

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (cross-sectional study) เพื่อสำรวจชนิดของผักปลอดสารกำจัดแมลงตกค้างและเพื่อเปรียบเทียบระดับสารกำจัดแมลงตกค้างในพืชผักปลอดสารกำจัดแมลงและพืชผักทั่วไป ที่วางจำหน่ายในเขตเทศบาลนครเชียงใหม่

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร พืชผักที่วางจำหน่ายในตลาดเทศบาลและศูนย์การค้าในเขตเทศบาลนครเชียงใหม่

กลุ่มตัวอย่าง พืชผักที่นิยมบริโภคและตรวจพบสารเคมีตกค้างมากที่สุดของภาคเหนือจำนวน 3 ชนิดแรกคือ กะหล่ำปลี ผักคะน้า และผักกวางตุ้ง (กลุ่มงานพัฒนาความปลอดภัยด้านเคมีวัตถุและกองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาร่วมกับกองอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2543) ที่วางจำหน่ายในตลาดเทศบาลและศูนย์การค้าในเขตเทศบาลนครเชียงใหม่

ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง

ผักทั่วไปมีขั้นตอนการสุ่มดังต่อไปนี้

1. ผักจากตลาดสด สุ่มตัวอย่างผักทั้ง 3 ชนิดจากกองผักในแผงขายผักแผงที่ 5 ที่พบโดยบังเอิญ ชนิดละประมาณ 1 กิโลกรัม ตลาดละอย่างน้อย 3 ชนิดผัก
2. ผักจากศูนย์การค้า สุ่มตัวอย่างผัก ทั้ง 3 ชนิดจากชั้นวางผัก ชนิดละประมาณ 1 กิโลกรัม ศูนย์การค้าละ อย่างน้อย 3 ชนิดผัก

ผักปลอดสารกำจัดแมลง มีขั้นตอนการสุ่มดังต่อไปนี้

1. สำรวจชนิดของผักปลอดสารกำจัดแมลงที่วางจำหน่ายในตลาดเทศบาลและศูนย์การค้าในเขตเทศบาลนครเชียงใหม่

2. สุ่มตัวอย่างผักทั้ง 3 ชนิด จากทุกเครื่องหมายการค้า/ตรา แบ่งเก็บสัปดาห์ละ 1 ครั้ง รวม 3 ครั้ง

ได้ตัวอย่างผักที่ใช้ในการตรวจหาสารกำจัดแมลง 100 ตัวอย่าง เป็นผักทั่วไป 49 ตัวอย่าง ผักปลอดสารกำจัดแมลง 51 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ชนิดผัก	ผักทั่วไป (จำนวนตัวอย่าง)	ผักปลอดสารกำจัดแมลงตกค้าง (จำนวนตัวอย่าง)
กะหล่ำปลี	16	17
ผักกวางตุ้ง	17	17
ผักคะน้า	16	17
รวม	49	51

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

ชุดตรวจสอบสารกำจัดแมลงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (GT) แต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ 1 ครั้ง และถ้าพบระดับที่ไม่ปลอดภัย ทำการตรวจวิเคราะห์ซ้ำ 1 ครั้ง (duplicate result)

คุณภาพของเครื่องมือ

ศึกษาคุณสมบัติของชุดทดสอบสารกำจัดแมลงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตามเกณฑ์กำหนดทางระบาดวิทยา (ไพบูลย์ โล่ห์สุนทร, 2531) โดยนำชุดทดสอบมาทำการวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มเดียวกัน เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ โดยสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ใช้วิธีวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี (กอบทอง รูปหอม, 2531) สารกลุ่มคาร์บาเมตใช้วิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีโครมาโตกราฟแบบของเหลว (บุญไพสังวรานนท์และคณะ, 2531) คุณสมบัติของชุดทดสอบมีผลดังนี้

ความไว (sensitivity) = ร้อยละ 92.7

ความถูกต้อง (accuracy) = ร้อยละ 87.1

ความจำเพาะ (specificity) = ร้อยละ 85.1

ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) = ร้อยละ 70.6

ค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) = ร้อยละ 96.6 (กอบทอง รูปหอมและคณะ, 2541)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์ประกอบด้วย

1. เครื่องปั่นไฟฟ้าชนิดมูลินี็กซ์ (Moulinex)
2. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
3. ขวดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมฝาเกลียว
4. หลอดทดลอง ขนาด 8-10 มิลลิลิตร
5. เครื่องเป่าอากาศชนิดใช้กับตู้ปลา
6. ที่วางหลอดทดลอง
7. บีกเกอร์ ขนาด 50 มล.
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
9. ปิเปตต์ (pipette) ขนาดความจุ 5 มิลลิลิตร
10. หลอดหยดแก้วทำขีดปริมาตร 0.250 มิลลิลิตร
11. หลอดหยดแก้ว (pasture pipette) ขนาดความจุ 1 มิลลิลิตร
12. ลูกยางสำหรับใช้กับปิเปตต์และหลอดหยด
13. ปิเปตต์อัตโนมัติ (automatic pipette)
14. ปิเปตต์ทิวป์ (pipette tip) ขนาด 1 มิลลิลิตร
15. นาฬิกาจับเวลา
16. กระดาษกรองเบอร์ 1
17. กรวยแก้ว
18. เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer)

ชุดน้ำยาทดสอบ ประกอบด้วย

1. น้ำยาสกัด 1 (น้ำยาไคคลอโรมีเทน)
2. น้ำยาสกัด 2 (สารละลายเอทานอลร้อยละ 5)

3. น้ำยา จีที 1 (ซีรัมของมนุษย์)
4. น้ำยา จีที 2 (สารอะซีติล โคลีน)
5. จีที 2.1 (น้ำยาโซเดียมอะซีเตท)
6. น้ำยา จีที 3 (สารไฮดรอกซีลามีน)
7. น้ำยา จีที 3.1 (น้ำยาโซเดียมไฮดรอกไซด์)
8. น้ำยา จีที 4 (กรดเกลือเจือจาง)
9. น้ำยา จีที 5 (สารละลายเฟอริกคลอไรด์)

ขั้นตอนการเตรียมและสกัดตัวอย่างผัก

1. ผักคะน้าและ ผักกวางตุ้ง สุ่มผักจากหลาย ๆ ส่วนประมาณ 100 – 200 กรัม นำมาผ่าครึ่งของลำต้น สุ่มเก็บส่วนใดส่วนหนึ่งไว้ ส่วนกะหล่ำปลี นำมาผ่าออกเป็น 4 ส่วนเท่า ๆ กัน สุ่มมา 2 ส่วนในด้านตรงกันข้าม จากนั้นนำมาหั่นพอหยาบแล้วนำเข้าเครื่องปั่นไฟฟ้าชนิดมูลินีเกิ้ลปั่นละเอียด แล้วชั่งผักที่ปั่นละเอียด 5.0 กรัมใส่ลงในขวดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการตรวจสอบสารกำจัดแมลงตกค้างในตัวอย่างผัก

1. เติมน้ำกลั่นหรือน้ำควบคุมอุณหภูมิ อุณหภูมิให้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. เติมน้ำยาสกัด 1 จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในขวดพลาสติกที่บรรจุตัวอย่างผักปั่นละเอียด 5.0 กรัม โดยใช้ปิเปตต์ ขนาด 5 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้แน่นเขย่าแรง ๆ ประมาณ 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 – 15 นาที
3. ใช้ลูกยางสวมหลอดหยดแก้วที่ทำเครื่องหมายในจุดที่สามารถดูดสารได้ในปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ดูคน้ำยาสกัด 2 ปริมาตรเท่ากับที่ทำเครื่องหมาย ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วนำหลอดหยดแก้วอันเดียวกันมาดูดสารสกัดผักในข้อ 2 ปริมาตรเท่ากับที่ทำเครื่องหมาย ใส่ลงในหลอดทดลองที่เติมน้ำยาสกัด 2 ไว้แล้ว
4. นำหลอดทดลองที่ใส่สารสกัดผักและน้ำยาสกัด 2 มาใส่ในที่วางหลอดทดลองนำไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศา ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ
5. ถอดลูกยางออกจากหลอดหยดแก้ว นำสายยางที่ต่อกับเครื่องปั๊มอากาศต่อเข้ากับหลอดหยดแก้ว เปิดเครื่องปั๊มอากาศ เป่าอากาศใส่หลอดหยดแก้วลงในหลอดทดลองในข้อ 4 เพื่อทำการละลายสารสกัด 1 และทำให้ย่นาแมลงย้ายจากสารสกัด 1 มาอยู่ในน้ำยาสกัด 2 (สังเกตน้ำยาชั้นล่างซึ่งเป็นน้ำยาสกัด 1 หดไปหรือยัง โดยสังเกตที่ก้นหลอดทดลอง ต้องไม่เห็นน้ำยา

แยกออกเป็น 2 ชั้น ไม่มีลักษณะคล้ายเม็ดทรายเกาะ และไม่เห็นว่ายาเกิดฟองวงแหวนเป็นชั้น ๆ เมื่อคนแล้วไม่มีกลิ่นของน้ำยาสกัด 1)

6. คูดน้ำยาสกัด 2 ที่ผ่านการระเหยตามข้อ 5 แล้ว ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ สำหรับหลอดคัดลิน คูดน้ำยา จีที 2 จำนวน 0.25 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง หลอดใหม่ที่ล้างให้สะอาดแล้ว

7. ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ เติมน้ำยา จีที 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ข้อ 6 เขย่าให้เข้ากัน

8. นำหลอดทดลองในข้อ 7 วางในอ่างควบคุมอุณหภูมิ นานประมาณ 5-10 นาที

9. ผสมน้ำยา จีที 2.1 ลงในขวด จีที 2 เขย่าให้เข้ากัน (น้ำยา จีที 2 เมื่อผสมแล้วต้องเก็บไว้ในตู้เย็น และใช้ได้ในเวลา 1 สัปดาห์) เมื่อครบเวลาที่อุณหภูมิในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ให้นำเอาสารละลาย จีที 2 ที่ผสมแล้ว เติกลงในหลอดทดลองปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร สำหรับชุดหลอดคัดลิน ที่มีระดับร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเตอเรสแตกต่างกันให้ เติมน้ำยาละลาย จีที 2 ดังนี้

หลอดร้อยละ 0 (0 % IH) เติมน้ำยาละลาย จีที 2 0.25 มิลลิลิตร

หลอดร้อยละ 10 (10 % IH) เติมน้ำยาละลาย จีที 2 0.275 มิลลิลิตร

หลอดร้อยละ 30 (30 % IH) เติมน้ำยาละลาย จีที 2 0.325 มิลลิลิตร

หลอดร้อยละ 50 (50 % IH) เติมน้ำยาละลาย จีที 2 0.375 มิลลิลิตร

หลอดร้อยละ 80 (80 % IH) เติมน้ำยาละลาย จีที 2 0.45 มิลลิลิตร

หลอดร้อยละ 100 (100 % IH) เติมน้ำยาละลาย จีที 2 0.5 มิลลิลิตร

10. จับเวลาภายหลังเติมน้ำยา จีที 2 แล้วทันที เป็นเวลานาน 60 นาทีพอดี

11. ผสมน้ำยา จีที 3.1 ลงในขวด จีที 3 เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำยา จีที 3 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองในข้อ 10. หลังเติมน้ำยา จีที 2 เป็นเวลา 60 นาทีพอดี ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง Vortex Mixer

12. เติมน้ำยาละลาย จีที 4 ลงในหลอดทดลองข้อ 11 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex Mixer

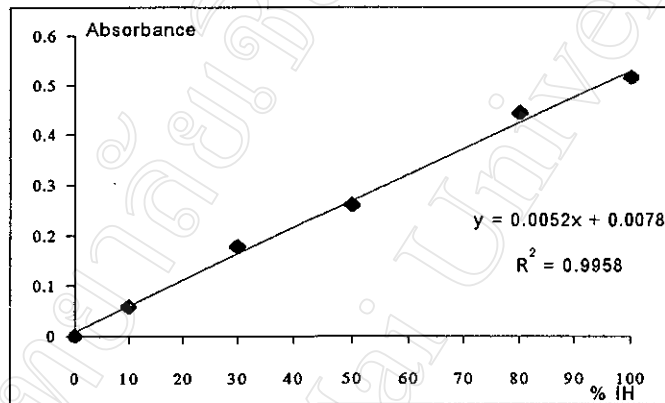
13. เติมน้ำยาละลาย จีที 5 ลงในหลอดทดลองข้อ 12 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex Mixer

14. กรองสารในข้อ 13 ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

การอ่านผล

อ่านด้วยเครื่องวัดดูดกลืนคลื่นแสง

โดยใช้ค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 540 นาโนเมตร เมื่ออ่านค่าดูดกลืนคลื่นแสงแล้วสามารถนำเอาค่าดังกล่าวของชุดคัดติมาเขียนกราฟ แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสง กับค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเตอเรส (% inhibition) ดังกราฟต่อไปนี้ แล้วนำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของหลอดทดสอบมาเทียบเพื่ออ่านค่าระดับสารกำจัดแมลงตกค้าง



การอ่านผลด้วยการเทียบสีหรือแปลผลเชิงคุณภาพ

สีในหลอดทดสอบผัก เท่ากับหรืออ่อนกว่าหลอด 0 % IH แสดงว่าตรวจไม่พบสารกำจัดแมลง

สีในหลอดผักเข้มกว่าหลอด 0 % IH แต่อ่อนกว่าหลอด 50 % IH แสดงว่าตรวจพบสารกำจัดแมลงในระดับปลอดภัยสำหรับบริโภค

สีในหลอดผักเข้มกว่าหลอด 50 % IH แสดงว่าตรวจพบสารกำจัดแมลงในระดับที่ไม่ปลอดภัยสำหรับบริโภค ทั้งนี้ได้จากการเปรียบเทียบเทียบกับค่าปลอดภัยตามมาตรฐานกำหนดในประกาศ กระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 163 (พ.ศ. 2538) (พระราชบัญญัติอาหาร, 2538) และเกณฑ์มาตรฐานโคเด็กซ์ (FAO/WHO, 1990)

การควบคุมคุณภาพของข้อมูล

1. ใช้น้ำยาชุดเดียวกัน ทั้งชุดหลอดคัดลินและหลอดทดสอบ
2. ตรวจสอบวันหมดอายุของน้ำยา เก็บน้ำยาไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
น้ำยาจีที 2 ที่ผสมแล้วไม่ใช่เกิน 7 วัน
3. เปิดเครื่องวัดการดูดกลืนคลีนแสงก่อนวัดค่าดูดกลืนคลีนแสงอย่างน้อยครึ่งชั่วโมง
4. ทดสอบการทวงสารละลายโดยใช้ปิเปตต์จนผ่านเกณฑ์
5. ตัวอย่างผักที่นำมาตรวจหาระดับสารกำจัดแมลงตกค้างจะเก็บวันต่อวัน และถ้าตัวอย่างผักที่เก็บมาตรวจหาสารกำจัดแมลงตกค้างไม่ทันในวันที่เก็บ จะนำผักไปเก็บรักษาไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส และนำมาตรวจในวันต่อมา (ตัวอย่างผักจะเก็บรักษาไว้ไม่เกิน 1 วัน)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปคอมพิวเตอร์ (SPSS : Statistical Package for the Social Science) ข้อมูลชนิดของผักปลอดสารเคมีกำจัดแมลง ผักที่พบสารกำจัดแมลงตกค้าง ใช้สถิติเชิงพรรณนา ความถี่ ร้อยละ และเปรียบเทียบระดับสารเคมีกำจัดแมลงระหว่างพืชผักทั่วไป และพืชผักปลอดสารกำจัดแมลง ใช้สถิติ Independent-Sample T Test