

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์
 - 1.1 แผ่นทำความร้อน (hot plate)
 - 1.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
 - 1.3 ตู้แช่แข็ง (deep freeze)
 - 1.4 เครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (freeze dryer)
 - 1.5 มีดสำหรับตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อ
 - 1.6 ตู้คักวัน
 - 1.7 ซ้อนตักสาร
 - 1.8 เครื่องกลั่นกรด
 - 1.9 เครื่อง Microwave Digester
 - 1.10 เตาเผาสาร (muffle furnace)
 - 1.11 ขวดเทฟลอน (teflon bottle) ขนาด 250 ml
 - 1.12 ถ้วยทรงกระบอกสำหรับใส่ตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์
 - 1.13 หลอดทรงคีนสอ (conical tube) ขนาด 15 และ 45 ml
 - 1.14 บีกเกอร์ (beaker)
 - 1.15 ครุฑชิลสำหรับเผาสารเคมี
 - 1.16 โถดูดความชื้น (desicator)
 - 1.17 ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipette)
2. สารเคมีสำหรับการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์
 - 2.1 กรดไนตริกเข้มข้น (HNO_3) ที่กลั่นให้บริสุทธิ์แล้ว
 - 2.2 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) ที่กลั่นให้บริสุทธิ์แล้ว
 - 2.3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) สำหรับขั้นตอนการทำความสะอาด vessel
 - 2.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) Analytical grade
 - 2.5 Stannous Chloride ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
 - 2.6 Potassium Bromide (KBr)

2.7 Potassium Bromate (KBrO_3)

2.8 Hydroxyammonium Chloride

2.9 น้ำ De-ionized

2.10 สารละลายมาตรฐานของปรอท (standard solution)

2.11 Argon gas

3. เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.1 เครื่อง Atomic Fluorescence Spectrometry (CVAFS) ของ PSA Analytical รุ่น Merlin สำหรับ วิเคราะห์ ปรอท

3.2 เครื่อง Atomic Absorption Spectrometer (AAS) สำหรับวิเคราะห์โลหะชนิดอื่น ๆ

วิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่าง ในการศึกษานี้เป็นการนำตัวอย่างอวัยวะของพะยูน โลมา และวาฬ ทั้งหมดที่มีหรือหามาได้จากการที่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเหล่านี้ขึ้นมาเกยตื้นหรือติดมา กับเครื่องมือประมงแล้วตาย โดยตัวอย่างทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากคุณกาญจนา อุดุลยานุโกศล สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง จังหวัดภูเก็ต ดังนั้น การเก็บตัวอย่าง จึงเป็นการเลือกตัวอย่างแบบกำหนดไว้ก่อน ตัวอย่างที่ได้มาจากหลายพื้นที่ คือ จังหวัดปัตตานี ภูเก็ต นครศรีธรรมราช พังงา ตรัง ระยอง กระบี่ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี เมื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในทะเลขึ้นมาเกยตื้นตายแล้ว หากตัวอย่างยังสมบูรณ์จะทำการ จำแนกชนิด และแยกเพศ (หากไม่สามารถจำแนกชนิดได้จากลักษณะภายนอกต้องอาศัยการจำแนก จากห้วกะโหลกและโครงกระดูก) และทำการถ่ายรูปรูปร่างภายนอกทั้งด้านบน ด้านข้าง และด้านท้อง ลักษณะครีบข้าง ครีบหลัง และครีบบาง ลักษณะสีลาย และจุดตามลำตัว รวมทั้งคำหนิภายนอก เช่น บาดแผล รอยขีด พยาธิหรือสัตว์ที่เกาะ เช่น เพรียงและอื่น ๆ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างทั้งตัว และวัด ขนาดเช่น ความยาวลำตัว รอบตัว ฯลฯ

เริ่มผ่าซากจากแนวกลางของด้านท้อง (ventral) ตามความยาวลำตัวหรือผ่าจากแนว ด้านข้างของลำตัว บันทึกลักษณะต่าง ๆ ของอวัยวะภายใน เช่น สี รอยขีด วัดความกว้าง ความยาว และชั่งน้ำหนัก ทำการเก็บเนื้อเยื่อทุกส่วนรวมทั้งอวัยวะภายในแต่ละชิ้นให้มีขนาดประมาณ 3 – 5 x 3 – 5 เซนติเมตร แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส เพื่อบริการวิเคราะห์ (กาญจนา อุดุลยานุโกศล และสุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, 2544)

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

2.1 นำตัวอย่างที่ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

2.2 นำตัวอย่างที่น้ำแข็งละลายหมดแล้ว มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน

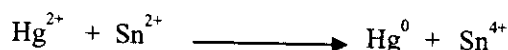
2.3 ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ต้องการวิเคราะห์ ได้แก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด เนื้อ และ blubber ตัวอย่างละประมาณ 0.25 กรัม ลงใน vessel

2.4 ทำการย่อยตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง Microwave Digester โดยใช้กรด ไนตริกเข้มข้น ที่ทำการกลั่น 2 ครั้งแล้ว และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใส่ลงใน vessel อัตราส่วน 5: 2 ml

2.5 หลังจากทำการย่อยเสร็จแล้ว ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำ De-ionized ให้ได้ปริมาตร 50 ml. และแบ่งสำหรับวิเคราะห์ปรอท 20 มิลลิลิตร และสำหรับวิเคราะห์โลหะหนักชนิดอื่น ๆ 30 มิลลิลิตร

2.6 นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปรอทด้วยเครื่อง Atomic Fluorescence Spectrometry ของ PSA analytical รุ่น Merlin (เทคนิค Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry) และ วิเคราะห์โลหะชนิดอื่น ๆ ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrometer (AAS)

3. การวิเคราะห์สารปรอท วิเคราะห์สารปรอทโดยใช้เครื่อง Atomic Fluorescence Spectrometry (CVAFS) ของ PSA analytical รุ่น Merlin ในการวิเคราะห์จะใช้ Stannous Chloride (SnCl_2) เป็นตัวรีดิวซ์ ให้ Hg^{2+} กลายเป็น Hg^0 ซึ่งสามารถระเหยกลายเป็นไอได้ ดังสมการ



เมื่อไอปรอทเกิดขึ้นจะถูกขับเข้าไปใน Fluorescence cell โดยมีก๊าซอาร์กอนเป็นตัวพาอะตอมอิสระที่ผ่านไปตามความยาวของ Fluorescence cell จะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยลำแสงจากหลอดฮาโลเจนที่ความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร

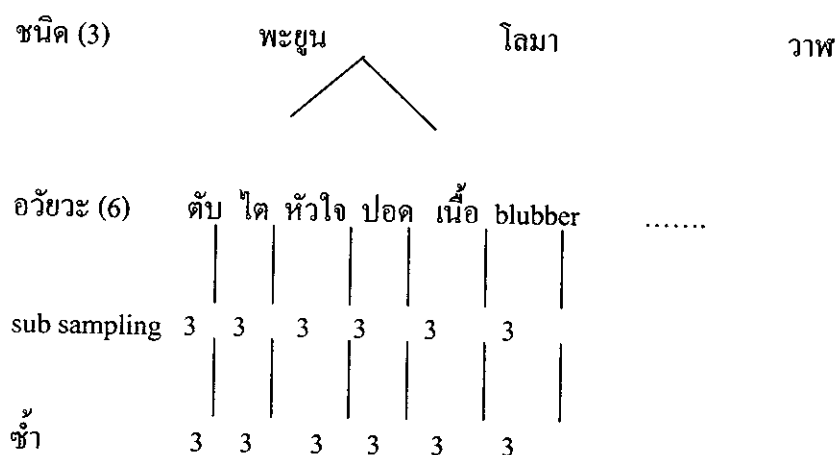
โดยความเข้มข้นของปรอทที่วัดได้จะคำนวณโดยใช้ Peak height ของตัวอย่างกับค่า Peak height ของ Standard และตรวจสอบความถูกต้อง (validation) ให้กับการวิเคราะห์โดยการหา % Recovery ของ Reference material (DORM-2)

4. การวิเคราะห์โลหะหนักชนิดอื่น ๆ ทำการวิเคราะห์โลหะ แคดเมียม ตะกั่ว ด้วยเครื่อง AAS Graphite Furnace และวิเคราะห์สังกะสีด้วยเครื่อง AAS Flame และตรวจสอบความถูกต้อง

(validation) ให้งกับการวิเคราะห์โดยการหา % Recovery ของ Reference material (DORM-2) เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปรอท

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แผนการทดลอง



การวิจัยครั้งนี้ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์โดยอาศัยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

1. สถิติเชิงพรรณนา ใช้ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าพิสัย (range) มาอธิบายปริมาณสารปรอทที่พบในเนื้อเยื่ออวัยวะต่าง ๆ
2. สถิติเชิงอนุมาน วิเคราะห์ความแปรปรวนโดย one way ANOVA และ LSD ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างแต่ละอวัยวะ ในสัตว์แต่ละชนิด

ผลการวิเคราะห์ % Recovery โดยใช้สารมาตรฐาน DORM-2 จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสารปรอทในสารมาตรฐาน DORM-2 (dog fish muscle) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นที่รับรองแล้วว่า 4.64 ± 0.26 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักแห้ง โดยทำการวิเคราะห์ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของปรอทในสารมาตรฐาน DORM-2

DORM-2 (จำนวนซ้ำ)	ความเข้มข้นของสารปรอท (ug/g)	% Recovery
1	4.474	96.420
2	4.532	97.662
3	4.398	94.781
4	4.496	94.950
เฉลี่ย + SD	4.452 + 0.063	95.953 + 1.356

และทำการคำนวณหาค่า Detection limit โดยใช้ค่า Standard Deviation ของ Blank ของตัวอย่างเนื้อเยื่อ DORM-2 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คูณด้วย 3 ได้ค่าเท่ากับ 0.781 นาโนกรัมต่อกรัม จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของแคดเมียมในสารมาตรฐาน DORM-2 (dog fish muscle) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นที่รับรองแล้วว่า 0.043 ± 0.008 ug/g น้ำหนักแห้ง โดยทำการวิเคราะห์ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคดเมียมในสารมาตรฐาน DORM-2

DORM-2 (จำนวนซ้ำ)	ความเข้มข้นของแคดเมียม (ug/g)	% Recovery
1	0.047	109.302
2	0.045	104.651
3	0.046	106.977
4	0.044	102.326
เฉลี่ย $\pm$ SD	0.046 $\pm$ 0.001	105.814

และทำการคำนวณหาค่า Detection limit โดยใช้ค่า Standard Deviation ของ Blank ของตัวอย่างเนื้อเยื่อ DORM-2 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ 8 ครั้ง คูณด้วย 3 ได้ค่าเท่ากับ 0.006 ไมโครกรัมต่อกรัม

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของตะกั่วในสารมาตรฐาน DORM-2 (dog fish muscle) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นที่รับรองแล้วว่า 0.065 ± 0.007 ug/g น้ำหนักแห้ง โดยทำการวิเคราะห์ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของตะกั่วในสารมาตรฐาน DORM-2

DORM-2 (จำนวนซ้ำ)	ความเข้มข้นของตะกั่ว (ug/g)	% Recovery
1	0.079	121.539
2	0.081	124.615
3	0.084	129.231
4	0.086	132.301
เฉลี่ย $\pm$ SD	0.084 ± 0.005	126.923

และทำการคำนวณหาค่า Detection limit โดยใช้ค่า Standard Deviation ของ Blank ของตัวอย่างเนื้อเยื่อ DORM-2 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ 8 ครั้ง คูณด้วย 3 ได้ค่าเท่ากับ 0.038 ไมโครกรัม ต่อกรัม

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสังกะสีในสารมาตรฐาน DORM-2 (dog fish muscle) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นที่รับรองแล้วว่า 25.6 ± 2.3 ug/g น้ำหนักแห้ง โดยทำการวิเคราะห์ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสังกะสีในสารมาตรฐาน DORM-2

DORM-2 (จำนวนซ้ำ)	ความเข้มข้นของสังกะสี (ug/g)	% Recovery
1	25.030	97.773
2	24.482	95.633
3	25.802	100.789
4	24.292	94.891
เฉลี่ย $\pm$ SD	24.901 ± 0.677	97.271

และทำการคำนวณหาค่า Detection limit โดยใช้ค่า Standard Deviation ของ Blank ของตัวอย่างเนื้อเยื่อ DORM-2 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ 8 ครั้ง คูณด้วย 3 ได้ค่าเท่ากับ 0.397 ไมโครกรัม ต่อกรัม

ตารางที่ 6 ค่า Detection limit ของตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ใช้ในการวิเคราะห์

Hg (นาโนกรัม/กรัม)	Cd (ไมโครกรัม/กรัม)	Pb (ไมโครกรัม/กรัม)	Zn (ไมโครกรัม/กรัม)
1.092	0.007	0.071	0.519

ตารางที่ 7 แสดงรายละเอียดทะเบียนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (ข้อมูลจากสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง จังหวัดภูเก็ต)

รหัส	DU 078 (F)	DU 088 (M)	DU 098 (M)	DU 057 (F)	DU 103 (F)	DU 060 (M)	DU 075 (M)	DU 084 (M)	DU 058
วันที่พบ	19/5/41	30/8/41	15/10/41	2/1/40	28/1/42	18/3/40	1/3/41	2/8/41	6/1/40
สถานที่	หาดละแม	เกาะสมุย	เกาะมันนอก	หาดเจ้าไหม	เกาะตะลิ่ง	หาดสำราญ	เกาะยา	ทำเรือภูเก็ต	หาดเจ้าไหม
พบ	จ.ชุมพร	จ.สุราษฎร์	จ.ระยอง	จ.ตรัง	จ.ตรัง	จ.ตรัง	จ.ตรัง	จ.ภูเก็ต	จ.ตรัง
ความยาว	231 ซม.	235 ซม.	214 ซม.	256 ซม.	167 ซม.	192 ซม.	240 ซม.	219 ซม.	250 ซม.
น้ำหนัก	151 กก.	228 กก.	180 กก.	281 กก.	95 กก.	84 กก.	-	184 กก.	245 กก.
เพศ	เมีย	ผู้	ผู้	เมีย	เมีย	ผู้	ผู้	ผู้	ผู้

ตารางที่ 8 แสดงรายละเอียดโลมาและวาฬที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (ข้อมูลจาก สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง จังหวัดภูเก็ต)

รหัส	วันเดือนปีพบ	ชื่อสามัญ	Species	เพศ	ความยาว (ม.)	น้ำหนัก (กก.)	สถานที่พบ
END 080	18/11/2540	โลมาปากขวด	<i>Tursiops aduncus</i>	ผู้	0.92	5.9	อ.ตากใบ จ.ปัตตานี
END 084	13/01/2541	โลมาหัวบาตรหลังเรียบ	<i>Neophocaena phocaenoides</i> (Cuvier, 1829)	ผู้	1.065	ไม่ทราบ	จ.นครศรีธรรมราช
END 085	14/03/2545	โลมาลายจุด	<i>Stenella attenuata</i> (Gray, 1846)	เมีย	1.95	54.5	อ.เกาะยาว จ.พังงา
END 106	18/06/2541	โลมาลายแถบ	<i>Stenella coeruleoalba</i> (Meyen, 1833)	ผู้	2.28	80.7	อ.กลาง จ.ภูเก็ต
END 119	16/09/2541	โลมาลายจุด	<i>Stenella attenuata</i> (Gray, 1846)	เมีย	2.00	44	อ.กระบุรี จ.ภูเก็ต
END 128	25/01/2542	โลมากระโศก	<i>Stenella longirostris</i> (Gray, 1846)	ผู้	1.8	42	อ.กันตัง จ.ตรัง
END 129	25/01/2542	โลมากระโศก	<i>Stenella longirostris</i> (Gray, 1846)	ผู้	1.77	45	อ.กันตัง จ.ตรัง
END 130	25/01/2542	โลมากระโศก	<i>Stenella longirostris</i> (Gray, 1846)	ผู้	1.9	48	อ.กันตัง จ.ตรัง
END 137	9/02/2542	โลมาลายจุด	<i>Stenella attenuata</i> (Gray, 1846)	ผู้	1.9	81	อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา
END 138	9/02/2542	โลมาลายจุด	<i>Stenella attenuata</i> (Gray, 1846)	ผู้	2.2	57.	อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา
END 139	9/02/2542	โลมาลายจุด	<i>Stenella attenuata</i> (Gray, 1846)	ผู้	2.03	69	อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา
END 083	24/12/2540	วาฬเพชฌฆาตดำ	<i>Pseudorca crassidens</i> (Owen, 1846)	เมีย	3.53	250	อ.เมือง จ.กระบี่
END 107	22/06/2541	วาฬหัวทุย	<i>Physter catodon</i> Linnaeus, 1758	เมีย	8.15	5400	อ.เมือง จ.ภูเก็ต
END 113	26/08/2541	วาฬเพชฌฆาตดำ	<i>Pseudorca crassidens</i> (Owen, 1846)	เมีย	3.39	369.5	อ.กลาง จ.ภูเก็ต
END 156	1/12/252542	วาฬบรูด้า	<i>Balaenoptera edeni</i> (Anderson, 1878)	เมีย	4.3	395.71	อ.เมือง จ.พังงา
END 158	5/2/2543	วาฬหัวทุยเล็ก	<i>Kogia breviceps</i> (de Blainville, 1838)	เมีย	2.6	-	อ.สวี จ.ชุมพร
END 187	2/6/2544	วาฬน้ำร่องครีบสั้น	<i>Globicephala macrohynchus</i> (Gray, 1846)	เมีย	3.38	268	จ.นครศรีธรรมราช
END 206	28/6/2545	วาฬบรูด้า	<i>Balaenoptera edeni</i> (Anderson, 1878)	ผู้	3.73	-	จ.สุราษฎร์ธานี