

# บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. รูปแบบการศึกษา

เป็นการศึกษาวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive Research) ศึกษาการได้รับ/สัมผัสสารทำลายเบนซีนของพนักงานในกิจการอู่ซ่อมรถยนต์ เขตเทศบาลนครขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น โดยหาออกมาเป็นระดับความเข้มข้นของฟีนอลในปัสสาวะ

### 2. ตัวแปรในการศึกษาวิจัย

2.1 ตัวแปรอิสระ (Independent Variables) ได้แก่ การได้รับ/สัมผัสเบนซีน จากปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เช่น อายุการทำงาน ระยะเวลาปฏิบัติงานต่อวันที่ได้รับสัมผัส และพฤติกรรมในขณะที่ปฏิบัติงาน (การสูบบุหรี่ การดื่มสุรา ไม่ล้างมือก่อนกินอาหาร การกินอาหารขณะปฏิบัติงาน) ที่มีผลต่อการเพิ่มระดับฟีนอลในปัสสาวะ

2.2 ตัวแปรตาม (Dependent Variables) ได้แก่ ระดับฟีนอลในปัสสาวะ

### 3. กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาและขนาดตัวอย่าง

#### 3.1 ประชากร

พนักงานในกิจการอู่ซ่อมรถ เขตเทศบาลนครขอนแก่น เพศชาย อายุตั้งแต่ 15-55 ปี จากจำนวนพนักงานทั้งหมด 479 คน ในอู่ซ่อมรถจำนวน 88 แห่ง เขตเทศบาลนครขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น (ข้อมูลจากสำนักงานสาธารณสุข และอนามัยสิ่งแวดล้อม)

#### 3.2 กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

พนักงานในกิจการอู่ซ่อมรถ เขตเทศบาลนครขอนแก่น เพศชาย อายุตั้งแต่ 15-50 ปี โดยใช้สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อประมาณค่าเฉลี่ยของประชากร กรณีประชากรมีขนาดเล็ก

$$n = \frac{NZ^2 \alpha_{/2} \sigma^2}{e^2 (N-1) + Z^2 \alpha_{/2} \sigma^2}$$

เมื่อ  $N$  = จำนวนประชากรทั้งหมด  
 $\sigma$  = ค่าความแปรปรวนซึ่งได้จากการศึกษาครั้งก่อน พบว่า  
 มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 14 (อัจฉิมา, 2547)  
 $e$  = ค่าความคลาดเคลื่อนสูงสุดที่ยินยอมให้เกิดขึ้น  
 $Z$  = ค่ามาตรฐานเมื่อกำหนดระดับความเชื่อมั่น

เมื่อ  $N$  = 479  
 $Z_{0.025}$  = 1.96  
 $e$  = 2.3

แทนค่า จะได้ 
$$n = \frac{479 \times 1.96^2 \times 14^2}{2.3^2(479-1) + 1.96^2 \times 14^2}$$

$n = 110$

ขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา = 110 คน

#### 4. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

4.1 แบบสัมภาษณ์ ใช้เก็บข้อมูลเชิงปริมาณ เพื่อทราบลักษณะประชากร อายุการทำงาน และ พฤติกรรมในการทำงาน กับ การได้รับสัมผัสสารทำลายเบนซีนจากการทำงานในอุตสาหกรรม โดยพิจารณาจากระดับความเข้มข้นของฟีนอลในปัสสาวะ ซึ่งผู้วิจัยได้ดัดแปลงมาจากแบบสอบถาม การซักประวัติ และการตรวจร่างกายในผู้ที่สัมผัสสารตัวทำลาย ของกรมอนามัย พร้อมทั้งทดสอบการใช้กับกลุ่มผู้ที่วิจัยโดยผ่านการให้คำปรึกษา และแก้ไขจากผู้เชี่ยวชาญกลุ่มงานอาชีพ เวชกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น

4.2 ตรวจวิเคราะห์ระดับฟีนอลในปัสสาวะ ด้วยเครื่องตรวจ Gas Chromatography ใช้เก็บข้อมูลเชิงปริมาณ เป็นดัชนีชี้วัดการได้รับสัมผัสสารทำลายเบนซีนจากการทำงานในอุตสาหกรรม

#### 5. การสร้างและพัฒนาเครื่องมือ

มีขั้นตอนดังนี้

ศึกษาทฤษฎี เอกสาร การสร้างและพัฒนาเครื่องมือ มีขั้นตอนดังนี้

1. ศึกษาทฤษฎี เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2. กำหนดกรอบเนื้อหา และออกแบบสัมภาษณ์ให้ครอบคลุมเนื้อหา ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องตามเกณฑ์และสอดคล้องกับแนวคิดทฤษฎีที่ใช้ในการวิจัย

3. นำแบบสัมภาษณ์ไปให้ผู้เชี่ยวชาญ และอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ตรวจสอบความถูกต้องและความตรงของเนื้อหา เพื่อให้มีความถูกต้อง ความชัดเจนของภาษา มีความตรงในเนื้อหา (Content validity) แล้วนำมาพิจารณาปรับปรุงแก้ไขก่อนนำไปทดสอบ

4. นำแบบสัมภาษณ์ไปทดลองใช้ ซึ่งการทดลองใช้แบบสัมภาษณ์มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความเข้าใจข้อความ คำถาม และคำที่ใช้ในแบบสัมภาษณ์ ซึ่งได้แก่ ช่วงซ่อมรถยนต์ในเขตเทศบาลนครขอนแก่น

5. นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าความเที่ยง (Reliability) โดยใช้สัมประสิทธิ์แอลฟา (Alpha Coefficient) ของ Chonbach (บุญธรรม กิจปริดาภิสุทธิ, 2535; กัลยา วานิชย์บัญชา, 2546)

## 6. วิธีการเก็บตัวอย่างและรวบรวมข้อมูล

### อุปกรณ์ที่ใช้

- 1) แบบส่งตัวอย่าง
- 2) แบบสอบถาม
- 3) ขวดพลาสติกเก็บปัสสาวะ (ปราศจากการปนเปื้อน)
- 4) ตะกร้าใส่หลอดพลาสติก
- 5) กระจกน้ำแข็ง
- 6) ถังน้ำแข็ง
- 7) หมึกบันทึกกันน้ำได้
- 8) ทำการสัมภาษณ์ตามแบบสอบถาม สอนวิธีการเก็บตัวอย่างปัสสาวะที่ถูกต้อง

ก่อนเก็บตัวอย่าง

### วิธีเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

- 1) ให้ผู้ถูกเก็บตัวอย่างล้างมือให้สะอาด
- 2) ให้เก็บปัสสาวะในระหว่างการทำงาน ( หลังจากปฏิบัติงานมาแล้วไม่น้อยกว่า 6 ชั่วโมง ) จำนวนประมาณ 30 มิลลิลิตร
- 3) เก็บปัสสาวะเพียงครั้งเดียว ใส่ขวดเก็บปัสสาวะที่บันทึกหมายเลขไว้แล้ว ปิดให้สนิท ระวังการปนเปื้อนทุกขั้นตอน
- 4) ให้แช่เย็นในกระติกน้ำแข็ง เพื่อนำส่งห้องปฏิบัติการ

### วิธีนำส่งตัวอย่าง

- 1) นำส่ง สำนักงานควบคุมโรคติดต่อเขต 6 ขอนแก่น
- 2) ใบนำส่งตัวอย่างปัสสาวะ

### วิธีการตรวจฟีนอลในปัสสาวะโดยเทคนิค Gas Chromatography

1. หลักการของวิธีวิเคราะห์ ( Principle of Method ) ย่อยปัสสาวะด้วยกรดเกลือเข้มข้น (HCl conc.) แล้วสกัดฟีนอลออกจากปัสสาวะด้วย Diisopropyl ether โดยฟีนอลที่ถูกสกัดออกมาจะอยู่ในชั้นของ Diisopropyl ether และอาศัยหลักการที่ฟีนอลเป็นสารอินทรีย์จุดเดือดต่ำ ความดันไอสูง ทำให้สามารถแยกสารผสมโดยมี Capillary column เป็น Stationary Phase และใช้ Helium carrier gas เป็น Mobile Phase เพื่อแยกสารที่สนใจออกจากกัน แล้วตรวจวัดสัญญาณด้วย Flame Ionization Detector ซึ่งตรวจหาปริมาณของสาร โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2. วิธีการเก็บตัวอย่างเก็บตัวอย่างปัสสาวะในขวดพลาสติกชนิด Polyethylene ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติม Thymol 2-3 เกล็ด ( เพื่อเก็บถนอมตัวอย่าง ) ปิดฝากระบอกพลาสติก แช่เย็นขณะนำส่งตัวอย่าง

3. ความคงทนของตัวอย่างและการส่งตัวอย่าง ( Stability and shipment )

1) ความคงทนของตัวอย่างปัสสาวะ

- คงสภาพที่ 25 C ได้นาน 4 วัน (กรณีเติมสาร Thymol)
- แช่ที่ 4 C เก็บได้นาน 1 สัปดาห์
- แช่ที่ -20 C เก็บได้นาน 3 เดือน

2) การนำส่งตัวอย่าง

เขียนหมายเลขกำกับลงบนขวดใส่ปัสสาวะ เรียงใส่ในกล่องให้เป็นระเบียบแช่เย็นขณะนำส่ง

4. วิธีการวัด (Measurement)

เทคนิค Gas Chromatography

5. สภาวะเครื่องมือ ( Condition of the instrument )

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ยี่ห้อ HEWLETT PACKARD รุ่น 6890 SERIES

5.1 Injector

- Temperature 200 C
- Split mode : Split ratio = 10 : 1
- Pressure 8.00 Psi

## 5.2 Column

- Capillary Column Hp-5% Phenyl methyl siloxane Length 30.0 m diameter  
320.0 um Film thickness 0.25 um. Nominal

- Carrier gas : He constant flow 1.2 ml/min . Pressure 8.0 Psi velocity 25 cm/sec

## 5.3 Oven

- 110 C hold 1 time min

- Ramps rate 15 C /min Final time 180 C hold time 2.5 min

- Run time 8.17 min

## 5.4 Detector

- Flame Ionization Detector (FID)

- Detector temperature 250 C

## 6. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Reagent and Equipment)

### 6.1 สารมาตรฐาน Phenol 99.8%

6.1.1 เตรียมสารมาตรฐาน Phenol ความเข้มข้น 1000 ppm ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 50.0 mg. ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 ml. สารมาตรฐานนี้จะเสถียรอยู่ได้ 14 วัน

6.1.2 Diisopropyl ether

6.1.3 Hydrochloric acid , HCl conc.

6.1.4 Thymol

6.1.5 ก๊าซที่ใช้ Hydrogen , Helium, Nitrogen, Air zero, ชนิด u.p grade

### 6.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

6.2.1 Gas Chromatography , HP 6890

6.2.2 Capillary Column, HP-5 30 m \* 320 um \* 0.25 um

6.2.3 Mixer

6.2.4 Hot plate

6.2.5 เครื่องชั่งละเอียด

6.2.6 Autopipette ขนาด 10 - 200, 200 - 1000 ul และ tip

6.2.7 Beaker ขนาด 10 , 50 , 100 , 600 ml.

6.2.8 Test tube ขนาด 10 ml. พร้อมฝาเกรียว

6.2.9 Vial ขนาด 1, 10 ml. พร้อมลูกยามสำหรับดูดสาร

## 7. ขั้นตอนการวิเคราะห์ (Procedure)

### 7.1 การเตรียมตัวอย่าง (sample preparation)

7.1.1 เขย่าน้ำปัสสาวะให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7.1.2 นำส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์หา Creatinine เพื่อใช้คำนวณภายหลัง

7.1.3 ปิเปตปัสสาวะ 5 ml. ใส่ลงใน Test tube ฝาเกลียว

7.1.4 เติมกรดเกลือเข้มข้น (HCl conc.) 1 ml.

7.1.5 ปิดฝาเกรียวพอหลวม ๆ ใส่ลงใน Beaker ที่มีน้ำอยู่ (ใช้แทน Water bath) ที่อุณหภูมิ 95°C ประมาณ 1 ชั่วโมง วางบน Hot plate

7.1.6 นำขึ้นจาก Water bath ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

7.1.7 เติม Diisopropyl ether 2 ml. ปิดฝาเกรียวให้แน่น เขย่าหลอดแก้วด้วย Mixer ประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

7.1.8 คูดสารละลายส่วนบน (ชั้นของ Diisopropyl ether) ใส่ลงใน Vial ขนาด 1 ml. แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography

### 7.2 การเตรียมสารมาตรฐานฟินอล 1000 mg/l

7.2.1 ชั่ง Phenol ประมาณ 5-20 mg. ( ใช้น้ำหนักแน่นอน )

7.2.2 ละลาย Phenol ในน้ำ DI 10-50 ml. ( แห้ตู้เย็นได้ ~ 1 เดือน )

7.2.3 คำนวณความเข้มข้นของ Phenol ในน้ำ DI หน่วยเป็น mg./L

### วิธีเตรียมสารมาตรฐาน Phenol เพื่อทำ Calibration curve for urine

พิจารณาค่ามาตรฐานของ Phenol ในปัสสาวะ = 50mg / G creatinine (- 50 mg / L)

จะต้องเตรียมค่ามาตรฐานของ std. ให้ครอบคลุมทั้งค่าต่ำและค่าสูง เช่น

5, 10, 25, 50, 100 mg/L

### วิธีการ

1) ไปเปตปัสสาวะ 5 มล. ในหลอดแก้วทดลองฝาเกลียวขนาด 15 มล.

2) ใส่ (spike) Std. Phenol ลงไปให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

3) เติม HCl conc. ลงไป 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer

4) นำไปต้มในน้ำร้อน (ประมาณ 95 °C) นาน 1 ชั่วโมง

5) จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ให้เย็น แล้วเติม Di Isopropyl Ether ( IPE ) ลงไป 5 มล. ผสมให้เข้ากันดีด้วย Vortex mixer (- 1 min)

6) ใช้ไปแปดบอย หรือ พาสเจอไปแปด คุณน้ำส่วนใสด้านบน ใส่ลงใน vial 2 มล. ปิดฝาให้แน่น

7) ฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography ( GC ) 1 ไมโครลิตร (มคล.) ด้วย ไชริงค์

8. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง ( Measurement )

8.1 นำ Working Standard ที่เตรียมไว้ ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography โดยมี ปริมาตรที่ฉีด 1 ไมโครลิตร ทุกความเข้มข้น นำ Peak area ที่ได้ไป Plot curve

8.2 ฉีดสารตัวอย่างที่สกัด เข้าเครื่อง Gas chromatography โดยมีปริมาตรฉีด 1 ไมโครลิตร เช่นเดียวกับ Working Standard แล้วนำ Peak area ที่ตรวจวัดได้ไปเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐาน และเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบความถูกต้อง ในการวิเคราะห์ โดยการ Spike สาร มาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น ( ซึ่งวิธีการเตรียมทำเช่นเดียวกันกับตัวอย่างปัสสาวะ ) มาฉีดเข้า เครื่อง Gas Chromatography เพื่อเทียบค่าความถูกต้องแม่นยำในการวิเคราะห์ด้วยทุกครั้ง

9. การแปลผล

รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ หน่วยเป็นมิลลิกรัมฟีนอลต่อกรัมครีอาตินิน ( mg/gCr)

10 การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์

10.1 ทำ Recovery ทุก 10 ตัวอย่าง ค่ากำหนดในช่วง 95-105%

10.2 ในการตรวจวิเคราะห์ฉีดตัวอย่าง 20 ครั้ง ใช้ทำการฉีดคั่นด้วยสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 30 ppm.

10.3 Duplicate injection, RPD ไม่เกิน 3 % การทำ Calibration Curve ต้องทำใหม่ ทุกครั้งที่วิเคราะห์

## 7. การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณค่าสถิติต่างๆจากข้อมูลในแบบสอบถามและผลการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้น ฟีนอลในปัสสาวะโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป STATA ดังนี้

7.1 สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ความถี่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จำแนกตาม ตัวแปรกับระดับความเข้มข้นฟีนอลในปัสสาวะของพนักงานในอุตสาหกรรม เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ (ACGIH) เพื่อประเมินความเสี่ยงการได้รับสารเบนซีนจากการ ทำงาน

7.2 สถิติอนุมาน ได้แก่ ใช้สถิติไคสแควร์ (Chi-square Test) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ระหว่าง ระยะการปฏิบัติงานเฉลี่ย ระยะเวลาการประกอบอาชีพ กับพฤติกรรมการทำงานใน

ข้อมูล ในกรณีการวิเคราะห์เป็นตารางภายในเซลล์ค่าคาดหวัง (Expected count) ต่ำกว่า 5 ใช้ค่า Fisher's Exact test

#### 8. สถานปฏิบัติงาน

ข้อมูลรถยนต์ในเขตเทศบาลนครขอนแก่น ห้องปฏิบัติการสำนักงานควบคุมโรค เขต 6  
ขอนแก่น