

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดเลือกประชากร

ในการศึกษาครั้งนี้ประชากรที่เป็นตัวอย่าง เป็นอาสาสมัครเด็กอายุระหว่าง 2-6 ปี จำนวน 10 คน ที่อาศัยอยู่ในจังหวัดปทุมธานี ซึ่งผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็กจะได้รับการฝึกอบรมให้มีความรู้ความเข้าใจ ในเรื่องการเก็บตัวอย่างอาหาร อุจจาระ และดิน โดยผู้ศึกษาจะเดินทางไปรับตัวอย่างติดต่อกัน 7 วัน เพื่อมาเตรียมตัวอย่างต่อไป รวมทั้งสามารถบันทึกข้อมูลส่วนตัว ของอาสาสมัครเด็กได้อย่างถูกต้อง (ภาคผนวก)

3.2 อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

3.2.1.1 ถังพลาสติก ขนาดบรรจุ 1 กิโลกรัม

3.2.1.2 ตู้น้ำแข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง

3.2.1.2 ข้อนพลาสติกสำหรับตักตัวอย่าง

3.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก

3.2.2.1 ตู้อบ Furnace (Carbolite[®], England)

3.2.2.2 ตู้อบ (Venticell[®] #MMM Medcenter, GS Scherhelt, Germany)

3.2.2.3 เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง

3.2.2.4 เครื่องปั่นอาหาร

3.2.2.5 เตา Hot plate

3.2.2.6 บีกเกอร์ ขนาด 250 ml.

3.2.2.7 หลอดทดลองขนาดกลาง

3.2.2.8 ปิเปต ขนาด 10 ml.

3.2.2.9 แท่งแก้วคนสาร

3.2.2.10 กรวยแก้วสำหรับกรอง

3.2.2.11 ลูกยาง

3.2.2.12 ข้อนพลาสติกสำหรับตักตัวอย่าง

- 3.2.2.13 ชั้นวางหลอดทดลอง
- 3.2.2.14 Forceps
- 3.2.2.15 กระจกนาฬิกา
- 3.2.2.16 กระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 mm. (Whatman, England)
- 3.2.2.17 Nitric acid ชนิด AR grade (Merck, Germany)
- 3.2.2.18 Perchloric acid ชนิด AR grade (Merck, Germany)

3.2.3 เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก

- 3.2.3.1 เครื่อง Atomic Absorption Spectrometer (AAS), AA 300
(Varian, Australia)
- 3.2.3.2 สารละลายมาตรฐาน Aluminium
Pure Standard Stock Solution (Merck, Germany)
- 3.2.3.3 สารละลายมาตรฐาน Silicon
Pure Standard Stock Solution (Merck, Germany)

3.3 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

3.3.1 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็ก บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับกิจกรรมของเด็กที่ทำเป็นประจำ เกี่ยวกับดิน อุปกรณ์การเล่นของเด็ก การรับประทาน การขับถ่ายของเด็ก ตลอดระยะเวลา 7 วัน ของการศึกษา เพื่อนำมาประกอบการวิเคราะห์ รวมทั้งให้ข้อมูลส่วนตัวของอาสาสมัครเด็ก เช่น ชื่อ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง เพศ สถานที่อยู่อาศัยและโรงเรียน

3.3.2 การเก็บอาหารและเครื่องดื่ม

การเก็บเครื่องดื่มและอาหารจะเก็บแบบ duplicate คือ ปริมาณเครื่องดื่ม นม และอาหารที่เก็บ มีปริมาณเท่ากับปริมาณเครื่องดื่ม นม และอาหาร ที่อาสาสมัครเด็กได้รับประทานในแต่ละมื้อ ใส่ถุงพลาสติกที่เตรียมไว้ และผู้ศึกษาจะเดินทางไปรับตัวอย่าง เพื่อมาเตรียมตัวอย่างต่อไป การเก็บจะต้องเก็บทุกมื้อติดต่อกัน 7 วัน รวมทั้งอาหารประเภทอื่นๆ ที่ได้รับประทานในแต่ละวัน เช่น ขนม ผลไม้ วิตามินต่าง

3.3.3 การเก็บอุจจาระ

การเก็บอุจจาระ จะเริ่มทำการเก็บอุจจาระในระหว่างวันที่ 2-8 ของการศึกษา การเก็บอุจจาระ จะเก็บวันละ 1 ครั้ง ใส่ถุงพลาสติกที่เตรียมไว้ และจะต้องเก็บติดต่อกัน 7 วัน หากไม่สามารถเก็บอุจจาระติดต่อกัน 7 วัน ผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็กจะต้องเริ่มการเก็บใหม่ตั้งแต่วันที่ 1 ของการศึกษาและขั้นตอนนี้ผู้ปกครองของอาสาสมัครเด็กจะต้องเตรียมตัวอย่างอุจจาระ โดยการชั่งน้ำหนักรวมของอุจจาระแล้วแบ่งใส่ปิ๊กเกอร์ประมาณ 20 กรัม นำตัวอย่างอุจจาระในปิ๊กเกอร์ไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 °ซ จนแห้ง ที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและฝึกอบรมด้านสิ่งแวดล้อม จ. ปทุมธานี และผู้ศึกษาจะเดินทางไปรับตัวอย่าง เพื่อมาเตรียมตัวอย่างต่อที่ ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาสัตวแพทยศาสตร์ ณ ชั้น 11 อาคารสัตวแพทย์ 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ ให้อยู่ในรูปของสารละลาย และส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หา Aluminium และ Silicon ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.4 การเก็บตัวอย่างดิน

การเก็บดินจะเก็บในบริเวณที่อยู่อาศัยและบริเวณที่เด็กมีกิจกรรม โดยเก็บดินจากบริเวณหน้าดินประมาณ 5 กรัมใส่ถุงพลาสติกที่เตรียมไว้ และจะต้องทำการเก็บดินตัวอย่างติดต่อกัน 7 วัน

3.3.5 การเตรียมและวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.3.5.1 ชั่งน้ำหนักรวมของตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างอุจจาระ และตัวอย่างดิน ซึ่งจะถูกทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 1 ครั้ง ตัวอย่างอาหาร และตัวอย่างอุจจาระจะแบ่งนำมาใช้ในการวิเคราะห์ประมาณ 20 กรัม/ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างดิน ใช้ประมาณ 0.5 กรัม/ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างใส่ในปิ๊กเกอร์

3.3.5.2 นำตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างอุจจาระ และตัวอย่างดิน ทั้ง 2 ปิ๊กเกอร์ไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 °ซ จนแห้งสนิท

3.3.5.3 ทิ้งตัวอย่างปิ๊กเกอร์ที่ผ่านการอบให้เย็นลง แล้วนำตัวอย่างไปเติมด้วยส่วนผสมของ $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (10:1) ปริมาตร 15 มิลลิลิตรหรือจนท่วมตัวอย่าง คนตัวอย่างและปิดปิ๊กเกอร์ด้วยกระดาษฟิวส์และตั้งไว้ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อย่อยสลายตัวอย่าง

3.3.5.4 นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยสลายแล้วไประเหยแห้ง เพื่อเอากรดออกบนเตา Hot plate นานประมาณ 3-4 ชั่วโมง

3.3.5.5 เผาตัวอย่างในตู้อบ Furnace ที่อุณหภูมิ 550 °ซ นาน 3 - 5 ชั่วโมง จนได้เถ้าสีเทา แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.3.5.6 นำเข้าสีเทาไปละลายด้วย 0.1 N HNO₃ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.3.5.7 กรองสารละลาย ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 ใส่ลงในหลอดทดลอง ปิดฝาให้เรียบร้อย

3.3.5.8 วิเคราะห์หาปริมาณ trace elements ในสารละลายตัวอย่าง ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS)

3.3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก

นำตัวอย่างอาหาร, อุจจาระและดินที่เตรียมไว้ในรูปของสารละลายในหลอดทดลองไปวิเคราะห์หาปริมาณ Aluminium (Al) และ Silicon (Si) ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) โดย Aluminium ใช้ความยาวคลื่น 309.3 นาโนเมตร และ Silicon ใช้ความยาวคลื่น 251.6 นาโนเมตร

เงื่อนไขในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS มีดังนี้

Flame	N ₂ O – Acetylene
Acetylene flow rate (Al)	6.90 L/min
Acetylene flow rate (Si)	7.0 L/min
N ₂ O flow rate (Al)	11.0 L/min
N ₂ O flow rate (Si)	11.0 L/min

3.3.7 การคำนวณปริมาณดินที่เด็กบริโภคในแต่ละวัน

คำนวณปริมาณดินที่เด็กบริโภคในแต่ละวัน จากสมการ Mass-balanced

$$M_{\text{intake}} = M_{\text{excreted}}$$

$$M_{\text{fo}} + M_{\text{so}} = M_{\text{fe}}$$

$$M_{\text{fo}} + [\text{IRs} \times C_{\text{so}}] = M_{\text{fe}}$$

$$\text{IRs} = \frac{[M_{\text{fe}} - M_{\text{fo}}]}{C_{\text{so}}}$$

โดย M_{fo} = ปริมาณ trace element ที่เด็กได้รับจากอาหาร น้ำดื่มและนม มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/วัน

M_{so} = ปริมาณ trace element ที่เด็กได้รับจากดิน มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/วัน

M_{fe} = ปริมาณ trace element ที่เด็กขับออกมาในอุจจาระ มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/วัน

IRs = ปริมาณดินที่เด็กบริโภคใน 1 วัน (Intake Rate of Soil) มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/วัน

C_{so} = ความเข้มข้นของ trace element ในดิน มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิกรัมดิน

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean), ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation), ค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95 และ 99 ในการรายงานอัตราการบริโภคดิน ได้จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS และหา % recovery ของ Al โดยใช้วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Standard Reference Material) Tomato Leaves Lot Number 1573a ซึ่งมี Aluminium 598 ไมโครกรัม/กรัม ของสถาบันมาตรฐานและเทคโนโลยี กระทรวงพาณิชย์ ประเทศสหรัฐอเมริกา (National Institute of Standard and Technology, U.S. Department of Commerce) และ Si โดยวิธี Standard addition ในวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี AAS