บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายมาตรฐานแอนติโมนี (Sb 1,000 ppm, AR grade, Fisher Scientific, UK)
2.1.2 สารละลายมาตรฐานแบเรียม (Ba 1,000 ppm, AR grade, Fisher Scientific, UK)
2.1.3 สารละลายมาตรฐานตะกั่ว (Pb 1,000 ppm, AR grade, Fisher Scientific, UK)
2.1.4 สารละลายกรดไนตริก (conc.HNO_3, AR grade, Lab Scan Analytical Sciences, Thailand)
2.1.5 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl 37%, AR grade, Lab Scan Analytical Sciences, Thailand)
2.1.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH 99%, AR grade, Merck, Germany)
2.1.7 โซเดียมไฮโดรโบมายด์ ($NaBH_4$ 97%, AR grade, Merck, Germany)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1 เครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณ

- เครื่องมืออินดักทีฟลีคอปเปิลพลาสมาออฟติคอลอิมิสชั่นสเปคโตรมิทรี (ICP-OES, Model Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA)
- Hydride generator
- แก๊สอาร์กอน (Ar 99.999%, Ultra High Pure grade, TIG, Thailand)
- แก๊สไนโตรเจน (N_2 99.999%, High Pure grade, TIG, Thailand)
- ปิเปต, ไมโครปิเปตและหัวปิเปต
- เครื่องแก้วอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการวิเคราะห์ เช่น ขวดวัดปริมาตร กระบอกตวง และบิกเกอร์ เป็นต้น

2.2.2 อุปกรณ์สกัดตัวอย่าง

- เครื่อง Centrifuge ความเร็วรอบ 2,000 รอบ/นาที (Suranaree medical equipment Co. Ltd.)
- เครื่อง Ultrasonic cleaner (Delta)
- ขวดน้ำกลั่น

2.2.3 อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง

- อาวุธปืนพกสั้นรีวอลเวอร์ ขนาด.38 ยี่ห้อ สมิธแอนด์เวสสัน (Smith & Wesson) บรรจุ 6 นัด
- กระสุนปืนลูกโม่ ขนาด .38 ยี่ห้อ ROYAL AMMUNITION
- ขวดเกลียวมีฝาปิด (Vial) ขนาด 15 ml
- Plastic shaft cotton buds ยี่ห้อ รถโรงพยาบาล
- Wood shaft cotton buds ยี่ห้อ HI-VAN ขนาด S
- Sterile foam - tipped applicator ยี่ห้อ Whatman
- กรรไกร
- ถุงมือ
- คีม

ภาพประกอบที่ 4 แสดงอาวุธปืนพกสั้นรีวอลเวอร์ ขนาด.38 ยี่ห้อ สมิธแอนด์เวสสัน และ กระสุนปืนยี่ห้อ ROYAL AMMUNITION ที่ใช้ในการทดลอง

ภาพประกอบที่ 5 แสดงวัสดุที่ใช้ในการเก็บสะสมตัวอย่าง: a. Plastic shaft cotton buds, b. Wood shaft cotton buds และ c. Sterile foam - tipped applicator

2.3 วิธีดำเนินการ

2.3.1 การเตรียม Standard solution และ Reagent solution

2.3.1.1 การเตรียม Working standard solution ของ Sb, Ba และ Pb

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1,000 ppm. ของแอนติโมนี, แบเรียมและตะกั่ว ปริมาณ 1, 1.5, และ 10 ml. ตามลำดับ ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml. แล้วปรับปริมาตรด้วย DI water จะได้สารละลายมาตรฐาน แอนติโมนี, แบเรียมและตะกั่ว มีความเข้มข้น 10, 15 และ 100 ppm ตามลำดับ

2.3.1.2 การเตรียมสารละลายกรดไนตริก (HNO_3)

ปิเปตสารละลายเข้มข้นกรดไนตริก (conc.HNO_3) ปริมาณ 5 ml. ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml. แล้วปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบตามต้องการ

2.3.1.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโดรโบมายด์ ($NaBH_4$) ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

เตรียมสารโซเดียมไฮโดรโบมายด์ ($NaBH_4$) 0.4% (w/v) โดยชั่งสาร 0.4 กรัม และเตรียมสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.5% (w/v) โดยชั่งสาร 0.31 กรัม ลงในแต่ละบิกเกอร์ เติม DI water ลงไปคนให้ละลาย จากนั้นเท NaOH ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml. แล้วเท $NaBH_4$ ตามลงไปปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบตามต้องการ

2.3.1.4 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl)

เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 2 mol/l โดยนำ volumetric flask ขนาด 100 ml. มาเติม DI water แล้วตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ปริมาตร 16.7 ml. จากนั้นปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบตามต้องการ

2.3.2 การตั้งค่าเครื่องมือ

2.3.2.1 ระบบ ICP-OES

เครื่องมืออินดักทีฟลีคอปเปิลพลาสมาออฟติคอลอิมิสชั่นสเปคโตรมิทรี ของ Perkin-Elmer Model Optima 4300 DV ทำการวิเคราะห์หาแบเรียมและตะกั่ว รายละเอียดและสภาวะของระบบ ICP-OES แสดงในตารางที่ 2 ข้อมูลสัญญาณที่ได้ของแอนติโมนี, แบเรียม และตะกั่ว แสดงผลผ่านทางเครื่อง printer ข้อมูลที่ได้รับมาจาก software Winlab 32

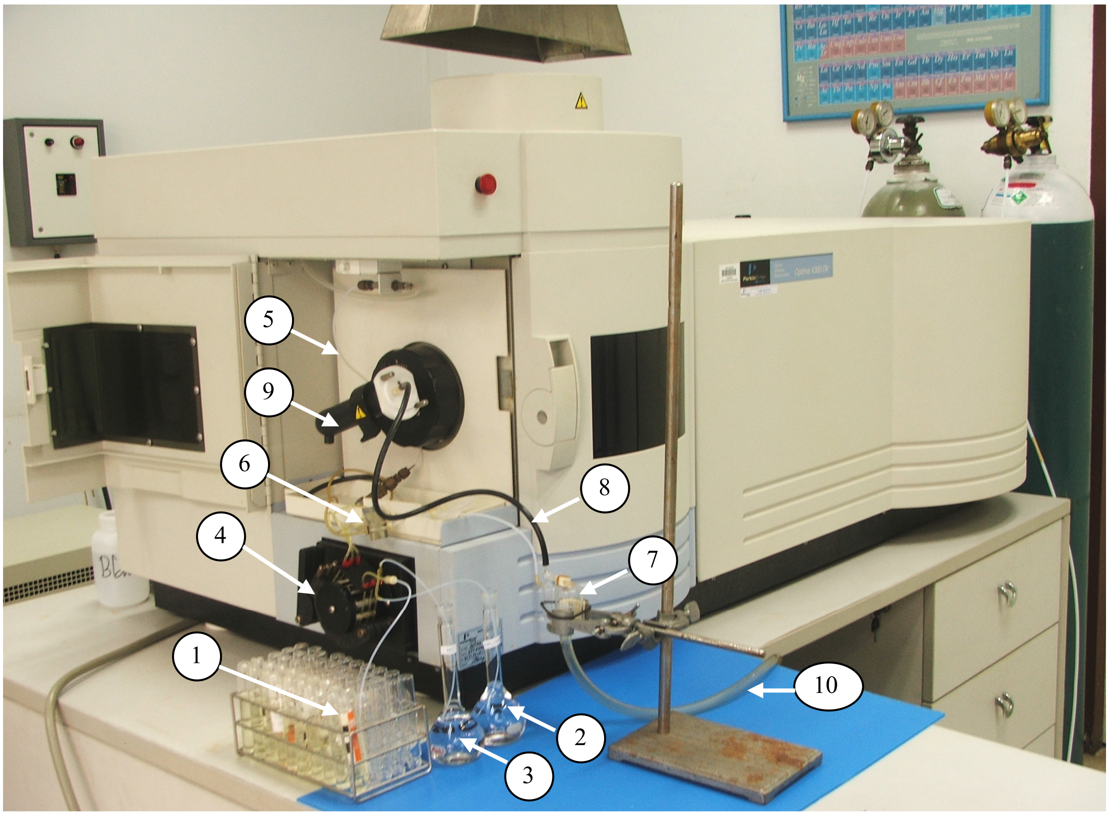
ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดและสภาวะของแบเรียมและตะกั่วในระบบ ICP-OES

สภาวะของ Inductively coupled plasma optical emission spectrometer	
Wavelength	
Ba	233.527 nm
Pb	220.353 nm
Measurements integration time	
Maximum	10 second
Minimum	1 second
RF power	1.3 kW.
Argon gas flow rates	
Nebulizer (Carrier gas)	0.8 L min^{-1}
Plasma	15 L min^{-1}
Auxiliary	0.2 L min^{-1}
Generator	40 MHz
Delay time	30 second
BaและPb Replicates	3
Plasma viewing	axial

2.3.2.2 ระบบ Hydride generation

ระบบ Hydride generation ประกอบด้วย peristaltic pump ที่มี 3 ช่อง (เครื่องมือ ICP-OES 4300 DV) สำหรับใส่ท่อ 3 สายที่ถูกปั๊มเข้าไปยัง mixing coil และ gas-liquid separator ต่อไป

สภาวะของ Hydride generation ที่ใช้สำหรับการศึกษาครั้งนี้ ใช้ flow rates ของตัวอย่าง, $NaBH_4$ ใน NaOH และ HCl ที่ 1.2 mL mim^{-1} สารละลาย 3 ตัวจะถูกปั๊มเข้าไปใน peristaltic pump ที่มี 3 ช่อง ต่อไปยัง mixing coil และผ่านไป gas-liquid separator เพื่อแยกแอนติโมนีไปยัง hydride connector โดยมีแก๊สอาร์กอนเป็นตัวพาผ่านเข้าสู่ระบบ ICP-OES เพื่อวิเคราะห์ต่อไป รายละเอียดและสภาวะของระบบ Hydride generation แสดงในตาราง ที่ 3 การจัดวางเครื่องมือ HG-ICP-OES แสดงในภาพประกอบที่ 6



ภาพประกอบที่ 6 การจัดวางเครื่องมือ HG-ICP-OES ที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย 1. ตัวอย่าง, 2. HCl, 3. $NaBH_4$, 4. Peristaltic pump, 5. แก๊สอาร์กอน, 6. Mixing coil, 7. Gas/liquid separator, 8. Hydride gas, 9. Hydride connector และ 10. ท่อน้ำทิ้ง

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดและสภาวะของแอนติโมนีในระบบ Hydride generation ICP-OES

สภาวะของ Inductively coupled plasma optical emission spectrometer

Sb wavelength	206.836 nm
Measurements integration time	
Maximum	10 second
Minimum	5 second
RF power	1.3 kW.
Argon gas flow rates	
Nebulizer (Carrier gas)	0.3 L min^{-1}
Plasma	15 L min^{-1}
Auxiliary	0.2 L min^{-1}
Generator	40 MHz
Delay time	45 second
Sb Replicates	5
Plasma viewing	axial

สภาวะของ Hydride generation

Pumping rate	0.5 mL min^{-1}
Sample flow rate	1.2 mL min^{-1}
$NaBH_4$ in NaOH และ HCl flow rate	1.2 mL min^{-1}
$NaBH_4$ Concentration	0.4% (w/v)
NaOH Concentration	0.5% (w/v)
HCl Concentration	2 mol L^{-1}

2.3.3 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of detection) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (Limit of quantification)

ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (LOD) คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือสามารถวัดได้ โดยปกติเป็นที่ยอมรับกันว่าสัญญาณมากกว่า 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัด blank (3σ หรือ $3S_B$) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (LOQ) คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถอ่านค่าได้อย่างแน่นอน ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่าสัญญาณมากกว่า 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัด blank (Taylor, 1987) ในการศึกษานี้ ทำการหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ โดยสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแอนติโมนีที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 80 และ 100 μg/l, แบเรียมที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 μg/l, และตะกั่วที่ความเข้มข้น 50, 100, 200, 300 และ 500 μg/l ตามลำดับ เพื่อหาค่าความชันของกราฟมาตรฐาน โดยกราฟมาตรฐานได้จากค่าระหว่าง intensity signal กับค่าความเข้มข้นของแต่ละธาตุ จากนั้นวัดสัญญาณของ blank 10 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยของ blank (X_B) และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ blank (standard deviation, S_B) แล้วนำมาคำนวณตามสูตรข้างล่าง (XueDong and Shane, 2004)

การหาค่าสัญญาณจากการวิเคราะห์ที่ต่ำที่สุด (X_L) สามารถหาได้จาก

$$X_L = X_B + kS_B \qquad \text{------(1)}$$

เมื่อ k คือ จำนวนคงที่ซึ่งพิจารณาจากระดับความต้องการ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (C_L) หาได้จาก X_L

$$C_L = (X_L\text{-}X_B)/\ m \qquad \text{------(2)}$$

เมื่อ m คือ ความชันของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ เพราะค่าเฉลี่ยของ blank อ่านได้จาก X_B ซึ่งเท่ากับ 0 สัญญาณถูกต้องไม่มี background โดยแทนสูตร 1 ในสูตร 2 จะได้

$$C_L = kS_B/\ m$$

เมื่อ C_L = ค่าความเข้มข้นของค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์

k = ค่าคงที่เท่ากับ 3 (3 คือ ค่าสัญญาณมากกว่า 3 เท่าของ blank)

S_B = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัด blank

m = ความชันของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์

2.3.4 ศึกษาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ

2.3.4.1 การเตรียมวัสดุ

ตัดส่วนปลายของวัสดุทั้ง 3 ชนิด คือ sterile foam - tipped applicator, plastic shaft cotton bud และ wood shaft cotton bud ลงในvial ขนาด 15 ml โดย sterile foam - tipped applicator ตัดจำนวน 1 ก้าน ต่อ 1 vial ส่วน plastic shaft cotton bud และ wood shaft cotton bud ตัดจำนวน 2 ก้าน ต่อ 1 vial

2.3.4.2 การเตรียมตัวอย่าง

นำสารละลายกรดไนตริก 5% spike บนวัสดุปริมาณ 150 µl ลงในแต่ละ vial จากข้อ 2.3.4.1 จากนั้นนำ Working standard solution ของ Sb, Ba และ Pb ที่ความเข้มข้น 10, 15, และ 100 ppm. ซึ่งเตรียมจากข้อ 2.3.1.1 มา spike ลงในแต่ละ vial เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ blank, low และ high ตามที่แสดงในตารางที่ 4 โดยที่ความเข้มข้น blank ทำการ spike เพียงสารละลายกรดไนตริก 5% เท่านั้น ความเข้มข้น low จะทำการ spike สารละลายมาตรฐานที่ผสมทั้ง 3 ธาตุ ปริมาณ 10 µl เพื่อให้ได้ปริมาณของแอนติโมนี, แบเรียม และตะกั่วที่ 0.1, 0.15 และ 1.0 µg ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้น high นั้นทำการ spike สารละลายมาตรฐานที่ผสมทั้ง 3 ธาตุ ปริมาณ 40 µl เพื่อให้ได้ปริมาณของแอนติโมนี, แบเรียม และตะกั่วที่ 0.4, 0.6 และ 4.0 µg ตามลำดับ

เมื่อ spike เสร็จเรียบร้อยแล้ว นำตัวอย่างทั้งหมดเข้า hot-air oven ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลาข้ามคืน (ประมาณ 16-17 ชั่วโมง)

ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นของสารละลายที่ spike บนวัสดุเพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recovery)

Spike Level	Sb, µg	Ba, µg	Pb, µg
Blank	0	0	0
Low	0.1	0.15	1.0
High	0.4	0.6	4.0

2.3.5 วิธีการสกัดตัวอย่าง

2.3.5.1 วิธีแช่ 24 ชั่วโมง (saturate 24 h)

นำตัวอย่างที่เตรียมเรียบร้อยแล้วจากข้อ 2.3.4.2 มาเติมสารละลายกรดไนตริก 5% จำนวน 5 ml. แช่ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) จากนั้นนำมา centrifuge เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสออกมาใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml. นำส่วนที่เหลือใน vial มาใส่ DI water ประมาณ 1 ml แล้ว centrifuge เป็นเวลา 10 นาที ทำเช่นนี้จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบ 10 ml. แล้วจึงนำไปหาปริมาณธาตุแอนติโมนี, แบเรียมและตะกั่วโดยใช้เครื่องมือ ICP - OES

2.3.5.2 วิธี sonicate 10 และ 20 นาที

นำตัวอย่างที่เตรียมเรียบร้อยแล้วจากข้อ 2.3.4.2 มาเติมสารละลายกรดไนตริก 5% จำนวน 5 ml. แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic cleaner ที่เวลา 10 นาที และ 20 นาที ตามที่กำหนดไว้ในแต่ละหลอด จากนั้นนำสารละลายส่วนใสออกมาใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml. นำส่วนที่เหลือใน vial มาใส่ DI water ประมาณ 1 ml แล้ว centrifuge เป็นเวลา 10 นาที ทำเช่นนี้จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นปรับปริมาตรด้วย DI water จนครบ 10 ml. แล้วจึงนำไปหาปริมาณธาตุแอนติโมนี, แบเรียมและตะกั่วโดยใช้เครื่องมือ ICP - OES

2.3.6 ศึกษาเขม่าปืนจากอาสาสมัคร

2.3.6.1 การเตรียมตัวอาสาสมัคร

เลือกอาสาสมัครที่ผ่านการยิงปืนมาแล้วอย่างน้อย 6 ชั่วโมง โดยอาสาสมัครจะต้องผ่านการล้างมือด้วยสบู่และเช็ดมือให้แห้ง จากนั้นนำมาเช็ดด้วยสารละลายกรดไนตริก 5% ทั้งฝ่ามือและหลังมืออีกครั้งจึงจะสามารถทำการยิงปืนได้ โดยท่าทางการยิง คือ อาสาสมัครจะต้องยิงปืนด้วยมือข้างเดียว โดยมือข้างที่ไม่ได้ยิงจะต้องนำมาไขว้หลังไว้ ทำการยิงปืนไปข้างหน้าจำนวน 1 นัด

2.3.6.2 การเก็บตัวอย่างเขม่าปืน

เมื่ออาสาสมัครยิงปืนแล้วจำนวน 1 นัด จะทำการเก็บตัวอย่างเขม่าปืนทันที โดยนำ plastic shaft cotton bud ที่ตัดปลายข้างหนึ่งทิ้ง มาหยดด้วย 5% HNO_3 พอประมาณ (2-3 หยด) จากนั้นทำการเช็ดที่หลังฝ่ามือ เริ่มเช็ดจากด้านหัวแม่มือไปจนถึงนิ้วก้อยให้ทั่วบริเวณทั้งหมด และเช็ดจากข้อมือถึงปลายนิ้วมือไปในทางเดียวกัน (ห้ามเช็ดกลับไปมา) พร้อมหมุนสำลีเพื่อให้ตัวอย่างติดโดยรอบ เสร็จแล้วนำตัวอย่างที่ได้ตัดเฉพาะส่วน

ปลายใส่ใน vial ทำการเช็ดฝ่ามือด้วยวิธีเดียวกัน จากนั้นนำมาใส่ใน vial เดียวกัน จะได้ 1 vial ต่อ 2 ก้าน เป็นอันเสร็จสำหรับอาสาสมัคร 1 คน ทำเช่นเดียวกันนี้ในอาสาสมัครคนถัดไป

ทำการหยด 5% HNO_3 ลงใน plastic shaft cotton bud จำนวน 2 ก้าน จากนั้นตัดส่วนปลายทั้ง 2 ลงใน vial เพื่อทำเป็น blank

2.3.7 ศึกษาระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเขม่าปืน

เก็บตัวอย่างด้วยวัสดุที่ได้ทำการทดลองแล้วว่ามีความสามารถในการเก็บเขม่าปืนที่มือได้ดีที่สุดจากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับและเตรียมตัวอาสาสมัครเช่นเดียวกับข้อ 2.3.6.1.

2.3.7.1 การเก็บและรักษาตัวอย่างเขม่าปืน

เมื่ออาสาสมัครทำการยิงปืนจำนวน 1 นัดแล้ว จะต้องทำการรักษาเขม่าปืนไว้เป็นเวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง โดยการนำซองกระดาษมาสวมมือไว้ แล้วใช้เทปใสปิดบริเวณข้อมือให้สนิท เพื่อยึดมือไว้มิให้เคลื่อนหลุดออกจากซองกระดาษและหลีกเลี่ยงไม่ให้มือสัมผัสกับน้ำ ในการเก็บตัวอย่างเขม่าปืนอาสาสมัครคนที่ 1 จะทำการเก็บตัวอย่างทันที ซึ่งทำเช่นเดียวกับข้อ 2.3.6.2 ส่วนในการเก็บตัวอย่างในอาสาสมัครคนที่ 2 และ3 จะต้องทำการรักษาตัวอย่างเขม่าปืนที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดจึงจะทำการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 2.3.6.2

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลความเข้มข้นที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณของธาตุแอนติโมนี, แบเรียมและตะกั่ว นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการใช้โปรแกรม SPSS 15.0 เพื่อการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (Oneway - ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (สุวิชาน, 2543)