

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ลักษณะข้อมูล

วิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงวิเคราะห์ชนิดภาคตัดขวาง (cross-sectional study) เพื่อศึกษาปริมาณสารปรอทในปัสสาวะของทันตบุคลากร ข้อมูลที่นำมาศึกษาเป็นข้อมูลทางชีวภาพ ได้มาจากการเก็บปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ระดับปรอท และเก็บข้อมูลตัวแปรอิสระโดยแบบบันทึกข้อมูลบุคคล และสภาพแวดล้อมของการทำงานต่าง ๆ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มที่สัมผัสกับสารปรอทเป็นระยะเวลานาน

1.1 กลุ่มทันตบุคลากรในโรงพยาบาลชุมชน ทั้งหมด 10 โรงพยาบาลดังนี้

1.1.1	โรงพยาบาลบ่อทอง	จำนวน	6	คน
1.1.2	โรงพยาบาลหนองใหญ่	จำนวน	5	คน
1.1.3	โรงพยาบาลบ้านบึง	จำนวน	6	คน
1.1.4	โรงพยาบาลพานทอง	จำนวน	5	คน
1.1.5	โรงพยาบาลพนัสนิคม	จำนวน	10	คน
1.1.6	โรงพยาบาลอ่าวอุดม	จำนวน	14	คน
1.1.7	โรงพยาบาลบางละมุง	จำนวน	6	คน
1.1.8	โรงพยาบาลสัตหีบ กม.10	จำนวน	9	คน
1.1.9	โรงพยาบาลวัดญาณสังวราราม	จำนวน	3	คน
1.1.10	โรงพยาบาลเกาะสีชัง	จำนวน	2	คน
รวม			63	คน

1.2 กลุ่มควบคุม (บุคลากรทั่วไป) ได้แก่ เจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการ, การเงิน ฯลฯ ในโรงพยาบาลชุมชนทั้ง 10 โรงพยาบาล แห่งละ 3 คน

2. กลุ่มที่เริ่มสัมผัสกับสารปรอท

- 2.1 นักศึกษาทันตภิบาลชั้นปีที่ 2 วิทยาลัยการสาธารณสุขสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์
จำนวน 41 คน
- 2.2 นักศึกษาพนักงานอนามัย (กลุ่มควบคุม) วิทยาลัยการสาธารณสุข
จังหวัดสุรินทร์ จำนวน 41 คน

แผนการเก็บตัวอย่าง

แผนการเก็บตัวอย่างแบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

1. กลุ่มทันตบุคลากรที่สัมผัสกับสารปรอทในโรงพยาบาลชุมชน

ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์คือ ปัสสาวะ

บุคลากรแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อยดังนี้

ก = ทันตแพทย์

ข = ทันตภิบาล

ค = ผู้ช่วยทันตแพทย์

ง = เจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการ, การเงิน ฯลฯ ในโรงพยาบาลชุมชน (กลุ่มควบคุม)

โรงพยาบาลชุมชนจำนวน 10 แห่ง

- | | |
|----------------------|-----------------------------|
| 1. โรงพยาบาลบ่อทอง | 6. โรงพยาบาลอ่าวอุดม |
| 2. โรงพยาบาลหนองใหญ่ | 7. โรงพยาบาลบางละมุง |
| 3. โรงพยาบาลบ้านบึง | 8. โรงพยาบาลสตึกหีบ กม.10 |
| 4. โรงพยาบาลพานทอง | 9. โรงพยาบาลวัดญาณสังวราราม |
| 5. โรงพยาบาลพนัสนิคม | 10. โรงพยาบาลเกาะสีชัง |

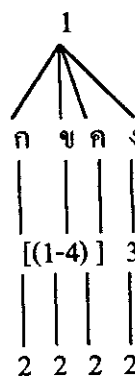
รพ. (10)

2.....10

บุคลากร (4)

ซ้ำ (1-4)

จำนวนซ้ำของการวิเคราะห์



2. กลุ่มทัศนบุคลากรที่เริ่มสัมผัสกับสารปรอท

ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์คือ ปัสสาวะ

บุคลากรแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยดังนี้

ท = นักศึกษาทันตภิบาล

พ = นักศึกษาพนักงานอนามัย (กลุ่มควบคุม)

วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดชลบุรี 1 แห่ง

วสส.ชบ. (1)

บุคลากร (2)

ซ้ำ (41)

จำนวนซ้ำของการวิเคราะห์ 2



การเก็บรวบรวมข้อมูล

เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูล

ตอนที่ 1 เก็บข้อมูลทางชีวภาพ

เก็บตัวอย่างปัสสาวะช่วงตื่นนอนตอนเช้า (early morning urine) ทุกวันพฤหัสบดีของสัปดาห์ จำนวน 50 มล. ลงในขวด teflon ปากกว้างขนาด 250 มล. ติดเทปขาวเขียนหมายเลขให้ถูกต้อง นำไปแช่เย็นเพื่อรอตรวจผล

ตอนที่ 2 เก็บข้อมูลจากแบบสอบถาม โดยการสัมภาษณ์

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารปรอทในปัสสาวะ

ใช้เครื่อง Hydride generator fluorescence spectrometer

สารเคมี

1. 0.2 N Potassium Bromate (KBrO_3)
2. 0.2 N Potassium Bromide (KBr)
3. 0.1 N Potassium Bromate (KBrO_3)/0.1 N Potassium Bromide (KBr)
4. Hydroxyammonium chloride (12% m/v)
5. 33% v/v Hydrochloric acid (HCl)

6. Tin (II) Chloride solution ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
7. Nitric acid (HNO_3)
8. Mercury standard solution [Mercury (II) nitrate $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$]
9. Argon gas
10. Deionized water
11. Distilled water

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง
 - 1.1 ขวด teflon ปากกว้างสำหรับเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 50 มล.
 - 1.2 ตู้เย็นสำหรับแช่ตัวอย่างปัสสาวะ
2. เครื่องมือและอุปกรณ์วิเคราะห์ตัวอย่าง
 - 2.1 microwave oven
 - 2.2 muffle furnace
 - 2.3 automatic pipette
 - 2.4 conical tube ขนาด 15 มล. และ 45 มล.
 - 2.5 teflon bottle ขนาด 250 มล.
 - 2.6 เครื่องชั่งสารเคมีชนิดละเอียด
 - 2.7 ตู้ฉีกควัน
 - 2.8 เครื่องกลั่นกรด

การเตรียมสารเคมี

1. **0.2 N Potassium Bromate (KBrO_3)** นำผง KBrO_3 ไปเผาด้วยเครื่อง muffle furnace ที่อุณหภูมิ $250 \pm 20^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ชั่งผง 2.78 กรัม ปรับปริมาตรในน้ำ deionized water ให้ได้ 500 ml เก็บใน teflon bottle มีอายุ 1 สัปดาห์
2. **0.2 N Potassium Bromide (KBr)** นำผง KBr ไปเผาด้วยเครื่อง muffle furnace ที่อุณหภูมิ $300 \pm 20^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ชั่งผง 11.90 กรัม ปรับปริมาตรในน้ำ deionized water ให้ได้ 500 ml เก็บใน teflon bottle มีอายุ 1 เดือน
3. **0.1 N Potassium Bromate (KBrO_3)/0.1 N Potassium Bromide (KBr)** นำ 0.2 N KBr และ 0.2 N KBrO_3 ที่เตรียมไว้มาอย่างละ 50 ml ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากัน เตรียมทุกวัน
4. **Hydroxyammonium chloride (12% m/v)** ชั่งผง 12 กรัม ปรับปริมาตรด้วย

deionized water ให้ได้ 100 ml เก็บใน volumetric flask มีอายุ 1 สัปดาห์

5. 33% v/v Hydrochloric acid (HCl) HCl conc. 167 ml ปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้ได้ 500 ml

6. Tin (II) Chloride solution ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ชั่งผง 2 กรัม ต่อ HCl (33%) 45 ml ปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้ได้ 100 ml นำไปคนสารละลายให้เข้ากันโดย Hot plate ทิ้งไว้ให้เย็น เตรียมทุกวัน

7. Blank

0.1 N KBrO_3/KBr	5 ml	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Hydroxyammonium chloride 12\%} \\ 150 \mu\text{l} \end{array} \right.$
HCl (33%)	37.5 ml	
ปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้ได้ 250 ml		

เตรียมทุกวัน

8. Standard base (ใช้ในการเตรียม series mercury standard) เตรียมทุกวัน

0.1 N KBrO_3/KBr	5 ml
HCl conc.	12.5 ml

ปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้ได้ 250 ml

9. Mercury standard solution [Mercury (II) nitrate $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$] = 1000 mg/L มีอายุนาน 6 เดือน

series mercury standard เตรียมทุกวัน

หมายเหตุ

1. น้ำที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย คือ deionized water
 2. Hydrochloric acid และ Nitric acid นำมากลั่นก่อนใช้งาน
- การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเพื่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง microwave oven (setting time = 50 W 10 นาที, Vent. 20 นาที)

1. ใส่ urine ใน teflon vessels 10 ml
 2. เติมนitric acid 5 ml
 3. หลังจากเตรียมตัวอย่างเสร็จแล้ว ปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้ได้ 50 ml
 4. นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Hydride generator fluorescence spectrometer
- การทำความสะอาด vessel ของเครื่อง microwave oven (setting time = 700 W 10 นาที, Vent. 50 นาที)

1. ใส่ Hydrochloric acid (conc.) 6 ml

2. ใส่ Nitric acid (conc.) 2 ml

การทำ **recovery test mercury** ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ ก่อนการวิเคราะห์ ด้วยเครื่องมือ microwave oven ที่ 50 W 10 นาที , vent 20 นาที ดังรายละเอียด ต่อไปนี้

sample	1.1 ml	HNO ₃ Conc.(ml)	ตัวอย่าง(10ml)	final volume 50 ml (ปรับปริมาตรด้วย deionized water)
1. blank	Std. Base	5	Deionized water	33.9
2. Urine No add R1	Std. Base	5	Urine	33.9
3. Urine No add R2	Std. Base	5	Urine	33.9
4. Urine add Std. Hg R1	Std. Hg 50 µg/L	5	Urine	33.9
5. Urine add Std. Hg R2	Std. Hg 500 µg/L	5	Urine	33.9

หมายเหตุ final volume = 50 ml + 12%Hydroxyammonium chloride 40 µl

$$\% \text{ recovery } 5 \mu\text{g/L} \pm \text{SD} = 98.68 \pm 0.22$$

$$\% \text{ recovery } 50 \mu\text{g/L} \pm \text{SD} = 97.39 \pm 3.25$$

limit of detection

ทำการทดลอง จำนวน 8 ซ้ำการทดลอง

$$\text{mean of blank} = 0.007$$

$$\text{SD of blank} = 0.01$$

$$\text{limit of detection} = 3 \text{ SD of blank}$$

$$= 3 \times 0.01$$

$$= 0.03 \mu\text{g/L}$$

การวิเคราะห์ระดับ creatinine (Jaffe reaction)

Photometric colorimetric test for endpoint

อุปกรณ์การทดลอง

1. Spectrophotometer

2. Water bath
3. หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มม.
4. ขวด teflon ขนาด 250 มล.
5. เครื่องแก้วขนาดต่าง ๆ

สารเคมี

Creatinine liquicolor ประกอบด้วย

1. Creatinine picric acid
2. Creatinine buffer
3. Creatinine standard
4. Acetic acid

การเตรียมสารเคมี นำ Creatinine picric acid และ Creatinine buffer ในปริมาณเท่า ๆ กันมาผสมให้เข้ากัน (working reagent) มีอายุการเก็บประมาณ 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการวิเคราะห์ Creatinine

1. dilute urine 10 เท่า
2. เตรียมหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มม.
 - 2.1 ใส่ deionized water 0.2 ml (blank)
 - 2.2 ใส่ urine 0.2 ml (sample)
3. pipet working reagent 3 ml ใส่ในหลอดทดลองทุกหลอด
4. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป heating bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที
5. set wavelength 510 nm ตั้งค่า blank = 0 อ่านค่า A1
6. เติม Acetic acid 0.1 ml ในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

7. ตั้งค่า blank = 0 อีกครั้ง อ่านค่า A2

การคำนวณ

$$\frac{\Delta \text{ Abs. (unknown)} \times \text{concentration of standard}}{\Delta \text{ Abs. (standard)}} = \text{creatinine (mg/dl) in unknown}$$

$$\Delta \text{ Abs.} = \text{absorbance A1} - \text{absorbance A2}$$

standard 5 mg/dl มีค่า A1 = 0.23 และ A2 = 0.0

ตัวอย่าง

$$\frac{(A1 - A2) \text{ unknown} \times 5.0 \text{ mg/dl}}{0.23 - 0.0} = ? \text{ mg/dl}$$

ค่าที่ได้นำไปแปลผลร่วมกับปริมาณสารปรอทในปัสสาวะ หน่วยคือ $\mu\text{g Hg/g creatinine}$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยครั้งนี้นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์โดยอาศัยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (statistical package for social science) for windows release 9.0

1. สถิติเชิงพรรณนา ใช้ค่าเฉลี่ย (mean) standard error และค่าพิสัย (range) ค่าร้อยละ มาอธิบายลักษณะปริมาณสารปรอทในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา

2. สถิติเชิงอนุมาน

2.1 วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way ANOVA) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณสารปรอทในปัสสาวะของกลุ่มทัศนบุคลากร และกลุ่มบุคลากรทั่วไป (กลุ่มควบคุม)

2.2 ใช้สถิติ Student Newman Keuls (SNK) ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของปริมาณสารปรอทในปัสสาวะของกลุ่มทัศนบุคลากรและกลุ่มบุคลากรทั่วไป (กลุ่มควบคุม)

2.3 ใช้สถิติ t-test ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณสารปรอทในปัสสาวะของนักศึกษาทันตภิบาลและนักศึกษาพนักงานอนามัย (กลุ่มควบคุม)

2.4 วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way ANOVA) และ t-test หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณสารปรอทในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างในแต่ละปัจจัยต่าง ๆ

2.5 ระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < .01$