หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

- กระบอกเก็บตัวอย่างน้ำแบบแวนดอน (Van Dorn)
- เครื่องตักดินแบบ Smith-McIntyre
- ถุงลากแพลงก์ตอนพืช ขนาดตา 70 ไมครอน
- ถุงลากแพลงก์ตอนสัตว์ ขนาดตา 300 ไมครอน
- เครื่องมืออวนลากหน้าดินแบบแผ่นตะเฆ่ ขนาดตา 4 ซม.
- ขวดเก็บน้ำ polyethylene ขนาด 1 ลิตร
- กระดาษกรอง Millipore 0.45 ไมครอน
- ถุงพลาสติก

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

2.1 อุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่าง

- เครื่องเขย่าสำหรับกรวยแยก
- เครื่องวัดค่า pH
- ตะแกรงร่อนดินแบบ polyethylene ขนาดตา 72 ไมครอน
- ตู้อบ
- ครกโมทาร์
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด
- เครื่องบดตัวอย่างสัตว์
- มีด stainless, ปากคีบเทฟล่อน, ไม้บรรทัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 <u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง</u>

- volummetric flask ขนาด 25 และ 200 มล.
- บีกเกอร์เทฟล่อน ขนาด 100 และ 250 มล.
- กรวยแยกเทฟล่อน ขนาด 500 มล.
- ขวดพลาสติก (polyethylene) ขนาด 60 มล.
- micro pipette ขนาด 100, 1000 และ 5000ไมโครลิตร
- magnetic stirrer
- กรวยกรอง, กระดาษกรอง Whatman No.41
- Hot plate
- เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AA)

3. <u>สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาโลหะ</u>

- Methyl Isobutyl Ketone (MIBK)
- Ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDC)
- กรด HNO_3 (conc) AR.(ที่กลั่นแล้ว)
- กรด HCL (conc) AR.
- Ammonium hydroxide (NH_4OH) AR.
- สารละลายมาตรฐาน BDH ของโลหะ Pb, Cu และ Zn
- น้ำกลั่นดีไอออนไนซ์

<u>วิธีดำเนินการ</u>

1. <u>สถานที่ทำการศึกษาและระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง</u>

ตัวอย่างน้ำและตะกอนที่นำมาวิเคราะห์ . เก็บจากบริเวณชายฝั่งทะเลตะวัน-ออกของอ่าวไทย ตั้งแต่จังหวัดระยองถึงจังหวัดตราด ระหว่างเส้นลองติจูดที่ 101°-102° 50' ตะวันออก และจากชายฝั่งถึงเส้นแลตติจูดที่ 11° 30' เหนือ โดยแบ่งสถานีเก็บตัวอย่างเป็น 13 สถานี ดังรูปที่ 1

ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ และสัตว์ทะเล เก็บจากบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก ตั้งแต่จังหวัดระยองถึงจังหวัดตราด โดยแบ่งสถานีเก็บตัวอย่างออกเป็น 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บริเวณ ดังรูปที่ 2 คือ เขต 1 (เขตจังหวัดตราด) และเขต 2 (เขตจังหวัดระยองและจันทบุรี) ตัวอย่างที่เก็บได้แต่ละสถานีจะนำมารวมกันในแต่ละเขต

ระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง

ระยะที่ 1 เดือนเมษายน 2530 (ช่วงปลายฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ)

ระยะที่ 2 เดือนพฤศจิกายน 2530 (ช่วงปลายฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้)

2. การเก็บตัวอย่าง

1. ตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำเก็บที่ระดับต่ำกว่าผิวน้ำ 1 เมตร โดยใช้กระบอกเก็บตัวอย่างน้ำแบบ แวนดอน นำมากรองด้วยกระดาษ Millipore 0.45 ไมครอน เทใส่ในขวด polyethylene ขนาด 1 ลิตร เติมกรดไนตริกเข้มข้นที่กลั่นแล้ว 2 ml ทันที แล้วนำมาแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 เซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

2. ตัวอย่างตะกอน

ตัวอย่างตะกอนเก็บที่ระดับ 0.5 ซม.โดยใช้เครื่องตักดินแบบ Smith-McIntyre นำใส่ถุงพลาสติกผูกให้แน่น แล้วนำไปแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 เซลเซียส

3. ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์

เก็บโดยใช้ถุงลากแพลงก์ตอนลากตามแนวนอนสถานีละ 10 - 15 นาที ตัวอย่างที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด นำใส่ขวดพลาสติกแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ - 20 เซลเซียส

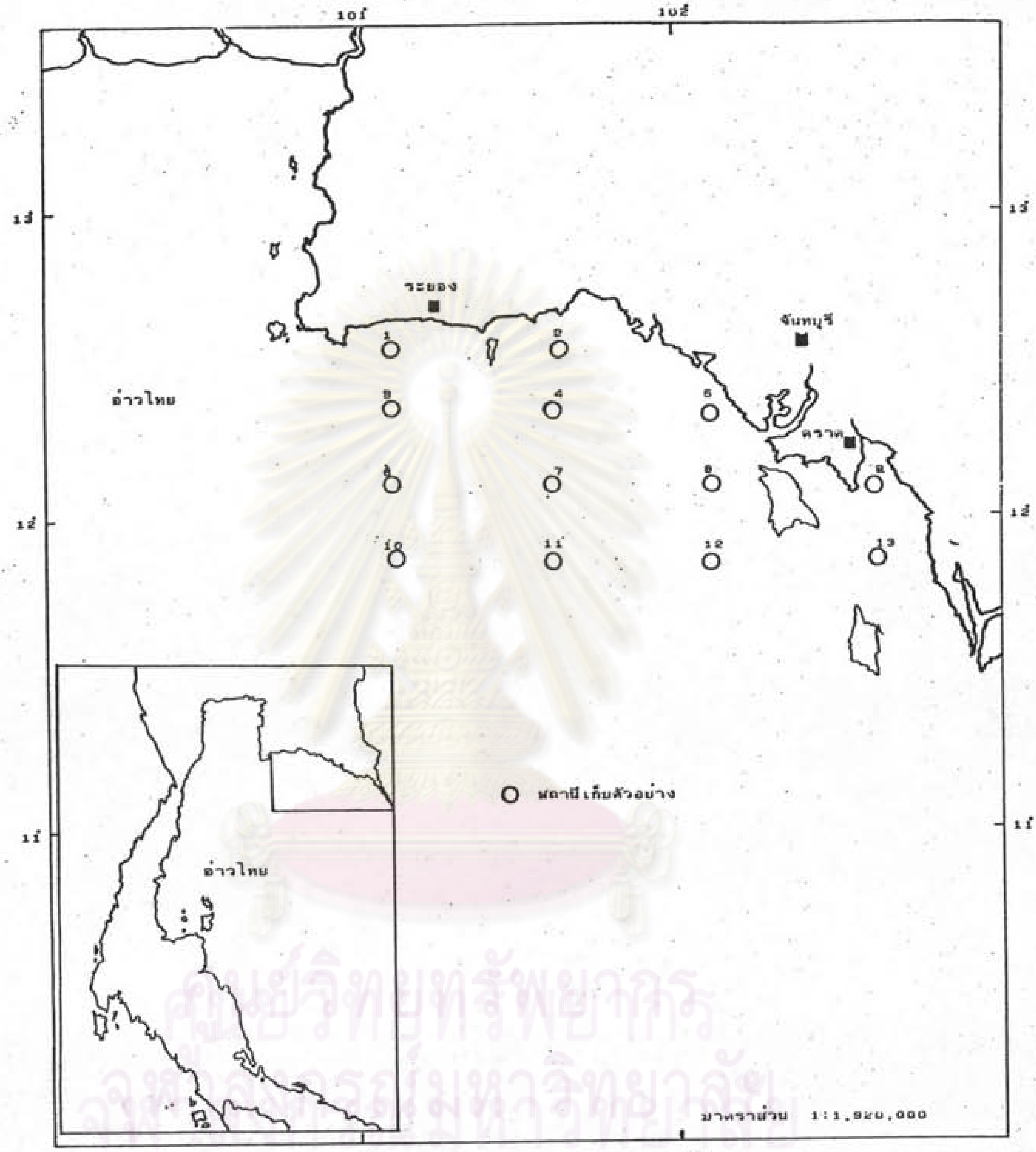
4. ตัวอย่างสัตว์ทะเล

เก็บโดยใช้อวนลากแผ่นตะเฆ่ ตัวอย่างที่ได้นำมาแยกชนิด ชั่งน้ำหนัก วัดความยาว แล่เนื้อ ล้างด้วยน้ำกลั่น นำใส่ถุงพลาสติกผูกให้แน่นแล้วนำไปแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ - 20 เซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานของโลหะตะกั่ว ทองแดง และสังกะสี

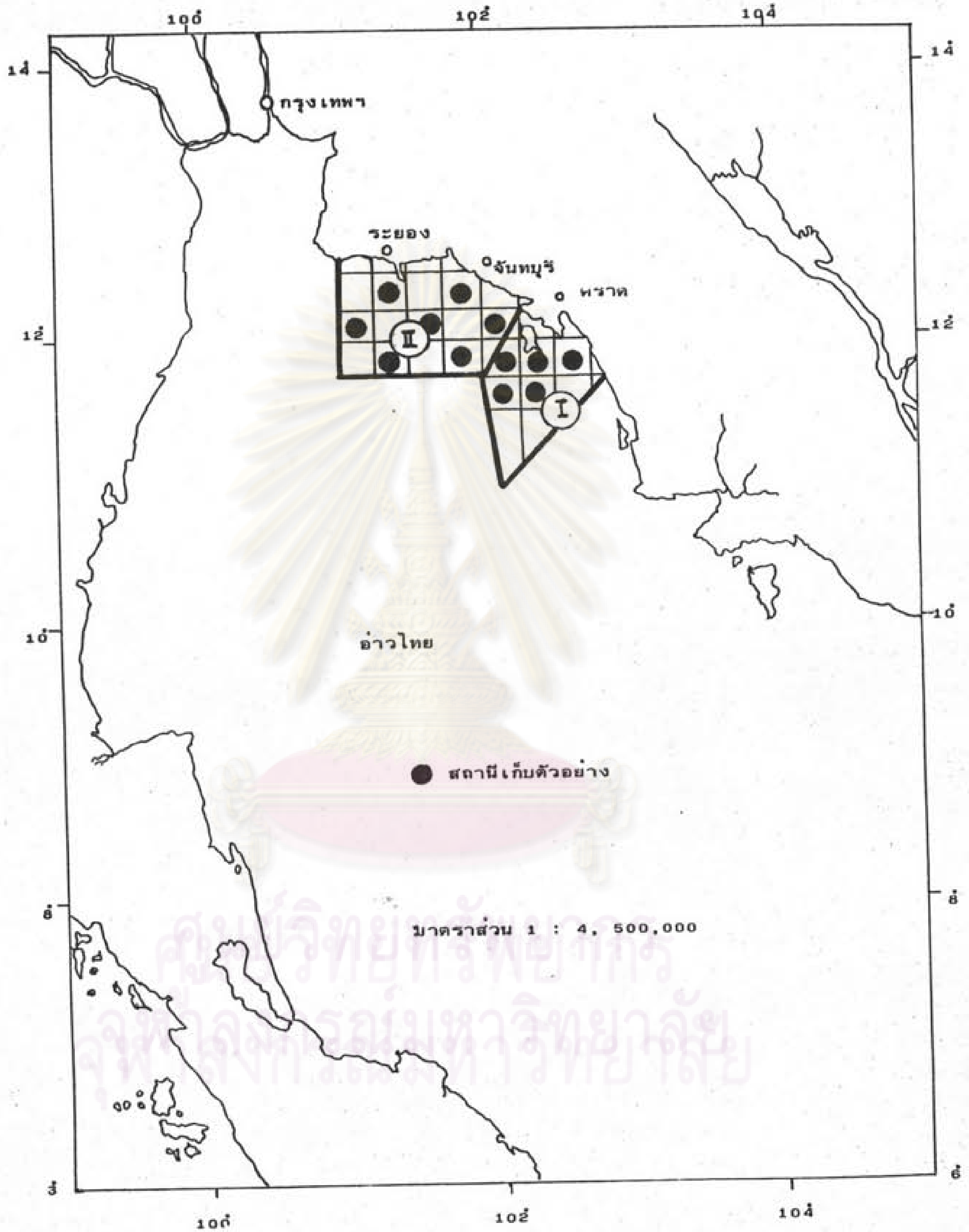
นำ BDH standard solution ของโลหะแต่ละชนิดซึ่งมีความเข้มข้น 1000 ppm มาทำให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดงสถานีเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอน บริเวณชายฝั่งทะเล
จังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แสดงอาณาเขตและสถานีเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ และสัตว์ทะเล บริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด

<u>โลหะตะกั่ว</u>

จากสารละลายมาตรฐานของโลหะตะกั่ว ทำให้มีความเข้มข้นเป็น 10 ppm ด้วยน้ำกลั่นดีไอออนไนซ์แล้วนำมา dilute ให้มีความเข้มข้นเป็น 5, 10, 15 และ 20 ppb ตามลำดับ

<u>โลหะทองแดง</u>

จากสารละลายมาตรฐานของทองแดงทำให้มีความเข้มข้น 10 ppm ด้วยน้ำกลั่นดีไอออนไนซ์ แล้วนำมา dilute ให้มีความเข้มข้นเป็น 5, 10, 20 และ 30 ppb ตามลำดับ

<u>โลหะสังกะสี</u>

จากสารละลายมาตรฐานของโลหะสังกะสี ทำให้มีความเข้มข้น 10 ppm ด้วยน้ำกลั่นดีไอออนไนซ์ แล้วนำมา dilute ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 200, 500, 1000 ppb ตามลำดับ

4. <u>การเตรียมสารละลาย APDC 1 %</u>

ชั่งสาร APDC จำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นดีไอออนไนซ์ แล้วทำปริมาตรให้เป็น 100 มล. นำไปใส่กรวยแยกเติมสารละลาย MIBK ที่กลั่นแล้วลงไป 10 มล. เขย่า 5 นาที แล้วเติมสารละลาย MIBK ลงไปอีก 10 มล. เขย่า 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น 10 นาที แล้วไขชั้นของสารละลาย APDC (ส่วนล่าง) ใส่ขวด polyethylene เก็บไว้ในตู้เย็น

5. <u>การวิเคราะห์ตัวอย่าง</u>

<u>วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ</u>

- นำตัวอย่างน้ำทะเลจำนวน 200 มล.ปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 4 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์
- เติมสารละลาย APDC 1% 10 มล. เขย่า 10 - 20 นาที
- แล้วเติมสารละลาย MIBK 10 มล. เขย่า 10 นาที ทิ้งให้แยกชั้น 15 นาที ไขชั้นล่างทิ้งไป นำชั้นบนของ MIBK เก็บเอาไว้
- นำชั้นของ MIBK มาสกัดอีกครั้งด้วย 4N HNO_3 10 มล. เขย่า 10 นาที

ทิ้งไว้ 15 - 20 นาที

- ไขชั้นกรด (ชั้นล่าง) ใส่ขวด polyethylene เก็บไว้ในตู้เย็นแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ค่าด้วยเครื่อง AA

วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างตะกอน

- นำตัวอย่างตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 60ํ เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- ตัวอย่างตะกอนที่อบแห้งแล้ว นำมาบดให้ละเอียดด้วยครกโมทาร์ แล้วร่อนผ่านตะแกรงร่อน ขนาด 72 ไมครอน

- ชั่งตัวอย่างตะกอนที่ร่อนแล้วจำนวน 0.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ที่เป็นเทฟล่อน เติมกรดไนตริกที่มีความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 10 มล.

- นำบีกเกอร์ตั้งบน hot plate อุณหภูมิ 110ํ - 130ํ เซลเซียส ประมาณ 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษ Whatman No.41 ทำปริมาตรให้เป็น 25 มล. ด้วยน้ำกลั่นดีไอออนไนซ์ เทใส่ขวดพลาสติก (ซึ่งแช่ด้วยกรด 10% HCL 3 วัน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นดีไอออนไนซ์) แล้วนำไปวัดค่าด้วยเครื่อง AA

วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์

- นำตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ที่เก็บได้มาล้างด้วยน้ำกลั่นดีไอออนไนซ์จนสะอาด กรองเอาน้ำออกให้หมด ชั่งน้ำหนักเปียกจดบันทึกไว้

- อบแห้งตัวอย่างที่อุณหภูมิประมาณ 60ํ เซลเซียส เป็นเวลา 12 - 24 ชั่วโมง

- นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว ชั่งน้ำหนักบันทึกไว้

- ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งแล้วจำนวน 0.1 กรัม ย่อยสลายด้วยกรดไนตริกเข้มข้นที่กลั่นแล้ว 3 มล. ในบีกเกอร์ที่เป็นเทฟล่อน ทำปริมาตรให้เป็น 10 มล. ด้วยน้ำกลั่นดีไอออนไนซ์ แล้วนำไปวัดค่าด้วยเครื่อง AA

วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างสัตว์ทะเล

- บดตัวอย่างสัตว์ด้วยเครื่องบดให้ละเอียด แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 60ํ เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งแล้วประมาณ 0.1 กรัม ย่อยสลายในกรดไนตริกเข้มข้นที่กลั่นแล้ว ทำปริมาตรให้เป็น 10 มล. ด้วยน้ำกลั่นดีไอออนไนซ์ แล้วนำไปวัดค่าด้วยเครื่อง AA

6. การหาค่า Recovery

เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีการที่นำมาใช้หาปริมาณของโลหะหนักในตัวอย่างให้ผลออกมามากน้อยเพียงใด

วิธีการทำ recovery ของตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างมา 1 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 3 ส่วน

2. นำตัวอย่างส่วนที่ 1 ไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะแต่ละชนิดตามวิธีดังกล่าวมาแล้ว

3. นำตัวอย่างส่วนที่ 2 และ 3 ไปเติม standard ซึ่งทราบปริมาณความเข้มข้นอย่างแน่นอน และจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะในตัวอย่างตามวิธีดังกล่าวแล้วเช่นกัน

7. การหาค่า Precision

เพื่อแสดงให้ดูว่า ค่าความแม่นยำ (Precision) ภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมือนกันทุกประการ จะมีการกระจายของผลที่ได้มากน้อยเพียงไร

วิธีการทำ precision

1. นำตัวอย่างมา 1 ตัวอย่าง

2. แบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วน ๆ ละ 0.1 กรัม นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของโลหะตามวิธีดังกล่าวมาแล้ว

8. การคำนวณผล

การคำนวณหาปริมาณของโลหะเป็น $\mu g/ml$ (ppm) ในตัวอย่าง

นำค่า Absorbance ของตัวอย่าง มาเทียบหาค่าความเข้มข้นของโลหะจาก Calibration Curve ของสารละลายมาตรฐาน แล้วนำมาคำนวณดังนี้

สมมุติค่าความเข้มข้นจากกราฟของโลหะ A อ่านได้ x $\mu g/ml$

ดังนั้นตัวอย่าง 10 มล. จะมีโลหะ A อยู่ 10x μg

แต่ตัวอย่าง 10 มล. มาจากน้ำหนักแห้ง 0.1 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นั่นคือตัวอย่าง 0.1 กรัม มีโลหะ A อยู่ 10x μg

นั่นคือตัวอย่าง 1.0 กรัม มีโลหะ A อยู่ $\frac{10x \times 1}{0.1} = 100x$ $\mu g/g$

9. การหาเปอร์เซนต์ Recovery ของโลหะในน้ำทะเล

สมมุติค่าจากกราฟของโลหะ A ในตัวอย่างที่ไม่ได้เติม standard อ่านได้ x $\mu g/ml$

สมมุติค่าจากกราฟของโลหะ A ในตัวอย่างที่เติม standard อ่านได้ y $\mu g/ml$

ถ้า y - x มีค่าเท่ากับปริมาณของโลหะที่เติมลงไป แสดงว่า recovery เท่ากับ 100 %

10. การหาค่า precision

โดยใช้ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) เป็นตัวกระจาย จากสูตร $S.D. = \sigma = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{N}}$

โดยที่ $\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \ldots\ldots + x_N}{N}$

$x_1, x_2 \ldots. x_N$ = ค่าของโลหะที่หาได้ในตัวอย่างแต่ละส่วน

N = จำนวนส่วนทั้งหมดที่ถูกแบ่งออก

11. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

11.1 การทดสอบความแตกต่างของปริมาณการแพร่กระจายของโลหะในน้ำทะเล และในตะกอน ตามฤดูกาล (เมษายน - พฤศจิกายน)

ทดสอบความแตกต่างโดยใช้ Student t - test ตามวิธีของ Snedecor and Cochran (1980) โดยคำนวณจากสูตร

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sp\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$Sp = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)\ S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

11.2 <u>การทดสอบความแตกต่างของปริมาณการสะสมของโลหะในห่วงโซ่อาหารของปลากินเนื้อในแต่ละบริเวณ ตามฤดูกาล</u>

โดยใช้หลักการวิเคราะห์วาเรียนซ์ร่วม (Analysis of Co - variance) แบบ Factorial Design ตามวิธีของ Snedecor and Cochran (1980) (ภาคผนวก ค)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย