

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุอุปกรณ์ (Materials)

2.1.1 ตัวอย่าง (Sample)

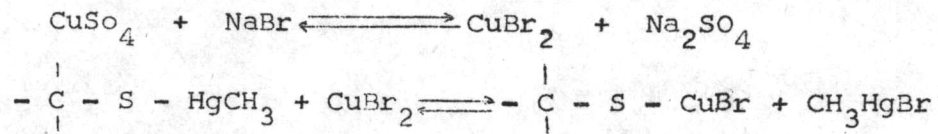
การเก็บตัวอย่างทำในบริเวณอ่าวไทยตอนบน (ภาพที่ 3) โดยอวนลากของเรือสำรวจประมง 2 และเรือประมง 4 ตัวอย่างที่เก็บมี 25 ชนิด 228 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้มี 6 ชนิดเป็นปลาผิวน้ำ (pelagic fish) และ 18 ชนิดเป็นปลาหน้าดิน (Demersal fish)

การเก็บตัวอย่างทำในช่วงระหว่างเดือนกันยายน 2519 - มีนาคม 2520 ตัวอย่างที่เก็บได้ถูกนำไปแช่แข็งจนกระทั่งทำการวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ ทำโดยนำปลามาแช่เนื้อบริเวณกล้ามเนื้อส่วนหลังประมาณ 4 กรัม (ภาพที่ 4) แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไป digest หาปริมาณ Total mercury อีกส่วนนำไปบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) เพื่อนำไปสกัดหา organic mercury ต่อไป

2.1.2 เครื่องมือ (Instrument)

ในการศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์ปริมาณของ Total mercury โดย flame - less atomic absorption spectrophotometer ใช้ Mercometer Model 2006 - 1R (Antipollution Technology Corporation, Holland, Michigan, U.S.A.) ส่วนปรอทอินทรีย์ที่วัดได้จากวิธีสกัดแยกของ Uthe, et al, (1972) หลักการของวิธีนี้คือสกัด methyl mercury ในรูปของ bromide salt หลังจาก acidified ตัวอย่างด้วยสารละลาย acid mixture ($H_2SO_4 + NaBr$) และด้วยการเติม $CuSO_4$ ลงไปจะเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดเพราะ สามารถดึงเอา methyl mercury จาก Sulhydryl group ในโปรตีนได้



ขั้นตอนไปเปลี่ยน methyl mercury bromide เป็น methyl mercuric thiolsulfate แล้ววิเคราะห์หาปริมาณปรอทใน aqueous solution โดยวิธีเดียวกับวิเคราะห์ Total mercury

- ลิมิตของเครื่อง Mercometer Model 2006 - 1R (Antipollution Technology Coporation Holland, Michigan, U.S.A.)

ช่วงการวัดของเครื่อง Mercometer Model 2006 - 1 R ที่เหมาะสม (normal range) อยู่ในช่วง 0.5 ppb - 1.5 ppm หรือ 0.5-1500 ng/g (จากสมุดคู่มือการใช้เครื่อง Mercometer Model 2006 - 1 R)

- ค่าความแม่นยำ (precision)

จากการทดลองวัดซ้ำหลาย ๆ ครั้งได้ผลดังนี้

ตารางที่ 5 ค่าความแม่นยำในการวัดปริมาณปรอท

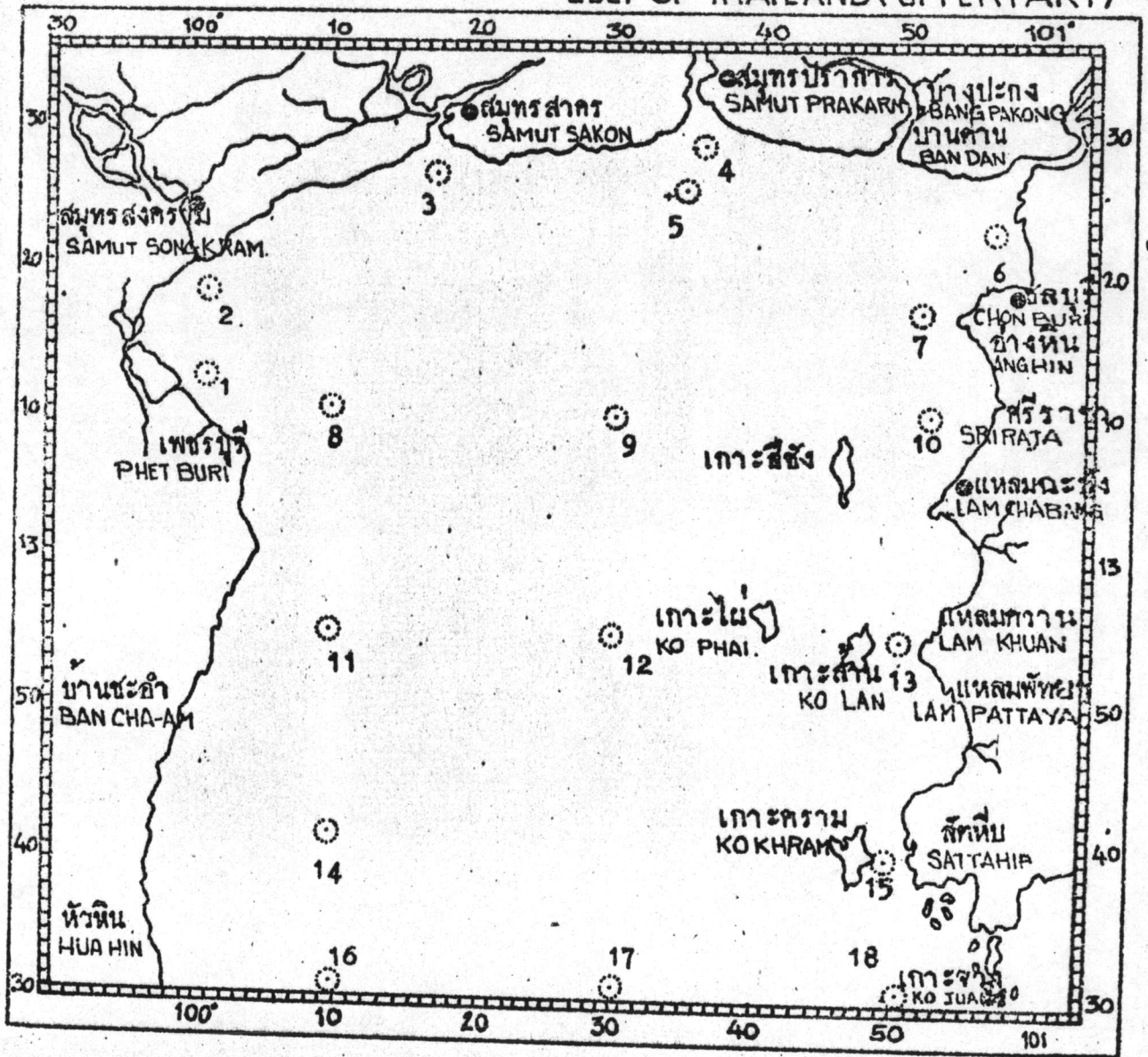
ความเข้มข้นซ้ำ	50 ng	100 ng	300 ng	500 ng
1	6.5 *	12.0	49.5	85.0
2	6.5	12.0	49.0	85.0
3	7.0	12.0	50.0	84.5
4	7.0	12.5	50.0	84.0
5	6.5	12.0	49.5	85.0
Average	6.7 ± 0.24	12.1 ± 0.16	49.6 ± 0.32	84.7 ± 0.36

* หน่วยเป็นจำนวนนับ (count)

ภาพที่ 3

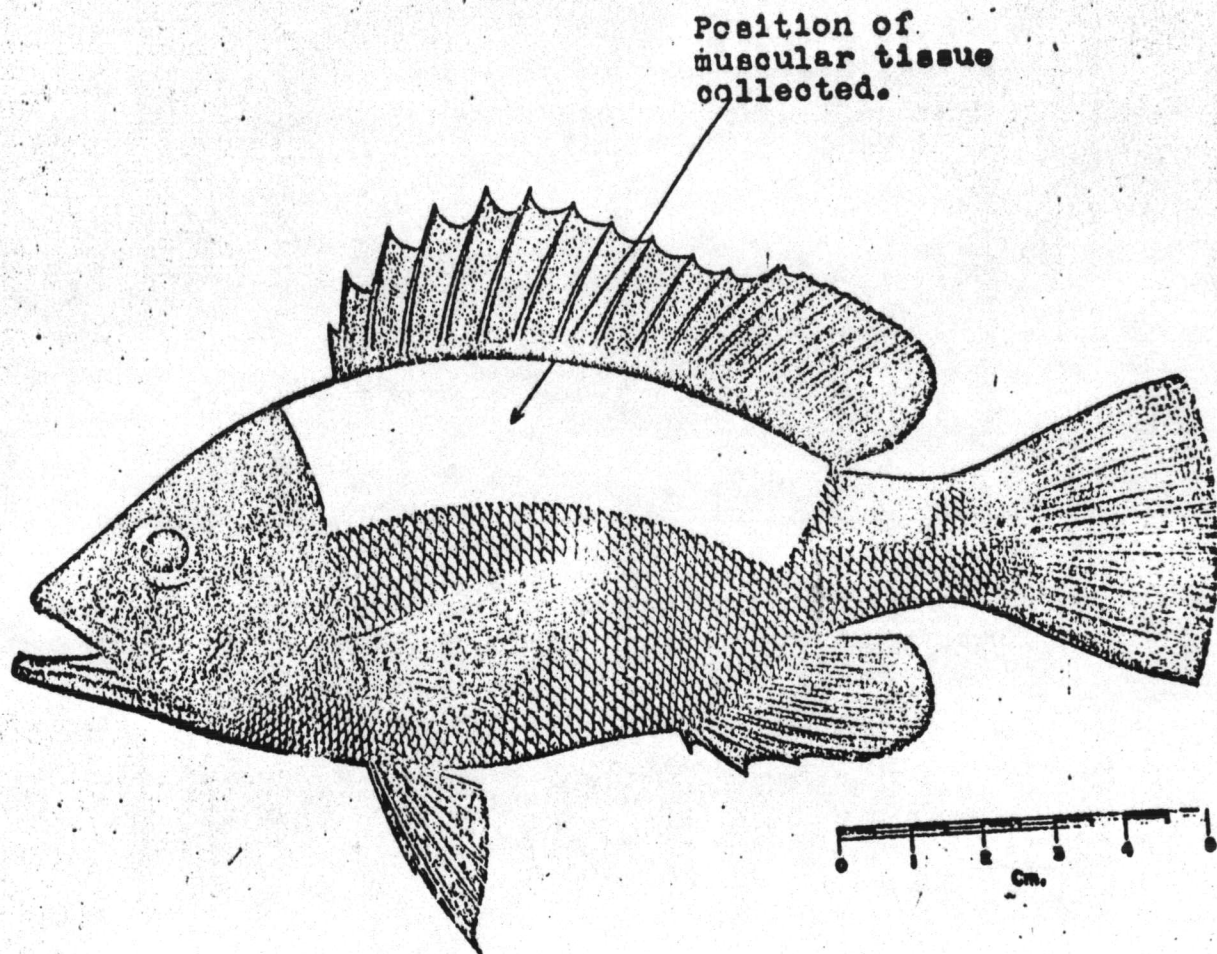
สถานการณ์มลพิษ POLLUTION ในอ่าวไทยตอนบน

GULF OF THAILAND (UPPER PART)



SCALE 1:480,000

The Collection of Fish Tissue



ภาพที่ 4 จากการศึกษาของ Holden (1972) รายงานว่ากล้ามเนื้อช่วงตัวส่วนบน เป็นส่วนที่มีปริมาณโปรตีนสูงกว่ากล้ามเนื้อส่วนอื่นๆ (ปฐม แหยม เกตุ 2518)

2.2 วิธีการวิเคราะห์ (Analytical method)

2.2.1 วิธีวิเคราะห์ Total mercury

ขนาดตัวอย่างที่ใช้ 0.5 - 2.0 gm (wet)

- 1) ชั่งตัวอย่างใส่ลงใน 250 ml Pyrex flask
- 2) เติม 20 ml ของ 1 : 1 conc HNO_3 + conc H_2SO_4 ลงใน flask เพื่อทำการย่อย (digest) ที่ 80°C . เป็นเวลา 20 นาที
- 3) เติม 10 ml ของสารละลายอิ่มตัวของ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8^*$ และ 50 ml ของน้ำกลั่นเขย่าให้ทั่วแล้วย่อย (digest) ที่ 80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 4) ทิ้งตัวอย่างไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ย้ายและล้างด้วยน้ำกลั่นไปยัง 500 ml 3 - neck distillation flask
- 5) เติม 20 ml ของสารละลาย reducing agent** (20 g NH_2OH . HCl , 20 g NaCl , 33g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1g Hydrazine sulfate และ 9 ml conc H_2SO_4 ละลายเป็น 1 ลิตร)
- 6) สอดสาย bubbler gas ลงในคอข้างหนึ่งของขวดที่เหลื่อมปิดด้วยจุก ground glass stoppers
- 7) ทำการวัดด้วย Mercometer Model 2006 - 1R (Anti - Pollution Technology Corporation, Holland, Michigan) เปรียบเทียบกับ standard calibration curve (ภาพที่ 5)

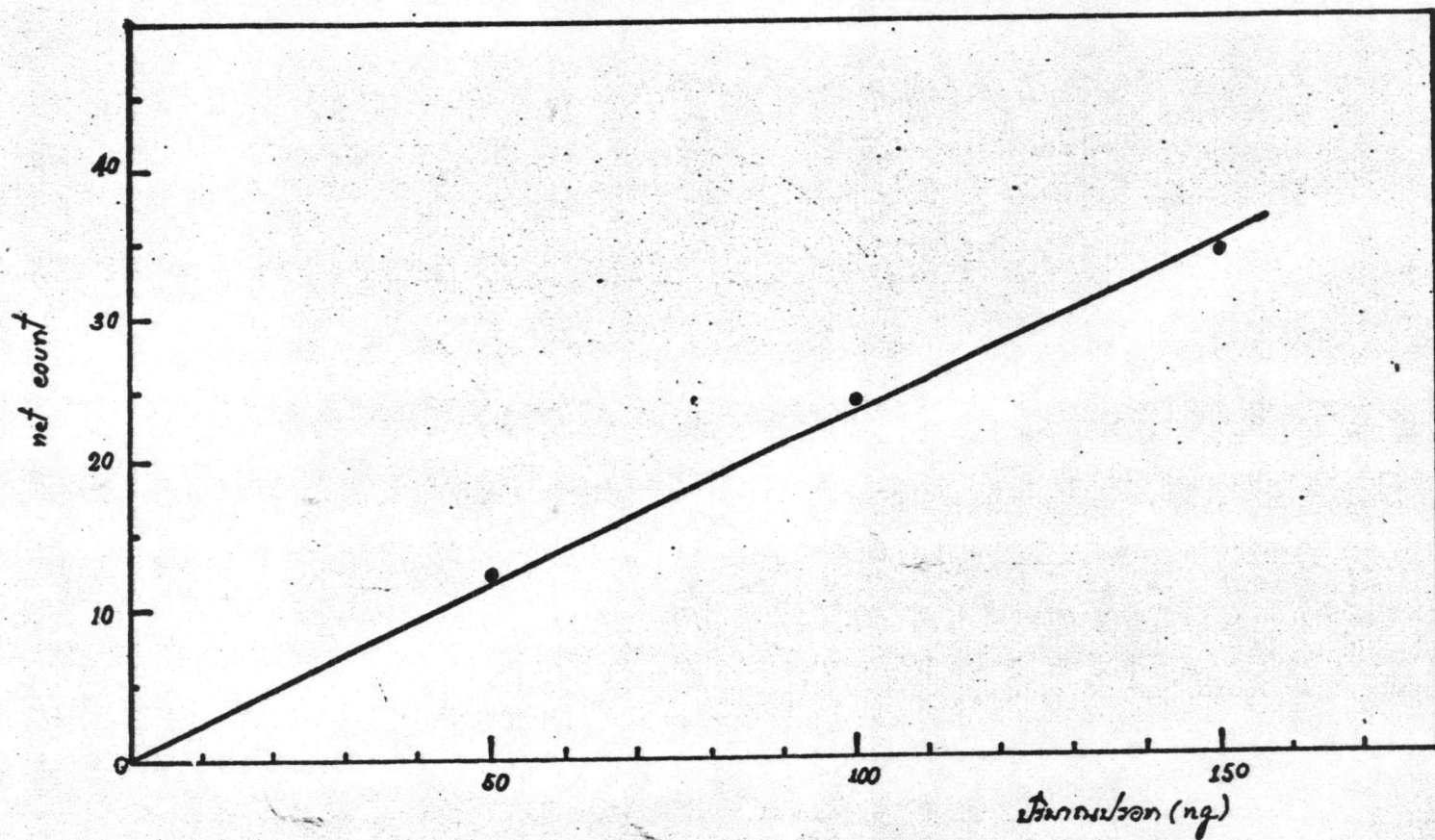
หมายเหตุ * เติม $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ เพื่อใช้ Oxidized สารประกอบปรอทให้เป็น Mercuric ion

** Oxidizing agent ที่เหลือจะถูก reduce ด้วยสารละลาย hydrazine ส่วน Mercuric ion จะถูก reduce ด้วยสารละลาย $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ไปเป็น elementary mercury



2.2.2 วิธีวิเคราะห์ Organic Mercury

- 1) นำตัวอย่างมา 2 gm (wet weight) มาบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) แล้วผสมเข้ากับ 20 ml CuSO_4 (0.1 M) และ 10 ml ของสารละลาย acid mixture (H_2SO_4 (5N), NaBr (3M) เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านใยแก้วและล้างด้วย 10 ml น้ำกลั่น
- 2) ย้ายไปกรวยแยกและสกัดด้วย 20 ml ของ Benzene แยก Benzene และ Emulsion ลงในหลอดทดลองแล้ว Centrifuge เป็นเวลา 20 นาที แยก Benzene ออก
- 3) เติม 2 ml thiosulfate solution (95% ethanol - 0.005 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ในน้ำกลั่น (1+1)) ใน benzene เหย้าแล้ว centrifuged แยก aqueous solution ของ organic mercuric thiosulfate ออกโดยการมีเปิดทำซ้ำ Step นี้อีกหนึ่งโดยใช้ 1 ml ของ thiosulfate solution
- 4) เติม 100 ml ของ acid solution (HNO_3 100 ml, H_2SO_4 100 ml dilute เป็น 1 ลิตร), 10 ml ของสารละลายอิ่มตัวของ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_3$ และ 50 ml ของน้ำกลั่นเหย้าให้ทั่ว
- 5) เติม 20 ml ของสารละลาย reducing agent (20 g $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 20 g NaCl, 33g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g Hydrazine sulfate และ 9 ml conc H_2SO_4 ละลายเป็น 1 ลิตร)
- 6) สอดสาย bubbler gas ลงในคอข้างหนึ่งของขวดที่เห็ดปิดด้วย จุก ground glass stoppers.
- 7) ทำการวัดด้วย Mercometer Model 2006-1R เปรียบเทียบกับ Standard Mercury



ภาพที่ 5 กราฟ Standard Calibration Curve

2.2.3 การคำนวณ

ปริมาณที่บันทึกเปรียบเทียบกับสารละลายปรอทมาตรฐานได้เป็น nanogram (ng) หรือ microgram (μg) สามารถคำนวณเป็น ppb หรือ ppm ได้ดังนี้

$$\frac{\text{ng Hg}}{\text{g Sample}} = \text{ppb Hg} \quad \text{ในตัวอย่าง}$$

$$\frac{\mu\text{g Hg}}{\text{g Sample}} = \text{ppm Hg} \quad \text{ในตัวอย่าง}$$

2.2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารเคมี

ก. สารละลายปรอทมาตรฐาน

1) สารละลายปรอทอินทรีย์มาตรฐาน ละลาย 0.1354 gm ของ HgCl_2 ใน 75 ml ของน้ำกลั่นเติม 10 ml HNO_3 conc ทำให้มีปริมาตร 100 ml จะได้ 100 ml ความเข้มข้น

$$1 \text{ ml} = 1 \text{ mg Hg}$$

2) สารละลายปรอทอินทรีย์มาตรฐาน ละลาย 0.1252 gm ของ CH_3HgCl ใน Benzene 100 ml จะได้ความเข้มข้น

$$1 \text{ ml} = 1 \text{ mg Hg}$$

ข) สารละลายผสมกรด (H_2SO_4 (5N) + NaBr (3M))

1) ผสม H_2SO_4 (ถ.พ. 1.84) กับน้ำ (1 + 1, v/v) ให้มีปริมาตร 220 ml ทำให้เย็น

2) ละลาย 310 gm NaBr ในน้ำกลั่น 700 ml, ผสมสารละลาย 1) และ 2) เข้าด้วยกันแล้วทำให้มีปริมาตร 1 ลิตร

ค) สารละลาย CuSO_4 1.0 M ละลาย 50 gm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 200 ml น้ำกลั่น

สำหรับ 0.1 M ให้เจือจาง 1 ml 1.0 M เป็น 10 ml

ง) สารละลาย Ethanolic sodium thiosulfate ละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.4 gm ในน้ำ 1 ลิตร ได้สารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05 M นำมาเจือจาง 10 เท่าแล้วผสมกับ 95% ethanol ในอัตราส่วน 1 : 1

จ) สารละลาย Reducing agent ละลาย 20 gm $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 20 gm NaCl , 33 gm $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 gm Hydrazine sulfate และ 9 ml กรด H_2SO_4 ในน้ำกลั่นทำให้เป็น 1 ลิตร

2.2.5 เปอร์เซ็นต์ Recovery

จากการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ Recovery ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่า Recovery ของปริมาณรวมของปรอท (Total mercury) และปรอทอินทรีย์ (Organic mercury)

Total mercury Recovery

Sample wt. (gm)	HgCl_2 added (ng)	HgCl_2 Rec (ng)	% Recovery
2.00 gm	20	18.00, 18.10	90.25
2.00 gm	40	39.30, 38.99	97.87
2.00 gm	60	58.25, 55.30	94.63
2.00 gm	80	78.81, 77.78	97.87
2.00 gm	100	101.5, 101.0	101.25
		<u>Average</u>	96.37

Organic mercury Recovery

Sample wt.(gm)	CH ₃ HgCl added (ng)	CH ₃ HgCl Rec (ng)	%Recovery
200 gm	20	16.90, 16.77	84.20
200 gm	40	34.00, 35.11	86.40
200 gm	60	52.21, 50.73	85.78
200 gm	80	72.25, 70.98	89.53
200 gm	100	89.97, 88.21	89.09
		<u>Average</u>	87.00

จากเปอร์เซ็นต์ Recovery ที่ทำได้เมื่อเปรียบเทียบกับของ Uthe et al(1970) ซึ่งใช้ Gas Liquid Chromatography ในการวิเคราะห์ได้ผลการหา Recovery ดังนี้

ตารางที่ 7 ค่า Recovery จากผลการทดลองของ Uthe, et al 1970

Sample	CH ₃ Hg added (ppm)	CH ₃ Hg Found (ppm)	% Recovery
Blank	0.10	0.10	100
	0.49	0.50	100
	2.00	1.95	97
	5.00	5.20	106
Pike	-	2.15	-
	0.49	2.60	91
	1.47	3.70	105
	4.90	7.23	102
		<u>Average</u>	99 ± 5

และจากผลงานของ Rivers, et al (1972) ซึ่งใช้เครื่องของ Perkin-Elmer Model 303 ในการวิเคราะห์ที่ได้แสดงผลการหา Recovery ดังนี้

ตารางที่ 8 ค่า Recovery จากผลการทดลองของ Rivers, et al (1972)

Sample wt (gm)	CH ₃ HgCl added (Ug)	CH ₃ HgCl Rec. (Ug)	% Recovery
<u>Total Mercury</u>			
10.00	0.00	0.05	-
10.00	2.00	1.94	97
10.00	4.00	4.08	102
10.00	6.00	6.00	100
10.00	8.00	8.16	102
10.00	10.00	10.60	106
		<u>average</u>	101.4
<u>Organic Mercury</u>			
10.00	0.00	0.05	-
10.00	2.00	2.08	104
10.00	4.00	4.00	100
10.00	6.00	5.70	95
10.00	8.00	7.36	92
10.00	10.00	8.60	86
		<u>average</u>	95.4

จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบผลกันแล้วค่าเฉลี่ยของ % Recovery ได้ผลอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน

2.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ก) หาปริมาณค่าเฉลี่ยของสารปรอทในปลาแต่ละชนิด

$$\bar{X} = \frac{EX}{N} \quad (\text{Garrette 1966})$$

\bar{X} คือค่าเฉลี่ยของปริมาณปรอทในปลาแต่ละชนิด

EX คือผลรวมของปริมาณปรอทในปลาแต่ละชนิด

N คือจำนวนตัวอย่างของปลาแต่ละชนิด

ข) หาความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

$$S.D. = \sqrt{\frac{NEX^2 - (EX)^2}{N(N-1)}}$$

S.D. คือค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

EX คือผลรวมของปริมาณปรอท

EX² คือผลรวมของปริมาณปรอทแต่ละตัวอย่างยกกำลังสอง

N คือจำนวนตัวอย่างแต่ละกลุ่ม

ค) ทดสอบความแตกต่างของปริมาณสารในแต่ละกลุ่มตัวอย่างโดยใช้สูตร

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}{(n_1 + n_2) - 2}}}$$

\bar{X} คือปริมาณเฉลี่ยของสาร

s_1^2 คือความแปรปรวนของปริมาณสารกลุ่มที่ 1

s_2^2 คือความแปรปรวนของปริมาณสารกลุ่มที่ 2

n คือจำนวนตัวอย่างในกลุ่ม

ง) การหาสมการ Regression line

$$Y = a + bx$$

โดย
$$b = \frac{n \sum xy - (\sum X)(\sum Y)}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$r = b \frac{S_{xx}}{S_{yy}}$$

โดย
$$S_{xx} = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}, \quad S_{yy} = \sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}$$

$$S_{xy} = \sum XY - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{n}$$

และการตรวจสอบว่า Slope ของสมการ = 0 หรือไม่, ใช้สูตร

$$t = \frac{b}{S_b}$$

โดย
$$S_b = \frac{S_{yx}}{\sqrt{S_{xx}}}$$

และ
$$(S_{yx})^2 = SS/n - 2$$

เมื่อ
$$SS = S_{yy} - \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}}$$