

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือเพื่อการวิเคราะห์

1. บั๊มน้ำ
2. ถูกลากแพลงก์ตอนขนาด 20 ไมครอน
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter ; WTW pH 320)
4. เครื่องวัดออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen meter ; YSI 9015)
5. เครื่องเก็บตัวอย่างตะกอนดิน (pertersen grab)
6. เครื่องวัดความเค็ม (refractometer)
7. เครื่องชั่ง (analytical balance) ชนิดจานเดียว
8. เครื่องปั่น (blender)
9. ตู้อบความร้อน (hot air sterilizing oven)
10. เตาเผา (muffle furnace Size 3 ; Gallenkamp)
11. เครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (freeze-dryer ; FTS Systems)
12. ชูตบดตัวอย่างอัตราโนมิติ (agate mortar)
13. กรวยแยก (seperator)
14. ชุดสกัด (soxhlet system HT 1043 Extraction Unit ; Tecator)
15. ชุดระเหย (rotary evaporator ; RE-11)
16. คอลัมน์สำหรับทำให้สารบริสุทธิ์
17. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ชนิด ECD รุ่น HP 5890 Series II

สารเคมีเพื่อการวิเคราะห์

1. ตัวทำละลายเฮกเซน (n-hexane, pesticide grade)
2. ตัวทำละลายอะซิโตน (acetone, AR grade)
3. น้ำกลั่นที่ผ่านการล้างด้วยเฮกเซน
4. โซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate, anhydrous, AR grade)

5. อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile, AR grade)
6. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, AR grade)
7. ฟลอริซิล (florisil, 60 - 100 mesh)
8. สารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 17 ชนิด
9. ทองแดง (copper)

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหอยนางรม ตะกอนดิน และแพลงก์ตอน จากพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรม บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ทุกเดือนเป็นเวลา 8 เดือน ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2543

1. เก็บตัวอย่างหอยนางรมจากแพเลี้ยงหอยนางรม 3 จุด แต่ละจุดห่างกันประมาณ 50 เมตร (ภาพที่ 1)

2. เก็บตัวอย่างตะกอนดินจากจุดที่เก็บตัวอย่างหอยนางรมด้วยแกรบ (grab) แล้วห่อตัวอย่างด้วยกระดาษฟอลียที่ล้างด้วยเฮกเซน

3. เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนที่ระดับความลึก 1 เมตร จากผิวน้ำทะเล บริเวณที่เก็บตัวอย่างหอยนางรม โดยสูบน้ำทะเล 200 ลิตร กรองผ่านถุงลากลแพลงก์ตอนขนาด 20 ไมครอน

ทำการวัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ (thermometer) วัดพีเอชด้วยพีเอชมิเตอร์ (pH meter) วัดความโปร่งแสงด้วยแซคชี ดิส (sacchi dish) และวัดความเค็มของน้ำทะเลด้วยเครื่องวัดความเค็ม (refractometer) วัดออกซิเจนละลายน้ำด้วยดีโอมิเตอร์ (DO meter) ณ จุดที่ทำการเก็บตัวอย่างหอยนางรมจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างหอยนางรม

นำตัวอย่างหอยนางรมที่เก็บมาจากแต่ละจุดมาทำการแยกขนาด โดยแบ่งขนาดออกเป็น 5 ขนาด ได้แก่

ขนาดที่ 1 หอยนางรมที่มีความยาวของเปลือกระหว่าง 2 ถึง 3 เซนติเมตร

ขนาดที่ 2 หอยนางรมที่มีความยาวของเปลือกระหว่าง 3 ถึง 4 เซนติเมตร

ขนาดที่ 3 หอยนางรมที่มีความยาวของเปลือกระหว่าง 4 ถึง 5 เซนติเมตร

ขนาดที่ 4 หอยนางรมที่มีความยาวของเปลือกระหว่าง 5 ถึง 6 เซนติเมตร

ขนาดที่ 5 หอยนางรมที่มีความยาวของเปลือกระหว่าง 6 ถึง 7 เซนติเมตร

ทำการแยกเพศหอยแต่ละจุด และแต่ละขนาดโดยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และชั่งน้ำหนักเนื้อหอยแต่ละตัว นำเนื้อหอยในแต่ละจุด แต่ละขนาด และแต่ละเพศจำนวน 30 ตัว มาปั่นรวมกันให้ละเอียด แล้วทำให้แห้งโดยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น

ตัวอย่างตะกอนดิน

ทำตะกอนดินให้แห้งด้วยความเย็น แล้วร่อนแยกกรวดและเปลือกหอยออก นำตะกอนดินมาบดให้ละเอียดด้วยชุดบดตัวอย่างอัตโนมัติ

ตัวอย่างแพลงก์ตอน

กรองแพลงก์ตอนด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ผ่านการล้างด้วยเฮกเซน แล้วทำให้แห้งด้วยความเย็น

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำในหอยนางรม และตะกอนดิน

ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ครุฑเปิดที่ได้อบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ปลอຍให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักที่คงที่ นำผลที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของปริมาณน้ำ

การวิเคราะห์สารอินทรีย์ในหอยนางรม และตะกอนดิน

นำตัวอย่างหอยนางรม และตะกอนดินที่ได้จากการอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส มาเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ปลอຍให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักที่คงที่ นำผลที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของสารอินทรีย์

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันของหอยนางรม

ชั่งตัวอย่างเนื้อหอยนางรมที่ผ่านการทำแห้งด้วยความเย็น (freeze dry) ประมาณ 3 กรัม ใส่ในเครื่องสกัดไขมัน สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องสกัดเป็นเวลา 20 นาที หลังจากทำการระเหยตัวทำละลายแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปลอຍให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักที่คงที่ นำผลที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของปริมาณไขมัน

161233

๑

๐๕๔.๙๐๘

๐๘๖๕

๓๐

การวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีน

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งด้วยความเย็น ประมาณ 2 กรัม ใส่ในเครื่องสกัด แล้วเติม สารละลายมาตรฐาน 2,4,5,6- tetrachloro-m-xylene (surrogate standard) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงไป สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนต่อเฮกเซน อัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร (มนทิพย์ ศรีรัตน ทานูกานอน, 2535) ทำการแยกส่วนของสารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนออกจากส่วนอื่น (partition) ด้วยอะซิโตนไไตรล์ที่อิ่มตัวด้วยเฮกเซน และเฮกเซน ตามวิธีของ AOAC (1975) และทำสารที่ได้ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (clean up) ด้วยฟลอร์ซิล ตามวิธีของ Sissions, Telling, and Vsher (1968) ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นตะกอนดิน ต้องทำการกำจัดซัลไฟด์โดยใช้ทองแดง (copper) จุ่มลงในตัวอย่างจนทองแดงที่ใช้ไม่เกิดสีดำ จากนั้นนำสารที่ได้ไประเหยแล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนให้เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปหาชนิด และปริมาณสารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณสารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป HP chemstations ซึ่งคำนวณพื้นที่ใต้พีค (peak) ของสารตัวอย่างที่แยกได้กับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานชนิดเดียวกันที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

การหาปริมาณต่ำสุดของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (instrument detection limit : IDL)

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของจำนง หัยกิจโกศล (2544) โดยเตรียมสารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 0.05, 0.025 และ 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 8 ข้ว ฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟด้วยปริมาณ 1 ไมโครลิตร นำค่าความเข้มข้นที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และนำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟ จะได้ค่าจุดตัดบนแกน Y และกำหนดให้ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟสามารถวัดได้มีค่าเป็น 3 เท่าของค่าจุดตัดบนแกน Y ดังตารางที่ 2

การหาร้อยละการได้กลับคืน (recovery) ของสารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนในตัวอย่างหอยนางรม และตะกอนดิน

แบ่งตัวอย่างที่ได้ทำแห้งแล้วเป็นสองกลุ่ม เติมสารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนคลอรีนลงในตัวอย่างกลุ่มที่สอง จากนั้นนำตัวอย่างทั้งสองกลุ่มไปทำการวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีน โดยทำการวิเคราะห์ 6 ข้ว สำหรับตัวอย่างหอยนางรม และ 2 ข้ว สำหรับตัวอย่างตะกอนดิน จากนั้นคำนวณหาร้อยละการได้กลับคืนจากสูตร

ร้อยละการได้กลับคืน = {(B-A)/C*100}

โดย A คือความเข้มข้นของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน

B คือความเข้มข้นของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่เติมสารมาตรฐาน

C คือความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม

ตารางที่ 2 ปริมาณต่ำสุดของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

ชนิดสาร	ปริมาณต่ำสุดของเครื่อง (นาโนกรัมต่อกรัม)
แอลฟา-บีเอชซี	0.24
เบต้า-บีเอชซี	2.10
แกมมา-บีเอชซี	1.80
เดลต้า-บีเอชซี	2.70
พารา, พารา-ดีดีดี	2.70
พารา, พารา-ดีดีอี	2.40
พารา, พารา-ดีดีที	2.10
อัลดริน	2.10
ดีลดริน	3.00
เอนดริน	3.60
เอนดริน อัลดีไฮด์	1.20
เอนโดซัลแฟน-1	2.60
เอนโดซัลแฟน-2	2.70
เอนโดซัลแฟน ซัลเฟต	3.30
เฮปตาคลอร์	2.10
เฮปตาคลอร์-อีพอกไซด์	0.90
เมทอกซิคลอร์	3.00

ตารางที่ 3 ร้อยละการได้กลับคืนของสารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีน

ในตัวอย่างหอยนางรม ($n=6$) และตะกอนดิน ($n=2$)

ชนิดสาร	ร้อยละการได้กลับคืน $\pm$ S.D.	
	หอยนางรม	ดินตะกอน
แอลฟา-บีเอซี	93.14 $\pm$ 12.55	105.35 $\pm$ 8.44
เบตา-บีเอซี	107.32 $\pm$ 9.38	114.33 $\pm$ 12.56
แกมมา-บีเอซี	112.28 $\pm$ 10.66	94.64 $\pm$ 9.64
เดลตา-บีเอซี	124.64 $\pm$ 12.32	117.25 $\pm$ 18.56
พารา, พารา-ดีดีดี	98.66 $\pm$ 5.87	78.38 $\pm$ 14.87
พารา, พารา-ดีดีอี	115.51 $\pm$ 14.39	85.45 $\pm$ 4.26
พารา, พารา-ดีดีที	105.35 $\pm$ 17.24	91.35 $\pm$ 12.45
อัลดริน	92.64 $\pm$ 12.63	75.43 $\pm$ 18.51
ดีลดริน	126.45 $\pm$ 13.21	89.24 $\pm$ 21.54
เอนดริน	117.23 $\pm$ 7.35	102.85 $\pm$ 14.22
เอนดริน อัลดีไฮด์	108.00 $\pm$ 10.36	82.36 $\pm$ 15.31
เอนโดซัลแฟน-1	95.32 $\pm$ 20.17	71.77 $\pm$ 9.36
เอนโดซัลแฟน-2	101.24 $\pm$ 8.34	104.26 $\pm$ 8.72
เอนโดซัลแฟน ซัลเฟต	112.33 $\pm$ 21.56	81.86 $\pm$ 18.66
เฮปตาคลอร์	93.35 $\pm$ 12.44	77.42 $\pm$ 17.23
เฮปตาคลอร์-อีพอกไซด์	106.71 $\pm$ 8.32	101.26 $\pm$ 11.39
เมทอกซิลคลอร์	115.32 $\pm$ 4.65	112.56 $\pm$ 13.68

หมายเหตุ : S.D. หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนจาก 3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ อายุ (8 เดือน) เพศ (2 เพศ) ซึ่งกำหนดให้เป็นปัจจัยหลัก และขนาด (3 ขนาด) เป็นปัจจัยสุ่ม ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่สะสมในหอยนางรมแบบ univariate โดยโปรแกรม SPSS/PC⁺ (statistic package for the social sciences) 10.0 for windows วิเคราะห์ปริมาณสารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่สะสมในตะกอนดิน และแพลงก์ตอนโดย

one-way ANOVA วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนกับปริมาณไขมัน เพศ ขนาด และอายุของหอยนางรม โดยใช้การหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient)

ขั้นตอนการวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีน

ตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้ง ประมาณ 5 ก.



สกัดด้วยอะซิโตนต่อเฮกเซน 1:1 ปริมาตร 150 มล. 50 °C 10 ชม.



เติมลงในอะซิโตนไตรีลที่อิ่มตัวด้วยเฮกเซน 30 มล.

เขย่าเป็นเวลา 1 นาที ตั้งไว้ให้แยกชั้น



ไขชั้นอะซิโตนไตรีลลงในกรวยแยกขนาด 1 ล.

ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ปริมาตร 500 มล.



ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง



เติมเฮกเซน 100 มล. แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ตั้งไว้ให้แยกชั้น



ไขชั้นเฮกเซนลงในกรวยแยกขนาด 1 ล. ที่มีน้ำกลั่น 500 มล. ทำซ้ำอีกครั้ง

โดยใช้เฮกเซน 50 มล. จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ตั้งไว้ให้แยกชั้น



ไขชั้นน้ำทิ้ง นำเฮกเซนที่เหลือมารองผ่านโซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ



ผ่านคอลัมน์ขนาด 1 X 30 ซม. ที่บรรจุฟลูอริซิล 10 ก.

และโซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ ชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน 30 มล.



ชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน 100 มล. และอะซิโตนร้อยละ 2 ในเฮกเซน อีก 100 มล.



จุ่มทองแดงลงในตัวอย่างจนทองแดงที่ใช้ไม่เกิดสีดำ (เฉพาะตัวอย่างตะกอนดิน)



นำสารที่ได้ไประเหย แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนเป็น 10 มล.



ฉีดสารที่ได้เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี