บทที่ 2
อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินงาน

ในการศึกษาปริมาณของโลหะหนัก และ ดีดีที พีซีบี ในหอยนางรมและหอยตะโกรมนั้น ใช้อุปกรณ์และมีวิธีการดำเนินงาน ดังต่อไปนี้

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเก็บตัวอย่าง
   - ถังเก็บน้ำ polyethylene ขนาด 5 ลิตร
   - ขวดเก็บน้ำ (สีชา) ขนาด 2 ลิตร
   - กล่องเก็บตัวอย่างดิน
   - Aluminum foil
   - เหล็กแกะหอยนางรม
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
   2.1 อุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่าง
   - ไม้บรรทัด
   - เหล็กแกะหอยนางรม
   - Aluminum foil
   - เครื่องชั่งชนิดละเอียด
   - ฉากยึ่งดิน
   - โกร่งบดดินและตัวอย่าง
   - ตะแกรงร่อนดินขนาด 30 mesh
   - ตู้อบ

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาโลหะหนัก

- Beaker ขนาด 25, 50, 250, 1000 มล.
- กระจกนาฬิกา
- กระบอกตวง ขนาด 10, 100, 1000 มล.
- ขวดพลาสติก (polyethylene bottle) ขนาด 50 มล.
- เตาเผา (muffle furnace)
- กระดาษกรอง
- Separatory funnel ขนาด 1000 มล.
- Erlenmeyer flask ขนาด 250, 500 มล.
- Atomic absorption apectrophotometer

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก

- กรด HNO_3 (conc.) AR, กรด HCl (conc.) AR, กรด CH_3COOH (conc.) AR
- Methyl Isobutyl Ketone (MIBK)
- Ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDC)
- dithizone
- Carbon tetrachloride, CCl_4
- diphenylthiocarbazone
- Stock solution ของโลหะ Cd, Cu, Pb, Zn และ Mn
- น้ำกลั่น (deionized distilled water)

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์หา ดีดีที และพีซีบี

- เครื่องกลั่นสารเคมี
- Sexhlet extractor

- Thimble
- Separatory funnel ขนาด 1000 มล.
- Beaker ขนาด 50, 250, 1000 มล.
- Erlenmeyer flask 500 มล.
- Water bath
- กรวยแก้ว
- กระบอกตวง ขนาด 10, 100, 250, 1000 มล.
- กระดาษกรอง
- Chromatographic column ชนิด teflon stopcock ขนาด 1" x 24"
- Elution column ขนาด 24 ซม. x 0.6 ซม. ปลายข้างหนึ่งลีบลงเหลือ 0.1 ซม.
- เครื่อง Gas chromatograph

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ดีดีที และ พีซีบี

2.5.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด (Extraction)

- n - hexane, AR จุดเดือด 68 - 69 °ซ. (นำมากลั่นใหม่อีกครั้งหนึ่งก่อนใช้)
- anhydrous sodium sulfate, AR อบที่ 130 °ซ. ประมาณ 12 ซ.ม.

2.5.2 สารเคมีที่ใช้ในการขจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ (Clean up)

- florisil, AR 60 / 100 mesh อบที่ 130 °ซ. ประมาณ 12 ซ.ม.
- anhydrous sodium sulfate, AR อบที่ 130 °ซ. ประมาณ 12 ซ.ม.

- alumina (Al_2O_3) AR 70/230 mesh ASTM อบที่ 800 ซ. ประมาณ 12 ซ.ม. แล้วนำมา deactivated * ด้วยน้ำ 1 %
- n - hexane, AR จุดเดือด 68 - 69 ซ. กลั่นใหม่ (Redistilled)
- Diethyl ether, AR

2.5.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจผลการวิเคราะห์โดย GC

- n - hexane, AR (redistilled)
- สารละลายมาตรฐาน ของ ดีดีอี, ดีดีดี, ดีดีที และ พีซีบี

<u>วิธีดำเนินงาน</u>

1. <u>การกำหนดสถานีและระยะเวลา</u>

สถานที่เก็บตัวอย่างหอยนางรมและหอยตะโกรม ในช่วงเวลา 1 ปี โดยเริ่มตั้งแต่เดือนมกราคม 2521 เป็นต้นมา ซึ่งทำในบริเวณฟาร์มเลี้ยงหอย 3 แห่ง ด้วยกัน คือ

1.1 ฟาร์มหอยนางรม บริเวณ ต.อ่างศิลา จ.ชลบุรี

- เก็บตัวอย่างหอยนางรม, น้ำ และดิน ทุก ๆ 1 เดือน รวม 12 ครั้ง

---

* deactivated alumina ด้วยน้ำ 1 % (Nicholson and Whitby, 1973) . . . นำ alumina 100 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. ชนิดมีจุกแก้วปิด เติมน้ำกลั่น 1 มล. โดยฉีดจาก syringe เขย่าให้เข้ากัน โดยใช้ mangnetic stirrer ช่วยในการผสม เพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว. . .

1.2 ฟาร์มหอยนางรม และหอยตะโกรม บริเวณ อ.ขลุง จ.จันทบุรี

– เก็บตัวอย่างหอยนางรม และหอยตะโกรม และน้ำ ทุก ๆ 2 เดือนต่อครั้ง รวม 6 ครั้ง

1.3 ฟาร์มหอยตะโกรม บริเวณ อ.กาญจนดิษฐ จ.สุราษฎร์ธานี

– เก็บตัวอย่างหอยตะโกรม และน้ำ ทุก ๆ 4 เดือนต่อครั้ง รวม 3 ครั้ง

2. <u>การเก็บตัวอย่าง</u>

2.1 <u>การเก็บตัวอย่างน้ำ</u>

ตัวอย่างน้ำเก็บที่ระดับผิวน้ำ

– ตัวอย่างน้ำสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก เก็บด้วยถึง polyethylene ขนาด 5 ลิตร และเติมกรดไนตริกเข้มข้น 25 มล. ทันที

– ตัวอย่างน้ำสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ ดีดีที และ พีซีบี เก็บด้วยขวดแก้วสีชา ขนาด 2 ลิตร แล้วนำแช่แข็งทันที

2.2 <u>การเก็บตัวอย่างดิน</u>

เก็บตัวอย่างดิน ทำในบริเวณฟาร์มหอยนางรมอ่างศิลา ระดับ 0 – 5 ซ.ม. นำบรรจุใส่ในกล่องพลาสติคที่บุด้วย aluminum foil แล้วนำแช่แข็งไว้

2.3 <u>การเก็บตัวอย่างหอย</u>

นำตัวอย่างหอยจากฟาร์ม มาวัดขนาด แล้วแกะเนื้อออกชั่งน้ำหนักบันทึกไว้ แล้วห่อด้วย aluminum foil นำแช่แข็งไว้จนกระทั่งทำการวิเคราะห์

<u>การเตรียม Stock solution ของโลหะหนักแต่ละชนิด</u>

<u>โลหะทองแดง</u> (Cu)

ชั่งโลหะทองแดงบริสุทธิ์ 1,000 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร เติมกรดไนตริก (1 + 1) ลงไป 10 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นเล็กน้อย เมื่อปฏิกิริยาหมดแล้ว จึงค่อย ๆ อุ่นสารละลายในบีกเกอร์ และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ทำปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

สารละลายนี้จะมีความเข้มข้น 1000 mg / l Cu

โลหะตะกั่ว (Pb)

ละลาย anhydrous lead nitrate, $Pb(NO_3)_2$ 1.599 กรัม ด้วยน้ำกลั่น เติมกรดไนตริกเข้มข้น 10 มล. และทำปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายนี้จะมีความเข้มข้น 1000 mg / l Pb

โลหะแมงกานีส (Mn)

ละลาย manganese sulfate, $MnSO_4$ 2.747 กรัม (ซึ่งอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 180 °ซ. เป็นเวลา 24 ช.ม.) ด้วยน้ำกลั่น และทำให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายนี้จะมีความเข้มข้น 1000 mg / l Mn

โลหะแคดเมี่ยม (Cd)

ชั่งโลหะแคดเมี่ยมบริสุทธิ์ 0.100 กรัม ละลายในกรดเกลือเข้มข้น 5 มล. ทำให้ร้อนเพื่อช่วยการละลาย และทำให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

สารละลายนี้จะมีความเข้มข้น 100 mg / l Cd

โลหะสังกะสี (Zn)

ละลายโลหะสังกะสีบริสุทธิ์ 1.000 กรัม ด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 10 มล. และทำปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

สารละลายนี้จะมีความเข้มข้น 1000 mg / l Zn

เตรียม Standard solution

จาก stock solution ดังกล่าว นำมาเตรียม standard solution ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เช่น 0.5, 1, 3, 5, 10 ppm หรือในช่วงความเข้มข้นใกล้เคียงกับปริมาณที่มีในตัวอย่าง โดยใช้สารละลายกรดไนตริกซึ่ง

มีค่า pH ใกล้เคียงกับตัวอย่างมาทำให้เจือจาง เพื่อนำไปทำ Carlibration curve สำหรับการคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่าง

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณของโลหะหนักในตัวอย่างหอย

1.1 นำตัวอย่างหอยอบที่อุณหภูมิ 80 ° ซ. ประมาณ 12 ซ.ม. และชั่งน้ำหนักไว้

1.2 นำตัวอย่างใส่ในปีกเกอร์ขนาด 25 หรือ 30 มล. นำไปเผาใน muffle furnace ที่อุณหภูมิ 450 – 500 ° ซ. เป็นเวลา 12 ซ.ม. หรือจนกระทั่งมีการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ (Anderson, 1977 ; Bryan et al., 1977)

1.3 นำมาละลายด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 2 มล. และทำให้มีปริมาตรเป็น 20 มล. ด้วยสารละลายกรดไนตริก 2 N.

1.4 กรองสารละลายที่ได้จากข้อ 3 แล้วนำไปวัดหาปริมาณของโลหะหนักด้วย AAS โดยคำนวณเทียบกับ calibration curve ของ standard

2. การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างดิน

2.1 นำตัวอย่างดินที่ตากแห้งมาบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 mesh.

2.2 ชั่งตัวอย่างดิน 3 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มล.

2.3 เติมกรดไนตริกเข้มข้น 20 มล. นำตั้งบน Hot plate จนกระทั่งปฏิกิริยาสมบูรณ์

2.4 ปล่อยให้ตัวอย่างเย็น และทำปริมาตรเป็น 50 มล. ด้วยน้ำกลั่น

2.5 นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปวัดปริมาณของโลหะหนักด้วย AAS

3. การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างน้ำ

3.1 การเตรียม Reagents

– Ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDC) solution, 1 % เตรียมโดยละลาย APDC 1 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 100 มล. (ควรเตรียมใหม่ ๆ ก่อนใช้)

– Buffer (pH 4.75) solution

ละลาย sodium acetate, CH_3COONa 136 กรัม ในน้ำกลั่น และทำให้มีปริมาตรเป็น 500 มล. จากนั้นเติมกรด acetic, CH_3COOH ลงไปจนกระทั่งวัดค่า pH ได้ 4.75 (ใช้ pH meter) และทำให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำมาสกัดด้วยสารละลาย dithizone 0.01 % หลังจากนั้นใช้ CCl_4, Carbon tetrachloride เพื่อสกัดเอา dithizone ส่วนที่เหลือออก

– สารละลาย Dithizone 0.01 %

เตรียมโดยละลาย 0.01 กรัม ของ diphenylthiocarbazone ใน Carbon tetrachloride 100 มล.

3.2 วิธีวิเคราะห์

3.2.1 นำตัวอย่างน้ำ 500 มล. ใส่ในกรวยแยกขนาด 1000 มล.

3.2.2 เติม 25 มล. ของ buffer solution เขย่าให้เข้ากัน

3.2.3 เติม APDC solution 25 มล. แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3.2.4 เติม MIBK 50 มล. แล้วเขย่าอย่างแรงประมาณ 5 นาที

3.2.5 ปล่อยไว้จนสารละลายแยกชั้น แล้วจึงไขเอาส่วนชั้นของ MIBK

3.2.6 จากนั้นนำไปวัดหาปริมาณโลหะหนักด้วย AAS โดยคำนวณเทียบกับ calibration curve ของ standard solution ซึ่งเตรียมโดยวิธีเดียวกัน

4. วิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ ดีดีที และ พีซีบี จากตัวอย่างน้ำ

4.1 ตวงตัวอย่างน้ำ 850 มล. ใส่ในกรวยแยก ขนาด 1000 มล.

4.2 นำมาสกัดด้วย n – hexane จำนวน 100, 50, 50 และ 50 มล. ตามลำดับ โดยในการสกัดแต่ละครั้งให้เขย่าอย่างแรง ประมาณ 5 นาที

4.3 ผสมส่วนที่ได้จากการสกัดทั้ง 4 ส่วนเข้าด้วยกัน แล้วนำไปผ่าน anhydrous sodium sulfate (ประมาณ 40 กรัม)

4.4 นำสารละลายที่ได้มาลดปริมาตรลงจนเกือบแห้ง แล้วชะด้วย n – hexane และปรับปริมาตรให้เป็น 3 มล.

4.5 เก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วขนาดเล็ก ฝาปิดด้วย aluminum foil เพื่อป้องกันการระเหย และถ้ายังไม่ฉีดเข้าเครื่อง GC ให้แช่แข็งไว้ก่อน

5. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ดีดีที และ พีซีบี ในตัวอย่างหอย

5.1 ชั่งตัวอย่างหอย 10 กรัม บดกับ Na_2SO_4 20 กรัม และบรรจุใส่ใน Thimble

5.2 นำไปทำการสกัดด้วย n – hexane 250 มล. ใน soxhlet extracter เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

5.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2 มาระเหยจนเหลือปริมาตรประมาณ 5 มล. และนำไป clean – up

5.4 Clean – up โดยผ่าน column ขนาด 1" + 24" ซึ่งบรรจุด้วย florisil 40 กรัม และ Na_2SO_4 20 กรัม

โดยใช้ 5 % diethyl ether in n – hexane 150 มล.

และ 15 % diethyl ether in n – hexane 100 มล.

เป็น eluting solvent

5.5 นำสารละลายที่ได้ไประเหยจนเหลือปริมาตร 1 มล. จากนั้นนำไป clean – up อีกครั้ง เพื่อแยก พีซีบี และ ดีดีที (Nicholson และ Whitby, 1973)

5.6 โดยผ่าน column ขนาด 24 + 0.6 ซ.ม. ซึ่งบรรจุด้วย 1 % deactivated alumina 1.5 กรัม โดยล้างด้วย n - hexane และแบ่งเก็บเป็น 2 ส่วน (fraction)

ส่วนที่ 1 เก็บ 2 มล.แรกที่ผ่าน column (สำหรับ พีซีบี)

ส่วนที่ 2 เก็บ 10 มล. n - hexane ที่ผ่าน column (สำหรับ ดีดีที)

5.7 นำสารละลายที่ได้ในส่วนที่ 1 และ 2 ไประเหยจนเหลือปริมาตร 1 และ 2 มล. ตามลำดับ

5.8 นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

6. <u>การวิเคราะห์ตัวอย่างดินเพื่อหาปริมาณของ ดีดีที และ พีซีบี</u>

6.1 นำตัวอย่างดินซึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาบด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 mesh

6.2 ชั่งตัวอย่างดิน 100 กรัม บรรจุใน Thimble หรือถุงผ้า

6.3 นำไปสกัดใน soxhlet extractor ด้วย n - hexane 250 มล. เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

6.4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยจนเหลือปริมาตร 5 มล. จากนั้นนำไป clean - up ตามขั้นตอน 5.4 - 5.8 ต่อไป

<u>การทำ Recovery</u>

จุดประสงค์เพื่อแสดงให้เห็นว่า วิธีการที่ใช้ในการหาปริมาตรของสารนั้นให้ผลออกมามากน้อยเพียงใด

<u>วิธีการทำ Recovery ของตัวอย่าง</u>

1. นำตัวอย่างหอยนางรมมา 1 ตัวอย่าง และแบ่งออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน

2. นำส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก หรือ ดีดีที และพีซีบี ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว

3. นำตัวอย่างอีกส่วนหนึ่งมาเติม standard ของโลหะหนัก หรือ ดีดีที และ พีซีบี ที่ทราบปริมาณหรือความเข้มข้นแน่นอนลงไป นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารที่เติมลงไปตามวิธีการดังกล่าวมาแล้วเช่นกัน

4. นำค่าปริมาณที่ได้จากทั้งสองส่วนมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recovery ต่อไป

<u>การหาค่าความแม่นยำ</u> (Precision)

เพื่อหาความแม่นยำ ในการทดลองภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมือนกันทุกประการ

<u>วิธีการหาค่าความแม่นยำ</u>

1. นำตัวอย่างมา 1 ตัวอย่าง และแบ่งออกเป็น 4 ส่วนเท่า ๆ กัน

2. นำแต่ละส่วนไปวิเคราะห์หาปริมาณสารตามวิธีดังกล่าว

<u>การคำนวณผล</u>

1. <u>การคำนวณหาปริมาณของโลหะหนักเป็น ppm ในตัวอย่าง</u>

จาก standard solution นำมาทำเป็น Calibration curve แล้วนำค่า optical density (absorbance) ของตัวอย่างที่ได้จากการวัด มาหาปริมาณ โดยเทียบกับ Calibration curve ของ standard solution

สมมติว่าค่าของตัวอย่างจากกราฟของโลหะ A อ่านได้ X µg / ml

ดังนั้นตัวอย่าง 20 มล. มีโลหะ A อยู่ 20X µg

แต่ตัวอย่าง 20 มล. มาจาก dry weight 3 g

นั่นคือ ตัวอย่าง 3 กรัม มีโลหะ A อยู่ 20X µg

นั่นคือ ตัวอย่าง 1 กรัม มีโลหะ A อยู่ $\frac{20X}{3}$ µg

ดังนั้น ตัวอย่างนี้มีปริมาณของโลหะ A อยู่ $\frac{20X}{3}$ µg / g

2. การหาปริมาณของ ดีดีที และ พีซีบี เป็น ppm ในตัวอย่าง

โดยใช้วิธีเปรียบเทียบพื้นที่ peak ของสารตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์กับพื้นที่ peak ของ standard solution การหาพื้นที่ peak ทำโดยลากเส้น approximate base line แล้วลากเส้นสัมผัสด้านทั้งสองของ peak ให้มากที่สุด และลากตัดกับเส้นฐาน ซึ่งจะได้ความยาวของเส้นฐาน และจุดตัดที่ยอด peak ลากเส้นตั้งฉากกับเส้นฐาน ก็จะได้ความสูงของ peak และคำนวณหาพื้นที่ของ peak จากสูตร

พื้นที่ของ peak = $\frac{1}{2}$ x สูง x ฐาน

โดยการเทียบพื้นที่ peak มาเป็นปริมาณสาร คำนวณได้ดังนี้

สมมติพื้นที่ของ standard ดีดีที = A cm^2

พื้นที่ peak ดีดีที ของตัวอย่าง = B cm^2

ปริมาตรของตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป = C µl

ปริมาณของ standard ที่ฉีดเข้าไป = D ng

ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่าง (ที่ปรับได้) = E ml

พื้นที่ A cm^2 ของ standard มีเนื้อสาร = $\frac{D \times B}{A}$ ng

สารตัวอย่าง C µl มีเนื้อสาร = $\frac{D \times B}{A}$ ng

สารตัวอย่าง C ml มีเนื้อสาร = $\frac{D \times B}{A}$ µg

ดังนั้น ตัวอย่าง E ml มีเนื้อสาร = $\frac{D \times B}{A} \times \frac{E}{C}$ µg

ถ้าสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ = F g

ดังนั้น ตัวอย่าง F กรัม มีเนื้อสาร = $\frac{D \times B}{A} \times \frac{E}{C}$ µg

ตัวอย่าง 1 กรัม มีเนื้อสาร = $\frac{D \times B}{A} \times \frac{E}{C} \times \frac{1}{F}$ µg

นั่นคือ สารตัวอย่างนี้มีปริมาณ ดีดีที หรือ พีซีบี

= $\frac{D \times B}{A} \times \frac{E}{C} \times \frac{1}{F}$ µg/g