

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง

1. ถุงพลาสติก
2. ถังสำหรับแช่ตัวอย่าง
3. เทอร์โมมิเตอร์
4. เครื่องวัดความเค็ม (refractometer)
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

อุปกรณ์ที่ใช้เตรียมตัวอย่าง

1. เครื่องชั่งชนิดละเอียด
2. มีด
3. เวียร์เนีย คาลิปเปอร์
4. aluminium foil
5. ตู้แช่แข็ง
6. เครื่อง freeze dry

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์สารอินทรีย์

1. เครื่องบด (motar)
2. โถดูดความชื้น (desiccator)
3. บีกเกอร์ (beaker)
4. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
5. ขวดก้นกลม (volumetric flask)
6. ปิเปต (volumetric pipettes)
7. ปิเปต (pasteur pipettes)
8. บิวเรต (buret)
9. แท่งแก้ว

10. ช้อนตักสาร
11. กรวยแยก (separatory funnel)
12. ขวด vial
13. ทิมเบิล (thimble)
14. หลอดหยด (dropper)
15. กระบอกตวง (cylinder)
16. เข็มฉีดยา (microliter syringes)
17. ชุดระเหย (rotary evaporator)
18. ชุด soxhlet
19. ตู้อบความร้อน (oven)
20. water bath
21. hot plate
22. เครื่อง junior orbital shaker
23. เครื่อง nitrogen gas evaporation unit
24. เครื่องตรวจวัด แก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatograph)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เฮกเซน (hexane)
2. อะซิโตน (acetone)
3. ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)
4. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)
5. Florisil
6. ใยแก้ว (pyrex glass wool)
7. ซิลิกาเจล (silica gel)
8. อลูมินา (alumina)
9. สารละลายมาตรฐานของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน
10. สารละลายมาตรฐานของสารกลุ่มพีซีบี

วิธีดำเนินการ

การกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่าง

กำหนดจุดเก็บตัวอย่างบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย และทะเลอันดามัน ทั้งหมด 9 สถานี (ดังภาพที่ 9) โดยพิจารณาจากพื้นที่บริเวณชายฝั่งที่มีแหล่งเพาะเลี้ยงหอยทั้ง 2 ชนิดดังนี้

1. บริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย โดยทำการเก็บตัวอย่าง 2 สถานี

- 1.1 สถานีที่ 1 : บริเวณ ต. เกรียนหัก อ. ชลบุรี จ. ชลบุรี
- 1.2 สถานีที่ 2 : บริเวณ ต. อ่างศิลา อ. เมือง จ. ชลบุรี

2. บริเวณชายฝั่งตอนกลางของอ่าวไทย โดยทำการเก็บตัวอย่าง 2 สถานี

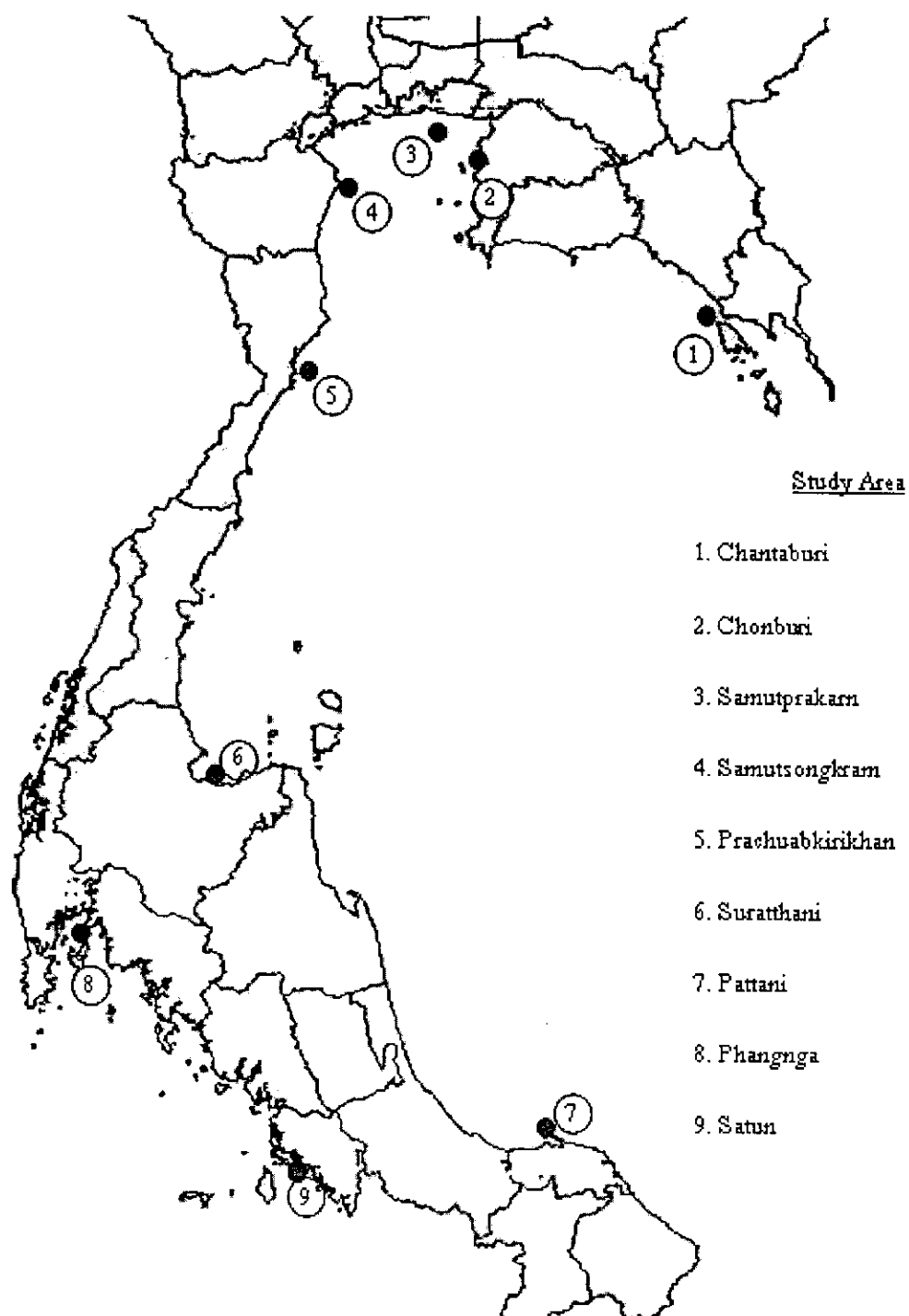
- 2.1 สถานีที่ 3 : บริเวณ ต. คลองด่าน อ. บางบ่อ จ. สมุทรปราการ
- 2.2 สถานีที่ 4 : บริเวณคอนหอยหลอด อ. เมือง จ. สมุทรสงคราม

3. บริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทย โดยทำการเก็บตัวอย่าง 3 สถานี

- 3.1 สถานีที่ 5 : บริเวณอ่าวมะนาว อ. เมือง จ. ประจวบคีรีขันธ์
- 3.2 สถานีที่ 6 : บริเวณหมู่บ้านปากน้ำกระแจะ อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี
- 3.3 สถานีที่ 7 : บริเวณ ต. ตูลา อ. หนองจิก จ. ปัตตานี

4. บริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน โดยทำการเก็บตัวอย่าง 2 สถานี

- 4.1 สถานีที่ 8 : บริเวณ ต. มะรุ่ย อ. ทับปุด จ. พังงา
- 4.2 สถานีที่ 9 : บริเวณ ต. หุ่นหล้า อ. หุ่นหว้า จ. สตูล



ภาพที่ 4 แสดงสถานีเก็บตัวอย่างบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

ขั้นตอนการวิเคราะห์ (แสดงดังภาพที่ 6)

1. การสกัด (soxhlet extraction)

การสกัดสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่อยู่ในตัวอย่าง โดยนำเนื้อหอยตัวอย่างที่คลุกกับโซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำใส่ในทิมเบิล (thimble) สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่ออะซิโตน (ปริมาตร 100 ml. : 50 ml.) ใส่ในขวดก้นกลม นำไปตั้งบนเตาให้ความร้อนปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 40 – 60°C ตัวทำละลายจะระเหยและควบแน่นในคอนเดนเซอร์แล้วจะผ่านตัวอย่างลงสู่ขวดก้นกลม เป็นการสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction) ใช้เวลาในการสกัดนานประมาณ 7 ชม.แล้วทำการระเหยสารที่สกัดให้มีปริมาตรเหลือ 6 ml. โดยใช้ hot plate

2. การหาปริมาณไขมัน (% lipid)

แบ่งสารตัวอย่างที่สกัดแล้วมาจำนวน 2 ml. แล้วนำไปเข้าตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชม. แล้วนำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักสารตัวอย่างจนกว่าน้ำหนักคงที่ได้เป็นปริมาณไขมัน

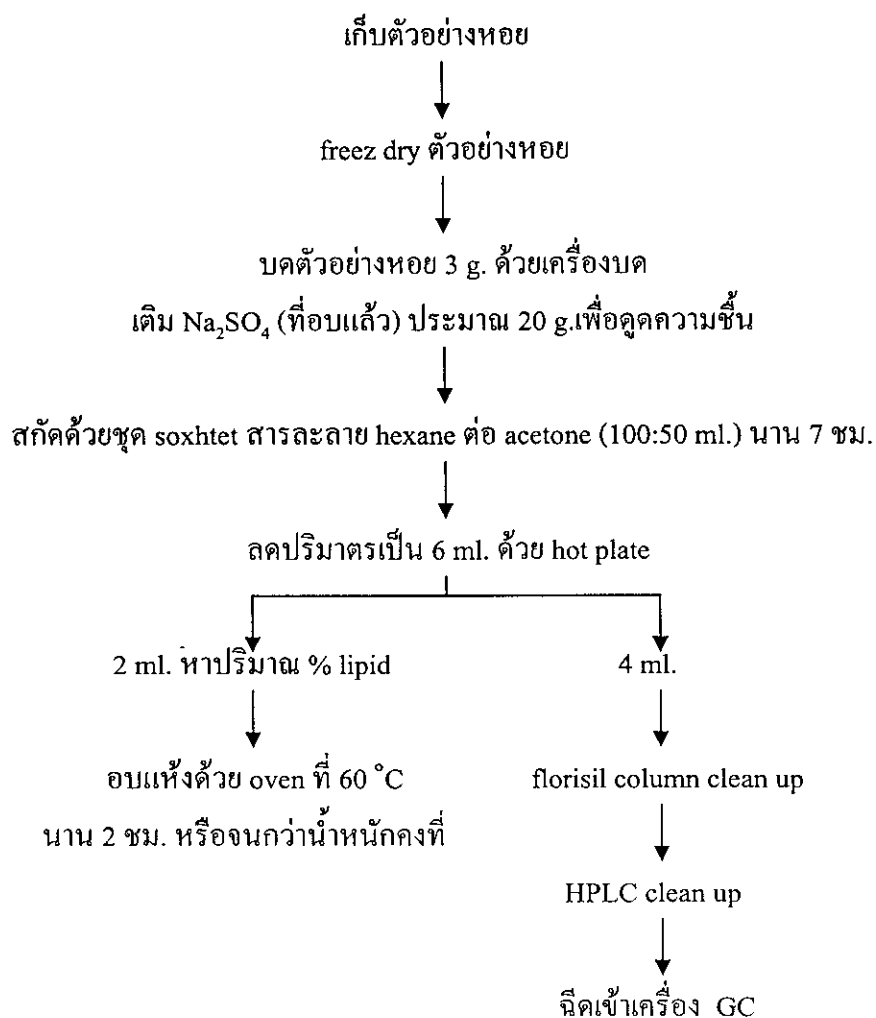
3. การกำจัดสารรบกวนโดย florisil (florisil column clean up)

การแยกสารรบกวนออกโดยใช้ florisil ที่อบทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้อบอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนัก florisil จำนวน 10.00 กรัม จากนั้นนำไปบรรจุในคอลัมน์ขนาด 1 x 30 ซม. โดยใส่ใยแก้วแล้วบรรจุโซเดียมซัลเฟตประมาณ 1 ซม. ก่อน หลังจากบรรจุ florisil ลงในคอลัมน์แล้วเทสารตัวอย่างที่มีปริมาตร 4 ml. ลงในคอลัมน์ ชะด้วยสารละลายเฮกเซนต่อไดคลอโรมีเทน (ปริมาตร 120 ml. : 30 ml.) จากนั้นชะคอลัมน์อีกครั้งด้วยเฮกเซนปริมาตร 70 มล. จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ผ่านออกจากคอลัมน์ไปลดปริมาตรโดย ปรับปริมาตรให้เป็น 4 ml. ใส่ในขวด vial

4. การกำจัดสารรบกวนโดย HPLC clean up

ทำการระเหยสิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดข้างต้นโดยใช้ชุดระเหย (rotary evaporator) จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บสิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดไปทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนต่อไป

การกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากสิ่งสกัด (clean up) การแยกสารรบกวนออกจากสิ่งสกัด โดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel) และอลูมินา (aluminal) จากนั้นนำสิ่งสกัดที่ผ่านออกจากคอลัมน์ไปลดปริมาตร แล้วนำไป clean up ต่อโดยใช้เครื่อง HPLC โดยองค์ประกอบของเครื่อง HPLC แสดงดังภาพที่ 7

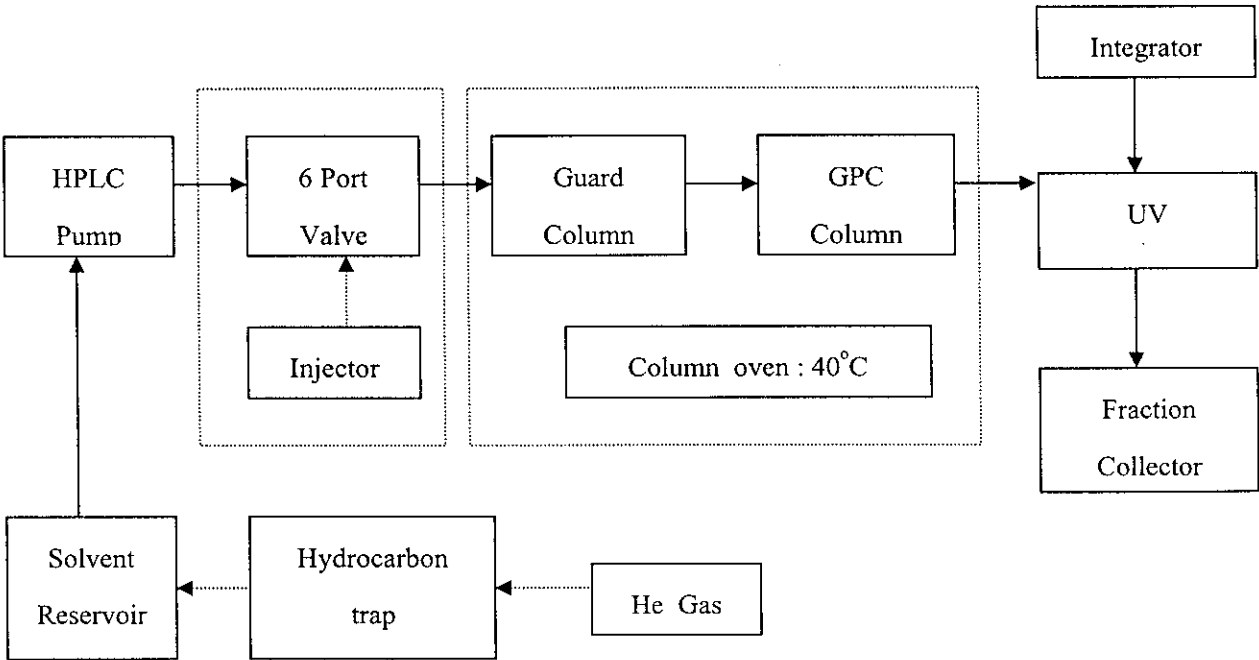


ภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและ การวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและพีซีบี
ในหอย

ในสารสกัดตัวอย่างทุกตัวจะเติม surrogate standard ดังตารางที่ 7 และ 8

ตารางที่ 7 สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและพีซีบี

	OCs	PCB
Surrogate-standard amount spiked		
4,4'-Dibromooctafluorobipheny (DBOFB)	5 ng.	5 ng.
PCB 103	5 ng.	5 ng.
PCB 169	5 ng.	5 ng.
GC internal standard solution spiked		
Trichloro-m-xylene (TCMX)	5 ng.	5 ng.



ภาพที่ 7 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC (Yim, 1998)

ตารางที่ 8 สภาวะของเครื่อง GC/ECD ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและ
พีซีบี

Instrument: Hewlett-Packard 5890 serial II Gas chromatograph with a ^{63}Ni electron capture
detector (ECD)

Feature: Split/splitless capillary inlet system

Instrument setting

Injection volume	2 μl (automatic liquid sampler)
Injection technique	Splitless
Splitter closing time	0.5 min
Carrier gas	Argon/methane (95/5) : 40 ml/min

Temperature program

Injection port temp.	275 $^{\circ}\text{C}$
Detector temp.	300 $^{\circ}\text{C}$
Oven temp.	100 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min., then 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ to 140 $^{\circ}\text{C}$, hold 1 min.; 1.5 $^{\circ}\text{C} / \text{min.}$, hold 1 min., 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 300 $^{\circ}\text{C}$, hold 5 min.

Calibration: Three - point calibration

6. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในตัวอย่างหอยนางรม และหอยแมลงภู่ (Oh, 2000)

6.1 บีบสิ่งสกปรกที่ได้จากการสกัดก่อนที่จะนำไปลดปริมาณมา 10 ml.

6.2 ใส่ใน aluminum foil cup ที่บันทึกน้ำหนักแล้ว (W_1)

6.3 นำไปอบที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

6.4 ทิ้งไว้ให้เย็นใน dessicator แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (W_2)

6.5 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ปริมาณไขมัน

$$\% \text{ Lipid} = \frac{(W_2 - W_1) * FV}{10SW}$$

W_1 = น้ำหนัก aluminum foil cup (กรัม)

W_2 = น้ำหนักรวม (กรัม) หลังจากอบแล้ว
(น้ำหนัก aluminum foil cup + น้ำหนักไขมัน)

FV = ปริมาตรของ solvent หลังจากสกัดแล้ว (ml.)

SW = น้ำหนักตัวอย่างที่นำมาสกัด (กรัม)

7. การหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และพีซีบีในตัวอย่างหอยนางรม และหอยแมลงภู่ (Oh, 2000)

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ recovery ในตัวอย่างหอยนางรมและหอยแมลงภู่ ทำโดยเติมสารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและพีซีบี ลงไปในตัวอย่างหอยนางรมและหอยแมลงภู่ จากนั้นวิเคราะห์หาสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและพีซีบี ในตัวอย่างหอยนางรม และหอยแมลงภู่ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recovery โดยคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ recovery} = \{(B-A)/C * 100\}$$

เมื่อ

A คือ ความเข้มข้นของสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและพีซีบีในตัวอย่างหอยนางรม และหอยแมลงภู่ ที่ไม่เติมสารมาตรฐาน

B คือ ความเข้มข้นของสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และพีซีบี ในตัวอย่างหอยนางรม และหอยแมลงภู่ ที่เติมสารมาตรฐาน

C คือ ความเข้มข้นสารมาตรฐานที่เติม

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ recovery ของสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและพีซีบีในตัวอย่างหอยนางรมและหอยแมลงภู่

ชนิดสาร	ค่าเฉลี่ย % recovery $\pm$ SD	
	หอยนางรม	หอยแมลงภู่
PCBs 103	69.51 $\pm$ 11.08	74.36 $\pm$ 15.67
DBOFB	87.96 $\pm$ 10.66	99.86 $\pm$ 17.33
PCB 198	95.43 $\pm$ 19.77	93.04 $\pm$ 14.57

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยปริมาณสารออร์กาโนคลอรีนและพีซีบีในหอยแต่ละชนิดของแต่ละสถานี

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวนจาก 2 ปัจจัย ดังนี้ คือ สถานี 9 สถานี และชนิดหอย 2 ชนิด โดยใช้แบบหุ้แบบ Two fixed factor ANOVA เพื่อทดสอบความแตกต่างของแต่ละปัจจัยด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS/PC+ การนำข้อมูลทั่วไป (เช่น ปริมาณไขมัน) และข้อมูลสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและพีซีบี ของหอยนางรมและหอยแมลงภู่ มาทำการวิเคราะห์ผลบางส่วนของการวิเคราะห์ผลได้ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ช่วยในการวิเคราะห์ เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและพีซีบี กับปริมาณไขมัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์และการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และพีซีบี แต่ละสถานี แล้วทำการเปรียบเทียบปริมาณการสะสมสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และพีซีบีในแต่ละสถานี เป็นการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Post hoc Tests เพื่อทดสอบความแตกต่างของปริมาณการสะสมของสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และพีซีบีในหอยนางรม และหอยแมลงภู่ของแต่ละสถานี โดยพิจารณาค่านัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยดังกล่าวที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์