

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงปลาหรือบริเวณแหล่งน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาและหอยขมจากลำน้ำเลยหรือสาขามากจากทั้งหมด 3 ตำแหน่งๆละ 2 ครั้งในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2554 และมิถุนายน พ.ศ. 2555 โดยในแต่ละตำแหน่งจะเก็บตัวอย่าง 3 จุดๆละประมาณ 500 มิลลิลิตร บรรจุในขวดโพลีเอททิลีน แล้วเติมด้วย 10% ของกรดไนตริกปริมาณ 5 มิลลิลิตรเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงรูปของสารหนู ตัวอย่างตะกอนดินเก็บจากผิวดินประมาณ 5 เซนติเมตร บรรจุในขวดโพลีเอททิลีนจากตำแหน่งเดียวกันกับตัวอย่างน้ำ โดยให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม บรรจุตัวอย่างในกล่องน้ำแข็งขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ เมื่อถึงห้องปฏิบัติการตัวอย่างดินจะถูกอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นกรองผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ส่วนตัวอย่างน้ำให้ตัดแยกส่วนที่เป็นของแข็งออก จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองให้ได้ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูต่อไป (Meador et al., 2004) เก็บตัวอย่างตะกอนดินและน้ำที่จะวิเคราะห์รวมทั้งสิ้น 36 ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างปลานิลและหอยชนิดละ 18 ตัวอย่าง จากแหล่งเลี้ยงหรือแหล่งที่พบในบริเวณที่เก็บตัวอย่างน้ำและดินตะกอน เนื่องจากการเก็บตัวอย่างปลาต้องได้รับความร่วมมือจากเกษตรกรการสุ่มตัวอย่างจึงเลือกใช้วิธีแบบเจาะจง (purposive sampling) โดยเลือกปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันอย่างน้อย 5 ตัวต่อครั้งของการเก็บตัวอย่าง บรรจุในกล่องน้ำแข็งและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ ชั่งน้ำหนักและวัดขนาดของปลาแล้วล้างให้สะอาด การเตรียมตัวอย่างปลาใช้เฉพาะส่วนเนื้อปลาสดเท่านั้นโดยใช้เนื้อทั้ง 2 ด้านของปลา นำไปบดรวมกันแล้วเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกว่าจะดำเนินการวิจัยในลำดับต่อไป การเก็บตัวอย่างหอยขมคล้ายกับการเก็บตัวอย่างปลาแต่จะเก็บครั้งละประมาณ 1 กิโลกรัม เมื่อถึงห้องปฏิบัตินำตัวอย่างแช่ในน้ำสะอาดอย่างน้อย 2 ชั่วโมงเพื่อให้หอยมีการคายดินออก ก่อนที่จะล้างอีกรอบและคัดแยก

เอาเฉพาะที่มีขนาดใกล้เคียงกัน แยกเอาเฉพาะส่วนเนื้อแล้วล้างน้ำให้สะอาดจึงนำไปดให้เป็นเนื้อเดียวกันและเก็บรักษาเช่นเดียวกับตัวอย่างปลาเนื้ล จนกว่าจะดำเนินการวิจัยในลำดับต่อไป รวมจำนวนตัวอย่างเนื้อสดของปลาและหอยทั้งหมด 36 ตัวอย่าง

3.2 เครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมี

วิเคราะห์หาปริมาณสารหนูทั้งหมดโดยใช้ atomic absorption spectrometer (AAS) โมเดล 300 PerkinElmer ที่ประกอบด้วย autosampler และ flow injection hydride generation system (FI-HG-AAS) สารเคมีใช้ระดับเกรดคุณภาพสำหรับการวิเคราะห์ และ วัสดุอ้างอิงสำหรับสารหนู (Standard Reference Material, SRM) 2977-mussel tissue; NIST) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมและวิเคราะห์ตัวอย่างล้างทำความสะอาดด้วยดีเทอร์เจนต์และแช่ใน 10% กรดไนตริก (HNO_3) อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างจนหมดฤทธิ์กรดด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากไอออนก่อนนำไปใช้งาน

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

การเตรียมวิธีการปรุงอาหาร วิธีปรุงอาหารในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการต้ม ย่าง และทอด โดยวิธีการต้มนั้นจะนำตัวอย่างอาหาร 20 กรัมไปต้มในหม้อสแตนเลสที่บรรจุน้ำกลั่น 1 ลิตร และอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที วิธีการทอดโดยใช้น้ำมันพืชคุณภาพสูงปริมาณ 25 มิลลิลิตรในกระทะเทฟลอนเป็นเวลา 10 นาที ส่วนการย่างนั้นใช้กระทะเทฟลอนเช่นเดียวกันโดยไม่ต้องเติมน้ำมันและย่างเป็นเวลา 10 นาที (Devesa et al., 2001) นำตัวอย่างอาหารทั้งหมดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารหนูตามวิธีการอ้างอิงต่อไป รวมจำนวนตัวอย่างอาหารที่จะวิเคราะห์หลังการปรุงอาหารแล้วจำนวน 108 ตัวอย่าง (ปลานิลและหอยขมชนิดละ 54 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างชนิดที่ใช้วิธีต้ม ชนิดที่ใช้วิธีย่าง และชนิดที่ใช้วิธีทอด วิธีละ 18 ตัวอย่าง/ชนิดของสัตว์)

การวิเคราะห์ปริมาณสารหนู การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูทั้งหมด นำตัวอย่างเนื้อปลาและหอยจำนวน 2 กรัม เติมด้วย ashing aid suspension (20% w/v MgNO_3 + 2% w/v MgO) ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร และ 50% HNO_3 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 12 – 15 ชั่วโมง จากนั้นนำไปประเหยแห้งบนเตาความร้อน 80 องศาเซลเซียส และที่ตู้เผาความร้อนสูงที่อุณหภูมิ

550 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาว ละลายเถ้าใน 6 mol/L ของกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) แล้วเติม reducing solution (5% w/v KI และ 5% w/v ascorbic acid) กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วปรับปริมาณของตัวอย่างให้ได้ 25 มิลลิลิตรด้วยการเติม 6 mol/L HCl ก่อนที่จะส่งวิเคราะห์ปริมาณสารหนูด้วยอะตอมมิกแอ็บซอร์บชันสเปกโตริเตอร์ต่อไป (Munoz et al., 1999; Ruangwises and Saipan, 2010)

การเตรียมตัวอย่างดินโดยชั่งตัวอย่างปริมาณ 0.5 กรัม เติมด้วยกรดไนตริกเข้มข้นปริมาณ 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 12 – 15 ชั่วโมง จากนั้นนำไประเหยแห้งบนเตาความร้อน 80 องศาเซลเซียส จึงเติมด้วยกรดไนตริกเข้มข้นปริมาณ 10 มิลลิลิตรและกรดเปอร์คลอริก 4 มิลลิลิตร และนำไปเผาที่เผาความร้อนสูงอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาว แล้วเติมด้วย 10 มิลลิลิตรของกรดไนตริก กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วปรับปริมาณของตัวอย่างให้ได้ 25 มิลลิลิตร ก่อนส่งวิเคราะห์ต่อไป ส่วนตัวอย่างน้ำเมื่อนำมากรองผ่านกระดาษกรองแล้วสามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารหนูได้โดยตรงโดยใช้เครื่องมืออะตอมมิกแอ็บซอร์บชันสเปกโตริเตอร์

การควบคุมคุณภาพและความถูกต้องของการทดลองใช้สารมาตรฐานอ้างอิงสำหรับสารหนู (Standard Reference Material, SRM; 2977–mussel tissue, NIST) พบว่าค่าที่ตรวจวัดได้ของสารหนูในตัวอย่างเปรียบเทียบกับค่าวัสดุอ้างอิงมีค่าความถูกต้องระหว่าง 93.25 ถึง 98.15% ($n = 5$) (ค่าเฉลี่ยของ SRM 2977 (mussel tissue) คือ 8.83 ± 0.91 ไมโครกรัมต่อกรัมและเครื่องมือวัดค่าได้เฉลี่ย 8.55 ± 0.40 ไมโครกรัมต่อกรัม) และมีค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limits of detection, LOD) คือ 0.005 ไมโครกรัมต่อกรัมหรือลิตร

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ความแตกต่างของสารหนูที่ตรวจพบปนเปื้อนในตัวอย่างปลานิลและหอย โดยใช้สถิติ Student's t-test และวิเคราะห์ความแตกต่างของผลการปรุงอาหารทั้ง 3 วิธีต่อปริมาณสารหนูด้วยสถิติ ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0 for Windows และคำนวณค่าการสะสมทางชีวภาพโดยใช้การเปรียบเทียบสัดส่วนของปริมาณสารหนูที่ตรวจพบในปลานิลหรือหอยต่อปริมาณสารหนูในน้ำหรือดินตะกอน