



การพัฒนากระบวนการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง
สำหรับการวิเคราะห์โลหะหนักบางชนิดในสาหร่ายทะเลกินได้

Development of ultrasound - assisted digestion procedure
for analysis of some heavy metals in edible seaweeds

โดย
ปรีตา มาโยธา
วิสกา ศิริอังคารุธ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย
งบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2564
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



การพัฒนากระบวนการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง
สำหรับการวิเคราะห์โลหะหนักบางชนิดในสาหร่ายทะเลกินได้

Development of ultrasound - assisted digestion procedure
for analysis of some heavy metals in edible seaweeds

คณะผู้วิจัย

1. ปรีตา มาโยธา
2. วัศกา ศิริอังคารุ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย
งบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2564
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้นำเสนอกระบวนการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง (UAD) ที่มีประสิทธิภาพ และเชื่อถือได้ สำหรับการเตรียมตัวอย่างก่อนที่จะทำการตรวจวัดปริมาณแคดเมียม และตะกั่วที่ปนเปื้อนในสาหร่ายทะเลที่กินได้โดยใช้เทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมตรี (FAAS) ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการย่อย ได้แก่ ชนิดของออกซิแดนท์ มวลตัวอย่าง เวลาก่อนการย่อย เวลาในการย่อย และอุณหภูมิในการย่อย ประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยแบบ UAD ที่นำเสนอจะนำไปเปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยแบบมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ด้วย FAAS ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงของแคดเมียมและตะกั่วอยู่ในช่วง 0 – 0.25 และ 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) > 0.990 ขีดจำกัดการตรวจวัดของแคดเมียม และตะกั่ว เท่ากับ 0.00083 และ 0.02813 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณของแคดเมียม และตะกั่ว เท่ากับ 0.00275 และ 0.09378 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.32 และ 2.41% สำหรับ 0.10 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อลิตรของแคดเมียมและตะกั่วตามลำดับ วิธีการที่นำเสนอนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์แคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้หลากหลายประเภท ตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมดมีการปนเปื้อนของแคดเมียม หนึ่งในสามของตัวอย่างมีระดับการปนเปื้อนของแคดเมียมสูงกว่าปริมาณแคดเมียมสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในสาหร่ายทะเลพร้อมรับประทานที่กำหนดโดยกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย

Abstract

In this work, an efficient and reliable ultrasound-assisted digestion (UAD) procedure was proposed for sample preparation prior to quantitative determination of Cd and Pb contaminants in edible seaweeds using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). The digestion parameters such as type of oxidant, sample mass, pre-sonication time, sonication time and digestion temperature were optimized. The efficiency of the proposed UAD procedure was evaluated by comparing with conventional acid digestion procedure. For FAAS analysis, the linear range of 0 – 0.25 mg/L for Cd and 0 – 1.0 mg/L for Pb were obtained with correlation coefficient (R^2) > 0.990. The limit of detection for Cd and Pb were 0.00083 and 0.02813 mg/L, respectively. The limit of quantification for Cd and Pb were 0.00275 and 0.09378 mg/L, respectively. Relative standard deviations were 1.32 and 2.41% for 0.10 mg/L Cd and 0.40 mg/L Pb, respectively. The proposed method was successfully applied for analysis of Cd and Pb in various types of edible seaweeds samples. All analysed sample were contaminated with Cd. The contaminant levels of Cd in one third of samples higher than the maximum permissible levels of Cd in ready-to-eat seaweeds sets by the Ministry of Public Health of Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาองค์กรและพัฒนาบุคลากร ประจำปี 2564 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ขอขอบคุณหน่วยบริการวิชาการด้านเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

พฤษภาคม 2565

พูน ปณ จิตโต สีเว

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	3
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 สาหร่ายทะเลกินได้	4
2.2 โลหะหนัก	4
2.3 ชนิดของโลหะหนักที่ศึกษา	5
2.3.1 แคดเมียม	5
2.3.2 ตะกั่ว	5
2.4 เกณฑ์การปนเปื้อนโลหะแคดเมียมและตะกั่วในสาหร่ายและอาหารของไทย	6
2.5 การวิเคราะห์โลหะหนักด้วยเทคนิค AAS	6
2.5.1 องค์ประกอบและคุณสมบัติ	6
2.5.2 แหล่งกำเนิดแสง	7
2.5.3 ส่วนประกอบที่ทำให้ธาตุกลายเป็นอะตอมอิสระ	8
2.5.4 โมโนโครมาเตอร์	8
2.5.5 เครื่องตรวจจับ	9
2.5.6 เครื่องประมวลผลและอ่านผล	9
2.6 การย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง	9
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
2.7.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะในสาหร่ายทะเลกินได้	10
2.7.2 เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณโลหะหนักในสาหร่ายทะเล	10
2.7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักโดยการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง	11

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	12
3.2 สารเคมี	12
3.3 การเตรียมสารละลาย	12
3.3.1 สารละลายมาตรฐานแคดเมียม ความเข้มข้น 100 mg/L	12
3.3.2 สารละลายมาตรฐานตะกั่ว ความเข้มข้น 25 mg/L	12
3.3.3 สารละลายมาตรฐานแคดเมียม ความเข้มข้น 6.25 mg/L	12
3.3.4 สารละลายมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน	13
3.4 ตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ ประเภทสาหร่ายพืชมะพร้าวในสภาพแห้ง	14
3.5 ตัวอย่างสาหร่ายพวงองุ่น	16
3.6 วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูง	18
3.7 การวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม และตะกั่วด้วยเทคนิค FAAS	19
3.7.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือ	19
3.7.2 วิธีการวิเคราะห์	19
3.7.3 การทวนสอบความใช้ได้ของวิธี	20
3.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูง	21
3.8.1 ชนิดของ Oxidant	21
3.8.2 น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการย่อย	22
3.8.3 เวลา pre-sonication	23
3.8.4 ปริมาตรออกซิเจนและเวลาที่ใช้ในการย่อย	24
3.8.5 อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย	25
3.9 การย่อยตัวอย่างด้วยกรดแบบเปียก	26
บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน	
4.1 การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์โลหะด้วยเทคนิค FAAS	27
4.1.1 ช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้	27
4.1.2 การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)	28
4.1.3 ความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ (Precision)	28

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้ด้วยคลื่นความถี่สูง	29
4.2.1 ชนิดของออกซิแดนท์ (Oxidant)	29
4.2.2 น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการย่อย	31
4.2.3 เวลา pre-sonication	33
4.2.4 ปริมาตรออกซิแดนท์ และเวลาที่ใช้ในการย่อย	34
4.2.5 อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย	35
4.2.6 ประสิทธิภาพในการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง (UAD)	36
4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะที่ปนเปื้อนในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้	37
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
บรรณานุกรม	43
Manuscript	46
แบบรายงานการดำเนินงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์มาใช้อันก่อให้เกิดประโยชน์อย่างเด่นชัด	67
ประวัติผู้วิจัย	73
รายงานสรุปการเงิน	74

บัญชีตาราง

- ตารางที่ 2.1 มาตรฐานของสารปนเปื้อนในสาหร่ายและอาหารของไทย
- ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายที่บริโภคได้
- ตารางที่ 3.2 ปริมาตรของโลหะแคดเมียมที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน
- ตารางที่ 3.3 ปริมาตรของโลหะตะกั่วที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน
- ตารางที่ 3.4 รายละเอียดตัวอย่างสาหร่ายประเภทพร้อมบริโภคในสภาพแห้ง
- ตารางที่ 3.5 รายละเอียดตัวอย่างสาหร่ายพวงอุ้ง
- ตารางที่ 3.6 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง
- ตารางที่ 3.7 พารามิเตอร์ของเครื่อง FAAS สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม และตะกั่ว
- ตารางที่ 3.8 ปริมาตรที่ใช้ในการศึกษาชนิดของออกซิแดนซ์
- ตารางที่ 3.9 สภาวะการทดลองในการศึกษาผลของน้ำหนัตัวอย่าง
- ตารางที่ 3.10 สภาวะการทดลองในการศึกษาผลของเวลา pre-sonication
- ตารางที่ 3.11 สภาวะการทดลองในการศึกษาผลของปริมาตรออกซิแดนซ์และเวลาในการย่อย
- ตารางที่ 3.12 สภาวะการทดลองในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย
- ตารางที่ 4.1 ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ที่ได้จากการทดลอง โดยการใช้สารละลายแบบลดจำนวน 10 ขั้ว
- ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการทำซ้ำ และการทวนซ้ำของสารละลายมาตรฐานแคดเมียม และตะกั่ว
- ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพของการย่อยด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง
- ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ประเภทพร้อมบริโภคในสภาพแห้ง และร้อยละการได้กลับคืน
- ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายพวงอุ้ง และร้อยละการได้กลับคืน

บัญชีภาพประกอบ

รูปที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงพลังงานของเครื่องอัลตราซาวด์

รูปที่ 3.1 สาหร่ายพวงองุ่น (sea grape)

รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแคดเมียม

รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานตะกั่ว

รูปที่ 4.3 ผลของชนิดของตัวออกซิแดนท์ที่มีผลต่อการย่อยตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้

รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการย่อยกับค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ ประเภทสาหร่ายพร้อมบริโภคนในสภาพแห้ง

รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการย่อยกับค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ ประเภทสาหร่ายพวงองุ่น

รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา pre-sonication กับค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้

รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการย่อยกับค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้

รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในการย่อยกับค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้

สัญลักษณ์ และคำย่อ

AR	เกรดสารเคมีที่มีความบริสุทธิ์สูงสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี
AAS	เทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรสโกปี
°C	องศาเซลเซียส
Limit of detection (LOD)	ขีดจำกัดการตรวจวัด
Limit of quantitation (LOQ)	ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ
L/min	ลิตรต่อนาที
mg/L	มิลลิกรัมต่อลิตร
mg/kg	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
μL	ไมโครลิตร
mA	มิลลิแอมแปร์
ND	ตรวจไม่พบ
%RSD	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
UAD	การย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง

พูนัน ปณ จิตโต สีเว

1.1 ที่มาและความสำคัญ

‘สาหร่ายทะเล’ เป็นพืชทะเลชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในกลุ่มพืชชั้นต่ำ ไม่มีท่อลำเลียงอาหาร ใช้วิธีการดูดซับน้ำและแร่ธาตุจากน้ำทะเลสู่เซลล์ต่างๆโดยตรง สาหร่ายทุกชนิดมีความสามารถในการสร้างอาหารโดยการสังเคราะห์แสง ซึ่งสารสังเคราะห์แสงที่อยู่ในสาหร่ายแต่ละชนิดสามารถใช้ในการแบ่งกลุ่มสาหร่ายทะเลได้ ดังนี้ สาหร่ายสีเขียว (green algae) กลุ่ม Cholorophyceae เช่น *Caulerpa peltata* สาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) กลุ่ม Phaeophyceae เช่น *Dictyota ciliarata* สาหร่ายสีแดง (red algae) กลุ่ม Rhodophyceae เช่น *Halymenia dutyillei* ในประเทศไทยมีสาหร่ายทะเลอยู่ประมาณ 350 ชนิด เป็นสาหร่ายสีเขียว 100 ชนิด สาหร่ายสีแดง 180 ชนิด และสาหร่ายสีน้ำตาล 70 ชนิด นอกจากทำหน้าที่ดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำทะเลเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงแล้ว สาหร่ายทะเลยังมีประโยชน์หลายอย่างกับสัตว์น้ำในทะเลและมนุษย์ โดยเฉพาะการใช้เป็นอาหาร สัตว์น้ำในทะเลกินสาหร่ายเป็นอาหาร มนุษย์เองก็ใช้สาหร่ายเป็นอาหารเช่นเดียวกัน โดยมีทั้งใช้บริโภคโดยตรงในรูปของสาหร่ายสด เช่น สาหร่ายพวงองุ่นหรือสาหร่ายช่อพริกไทย ที่ได้รับการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงในรูปแบบพืชเศรษฐกิจตามแนวชายฝั่งทะเลของไทย และมีวางจำหน่ายทั่วประเทศ หรือการนำสาหร่ายทะเลมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น สาหร่ายทะเลทอดกรอบ สาหร่ายทะเลอบแห้ง เป็นต้น

สาหร่ายทะเลมีแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อมนุษย์อยู่หลายชนิด เช่น แคลเซียม คลอรีน โครเมียม โคบอลต์ ทองแดง ไอโอดีน เหล็ก แมกนีเซียม ซีลีเนียม โซเดียม ซัลเฟอร์ วานาเดียม และสังกะสี เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ผู้บริโภคควรตระหนักและพึงระวังสารปนเปื้อนในสาหร่าย เนื่องจากเป็นพืชที่มาจากทะเลหากน้ำทะเลบริเวณนั้นไม่สะอาด เช่น อยู่ใกล้แหล่งอุตสาหกรรม ก็มีโอกาที่สาหร่ายทะเลนั้นจะปนเปื้อนโลหะหนัก เช่น สารหนูปรอท แคดเมียม และตะกั่วได้ (Santos-Silva et al., 2018) โลหะหนักมีความเป็นพิษ และไม่มีประโยชน์ใดๆต่อร่างกาย ปริมาณโลหะหนักที่พบในอาหารส่งผลกระทบต่อสุขภาพด้านสุขภาพ การหาปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสาหร่ายทะเลจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อสุขภาพและอนามัยของผู้บริโภค หน่วยงานด้านสาธารณสุขจึงได้มีการกำหนดระดับความเป็นพิษที่ยอมรับได้ไว้ เช่น องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (FAO/WHO) ได้กำหนดปริมาณสูงสุดที่ร่างกายผู้ใหญ่จะรับแคดเมียมได้ไว้ที่ 7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว และตะกั่วไว้ที่ 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว (World Health Organization, 1992) กระทรวงสาธารณสุขของไทยกำหนดเกณฑ์การปนเปื้อนของตะกั่วในอาหารสูงสุดไว้ที่ปริมาณตะกั่ว 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2563) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนดการปนเปื้อนสูงสุดของแคดเมียมในสาหร่ายพร้อมบริโภคในสภาพแห้ง ให้สูงสุดได้ไม่เกิน 2 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2561) ส่วนกระทรวงอุตสาหกรรมของไทย ได้กำหนดเกณฑ์การปนเปื้อนสูงสุดของตะกั่ว และแคดเมียมในสาหร่ายทะเลอบตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.515/2547) ไว้ที่

ปริมาณตะกั่วไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และปริมาณแคดเมียมไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2547)

การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในอาหาร นิยมใช้เทคนิคอะตอมมิกสเปกโตรเมตรี (atomic spectrometry) เช่น เฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี (flame atomic absorption spectrometry; FAAS) แกรไฟต์เฟิร์นอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี (Graphite furnace atomic absorption spectrometry; GFAAS) อินดักทีฟคัปเพิลพลาสมาแมสสเปกโตรเมตรี (Inductively coupled plasma-mass spectrometry; ICP-MS) เป็นต้น ซึ่งเทคนิคเหล่านี้สามารถตรวจวัดปริมาณโลหะในอาหารได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สะดวกและรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม ความล่าช้าในการตรวจวัดและรายงานผลการวิเคราะห์มักเกิดขึ้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมก่อนนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณ การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และสามารถเตรียมตัวอย่างพร้อมๆ กันได้หลายตัวอย่าง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และลดระยะเวลาในการให้บริการ รวมทั้งลดต้นทุนในการวิเคราะห์ลงได้

ในงานวิจัยนี้ จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย และรวดเร็ว โดยวิธีการย่อยตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูง สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ แคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ ร่วมกับการตรวจวัดปริมาณโลหะด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสาหร่ายทะเลกินได้ โดยการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง (Ultrasound-assisted digestion, UAD)

1.2.2 เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม และตะกั่ว ด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี (Flame atomic absorption spectrometry, FAAS)

1.2.3 เพื่อประยุกต์ใช้วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม และตะกั่วที่ปนเปื้อนในสาหร่ายทะเลที่กินได้ ซึ่งมีวางจำหน่ายในท้องตลาด ด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1.3.1 ทวนสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโลหะแคดเมียม และตะกั่ว ด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมตรี

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และประสิทธิภาพในการย่อยตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ โดยการย่อยตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูง และเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมตัวอย่างมาตรฐานด้วยการย่อยด้วยกรดแบบเปียก (Wet digestion)

1.3.3 วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม และตะกั่ว ในตัวอย่างสาหร่ายพร้อมบริโภคนิคมในสภาพแห้งที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด ได้แก่ ขนมอบเคี้ยวประเภทสาหร่าย สาหร่ายแกงจืด สาหร่ายห่อซูชิ และสาหร่ายที่นิยมนิคมบริโภคแบบสาหร่ายสด ได้แก่ สาหร่ายพวงองุ่น

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้วิธีการเตรียมตัวอย่าง และวิธีวิเคราะห์โลหะแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลกินได้โดยใช้เฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมตรีที่มีความถูกต้อง รวดเร็ว ง่าย และประหยัดสารเคมี

1.4.2 ได้ข้อมูลปริมาณโลหะแคดเมียม และตะกั่วปริมาณน้อยที่ปนเปื้อนในตัวอย่างสาหร่ายพร้อมบริโภคนิคมในสภาพแห้งและสาหร่ายพวงองุ่นที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายทะเล (Seaweeds)

สาหร่ายทะเลมีแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อร่างกายอยู่หลายชนิด เช่น ทองแดง สังกะสี แต่อาจจะมี การปนเปื้อนของโลหะหนักบางชนิดที่ไม่เกิดประโยชน์ และส่งผลเสียต่อสุขภาพ เช่น สารหนู แคดเมียม โปรท และตะกั่ว ซึ่งโลหะหนักเหล่านี้ อาจจะปนเปื้อนมาจากสิ่งแวดล้อม (Filippini et al., 2020) หรือน้ำทะเล เพราะสาหร่ายเป็นพืชที่มาจากทะเล หากน้ำทะเลบริเวณนั้นไม่สะอาด เช่น อยู่ใกล้แหล่งอุตสาหกรรม สิ่งทอ ยานยนต์ หรืออิเล็กทรอนิกส์ ก็มีโอกาที่สาหร่ายทะเลนั้นจะปนเปื้อนโลหะหนัก เช่น แคดเมียม และ ตะกั่วได้ (Santos-Silva et al., 2018)

2.2 โลหะหนัก (heavy metal)

โลหะหนัก หมายถึง แร่ธาตุที่มีประจุไฟฟ้าบวก มีความหนาแน่นสูงกว่า 5 กรัมต่อลิตร มีคุณสมบัติ เป็นของแข็ง ยกเว้นปรอทซึ่งเป็นของเหลว ณ อุณหภูมิปกติ นำไฟฟ้าและนำความร้อนได้ดี มีลักษณะมัน วาวเหนียว และสามารถดัดงอได้ไม่แตกหัก มีจุดเยือกแข็งและจุดหลอมเหลวแน่นอน สามารถรวมตัวกับ สารประกอบอื่นๆ กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้หลายรูปแบบที่เสถียรกว่าโลหะอิสระ (ภัทรารวรรณ, 2543)

โลหะหนักพบได้โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ อากาศ มนุษย์นำโลหะหนักมาใช้ประโยชน์ ในทางอุตสาหกรรมหลายชนิด (จิรศักดิ์, 2555) จากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์ทำให้ทราบว่าโลหะหนัก หลายชนิดเป็นอันตรายต่อพืชและสัตว์แตกต่างกันไป ความเป็นพิษของโลหะหนักเกิดจากการที่ร่างกาย ได้รับเข้าไปทางระบบต่างๆ ทำให้ไปรบกวนการทำงานของระบบเอนไซม์ของเซลล์ และจับยึดเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การควบคุมการลำเลียงสารต่างๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติไป โลหะหลักบางชนิดมีผลต่อสมบัติ ทางด้านโครงสร้างหรือเคมีไฟฟ้าของเซลล์ โดยระดับความเป็นพิษของโลหะหนักอาจมีอาการแสดงตั้งแต่ไม่ รุนแรงไปจนถึงขั้น เสียชีวิตได้ และอาจสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจากสะสมตั้งแต่ปริมาณน้อยๆ และเพิ่ม มากขึ้นจนถึงขีดที่ร่างกายแสดงอาการออกมา เรียกว่า เป็นพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity)

พูน ปณ จิตโต สีเว

2.3 ชนิดของโลหะหนักที่ศึกษา

โลหะหนักที่ทำการศึกษามี 2 ชนิด คือ ตะกั่ว และแคดเมียม

2.3.2 แคดเมียม

แคดเมียม (Cadmium, Cd) จัดเป็นแร่โลหะหนัก มีลักษณะสีขาว มีความอ่อนตัว เป็นมันเงา หรือเป็นผง เม็ดละเอียดสีเทาพบในธรรมชาติในรูปของสารประกอบซัลไฟด์ และมักพบร่วมกับสังกะสี และทองแดง โดยทั่วไปจะเข้าสู่ร่างกายโดยทางกินผ่านระบบทางเดินอาหารกับอาหารหรือน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อน และจากการหายใจเอาไอพิษแคดเมียม ละอองหรือฝุ่นที่มีการปนเปื้อนแคดเมียมในอากาศ โดยเฉพาะบริเวณการทำเหมืองแร่ การหลอมสังกะสี ทองแดง และตะกั่ว แคดเมียม หรือ อีกชื่อหนึ่ง คือ Colloidal cadmium เป็นโลหะหนักที่มีประจุบวก 2 ประจุ ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1817 โดยมีรากศัพท์มาจากภาษาละตินว่า Cadmia และ ภาษาทางการคำว่า Kadmeia มีสัญลักษณ์ทางเคมี คือ Cd โดยมีเลขอะตอม และมวลอะตอมเท่ากับ 48 และ 112.40 g/mol ตามลำดับ โครงสร้างเป็นรูปหกเหลี่ยม (Hexagonal structure) จัดเป็นธาตุทรานซิชัน (Transition metal) ที่อยู่ในกลุ่ม IIB ตามตารางธาตุ

2.3.1 ตะกั่ว

ตะกั่ว (Lead, Pb) เป็นโลหะอ่อนที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ มีสีเทาเงินหรือแกมน้ำเงิน สามารถรีดหรือตีขึ้นรูปได้ง่าย นำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน โดยเฉพาะการผลิตแบตเตอรี่ อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ สี และหัวกระสุน เป็นต้น ตะกั่วจะขยายตัวได้มากเมื่อได้รับความร้อน มีความหล่อลื่นในตัวเอง ทนทานต่อการกัดกร่อน สามารถผสมกับโลหะต่างๆ เป็นโลหะผสม (alloys) ได้หลายชนิด สารประกอบของตะกั่วส่วนมากไม่ละลายน้ำ หรือละลายในน้ำได้เล็กน้อย แต่ละลายได้ดีในกรดไนตริก และกรดกำมะถันที่ร้อน โดยทั่วไปไม่มีสีหรือไม่มีสี แต่ออกไซด์ของตะกั่วจะมีสีเหลืองหรือสีส้ม ส่วนไดออกไซด์มีสีเทาหรือดำ ตะกั่วอาจอยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์บางชนิดซึ่งสามารถละลายน้ำได้ และกรดกำมะถันเข้มข้นที่ร้อน ทั้งนี้ ตะกั่ว ที่ใช้บนโลกถูกผลิตมาจากเหมืองตะกั่วเป็นหลัก (เบญจวรรณ วงศ์ศิริ, 2547)

2.4 เกณฑ์การปนเปื้อนโลหะแคดเมียมและตะกั่วในสาหร่าย และอาหารของไทย

แคดเมียมและตะกั่ว เป็นโลหะหนักที่เป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ หน่วยงานราชการที่ทำหน้าที่ในการควบคุมสุขภาพ และอนามัยของประชาชน จึงได้ออกมาตรฐานเพื่อควบคุมปริมาณแคดเมียมและตะกั่วที่ยอมให้มีได้สูงสุดในสาหร่ายและอาหารบางชนิด ดังสรุปในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 มาตรฐานของสารปนเปื้อนในสาหร่าย และอาหารของไทย

สารปนเปื้อน	เกณฑ์กำหนด		
	มผช. 515/2547 ^[1]	อย. 61 ^[2]	สาธารณสุข 63 ^[3]
Cd (mg/Kg)	ไม่เกิน 0.2	ไม่เกิน 2.0	-
Pb (mg/Kg)	ไม่เกิน 1.0	-	ไม่เกิน 1.0

^[1] ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 515 (พ.ศ. 2547) เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนสาหร่ายทะเลอบ

^[2] ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดของแคดเมียมในอาหารบางชนิด ณ วันที่ 30 สิงหาคม 2561

^[3] ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 (พ.ศ.2563) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน

2.5 การวิเคราะห์โลหะหนักด้วยเทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรสโกปี

การจำแนก (identify) ธาตุชนิดต่างๆ โดยอาศัยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นจำเพาะของอะตอมธาตุแต่ละชนิดได้ถูกนำมาใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ.1955 แต่เริ่มใช้กันอย่างแพร่หลายมากในช่วงปี ค.ศ. 1963-1965 เนื่องจากสามารถสร้างเครื่องมือวัดการดูดกลืนแสงของอะตอม (atomic absorption spectrometer, AAS) ที่มีความถูกต้องและความแม่นยำสูงได้ อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์ธาตุที่มีปริมาณน้อยๆได้ดี ในปัจจุบันเครื่องดังกล่าวได้ถูกพัฒนามาจนสามารถวิเคราะห์ธาตุได้ไม่น้อยกว่า 70 ชนิด ในสารตัวอย่างเกือบทุกชนิด ตัวอย่างธาตุเหล่านี้ได้แก่ Cu, Zn, Cd, Sb, Bi, Fe, Co, Mn, Ni, Ag, Au, Pb, Ca, Sn, As, Ge, Se, Te, Ru, Os, Ir, Al, Si, Be, Sr, Ba, P, S, silicon ฯลฯ แต่เนื่องจากเครื่องมือดังกล่าวมีราคาสูงมาก การใช้งานจึงไม่แพร่หลายในห้องปฏิบัติการทั่วไป เหมือนเครื่องมือวิทยาศาสตร์อื่นๆ

2.5.1 องค์ประกอบและคุณสมบัติ

เครื่องมือวัดการดูดกลืนแสงของอะตอม มีองค์ประกอบหลักคล้ายกับเครื่องมือวัดการดูดกลืนแสง กล่าวคือ มีหลอดไฟกำเนิดแสง (light source) มีเปลวไฟที่ทำหน้าที่เหมือนคิวเวทท์ มีตัวแยกแสง (monochromator) มีภาชนะขยายสัญญาณและภาคแสดงผล แต่เพื่อให้ปริมาณธาตุมีความถูกต้องสูง จึงจำเป็นต้องมีระบบไมโครโพรเซสเซอร์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบการวิเคราะห์ตัวอย่างเช่น ระบบควบคุมอัตราการขยายสัญญาณอัตโนมัติ (automatic gain control) ระบบการแก้การรบกวนจากพื้นหลัง (background correction) และโปรแกรมการคำนวณต่างๆ ฯลฯ เครื่องมือวัดการดูดกลืนแสงของอะตอม

โดยทั่วไป มีองค์ประกอบที่สำคัญต่างๆ ของเครื่องเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์มี 5 ส่วนด้วยกัน คือ

1. แหล่งกำเนิดแสง (light source)
2. ส่วนที่ทำให้ธาตุกลายเป็นอะตอมอิสระ (atomizer)
3. โมโนโครเมเตอร์ (monochromator)
4. ดีเทคเตอร์ (detector)
5. เครื่องประมวลผล และอ่านผล (data system and read-out units)

2.5.2 แหล่งกำเนิดแสง (light source)

โดยทั่วไปแหล่งกำเนิดแสงใช้เป็น hollow cathode lamps (HCL) และ electrodeless discharge lamps (EDL) ซึ่งใช้เฉพาะบางธาตุเท่านั้น ทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติและลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน ดังนี้

2.5.2.1 Hollow cathode lamp (HCL)

ประกอบไปด้วย ขั้วบวก (anode) ที่ทำจากทังสเตน และขั้วลบ (cathode) ประกอบไปด้วยธาตุเดี่ยวและธาตุผสม (เมื่อต้องการใช้หลอด 1 อันสำหรับวิเคราะห์หลายๆธาตุ) ชนิดเดียวกับธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ ขั้วทั้งสองบรรจุอยู่ในกระบอกแก้วปิดที่มีแก๊สเฉื่อยนีออน แก๊สอาร์กอน หรือแก๊สฮีเลียมมีความดันประมาณ 1 – 5 ทอร์ เมื่อขั้วทั้งสองได้รับความต่างศักย์ประมาณ 200 – 400 โวลต์ แก๊สเฉื่อยจะแตกตัวออกเป็นไอออน (ionization) และเกิดกระแสอิเล็กตรอนระหว่างขั้วทั้งสองประมาณ 5 – 10 มิลลิแอมป์ ความต่างศักย์ที่สูงจะทำให้อะตอมของแก๊สมีประจุบวก (gaseous cation) วิ่งชนแคโทด ทำให้เกิดกลุ่มอะตอม (atomic cloud) ในสถานะกระตุ้น (excited state) เมื่อพลังงานลดลงจะปล่อยคลื่นแสงที่มีความจำเพาะสำหรับแต่ละธาตุออกมา อะตอมส่วนใหญ่จะกลับไปเกาะที่แคโทดและส่วนน้อยเกาะที่ผิวแก้ว อายุการใช้งานของหลอดอยู่ในช่วง 100 – 300 ชั่วโมง หลอดที่ขั้วลบทำด้วยธาตุที่ระเหยง่ายตัวอย่างเช่น Na, As, Sb, Bi, Mg, Pb มีอายุการใช้งานสั้นกว่าธาตุที่ระเหยยาก การเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วหลอดจะทำให้แสงที่ปล่อยออกมา มีความเข้มข้น แต่ถ้าเพิ่มมากเกินไปจะทำให้เกิดอะตอมอิสระพลังงานต่ำมากขึ้น ทำให้ดูดกลืนแสงที่ปล่อยออกมาจากอะตอมพลังงานสูงไว้เอง (self-absorption) เป็นผลให้ความเข้มข้นแสงจากหลอดไฟกำเนิดแสงลดลง

2.5.2.2 Electrodeless Discharge Lamps (EDL)

ภายในหลอดแก้วบรรจุไว้ด้วยเกลือของธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ และขดลวดเหนี่ยวนำ (RF coil) ซึ่งพันอยู่บนเซรามิกซ์ เมื่อขดลวดได้รับกระแสไฟฟ้าจะเหนี่ยวนำ และจะทำให้เกลือของธาตุกลายเป็นไอและแตกตัวเป็นไอออน ขณะที่พลังงานลดลงจะปล่อยแสงที่สว่างและมีความยาวคลื่นจำเพาะสำหรับแต่ละธาตุออกมา หลังจากนั้นความต่างศักย์จะลดลงอยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการรักษาความคงที่ของการแตกตัวของไอออนธาตุและความเข้มของแสง ความต่างศักย์ที่สูงขึ้นจะทำให้ความเข้มแสงเข้มข้น แต่ความกว้างของความยาวคลื่นแสงที่ปล่อยออกมาจะกว้างขึ้น เป็นผลให้ความไวในการวิเคราะห์ลดลง

หลอดชนิดนี้มีข้อดีกว่า HCL อย่างน้อย 4 ประการคือ มีอายุการใช้งานที่นานกว่า โดยมีอายุการใช้งานนานถึง 1,000 ชั่วโมง, ปล่อยแสงที่มีความเข้มมากกว่า (5 เท่าสำหรับหลอดชนิด Te และ 100 เท่า สำหรับหลอดชนิด Ge, มีความไวดีกว่า As, Hg) และมีขีดจำกัดการวิเคราะห์ช่วงที่ต่ำ (lower detection limit) ดีกว่าหลอดชนิด As, Bi, Cd, Ge, Hg, Pb, Sn, Te, Tl และ Zn ถึงแม้ว่าจะมีคุณสมบัติที่เด่นกว่าก็ตาม แต่ในทางการค้าสามารถผลิตหลอดชนิดสำหรับวิเคราะห์ธาตุได้เพียง 10 กว่าชนิดเท่านั้น ตัวอย่างเช่น As, Bi, Cd, Ge, Cs, Hg, P, Pb, Rb, Sn, Te, Tl และ Zn ฯลฯ

2.5.3 ส่วนประกอบที่ทำให้ธาตุกลายเป็นอะตอมอิสระ (The Atomization Process หรือ Atomizer)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AAS นั้น จะประสบความสำเร็จมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณของอะตอมอิสระของธาตุที่ทำให้เกิดขึ้น เพราะอะตอมอิสระเป็นตัวดูดกลืนแสงที่จะทำการวัดโดยเลือกใช้ความยาวคลื่นของแสงที่เหมาะสมผ่านเข้าไป ดังนั้น ความสำคัญจึงอยู่ที่การทำให้ธาตุที่มีอยู่ในสถานะสารละลายตัวอย่างแตกตัวเป็นอะตอมอิสระที่สถานะพื้นได้มากๆ วิธีนี้นิยมใช้กันคือ กระบวนการทำให้ธาตุแตกตัวเป็นอะตอมอิสระด้วยเปลวไฟ (Flame Atomization) กระบวนการนี้สารตัวอย่างจะต้องเป็นสารละลายที่เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีสารแขวนลอยอยู่ ตัวทำละลายจะเป็นน้ำหรือสารอินทรีย์ก็ได้ กระบวนการ atomization มี 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. Nebulization เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนของเหลวให้เป็นละอองเล็กๆ (mist) ด้วยเครื่องเรียกว่า nebulizer
2. Droplet precipitation เป็นกระบวนการที่ละอองเล็กๆ ของสารละลาย รวมกันเป็นหยดสารละลายโต ไม่สามารถลอยอยู่ในอากาศได้ จึงตกลงมาแล้วออกทางท่อน้ำทิ้ง (drain)
3. Mixing เป็นกระบวนการที่ละอองเล็กๆ ของสารละลายเกิดผสมกับแก๊ส เชื้อเพลิง (fuel) และออกซิเจนใน spray chamber ของ nebulizer
4. Desolvation เป็นกระบวนการที่ตัวทำละลายที่อยู่ในละอองเล็กนั้นถูกกำจัดไป ทำให้เกิดเป็นอนุภาคเล็กๆ ของสารประกอบ กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นตอนล่างของเปลวไฟ
5. Compound decomposition เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในเปลวไฟ โดยที่พลังงานความร้อนจากเปลวไฟจะไปทำให้สารประกอบเกิดการแตกตัวเป็นออกไซด์ เป็นโมเลกุล และเป็นอะตอมอิสระ บางครั้งอาจเกิดการกระตุ้นหรือเกิดไอออไนเซชันต่อไปได้

2.5.4 โมโนโครมาเตอร์ (Monochromator)

หน้าที่หลัก คือ ใช้แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นของแสงที่ต้องการ (wavelength selector)

2.5.5 เครื่องตรวจวัด (Detector)

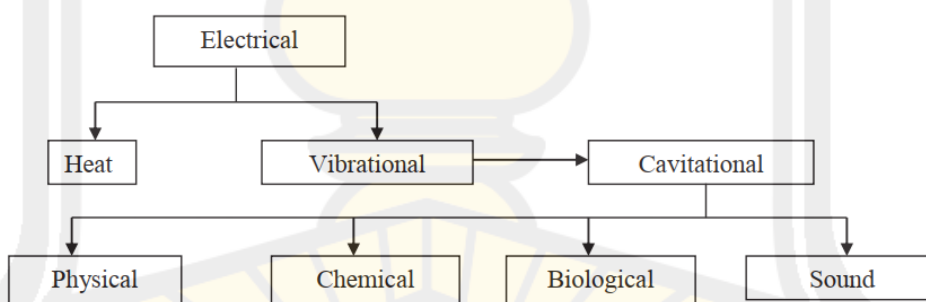
ที่นิยมใช้ คือ photo Multiplier Tube (PMT) เนื่องจากมีความไวในการตรวจวัดสูง และให้การตอบสนองที่สม่ำเสมอตลอดช่วงความยาวคลื่นแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตและวิสิเบิล (นวลศรี, 2535) ภายในหลอดประกอบไปด้วยแคโทด แอโนด และอิเล็กโทรด มีไดโนด 9 ชุด กระจายอยู่ทั่วหลอดโฟโตมัลติไฟเออร์ เมื่อแสงโฟตอนตกกระทบบที่ขั้วแคโทด ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกมาแล้ววิ่งไปที่ไดโนด

2.5.6 เครื่องประมวลผลและอ่านผล (data system and read – out units)

เครื่องจะประมวลผลออกมาในรูปของการดักคลื่นแสงหรือค่าแอมป์เซอร์แบนซ์

2.6 การย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง

คลื่นความถี่สูง (Ultrasound) เป็นคลื่นความถี่สูงกว่า 20 KHz จนถึง 10^6 KHz ซึ่งเป็นช่วงความถี่ที่หูของมนุษย์ไม่สามารถได้ยิน เพราะหูของมนุษย์ได้ยินเสียงในช่วงความถี่ 16 - 16,000 Hz ความถี่ที่สูงนี้ก่อให้เกิดผลทางเคมี (Chemical) ผลทางชีววิทยา (Biological) และทางกายภาพ (Physical) ในรูปแบบต่างๆ กล่าวคือ คลื่นความถี่สูงที่มีความแรงมากจะทำให้เกิดฟองอากาศ เกิดความดัน และเกิดความร้อนเฉพาะที่ ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางชีววิทยา ทางกายภาพ และทางเคมี สำหรับทางเคมีพบว่าทำให้เกิดการออกซิเดชัน (Oxidation) การสลาย (Decomposition) การเปล่งแสง (Luminescence) การเกิดผลึก (Crystallization) เป็นต้น



รูปที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงพลังงานของเครื่องอัลตราซาวด์

หลักการทำงานของเครื่องอัลตราซาวด์ นั้นจะแปลงพลังงานไฟฟ้าเป็นพลังงานความร้อนและพลังงานสั่นสะเทือน จากนั้นพลังงานสั่นสะเทือนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นพลังงานที่ทำให้เกิด และสลายตัวของฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมาก เรียกกระบวนการนี้ว่า cavitation และจะถูกเปลี่ยนเป็นผลทางเคมี ทางกายภาพ หรือทางชีววิทยานั้นขึ้นอยู่กับการใช้งาน และสภาพแวดล้อมของการเกิดปฏิกิริยา โดยทั่วไปผลของอัลตราซาวด์ในปฏิกิริยาเคมีมาจากพลังงานที่เกิดจาก cavitation คือการก่อตัว และยุบตัวของฟองอากาศในของเหลว ที่เกิดจากการขยายตัวและบีบอัดของความดันในเครื่องอัลตราซาวด์ ซึ่งนั่นเป็นผลมาจากแรงดันเชิงลบ และแรงดันเชิงบวกตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะก่อตัวเป็นฟองซึ่งเต็มไปด้วย

ตัวทำละลาย ไอตัวละลาย และแก๊ส ฟองอากาศเหล่านั้นจะขยายตัว และบีบอัดซ้ำๆ เมื่อฟองอากาศเกิดการยุบตัวจะสร้างความร้อน และแรงดันในระดับสูงมากเช่นเดียวกับการเพิ่มมวล และถ่ายเทความร้อนในตัวกลางเนื่องจากการก่อตัวของฟองอากาศซ้ำๆวนไปมา เป็นต้น (Tan, Shiou Xuan. et al., 2019)

การย่อยด้วยกรดร่วมกับคลื่นความถี่สูง เป็นการนำคลื่นความถี่สูงมาทำให้กรดเกิดการละลาย และแทรกซึมเข้าไปในตัวอย่งที่ต้องการย่อย อย่างไรก็ตามองค์ประกอบเหล่านี้ที่เป็นเฟสของเหลวนั้นเป็นเพียงขั้นตอนการย่อยอีกแบบหนึ่งที่ยังไม่สมบูรณ์จึงต้องมีการกรองในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้ยังมีโลหะบางชนิดที่ไม่สามารถย่อยด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงได้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะในสาหร่ายทะเลกินได้

มีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในสาหร่ายทะเลกินได้จากหลากหลายพื้นที่ทั่วโลก เช่น ปริมาณโลหะหนักปนเปื้อนของสาหร่ายทะเลในเกาหลีใต้ (Khan et al., 2015) ปริมาณโลหะหนักในสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลและสีแดงจากมหาสมุทรแอตแลนติกใต้ (Santos-Silva et al., 2018) ปริมาณโลหะหนักในสาหร่ายทะเลที่นิยมบริโภคในยุโรป (Paz et al., 2019) ปริมาณโลหะหนักในสาหร่ายทะเลกินได้จากตลาดในอิตาลี (Filippini et al., 2020) ปริมาณธาตุ 21 ชนิดในสาหร่ายทะเลกินได้สามสปีชีส์ที่นำเข้าจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Miedico et al., 2017) ปริมาณโลหะที่สะสมในสาหร่ายทะเลกินได้ที่เก็บจากอ่าวทางตะวันออกเฉียงใต้ของอินเดีย (Arulkumar et al., 2019) เป็นต้น

2.7.2 เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณโลหะหนักในสาหร่ายทะเล

เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณโลหะหนักในสาหร่ายทะเล เช่น เทคนิคอินดักทีฟพลาสมาแมสสเปกโตรเมตรี (Inductively couple plasma-mass spectrometry; ICP-MS) (Filippini et al., 2020; Paz et al., 2019) เทคนิคอินดักทีฟพลาสมาออปติคอลอีมิสชันสเปกโตรเมตรี (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry; ICP-OES) (Domínguez-González et al., 2005) เทคนิคแกรไฟต์เฟอว์เนสอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี (Graphite furnace atomic absorption spectrophotometer; GF-AAS) (Santos-Silva et al., 2018) เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปก่อนการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักด้วยเทคนิคเหล่านี้ จะต้องทำการเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวัด โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างที่นิยมใช้ เช่น การย่อยด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave digestion) (Roleda et al., 2019; Miedico et al., 2017; Khan et al., 2015) การย่อยด้วยกรดแบบเปียก (wet acid digestion) (Arulkumar et al., 2019) เป็นต้น ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่างดังกล่าว มีข้อจำกัดในเรื่องของการใช้สารเคมีปริมาณมาก ขั้นตอนในการเตรียมซับซ้อน และใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างนาน หากมีตัวอย่างจำนวนมากอาจทำให้การวิเคราะห์ และการออกผลล่าช้า

2.7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักโดยการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง

การเตรียมตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูงหรือคลื่นอัลตราซาวนด์ (ultrasound-assisted sample pretreatment) เป็นหนึ่งในวิธีทางเคมีวิเคราะห์สะอาด (green analytical chemistry) ซึ่งมีขั้นตอนที่สะอาด ปลอดภัย ใช้เวลาสั้น (น้อยกว่า 1 ชั่วโมง) และใช้ปริมาณหรือความเข้มข้นของตัวทำละลายและพลังงานไม่มาก (Bendicho et al., 2012) โดยคลื่นความถี่สูงที่ใช้การเตรียมตัวอย่างแบบนี้จะมีส่วนช่วยในการละลายสารออกจากตัวอย่างที่เป็นของแข็งจากการเกิดปรากฏการณ์ acoustic cavitation (Priego-Capote and Luque de Castro., 2007) มีรายงานการประยุกต์ใช้การเตรียมตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูงสำหรับการย่อยสาหร่ายทะเลกินได้เพื่อการวิเคราะห์โลหะบางชนิด (Neher et al., 2018; Domínguez-González et al., 2005) การย่อยนมผงสำหรับทารกเพื่อหาปริมาณ Zn, Fe, Mg, Ca, Na, K (Gamela et al., 2019) การย่อยข้าวออร์แกนิกสำหรับการวิเคราะห์แคดเมียมและตะกั่ว (Siriangkhawut et al., 2017a) การย่อยสมุนไพรไทยสำหรับการหาปริมาณแคดเมียมและตะกั่ว (Siriangkhawut et al., 2017b) การย่อยอาหารสุกรสำหรับการวิเคราะห์ธาตุต่างๆ (Saleh et al., 2015) การย่อยตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมและทางชีวภาพเพื่อการวิเคราะห์โลหะหนัก (Kazi et al., 2009) เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้ จึงสนใจที่จะนำเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นความถี่สูงมาประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง สำหรับการย่อยและสกัดโลหะหนักจากสาหร่ายทะเลกินได้ ก่อนนำสารละลายที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก เช่น แคดเมียมและตะกั่ว ด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรเมตรี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ (Instrument and apparatus)

1. เครื่อง Atomic Absorption Spectroscopy รุ่น 280FS Agilent technologies, Santa clara, CA, USA
2. เครื่อง Ultrasonic bath รุ่น CP 1100D, Crest Ultrasonics, NJ, USA
3. กระดาษกรองเบอร์ 1 ยี่ห้อ Whatman™
4. ไมโครปิเปตขนาด 20-200 μL , 100-1000 μL , 0.5-5 mL ยี่ห้อ Eppendorf Research plus
5. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ

3.2 สารเคมี (Chemical Reagent)

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายที่บริโภคได้

สารเคมี	Grade	บริษัทผู้ผลิต
1. 65% Nitric acid	AR	QRëC, New Zealand
2. 35% Hydrogen peroxide	AR	QRëC, New Zealand
3. Standard Cadmium solution 1000 mg/L	Standard for atomic absorption	Fisher Scientific, UK
4. Standard Lead solution 1000 mg/L	Standard for atomic absorption	Merck KGaA, Germany
5. Deionized (DI) water	-	Milli-Q, Millipore, USA

3.3 การเตรียมสารละลาย

3.3.1 สารละลายมาตรฐานแคดเมียม ความเข้มข้น 100 mg/L

ปิเปตสารละลายมาตรฐานแคดเมียมจากสารละลายมาตรฐาน 1000 mg/L มา 2500 μL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL และปรับปริมาตรจนครบด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.2 สารละลายมาตรฐานตะกั่ว ความเข้มข้น 25 mg/L

ปิเปตสารละลายมาตรฐานตะกั่วจากสารละลายมาตรฐาน 1000 mg/L มา 125 μL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 mL และปรับปริมาตรจนครบด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3 สารละลายมาตรฐานแคดเมียม ความเข้มข้น 6.25 mg/L

ปิเปตสารละลายมาตรฐานแคดเมียมจากสารละลายมาตรฐาน 100 mg/L มา 312.5 μL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 mL และปรับปริมาตรจนครบด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.4 สารละลายมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมชุดสารละลายมาตรฐานโดยการปิเปตสารมาตรฐานแคดเมียม และตะกั่ว ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3 และ 3.3.2 ตั้งรายละเอียดในตาราง 3.2 และ 3.3 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 mL

ตารางที่ 3.2 ปริมาตรของโลหะแคดเมียมที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้น (mg/L)	ปริมาตรสารที่ปิเปตมา		ปริมาตรรวม (mL)
	Cd 6.25 mg/L (μ L)	Conc.HNO ₃ (mL)	
0.00	0	2.5	25
0.01	40	2.5	25
0.05	200	2.5	25
0.10	400	2.5	25
0.15	600	2.5	25
0.20	800	2.5	25
0.25	1000	2.5	25

ตารางที่ 3.3 ปริมาตรของโลหะตะกั่วที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้น (mg/L)	ปริมาตรสารที่ปิเปตมา		ปริมาตรรวม (mL)
	Pb 25 mg/L (μ L)	Conc.HNO ₃ (mL)	
0.00	0	2.5	25
0.10	100	2.5	25
0.20	200	2.5	25
0.40	400	2.5	25
0.60	600	2.5	25
0.80	800	2.5	25
1.00	1000	2.5	25

3.4 ตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ ประเภทสาหร่ายพร้อมบริโภคในสภาพแห้ง

การทดลองนี้ได้นำตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ประเภทพร้อมบริโภคในสภาพแห้งที่มีขายตามท้องตลาด เช่น สาหร่ายประเภทขนมขบเคี้ยว สาหร่ายแกงจืด สาหร่ายห่อซูชิ จำนวนรวม 15 ตัวอย่าง รายละเอียดตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 รายละเอียดตัวอย่างสาหร่ายประเภทพร้อมบริโภคในสภาพแห้ง

ตัวอย่างที่	รหัส ตัวอย่าง	ประเภท สาหร่าย	ชื่อ/ชื่อทางการค้า	แหล่งผลิต	ลักษณะทาง กายภาพ
1	S1	ขนม	สาหร่ายอบกรอบซีลี โก๊ะ รสดั้งเดิม	บริษัท แคปิตัล เทรดดิ้ง จำกัด จ.สมุทรปราการ	เป็นแผ่นบางๆสี เขียวมีความมัน เล็กน้อย
2	S2	ขนม	สาหร่ายอบกรอบสไตล์ เกาหลี ตรามาซิเตะ รสดั้งเดิม(ออริจินัล)	บริษัท ไทย-โคเรียน ชีวิต จำกัด จ.ปทุมธานี	เป็นแผ่นสีเขียว มีความมัน เล็กน้อย
3	S3	ขนม	สาหร่ายอบกรอบ ตะวันแดง รสดั้งเดิม	บริษัท ทริปปิเล-เอ็ม โปรดักส์ จำกัด กรุงเทพฯ	เป็นแท่งม้วน กรอบ สีเขียว
4	S4	ขนม	สาหร่ายย่างม้วน ตราคาบูกิ รสออริจินัล	บริษัท สยามฟู้ดส์ อินดัสทรี จำกัด จ.นครปฐม	เป็นแท่งม้วน กรอบ สีเขียว น้ำตาล
5	S5	ขนม	สาหร่ายอบแห้งแก้วน้อย รสคลาสสิก	บริษัท แก้วน้อย ฟู้ดแอนด์มาร์เก็ตติ้ง จำกัด (มหาชน) จ.พระนครศรีอยุธยา	เป็นแผ่นสีเขียว มีความมัน เล็กน้อย
6	S6	ขนม	สาหร่ายย่างสไตล์ญี่ปุ่น ตราแก้วน้อย รสคลาสสิก	บริษัท แก้วน้อย ฟู้ดแอนด์มาร์เก็ตติ้ง จำกัด (มหาชน) จ.พระนครศรีอยุธยา	เป็นแท่งม้วน กรอบ สีเขียว
7	S7	ขนม	สาหร่ายทอดสไตล์ ญี่ปุ่น ตรากาแก้วน้อย รสคลาสสิก	บริษัท แก้วน้อย ฟู้ดแอนด์มาร์เก็ตติ้ง จำกัด (มหาชน) จ.พระนครศรีอยุธยา	เป็นแผ่นสีเขียว มีความมัน

ตารางที่ 3.4 รายละเอียดตัวอย่างสาหร่ายประเภทพืชมรกติกในสภาพแห้ง (ต่อ)

ตัวอย่างที่	รหัส ตัวอย่าง	ประเภท สาหร่าย	ชื่อ/ชื่อทางการค้า	แหล่งผลิต	ลักษณะทาง กายภาพ
8	S8	ขนม	สาหร่ายอบกรอบ ตราโนริ	ธราธรอนันต์ 27/13 ต. ลาดสวอย อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี	เป็นแท่งม้วน กรอบ สีเขียว
9	S9	ขนม	สาหร่ายทะเลปรุงรส ตราแพนด้า รสดั้งเดิม	บริษัท เอสแอนด์ที แอนเนอรัล ฟู้ด จำกัด จ.พระนครศรีอยุธยา	เป็นแผ่นบางๆ สีเขียว
10	W1	สำหรับใส่ แกงจืด	สาหร่ายแห้ง ตราปลาทอง	บริษัท เฮอริเทจ มาร์ เก็ตติ้ง จำกัด จ.สมุทรสาคร	เป็นแผ่นยาว ติดกัน สีเขียว ม้วน
11	W2	สำหรับใส่ แกงจืด	สาหร่ายแห้ง ตราภาษาจีน	GUTIANXIAN YITAILONG FOODCO., LTD	เป็นแผ่นกลม มีสีแดงอมม่วง
12	W3	สำหรับใส่ แกงจืด	สาหร่ายทะเล ตราต้นตะวัน	บริษัท ตะวันพืชผล จำกัด จ.สมุทรปราการ	เป็นแผ่นยาว ติดกัน มีสีม่วง อมเขียว
13	W4	สำหรับใส่ แกงจืด	สาหร่ายทะเลทำ แกงจืด ตราทาเบรุ	บริษัท เค เจ ซี อินเตอร์ฟู้ด จำกัด จ.ปทุมธานี	เป็นแผ่นสี เขียวเล็กๆ บางๆ
14	W5	สำหรับใส่ แกงจืด	สาหร่ายทะเลวากาเมะ อบแห้ง ตราทาเบรุ	บริษัท เค เจ ซี อินเตอร์ฟู้ด จำกัด จ.ปทุมธานี	เป็นแผ่นสี เขียวเข้ม หนา และแข็ง
15	Z1	สำหรับห่อ ข้าว ทำซูชิ	โรสเต็ด ซีวีด ยากิโน ริ(สาหร่ายสำหรับห่อ ข้าวสีเขียว) ตราแดซอง เอฟแอนด์ซี	บริษัท แดซอง เอฟ แอนด์ซี จำกัด ประเทศเกาหลีใต้	เป็นแผ่นใหญ่ บาง สีเขียว

3.5 ตัวอย่างสาหร่ายพวงองุ่น

สาหร่ายพวงองุ่น มีลักษณะเป็นเม็ดกลมเล็กๆ รวมกันเป็นช่อคล้ายกับพวงองุ่น ดังแสดงในรูปที่ 3.1 เป็นที่รู้จักในนามของ sea grape หรือ green caviar โดยนิยมบริโภคในลักษณะของสาหร่ายสด ในการทดลองนี้ได้นำตัวอย่างสาหร่ายพวงองุ่นที่มีขายตามท้องตลาด จำนวน 10 ตัวอย่าง สำหรับการเตรียมตัวอย่างสาหร่ายพวงองุ่นก่อนการวิเคราะห์ คือ ล้างสิ่งปนเปื้อนในสาหร่ายออกด้วยน้ำปราศจากไอออนให้สะอาด จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C แล้วนำมาบดจนเป็นผงละเอียด และเก็บไว้ในถุงพลาสติก รายละเอียดตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3.5



รูปที่ 3.1 สาหร่ายพวงองุ่น (sea grape)

ตารางที่ 3.5 รายละเอียดตัวอย่างสาหร่ายพวงองุ่น

ตัวอย่างที่	รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา
1	SG1	ศูนย์การค้าเสริมไทยคอมเพล็กซ์ จังหวัดมหาสารคาม
2	SG2	บิกซี ซูเปอร์เซ็นเตอร์ จังหวัดมหาสารคาม
3	SG3	ตำบลแหลมผักเบี้ย อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี
4	SG4	บ้านพักกาดสาหร่ายพวงองุ่น ตำบลบางแก้ว อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี
5	SG5	สาหร่ายพวงองุ่นบ้านฉาง ตำบลปายุบใน อำเภอวังจันทร์ จังหวัดระยอง
6	SG6	ภิญญามาศฟาร์มสาหร่ายพวงองุ่น ตำบลปากทะเล อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี

ตารางที่ 3.5 รายละเอียดตัวอย่างสาหร่ายพวงองุ่น (ต่อ)

ตัวอย่างที่	รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา
7	SG7	สาหร่ายพวงองุ่น Organic ตำบลบางแก้ว อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี
8	SG8	สาหร่ายพวงองุ่นเลี้ยงระบบอินทรีย์ อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี
9	SG9	ลูกปลาฟาร์มสาหร่ายพวงองุ่น อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี
10	SG10	สาหร่ายพวงองุ่น Lovegreencaviar อำเภอบ้านไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี

3.6 วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูง

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดมา 0.10 - 0.15 g ใส่ลงในหลอดแก้วที่มีฝา จากนั้นเติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 2 mL แล้ว pre-sonication เป็นเวลา 5 นาที นำไปย่อยด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 3.6 เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หลังจาก 10 นาทีของการย่อยครั้งแรกแล้ว นำหลอดแก้วตัวอย่างออกมาเติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ อีก 1 mL จากนั้นนำไปย่อยที่สภาวะเดียวกันอีก 10 นาที ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง จนได้ปริมาตรสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ รวม 4 mL และเวลารวมในการย่อยเป็น 30 นาที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้มา ปรับปริมาตรเป็น 10 mL แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ลงในหลอดเซ็นทรีฟิวกซ์ขนาด 15 mL นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FAAS โดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ทุกการทดลองจะทำการศึกษาซ้ำ 2 ซ้ำ

กรณีศึกษาร้อยละการได้กลับคืน จะเติมสารมาตรฐานแคดเมียม และตะกั่ว ปริมาตร 5 mg/L และ 40 mg/L ลงไปในตัวอย่างด้วยปริมาตร 100 และ 75 μL ตามลำดับ จากนั้นนำไปทำการย่อย และวิเคราะห์ด้วย FAAS เช่นเดียวกับตัวอย่าง

ตารางที่ 3.6 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง

ตัวแปรในการย่อย	ช่วงที่ทำการศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
ชนิดของออกซิแดนท์	HNO_3 H_2O_2 $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (1 : 1, 1 : 2, 2 : 1)	$\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2 : 1)
น้ำหนักตัวอย่าง	0.05, 0.10, 0.15, 0.20 g	0.10 – 0.15 g
เวลา pre-sonication	0, 5, 10 min	5 min
ปริมาตรของออกซิแดนท์ และเวลาในการย่อย	$\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) เติมครั้งละ 1-2 mL 10, 15, 20, 30 min	การเติมออกซิแดนท์ผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) เป็นลำดับครั้งละ 2, 1, 1 mL ทุกๆ 10 นาที เวลาในการย่อยรวม 30 นาที
อุณหภูมิในการย่อย	30 – 75 °C	60 °C
Frequency	-	45 kHz
Ultrasonic output power	-	360 W (power No. 9)

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม และตะกั่วด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรสโกปี

3.7.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือ

การหาค่า Characteristic concentration (Sensitivity) โดยใช้สารมาตรฐาน

1. ปรับสภาพของเครื่องมือให้เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์แคดเมียม โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน แคดเมียม ความเข้มข้น 0.6 mg/L โดยการปิเปตสารละลายแคดเมียม ความเข้มข้น 1000 mg/L ปริมาตร 30 μ L ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL เติมกรดไนตริกเข้มข้น 2.5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศไอออน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแคดเมียมเข้มข้น 0.6 mg/L

2. ปรับสภาพของเครื่องมือให้เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ตะกั่ว โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน ตะกั่ว ความเข้มข้น 5.0 mg/L โดยการปิเปตสารละลายตะกั่ว ความเข้มข้น 1000 mg/L ปริมาตร 250 μ L ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL เติมกรดไนตริกเข้มข้น 2.5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศไอออน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานตะกั่วเข้มข้น 5.0 mg/L

3.7.2 วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานตามหัวข้อ 3.3.4 และสารละลายตัวอย่างตามหัวข้อ 3.5
2. เปิดเครื่อง FAAS ประกอบ Hollow cathode lamp ของธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ เพื่อเป็นการอุ่นเครื่องให้พร้อมในการทำงานเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ค่าที่อ่านได้จากเครื่องมือมีความแน่นอน
3. การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของธาตุ แคดเมียม และตะกั่ว โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำไป ความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแคดเมียม และตะกั่ว ที่อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน
4. ทำการวิเคราะห์สารละลายแบลงค์ ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน แคดเมียม และตะกั่วที่เตรียมไว้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง FAAS ตามสภาวะในการวัดด้วยเครื่อง FAAS ดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 พารามิเตอร์ของเครื่อง FAAS สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม และตะกั่ว

Parameter	Cd	Pb
Wavelength (nm)	228.8	217.0
Lamp Current (mA)	4.0	10.0
Flame Type	Air/Acetylene	Air/Acetylene
Air Flow (L/min)	13.50	13.50
Acetylene Flow (L/min)	2.00	2.00
Slit Width (nm)	0.5	1.0
Burner Height (nm)	13.5	13.5

3.7.3 การทวนสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Verification)

3.7.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อหาช่วงการใช้งานที่เป็นเส้นตรง

เตรียมชุดของสารละลายมาตรฐานของแคดเมียม และตะกั่ว ตามวิธีการในหัวข้อ 3.3.5 จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง FAAS ตามหัวข้อ 3.6.2

3.7.3.2 การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

วิเคราะห์โดยเตรียมสารละลายแบลงค์ 10 ข้ว นำไปเติมกรดไนตริกเข้มข้น 2.5 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ 25 mL นำไปวัดด้วยเครื่อง FAAS คำนวณหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดย

$$\text{LOD} = 3\text{SD} \quad \dots\dots\dots(3.1)$$

$$\text{LOQ} = 10\text{SD} \quad \dots\dots\dots(3.2)$$

3.7.3.3 ค่าร้อยละการได้กลับคืน (%Recovery)

การคำนวณค่าร้อยละการได้กลับคืน สามารถคำนวณได้จากการเตรียมสารละลายตัวอย่างตามหัวข้อ 3.5 โดยการเติมสารละลายมาตรฐานแคดเมียม (Cd) และตะกั่ว (Pb) ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.3 mg/L ของแคดเมียม และตะกั่ว ตามลำดับ ลงในตัวอย่างที่จะทำการย่อย เพื่อหาร้อยละการได้กลับคืนตามสมการที่ 3.3

$$\% \text{Recovery} = \frac{C(\text{spiked}) - C(\text{unspiked})}{C(\text{add})} \times 100 \quad \dots\dots\dots(3.3)$$

เมื่อ C_{spiked} คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน

C_{unspiked} คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐาน

C_{add} คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

3.7.3.4 ความเที่ยง (Precision)

3.7.3.4.1 การทำซ้ำ (Repeatability)

เตรียมสารละลายมาตรฐานแคดเมียม ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/L และ 0.10 mg/L และของตะกั่วที่ความเข้มข้น 0.10 mg/L และ 0.40 mg/L ความเข้มข้นละ 11 ข้ว ตามวิธีการเตรียมสารในหัวข้อที่ 3.3.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FAAS ตามหัวข้อ 3.6.2 โดยทำการทดลองให้เสร็จสิ้นในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน คำนวณค่า $\bar{X}$, SD และ %RSD ของผลการทดสอบ

3.7.3.4.2 การทวนซ้ำ (Reproducibility)

เตรียมสารละลายมาตรฐานแคดเมียม ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/L และ 0.10 mg/L และของตะกั่วที่ความเข้มข้น 0.10 mg/L และ 0.40 mg/L ความเข้มข้นละ 1 ข้ว ตามวิธีการเตรียมสารในหัวข้อที่ 3.3.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FAAS ตามหัวข้อ 3.6.2 โดยทำการทดลองซ้ำเช่นเดิมเป็นเวลา 11 วัน คำนวณค่า $\bar{X}$, SD และ %RSD ของผลการทดสอบ

3.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่างด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

ทำการศึกษาสภาวะในการย่อยที่เหมาะสม โดยใช้ตัวอย่างสาหร่ายทะเลราตั้นตะวัน (W3) เป็นตัวแทนของตัวอย่างในการศึกษา

3.8.1 ชนิดของออกซิแดนท์

ทำการศึกษาชนิดของออกซิแดนท์ (Oxidant) คือ กรดไนตริก (HNO_3), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และออกซิแดนท์ผสมระหว่างกรดไนตริก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 2:1 ตามลำดับ ปริมาณที่ใช้ในการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 3.8 เติมสารละลายออกซิแดนท์ 2 mL จากนั้น pre-sonication 10 นาที นำไปย่อยด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 30 นาที (ทุก 10 นาที เติมตัวอย่างออกซิแดนท์ 1 mL)

ตารางที่ 3.8 ปริมาตรที่ใช้ในการศึกษาชนิดของออกซิแดนท์

หลอดที่	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ชนิดของตัว Oxidant (mL)				
		HNO_3	H_2O_2	$\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$		
				1:1	1:2	2:1
1	0.10	2+1+1	-	-	-	-
2	0.10	-	2+1+1	-	-	-
3	0.10	-	-	2+1+1	-	-
4	0.10	-	-	-	2+1+1	-
5	0.10	-	-	-	-	2+1+1

3.8.2 น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการย่อย

ทำการศึกษาน้ำหนักตัวอย่างที่เหมาะสมในการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง โดยการเปรียบเทียบร้อยละการได้กลับคืนของน้ำหนักตัวอย่างที่น้ำหนัก 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 กรัม ดังตารางที่ 3.9 โดยจะศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยตัวอย่างที่น้ำหนักละ 2 ข้ำ พร้อมกับตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน Spiked sample ของแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 0.05 mg/L และตะกั่วที่มีความเข้มข้น 0.3 mg/L อีก 2 ข้ำ รวมเป็นน้ำหนักละ 4 หลอด เติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 2 mL แล้ว pre-sonication เป็นเวลา 10 นาทีนำไปย่อยด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 1 mL นำไปย่อยที่สภาวะเดียวกันจนถึงเวลา 30 นาที (ทุก 10 นาที เติมกรดผสม 1 mL) จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ลงในหลอดเซันตริฟิวก์ขนาด 15 mL แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FAAS

ตารางที่ 3.9 สภาวะการทดลองในการศึกษาผลของน้ำหนักตัวอย่าง

หลอดที่	น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)	ปริมาตรสาร มาตรฐานที่เติม (μL)		ปริมาตรออก ซิแดนซ์ผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) (mL)	เวลา Pre- sonication (min)	เวลาใน การย่อย (min)	อุณหภูมิใน การย่อย (°C)
		Cd 5 mg/L	Pb 40 mg/L				
blank	-	-	-	2+1+1	10	10+10+10	70
1,2	0.05	-	-	2+1+1	10	10+10+10	70
3,4	0.05	100	75	2+1+1	10	10+10+10	70
5,6	0.10	-	-	2+1+1	10	10+10+10	70
7,8	0.10	100	75	2+1+1	10	10+10+10	70
9,10	0.15	-	-	2+1+1	10	10+10+10	70
11,12	0.15	100	75	2+1+1	10	10+10+10	70
13,14	0.20	-	-	2+1+1	10	10+10+10	70
15,16	0.20	100	75	2+1+1	10	10+10+10	70

3.8.3 เวลา pre-sonication

ศึกษาเวลา pre-sonication ที่เหมาะสมในช่วงเวลา 0, 5 และ 10 นาที ก่อนการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง โดยการเปรียบเทียบร้อยละการได้กลับคืนของการย่อย โดยจะศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยตัวอย่างที่เวลาละ 2 ชั่วโมง พร้อมกับตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน Spiked sample ของแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 0.05 mg/L และตะกั่วที่มีความเข้มข้น 0.3 mg/L อีก 2 ชั่วโมง รวมเป็นเวลาละ 4 ชั่วโมง รายละเอียดดังตารางที่ 3.10 เติมน้ำละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 2 mL แล้ว pre-sonication นำไปย่อยด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 1 mL นำไปย่อยที่สภาวะเดียวกันจนถึงเวลา 30 นาที (ทุก 10 นาที เติมน้ำละลายกรดผสม 1 mL) นำสารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ลงในหลอดเซ้นตริฟิวกซ์ขนาด 15 mL แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FAAS

ตารางที่ 3.10 สภาวะการทดลองในการศึกษาผลของเวลา pre-sonication

หลอดที่	น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)	ปริมาตรสารมาตรฐานที่ เติม (μL)		ปริมาตรออก ซิแดนซ์ผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) (mL)	เวลา Pre- sonication (min)	เวลาในการ ย่อย (min)	อุณหภูมิใน การย่อย ($^{\circ}\text{C}$)
		Cd 5 mg/L	Pb 40 mg/L				
blank	-	-	-	2+1+1	0	10+10+10	70
1,2	0.10	-	-	2+1+1	0	10+10+10	70
3,4	0.10	100	75	2+1+1	0	10+10+10	70
blank	-	-	-	2+1+1	5	10+10+10	70
5,6	0.10	-	-	2+1+1	5	10+10+10	70
7,8	0.10	100	75	2+1+1	5	10+10+10	70
blank	-	-	-	2+1+1	10	10+10+10	70
9,10	0.10	-	-	2+1+1	10	10+10+10	70
11,12	0.10	100	75	2+1+1	10	10+10+10	70

3.8.4 ปริมาตรออกซิแดนซ์ และเวลาที่ใช้ในการย่อย

ศึกษาปริมาตรออกซิแดนซ์ และเวลาที่เหมาะสมในการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง โดยการเปรียบเทียบร้อยละการได้กลับคืนของการย่อยที่ช่วงเวลา 10, 15, 20 และ 30 นาที โดยจะศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยตัวอย่างที่เวลาละ 2 ชั่วโมง พร้อมกับตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน Spiked sample ของแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 0.05 mg/L และตะกั่วที่มีความเข้มข้น 0.3 mg/L อีก 2 ชั่วโมง รวมเป็นเวลาละ 4 หลอด ในการศึกษาเวลาในการย่อยในการทดลองนี้จะเป็นเวลาในการย่อยต่อปริมาตรออกซิแดนซ์ที่เติมลงไปด้วย รายละเอียดดังตารางที่ 3.11 โดยการเติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 2 mL แล้ว pre-sonication เป็นเวลา 5 นาที นำไปย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ตามปริมาณออกซิแดนซ์และเวลาที่ใช้ในการย่อย คือ ชุดที่ 1 เติม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) ครั้งละ 1 mL ทุก 5 นาทีในการย่อย (รวมเวลาในการย่อยทั้งหมด 15 และ 20 นาที) และชุดที่ 2 เติม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) ครั้งละ 1 mL ทุก 10 นาทีในการย่อย (รวมเวลาในการย่อยทั้งหมด 20 และ 30 นาที) นำสารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ลงในหลอดเซ้นตริฟิวส์ขนาด 15 mL แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FAAS

ตารางที่ 3.11 สถานะการทดลองในการศึกษาผลของปริมาตรออกซิแดนซ์ และเวลาในการย่อย

หลอดที่	น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)	ปริมาตรสาร มาตรฐานที่เติม (μL)		ปริมาตรออก ซิแดนซ์ผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) (mL)	เวลา Pre- sonication (min)	เวลาใน การย่อย (min)	อุณหภูมิใน การย่อย (°C)
		Cd 5 mg/L	Pb 40 mg/L				
1,2	0.10	-	-	2	5	10	70
3,4	0.10	100	75	2	5	10	70
5,6	0.10	-	-	2+1	5	10+5	70
7,8	0.10	100	75	2+1	5	10+5	70
9,10	0.10	-	-	2+1+1	5	10+5+5	70
11,12	0.10	100	75	2+1+1	5	10+5+5	70
13,14	0.10	-	-	2+1	5	10+10	70
15,16	0.10	100	75	2+1	5	10+10	70
17,18	0.10	-	-	2+1+1	5	10+10+10	70
19,20	0.10	100	75	2+1+1	5	10+10+10	70

3.8.5 อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง โดยการเปรียบเทียบร้อยละการได้กลับคืนของการย่อยเมื่อไม่ตั้งอุณหภูมิ และที่ช่วงอุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 75 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการย่อย 30 นาที โดยจะศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยตัวอย่างที่อุณหภูมิละ 2 ชั่วโมง พร้อมกับตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน Spiked sample ของแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 0.05 mg/L และตะกั่วที่มีความเข้มข้น 0.3 mg/L อีก 2 ชั่วโมง รวมเป็นเวลาละ 4 หลอด รายละเอียดดังตารางที่ 3.12 เติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 2 mL แล้ว pre-sonication 5 นาที นำไปย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 1 mL นำไปย่อยที่สภาวะเดียวกันจนถึงเวลา 30 นาที (ทุก 10 นาทีเติมกรดผสม 1 mL) นำสารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ลงในหลอดเซ้นตริฟิวก์ขนาด 15 mL แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FAAS

ตารางที่ 3.12 สภาวะการทดลองในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย

หลอด ที่	น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)	ปริมาตรสารมาตรฐานที่ เติม (μL)		ปริมาตรออก ซิแดนซ์ผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) (mL)	เวลา Pre- sonication (min)	เวลาใน การย่อย (min)	อุณหภูมิ ในการ ย่อย ($^{\circ}\text{C}$)
		Cd 5 mg/L	Pb 40 mg/L				
blank	-	-	-	2+1+1	5	10+10+10	ไม่ตั้ง อุณหภูมิ
1,2	0.10	-	-	2+1+1	5	10+10+10	ไม่ตั้ง อุณหภูมิ
3,4	0.10	100	75	2+1+1	5	10+10+10	ไม่ตั้ง อุณหภูมิ
blank	-	-	-	2+1+1	5	10+10+10	50
5,6	0.10	-	-	2+1+1	5	10+10+10	50
7,8	0.10	100	75	2+1+1	5	10+10+10	50
blank	-	-	-	2+1+1	5	10+10+10	60
9,10	0.10	-	-	2+1+1	5	10+10+10	60
11,12	0.10	100	75	2+1+1	5	10+10+10	60

ตารางที่ 3.12 สภาวะการทดลองในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย (ต่อ)

หลอดที่	น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)	ปริมาตรสารมาตรฐานที่ เติม (μL)		ปริมาตรออก ซิแดนซ์ผสม HNO ₃ : H ₂ O ₂ (2:1) (mL)	เวลา Pre- sonication (min)	เวลาใน การย่อย (min)	อุณหภูมิ ในการ ย่อย (°C)
		Cd 5 mg/L	Pb 40 mg/L				
blank	-	-	-	2+1+1	5	10+10+10	70
13,14	0.10	-	-	2+1+1	5	10+10+10	70
15,16	0.10	100	75	2+1+1	5	10+10+10	70
blank	-	-	-	2+1+1	5	10+10+10	75
17,18	0.10	-	-	2+1+1	5	10+10+10	75
19,20	0.10	100	75	2+1+1	5	10+10+10	75

3.9 การย่อยตัวอย่างด้วยกรดแบบเปียก (wet digestion)

ดัดแปลงจากวิธีของ (Plank C.,1992) โดยชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วมา 0.10 g ใส่ลงในหลอดแก้ว เติมกรดไนตริก (HNO₃) 2 mL แซ่ตัวอย่างไว้ 1 คืน จากนั้นนำไปย่อยโดยวางหลอดแก้วลงในหลุมของแผ่นเหล็กสำหรับย่อยตัวอย่างซึ่งวางบนเตาให้ความร้อน (Hot plate) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) 1 mL นำไปย่อยต่อบนเตาให้ความร้อน แล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มอีก (H₂O₂) 1 mL แล้วนำไปให้ความร้อนจนสารละลายใสไม่มีสีเมื่อย่อยเสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ลงในหลอดเซ้นตริฟิวส์ขนาด 15 mL แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FAAS

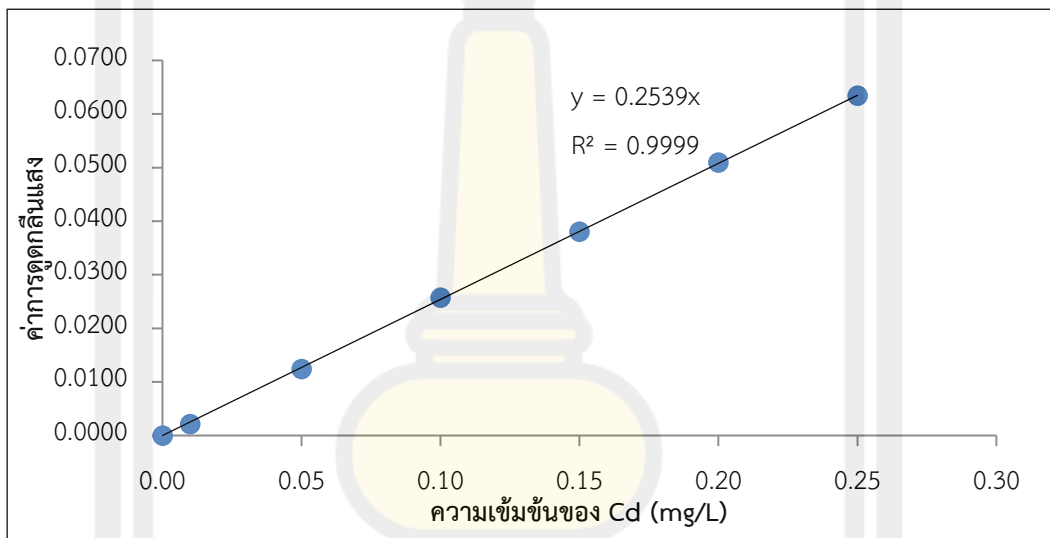
บทที่ 4

ผลการดำเนินงาน

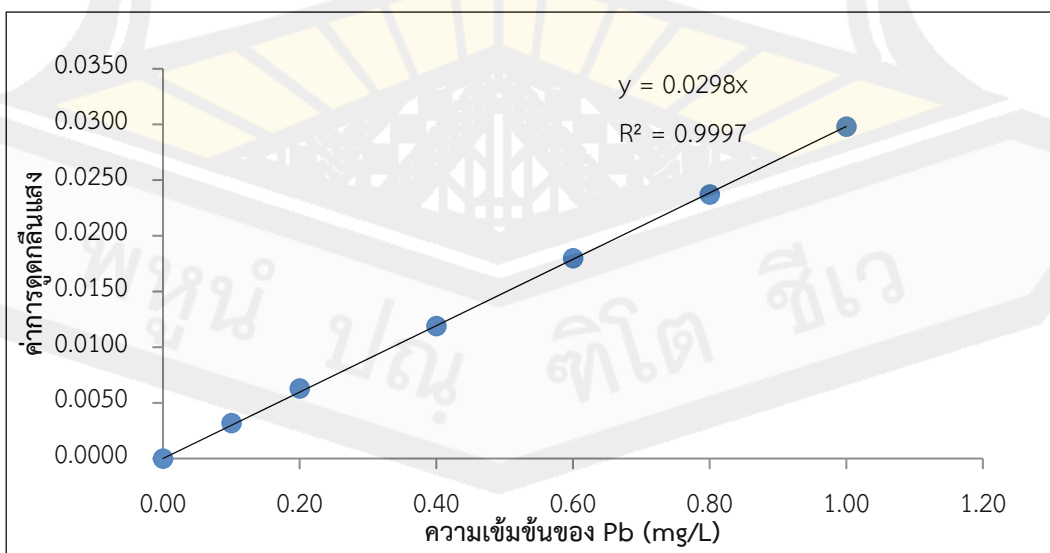
4.1 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์โลหะด้วยเทคนิค FAAS

4.1.1 ช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้

ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการวิเคราะห์ โดยศึกษาช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคดเมียม และตะกั่ว ที่สัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงอย่างเป็นเส้นตรง พบว่า แคดเมียมมีช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงในช่วง 0 ถึง 0.25 mg/L ได้สมการเส้นตรง คือ $y = 0.2539x$ และค่า $R^2 = 0.9999$ ดังรูปที่ 4.1 ตะกั่วมีช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงในช่วง 0 ถึง 1.00 mg/L ได้สมการเส้นตรง คือ $y = 0.0298x$ และค่า $R^2 = 0.9997$ ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแคดเมียม



รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานตะกั่ว

4.1.2 การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

จากการวัดสารละลายแบบลงค์ 10 ครั้ง คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ได้ค่า LOD และ LOQ ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ที่ได้จากการทดลอง โดยการวิเคราะห์สารละลายแบบลงค์จำนวน 10 ซ้ำ

Parameter	Cd*	Pb*
LOD (mg/L)	0.00083	0.02813
LOQ (mg/L)	0.00275	0.09378

*LOD = 3SD, LOQ = 10SD

4.1.3 ความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงเป็นคุณลักษณะที่แสดงความสามารถในการทดสอบตัวอย่างซ้ำหลายครั้ง แล้วให้ผลใกล้เคียงกัน ภายใต้สภาวะที่ใกล้เคียงกัน ความเที่ยงจะบอกถึงการทดลองนั้นมีความสม่ำเสมอ เที่ยงตรงในระดับใดเมื่อมีการทดลองซ้ำ การแสดงความเที่ยงของการทดลองนี้แสดงได้จากการทดลองตัวอย่างซ้ำหลายๆครั้ง ด้วยเครื่องมือและชุดการทดลองเดียวกัน ในเวลาที่ใกล้เคียงกัน โดยในการทดลองนี้ระบุความเที่ยงในรูปของ %RSD ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการทำซ้ำ และการทวนซ้ำของสารละลายมาตรฐานแคดเมียม และตะกั่ว

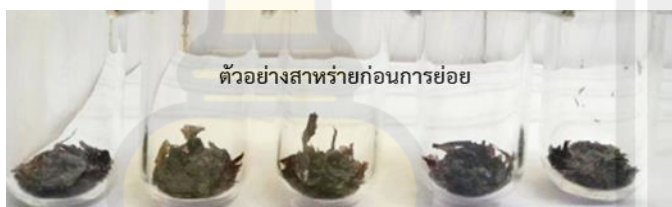
Precision	Cd (0.01 mg/L)	Cd (0.10 mg/L)	Pb (0.10 mg/L)	Pb (0.40 mg/L)
Repeatability (n=11)	2.50%	1.32%	3.81%	2.41%
Reproducibility (n=11)	5.41%	3.09%	4.48%	3.35%

4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้ด้วยคลื่นความถี่สูง

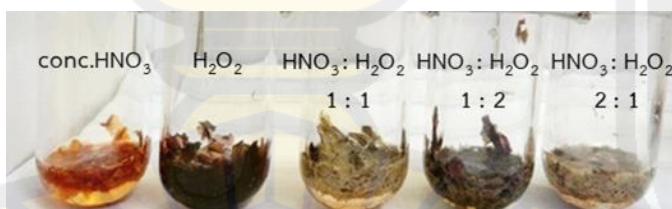
4.2.1 ชนิดของออกซิแดนท์ (Oxidant)

จากการศึกษาชนิดของออกซิแดนท์ที่เหมาะสม ได้แก่ กรดไนตริก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และออกซิแดนท์ผสมระหว่างกรดไนตริกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในการย่อยตัวแทนตัวอย่างสาหร่าย โดยการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของสารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้ให้มีลักษณะใส ไม่มีสี ดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ก) – (ค) พบว่า เมื่อใช้กรดไนตริกเข้มข้นเป็นตัวออกซิแดนท์ สารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้จะมีสีเหลืองส้ม เมื่อใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการย่อยตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้จะได้สารละลายสีน้ำตาล และมีเนื้อสารเหลืออยู่ ซึ่งแสดงว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถย่อยตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ โดยสังเกตจากการที่เนื้อสารตัวอย่างย่อยไม่หมดเมื่อเทียบจากก่อนการย่อย ส่วนออกซิแดนท์ผสมระหว่างกรดไนตริกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 2:1 พบว่าสามารถย่อยตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้ได้อย่างสมบูรณ์ ได้สารละลายใสไม่มีสีทั้งสามอัตราส่วนของออกซิแดนท์ แต่หากเปรียบเทียบจากรูปที่ 4.3 (ง), (จ) และ (ฉ) จะพบว่าออกซิแดนท์ผสมที่อัตราส่วน 2:1 มีประสิทธิภาพในการย่อยได้ดีที่สุด เนื่องจากสามารถเปลี่ยนสีของตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้ให้กลายเป็นสารละลายที่ใสกว่าอัตราส่วนออกซิแดนท์ผสม 1:1 และ 1:2 ดังนั้น การทดลองนี้จึงได้เลือกชนิดของตัวออกซิแดนท์ คือ ออกซิแดนท์ผสมระหว่างกรดไนตริกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อัตราส่วน 2:1

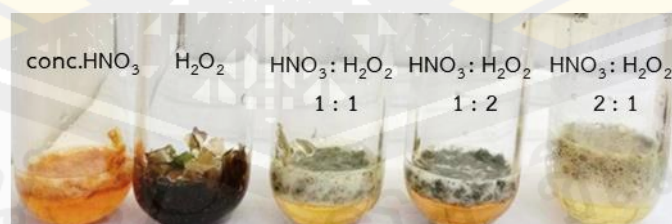
(ก)



(ข)



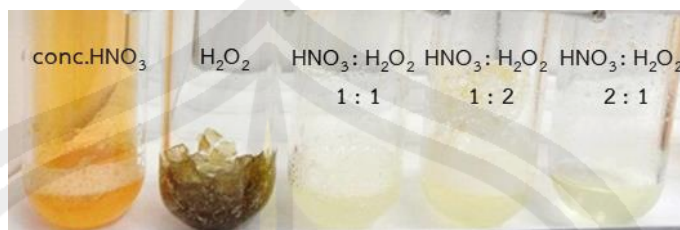
(ค)



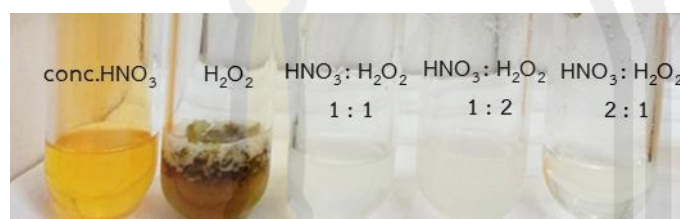
รูปที่ 4.3 ผลของชนิดของตัวออกซิแดนท์ที่มีผลต่อการย่อยตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้

(ก) ตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้ 0.1 g (ข) ตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้ 0.1 g + ออกซิแดนท์ 2 mL (ค) ตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้ 0.1 g + ออกซิแดนท์ 2 mL หลัง pre-sonication 10 นาที

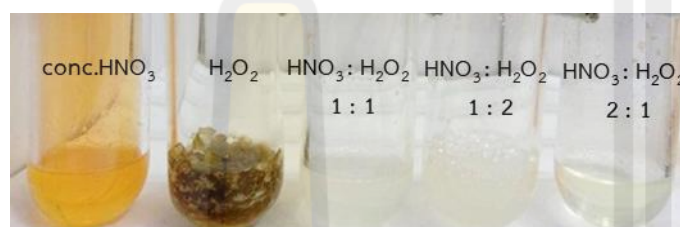
(ง)



(จ)



(ฉ)



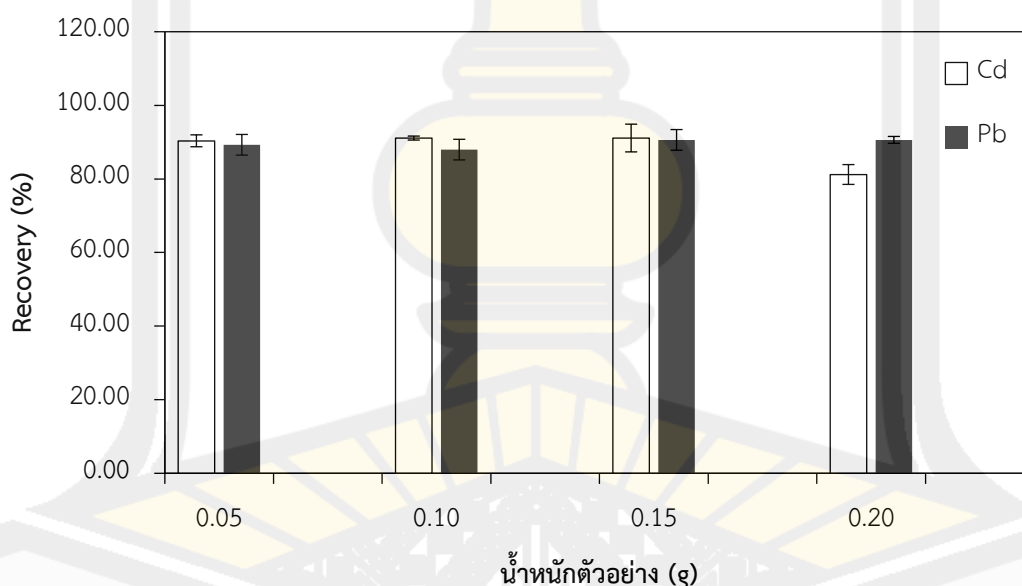
รูปที่ 4.3 (ต่อ) ผลของชนิดของตัวออกซิแดนท์ที่มีผลต่อการย่อยตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้

(ง) ตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้ 0.1 g + ออกซิแดนท์ 2 mL หลังทำการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงที่อุณหภูมิ 70 °C เวลา 10 นาที (จ) ตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้ 0.1 g + ออกซิแดนท์ 2+1 mL หลังทำการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงที่อุณหภูมิ 70 °C เวลา 20 นาที (ฉ) ตัวอย่างสาหร่ายที่กินได้ 0.1 g + ออกซิแดนท์ 2+1+1 mL หลังทำการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงที่อุณหภูมิ 70 °C เวลา 30 นาที

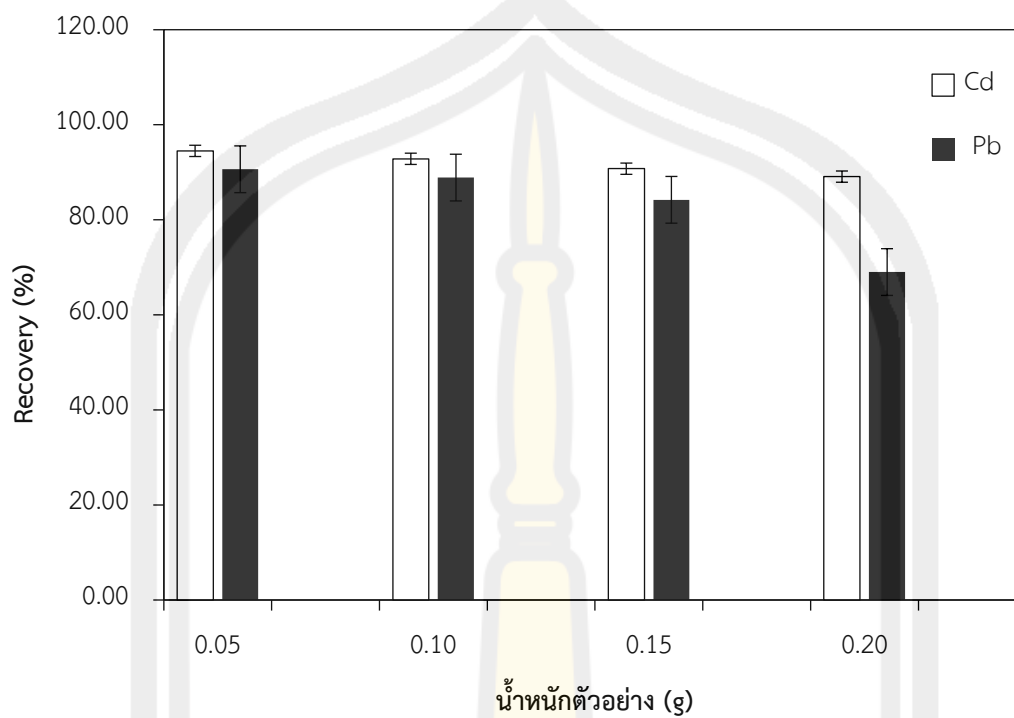
พูน ปณ จิตโต สีเว

4.2.2 น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการย่อย

ทำการศึกษาน้ำหนักตัวอย่างที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่างที่น้ำหนัก 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัม เพื่อหาช่วงของน้ำหนักตัวอย่างที่สามารถย่อยตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ โดยการสังเกตลักษณะทางกายภาพ และเปรียบเทียบร้อยละการได้กลับคืนของโลหะแคดเมียม และตะกั่ว จากการเติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 4 mL (2+1+1), pre-sonication 10 นาที แล้วนำไปย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 30 นาที (ทุก 10 นาที เติมกรดผสม 1 mL) พบว่า น้ำหนักตัวอย่างมีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยเมื่อสังเกตจากลักษณะทางกายภาพ โดยที่น้ำหนักตัวอย่าง 0.20 กรัม สารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้จะมีความขุ่นเล็กน้อย และสารละลายมีสีเหลือง แต่ที่น้ำหนักตัวอย่าง 0.05, 0.10 และ 0.15 กรัม สารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้จะใสไม่มีสี (ดังรูป ในภาคผนวก ค ข้อ 2.1) หากพิจารณาจากค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียม และตะกั่วที่น้ำหนักตัวอย่างน้อยกว่า 0.15 กรัม ของสารหยาบพร้อมบริโภคในสภาพแห้ง ดังรูปที่ 4.4 พบว่ามีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยได้ค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียมในช่วง 90.35 – 91.12 % และตะกั่วในช่วง 87.96 – 90.61 % และตัวอย่างสารหยาบพวงอุ้งน ดังรูปที่ 4.5 พบว่าได้ค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียมในช่วง 90.76 – 94.50 % และตะกั่วในช่วง 84.21 – 90.64 % ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงสามารถเลือกใช้น้ำหนักตัวอย่างในการย่อยได้ในช่วง 0.05 - 0.15 กรัม ตามปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง



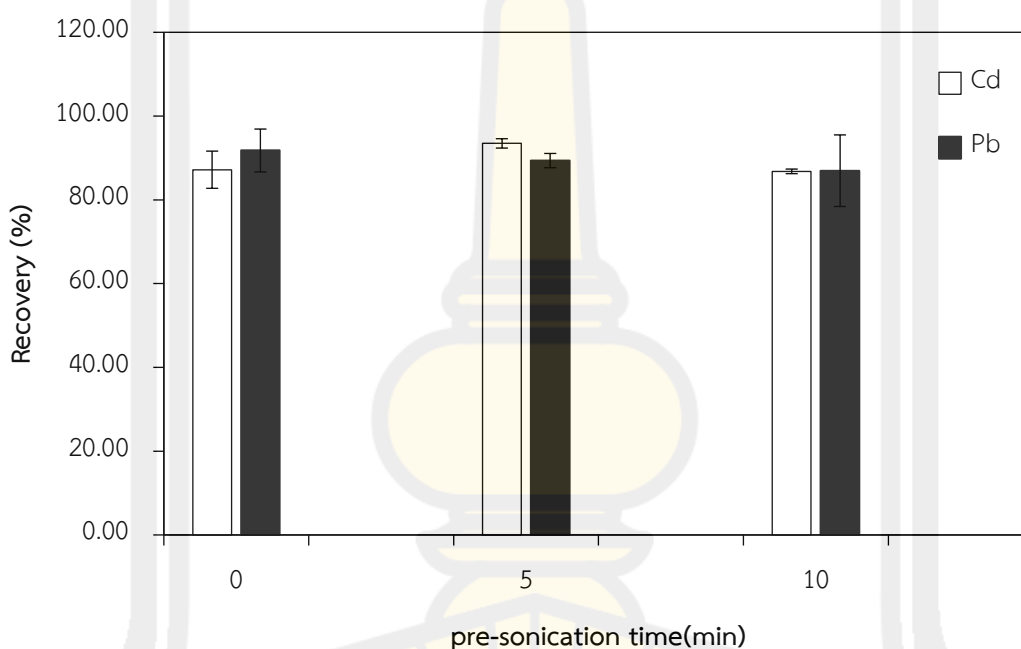
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการย่อยกับค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสารหยาบทะเลที่กินได้ ประเภทสารหยาบพร้อมบริโภคในสภาพแห้ง



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการย่อยกับค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ ประเภทสาหร่ายพวงองุ่น

4.2.3 เวลา pre - sonication

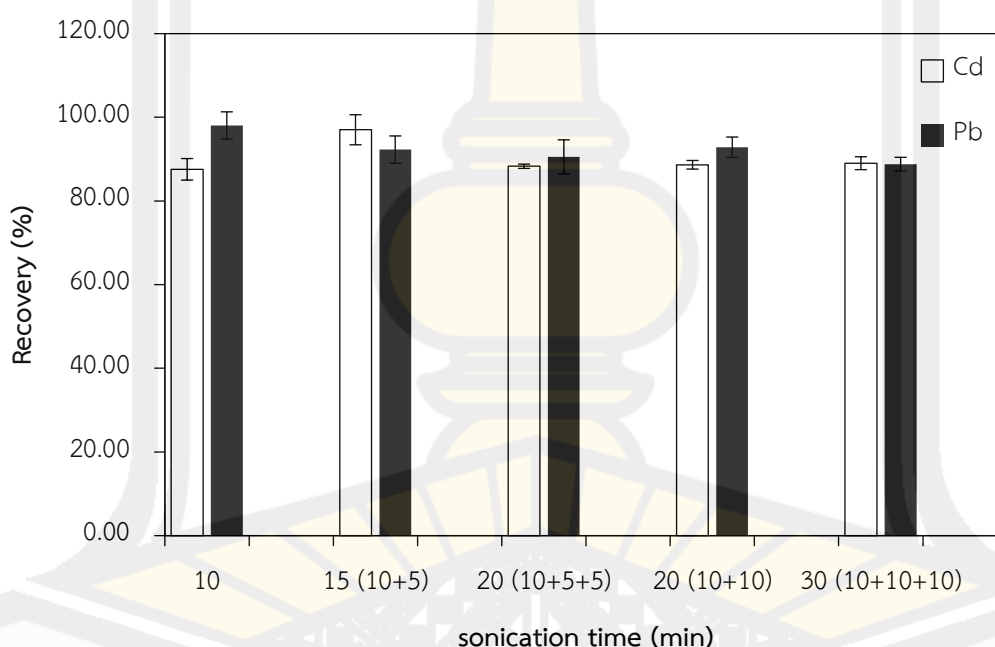
ทำการศึกษาเวลา pre-sonication ที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่าง ได้แก่ ไม่มีการ pre-sonication (0), 5 และ 10 นาที เพื่อหาเวลา pre-sonication ที่มีส่วนช่วยในการย่อยตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ โดยการสังเกตลักษณะทางกายภาพและเปรียบเทียบร้อยละการได้กลับคืนของโลหะแคดเมียมและตะกั่ว จากการเติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 4 mL (2+1+1) นำไปย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 30 นาที (ทุก 10 นาที เติมกรดผสม 1 mL) พบว่า เมื่อไม่มีการ pre-sonication และ pre-sonication ที่ 5 และ 10 นาที สารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้จะใสไม่มีสี เมื่อพิจารณาค่าร้อยละการได้กลับคืน พบว่าทุกช่วงเวลาในการ pre-sonication ได้ค่าร้อยละการได้กลับคืนที่ไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้เวลา pre-sonication ที่ 5 นาที ซึ่งให้ค่าการได้กลับคืนของแคดเมียม 93.48% และตะกั่ว 89.37% เพื่อช่วยในการย่อยตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ และใช้เวลาไม่นาน



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา pre-sonication กับค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้

4.2.4 ปริมาตรออกซิแดนซ์ และเวลาที่ใช้ในการย่อย

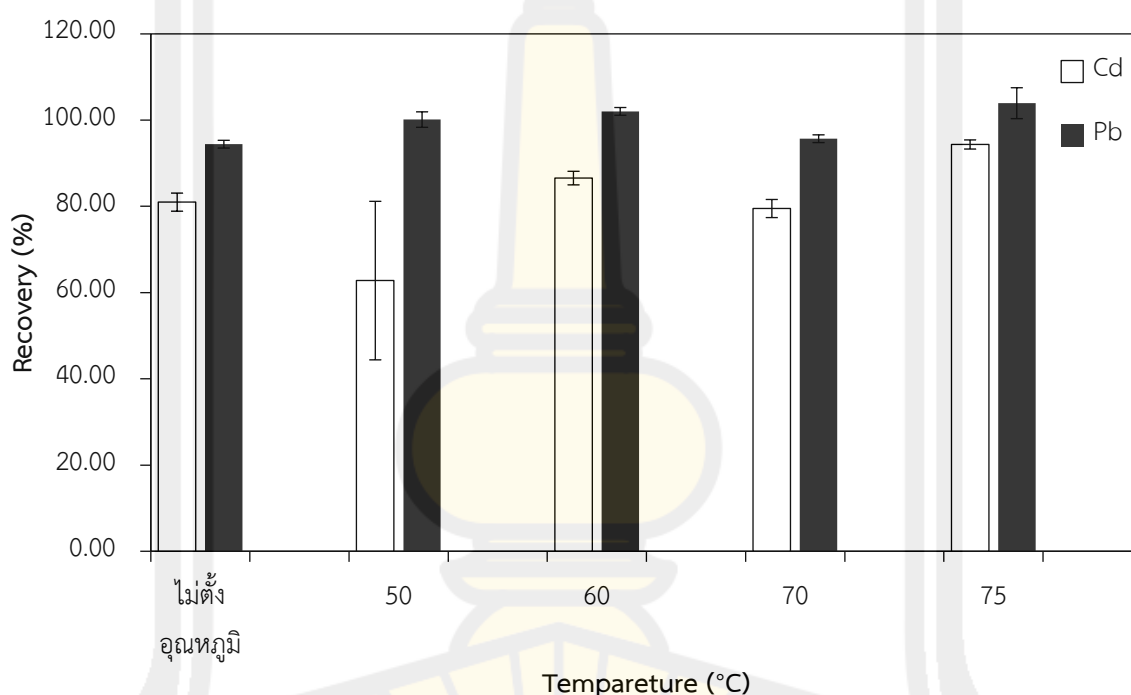
ทำการศึกษาปริมาตรออกซิแดนซ์ และเวลาที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่าง ได้แก่ 10, 15, 20 และ 30 นาที เพื่อหาเวลาที่สามารถย่อยตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ โดยการสังเกตลักษณะทางกายภาพและเปรียบเทียบร้อยละการได้กลับคืนของโลหะแคดเมียมและตะกั่ว โดยการเติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ 2 mL แล้ว pre-sonication เป็นเวลา 5 นาที นำไปย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 1 mL แล้วนำไปย่อยต่อโดยจะแบ่งออกเป็น 2 ชุด ตามเวลาที่ใช้ในการย่อย คือ ชุดที่ 1 เติม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) ครั้งละ 1 mL ทุก 5 นาทีในการย่อย (รวมเวลาในการย่อยเป็น 15 และ 20 นาที) และชุดที่ 2 เติม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) ครั้งละ 1 mL ทุก 10 นาทีในการย่อย (รวมเวลาในการย่อยเป็น 20 และ 30 นาที) พบว่า หลังจากใช้เวลาในการย่อย 30 นาที เติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) รวม 4 mL (2+1+1) สารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้จะใสไม่มีสี เมื่อพิจารณาการย่อยและการได้กลับคืน พบว่าเวลาในการย่อยที่ 30 นาที ให้ค่าการได้กลับคืนของแคดเมียม 89.03% และตะกั่ว 88.81% ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้เวลาในการย่อยที่ 30 นาที เพื่อประสิทธิภาพในการย่อยที่สมบูรณ์



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการย่อยกับค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้

4.2.5 อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่าง ได้แก่ ไม่ตั้งอุณหภูมิ, 50, 60, 70 และ 75 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่สามารถย่อยตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ โดยการสังเกตลักษณะทางกายภาพ และเปรียบเทียบร้อยละการได้กลับคืนของโลหะแคดเมียมและตะกั่ว จากการเติมสารละลายกรดผสม $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ 4 mL(2+1+1), pre-sonication 5 นาที นำไปย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที (ทุก 10 นาที เติมกรดผสม 1 mL) พบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิในการย่อยที่ 60 องศาเซลเซียส สารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้จะใสไม่มีสี เมื่อพิจารณาค่าร้อยละการได้กลับคืน พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้ค่าการได้กลับคืนของแคดเมียม 86.55% และตะกั่ว 102.03% ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อย คือ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากเกิดการย่อยได้อย่างสมบูรณ์และให้ค่าการได้กลับคืนที่ดี



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในการย่อยกับค่าร้อยละการได้กลับคืนของแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้

4.2.6 ประสิทธิภาพในการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง (UAD)

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม และตะกั่ว ในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ ระหว่างเทคนิคการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง และเทคนิคการย่อยตัวอย่าง ด้วยกรดแบบเปียก (Wet digestion) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า ปริมาณแคดเมียมที่พบในตัวอย่างจากการย่อยทั้งสองวิธีมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความ เชื่อมั่น 95% ($t_{cal} = -1.018$; $t_{crit} = 2.10$) ซึ่งแสดงว่าวิธีการย่อยทั้งสองวิธีนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยที่ไม่ แตกต่างกัน ทั้งนี้ ปริมาณตะกั่วพบในตัวอย่างสาหร่ายจากทั้งสองวิธีมีค่าที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก อาจ เนื่องมาจาก ปริมาณที่พบนี้อยู่ในระดับต่ำหรือใกล้เคียงกับค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ จึงทำให้ค่าที่ วิเคราะห์ได้มีค่าที่ไม่แน่นอน แต่ผลการวิเคราะห์โลหะทั้งสองยังมีความถูกต้อง โดยพิจารณาจากค่าร้อยละ การได้กลับคืนสำหรับการวิเคราะห์แคดเมียมและตะกั่วด้วยวิธีการย่อยทั้งสองวิธี ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (>85%)

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพของการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง

ชนิดโลหะ	Method	ปริมาณโลหะที่วิเคราะห์ได้ (mg/L)		%Recovery
		ตัวอย่าง	ตัวอย่าง+สารมาตรฐาน	
Cd	Wet digestion (n=10)	0.0296 ± 0.0012	0.0762 ± 0.0031	93.20
	UAD (n=10)	0.0290 ± 0.0015	0.0720 ± 0.0013	86.00
Pb	Wet digestion (n=10)	0.0436 ± 0.0113	0.3567 ± 0.0101	104.37
	UAD (n=10)	0.1135 ± 0.0104	0.3933 ± 0.0083	93.27

*Standard Cd 0.05 mg/L, Pb 0.3 mg/L *Recovery (%) = $\left(\frac{(sample+std)-sample}{std} \right) \times 100$

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะที่ปนเปื้อนในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้

จากการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ โดยการย่อยตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูง และตรวจวัดด้วยเทคนิค FAAS ได้ผลการวิเคราะห์ของสาหร่ายประเภทพริ้วพร้อมบริโภคนในสภาพแห้ง จำนวน 15 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.4 ได้ค่าร้อยละการได้กลับคืนในการวิเคราะห์โลหะแคดเมียม และตะกั่วในช่วง 85.84 - 110.47 % และ 79.76 - 99.60 % ตามลำดับ และสาหร่ายพวงองุ่น จำนวน 10 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.5 ได้ค่าร้อยละการได้กลับคืนในการวิเคราะห์โลหะแคดเมียม และตะกั่ว ในช่วง 90.11 - 94.83 % และ 82.34 - 98.94 % ตามลำดับ

ซึ่งพบว่าตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ประเภทพริ้วพร้อมบริโภคนในสภาพแห้งมีการตรวจพบปริมาณแคดเมียมทั้ง 15 ตัวอย่าง และตรวจพบปริมาณตะกั่วจำนวน 7 ตัวอย่าง (S5, S9, W1, W2, W3, W4 และ W5) ในระดับที่ต่ำกว่าค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ และในตัวอย่างสาหร่ายพวงองุ่นมีการตรวจพบปริมาณแคดเมียมทั้ง 10 ตัวอย่าง ตรวจพบปริมาณตะกั่วจำนวน 6 ตัวอย่าง (SG1 SG3 SG4 SG5 SG6 SG8) ในระดับที่ต่ำกว่าค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ และตรวจพบปริมาณตะกั่วเกินมาตรฐานจำนวน 2 ตัวอย่าง (SG7 SG9) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโลหะที่ตรวจพบกับเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนักในสาหร่ายพร้อมบริโภคนในสภาพแห้งของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) สำหรับแคดเมียม และมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน กระทรวงสาธารณสุข สำหรับตะกั่ว (จากหัวข้อ 2.4) พบว่า ตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่กินได้ประเภทพริ้วพร้อมบริโภคนในสภาพแห้งมีปริมาณแคดเมียมเกินมาตรฐาน 5 ตัวอย่าง (S1, S8, W1, W2 และ W3) และมีปริมาณตะกั่วเกินมาตรฐาน 7 ตัวอย่าง (S5, S9, W1, W2, W3, W4 และ W5) และตัวอย่างสาหร่ายพวงองุ่นมีปริมาณแคดเมียมอยู่ในระดับต่ำกว่ามาตรฐาน และมีปริมาณตะกั่วเกินมาตรฐาน 8 ตัวอย่าง (SG1 SG3 SG4 SG5 SG6 SG7 SG8 SG9)

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสำหรับทะเลที่กินได้ประเภทพร้อมบริโภคในสภาพแห้ง และร้อยละการได้กลับคืน

ตัวอย่าง	แคดเมียม			ตะกั่ว		
	ปริมาณที่พบ (mg/L) ± SD (n=2)	ปริมาณที่พบ (mg/kg) ± SD (n=2)	%Recovery	ปริมาณที่พบ (mg/L) ± SD (n=2)	ปริมาณที่พบ (mg/kg) ± SD (n=2)	%Recovery
S1	0.0562 ± 0.0012	3.7379 ± 0.0681	86.71	ND	-	95.62
S2	0.0115 ± 0.0009	0.7549 ± 0.0565	91.62	ND	-	93.63
S3	0.0037 ± 0.0003	0.2435 ± 0.0174	88.75	ND	-	99.60
S4	0.0039 ± 0.0000	0.2532 ± 0.0001	88.34	ND	-	99.60
S5	0.0084 ± 0.0000	0.5588 ± 0.0003	89.16	<LOQ (0.0438 ± 0.0028)	<LOQ (2.9207 ± 0.1891)	97.61
S6	0.0081 ± 0.0003	0.5333 ± 0.0186	97.13	ND	-	81.70
S7	0.0053 ± 0.0006	0.3528 ± 0.0407	95.42	ND	-	86.93
S8	0.0329 ± 0.0003	2.1592 ± 0.0378	94.36	ND	-	90.80

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสำหรับทะเลที่กินได้ประเภทพร้อมบริโภคในสภาพแห้ง และร้อยละการได้กลับคืน (ต่อ)

ตัวอย่าง	แคดเมียม			ตะกั่ว		
	ปริมาณที่พบ (mg/L) ± SD (n=2)	ปริมาณที่พบ (mg/kg) ± SD (n=2)	%Recovery	ปริมาณที่พบ (mg/L) ± SD (n=2)	ปริมาณที่พบ (mg/kg) ± SD (n=2)	%Recovery
S9	0.0098 ± 0.0000	0.6422 ± 0.0030	92.58	<LOQ (0.0310 ± 0.0000)	<LOQ (2.0258 ± 0.0094)	87.93
W1	0.0373 ± 0.0028	2.4354 ± 0.1941	98.68	<LOQ (0.0438 ± 0.0101)	<LOQ (2.8545 ± 0.6488)	92.56
W2	0.0523 ± 0.0003	3.4058 ± 0.0153	90.25	<LOQ (0.0616 ± 0.0051)	<LOQ (4.0084 ± 0.3323)	91.07
W3	0.0457 ± 0.0011	3.0025 ± 0.0773	87.04	<LOQ (0.0545 ± 0.0051)	<LOQ (3.5760 ± 0.3283)	88.10
W4	0.0239 ± 0.0003	1.5554 ± 0.0206	85.84	<LOQ (0.0795 ± 0.0000)	<LOQ (5.1785 ± 0.0072)	84.52
W5	0.0219 ± 0.0003	1.4330 ± 0.0139	88.65	<LOQ (0.0848 ± 0.0025)	<LOQ (5.5605 ± 0.1836)	79.76
Z1	0.0110 ± 0.0003	1.0786 ± 0.0401	110.47	ND	-	83.91

หมายเหตุ ND = Not detection

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายพวงองุ่น และร้อยละการได้กลับคืน

ตัวอย่าง	แคดเมียม			ตะกั่ว		
	ปริมาณที่พบ (mg/L) ± SD (n=2)	ปริมาณที่พบ (mg/kg) ± SD (n=2)	%Recovery	ปริมาณที่พบ (mg/L) ± SD (n=2)	ปริมาณที่พบ (mg/kg) ± SD (n=2)	%Recovery
SG1	0.0079 ± 0.0006	0.5273 ± 0.0393	90.76	<LOQ (0.0404 ± 0.0174)	<LOQ (2.6901 ± 1.1578)	84.21
SG2	0.0082 ± 0.0003	0.5443 ± 0.0182	93.19	ND	-	89.96
SG3	0.0037 ± 0.0003	0.2478 ± 0.0205	90.11	<LOQ (0.0628 ± 0.0059)	<LOQ (4.1826 ± 0.3924)	90.66
SG4	0.0144 ± 0.0000	0.7587 ± 0.0000	94.33	<LOQ (0.0732 ± 0.0148)	<LOQ (4.8801 ± 0.9882)	86.47
SG5	0.0087 ± 0.0000	0.5828 ± 0.0003	90.91	<LOQ (0.0837 ± 0.0059)	<LOQ (5.5657 ± 0.3909)	90.66
SG6	0.0200 ± 0.0000	1.3305 ± 0.0006	92.11	<LOQ (0.0896 ± 0.0028)	<LOQ (5.9741 ± 0.1906)	82.34
SG7	0.0193 ± 0.0016	1.2834 ± 0.1074	93.92	0.2789 ± 0.0113	18.5615 ± 0.7587	85.66
SG8	0.0095 ± 0.0006	0.6348 ± 0.0433	91.65	<LOQ (0.0359 ± 0.0056)	<LOQ (2.3890 ± 0.3776)	98.94

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมและตะกั่วในตัวอย่างสำหรับวางอุณหภูมิ และร้อยละการได้กลับคืน (ต่อ)

ตัวอย่าง	แคดเมียม			ตะกั่ว		
	ปริมาณที่พบ (mg/L) ± SD (n=2)	ปริมาณที่พบ (mg/kg) ± SD (n=2)	%Recovery	ปริมาณที่พบ (mg/L) ± SD (n=2)	ปริมาณที่พบ (mg/kg) ± SD (n=2)	%Recovery
SG9	0.0125 ± 0.0010	0.8309 ± 0.0629	94.83	0.0936 ± 0.0085	6.2351 ± 0.5541	82.34
SG10	0.0135 ± 0.0003	0.8996 ± 0.0179	92.81	ND	-	91.61

หมายเหตุ ND = Not detection

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว โดยวิธีการย่อยตัวอย่าง ด้วยคลื่นความถี่สูง สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ แคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่าง สาหร่ายทะเลที่กินได้ที่มีขายตามท้องตลาด ได้แก่ สาหร่ายพร้อมบริโภคในสภาพแห้ง เช่น สาหร่ายประเภทย่น ขนบเคี้ยว สาหร่ายแกงจืด สาหร่ายห่อซูชิ และสาหร่ายที่นิยมบริโภคแบบสด ได้แก่ สาหร่ายพวงองุ่น ร่วมกับการตรวจวัดปริมาณโลหะด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี โดยความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโลหะแคดเมียม และตะกั่วอยู่ที่ 228.8 และ 217.0 นาโนเมตร ตามลำดับ

จากการทวนสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่า การวิเคราะห์แคดเมียม และตะกั่ว นั้นได้กราฟมาตรฐาน อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังนี้ 0 – 0.25 และ 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับแคดเมียมและ ตะกั่ว ตามลำดับ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R^2) เท่ากับ 0.9999, 0.9997 ตามลำดับ มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) สำหรับแคดเมียม และตะกั่วอยู่ที่ 0.00083 และ 0.02813 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) สำหรับแคดเมียม และตะกั่วอยู่ที่ 0.00275 และ 0.09378 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่างโดยใช้คลื่นความถี่สูง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ น้ำหนักตัวอย่าง 0.10 – 0.15 กรัม ชนิดของออกซิแดนซ์ผสมระหว่างกรดไนตริก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$) ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (เติมครั้งละ 2+1+1 มิลลิลิตร) เวลาที่ใช้ในการย่อย 30 นาที (ครั้งละ 10+10+10 นาที) อุณหภูมิของอ่างอัลตราโซนิกคือ 60 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการย่อยตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูงด้วยสภาวะที่เหมาะสมจะมีประสิทธิภาพในการย่อยตัวอย่างได้ไม่แตกต่างจากการย่อยด้วยกรดแบบเปียก และยังมีข้อดีที่เหนือกว่าคือ ใช้เวลาในการย่อยสั้นกว่า นอกจากนี้ยังสามารถย่อยตัวอย่างพร้อมกันได้สูงสุดครั้งละ 16 ตัวอย่าง โดยผลการวิเคราะห์สาหร่ายประเภทย่นพร้อมบริโภคในสภาพแห้งได้ค่าร้อยละการได้กลับคืนในการวิเคราะห์โลหะแคดเมียม และตะกั่วในช่วง 85.84 - 110.47 % และ 79.76 - 99.60 % ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์สาหร่ายพวงองุ่นได้ค่าร้อยละการได้กลับคืนในการวิเคราะห์โลหะแคดเมียม และตะกั่ว ในช่วง 90.11 – 94.83 % และ 82.34 – 98.94 % ตามลำดับ

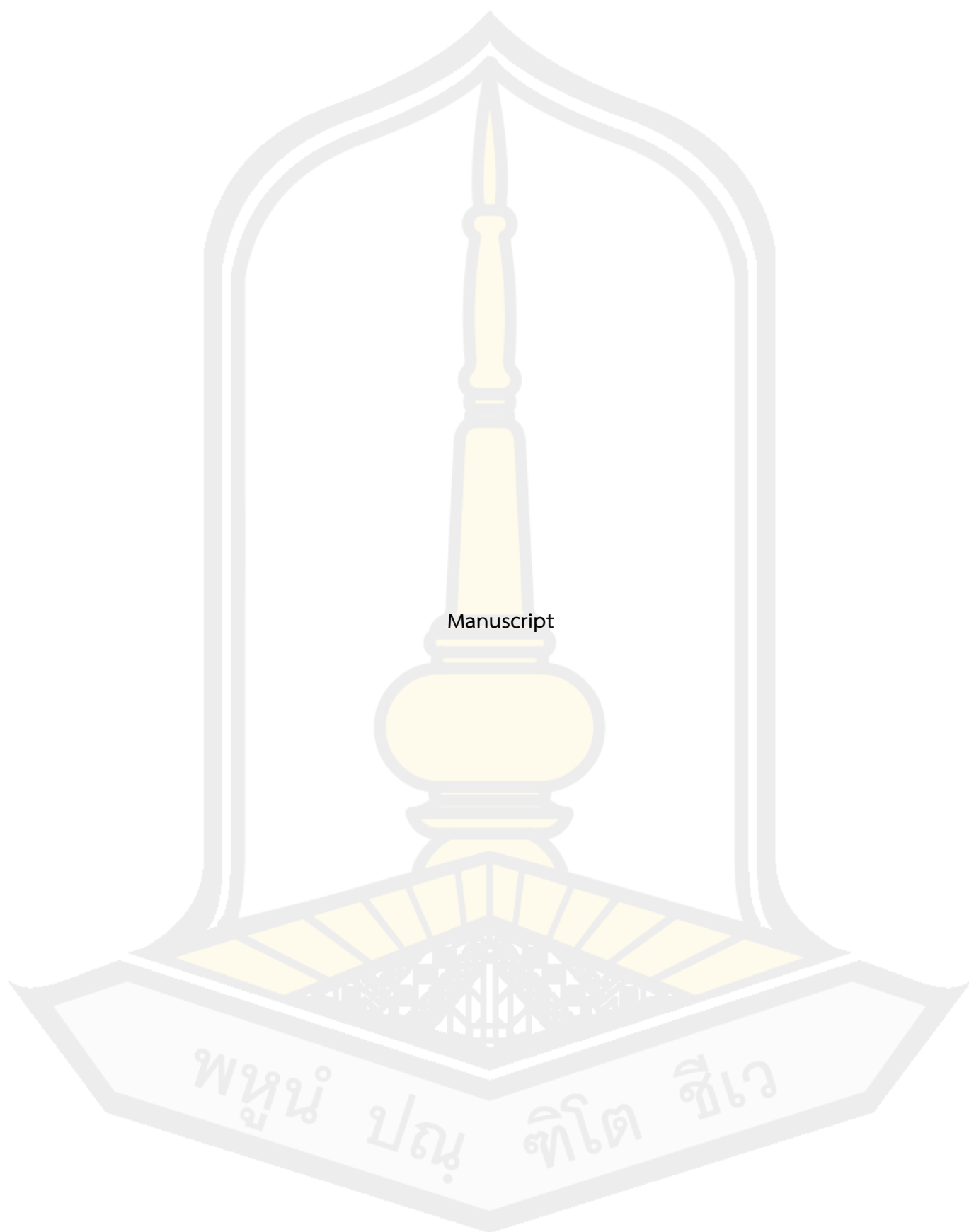
ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลกินได้ประเภทพร้อมบริโภค ในสภาพแห้ง จำนวน 15 ตัวอย่าง และสาหร่ายพวงองุ่น จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยการย่อยตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูง และตรวจวัดด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี พบว่ามีการปนเปื้อนของแคดเมียม และตะกั่วในบางตัวอย่างที่มีค่าสูงเกินค่ามาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนักในสาหร่ายพร้อมบริโภคในสภาพแห้งของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) สำหรับแคดเมียมไม่เกิน 2.0 mg/kg และมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน กระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 (พ.ศ.2563) สำหรับตะกั่วไม่เกิน 1.0 mg/kg

บรรณานุกรม

- กระทรวงสาธารณสุข, 2529. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. 20 มีนาคม 2563
- จิรศักดิ์ กาญจนางศ์กุล.(2555, กันยายน). “พิษจากโลหะหนัก,” เวชปฏิบัติปริทัศน์ คลินิก. 28(9): 658-663
- เบญจวรรณ วงศ์ศิริ. การกำจัดตะกั่วและทองแดงจากน้ำเสีย โดยซิลิกาเจลที่ใช้แล้วเคลือบด้วยเหล็กออกไซด์. วิทยานิพนธ์ (วท.ม.) วิทยาศาสตร์ (สหสาขาวิชา) สิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547
- ภัทรารวรรณ เฉลยชัยภูมิ.การจำกัดโลหะหนักในน้ำเสียโรงงานแกลโซไนต์โดยใช้เบนโทไนต์.วิทยานิพนธ์ปริญญา สาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต สาขานามัยสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2543.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารยา, 2561. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารยา เรื่อง การกำหนดการปนเปื้อนสูงสุดของแคดเมียมในอาหาร. 1 สิงหาคม 2561
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน สำหรับายทะเลอบ (มพช. 515/254).
- Arulkumar, A.; Nigariga, P.; Paramasivam, S.; Rajaram, R., 2019. Metals accumulation in edible marine algae collected from Thondi coast of Palk Bay, Southeastern India. Chemosphere 221, 856-862.
- Bendicho, C.; De La Calle, I.; Pena, F.; Costas, M.; Cabaleiro, N.; Lavilla, I., 2012. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. TrAC Trends in Analytical Chemistry 31, 50-60.
- Domínguez-González, R.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, A.; Bermejo-Barrera, P., 2005. Application of ultrasound-assisted acid leaching procedures for major and trace elements determination in edible seaweed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. Talanta 66 (4), 937-942.
- Filippini, M.; Baldisserotto, A.; Menotta, S.; Fedrizzi, G.; Rubini, S.; Gigliotti, D.; Valpiani, G.; Buzzi, R.; Manfredini, S.; Vertuani, S., 2020. Heavy metals and potential risks in edible seaweed on the market in Italy. Chemosphere 127983.

- Gamela, R. R.; Barrera, E. G.; Duarte, A. T.; Boschetti, W.; da Silva, M. M.; Vale, M. G. R.; Dessuy, M. B., 2019. Fast sequential determination of Zn, Fe, Mg, Ca, Na, and K in infant formulas by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry using ultrasound-assisted extraction. *Food Analytical Methods* 12, 1420-1428.
- Kazi, T. G.; Jamali, M. K.; Arain, M. B.; Afridi, H. I.; Jalbani, N.; Sarfraz, R. A.; Ansari, R., 2009. Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples. *Journal of Hazardous Materials* 161 (2), 1391-1398.
- Khan, N.; Ryu, K. Y.; Choi, J. Y.; Nho, E. Y.; Habte, G.; Choi, H.; Kim, M. H.; Park, K. S.; Kim, K. S., 2015. Determination of toxic heavy metals and speciation of arsenic in seaweeds from South Korea. *Food Chemistry* 169, 464-470.
- Miedico, O.; Pompa, C.; Tancredi, C.; Cera, A.; Pellegrino, E.; Tarallo, M.; Chiaravalle, A. E., 2017. Characterisation and chemometric evaluation of 21 trace elements in three edible seaweed species imported from south-east Asia. *Journal of Food Composition and Analysis* 64, 188-197.
- Neher, B. D.; Azcarate, S. M.; Camina, J. M.; Savio, M., 2018. Nutritional analysis of Spirulina dietary supplements: Optimization procedure of ultrasound-assisted digestion for multielemental determination. *Food Chemistry* 257, 295-301.
- Paz, S.; Rubio, C.; Frías, I.; Gutiérrez, Á. J.; González-Weller, D.; Martín, V.; Revert, C.; Hardisson, A., 2019. Toxic metals (Al, Cd, Pb and Hg) in the most consumed edible seaweeds in Europe. *Chemosphere* 218, 879-884.
- Plank, C. O. Plant analysis reference procedures for the southern region of the united states. SAAEAD. 1992, 368, 7-8.
- Priego-Capote, F.; de Castro, L., 2007. Ultrasound-assisted digestion: A useful alternative in sample preparation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (2), 299-310.
- Roleda, M. Y.; Marfaing, H.; Desnica, N.; Jónsdóttir, R.; Skjermo, J.; Rebours, C.; Nitschke, U., 2019. Variations in polyphenol and heavy metal contents of wild-harvested and cultivated seaweed bulk biomass: Health risk assessment and implication for food applications. *Food Control* 95, 121-134.

- Santos-Silva, M. C.; Machado, E. C.; Wallner-Kersanach, M.; Camargo, M. G.; Andrade, C.; Sá, F.; Pellizzari, F., 2018. Background levels of trace elements in brown and red seaweeds from Trindade, a remote island in South Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 135, 923-931.
- Saleh, M. A. D.; Padilha, P. M.; Hauptli, L.; Berto, D. A., 2015. The ultrasonication of minerals in swine feed. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6, 32.
- Siriangkawut, W.; Sittichan, P.; Ponhong, K.; Chantiratikul, P., 2017a. Stripping voltammetric determination of trace cadmium and lead in Thai organic unpolished rice after ultrasound-assisted digestion. *Journal of Food Composition and Analysis* 59, 145-152.
- Siriangkawut, W.; Sittichan, P.; Ponhong, K.; Chantiratikul, P., 2017b. Quality assessment of trace Cd and Pb contaminants in Thai herbal medicines using ultrasound-assisted digestion prior to flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis* 25(4), 960-967.
- Tan, Shiou X.; Lim, S.; Ong, H. C.; Pang, Y. L. State of the art review on development of ultrasound-assisted catalytic transesterification process for biodiesel production. *Fuel*. 2019, 235, 886–907.
- World Health Organization (WHO) 1992. International Programme Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 134, Geneva, Switzerland.



Manuscript

พูนัน ปณ จิตโต สีเว

Sequential ultrasound-assisted digestion procedure for determination of cadmium and lead contaminants in sea grapes and some seaweed products

Parita Mayo¹, Piyanete Chantiratikul² and Watsaka Siriangkawut^{2,*}

¹Scientific Instrument Academic Service Unit, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand.

²Creative Chemistry and Innovation Research Unit, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand.

*Corresponding author. Tel.: +66-4375-4246, Fax: +66-4375-4246.

E-mail address: watsaka@hotmail.com (W. Siriangkawut).



Abstract

A high efficiency sample preparation procedure based on sequential ultrasound-assisted digestion was proposed and applied for acid digestion in edible seaweed samples. The quantitative determination of cadmium and lead were analyzed using flame atomic absorption spectrometry. The digestion parameters such as solvent system, sample mass, pre-sonication time, sonication time, and digestion temperature were optimized. The efficiency of the proposed ultrasound-assisted digestion procedure was evaluated by comparing with conventional acid digestion procedure. Under the optimum conditions, the linear range of 0 – 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cd, and 0 - 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Pb were obtained with correlation coefficient > 0.999 . The limit of detection for Cd and Pb were 0.58 and 8.87 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The limit of quantification for Cd and Pb were 1.92 and 29.58 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Relative standard deviations were 2.4 and 2.9 % for 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb, respectively. The proposed method was successfully applied for analysis of trace Cd and Pb in sea grapes and some commercial seaweed products consumed in Thailand. All analyzed samples were contaminated with Cd. The contamination of Pb were found in two thirds of studied seaweed samples.

Keywords: Ultrasound-assisted digestion, Cadmium, Lead, Edible seaweed, Sea grapes

Introduction

Seaweeds have been consumed traditionally in Asia as a natural source of food and medicines. In recent years, the increasing popularity of macrobiotic diets has been attributed to the demand of these marine products. One of the popular edible seaweeds produced for commercial cultivation in Thailand is the green seaweed from the genus *Caulerpa*, particularly *Caulerpa lentillifera* and *Caulerpa racemose* varieties, is also called “Sea grapes”

or “Green caviar”. The commercial aquaculture production is primarily of *C. lentillifera* which was found in the Gulf of Thailand [1]. Normally, sea grapes are consumed fresh as a salad vegetable. The edible seaweeds are known for their richness in polysaccharides, proteins, dietary fibers, polyunsaturated fatty acids, vitamin, mineral and essential trace elements, and bioactive metabolites [2]. However, the possibility for bio-sorption and bio-accumulation of metal ions from the excellent binding group of anionic carboxylic, sulfate and phosphate groups of proteins and polysaccharides [3] lead to the contamination of some heavy metals in seaweeds (Table S1) and may increase health risks in seaweed consumption. The levels of heavy metals in seaweeds have been reported to substantially vary across species, location, season and growth-related factors [4, 5]. In Thailand, Food and Drug Administration, the Ministry of Public Health sets a maximum level for Cd and Pb in ready-to-eat seaweeds at 2.0 and 1.0 mg kg⁻¹ dry weight, respectively. The maximum level of toxic metals in roasted seaweeds for As, Cd, Pb and Hg are 2, 0.2, 1 and 0.5 mg kg⁻¹, respectively, sets by the Ministry of Industry for community product standards.

Spectroscopic techniques are commonly used for trace heavy metals analysis in edible seaweeds such as flame atomic absorption spectrometry (FAAS) [6, 7], graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) [8], inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) [9-12], inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) [13-17], and microwave induced plasma atomic emission spectrometry (MPAES) [18]. The traditional wet digestion or dry ashing procedures and even microwave-assisted digestion were required for sample pre-treatment involving complete destruction of the organic matrix.

Alternatively, ultrasound-assisted treatment procedures have been proposed to reduces tedious preparation steps, long digestion time, and high chemical reagent consumption [19, 20] which are the disadvantages of the traditional acid digestion procedure.

Under ultrasonic irradiation, the dissolution of a solid sample in a liquid phase can be enhanced by mechanical effects from the acoustic cavitation phenomenon, and chemical effects from the formation of free radicals and various other species [21]. Therefore, digestion assisted by ultrasonic radiation is a simple, rapid, efficient and low-cost sample preparation technique for determination of elements and has been employed in the analysis of some food samples such as meat and mussel [22, 23], vegetables and dried fruits [24], seaweeds [12, 18], juices and soft drinks [25], palm oil [26], coconut milk [27], fish [28], unpolished rice [29], and centrifugal sugar [30].

Although, there are numerous published literatures report on heavy metals contaminant in seaweeds. Nevertheless, only few works have been proposed on the sample preparation procedure development, especially, the ultrasound-assisted digestion. The developed method for determination of heavy metals in seaweed and their products is still an analytical challenge due to their low concentration levels and the characteristics of the matrix.

In this study, a simple, fast and reliable sample pre-treatment procedure was developed using a sequential ultrasound-assisted acid digestion on an ultrasonic bath. The developed procedure was applied in sea grapes and some seaweed products consumed in Thailand for heavy metals determination by FAAS. The concentrations of Cd and Pb found in the sea grapes and some commercially available seaweed products provided safety information for the database of Thai seaweeds and for human dietary intake.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

All chemicals used were of analytical reagent grade unless otherwise stated. Deionized water from a Simplicity 185 (Millipore, Billerica, MA, USA) with resistivity of 18.2 M Ω

cm was used throughout the experiments. Nitric acid (HNO_3 , 65%, extra pure grade) and hydrogen peroxide (H_2O_2 , 35%, extra pure grade, QRëC, New Zealand) were used for the digestion of the samples. Metals standard of Cd and Pb (1000 mg L^{-1} for AAS, Merck, Darmstadt, Germany) were used for all the experiments. Working standard solutions of Cd and Pb with different concentrations were prepared by appropriately diluting the stock solution. All glassware and plastic materials used were treated for 24 h in 10% v/v nitric acid and rinsed with deionized water.

Instrumentation

The FAAS measurements were performed with an Agilent 280FS AA atomic absorption spectrometer (Agilent Technologies, CA, USA) equipped with a deuterium background corrector. A high intensity UltrAA coded multi-element (Ag/Cd/Pb/Zn) hollow cathode lamp (Agilent Technologies, CA, USA) was employed as the radiation source. The detection wavelength for Cd and Pb were 228.8 and 217.0 nm, respectively. All instrumental conditions were followed according to the manufacturer's recommendation [31] using air/acetylene flame. Ultrasound-assisted digestion was carried out using a Crest PowersonicTM CP1100D (Crest Ultrasonics Corporation, NJ, USA) with a table-top ultrasonic cleaning unit and digital control display. Technical specifications were: timer 1-99 min, Volts 230V, frequency 45 kHz, built-in heater 20-80 °C, and sonic power in 9 steps from approximately 40% to 100% of maximum output power (360 W).

Sample collection

Nine of fresh sea grapes samples (SG1-SG9) were bought directly from various sea grapes farms which were domestic cultivated and produced in Thailand. After delivery to the laboratory, the samples were cleaned with deionized water and dried in an oven at 60 °C.

Then, the dried samples were ground to fine particles using mortar and pestle and kept in a desiccator at room temperature until it reached a constant mass. The dried samples were then individually packaged in clean polyethylene bags and stored in a desiccator. Each sample was analyzed in triplicate.

Fifteen samples of commercial seaweed samples were selected from convenience stores and grocery stores in Maha Sarakham Provinces, Thailand. The selected seaweed samples including nine of crispy seaweed snacks (SN1-SN9), the other six seaweeds for soup (SS1-SS5) and sushi (SS6) are in the form of dried seaweeds sheet. After delivery to the laboratory, the samples were torn to small pieces and ground to fine particles using mortar and pestle. The fine powdered form samples were dried in an oven at 60 °C for 4 h and stored in a desiccator at room temperature for about 10 days until it reached a constant mass. The dried samples were then individually packaged in clean polyethylene bags and stored in a desiccator. Each sample was analyzed in triplicate.

Sequential ultrasound-assisted digestion procedure

For optimization, different solvent systems (conc. HNO_3 , a mixture of conc. HNO_3 : H_2O_2 , and H_2O_2), sample mass, pre-sonication time, sonication time and digestion temperature were tested. To evaluate the efficiency of the process, the results obtained with the ultrasound-assisted digestion procedure were compared with those from a conventional acid digestion procedure.

Approximately 0.10 – 0.15 g of all dried seaweed samples were accurately weighed into glass test tubes with cap (50 mL capacity), and 2.0 mL of 2:1 acid-oxidant mixture (conc. HNO_3 : H_2O_2) was added. The glass tube cap was covered. All tubes were allowed to stand for 5 min at room temperature, marked as pre-sonication time. The three steps sequential UAD was then carried out. The temperature range of the ultrasonic bath was set at 60 °C

using a built-in heater. The tubes were immersed in the ultrasonic water bath and subjected to ultrasonic energy at 45 kHz for 10 min, termed as sonication time. After 10 min of the first digestion step, 1.0 mL of 2:1 acid-oxidant mixture (conc. HNO_3 : H_2O_2) was added and the tubes were digested under the same condition for a further 10 min. After 10 min of the second digestion step, 1.0 mL of 2:1 acid-oxidant mixture (conc. HNO_3 : H_2O_2) was added and the tubes were digested under the same condition for a last 10 min. After sonication, the digested sample was made up to 10 mL in calibrated flasks with deionized water. Then, it was centrifuged for 5 min at 5000 rpm and filtered through filter paper. The final volume was stored in polyethylene bottles at 4 °C for analysis. Blanks were also treated in the same manner without samples for each experiment.

Conventional acid digestion procedure

Acid digestion of all samples was prepared by following the wet digestion of plant analysis reference procedures [32] with some modification. Approximately 0.5 g of each sample was accurately weighed into a beaker, 10 mL of conc. HNO_3 was then added, and the beaker was covered with a watch glass. The beaker was allowed to stand overnight, and the contents were heated on a hot plate for 1 h. The digestion solution was then cooled to room temperature, followed by the addition of 1 mL of H_2O_2 (35%) and heated on a hot plate for 20 min. A further 1 mL of H_2O_2 (35%) was then added, and heating was continued until the color of the digestion solution became transparent. After digestion, the digestion solution was filtered through filter paper. The final volume was made up to 50 mL in volumetric flasks with deionized water, and stored in polyethylene bottles at 4 °C for analysis. Blanks were also treated in the same manner without samples for each experiment.

Results and Discussion

Optimization of the sequential ultrasound-assisted digestion

The digestion efficiency or percentage recovery of the results provided by ultrasound-assisted digestion variable parameters was evaluated considering the optimum conditions. By spiking the metal ions into the mixed of dried seaweed samples. The sequential ultrasound-assisted digestion procedure by adding a series of solvent during the sonication period was selected due to the highly digestion performance [29, 33]. The volume of solvent was divided into 2, 1 and 1 mL for three step of sonication time (10 min each). The parameters influencing the UAD efficiency were optimized within the variation as listed in Table 1.

Table 1

The effect of solvent systems such as acid (conc. HNO_3), oxidant (H_2O_2), and acid-oxidant mixture ($\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$; 1:1, 1:2, 2:1) was investigated in a univariate mode by fixing the other variables at 0.10 g sample, solvent volume 2+1+1 mL, pre-sonication time 10 min, sonication time 30 min, and temperature 70 °C. After 30 min sonication time, incomplete digestion samples (from visual observation) were obtained for acid and oxidant alone as presented in Fig. S1. During digestion process, we found that H_2O_2 combined with HNO_3 can improve the efficiency of the digestion and finally provided a clear solution. This result was consistent with published reports that oxidation of biological samples with high organic matter (e.g. protein, carbohydrates) is usually incomplete digestion with only HNO_3 , the use of H_2O_2 combined with HNO_3 yielded clear solution and improved recovery [19]. In this work, the mixture of 2:1 $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ offers clearly digested solution and significantly higher recoveries of Cd and Pb than from 1:1 and 1:2. Therefore, 2:1 $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ was chosen as optimum condition.

The mass of sample was evaluated in a univariate mode by fixing the other variables at $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1) volume 2+1+1 mL, pre-sonication time 10 min, sonication time 30

min, and temperature 70 °C. High percentage recoveries (>90% for Cd and >88% for Pb) were obtained for all sample mass studied, except for 0.20 g, incomplete digestion sample (from visual observation) was observed and low percentage recoveries for Cd (81%) was obtained as shown in Fig. S2. Therefore, a sample mass in a range of 0.05 – 0.15 g was suitable for ultrasound-assisted digestion under this condition. The mass of sample employed for metals analysis can be chosen according to their amount in the sample. The sample mass of 0.10 g was selected for further investigated.

The effect of pre-sonication time, the time for treatment of the samples with acid-oxidant mixtures before subjection to the ultrasonic bath, was then evaluated for different time (0 – 10 min) intervals. As presented in Fig. S3, this parameter was not significant effect on the recoveries of both metals studied. The optimum time was selected at 5 min (>90% recovery for Cd and Pb).

The influence of sonication time and solvent volume on the digestion efficiency were investigated in a univariate mode at their optimal values. The percentage recoveries obtained (>88% for Cd and >89% for Pb) from different sonication time and solvent volume of both metals were not significantly difference as shown in Fig.1. From visual observation, as shown in Fig. S4, the incomplete digestion sample with yellow color was clearly observed for 10 min sonication time (only 2 mL of digestion solvent). The other three conditions, for 15 and 20 min sonication time, pale-yellow color of digested solutions were observed. After sonication for 30 min, the clear solutions of digested samples were obtained with practically quantitative recoveries. Therefore, the sequential ultrasound-assisted digestion procedure by adding a series of HNO_3 : H_2O_2 (2:1) into 2, 1 and 1 mL for three steps of sonication time (10 min each) was selected.

Fig. 1

The effect of digestion temperature was then evaluated without temperature control and temperature control from 50, 60, 70 and 75 °C. The incomplete digestion sample with brown-yellow color was observed for uncontrolled temperature (from visual observation), thus, this condition was not performed to calculate the percentage recoveries. The results as shown in Fig. 2 indicated that the ultrasound-assisted digestion efficiency increased with increasing temperature from 50 to 60 °C, and then reached equilibrium (>90% recovery for Cd and Pb). Therefore, the optimum temperature was selected at 60 °C.

Fig. 2

The optimized values for sequential ultrasound-assisted digestion procedure are presented in Table 1. In addition, comparison of the digestion efficiency of both sequential ultrasound-assisted digestion and conventional acid digestion procedures are summarized as shown in Table 2. Satisfactory recoveries of both procedures were obtained for Cd and Pb. According to *t*-test at 95% confident limit, the results obtained from both procedures were in good agreement ($t_{\text{critical}} = 2.101$, $t_{\text{calculate}} = 1.792$ and -1.120 for Cd and Pb, respectively). These results indicated that the digestion efficiency of the proposed ultrasound-assisted digestion procedure is comparable to conventional acid digestion procedure. Moreover, the relative standard deviations of the metal concentration obtained after digestion by sequential ultrasound-assisted digestion are trend to be lower than conventional acid digestion.

Table 2

Analytical features of the proposed method

The analytical characteristics of the proposed method were investigated. Using the optimum conditions as described above, the standard calibration in the range of 0 – 250 µg L⁻¹ for Cd, and 0 – 1000 µg L⁻¹ for Pb were constructed by plotting the absorbance against concentrations. Under the selected conditions, a linear calibration graph was obtained for Cd

and Pb, with the calibration equations $y = (2.549 \times 10^{-4})x$, $R^2 = 0.9999$ for Cd, and $y = (2.958 \times 10^{-5})x$, $R^2 = 0.9997$ for Pb, respectively. The limits of detection (LOD) ($3\sigma/s$) and quantification (LOQ) ($10\sigma/s$) (where σ is standard deviation of digestion blank ($n=7$) and s is the slope of calibration curve) were obtained at LOD $0.58 \mu\text{g L}^{-1}$, LOQ $1.92 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cd, and LOD $8.87 \mu\text{g L}^{-1}$, LOQ $29.58 \mu\text{g L}^{-1}$ for Pb, respectively. The relative standard deviations for eleven replicate determinations of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cd and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb were 2.4 and 2.9%, respectively. The reproducibility for seven determinations of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cd and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ for Pb were 3.3 and 3.4%, respectively.

The analytical performance of the proposed method has been compared in Table S1 with previous methods for determination of Cd and Pb in various seaweed samples. The sensitivity of the proposed assay was lower than other ICP-OES and ICP-MS system. However, the sensitivity of this proposed method are comparable to other FAAS and MPAES system and it is enough to measure metal contaminants in seaweed samples. Comparing to previous sample pre-treatment procedures, these proposed sequential ultrasound-assisted digestion provides some advantages such as ease of operation, short operation time, and high sample throughput.

Analysis of edible seaweed samples

The proposed sequential ultrasound-assisted digestion procedure was employed for FAAS determination of Cd and Pb in edible seaweed samples. The analysis results of Cd and Pb in all samples are presented in Table 3. To perform the recovery study, all samples were spiked with Cd and Pb at 50 and $300 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Satisfactory results for the concentration levels studied were obtained for Cd and Pb, with percentage recoveries of 86 – 111% and 82 – 100%, respectively.

As presented in Table 3, all studied samples were contaminated with Cd. In addition, Pb were found in most of all sea grapes samples, two samples of crispy seaweed snacks (SN5 and SN9), and all seaweed for soup samples. According to the maximum permitted level (MPL) in ready-to-eat seaweed of Cd at 2.0 mg kg^{-1} and Pb at 1.0 mg kg^{-1} sets by Food and Drug Administration, the Ministry of Public Health, the amounts of Cd found in five samples of crispy seaweed snacks (SN1 and SN8) and seaweed for soup (SS1, SS2 and SS3) were higher than the MPL level. Moreover, concentration of Pb found in most of all samples were higher than the MPL level.

The amount of Cd and Pb found in sea grapes (SG1-SG9) trend to be higher than the amount of Cd and Pb found in other sea grapes from other countries (Table S1), especially for Pb. This might be due to the cultivation farms are located nearby the industry zone in the Gulf of Thailand. However, it should be noted that sea grapes samples were analyzed in dried form, generally, the sea grapes are consumed in fresh form.

Table 3

Conclusions

A sequential ultrasound-assisted digestion was successfully applied for the acid digestion of edible seaweed samples. Determination of Cd and Pb was performed by flame atomic absorption spectrometry with sensitive, precise and accurate results. The recommended method offers a rapid, easy, convenient, inexpensive, reproducible, high sample throughput, and low chemical consumption for digestion of edible seaweed samples, compared to the conventional wet acid digestion. This study provides significant data on the safety and quality of sea grapes and some commercially available seaweed products consumed in Thailand. In addition, the proposed method for the digestion and quantification

of Cd and Pb in seaweeds, will help to advance the analysis of heavy metals content in similar food sample varieties.

Acknowledgements

Additional support from the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Ministry of Higher Education, Science, Research and Innovation was greatly appreciated. The authors wish to thank Ms. Darika Jewkhuntod and Ms. Pimonpon Trinak for their laboratory assistance.

Funding

The authors gratefully acknowledge the financial support from Mahasarakham University (Grant year 2021) and the Mahasarakham University Development Fund.

Declarations

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. U. Sompong, J. Mingkaew, D. Amornlerdpison, K. Mengumphan, Maejo Int. J. Energy Environ. Commun. **2**, 17 (2020).
<https://doi.org/10.54279/mijeec.v2i1.244947>
2. A. Bocanegra, S. Bastida, J. Benedí, S. Rodenas, F.J. Sanchez-Muniz, J. Med. Food **12**, 236 (2009). <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0151>
3. T.A. Davis, B. Volesky, A. Mucci, Water Res. **37**, 4311 (2003).
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00293-8)

4. M.Y. Roleda, H. Marfaing, N. Desnica, R. Jónsdóttir, J. Skjermo, C. Rebours, U. Nitschke, *Food Control* **95**, 121 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.031>
5. G.B. Brito, T.L. de Souza, F.C. Bressy, C.W.N. Moura, M.G.A. Korn, *Mar. Pollut. Bull.* **64**, 2238 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.06.022>
6. A. Arulkumar, P. Nigariga, S. Paramasivam, R.Rajaram, *Chemosphere* **221**, 856 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.007>
7. N.L. Llanos, S.M.B. Dalawampu, *Int. J. Adv. Res.* **5**, 1429 (2017).
<http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/4264>
8. C. Almela, M.J. Clemente, D. Ve´lez, R. Montoro, *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1901 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.06.011>
9. M.U. Khandaker, N.O. Chijioke, N.A.B. Heffny, D.A. Bradley, A. Alsubaie, A. Sulieman, M. R.I. Faruque, M.I. Sayyed, K.S. Al-mugren, *Foods* **10**, 381 (2021).
<https://doi.org/10.3390/foods10020381>
10. S.E. Perryman, I. Lapong, A. Mustafa, R. Sabang, M.A. Rimmer, *Aquac. Rep.* **5**, 27 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.12.002>
11. C. Rubio, G. Napoleone, G. Luis-Gonzalez, A.J. Gutierrez, D. Gonzalez-Weller, A. Hardisson, C. Revert, *Chemosphere* **173**, 572 (2017).
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.064>
12. R. Dominguez-Gonzalez, A. Moreda-Pineiro, A. Bermejo-Barrera, P. Bermejo-Barrera, *Talanta* **66**, 937 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.12.051>
13. F. Panebianco, V. Nava, F. Giarratana, T. Gervasi, N. Cicero, *J. Food Compos. Anal.* **104**, 104150 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104150>

14. M. Filippini, A. Baldisserotto, S. Menotta, G. Fedrizzi, S. Rubini, D. Gigliotti, G. Valpiani, R. Buzzi, S. Manfredini, S. Vertuani, *Chemosphere* **263**, 127983 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127983>
15. N. Khan, K.Y. Ryu, J.Y. Choi, E.Y. Nho, G. Habte, H. Choi, M.H. Kim, K.S. Park, K.S. Kim, *Food Chem.* **169**, 464 (2015).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.020>
16. N.A. Paul, N. Neveux, M. Magnusson, R. de Nys, *J. Appl. Phycol.* **26**, 1833 (2014).
<https://doi.org/10.1007/s10811-013-0227-9>
17. S.R. de la Rocha, F.J. Sanchez-Muniz, M. Gomez-Juaristi, M.T.L. Marin, *J. Food Compos. Anal.* **22**, 330 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.021>
18. B.D. Neher, S.M. Azcarate, J.M. Camiña, M. Savio, *Food Chem.* **257**, 295 (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.011>
19. T.G. Kazi, M.K. Jamali, M.B. Arain, H.I. Afridi, N. Jalbani, R.A. Sarfraz, R. Ansari, *J. Hazard. Mater.* **161**, 1391 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.103>
20. T.G. Kazi, N. Jalbani, M.B. Arain, M.K. Jamali, H.I. Afridi, A.Q. Shah, *Environ. Monit. Assess.* **154**, 155 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0386-3>
21. F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, *J. Biochem. Bioph. Meth.* **299**, 70 (2007).
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.09.006>
22. M.C. Yebra-Biurrun, A. Moreno-Cid, S. Cancela-Perez, *Talanta* **66**, 691 (2005).
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.12.019>
23. A. Moreno-Cid, M.C. Yebra, *Spectrochim. Acta B* **57**, 967 (2002).
[https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(02\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(02)00030-7)
24. M.C. Yebra, S. Cancela, *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 1093 (2005).
<https://doi.org/10.1007/s00216-005-3237-x>

25. N. Jalbani, T.G. Kazi, B.M. Arain, M.K. Jamali, H.I. Afridi, R.A. Sarfraz, *Talanta* **70**, 307 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.02.045>
26. J.C. Cypriano, M.A.C. Matos, R.C. Matos, *Microchem. J.* **90**, 26 (2008).
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.03.001>
27. D.C.M.B. Santos, L.S.B. Carvalho, D.C. Lima, D.J. Leao, L.S.G. Teixeira, M.G.A. Korn, *J. Food Compos. Anal.* **34**, 75 (2014).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.02.008>
28. P.M. de Lima, B. Cavecci, P.S. Roldan, C.P. Braga, C.C.F. Padilha, L.E. Pezzato, P.M. Padilha, *J. Food Meas. Charact.* **10**, 113 (2016).
<https://doi.org/10.1007/s11694-015-9283-y>
29. W. Siriangkawut, P. Sittichan, K. Ponghong, P. Chantiratikul, *J. Food Compos. Anal.* **59**, 145 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.018>
30. J.M. dos Santos, J.K. de Andrade, F. Galvão, M.L. Felsner, *Food Chem.* **292**, 66 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.037>
31. Agilent Technologies Inc., The manual of flame atomic absorption spectrometry analytical method: standard conditions of Cd and Pb, 10th ed. (USA, 2012), pp. 25 and 55.
32. C.R. Campbell and C.O. Plank, in *Plant Analysis Reference Procedures for the Southern Region of the United States*, ed. By C.O. Plank (Southern Cooperative, Georgia, 1992), p. 7, <https://aesl.ces.uga.edu/sera6/PUB/PlantAnalysisReferenceProcedures.pdf>. Accessed 5 May 2020.
33. W. Siriangkawut, P. Sittichan, K. Ponghong, P. Chantiratikul, *J. Food Drug Anal.* **25**, 960 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.011>

Captions for Figures and Tables

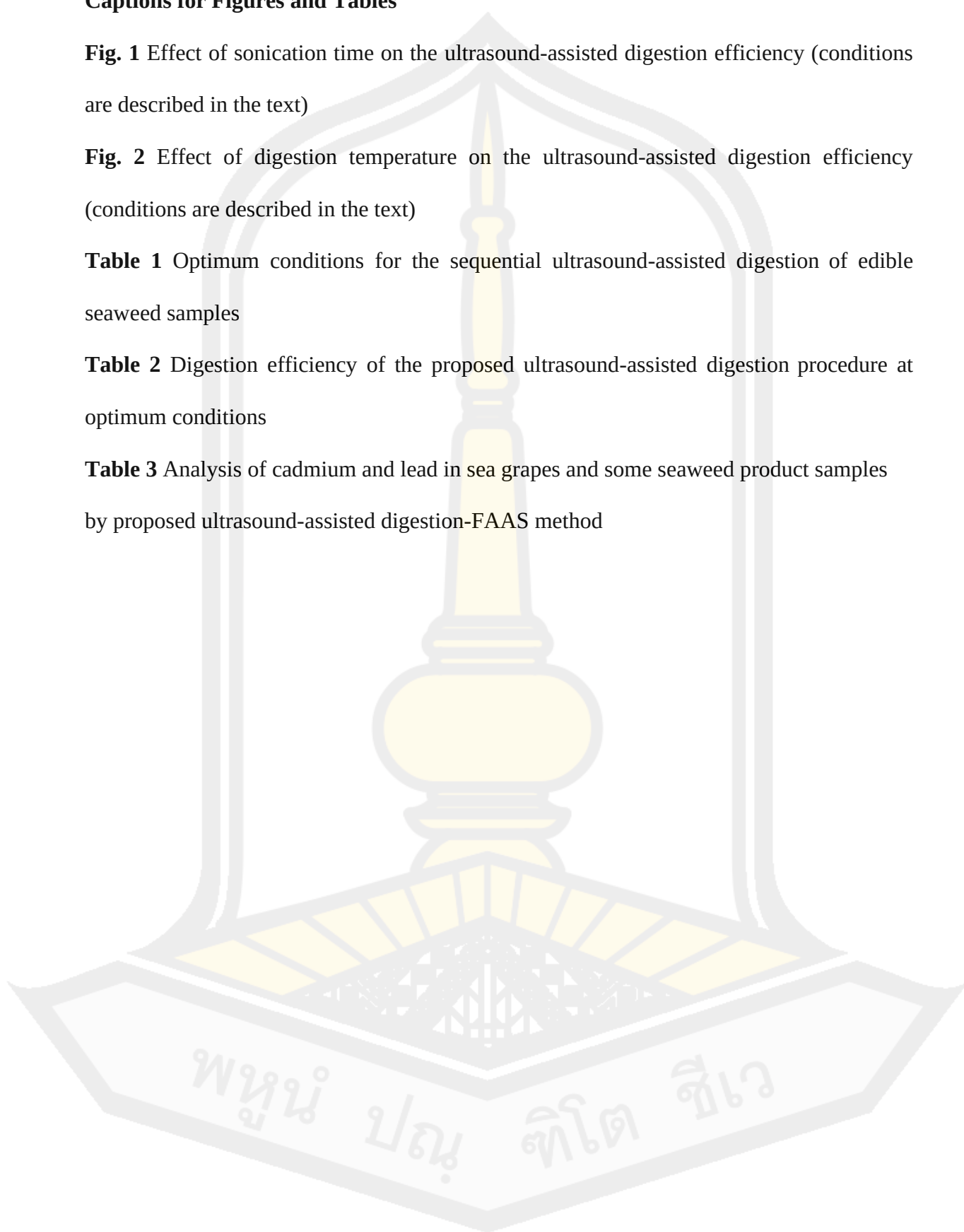
Fig. 1 Effect of sonication time on the ultrasound-assisted digestion efficiency (conditions are described in the text)

Fig. 2 Effect of digestion temperature on the ultrasound-assisted digestion efficiency (conditions are described in the text)

Table 1 Optimum conditions for the sequential ultrasound-assisted digestion of edible seaweed samples

Table 2 Digestion efficiency of the proposed ultrasound-assisted digestion procedure at optimum conditions

Table 3 Analysis of cadmium and lead in sea grapes and some seaweed product samples by proposed ultrasound-assisted digestion-FAAS method



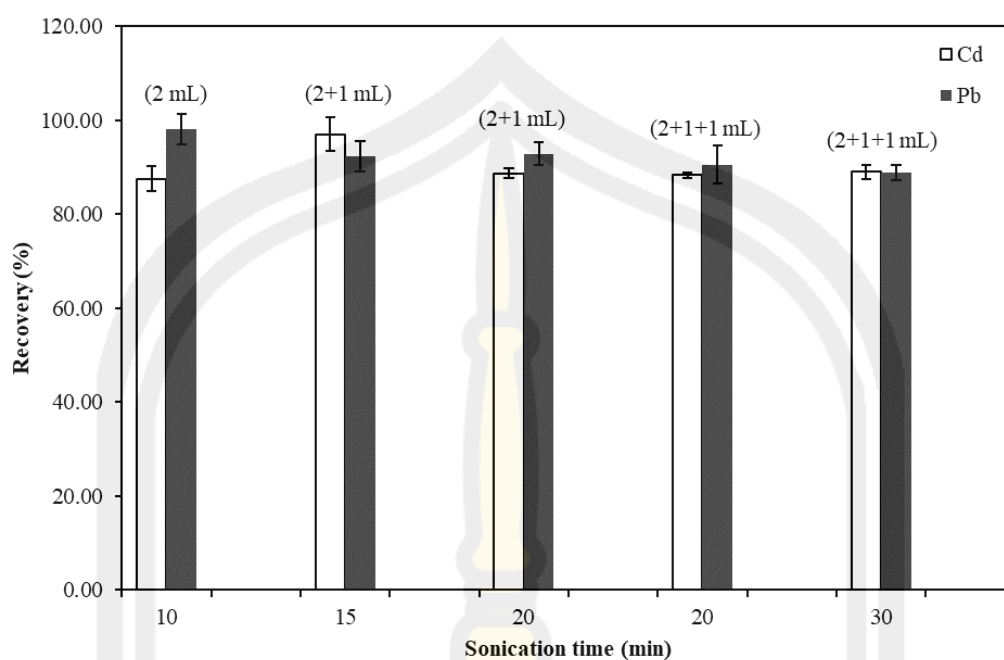


Fig. 1 Effect of sonication time on the ultrasound-assisted digestion efficiency (conditions are described in the text)

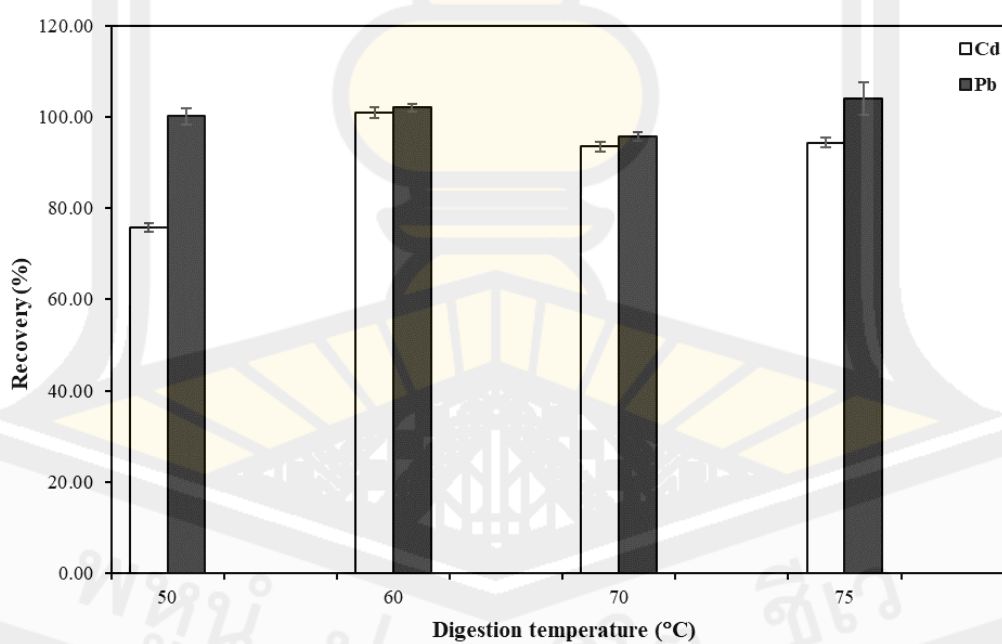


Fig. 2 Effect of digestion temperature on the ultrasound-assisted digestion efficiency (conditions are described in the text)

Table 1 Optimum conditions for the sequential ultrasound-assisted digestion of edible seaweed samples

Digestion parameters	Variation	Optimized value
Solvent system	Series of HNO ₃ 2+1+1 mL H ₂ O ₂ 2+1+1 mL HNO ₃ : H ₂ O ₂ (1:1) 2+1+1 mL HNO ₃ : H ₂ O ₂ (1:2) 2+1+1 mL HNO ₃ : H ₂ O ₂ (2:1) 2+1+1 mL	Series of HNO ₃ : H ₂ O ₂ (2:1) 2+1+1 mL
Sample mass	0.05, 0.10, 0.15, 0.20 g	0.05 – 0.15 g
Pre-sonication time	0, 5, 10 min	5 min
Sonication time (and volume of solvent)	10 min : 10 min (2 mL) 15 min : 10 min (2 mL), 5 min (1 mL) 20 min : 10 min (2 mL), 10 min (1 mL) 20 min : 10 min (2 mL), 5 min (1 mL), 5 min (1 mL) 30 min : 10 min (2 mL), 10 min (1 mL), 10 min (1 mL)	30 min : 10 min (2 mL), 10 min (1 mL), 10 min (1 mL)
Digestion temperature	uncontrolled, 50, 60, 70, 75 °C	60 °C

Table 2 Digestion efficiency of the proposed ultrasound-assisted digestion procedure at optimum conditions

Metal	Added (µg L ⁻¹)	Conventional acid digestion (n=10)		Sequential ultrasound-assisted digestion (n=10)	
		Found (µg L ⁻¹)	Recovery (%)	Found (µg L ⁻¹)	Recovery (%)
Cd	0	29.6 ± 1.2		29.0 ± 1.5	
	50	81.3 ± 3.1	103.3 ± 4.0 (3.9 %RSD)	79.5 ± 1.3	100.9 ± 1.2 (1.2 %RSD)
Pb	0	ND		ND	
	300	289.4 ± 10.1	96.5 ± 3.4 (3.5 %RSD)	294.0 ± 8.3	98.0 ± 2.8 (2.8 %RSD)

Table 3 Analysis of cadmium and lead in sea grapes and some seaweed product samples by proposed ultrasound-assisted digestion-FAAS method

Type of sample ^a	Cd		Pb	
	Amount (mg kg ⁻¹)	Recovery (%)	Amount (mg kg ⁻¹)	Recovery (%)
SG1	0.53 ± 0.04	90.8 ± 0.0	2.69 ± 1.16	84.2 ± 3.3
SG2	0.39 ± 0.14	93.6 ± 1.2	<LOQ ^b 0.84 ± 1.18	90.0 ± 4.9
SG3	0.25 ± 0.02	90.1 ± 0.0	4.18 ± 0.39	90.7 ± 2.0
SG4	0.55 ± 0.12	92.3 ± 1.9	4.88 ± 0.99	86.5 ± 2.0
SG5	0.32 ± 0.08	93.2 ± 0.6	5.57 ± 0.39	90.7 ± 2.0
SG6	1.33 ± 0.00	92.1 ± 3.2	5.97 ± 0.19	82.3 ± 3.8
SG7	0.63 ± 0.04	91.7 ± 0.0	2.39 ± 0.38	98.9 ± 8.5
SG8	0.83 ± 0.06	93.5 ± 1.3	6.24 ± 0.55	82.3 ± 5.6
SG9	0.90 ± 0.02	92.8 ± 0.0	ND ^c	91.6 ± 4.2
SN1	3.74 ± 0.07	86.7 ± 0.6	ND	95.6 ± 2.8
SN2	0.75 ± 0.06	91.6 ± 1.2	ND	93.6 ± 2.8
SN3	0.24 ± 0.02	88.8 ± 1.7	ND	99.6 ± 3.8
SN4	0.25 ± 0.00	88.3 ± 1.2	ND	99.6 ± 0.0
SN5	0.56 ± 0.00	89.2 ± 1.2	2.92 ± 0.19	97.6 ± 2.8
SN6	0.53 ± 0.02	97.1 ± 1.2	ND	88.9 ± 1.9
SN7	0.35 ± 0.04	95.4 ± 0.6	ND	92.2 ± 0.9
SN8	2.16 ± 0.04	94.4 ± 4.4	ND	90.8 ± 0.0
SN9	0.64 ± 0.00	92.6 ± 3.2	2.03 ± 0.01	87.9 ± 2.4
SS1	2.44 ± 0.19	98.7 ± 4.5	2.85 ± 0.65	92.6 ± 1.7
SS2	3.41 ± 0.02	90.3 ± 0.6	4.01 ± 0.33	91.1 ± 2.5
SS3	3.00 ± 0.08	87.0 ± 5.1	3.58 ± 0.33	88.1 ± 3.4
SS4	1.56 ± 0.02	85.8 ± 1.1	5.18 ± 0.01	95.1 ± 1.6
SS5	1.43 ± 0.01	88.7 ± 0.6	5.56 ± 0.18	90.0 ± 0.8
SS6	1.08 ± 0.04	110.5 ± 1.9	ND	99.4 ± 3.9

^a SG1 – SG9, sea grapes; SN1 – SN9, crispy seaweed snack; SS1-SS6, seaweed for soup and sushi

^b <LOQ, below limit of quantification of Cd 1.92 µg L⁻¹; 0.13 mg kg⁻¹ and Pb 29.58 µg L⁻¹; 1.97 mg kg⁻¹

^c ND, Not detected or below detection limit of Cd 0.58 µg L⁻¹; 0.04 mg kg⁻¹ and Pb 8.87 µg L⁻¹; 0.59 mg kg⁻¹

แบบรายงานการดำเนินงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์มาใช้อันก่อให้เกิดประโยชน์อย่างเด่นชัด

พูนัน ปณ จิตโต สีเว

แบบรายงานการนำงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์มาใช้ อันก่อให้เกิดประโยชน์อย่างเด่นชัด
ประจำปีงบประมาณ 2564

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

1. ข้อมูลทั่วไป

ชื่อโครงการ(ภาษาไทย) การพัฒนากระบวนการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงสำหรับการวิเคราะห์โลหะหนักบางชนิดในสาหร่ายทะเลกินได้

ชื่อโครงการ(ภาษาอังกฤษ) Development of ultrasound-assisted digestion procedure for analysis of some heavy metals in edible seaweeds

ชื่อทุน ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาองค์กร และพัฒนาบุคลากร งบประมาณรายได้
ประจำปีงบประมาณ 2564

เลขที่สัญญา 6415004/2564

2. หัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้รับทุน (หัวหน้าโครงการวิจัย)

ชื่อ นางสาวปริตา.....นามสกุล.....มาโยธา.....
ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ปฏิบัติการ.....
สังกัดภาควิชา/สาขา....คณะ/หน่วยงาน...หน่วยบริการวิชาการด้านเครื่องมือวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์.....
โทรศัพท์.....043-754-247.....โทรสาร.....043-754-247.....
email.....paritapop@hotmail.com.....
โทรศัพท์มือถือ088-3657-679.....
สัดส่วนการทำงานวิจัย.....100 %.....

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ นางสาววัสกา.....นามสกุล.....ศิริอังกาวัชร.....
ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์.....
สังกัดภาควิชา/สาขา.....เคมี.....คณะ/หน่วยงาน.....วิทยาศาสตร์.....
โทรศัพท์.....043-754-246.....โทรสาร.....043-754-246.....
email.....watsaka@hotmail.com.....
โทรศัพท์มือถือ087-575-3639.....

3. ประเภทของงานวิจัย

- [] การวิจัยพื้นฐาน
- [] การวิจัยประยุกต์
- [✓] การพัฒนาทดลอง

4. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

‘สาหร่ายทะเล’ เป็นพืชทะเลชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในกลุ่มพืชชั้นต่ำ ไม่มีท่อลำเลียงอาหาร ใช้วิธีการดูดซับน้ำและแร่ธาตุจากน้ำทะเลสู่เซลล์ต่างๆโดยตรง สาหร่ายทุกชนิดมีความสามารถในการสร้างอาหารโดยการสังเคราะห์แสง ซึ่งสารสังเคราะห์แสงที่อยู่ในสาหร่ายแต่ละชนิดสามารถใช้ในการแบ่งกลุ่มสาหร่ายทะเลได้ ดังนี้ สาหร่ายสีเขียว (green algae) กลุ่ม Cholorophyceae เช่น *Caulerpa peltata* สาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) กลุ่ม Phaeophyceae เช่น *Dictyota ciliolata* สาหร่ายสีแดง (red algae) กลุ่ม Rhodophyceae เช่น *Halymenia dutyillei* ในประเทศไทยมีสาหร่ายทะเลอยู่ประมาณ 350 ชนิด เป็นสาหร่ายสีเขียว 100 ชนิด สาหร่ายสีแดง 180 ชนิด และสาหร่ายสีน้ำตาล 70 ชนิด นอกจากทำหน้าที่ดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำทะเลเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงแล้ว สาหร่ายทะเลยังมีประโยชน์หลายอย่างกับสัตว์น้ำในทะเลและมนุษย์ โดยเฉพาะการใช้เป็นอาหาร สัตว์น้ำในทะเลกินสาหร่ายเป็นอาหาร มนุษย์เองก็ใช้สาหร่ายเป็นอาหารเช่นเดียวกัน โดยมีทั้งใช้บริโภคโดยตรงในรูปของสาหร่ายสด เช่น สาหร่ายพวงองุ่น หรือสาหร่ายช่อพริกไทย ที่ได้รับการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงในรูปแบบพืชเศรษฐกิจตามแนวชายฝั่งทะเลของไทย และมีวางจำหน่ายทั่วประเทศ หรือการนำสาหร่ายทะเลมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น สาหร่ายทะเลทอดกรอบ สาหร่ายทะเลอบแห้ง เป็นต้น

สาหร่ายทะเลมีแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อมนุษย์อยู่หลายชนิด เช่น แคลเซียม คลอรีน โครเมียม โคบอลต์ ทองแดง ไอโอดีน เหล็ก แมกนีเซียม ซีลีเนียม โซเดียม ซัลเฟอร์ วานาเดียม และสังกะสี เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ผู้บริโภคควรตระหนักและพึงระวังสารปนเปื้อนในสาหร่าย เนื่องจากเป็นพืชที่มาจากทะเล หากน้ำทะเลบริเวณนั้นไม่สะอาด เช่น อยู่ใกล้แหล่งอุตสาหกรรม ก็มีโอกาสดที่สาหร่ายทะเลนั้นจะปนเปื้อนโลหะหนัก เช่น สารหนูปรอท แคดเมียม และตะกั่วได้ โลหะหนักมีความเป็นพิษ และไม่มีประโยชน์ใดๆต่อร่างกาย ปริมาณโลหะหนักที่พบในอาหารส่งผลกระทบโดยตรงต่อปัญหาด้านสุขภาพ การหาปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสาหร่ายทะเลจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อสุขภาพและอนามัยของผู้บริโภค หน่วยงานด้านสาธารณสุขจึงได้มีการกำหนดระดับความเป็นพิษที่ยอมรับได้ไว้ เช่น องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (FAO/WHO) ได้กำหนดปริมาณสูงสุดที่ร่างกายผู้ใหญ่จะรับแคดเมียมได้ไว้ที่ 7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว และตะกั่วไว้ที่ 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว (World Health Organization, 1992) กระทรวงสาธารณสุขของไทยกำหนดเกณฑ์การปนเปื้อนของตะกั่วในอาหารสูงสุดไว้ที่ปริมาณตะกั่ว 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2529) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนดการปนเปื้อนสูงสุดของแคดเมียมในอาหาร ให้สูงสุดได้ไม่เกิน 2 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2561) ส่วนกระทรวง

อุตสาหกรรมของไทย ได้กำหนดเกณฑ์การปนเปื้อนสูงสุดของตะกั่วและแคดเมียมในสาหร่ายทะเลอบตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.515/2547) ไว้ที่ปริมาณตะกั่วไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และปริมาณแคดเมียมไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2547)

การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในอาหาร นิยมใช้เทคนิคอะตอมมิกสเปกโตรเมตรี (atomic spectrometry) เช่น เฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี (flame atomic absorption spectrometry; FAAS) แกรฟไฟต์เฟิร์นอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี (Graphite furnace atomic absorption spectrometry; GFAAS) อินดักทีฟคัปเพิลพลาสมาแมสสเปกโตรเมตรี (Inductively coupled plasma-mass spectrometry; ICP-MS) เป็นต้น ซึ่งเทคนิคเหล่านี้สามารถตรวจวัดปริมาณโลหะในอาหารได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สะดวกและรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม ความล่าช้าในการตรวจวัดและรายงานผลการวิเคราะห์มักเกิดขึ้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมก่อนนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณ การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และสามารถเตรียมตัวอย่างพร้อมกันได้หลายตัวอย่าง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและลดระยะเวลาในการให้บริการ รวมทั้งลดต้นทุนในการวิเคราะห์หลังได้

ในงานวิจัยนี้ จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็ว โดยวิธีการย่อยตัวอย่างด้วยคลื่นความถี่สูง สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ แคดเมียม และตะกั่วในตัวอย่างสาหร่ายทะเลกินได้ ร่วมกับการตรวจวัดปริมาณโลหะด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี

5. วัตถุประสงค์

5.1 เพื่อพัฒนาวิธีการย่อยตัวอย่างสาหร่ายทะเลกินได้ด้วยคลื่นความถี่สูง

5.2 เพื่อประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก เช่น แคดเมียม และตะกั่วที่ปนเปื้อนในสาหร่ายทะเลกินได้ ด้วยเทคนิคเฟลมอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรเมตรี

ส่วนที่ 2 รายละเอียดเกี่ยวกับการนำงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์ไปใช้อันก่อให้เกิดประโยชน์อย่างเด่นชัด

2.1 ประเภทของการใช้ประโยชน์จากงานวิจัย และงานสร้างสรรค์ (โปรดระบุประเภทโดยใส่เครื่องหมาย ✓)

- [✓] การใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ
- [] การใช้ประโยชน์ เชิงสาธารณะ
- [] การใช้ประโยชน์ เชิงนโยบาย
- [] การใช้ประโยชน์ เชิงพาณิชย์

2.2 สรุปรายละเอียดหลักฐานที่ปรากฏชัดเจนถึงการดำเนินงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์ไปใช้ประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ที่ระบุไว้ในข้อเสนอโครงการ

ได้นำส่วนหนึ่งของผลการวิจัยนี้ มาใช้ประโยชน์ในการจัดการเรียนการสอนในรายวิชา 0202251 เคมีวิเคราะห์ ในหัวข้อการเตรียมตัวอย่าง : การสลายสารประกอบอินทรีย์โดยการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูง

นอกจากนี้ วิธีการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงที่พัฒนาขึ้น ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการย่อยตัวอย่างอาหาร หรือตัวอย่างประเภทอื่น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการให้บริการการวิเคราะห์กับหน่วยงานภายนอกหรือผู้ขอใช้บริการของหน่วยบริการวิชาการด้านเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ต่อไปได้

ลงชื่อ

(นางสาววิสกา ศิริอังคาวุธ)

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ผู้รับรองการนำไปใช้ประโยชน์

วันที่

พูน ปณ จิต สีเว

การเตรียมตัวอย่าง

- การเก็บตัวอย่าง (sampling)
- การทำให้แห้ง (drying)
- การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำ
- การละลายตัวอย่าง
- การสลายสารประกอบอินทรีย์

การสลายสารประกอบอินทรีย์

- การย่อยแบบเปียก (wet digestion)
- การย่อยด้วยเตาไมโครเวฟ (microwave wet digestion)
- การทำให้แห้งเป็นเถ้า (dry ashing)
- การเผาในบรรยากาศออกซิเจนในภาชนะปิด (combustion with oxygen in a sealed container)
- การย่อยด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound-assisted digestion)

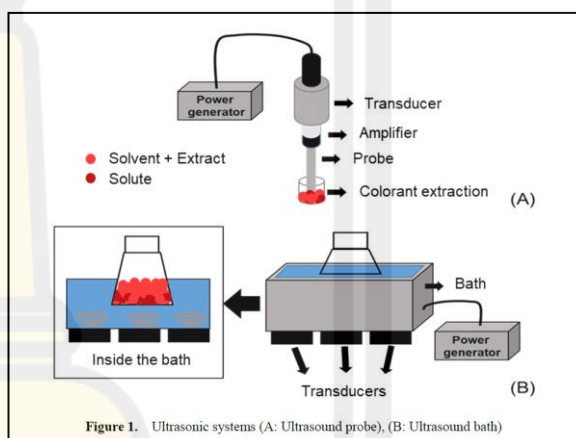
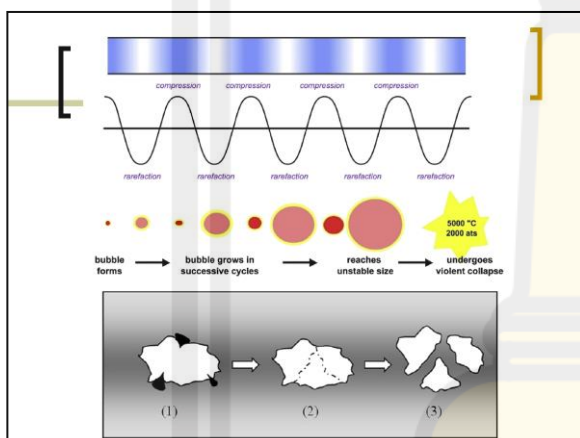
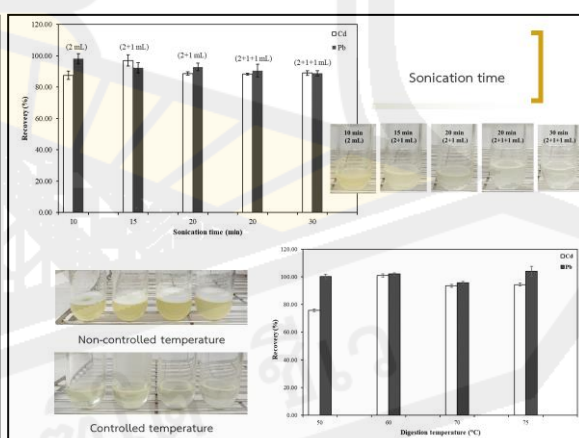
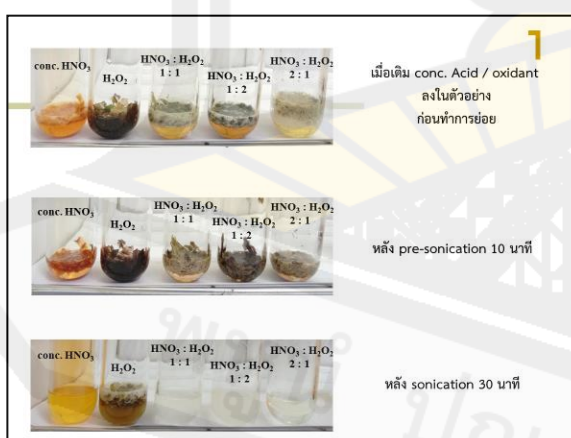


Figure 1. Ultrasonic systems (A: Ultrasound probe), (B: Ultrasound bath)



ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ นางสาวปริตา มาโยธา

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

หน่วยบริการวิชาการด้านเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ต. ขามเรียง อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

e-mail: parita.m@msu.ac.th

โทรศัพท์เคลื่อนที่ 088-3657-679

2. ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสกา ศิริอังคารุช

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ต. ขามเรียง อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

โทรศัพท์/โทรสาร 043-754-246

e-mail: watsaka@hotmail.com

โทรศัพท์เคลื่อนที่ 087-575-3639

พูน ปณ จิต สีเว

รายงานสรุปการเงิน

โครงการ : การพัฒนากระบวนการย่อยด้วยคลื่นความถี่สูงสำหรับการวิเคราะห์โลหะบางชนิดใน
สำหรับทะเลกินได้

สัญญาเลขที่ : 6415004/2564

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : นางสาวปรีดา มาโยธา

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ ถึงวันที่

หมวด (ตามสัญญา)	รายจ่าย		รวมรายจ่าย		งบประมาณ รวมทั้งโครงการ	คงเหลือ (หรือเกิน)
	รายละเอียด จากรายงาน ครั้งก่อน	งวดปัจจุบัน	สะสมจนถึง งวดปัจจุบัน			
1. ค่าตอบแทน	0.00	6,000.00	6,000.00	6,000.00	0.00	0.00
2. ค่าจ้าง	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3. ค่าวัสดุ	0.00	30,000.00	30,000.00	30,000.00	0.00	0.00
4. ค่าใช้สอย	0.00	24,000.00	24,000.00	24,000.00	0.00	0.00
5. ค่าครุภัณฑ์	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6. ค่าอื่นๆ	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
รวม	0.00	60,000.00	60,000.00	60,000.00	0.00	0.00
<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>						
จำนวนเงินที่ได้รับ						
งวดที่ 1		36,000.00	บาท	เมื่อ วันที่		
งวดที่ 2		18,000.00	บาท	เมื่อ วันที่		
งวดที่ 3		6,000.00	บาท	เมื่อ วันที่		
	รวม	60,000.00	บาท			
<u>ค่าใช้จ่าย</u>						
งวดที่ 1		36,000.00	บาท	เมื่อ วันที่		
งวดที่ 2		18,000.00	บาท	เมื่อ วันที่		
งวดที่ 3		0.00	บาท	เมื่อ วันที่		
	รวม	54,000.00	บาท			
จำนวนเงินคงเหลือ		6,000.00	บาท			

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ