

บทที่ 3

วิธีการศึกษาวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง

- 1.1 ถุงมือยาง (Latex Gloves)
- 1.2 ถุงซีปพลาสติก (Plastic Zip Lock Bag)
- 1.3 หนังสือแผนที่ทางเข้าจุดสำรวจ (Map)
- 1.4 ขวดแก้ว ขนาด 125 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด (Glass Bottles)
- 1.5 เครื่องมือหาพิกัดด้วยดาวเทียม (GPS:Global Position System)

2. เครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

- 2.1 ดีโอมิเตอร์ (DO Meter)
- 2.2 พีเอชมิเตอร์ (pH Meter)
- 2.3 ฟอเรลสเกล (Forel Scale)
- 2.4 เอสทีซีมิเตอร์ (STC Meter)
- 2.5 แผ่นวัดความโปร่งใส (Secchi Disk)

3. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ทางเคมีสารประกอบชีวฟิลทิน

- 3.1 ปิเปต (Pipette)
- 3.2 เข็มฉีดยา (Syringe)
- 3.3 เครื่องเขย่า (Shaker)
- 3.4 ใยแก้ว (Glass Wool)
- 3.5 ขวดเก็บสารสกัด (Vials)
- 3.6 ขวดจุกแก้ว (Stopper Flasks)
- 3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.8 กรวยแยก (Separatory Funnel)
- 3.9 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flasks)
- 3.10 เครื่องเขย่าอ่างน้ำ (Shaking Water Bath)
- 3.11 เครื่องลดปริมาตรแบบแกนหมุน (Rotary Evaporator)
- 3.12 คอลัมน์และกรวยแยกสำหรับทำความสะอาดสารละลาย (Clean Up Column)

3.13 Gas Chromatography – Flame Photometric Detector (FPD) Perkin Elmer

Autosystem XL

4. อุปกรณ์ในการตรวจ ImPOSEX

4.1 ค้อน (Hammer)

4.2 คาลิเปอร์ (Calliper)

4.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (Digital Balance)

สารเคมี

1. Tropolone (Fluka)
2. Sulfuric Acid (Merck)
3. Methanol (J.T.Baker)
4. Tripropyltin 93% (Merck)
5. Hydrochloric Acid (Merck)
6. Dimethyl Sulfoxide (Riedel)
7. Hexane (Analytical Grade, Fish)
8. Tributyltin Chloride 97% (Fluka)
9. Dibutyltin Chloride 97% (Fluka)
10. Benzene (Analytical Grade, BDH)
11. Sodium Sulfate Anhydrous (Carlo)
12. Acetone (Analytical Grade, Merck)
13. Monobutyltin Chloride 95% (Fluka)
14. Florisil 60-100 Mesh Pr (Mallinckrode)
15. Propylmagnesium Chloride 5 mol/ l in Diether (Fluka)

วิธีทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำประเภทหอย

1.1 เก็บตัวอย่างหอยในแต่ละจุดเก็บ ในบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลง ซึ่งเลือกจากชนิดหอยที่มีในแต่ละพื้นที่ที่มีชุกชุมมากที่สุด โดยให้น้ำหนักเนื้อหอยประมาณ 100 กรัม การเก็บตัวอย่างจะเลือกเก็บตัวอย่างหอยที่อยู่ในวัยเดียวกัน

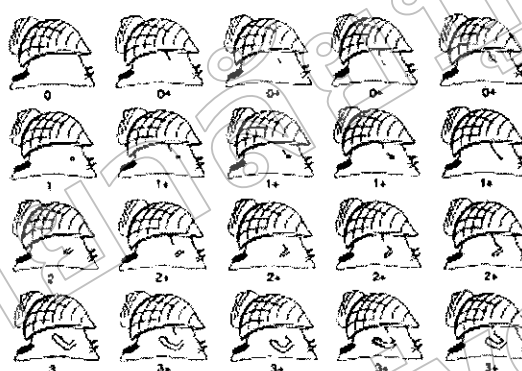
1.2 แกะเนื้อหอยออกจากเปลือกหอยในห้องปฏิบัติการ

1.3 ทำการศึกษาการเกิด Imposex และเก็บเนื้อหอยที่อุณหภูมิประมาณ -40 องศา

เซลเซียส

2. การศึกษาการแบ่ง State of Imposex ในสัตว์น้ำประเภทหอย ตามวิธีของ Berend et al. (2002)

ตรวจระดับการเกิด Imposex โดยดูลักษณะของ Pseudopenis และวัดความยาวของ Pseudopenis โดยใช้ Calliper ในการแบ่งระดับการพัฒนาของ Pseudopenis ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 การพัฒนาลักษณะเพศผู้ของ *Buccinum undatum* (การเกิดท่อนำสเปิร์ม

(Partial Vas Deferens) แสดงโดยใช้สัญลักษณ์ '+')

0: ไม่เกิดลักษณะเพศผู้ (ไม่มี Pseudopenis)

1: พบตั้งเนื้อเล็กๆ บริเวณที่มี Penis ในหอยเพศผู้

2: ตั้งเนื้อที่มีลักษณะใหญ่ขึ้นและโครงสร้างเปลี่ยนแปลง

3: มีการพัฒนาของตั้งเนื้อที่มีโครงสร้างคล้ายกับอวัยวะเพศผู้แต่มีขนาดเล็กกว่าอวัยวะเพศผู้ที่โตเต็มวัย

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไตรบิวทิลทิน ไคบิวทิลทินและโมนิบิวทิลทิน ในสัตว์น้ำประเภทหอยตามวิธีของ Kan-atireklap et al. (1997)

3.1 นำตัวอย่างเนื้อสัตว์ทะเล(หอยฝาเดียว)มาประมาณ 10 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ หรือปิกเกอร์ขนาด 200 มิลลิลิตร

3.2 เติมนสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอมลของ 10 มิลลิลิตร เติมน Internal Standard

3.3 เติมน 20 มิลลิลิตร ของสารละลาย 0.1เปอร์เซ็นต์โทรโฟโลนในอะซิโตน

3.4 สกัดตัวอย่างกับสารละลายด้วยเครื่องปั่นเนื้อเยื่อ นานประมาณ 25 นาที

3.5 แยกสารละลาย 0.1เปอร์เซ็นต์ไทรโพลโนนในอะซิโตน จากตัวอย่างด้วยการ เซนตริฟิวจ์ ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

3.6 รินสารละลายที่ได้ใส่ในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลาย 0.1% ไทรโพลโนนในเบนซีน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 250 มิลลิลิตร ของน้ำกลั่นที่ล้างด้วยเฮกเซนแล้ว

3.7 ตัวอย่างที่เหลืออยู่ในหลอดนำมาเติม 20 มิลลิลิตร ของสารละลาย 0.1% ไทรโพลโนนในอะซิโตน

3.8 ทำตามข้อ 4 และ 5 อีกครั้ง

3.9 แยกชั้นของ 0.1เปอร์เซ็นต์ไทรโพลโนนในอะซิโตน ครั้งที่ 2 มาใส่กรวยแยก เดียวกับครั้งแรก

3.10 ผสมให้เข้ากันดีแล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ประมาณ 45 นาที

3.11 แยกชั้นของ 0.1เปอร์เซ็นต์ไทรโพลโนนในเบนซีน ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.12 เติมสารละลาย 0.1เปอร์เซ็นต์ไทรโพลโนนในเบนซีนใหม่ลงไปอีก 25 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที

3.13 ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นประมาณ 1 ชั่วโมง

3.14 แยกชั้นของสารละลาย 0.1เปอร์เซ็นต์ไทรโพลโนนในเบนซีน มารวมกับ สารละลายครั้งแรก

3.15 เติมผงโซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรส์เพื่อกำจัดน้ำออกจากสารละลาย (โดยใส่ให้ เกินแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที)

3.16 แยกชั้นของสารละลาย มาลดปริมาตรด้วยเครื่องลดปริมาตร โดยแกนหมุน ให้เหลือประมาณ 3-5 มิลลิลิตร

3.17 ย้ายสารละลายไปใส่หลอดที่มีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย ไพรอิมเมกนีเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิลิตร

3.18 เขย่าหลอดในวอร์เตอร์บาท์อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3.19 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วหยดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 1 นอ้มัล ของกรดซัลฟูริก 10 มิลลิลิตร

3.20 ย้ายสารไปใส่ในกรวยแยกขนาด 200 มิลลิลิตร ที่มี 20 มิลลิลิตรของ 10% เบนซีนในเฮกเซน และ 40 มิลลิลิตรของน้ำกลั่นที่ล้างด้วยเฮกเซนแล้ว

3.21 ล้างสารละลายที่ค้างอยู่ในหลอดด้วย เมทานอล 10 มิลลิลิตร

3.22 เขย่านาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แยกชั้นดี

3.23 แยกชั้นของ 10เปอร์เซ็นต์เบนซีนในเฮกเซน ไปลดปริมาตรให้เหลือปริมาตร

3-5 มิลลิลิตร

3.24 นำสารละลายที่ได้ไปผ่านแท่งคอลัมน์ของฟลอริซิล ที่อยู่ในเฮกเซน

3.25 สารละลายที่สะอาดแล้วนำไปลดปริมาตรให้เหลือประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีที่ต่อกับเฟลมโฟโตเมตริกดีเทคเตอร์

4. การวิเคราะห์

4.1 นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีที่ต่อกับเฟลมโฟโตเมตริก ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร คอลัมน์ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร หน้า 0.25 ไมครอน อุณหภูมิ Injector 150 องศาเซลเซียส Detector 270 องศาเซลเซียส และ Oven 100 องศาเซลเซียส 1 นาที 280 องศาเซลเซียส 10 นาที โดยมีอัตราการเพิ่ม 10 องศาเซลเซียส/ นาที อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน อากาศและไนโตรเจนที่ 90, 110 และ 5 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ โดยขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (Detection Limit) คือ 10 นาโนกรัมต่อกรัม

4.2 สารมาตรฐานที่ใช้เป็น Internal Standard คือ สารไตรโพรพิลทิน และสารมาตรฐานที่ใช้คือ ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ (TBT) ไดบิวทิลทินคลอไรด์ (DBT) และโมโนบิวทิลทินคลอไรด์ (MBT) โดยการเปรียบเทียบเวลาที่พิกของสารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์กับเวลาที่พิกของสารมาตรฐานถูกชะออกจากคอลัมน์ซึ่งทราบแล้วว่าแต่ละพิกเป็นสารมาตรฐานชนิดใด ถ้าพิกของสารตัวอย่างใช้เวลาในการชะออกจากคอลัมน์ตรงกับพิกของสารมาตรฐานชนิดใด แสดงว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

4.3 การหาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หรือร้อยละการกลับคืน (%Recovery) โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในตัวอย่าง นำไปสกัดและวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารด้วยวิธีการเดียวกับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทั้งหมด โดยประสิทธิภาพการวิเคราะห์สารประกอบบิวทิลทินมีดังนี้

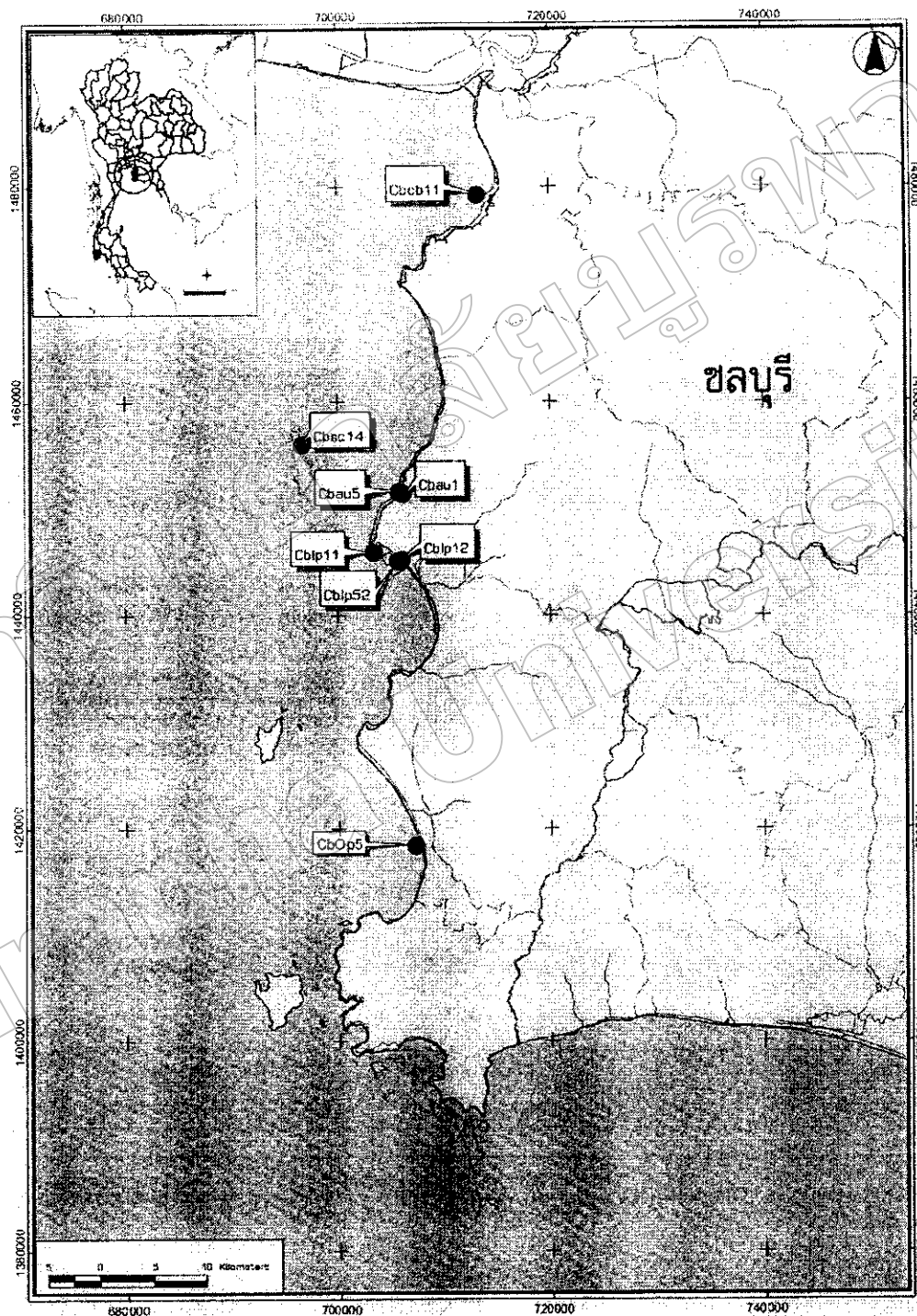
สารไตรบิวทิลทิน	85.71 %
สารไดบิวทิลทิน	87.50 %
สารโมโนบิวทิลทิน	85.71 %

สถานที่ดำเนินการทดลอง

จำนวนสถานีเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 8 สถานี สำหรับรายละเอียดของสถานีเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำ (หอยฝาเดียว) จำแนกตามพื้นที่ที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของจุดสำรวจ แสดงไว้ในตารางที่ 1 และแผนที่ภาพรวมของสถานีเก็บตัวอย่างในภาพที่ 14

ตารางที่ 1 รายละเอียดของสถานีเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวจำแนกตามพื้นที่

สถานี	รหัส สถานี	UTM zone	X	Y	เหตุผลในการคัดเลือก
อ่าวชลบุรี	Cbcb11	47	713329	1479200	เป็นบริเวณที่มีเรือสัญจรไปมา และเป็นแหล่งแพร่กระจายสารปนเปื้อนไปสู่แหล่งอื่น ๆ
เกาะสีชัง (ท่าภาณุรังสี)	Cbsc14	47	696529	1455953	เป็นบริเวณที่มีเรือสัญจรไปมา และเป็นแหล่งแพร่กระจายสารปนเปื้อนไปสู่แหล่งอื่น ๆ
อ่าวอุดม (กลาง)	Cbau5	47	705600	1451550	เป็นบริเวณที่มีเรือสัญจรไปมา และเป็นแหล่งแพร่กระจายสารปนเปื้อนไปสู่แหล่งอื่น ๆ
อ่าวอุดม (สะพานปลา)	Cbau1	47	705950	1451350	เป็นบริเวณที่มีเรือสัญจรไปมา และเป็นแหล่งแพร่กระจายสารปนเปื้อนไปสู่แหล่งอื่น ๆ
หัวแหลมฉะบั้ง	Cblp11	47	703300	1445850	เป็นบริเวณที่มีเรือสัญจรไปมา และเป็นแหล่งแพร่กระจายสารปนเปื้อนไปสู่แหล่งอื่น ๆ
ท่าเรือแหลมฉะบั้ง	Cblp52	47	705850	1445200	เป็นบริเวณที่มีเรือสัญจรไปมา และเป็นแหล่งแพร่กระจายสารปนเปื้อนไปสู่แหล่งอื่น ๆ
ท่าเรือแหลมฉะบั้ง (ตอนกลาง)	Cblp12	47	705500	1445000	เป็นบริเวณที่มีเรือสัญจรไปมา และเป็นแหล่งแพร่กระจายสารปนเปื้อนไปสู่แหล่งอื่น ๆ
ท่าเทียบเรือ บริษัท โอเชียน มารีน่า ยอร์ค คลับ	CbOp5	47	707048	1418439	เป็นบริเวณท่าเทียบเรือยอร์ค และเป็นแหล่งแพร่กระจายสารปนเปื้อนไปสู่แหล่งอื่น ๆ



ภาพที่ 14 แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารประกอบบิวทิลทินในตัวอย่างหอยฝา
เดียวบริเวณจังหวัดชลบุรี