บทที่ 3

วิธีการศึกษาวิจัย

วิธีดำเนินการทดลอง

การเตรียมน้ำสำหรับทำการทดลอง

นำน้ำทะเลที่ได้จากการสั่งซื้อจากนาเกลือในเขตจังหวัดสมุทรสาครทาทิ้งให้ตกตะกอนในถังตกตะกอนเป็นเวลา 15 วัน เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 30 ส่วนในพันส่วนด้วยน้ำประปา ใส่ EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ให้ได้ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อตกตะกอนสารแขวนลอยและโลหะหนักต่างๆ ในน้ำออกเติม Chlorine 40 เปอร์เซนต์ เพื่อทำการฆ่าเชื้อโรคและสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ในน้ำ ให้อากาศตลอดเวลาเป็นเวลา 7 วันเพื่อไล่คลอรีนออก ทดสอบการตกค้างของคลอรีนด้วย Potassium iodide และกำจัดคลอรีนส่วนที่ตกค้างด้วย Sodium thiosulphate และตรวจสอบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ คือความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และปริมาณแอมโมเนียที่ละลายในน้ำก่อนนำน้ำมาใช้ทุกครั้ง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ไข่กุ้งกุลาดำ ได้รับการอนุเคราะห์จากการเพาะเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำ จากฟาร์มดาวทองฟาร์ม ในเขตจังหวัดชลบุรี โดยการทดสอบการเกิดพิษของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์แต่ละครั้งจะใช้ไข่กุ้งจากแม่กุ้งตัวเดียวกัน นำไข่ลูกกุ้งมาทำการเพาะฟักในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยง ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเตรียมการทดลองความเป็นพิษของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ โดยแบ่งระบบการทดสอบดังนี้

-ระยะเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากแม่กุ้งวางไข่เพื่อหาค่าการเกิดพิษต่อการพัฒนาและการรอดของกุ้งระยะไข่

-ระยะเวลา 12 ชั่วโมงหลังจากฟักจากไข่ เพื่อทำการทดสอบในระยะนอเพลียส

-ระยะเวลา 12 ชั่วโมงหลังจากเข้าสู่ระยะโปรโตซูเอี้ยเพื่อทำการทดสอบในระยะโปรโตซูเอี้ย

-ระยะเวลา 12 ชั่วโมงหลังจากเข้าสู่ระยะไมซิส เพื่อทำการทดสอบในระยะไมซิส

-ระยะเวลา 12 ชั่วโมงหลังจากเข้าสู่ระยะโพสลาวา2 เพื่อทดสอบในระยะโพสลาวา2

-ระยะเวลา 12 ชั่วโมงหลังจากเข้าสู่ระยะโพสลาวา6 เพื่อทดสอบในระยะโพสลาวา6

การทดลองทุกระยะจะใช้ลูกกุ้งที่มีความแข็งแรงโดยสังเกตจากการว่ายน้ำของลูกกุ้งและความสมบูรณ์ของลูกกุ้ง

การเตรียมภาชนะสำหรับการทดลอง

เครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้สำหรับการทดลอง จะทำการแช่ในสารละลายกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ ล้างกรดออกและล้างด้วยน้ำกลั่น ทำให้แห้งโดยวิธี Air dry (Michael, 1987)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์

เตรียมสารมาตรฐาน (Stock solution) สารละลายของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ (Fluka Chemical Ltd.) ในเมธิลแอลกอฮอล์ โดยให้มีความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บในขวดสีชาและเก็บในอุณหภูมิห้อง โดยไม่ให้ถูกแสง เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ โดยสารละลายที่เตรียมไว้จะมีความอยู่ตัวมากกว่า 3 เดือน (Matthias et al., 1987)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการทดลอง

นำสารละลายมาตรฐานมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจือจางด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและกำจัดคลอรีนออกแล้วเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้สมการการเตรียมสารละลาย

I16758651

$$M_1V_2 = M_1V_2$$

เมื่อ M_1 คือความเข้มข้นของสารละลายดีบุกอินทรีย์มาตรฐาน

M_2 คือความเข้มข้นของสารละลายดีบุกอินทรีย์ที่ต้องการ

V_1 คือปริมาตรของสารละลายดีบุกอินทรีย์มาตรฐาน

V_2 คือปริมาตรของสารละลายดีบุกอินทรีย์ที่ต้องการ

สารละลายของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ที่ใช้ทดสอบสัตว์ทดลองจะทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่แน่นอน และจะทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่ทุก 3 เดือน

การวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ในน้ำทะเล

1 การเตรียมสารเคมี

- สารละลายมาตรฐานของสารประกอบบีส-ไตรบิลทิลทินออกไซด์

โดยการชั่งสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ (Purity > 96 เปอร์เซนต์) น้ำหนัก 1-2 กรัม ละลายลงในสารละลายเมททิลแอลกอฮอล์ 99 เปอร์เซนต์ให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง ทำการเตรียมใหม่ทุกๆ 3 เดือน

- สารละลายมาตรฐาน ไดออกทิลทินไดคลอไรด์ (Di-n-octyltin dichloride) จากบริษัท Eastgate, White Lund, Merecambe, England ละลายลงในสารละลายเมททิลแอลกอฮอล์ 99 เปอร์เซนต์ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง ทำการเตรียมใหม่ทุกๆ 1 เดือน

- สารละลายโซเดียม บอโรไฮไดร์ ($Na(BH_4)$) จากบริษัทเมอร์คไทยแลนด์ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ (W/V) ในน้ำกลั่น

- สารละลายโทรโปโลน (Tropolone : 2,4,6-cycloheptriene-1-one,2-hydroxy) จากบริษัทเมอร์คไทยแลนด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ ในเมททิลแอลกอฮอล์ 99 เปอร์เซนต์

- SPE Octadecyl(C-18) boned silica, 300 mg sorbent bed ของบริษัท JT beaker

2 ขั้นตอนการวิเคราะห์

- การเตรียม C-18 sorbent bed

ล้างด้วยเมททิลแอลกอฮอล์ (HPLC grade) 3 มิลลิลิตร และตามด้วย โทรโปโลน (0.1 % W/V) 0.5 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยการดูดอากาศผ่านนาน 3 นาที

- การเตรียมน้ำทะเลตัวอย่าง

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ โดยนำตัวอย่างน้ำทะเลใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ใส่สารประกอบไดออกทิลทินไดคลอไรด์ เข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วน ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเพื่อเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) ปรับสภาพให้เป็นกรดโดยการใช้กรดไฮโดรคลอริก (hydrocholic acid) ให้มีความเป็นกรดประมาณ 2-3 ใส่สารละลายโทรโปโลนเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ (W/V) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำน้ำทะเลที่ได้ไหลผ่าน C-18 sorbent bed ที่เตรียมไว้ด้วยอัตราไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที โดยการใช้ปั๊มดูดอากาศ โดยในระหว่างการสกัดพยายามให้โดนแสงน้อยที่สุด หลังจากสกัดได้แล้วทำให้ C-18 แห้งโดยการดึงอากาศผ่านเป็นเวลา 10 นาที ล้าง C-18 ด้วยไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เก็บไดคลอโรมีเทนที่ไหลผ่าน C-18 ในขวด (vial) ขนาด 7 มิลลิลิตร ทำการลดปริมาตรสารโดยการผ่านกาซไนโตรเจนให้เหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่สารละลายโซเดียมโบโรไฮไดร์ ($NaBH_4$) เข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อให้สารเข้าทำปฏิกริยานาน 45 นาที ปิเปตสารที่อยู่ส่วนบนออกและนำสารส่วนล่างมาวิเคราะห์โดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี (สารที่ได้จะมีความคงตัวอยู่ประมาณ 3 วันเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและไม่มีแสง) (Matthias et al., 1987) โดยใช้สภาวะเครื่อง (Conditions) ดังนี้

- เครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี (Fison instruments HRGC MEGA 2 Series)
- คลอลัมน์ (Capillary column OV-1 (MEGA) silica 0.1-0.15 mm) เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร อุณหภูมิคลอลัมน์ : เริ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วเพิ่มในอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- Carrier gas) : ไนโตรเจน (Nitrogen) อัตราการไหลผ่านที่ 1.6 มิลลิลิตรต่อนาที
- Make up gas : ไนโตรเจน (Nitrogen) อัตราการไหลผ่านที่ 24 มิลลิลิตรต่อนาที
- ไฮโดรเจน (Hydrogen) อัตราการไหลผ่านที่ 32 มิลลิลิตรต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- อากาศ (Air) อัตราการไหลผ่านที่ 230 มิลลิลิตรต่อนาที
- Detector : F.I.D. (Flame ionic detector) อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิอินเจคเตอร์ (Injector) : 250 องศาเซลเซียส
- Split ratio 20:1
- ใช้โปรแกรม Chrom card ของบริษัท Fision

5.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์

สร้างโดยวิธีใช้สารละลายไดออกทิลทินไดคลอไรด์เป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (Internal standard) เตรียมสารละลายออกทิลทินไดคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายเมทธิลแอลกอฮอล์ ทำความเข้มข้นของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ในน้ำทะเล สภาวะที่ใช้ทดลองให้ได้ความเข้มข้น 19.5, 39.1, 58.6 และ 0 ไมโครกรัมต่อลิตรในน้ำทะเลปริมาตร 100 มิลลิลิตรตามลำดับ ใส่สารประกอบไดออกทิลทินไดคลอไรด์ที่เตรียมไว้ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทำการสกัดตามวิธีที่ได้กล่าวไว้แล้วและวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์โดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟีจากข้อมูลโดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี สร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์และสารประกอบออกทิลทินไดคลอไรด์

การหาอัตราการสลายตัวของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ในระยะเวลา 4 วัน (96 ชั่วโมง) โดยเตรียมโหลแก้วขนาด 10 ลิตร ทำความเข้มข้นของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ในน้ำทะเลสภาวะที่ใช้ทำการทดลอง ให้ได้ 19.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ตรวจหาปริมาณสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ในน้ำทะเลที่เตรียมไว้ทุกๆ 24 ชั่วโมง (รวมชั่วโมงแรกที่เตรียม) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้วิธีที่กล่าวไว้แล้ว สร้างกราฟอัตราการสลายตัว (Degradation rate) ของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์

การทดสอบความเป็นพิษของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ ต่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

1 การทดสอบพิษของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ต่อระยะไข่ของกุ้งกุลาดำ

นำไข่กุ้งกุลาดำจากโรงเพาะฟักที่ได้จากแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำตัวเดียวกัน ตรวจความสมบูรณ์ของไข่ โดยตรวจสอบอัตราการผสมให้มีมากกว่า 60 เปอร์เซนต์ มาทำการทดสอบความเป็นพิษ และไข่ที่เลือกสำหรับทดสอบความเป็นพิษมีอายุไม่เกิน 6 ชั่วโมง

การทดสอบความเป็นพิษของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ต่อไข่ที่มีอายุ 6 ชั่วโมงหลังจากแม่กุ้งทำการวางไข่ ทำในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยการสุ่มไข่ 100 ฟอง ที่ปริมาตรน้ำ 200 มิลลิลิตร ตรวจสอบการพัฒนาของไข่ทุกๆ 3 ชั่วโมงเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของไข่กุ้งและการฟักของไข่กุ้ง

2. การทดสอบพิษของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์กุ้งกุลาดำวัยอ่อน

การทดสอบพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity test) ของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ต่อตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำ กำหนดการหาระดับความเข้มข้นของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ ที่ทำให้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะต่างๆ ตายร้อยละ 50 ของประชากรกุ้งกุลาดำทั้งหมดในช่วงเวลาที่ได้รับสัมผัสสาร 24 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากวัยอ่อนของกุ้งแต่ละช่วงมีระยะเวลาในการอยู่ในแต่ละช่วงของตัวอ่อนมีเวลาจำกัด โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน

การทดสอบขั้นเริ่มต้น (Preliminary test) เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ที่ทำให้ประชาการกุ้งกุลาดำวัยอ่อนตายร้อยละ 0-100 ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ในการทดลองนี้จะเตรียมความเข้มข้นของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ 6 ระดับความเข้มข้น 1 ชุดควบคุม และ 1 ชุดควบคุมโดยที่ชุดควบคุมนี้จะใช้ตัวทำละลายเมทธิลแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยทำการเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นใหม่จนกว่าจะได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองขั้นละเอียด (Full scale test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ที่ทำให้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนตายร้อยละ 50 ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยนำช่วงความเข้มข้นที่ได้จากช่วงการทดลองขั้นเริ่มต้นมากำหนดให้ละเอียดยิ่งขึ้นโดยเตรียมความเข้มข้นของ สารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ 6 ระดับความเข้มข้น 1 ชุดควบคุม และ 1 ชุดควบคุมที่มีเมทธิลแอลกอฮอล์ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำเพื่อผลการทดลองที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

การทดสอบขั้นละเอียดในกุ้งระยะนอเพลียส โดยการแบ่งความเข้มข้นออกเป็น 6 ระดับความเข้มข้น โดยใช้ความเข้มข้น 0.47, 0.70, 0.93, 1.17, 1.40 และ 1.63 ไมโครกรัมต่อลิตร ทดสอบต่อกุ้งระยะนอเพลียสที่มีอายุ 12 ชั่วโมง

การทดสอบขั้นละเอียดในกุ้งระยะซูเอี้ย โดยการแบ่งความเข้มข้นออกเป็น 6 ระดับความเข้มข้น โดยใช้ความเข้มข้น 1.17, 1.40, 1.63, 1.86, 2.10 และ2.33 ไมโครกรัมต่อลิตร ทดสอบต่อกุ้งระยะซูเอี้ยที่มีอายุ 12 ชั่วโมง

การทดสอบขั้นละเอียดในกุ้งระยะไมซีส โดยการแบ่งความเข้มข้นออกเป็น 6 ระดับความเข้มข้น โดยใช้ความเข้มข้น 1.40, 1.63, 1.86, 2.10, 2.33 และ 2.56 ไมโครกรัมต่อลิตร ทดสอบต่อกุ้งระยะไมซีสที่มีอายุ 12 ชั่วโมง

การทดสอบขั้นละเอียดในกุ้งระยะโพสลาวา2 โดยการแบ่งความเข้มข้นออกเป็น 6 ระดับความเข้มข้น โดยใช้ความเข้มข้น 2.66, 2.90, 3.14, 3.38, 3.62 และ 3.86 ไมโครกรัมต่อลิตร ทดสอบต่อกุ้งระยะโพสลาวา2 ที่มีอายุ 12 ชั่วโมง

การทดสอบขั้นละเอียดในกุ้งระยะโพสลาวา6 โดยการแบ่งความเข้มข้นออกเป็น 6 ระดับความเข้มข้น โดยใช้ความเข้มข้น 2.90, 3.14, 3.38, 3.62, 3.86 และ 4.11 ไมโครกรัมต่อลิตร ทดสอบต่อกุ้งระยะโพสลาวา6 ที่มีอายุ 12 ชั่วโมง

วิธีการทดลองทั้ง 2 ขั้นตอนนี้ใช้วิธีการทดสอบแบบวิธีชีววิทยาในน้ำนิ่งแบบ ไม่เปลี่ยนน้ำตลอด 24 ชั่งโมงที่ทำการทดลองทำการทดลองในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร และในแต่ละบีกเกอร์ใส่กุ้งกุลาดำบีกเกอร์ละ 10 ตัว ในขณะทำการทดลองไม่ให้อาหารกับกุ้ง

กุลาดำ สังเกตอาการและบันทึกจำนวนลูกกุ้งที่ตายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินว่ากุ้งกุลาดำตาย คือ นอนอยู่ก้นภาชนะ ไม่เคลื่อนไหว และเมื่อใช้เข็มเขี่ยที่ตัวกุ้งกุลาดำก็ไม่แสดงอาการตอบสนองใดๆ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS-PC ในการวิเคราะห์โปรบิท ซึ่งจะรายงานค่า LC_{50} ในช่วงเวลาต่างๆ และช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ รวมทั้งสร้างกราฟ แสดงความเป็นพิษของสารประกอบบีส-ไตรบิวทิลทินออกไซด์ต่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อนในแต่ละระยะ

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันนั้น ต้องนำน้ำที่ใช้ทดลองมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ทั้งก่อนและหลังทำการทดลองทุกครั้ง ดังนี้

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำ

- วิเคราะห์ความเป็น กรด-ด่าง ของน้ำโดยใช้ pH meter
- วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำโดยใช้ DO meter
- วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียที่ละลายในน้ำโดยใช้ Ammonia indicator ของบริษัทเมอร์เคมีคอล ไทยแลนด์

การวิเคราะห์หาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของน้ำ

- วัดอุณหภูมิของน้ำโดยใช้ Thermometer
- วัดความเค็มโดยใช้ Salinometer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย