ที่สงสัยว่าอาจมีการเจือปนของบอแรกซ์หรืออาหารที่เคยมีรายงานการตรวจพบบอแรกซ์ นำอาหารใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ภายในกระติกน้ำแข็ง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณบอแรกซ์ที่ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.4 เก็บตัวอย่างปัสสาวะ โดยเก็บตัวอย่างปัสสาวะของนักเรียนชั้นประถมศึกษาปีที่ 1-6 ของโรงเรียนอนุบาลนครศรีธรรมราช ณ นครอุทิศ เฉพาะนักเรียนที่ได้รับการอนุญาตจากผู้ปกครอง ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้า (first morning specimen) ซึ่งถือว่าเป็นปัสสาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายมากที่สุด เก็บปัสสาวะวันอังคาร พุธ พฤหัสบดี และศุกร์ โดยให้ นักเรียนเก็บปัสสาวะแรกในตอนเช้าจากบ้าน

2.5 เก็บข้อมูลโดยใช้แบบสัมภาษณ์ ให้นักเรียนตอบคำถามตามแบบสัมภาษณ์ (ภาคผนวก จ)

3. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.1 การวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณบอแรกซ์ในอาหารดัดแปลงมาจากวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในปัสสาวะด้วยวิธี colorimetric method โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ตามวิธีของ Sunshine (1985) และ Flanagan, *et. al* (1995) มี sensitivity ของ boric acid 5.00 มก./กก. และคำนวณเป็นปริมาณบอแรกซ์ในอาหาร มีวิธีการดังนี้

1. เติมสารละลาย ammonium sulfate 5.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. เติมอาหารตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ 1.00 กรัม ซึ่งบดละเอียด นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จนอาหารละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน นำหลอดเซนตริฟิวส์ไปวางในน้ำเดือด 15 นาที คนเบา ๆ เป็นระยะ ๆ
3. นำหลอดเซนตริฟิวส์ไปปั่นที่ความเร็ว 3500 รอบ / นาที เป็นเวลา 10 นาที
4. เทส่วนใส (supernatant) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร ล้างตะกอนซ้ำเช่นเดียวกับในข้อ 3 ปรับปริมาตรจนครบ 10.00 มิลลิลิตร
5. เติม activated charcoal ประมาณ 0.10 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าเป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วปล่อยให้ถ่านตกตะกอนอีก 5 นาที
6. กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง whatman No. 1
7. นำสารละลายที่กรองได้ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม conc. sulfuric acid และ carminic acid อย่างละ 5.00 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
8. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดบอริก ให้มีความเข้มข้นของโบรอน 5.00, 10.00, 15.00 และ 20.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อย่างละ 1 มิลลิลิตร เติม conc. sulfuric acid และ carminic acid อย่างละ 5.00 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับข้อ 7.
9. วัดการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
10. คำนวณความเข้มข้นของกรดบอริกในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดบอริก และคำนวณเป็นปริมาณบอแรกซ์ในอาหาร (มก./กก.) (ภาคผนวก ก)

3.2 การทดสอบปัสสาวะ

ก. การวัดความถ่วงจำเพาะของปัสสาวะโดยใช้ยูริโนมิเตอร์ (urinometer)

การวัดความถ่วงจำเพาะของปัสสาวะเป็นการวัดความสามารถของไตในการควบคุมสารต่าง ๆ ที่ไตขับถ่ายออกมา ใช้กระบอกตวง (cylinder) กับยูริโนมิเตอร์ซึ่งทำมาจากแท่งแก้วหัวและท้ายปิดสนิทและสามารถทนต่อฤทธิ์ของกรดและด่างของปัสสาวะ ส่วนล่างสุดเป็นกระเปาะมีปรอทบรรจุอยู่ ซึ่งวิธีการวัดความถ่วงจำเพาะมีวิธีการดังนี้

1. เทปัสสาวะที่ต้องการจะหาความถ่วงจำเพาะลงไปในกระบอกตวงให้ระดับของปัสสาวะห่างจากส่วนบนสุดของกระบอกตวงประมาณ 1 นิ้ว และอย่าให้มีฟองอากาศ
2. ใส่ยูริโนมิเตอร์ลงในกระบอกตวง อ่านค่าความถ่วงจำเพาะที่ก้านยูริโนมิเตอร์ตรงระดับต่ำสุดของรอยเว้าของปัสสาวะ
3. เมื่อใช้เสร็จทุกครั้งควรล้างให้สะอาดและแช่ยูริโนมิเตอร์ลงในกระบอกตวงที่มีน้ำกลั่นปราศจากไอออนหรือน้ำกลั่น

การวัดความถ่วงจำเพาะปัสสาวะเป็นการปรับปัสสาวะที่ใช้ทดสอบให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานเดียวกัน โดยกำหนดปัสสาวะของคนที่การทำงานของไตเป็นปรกติ มีค่าความถ่วงจำเพาะอยู่ในช่วง 1.003-1.035 (Ross, 1983) ดังนั้นหากปัสสาวะที่มีความถ่วงจำเพาะต่ำกว่าหรือสูงกว่าค่าปรกติดังกล่าวจะเก็บตัวอย่างซ้ำ เนื่องจากปัสสาวะที่ได้อาจมีความเจือจางหรือเข้มข้นน้อยเกินไป

ข. การทดสอบหาระดับบอแรกซ์ในปัสสาวะโดยใช้กระดาษขมิ้น

ทดสอบหาบอแรกซ์ในปัสสาวะนักเรียนโดยวิธีทดสอบด้วยกระดาษขมิ้น ซึ่งเป็นการตรวจสอบกึ่งหาปริมาณ (semi - quantitative technique) (สมพูล กฤตลักษณ์ และกรรณิกา พิริยะจิตรา, 2532 : 53-63) มีวิธีการดังนี้

1. การเตรียมกระดาษขมิ้นสำหรับการทดสอบ เตรียมสารละลายขมิ้นให้มีอัตราส่วนของผงขมิ้น : แอลกอฮอล์ โดยปริมาตรเท่ากับ 1 : 10 โดยนำผงขมิ้นที่อบแห้งจำนวน 1 ส่วนต่อ absolute alcohol 10 ส่วน ใส่ในบีกเกอร์ คนให้ละลายด้วย magnetic stirrer นาน 5 นาที กรองสารละลายขมิ้นที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 จะได้สารละลายที่มีสีเหลืองแสดและใส นำสารละลายขมิ้นที่กรองได้ใสในถาดสแตนเลส นำกระดาษกรอง whatman No.2 จุ่มลงในสารละลายขมิ้นให้สารละลายแทรกเข้าไปในเนื้อกระดาษอย่างสม่ำเสมอ ตากให้แห้งในที่ที่ไม่ถูกแสงแดดเมื่อแห้งดีแล้ว เก็บกระดาษขมิ้นที่เตรียมไว้ในกล่องทึบแสง ใช้ในการทดสอบต่อไป

2. การทดสอบความไวของกระดาษขมิ้น

2.1 เตรียมสารละลายบอแรกซ์ในปัสสาวะใส่ในหลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังต่อไปนี้ คือ 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000 มก./ล. อย่างละหนึ่งหลอดทดสอบ

2.2 นำสารละลายในข้อ 2.2 แต่ละหลอดมาปรับ pH ด้วย HCl 1 N. ให้มี pH อยู่ระหว่าง 4-6

2.3 นำสารละลายในข้อ 2.3 มาทดสอบกับกระดาษขมิ้น จะได้แถบสีมาตรฐานดังนี้

สีเหลือง	มีบอแรกซ์ในปัสสาวะ	0	มก./ล.
สีเหลืองเข้ม	มีบอแรกซ์ในปัสสาวะ	250	มก./ล.
สีส้มอ่อน	มีบอแรกซ์ในปัสสาวะ	500	มก./ล.
สีส้ม	มีบอแรกซ์ในปัสสาวะ	1,000	มก./ล.
สีแสด	มีบอแรกซ์ในปัสสาวะ	2,500	มก./ล.
สีแสดแดง	มีบอแรกซ์ในปัสสาวะ	5,000	มก./ล.
สีน้ำตาลอมแดง	มีบอแรกซ์ในปัสสาวะ	10,000	มก./ล.

3. วิธีการตรวจปัสสาวะ

3.1 นำปัสสาวะที่ต้องการหาบอแรกซ์มา 1 มิลลิลิตรใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.2 ทดสอบ pH ของปัสสาวะในข้อ 3.1 ด้วย pH paper ถ้าปัสสาวะนั้นมี pH อยู่ระหว่าง 4-6 นำปัสสาวะไปทดสอบกับกระดาษขมิ้นได้เลย แต่ถ้าปัสสาวะนั้นมีค่า pH มากกว่า 6 ขึ้นไป ต้องปรับสภาพของปัสสาวะให้เป็นกรดด้วย HCl 1 N. จนปัสสาวะมีสภาพเป็นกรดที่ pH 4-6

3.3 นำปัสสาวะตาม ข้อ 3.2 มาทดสอบกับกระดาษขมิ้น เทียบสีอ่านค่าที่ได้ ยืนยันผลการทดสอบโดยหยด ammonium hydroxide กระดาษขมิ้นที่เป็นสีแดงจะเปลี่ยนเป็นสี darkblue green (Sunshine, 1985)

ทั้งนี้หากระดับบอแรกซ์ในปัสสาวะ < 250 มก./ล. ถือว่าตรวจไม่พบบอแรกซ์ในปัสสาวะ หากระดับบอแรกซ์ในปัสสาวะ > 250 มก./ล. ขึ้นไป ถือว่าตรวจพบบอแรกซ์ในปัสสาวะ (สมพูล กฤตลักษณ์ และกรรณิกา พิริยะจิตรา, 2532 : 53-63)

4. การควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ทำการควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ตัวอย่าง เพื่อยืนยันความถูกต้องและความแม่นยำของผลการวิเคราะห์ โดยการหา % recovery ของ spiked sample และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อหา % difference (% D)

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{found value} \times 100}{\text{true value}}$$

$$\% \text{ difference (\% D)} = \left| \frac{\text{found value - average value}}{\text{average value}} \right| \times 100$$

โดย% recovery อยู่ในช่วง 80-120 และ % difference ไม่เกิน 5% ถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปSPSS (Statistical Package for the Social Science for Window) สถิติที่ใช้ในการวิจัย คือ

1. สถิติเชิงพรรณา :
   - 1.1 จำนวนร้อยละ (percent)
   - 1.2 ค่าเฉลี่ย (mean)
2. สถิติเชิงวิเคราะห์ :
   - 2.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างปริมาณบอแรกซ์ในอาหารที่จำหน่ายในโรงอาหารกับอาหารที่จำหน่ายหน้าโรงเรียน (t – test)
   - 2.1 ทดสอบความสัมพันธ์ของระดับบอแรกซ์ในปัสสาวะของนักเรียนกับตัวแปรต่าง ๆ ดังนี้ (χ^2 – test)
     - จำนวนมื้อที่รับประทานอาหาร
     - ความถี่ในการรับประทานอาหารหน้าโรงเรียน
     - ชนิดอาหารหน้าโรงเรียนที่รับประทาน
     - ระยะเวลาหลังจากรับประทานอาหารหน้าโรงเรียน
     - ชนิดอาหารที่รับประทานนอกจากที่โรงเรียน
     - ระยะเวลาหลังจากรับประทานอาหารนอกจากที่โรงเรียน
     - ความรู้เกี่ยวกับอันตรายของบอแรกซ์
     - โรคประจำตัวของนักเรียน