บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่าง อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างชาเขียวที่จำหน่ายในจังหวัดเชียงราย และจังหวัดเชียงใหม่ทุกแหล่งผลิต แหล่งผลิตละ 3 ตัวอย่าง

3.1.2 อุปกรณ์

1. เครื่อง Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS: Agilent Technology : 7500, U.S.A.)
2. เครื่อง เฟรม อะตอมมิคแอบซอปชั่น สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Flame Atomic Absorption Spectrophotometer; SHIMADZU: AA-6300, Japan)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Electronic balance; Mettle-Toledo : AG204, Switzerland)
4. เครื่องปั่นผสมอาหาร (Blender; National: MX897GM, Malaysia)
5. เตาเผาอุณหภูมิสูง (Economy Furnace; Nabertherm: Lg/11/B1700, Germany)
6. กระดาษกรองเบอร์ 42 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว (Filter paper No.42 Whatman)
7. ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส (Freezer; J.PSELECTA Templo-S, U.S.A.)
8. ตู้เย็นแช่อาหาร (Refrigerator; MISUBISHI, Thailand)
9. ตู้ดูดควันพิษ (Economy fume cupboard; MAJOR Scientific Product Co.,Ltd. : ECON 150, Thailand)
10. Micropipette
11. คลูซิเบิล
12. ขวดโพลิเอทิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร
13. บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
14. โกร่งบดตัวอย่าง
15. Hot plate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16. Micropipette
17. Volumetric flask 50 ml
18. ตะแกรงร่อน ขนาด 20 mesh เส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร
19. ช้อนตักดินพลาสติก

3.1.3 สารเคมี

1. กรดไนตริก (Nitric acid, Merk,Germany)
2. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, Merk,Germany)
3. กรดเปอร์คลอริก (Perchloric, Merk, Germany)
3. น้ำ deionized water
4. แก๊สอาร์กอน (Argon High Purity Grade, บจก.ลานนาอินดัสเตรียลแก๊ส, ประเทศไทย)
5. สารละลายมาตรฐาน
    5.1 สารหนู (Arsenic ICP standard traceable to SRM from NIST H_3AsO_4 in HNO_3 2 – 3% 1000 mg/l As CertiPUR ®, Merck, Germany)
    5.2 ตะกั่ว (Lead ICP standard traceable to SRM from NIST $Pb(NO_3)_2$ in HNO_3 2-3 % 1000 mg/l Pb CertiPUR®, Merck , Germany)
    5.3 ทองแดง (Copper ICP standard traceable to SRM from NIST $Cu(NO_3)_2$ in HNO_3 2-3 % 1000 mg/l Cu CertiPUR®, Merck, Germany)
    5.4 สังกะสี (Zinc ICP standard traceable to SRM from NIST $Zn(NO_3)_2$ in HNO_3 2-3 % 1000 mg/l Zn CertiPUR®, Merck, Germany)
    5.5 เหล็ก (Iron ICP standard traceable to SRM from NIST $Fe(NO_3)_2$ in HNO_3 10 % 1000 mg/l Fe CertiPUR®, Merck, Germany)
    5.6 ดีบุก (Tin ICP standard traceable to SRM from NIST $SnCl_4$ in HCl 7% 1000 mg/l Sn CertiPUR®, Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองแบ่งออกเป็น 5 ส่วน ดังนี้

3.2.1 การสำรวจแหล่งผลิตชา

สำรวจแหล่งผลิตชาในจังหวัดเชียงรายและจังหวัดเชียงใหม่ โดยการสืบค้นข้อมูลจากอินเตอร์เนต ข้อมูลจากอุตสาหกรรมจังหวัด และจากการออกสำรวจแหล่งผลิต ลักษณะตัวอย่างที่เก็บจะต้องบรรจุในภาชนะปิดสนิท มีตราสินค้า และสถานที่ผลิตบ่งบอกอย่างชัดเจนที่ภาชนะบรรจุ

3.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างชาเขียว

3.2.2.1 การเก็บตัวอย่างชาเขียว

สุ่มเก็บตัวอย่างชาเขียวที่วางจำหน่ายตามท้องตลาด และร้านขายชา ณ สถานที่ผลิตชาในจังหวัดเชียงราย และจังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างแหล่งผลิตละ 3 ตัวอย่างที่มี lot การผลิตไม่ซ้ำกัน รวมเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 29 แหล่งผลิต 87 ตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2.2 การย่อยตัวอย่างชาเขียวก่อนวิเคราะห์โลหะหนัก

แช่คลูซิเบิล และเครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง ด้วยกรดไนตริก (HNO_3) ความเข้มข้น 10% (w/v) อย่างน้อย 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำ deionized อีก 2 ครั้ง เพื่อกำจัดโลหะปนเปื้อนอื่นๆ ที่อาจติดมากับภาชนะ แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้ (Sastre, 2002) จากนั้นนำตัวอย่างชาเขียวทั้ง 87 ตัวอย่าง ปั่นให้เป็นผงละเอียด แล้วชั่งตัวอย่างละ 0.5000 กรัม ใส่คลูซิเบิล เผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าตัวอย่างจะกลายเป็นเถ้าสีขาวทั้งหมด แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้ความร้อนตัวอย่างบน hot plate ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนสารละลายตัวอย่างเปลี่ยนจากสีน้ำตาลของเถ้ากลายเป็นสารละลายสีเหลืองใส แล้วเติมกรดไนตริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างไว้ในขวดโพลิเอทิลีนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ (Seenivasan *et al.* 2008)

3.2.2.3 การวิเคราะห์โลหะหนัก ในตัวอย่างชาเขียวด้วยเครื่อง ICP-MS

เตรียมสารละลาย blank โดยทำตามขั้นตอนวิธีการย่อยตัวอย่าง แต่ไม่ใส่ตัวอย่าง ใช้สารละลายมาตรฐานของสารหนู ตะกั่ว และทองแดง ที่มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อลิตร สังกะสี เหล็ก และดีบุก มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 300 และ 400

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไมโครกรัมต่อลิตร เพื่อทำเป็น Calibration curve ด้วยเครื่อง ICP-MS เปรียบเทียบกับตัวอย่างชาเขียว ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ของเครื่องดังตาราง 3.3 (Thomas, 2008)

ตาราง 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ICP-MS

สภาวะ	ค่าที่กำหนด
Argon flow rate (1/min)	Plasma : 15 , Auxillary gas : 0.5
Nebulizer	Babington type
Sample flow rate (ml/min)	1.5
Vacuum	Interface : 4 torr, quadrupole : $2x10^{-5}$ torr
Spray chamber	Scott-type
Data acquisition	Peak hopping, replicate time 200 ms

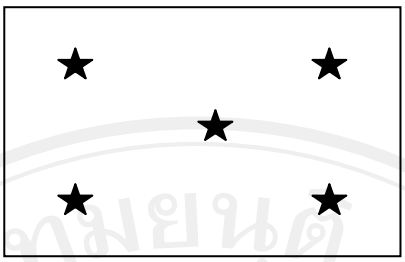
ที่มา : Thomas, 2008

3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างดินจากแหล่งปลูกตัวอย่างชาเขียวที่พบการปนเปื้อน

3.2.3.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งปลูกตัวอย่างชาเขียวที่พบการปนเปื้อนสูงจากข้อ 3.2.2.3 มาวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักทั้ง 6 ชนิดเช่นเดียวกับตัวอย่างชาเขียว โดยสุ่มเก็บดินตัวอย่างละ 5 จุด จุดละ 1 กิโลกรัม เก็บดินให้กระจายทั่วพื้นที่ (รูป 3.1) โดยตักดินที่ความลึก 5 เซนติเมตร (Wong *et al.* 2002) แล้วนำตัวอย่างดินทั้ง 5 จุดมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำมาผึ่งไว้จนแห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปย่อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.1 จุดเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกชา

3.2.3.2 การย่อยตัวอย่างดินก่อนวิเคราะห์โลหะหนัก

แช่เครื่องแก้วที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง ด้วยกรดไนตริก (HNO_3) ความเข้มข้น 10% (w/v) อย่างน้อย 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำ deionized อีก 2 ครั้ง เพื่อกำจัดโลหะปนเปื้อนอื่นๆ ที่อาจติดมากับภาชนะเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ชาเขียว แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้ จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ผึ่งไว้บดด้วยโกร่งให้ละเอียด แล้วร่อนด้วยตะแกรงร่อน เพื่อกำจัดกรวด หิน เศษใบไม้ และอื่นๆ นำตัวอย่างดินที่ได้จากการร่อนไปชั่งตัวอย่างละ 5.0000 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น($HClO_4$) 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนบน hot plate 3 ครั้ง โดยครั้งแรกที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้ความร้อนต่อครั้งที่ 2 ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และครั้งที่สามให้ความร้อนต่อที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียสจนกว่าตัวอย่างจะแห้ง วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงเติมกรดไนตริก 0.8 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร อุ่นตัวอย่างอีกครั้งบน hot plate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ววางไว้ให้เย็น (ทุกขั้นตอนในการย่อยตัวอย่างดินต้องทำในตู้ดูดควันพิษ) แล้วกรองตัวอย่างที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 เก็บไว้ในขวดโพลิเอทีลินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ (Wong *et al*. 2002)

3.2.3.3 การวิเคราะห์โลหะหนัก ในตัวอย่างดินด้วยเครื่อง ICP-MS

นำตัวอย่างดินที่ได้ ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างชาเขียวข้อ 3.2.2.3 โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ ดังตาราง 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4 การศึกษาความเที่ยงตรง (Precision) ของวิธีการและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างวิธี Flame AAS และ วิธี ICP-MS ในตัวอย่างชาที่พบการปนเปื้อน

นำตัวอย่างชาเขียวมา 1 ตัวอย่าง ทำการย่อยตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.2 จำนวน 10 ซ้ำ ให้มีตัวอย่างมากพอ จากนั้นแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Flame AAS โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ของเครื่องมือดังวิธีของ Goodwin (2002) รายละเอียดในตาราง 3.2 ส่วนที่สองนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ICP-MS โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ ดังตาราง 3.1 นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปหาค่า HORRAT ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{RSD}_{\text{lab}}}{\text{RSD}_{\text{expected}}}$$

โดยที่ S.D. = $\sqrt{\frac{N\sum X^2 - \left(\sum X\right)^2}{N\left(N-1\right)}}$

$\sum X$ = ผลรวมของปริมาณโลหะหนักแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้

$\sum X^2$ = ผลรวมของปริมาณโลหะหนักแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้ยกกำลังสอง

N = จำนวนซ้ำ

RSD = ค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์; $\frac{\text{S.D.}}{\overline{X}} \times 100$

RSD_{lab} = ค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดลอง

$\text{RSD}_{\text{expected}}$ = ค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ที่ได้การคำนวณของ HORRAT

ตาราง 3.2 สภาวะการวิเคราะห์ด้วยวิธี Flame AAS

โลหะ	ความยาวคลื่น (nm)	Slit width (nm)
ตะกั่ว	283.3	0.7
ทองแดง	324.8	0.7
สังกะสี	213.9	0.7

ที่มา : Goodwin (2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.5 การศึกษาความความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธี ICP-MS ในตัวอย่างชาเขียวและตัวอย่างดิน

เลือกตัวอย่างชาเขียวและตัวอย่างดินมาอย่างละ 1 ตัวอย่างที่พบโลหะหนักชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีปริมาณสูงสุดและต่ำสุดจากการวิเคราะห์ในข้อ 3.2.2 และข้อ 3.2.3 ตามลำดับ จากนั้นชั่งตัวอย่างชาเขียว 0.5000 กรัม และตัวอย่างดิน 5.0000 กรัม เตรียมสารละลายมาตรฐานของโลหะหนักที่พบสูงสุดในตัวอย่างชาเขียว และพบต่ำสุดในตัวอย่างดิน เติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างชาเขียวและตัวอย่างดิน (spiked sample) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทำการย่อยตัวอย่างชาเขียวเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.2 และย่อยตัวอย่างดินเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.2 จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะหนักในตัวอย่าง โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ในตารางที่ 3.1 แล้วคำนวณหาร้อยละการคืนกลับ (Recovery ; R) โดยใช้วิธีการของทิพวรรณ (2549) ซึ่งคำนวณค่า R (%) ดังสมการต่อไปนี้

$$R\ (\%) = \frac{C1 \times 100}{C2}$$

C1 คือ ความเข้มข้นที่เครื่องมือวัดได้

C2 คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทราบค่ารวมกับความเข้มข้นที่เติม

3.2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การสร้างสมการถดถอย (Regression Analysis) เพื่อสร้างสมการทำนายโดยหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระตัวแปรเดียว (X) กับค่าตอบสนอง (Y) ทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Version 11.5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved