บทที่ 3

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอลในดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง มีขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย ดังต่อไปนี้

3.1 ขั้นตอนการวิจัย

3.1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณคลอแรมเฟนิคอล โดยใช้ HPLC

3.1.2 ศึกษาความสามารถในการตรวจวัดคลอแรมเฟนิคอลด้วย HPLC

3.1.3 วิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอลในดิน และศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ปนเปื้อนในดินตามระดับความลึกของดิน

3.1.4 เปรียบเทียบปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่ปนเปื้อนในดินตามสถานีต่างๆ

3.1.5 ศึกษาการสลายตัวของคลอแรมเฟนิคอลในดินที่สภาวะต่างๆ และการชะละลายจากดินที่มีการปนเปื้อนคลอแรมเฟนิคอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่

- Chloramphenicol purity 99%
- Methanol (HPLC grade)
- Acetonitrile (HPLC grade)
- Ethyl acetate (AR grade)
- n-Hexane (AR grade)

- Acetic acid (AR grade)
- Sodium acetate (AR grade)
- Dipotassium hydrogen phosphate (AR grade)
- Disodium hydrogen phosphate (AR grade)
- Sodium hydrogen phosphate (AR grade)
- Sodium chloride (AR grade)
- Nitrogen gas

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย

3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างดิน

- เครื่องมือเก็บตัวอย่างดินตามระดับความลึก (Core sampler) ทำจากพีวีซี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ½ นิ้ว และมีความยาว 30 เซนติเมตร
- เครื่องมือตัด Section ดินที่เก็บได้
- ถุงพลาสติก (Zip bag)

3.3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัยที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.3.2.1 อุปกรณ์

- หลอดเหวี่ยง (Centrifuge tube) ชนิด Polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร
- กระจกนาฬิกา (Watch glass dish)
- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 250 มิลลิลิตร
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10, 50, 100 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
- กระดาษกรอง (Filter paper) Whatman เบอร์ 42/125 มิลลิเมตร
- กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100, 250 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- กรวยกรอง (Funnel filter)
- ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5, 10, 25 มิลลิลิตร
- พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร
- Iso-Disc™ Filters PTFE –13-4
- โกร่งบดดิน

3.3.2.2 เครื่องมือวิจัย

- เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น IEC : SER 42900961
- เครื่อง Vortex รุ่น Vortex-2 Genie
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด ของ Mattler : Pj3600
- เครื่อง HPLC ชนิด UV detector ของ Waters 486 MS พร้อมด้วย คอลัมน์ Hypersil BDS C18 ของ Thermo Hypersil-Keystone
- เครื่อง Freeze dryer ของ LABCONCO : Model 77520
- เตาอบ (Oven) ของ Memmert 854 Schwabach
- pH meter ของ ORION : 920A
- เครื่อง UV-visible spectrophotometer ของ JANKE&KUNKEL : HS-500
- เครื่องเขย่า (Shaker) ของ GFL® 3015

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยนี้ มีขั้นตอนดังนี้

3.4.1 การเตรียมการทดลอง

3.4.1.1 การเตรียมสารละลาย

3.4.1.1.1 1 M Acetic acid solution

ปิเปต 6 M Acetic acid 16.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.2 0.01 M Acetic acid solution

ปิเปต 1 M Acetic acid solution 1 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.3 1 M Sodium acetate solution

ชั่ง Sodium acetate 8.2035 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.4 0.01 M Sodium acetate solution

ปิเปต 1 M Sodium acetate solution 1 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.1.5 1 M Sodium acetate buffer solution

ผสม 1 M Acetic acid solution กับ 1 M Sodium acetate solution ในอัตราส่วน 1 : 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.1.1.6 0.01 M Sodium acetate buffer solution

ผสม 0.01 M Acetic acid solution กับ 0.01 M Sodium acetate solution ในอัตราส่วน 1 : 1

3.4.1.1.7 K_2HPO_4 solution (100 mg/L)

ชั่ง K_2HPO_4 100 มิลลิกรัม นำมาละลายน้ำ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

3.4.1.1.8 0.01 M Acetonitrile

ปิเปต Acetonitrile 0.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นทำให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

3.4.1.1.9 Phosphate buffer solution (pH 7.2)

ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.55 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.85 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัม ละลายน้ำ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาปรับพีเอชให้ได้ พีเอช 7.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดฟอสฟอริก

3.4.1.1.10 น้ำกลั่น สำหรับ HPLC

นำน้ำดีไอออไนซ์มากรองผ่านมิลลิพอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และไล่อากาศออกภายใต้ระบบสุญญากาศนาน 15 นาทีก่อนใช้

3.4.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล (Standard solution)

3.4.1.2.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm

ชั่งสารคลอแรมเฟนิคอลมาตรฐาน 100 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 100 ppm

ปิเปตสารละลายสต็อกคลอแรมเฟนิคอล 1,000 ppm 10 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.1.2.2 Working standard solution ความเข้มข้น 10, 5, 3, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002 และ 0.001 ppm เตรียมได้ดังต่อไปนี้

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 10 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 100 ppm 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 10 ppm 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 3 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 10 ppm 3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 5 ppm 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 5 ppm 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.2 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 1 ppm 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.1
ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิค
เติมน้ำกลั่นให้ได้ 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0.
ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิค
เติมน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล 0
ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิ
เติมน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล (
ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิค
เติมน้ำกลั่นให้ได้ 25 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล
ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิ
เติมน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

ส่วน 60 : 37 :

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล
ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟ
เติมน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

ส่วน 30:69:1

- สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอ
ปิเปตสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟ
เติมน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.4.1.3 การเตรียมโมบายล์เฟส

โมบายล์เฟสที่ใช้ศึกษามีทั้งหมด 12 ชนิ

1. Methanol : H_2O (70:30) (Kutter et
นำ Methanol มาผสมกับ น้ำกลั่น ใ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. Methanol : H_2O (60:40)

นำ Methanol มาผสมกับ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 60 : 40

3. Methanol : H_2O (50:50)

นำ Methanol มาผสมกับ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 50 : 50

4. Methanol : H_2O (40:60)

นำ Methanol มาผสมกับ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 40 : 60

5. Methanol : H_2O (30:70) (Wal et al., 1980)

นำ Methanol มาผสมกับ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 30 : 70

6. Methanol : H_2O : Acetic acid (62:37:1) (Willis , 1999)

นำ Methanol มาผสมกับ น้ำกลั่น และ Acetic acid 1 M ในอัตราส่วน 60 : 37 : 1

7. Methanol : H_2O : Acetic acid (30:69:1)

นำ Methanol มาผสมกับ น้ำกลั่น และ Acetic acid 1 M ในอัตราส่วน 30:69:1

8. 30 % Methanol + 100 mg K_2HPO_4/L (Johannes et al., 1983)

นำ Methanol มาผสมกับสารละลาย K_2HPO_4 ในอัตราส่วน 30 : 70

9. Acetonitrile : H_2O (30:70) (Caniou , 1995)

นำ Acetonitrile มาผสมกับ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 30 : 70

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. Acetonitrile: H_2O: 1 M Acetate buffer (20:80:1) (Becheiraz, et al., 1983)

นำ Acetonitrile มาผสมกับ น้ำกลั่น และ 1 M Acetate buffer ในอัตราส่วน 20 : 80 : 1

11. 0.01 M Acetonitrile : 0.01 M Sodium acetate solution (2.5:7.5) (Petz, 1983)

นำ 0.01 M Acetonitrile มาผสมกับ 0.01 M Sodium acetate solution ในอัตราส่วน 2.5 : 7.5

12. Acetonitrile : 0.01 M Sodium acetate buffer (25:75) (Vander Stroom-Kruyswijk et al., 1983; Aerts, 1989)

นำ Acetonitrile มาผสมกับ 0.01 M Sodium acetate buffer ในอัตราส่วน 25 : 75

3.4.2 **ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลโดยใช้** HPLC

3.4.2.1 ศึกษาหาการดูดกลืนแสงของคลอแรมเฟนิคอลที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร

เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่คลอแรมเฟนิคอลสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด (λ_{max}) โดยศึกษาที่ช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยใช้คลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้น 10 ppm และใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

3.4.2.2 ศึกษาสภาวะของโมบายล์เฟสที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่าง Retention time ของโมบายล์เฟส กับ Retention time ของคลอแรมเฟนิคอล โดยใช้โมบายล์เฟสชนิดต่างๆ กัน และเปรียบเทียบค่า Peak height ของโมบายล์เฟสแต่ละชนิด

ศึกษาโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ที่ความเข้มข้น 0.1 ppm นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะในการศึกษาดังนี้

1. เครื่องมือ : HPLC ชนิด UV detector ที่ 278 นาโนเมตร
   - คอลัมน์ : ชนิดเหล็กกล้าปลอดสนิม ขนาด 125×4 มิลลิเมตร บรรจุด้วย C18 Nucleosil ขนาด 5 ไมโครเมตร
   - อัตราเร็วการไหลของโมบายล์เฟส : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
   - ความดัน : 2,500-2,600 psi
   - ปริมาตรสารที่ฉีด : 20 ไมโครลิตร

2. โมบายล์เฟส :
   - Methanol : H_2O (30:70)
   - Methanol : H_2O : Acetic acid (62:37:1)
   - Methanol : H_2O : Acetic acid (30:69:1)
   - 30 % Methanol + 100 mg K_2HPO_4/L
   - Acetonitrile : H_2O (30:70)
   - Acetonitrile : H_2O : Acetate buffer (20:80:1)
   - Acetonitrile : 0.01 M aq. Sodium acetate (2.5:7.5)
   - Acetonitrile : 0.01 M Sodium acetate buffer(25:75)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลเข้าเครื่อง HPLC แล้วจะได้ค่า Retention time ของโมบายล์เฟส กับ Retention time ของคลอแรมเฟนิคอลนำมาเปรียบเทียบกัน เมื่อได้โมบายล์เฟสที่มี Retention time ห่างกันพอสมควรเพื่อไม่ให้เกิดการซ้อนกันของ

Peak แล้วนำค่า Peak height ของโมบายล์เฟสแต่ละชนิดที่ตรวจวัดได้ด้วย HPLC มาเปรียบเทียบเพื่อเลือกโมบายล์เฟสที่มีค่า Peak height สูงที่สุด

เนื่องจากตัวอย่างด้านสิ่งแวดล้อมอาจจะ Interference มาจากสิ่งเจือปนอื่นๆ ในธรรมชาติ และอาจปนเปื้อนอยู่ในสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้นการใช้คอลัมน์ที่มีความยาวมากขึ้นจะเพิ่มประสิทธิภาพของการแยกสารประกอบได้ดีขึ้น ดังนั้นจึงมีการศึกษาโดยใช้คอลัมน์ Hypersil BDS C18 โดยใช้สภาวะในการศึกษาเหมือนกับคอลัมน์ Nucleosil C18 และใช้โมบายล์เฟสดังนี้ คือ

1. Methanol : H_2O (70:30)
2. Methanol : H_2O (60:40)
3. Methanol : H_2O (50:50)
4. Methanol : H_2O (40:60)
5. Methanol : H_2O (30:70)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลเข้าไปในเครื่อง HPLC จะได้ค่า Retention time ของโมบายล์เฟส กับ Retention time ของคลอแรมเฟนิคอลมาเปรียบเทียบกัน เมื่อได้โมบายล์เฟสที่มี Retention time ห่างกันพอสมควรเพื่อไม่ให้เกิดการซ้อนกันของ Peak แล้วนำค่า Peak height ของโมบายล์เฟสแต่ละชนิดที่ตรวจวัดได้ด้วย HPLC มาเปรียบเทียบเพื่อเลือกโมบายล์เฟสที่มีค่า Peak height สูงที่สุด เป็นโมบายล์เฟสที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3.4.3 การศึกษาความสามารถในการตรวจวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลโดยใช้ HPLC

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.3.1 การศึกษาช่วงการตรวจวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่เหมาะสม (Calibration range)

เพื่อหาช่วงของความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดคลอแรมเฟนิคอลได้ โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1,

0.2, 0.5, 1, 3, 5, 10 ppm (เตรียมตาม 3.4.1.2) นำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC ชนิด UV detector ที่ 278 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ Hypersil BDS C18 , โมบายล์เฟส Methanol : H_2O (50:50) , อัตราการไหล 1 mL/min และปริมาตรที่ฉีดเข้า HPLC เท่ากับ 20 ไมโครลิตร แล้วนำผลวิเคราะห์ที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง Peak area กับ ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล และหาค่า Linear regression

3.4.3.2 การหา Limit of detection (LOD)

เพื่อศึกษาความสามารถของเครื่องมือที่จะตรวจวัดสัญญาณที่ Retention time เดียวกับคลอแรมเฟนิคอล ทำได้โดยการใช้โมบายล์เฟสแทนสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล และฉีดโมบายล์เฟสเข้า HPLC โดยใช้สภาวะการศึกษาตาม 3.4.3.1 ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง และวัด Peak area ในช่วง Retention time ของคลอแรมเฟนิคอล มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นนำค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมาคูณ 3 แล้วบวกค่าเฉลี่ย และนำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล จะได้ค่า Limit of detection (จิตรา, 2545)

3.4.3.3 การหา Limit of quantitation (LOQ)

เพื่อศึกษาวิธีการตรวจวัดปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่ต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วย HPLC ทำได้โดยการใช้โมบายล์เฟสแทนสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล และฉีดโมบายล์เฟสเข้า HPLC โดยใช้สภาวะการศึกษาตาม 3.4.3.1 ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง และวัด Peak area ในช่วง Retention time ของคลอแรมเฟนิคอล มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นนำค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมาคูณ 10 แล้วบวกค่าเฉลี่ย และนำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล จะได้ค่า Limit of quantitation และทำการยืนยันด้วยสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้นเดียวกับที่คำนวณได้ (จิตรา, 2545)

3.4.3.4 การหาค่าความแม่นยำ (Precision) ในรูปของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)

เพื่อหาความแม่นยำของการสกัดคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างดิน ทำได้โดยนำตัวอย่างดินที่มีคลอแรมเฟนิคอลมาทำการวิเคราะห์ ซ้ำ 5 ครั้งภายใต้สภาวะการศึกษาตามข้อ 3.4.3.1 และดูค่าความแม่นยำโดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD)

3.4.3.5 การหา % Recovery ของการวิเคราะห์

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ใช้สกัดคลอแรมเฟนิคอลในดิน ทำได้โดย

1. นำตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนคลอแรมเฟนิคอลน้อยที่สุด ในที่นี้ใช้ดินจากบ่อน้ำในหอพักหญิง จุฬาฯ มา 1 ตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน และแบ่งออกเป็น 2 ส่วน
2. นำตัวอย่างส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่มีอยู่ในตัวอย่างดินตามวิธีดังกล่าวมาแล้ว
3. นำตัวอย่างอีกส่วนหนึ่งมาเติมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้น 0.01 ppm 1 มิลลิลิตร คิดเป็นคลอแรมเฟนิคอล 10 นาโนกรัมต่อดิน 3 กรัม แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลด้วย HPLC ภายใต้สภาวะการศึกษาตามข้อ 3.4.3.1
4. นำค่าที่ได้จากตัวอย่างทั้งสองส่วนมาคำนวนหาค่า % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

เมื่อ A = ปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่วิเคราะห์ได้ (ng/g)

B = ปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่มีอยู่ในตัวอย่างดินก่อนสกัด (ng/g)

C = ปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่เติม (ng/g)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.4 ศึกษาการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอลในดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

3.4.4.1 การกำหนดสถานีเก็บตัวอย่างดิน

กำหนดสถานีเก็บตัวอย่างดินทั้งสิ้น 8 สถานี

สถานี A สถานีควบคุม เก็บจากบริเวณบ้านพักอาศัย ดังรูปที่ 3.1 เก็บได้ 2 จุด

สถานี B สถานีควบคุม เก็บจากบริเวณบ้านพักอาศัย เก็บได้ 1 จุด

สถานี C สถานีควบคุม เก็บจากคลองสาธารณะ เก็บได้ 1 จุด

สถานี D บ่อน้ำทิ้งจากบ่ออนุบาลลูกกุ้ง ดังรูปที่ 3.2 เก็บได้ 2 จุด

สถานี E บ่อน้ำทิ้งจากบ่ออนุบาลลูกกุ้ง เก็บได้ 1 จุด

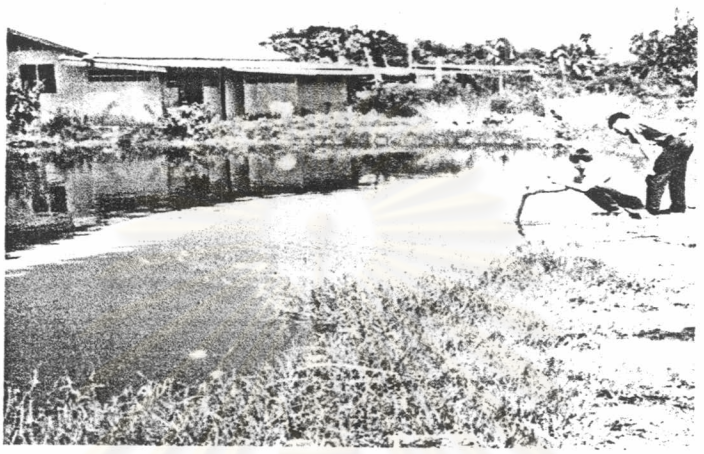
สถานี F บ่อเลี้ยงกุ้ง หลังจากตากแห้ง 10 วัน ดังรูปที่ 3.3 เก็บได้ 6 จุด

สถานี G บ่อเลี้ยงกุ้ง เตรียมเลี้ยงกุ้งรุ่นต่อไป ดังรูปที่ 3.4 เก็บได้ 6 จุด

สถานี H บ่อเลี้ยงกุ้ง กำลังเลี้ยง ดังรูปที่ 3.5 เก็บได้ 5 จุด

โดยสถานี D-E จะเก็บตัวอย่างดินก้นบ่อที่บริเวณริมบ่อ และสถานี F-H จะเก็บตัวอย่างดินก้นบ่อบริเวณริมบ่อ และกลางบ่อ ความลึก 30 เซนติเมตร โดยตัวอย่างดินที่เก็บมีอายุการใช้งานในการเลี้ยงกุ้งตั้งแต่ 5 ปีขึ้นไป

รูปที่ 3.1 สถานี A ดินควบคุมจากบ้านพักอาศัย



รูปที่ 3.2 สถานี D บ่อน้ำทิ้งจากบ่ออนุบาลลูกกุ้ง

รูปที่ 3.3 สถานี F บ่อเลี้ยงกุ้งหลังจากตากแดด 10 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.4 สถานี G บ่อเลี้ยงกุ้งเตรียมเลี้ยงกุ้งรุ่นต่อไป

3.4.4.2 การเก็บตัวอย่างดินในภาคสนาม

การเก็บตัวอย่างดิน ใช้เครื่องมือช่วยในการเก็บ ได้แก่เครื่องมือเก็บตัวอย่างดินตามระดับความลึก (Core sampler) เก็บดินตามสถานีเก็บตัวอย่างที่กำหนดไว้ข้างต้น โดยเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึกจาก 0-30 เซนติเมตรจากก้นบ่อ

การเก็บรักษาตัวอย่างดินหลังจากเก็บดินจากสถานีต่างๆ แล้ว โดยใส่ถุงพลาสติกสะอาดที่ปิดแน่นสนิท และให้แช่เย็นเก็บไว้ แล้วนำมาวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ หากยังไม่วิเคราะห์ทันทีให้เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (Deep freezer) ที่อุณหภูมิ –20 °ซ จนกระทั่งเริ่มทำการวิเคราะห์

3.4.4.3 การเตรียมตัวอย่างดิน

1. นำตัวอย่างดินที่แช่แข็งไว้ในท่อพีวีซีออกจากตู้แช่แข็ง ทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

2. เตรียมตัวอย่างดินโดยตัดดินเป็นส่วน ตามระดับความลึก ดังนี้

- ช่วงที่ 1 ที่ระดับความลึก 0-10 เซนติเมตรจากผิวดินตะกอน แบ่งเป็นชั้นละ 2 เซนติเมตร ได้ 5 ชั้น คือ 0-2, 2-4, 4-6, 6-8 และ 8-10 เซนติเมตร

- ช่วงที่ 2 ที่ระดับความลึก 10-20 เซนติเมตร แบ่งเป็นชั้นละ 5 เซนติเมตร ได้ 2 ชั้น คือ 10-15 และ 15-20 เซนติเมตร

- ช่วงที่ 3 ที่ระดับความลึก 20-30 เซนติเมตร แบ่งวิเคราะห์ชั้นละ 10 เซนติเมตร ได้ 1 ชั้น คือ 20-30 เซนติเมตร

โดยดินแต่ละระดับความลึก ให้เก็บในถุงพลาสติกสะอาดที่ปิดแน่นสนิทและระบุตัวอย่างดินให้ชัดเจน

3. นำตัวอย่างดินที่แบ่งเป็นชั้น มาทำการสกัดต่อไป

3.4.4.4 การทำ Standard calibration curve ของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลที่เตรียมได้

โดยใช้สารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ซึ่งมีความเข้มข้นเป็น 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำมาวัดค่า Peak area ด้วย HPLC แล้วนำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟระหว่าง ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล กับ Peak area และคำนวณหาค่า Linear regression ของ Calibration curve ที่ได้ ค่า Linear regression ของสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอลที่ได้ มีค่าสูงกว่า 0.995 ขึ้นไป เพื่อนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างดินต่อไป

3.4.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ปนเปื้อนในดิน

3.4.4.5.1 การสกัดตัวอย่างดิน (ดัดแปลงจากวิธีของ EURO-DIAGNOSTICA; Sander, 1991 และ Chang et al., 2000)

1. ผสมตัวอย่างดินให้เข้ากันอย่างดี เลือกเอาก้อนหิน เศษตะกอนขนาดใหญ่ออก แล้วจึงชั่งตัวอย่างดินประมาณ 3 กรัมใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมเอธิลอะซีเตต 6 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง ปิดฝาจุกนำไป Vortex เป็นเวลา 5 นาที

3. นำหลอดทดลองเข้าเครื่องเหวี่ยง เป็นเวลา 15 นาทีในอัตรา 2000 รอบต่อนาที

4. เทเอธิลอะซีเตตจากในหลอดทดลองใส่ลงในหลอดทดลองอีกอัน และนำไประเหยด้วยกระแสไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง

5. สกัดดินซ้ำ อีก 2 ครั้ง โดยใช้เอธิลอะซีเตตครั้งละ 4 มิลลิลิตร แล้วนำมาเทใส่หลอดในข้อ 4 และนำไประเหยจนแห้ง

6. เติม n-เฮกเซน 1 มิลลิลิตร และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดในข้อ 5

7. นำสารละลายในข้อ 6 ไป Vortex เป็นเวลา 1 นาที

8. ปิเปตสารละลายชั้นล่าง (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) 1 มิลลิลิตรใส่ใน Microtube เพื่อนำไปวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลด้วยเครื่อง HPLC

3.4.4.5.2 การวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ปนเปื้อนในดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งด้วย HPLC

การวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอล กระทำได้โดยนำสารละลายชั้นล่างที่ได้จากการสกัด (ชั้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์) มาทำการวิเคราะห์โดยฉีดตัวอย่างเข้าไปในเครื่อง HPLC แล้วนำผลที่ได้มาเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้สภาวะดังที่กล่าวมาแล้วใน 3.4.2.2 โดยใช้ Methanol : H_2O (50:50) เป็นโมบายล์เฟส

3.4.4.5.3 การคำนวณ

คำนวณความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลจากตัวอย่าง โดย

$$\text{ปริมาณความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลในดิน } (\mu g/g) = \frac{A \times B}{C}$$

เมื่อ A = ปริมาณความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่คำนวณจาก Calibration curve ($\mu g/mL$)

B = ปริมาตรของสารละลายที่ได้จากการสกัดดิน เท่ากับ 1 มิลลิลิตร

C = น้ำหนักของตัวอย่างดินก่อนนำไปสกัด (กรัม)

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอลในดินตามระดับความลึกตามสถานีต่างๆ แล้วนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในดินกับระดับความลึกของดินในแต่ละสถานี โดยศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกับปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในดินตามระดับความลึกของดินมากที่สุด

3.4.5 **เปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอลในดินตามสถานีต่างๆ**

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่ปนเปื้อนในดินตามสถานีต่างๆ แล้วจะทำการเปรียบเทียบปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลในดินในแต่ละสถานีตามระดับความลึกของดิน และเปรียบเทียบปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในดินทั้งหมด 8 สถานี โดยนำผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในดินที่ระดับความลึก 0-2 เซนติเมตรจากผิวดินมาเปรียบเทียบกัน

3.4.6 ศึกษาการสลายตัวของคลอแรมเฟนิคอลในดินที่สภาวะต่างๆ และการชะละลายจากดินที่ปนเปื้อนคลอแรมเฟนิคอล

3.4.6.1 การสลายตัว

เพื่อศึกษาการสลายตัวของคลอแรมเฟนิคอลที่อยู่ในดินที่สภาวะต่างๆ ทำได้โดย

1. นำตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของคลอแรมเฟนิคอลน้อยที่สุด ในที่นี้ใช้ตัวอย่างดินจากบ่อน้ำบริเวณหอพักหญิง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มา 1,200 กรัม (น้ำหนักเปียก) ใส่ในถาด เลือกเศษหิน กรวด ตะกอนขนาดใหญ่ออก

2. เติมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 0.2 ppm 150 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน 1,200 กรัม คิดเป็นปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในดิน 35.3 นาโนกรัมต่อกรัม (คำนวณจากน้ำหนักดินแห้ง) ผสมดินให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3. แบ่งตัวอย่างดินเป็น 4 ส่วน เพื่อศึกษาการสลายตัวในสภาวะต่างๆ กัน คือ

- ส่วนที่ 1 เป็นตัวอย่างดินควบคุม โดยนำดินไปทำให้แห้งด้วยวิธี Freeze dry และเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ

- ส่วนที่ 2 ศึกษาการสลายตัวเมื่อเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ โดยนำตัวอย่างดินไปทำให้แห้งด้วยวิธี Freeze dry แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20^{o}ซ เป็นเวลา 5,10,15, 30 และ 60 วัน

- ส่วนที่ 3 ศึกษาการสลายตัวโดยการอบจนแห้ง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 5 ส่วน นำไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 105 ^{o}ซ เป็นเวลา 1,3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

- ส่วนที่ 4 ศึกษาการสลายตัวโดยการตากแดดจนแห้ง โดยนำตัวอย่างดินไปตากแดดให้แห้งเป็นเวลา 5, 6, 7, 10, 12, 15, 20 และ 30 วัน

4. นำตัวอย่างดินจากข้อ 3 ที่ทำให้แห้งแล้วมาบดให้ละเอียด และนำไปวิเคราะห์ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลโดยใช้ HPLC ภายใต้สภาวะการศึกษาตามข้อ 3.4.3.1 และคำนวณ % การสลายตัว โดยเทียบกับตัวอย่างดินควบคุม

$$\% \text{ การสลายตัว} = 100 - [(A / B) \times 100]$$

เมื่อ A = ปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่เหลืออยู่ (ng/g)

B = ปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่มีในตัวอย่างดินควบคุม (ng/g)

3.4.6.2 การชะละลาย (Leaching)

เพื่อศึกษาว่าปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลจากดินมีความสามารถในการกลับเข้าสู่แหล่งน้ำ ทำได้โดย

1. นำตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนคลอแรมเฟนิคอลน้อยที่สุด ในที่นี้ใช้ดินจากบ่อน้ำในหอพักหญิง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มา 1 ตัวอย่าง นำมา freeze dryให้แห้ง

2. ชั่งตัวอย่างดินมา 3 กรัม นำมาเติมสารละลายมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ที่ความเข้มข้น 0.1 ppm 1 มิลลิลิตร คิดเป็นคลอแรมเฟนิคอล 100 นาโนกรัมต่อดิน 3 กรัม แล้วนำไปใส่น้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร

3. นำมาวัดพีเอช และปรับพีเอชด้วยกรดฟอสฟอริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้ค่าพีเอช 5, 7, 9, 11 ตามลำดับแล้วรอจนค่า pH คงที่

4. เขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องเขย่าชนิด 100 รอบต่อนาทีที่ช่วงกว้างของการเขย่า 5 เซนติเมตร

5. กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง

6. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลโดยใช้ HPLC ภายใต้สภาวะการศึกษาตามข้อ 3.4.3.1

7. นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหา %การชะละลาย

$$\% \text{ การชะละลาย} = \frac{A}{B} \times 100$$

เมื่อ A = ปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่วัดได้ (ppb)

B = ปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลในดินควบคุม (ppb)