

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

1. ถุงพลาสติก
2. ถังสำหรับเก็บตัวอย่าง
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
4. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
5. เครื่องวัดความเค็ม (refractometer)
6. พลาสติกสำหรับตัดดินตะกอน

อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับเตรียมตัวอย่าง

1. ตะแกรงสำหรับร่อนดินตะกอน
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด
3. ตู้แช่แข็ง (deep freezer)
4. เครื่องอบแห้งแบบทำความเย็น (freezer dryer)
5. เครื่องไมโครเวฟ (microwave : MLS - 1200 MEGA)
6. โถดูดความชื้น (desiccator)
7. บีกเกอร์ (beaker)
8. ปิเปต (volumetric pipet)
9. กระบอกตวง (cylinder)
10. แท่งแก้วคนสาร
11. กรวยแยก (separatory funnel)
12. กระดาษกรอง Whatman
13. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)
14. หลอดหยด (dropper)

เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชัน สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และระบบไฮโดรด์

MHS – 10 ของเพอร์กินเอลเมอร์ (Atomic Absorption Spectrophotometer : AAS)

สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง

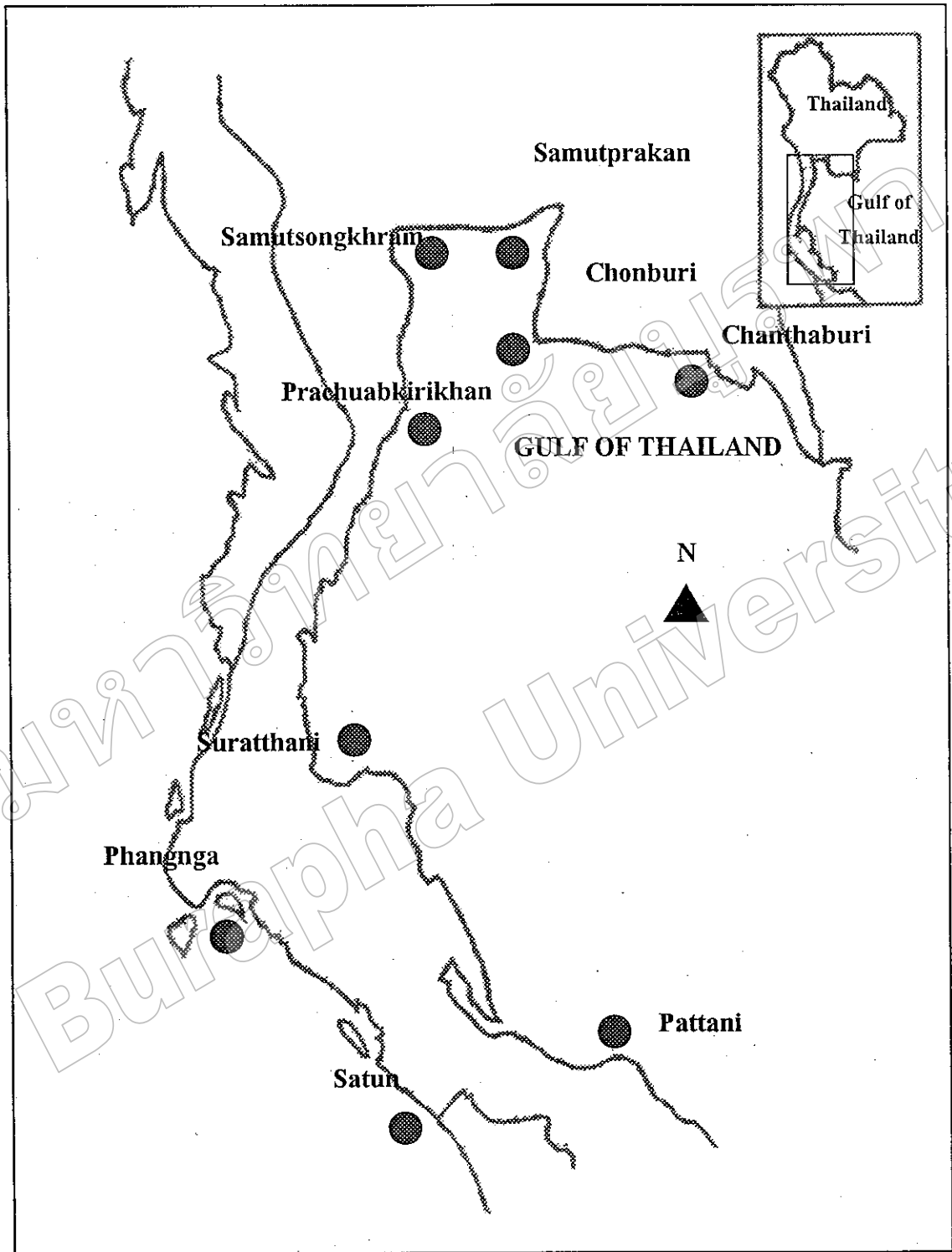
1. กรดไนตริกเข้มข้น (HNO_3) (superpure grade)
2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (redistilled grade)
3. โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (KMnO_4) (A.R. grade)
4. โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4) (A.R. grade)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (A.R. grade)
6. สารละลายมาตรฐานของปรอท (Standard solution) (AAS grade)
7. น้ำกลั่น (deionized distilled water)

วิธีดำเนินการ

การกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่าง

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

1. บริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย โดยทำการเก็บตัวอย่าง 2 สถานี
 - 1.1 บริเวณ ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี
 - 1.2 บริเวณ ต.เควียนหัก อ.ขลุง จ.จันทบุรี
2. บริเวณชายฝั่งตอนกลางของอ่าวไทย โดยทำการเก็บตัวอย่าง 2 สถานี
 - 2.1 บริเวณ ต.คลองด่าน อ.บางบ่อ จ.สมุทรปราการ
 - 2.2 บริเวณคอนหอยหลอด อ.เมือง จ.สมุทรสงคราม
3. บริเวณชายฝั่งตะวันตกของอ่าวไทย โดยทำการเก็บตัวอย่าง 3 สถานี
 - 3.1 บริเวณอ่าวมะนาว อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
 - 3.2 บริเวณหมู่บ้านปากน้ำกระแต อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี
 - 3.3 บริเวณ ต.คุยา อ.หนอกจิก จ.ปัตตานี
4. บริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน โดยทำการเก็บตัวอย่าง 2 สถานี
 - 4.1 บริเวณ ต.มะรุ่ย อ.ทับปุด จ.พังงา
 - 4.2 บริเวณ ต.ทุ่งบุหล้า อ.ทุ่งหว้า จ.สตูล



ภาพที่ 9 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างบริเวณอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

การตรวจวัด % recovery เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือ

ก่อนทำการทดลองจะต้องทำการหา % recovery เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือและวิธีการวิเคราะห์ โดยใช้สารมาตรฐาน DORM-2 (Dogfish Muscle Certified Reference for Trace Metals) หน่วยงานเจ้าของคือ National Research Council of Canada ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลาชนิด Dogfish ผสมรวมอยู่กับองค์ประกอบอื่น ๆ มีลักษณะของผงละเอียดเป็นเนื้อเยื่อเดียวกัน ซึ่งประกอบด้วยสารโลหะร่อง (trace element) มากกว่า 16 ชนิด โดยมีค่าปริมาณปรอทร่องอยู่ในอัตราส่วน 4.64 ± 0.26 mg/kg ซึ่งสามารถใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์สารปรอทในเนื้อเยื่อได้

วิธีการวิเคราะห์

ทำการตรวจสอบสารมาตรฐาน DORM-2 จำนวน 5 ตัวอย่าง (ซ้ำ) ตามวิธีการวิเคราะห์ปริมาณปรอทในตัวอย่างหอยนางรมและหอยแมลงภู่ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ และนำค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ มาคิดคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นปรอทที่วัดได้} \times 100}{\text{ความเข้มข้นของปรอทในสารมาตรฐาน DORM-2}}$$

ค่าที่ใกล้เคียง 100 % แสดงถึงการมีประสิทธิภาพสูงของการวิเคราะห์ (พิมพ์พร เจริญศรี,

2544)

วิธีการเก็บและเตรียมตัวอย่างดินตะกอน

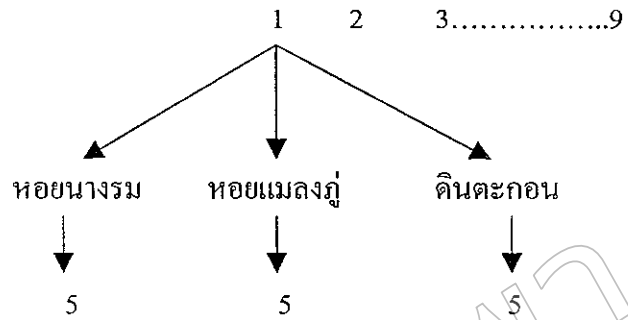
การเก็บดินตะกอน

เก็บตัวอย่างดินตะกอนโดยใช้พลั่วพลาสติกตักดินตะกอนจากบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างหอยทั้ง 2 ชนิดนั้น โดยสุ่มเก็บดินตะกอน 5 จุด (ซ้ำ) (ดังภาพที่ 10) ในบริเวณเดียวกัน บรรจุในถุงพลาสติกเก็บไว้ในถังแช่เย็น จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

สถานี (9)

ชนิดของตัวอย่าง (3)

ซ้ำ (5)



ภาพที่ 10 แผนการเก็บตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างดินตะกอน (Tanner & Leong, 1995)

1. นำดินตะกอนใส่ลงในภาชนะพลาสติกที่ปิดสนิท นำไปแช่ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นนำไปเข้าเครื่องอบแห้งแบบทำความเย็นทันทีที่อุณหภูมิ -55°C ประมาณ 3-4 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างดินตะกอนไว้ในถุงพลาสติกทันที ปิดถุงให้สนิทและเก็บไว้ในโถสุญญากาศความชื้น

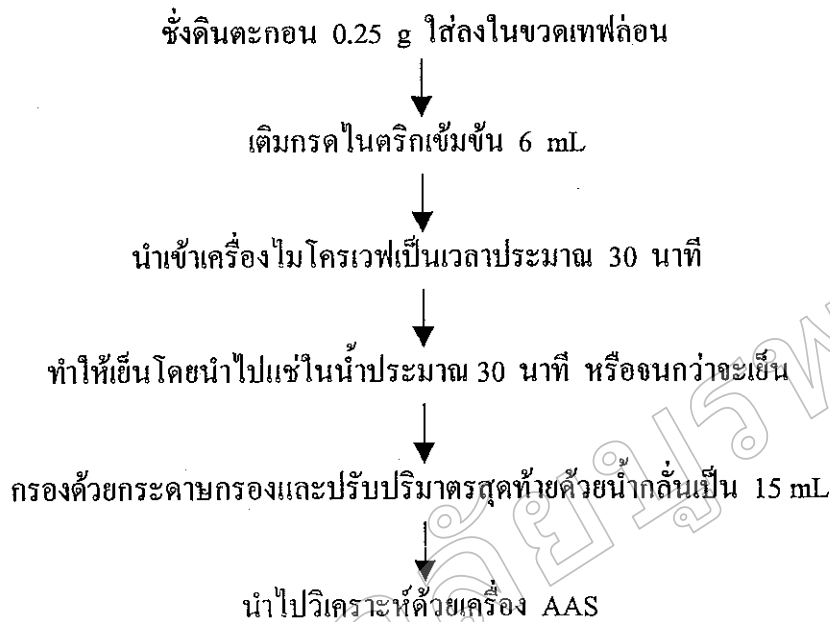
2. นำตัวอย่างดินตะกอนมาอุ่นผ่านตะแกรง ด้วยชุดเครื่องร้อนดินตะกอน จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยครกบด และเก็บตัวอย่างดินตะกอนไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทในโถสุญญากาศความชื้น เพื่อรอขั้นตอนการย่อยดินตะกอนต่อไป

การย่อยตัวอย่างดินตะกอน (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างดินตะกอนที่แห้งแล้ว 0.25 g ใส่ในขวดเทฟลอน

2. ย่อยด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 6 mL ปิดฝา นำเข้าเครื่องไมโครเวฟ ที่ตั้งโปรแกรมสำหรับย่อยดินตะกอนไว้แล้ว (ตาราง 19) เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นนำออกจากไมโครเวฟ แล้วทำให้เย็นโดยการแช่น้ำเป็นเวลาประมาณ 30 นาทีหรือจนกว่าจะเย็น

3. กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 mL จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารปรอทด้วยเครื่อง AAS



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารปรอทในดินตะกอน

วิธีการเก็บและการเตรียมตัวอย่างหอยสองฝา

การเก็บตัวอย่างหอยสองฝา

1. เก็บตัวอย่างหอยนางรม และหอยแมลงภู่จากพื้นที่ที่ทำการศึกษาทั้งหมด 9 สถานีที่กำหนดไว้ โดยทำการเก็บตัวอย่างหอยทั้ง 2 ชนิด 5 ซ้ำ และเลือกหอยโตเต็มที่ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (ขนาดประมาณ 8–12 cm สำหรับหอยนางรม และ 6–7 cm สำหรับหอยแมลงภู)
2. นำตัวอย่างหอยมาล้างให้สะอาด แคะเอาเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อ แช่ไว้ในถังเย็นจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างหอยสองฝา

1. นำตัวอย่างหอยที่เก็บไว้มาบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenize) จากนั้นนำไปเข้าตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วนำไปเข้าเครื่องอบแห้งแบบทำความเย็นทันทีที่อุณหภูมิ -55°C ประมาณ 3-4 วัน แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้น
2. ทำการบดละเอียดตัวอย่างหอยที่เตรียมได้จากข้อ 1 บรรจุในถุงพลาสติกและเก็บไว้ในโถดูดความชื้นอีกครั้งเพื่อรอขั้นตอนการย่อยต่อไป

การย่อยตัวอย่างหอย

1. ชั่งตัวอย่างหอยที่บดละเอียดแล้วมา 0.25 g ใส่ลงในขวดเพฟลอน
2. เติมกรดไนตริกเข้มข้น 6 mL และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 mL ปิดฝาให้แน่น นำเข้าเครื่องไมโครเวฟที่ตั้งโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์เนื้อเชื้อไว้แล้ว (ตาราง 20) เป็นเวลาประมาณ 30 นาที
3. หลังจากนั้นนำชุดตัวอย่างออกจากไมโครเวฟ ทำให้เย็นโดยการแช่น้ำประมาณ 30 นาที หรือจนกว่าจะเย็น
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 15 mL แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณปรอทด้วยเครื่อง AAS

ชั่งตัวอย่างหอย 0.25 g ใส่ลงในขวดเพฟลอน

↓
เติมกรดไนตริกเข้มข้น 6 mL และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 mL

↓
นำเข้าเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 30 นาที

↓
ทำให้เย็นโดยนำไปแช่น้ำประมาณ 30 นาที หรือจนกว่าจะเย็น

↓
ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 15 mL

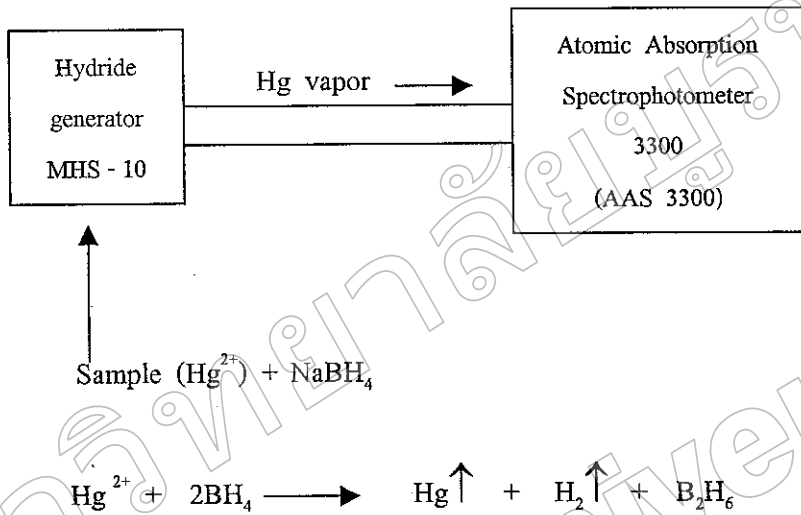
↓
นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAS

(ใช้ NaBH_4 เป็น Reducing agent โดยใช้ 3% NaBH_4 ละลายใน 1% NaOH)

ภาพที่ 12 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารปรอทในหอยสองฝา

การวิเคราะห์ปริมาณปรอท

วิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer และ Hydride generator MHS - 10 ของ Perkin - Elmer โดยการวิเคราะห์จะใช้สารละลาย NaBH_4 3% ใน NaOH 1% และกรดไนตริกเจือจาง 1.5% เป็นตัวทำปฏิกิริยา



ภาพที่ 13 การทำงานของเครื่อง Hydride generator ร่วมกับ AAS (ดัดแปลงจาก Perkin - Elmer, 1987)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Perkin - Elmer, 1987)

1. ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐานของสารปรอทที่มีความเข้มข้น $1,000 \mu\text{g/L}$ มา 0.1 mL ($100 \mu\text{L}$) ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL เติมกรดไนตริกเจือจาง 1.5% ลงไป 10 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 mL หยดสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตเจือจาง 5% ลงไป 1 หยด จะได้สารละลายมาตรฐานของสารปรอทที่มีความเข้มข้น $1.0 \mu\text{g/mL}$
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารปรอทที่มีความเข้มข้น $10, 20,$ และ $30 \mu\text{g/L}$ โดยการปิ่เปิดสารละลายมาตรฐานของสารปรอทที่มีความเข้มข้น $1.0 \mu\text{g/mL}$ มา $100, 200$ และ $300 \mu\text{L}$ ใส่ลงในถ้วยทำปฏิกิริยาของชุดไฮไดรต์ เติมกรดไนตริกเจือจาง 1.5% ลงไปในถ้วยละ 10 mL

บีเปตสารละลายมาตรฐานของสารปรอทที่มีความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g/mL}$ มา 250 μL (250 ng Hg) เติมกรดไนตริกเจือจาง 1.5 % ลงไปในถ้วยทำปฏิกิริยา 10 mL เพื่อวัดค่า

Sensitivity check

3. เตรียมสารละลายเบลงค์ (blank) โดยการบีเปตกรดไนตริกเจือจาง 1.5 % 10 mL ลงในถ้วยทำปฏิกิริยา

การคำนวณ

สร้างกราฟมาตรฐานโดยเขียนกราฟระหว่างความสูงของพีค (peak) ของสารละลายมาตรฐานกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน วัดความสูงของพีคที่อ่านได้จากสารตัวอย่างนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแล้วอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟ นำความเข้มข้นที่อ่านได้มาคำนวณกับปริมาณหรือน้ำหนักของตัวอย่างก่อนการคำนวณสูตรความเข้มข้นของสาร

สูตรการคิดคำนวณ

$$\text{Concentration of Mercury in } \mu\text{g/g} = \frac{V \times X}{A \times W}$$

V = Total volume of digestion solution (mL)

X = Determined weight of metal in sample aliquot A (μg)

A = Sample aliquot (mL)

W = Sample weight (g)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยปริมาณสารปรอทในหอยแต่ละชนิด ของแต่ละสถานี
2. การวิเคราะห์ความแปรปรวนจาก 2 ปัจจัย ได้แก่ สถานี (9 สถานี) ชนิดหอย (2 ชนิด) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA) เพื่อทดสอบความแตกต่างของแต่ละปัจจัยด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS