

บทที่ 3
การทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตารางที่ 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
Micropipette 10 μ L	VA-100	Accumax
Micropipette 100, 5000 μ L	Wito PET digital	Witeg Germany
Heating mantle & stirrer	Color squid ikamag	IKA
Test tube	-	Pyrex
Beaker	-	Duran
Volumetric flask 5, 25, 50, 100, 250 mL	-	Witeg
Cylinder	-	-
Vial 25 mL	-	-
Magnetic bar	-	-
Thermometer	-	-
Filter paper No.1 (11 μ m), No.4(20-25 μ m), No.5(2.5 μ m)	-	Whatman
Tissue	-	Scott
pH-Sticks 0-14	-	Ajax Finechem
pH Dip Stick 0.0-6.0	-	Sigma-Aldrich
Cu grid 200 mesh	-	EMS Switzerland
Grid storage box	-	EMS Switzerland
Tweezers	78320-5x	EMS Switzerland

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
UV-visible spectrometer	UV-2600	Shimadzu
Particle Size Analyzer	Zetasizer nano ZS	Malvern
Transmission electron microscope	JEM-1230	JEOL
Transmission electron microscope combined with X-ray spectroscopy detector (TEM-EDXs)	JEM-2010	JEOL
Scanning Electron Microscope combined with Energy Dispersive X-ray Spectrometer (SEM-EDS using in mapping technique)	JSM-6460LV	JEOL
Field Emission Scanning Electron Microscope combined with Energy Dispersive X-ray Spectrometer (FESEM-EDS)	INCAx-sight	OXFORD
Atomic absorption spectrometer	JSM-76010F	JEOL
Hydride generator flow injection analysis	INCAx-Max20	OXFORD
Digital camera	PinAAcle 900T	Perkin Elmer
โปรแกรม Image J	FIAS 100	Perkin Elmer
	DSC-WX300	Sony
	1.47v JAVA 1.8.0_31	-

3.2 สารเคมี

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Mercury (II) sulphate (HgSO_4)	Carlo Erba
Mercury chloride (HgCl_2)	BAKER ANALYZED
Silver nitrate (AgNO_3 , 98%)	Carlo Erba
Sodium borohydride (NaBH_4 , 95%)	Carlo Erba
Tri sodium citrate	Carlo Erba
Iron (II) sulphate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Unilab
Magnesium sulphate anhydrous (MgSO_4)	Panreac
Nickel (II) sulphate hexahydrate ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Carlo Erba
Lead (II) nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)	Fluka
Cadmium nitrate tetrahydrate ($\text{CdNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Carlo Erba
Zinc sulphate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Fluka
Copper (II) sulphate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Carlo Erba
Barium nitrate ($\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$)	BAKER ANALYZED
Sodium chloride (NaCl)	Carlo Erba
Sodium fluoride (NaF)	Carlo Erba
Sodium nitrate (NaNO_3)	Carlo Erba
Sodium sulphate (Na_2SO_4)	Carlo Erba
Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Carlo Erba
Manganese sulphate monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Carlo Erba
Potassium permanganate (KMnO_4)	Carlo Erba
Sodium hydrogen sulphide ($\text{NaHS} \cdot x\text{H}_2\text{O}$)	Carlo Erba
Hydrochloric 37% (HCl)	Sigma-Aldrich
Nitric acid 65% (HNO_3)	Sigma-Aldrich
De-ionized (DI) water	Millipore Milli-Q purification system
Standard reference material (SRM) of mercury in water (1641d) with certified value of mercury 1.557 mg/kg \pm 0.020 mg/kg	National institute of standards and technology (NIST)
Unmodified AgNPs with spherical shape sizes of 10, 20, 30, 40, 50 and 60 nm stabilize in 2 mM NaBH_4 solution	Cyodiagnosics Inc.

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสารเคมี

สารละลาย AgNO_3 เตรียมโดยชั่ง AgNO_3 0.0106 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย AgNO_3 ความเข้มข้น 1.25 mM ปริมาตร 50 mL

สารละลาย NaBH_4 เตรียมโดยชั่ง NaBH_4 0.0189 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ปริมาตร 250 mL จะได้สารละลาย NaBH_4 ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 250 mL

สารละลาย tri sodium citrate เตรียมโดยชั่ง tri sodium citrate 0.0184 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 25 mL จะได้สารละลาย tri sodium citrate ความเข้มข้น 2.5 mM ปริมาตร 25 mL

สารละลาย Hg(II) เตรียมโดยชั่ง HgSO_4 0.0037 g ละลายด้วยกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 65%w/v หรือ 15.58 M ปริมาตร 15 μL และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Hg(II) ความเข้มข้น 50 ppm ปริมาตร 50 mL (จะมีความเข้มข้นสุดท้ายของกรดไนตริกเท่ากับ 4.67 mM) ถ้าเตรียมจาก HgCl_2 เตรียมโดยชั่ง HgCl_2 0.0038 g ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 50 mL จะได้สารละลาย Hg(II) ความเข้มข้น 50 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลาย Ba(II) เตรียมโดยชั่ง $\text{Ba(NO}_3)_2$ 0.0019 g ละลายและปรับปริมาตร ด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Ba(II) ความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลาย Ca(II) เตรียมโดยชั่ง CaCl_2 0.0137 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Ca(II) ความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลาย Cd(II) เตรียมโดยชั่ง $\text{Cd(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0027 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Cd(II) ความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลาย Cu(II) เตรียมโดยชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0039 g ละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Cu(II) ความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลาย Fe(II) เตรียมโดยชั่ง $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0049 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Fe(II) ความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลาย Mg(II) เตรียมโดยชั่ง MgSO_4 0.2476 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Mg(II) ความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลาย Mn(II) เตรียมโดยชั่ง $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0012 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Mn(II) ความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลาย Ni(II) เตรียมโดยชั่ง $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0045 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Ni(II) ความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลาย Pb(II) เตรียมโดยชั่ง $\text{Pb(NO}_3)_2$ 0.0016 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Pb(II) ความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลาย Zn(II) เตรียมโดยชั่ง $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0109 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Zn(II) ความเข้มข้น 50 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลายคลอไรด์ (Cl^-) เตรียมโดยชั่ง NaCl 0.0823 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Chloride ความเข้มข้น 1,000 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลายฟลูออไรด์ (F^-) เตรียมโดยชั่ง NaF 0.1108 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Fluoride ความเข้มข้น 1,000 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลายซัลเฟต (SO_4^{2-}) Sulphate เตรียมโดยชั่ง Na_2SO_4 0.0740 g ละลายน้ำและปรับปริมาตร ด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Sulphate ความเข้มข้น 1,000 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลายไนเตรต (NO_3^-) เตรียมโดยชั่ง $NaNO_3$ 0.0686 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Nitrate ความเข้มข้น 1,000 ppm ปริมาตร 50 mL

สารละลายซัลไฟด์ (S^{2-}) Sulphide เตรียมโดยชั่ง $NaHS \cdot xH_2O$ 0.0018 g ละลายในน้ำและปรับ ปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ปริมาตร 50 mL จะได้สารละลาย Sulphide ความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 50 mL

3.3.2 การเตรียมสารละลายอนุภาคเงินนาโนที่ไม่ถูกปรับปรุงพื้นผิว (Unmodified silver nanoparticles; AgNPs)

อนุภาคเงินนาโนถูกสังเคราะห์โดยปรับปรุงตามงานวิจัยของ Wang G.L. และคณะ. [33] และ Solomon D.S. และคณะ [52] โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ ปิเปตสารละลาย $NaBH_4$ ความเข้มข้น 2 mM จำนวน 15 mL ใส่ลงในขวดไซขนาด 30 mL จากนั้นเติมสารละลาย tri-sodium citrate ความเข้มข้น 2.5 mM จำนวน 2 mL นำไปแช่ในตู้เย็นจนสารละลายผสมมีอุณหภูมิเริ่มต้น 18-20 °C นำออกมาจนที่ 1,000 รอบ/นาที จากนั้นเติมสารละลาย $AgNO_3$ ความเข้มข้น 1.25 mM () จำนวน 5 mL กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีแสดงดังภาพ

2 mM $NaBH_4$ 15 mL
ผสมกับ 2.5 mM
tri-sodium citrate 2
mL



นำไปแช่ในตู้เย็นให้
ได้อุณหภูมิประมาณ
18-20 °C

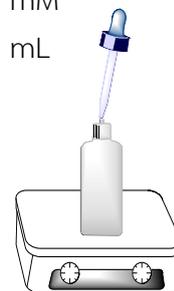


จะได้สารละลายสีเหลืองใสที่มีเสถียรภาพสูงของ

AgNPs



เติม 1.25 mM
 $AgNO_3$ 5 mL

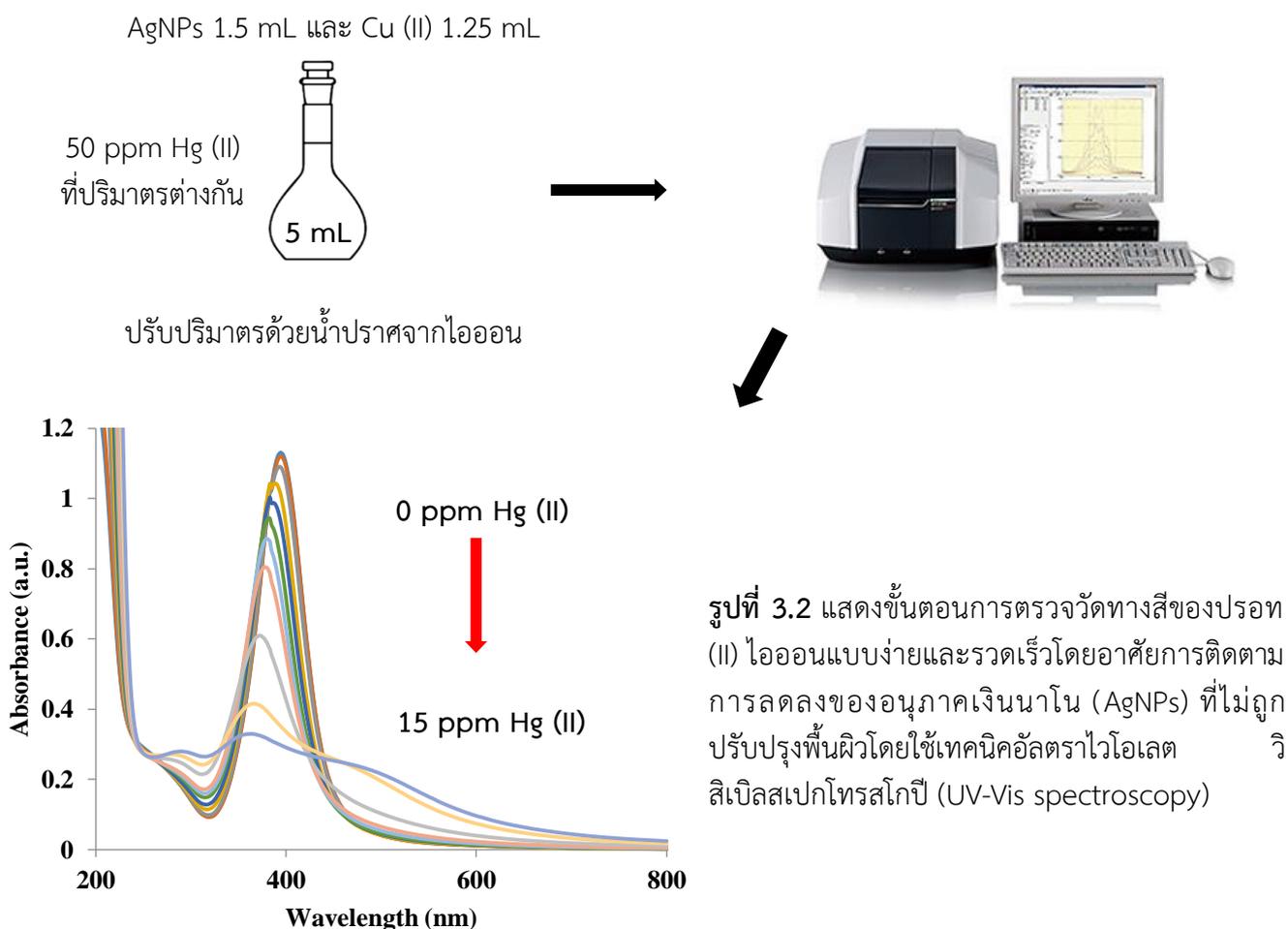


กวนสารละลาย 1,000 รอบ/
นาที เป็นเวลา 30 นาที

รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน (AgNPs)

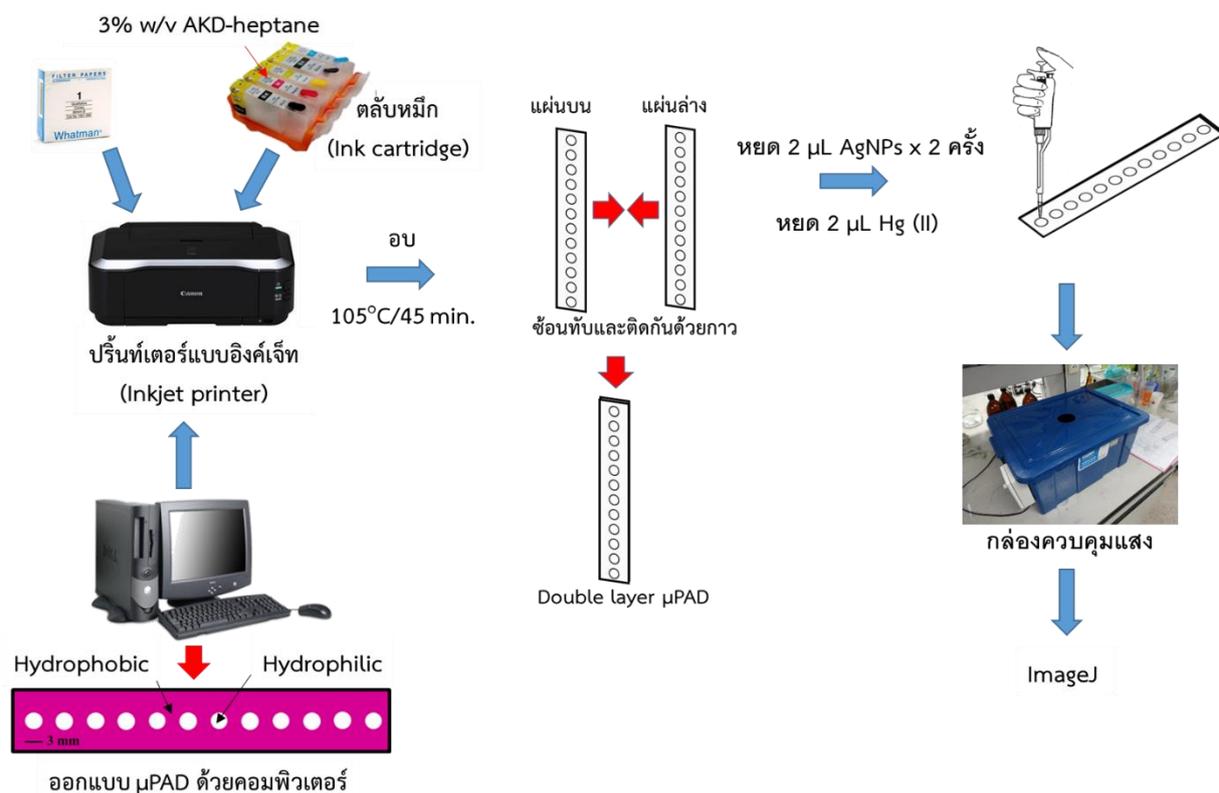
3.3.3 การตรวจวัดทางสีของปรอท (II) ไอออนแบบง่ายและรวดเร็วโดยอาศัยการติดตามการลดลงของอนุภาคเงินนาโน (AgNPs) ที่ไม่ถูกปรับปรุงพื้นผิวโดยใช้เทคนิคอัลตราไวโอเลต วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-Vis spectroscopy)

ปิเปตสารละลาย AgNPs ที่เตรียมได้จาก 3.3.2 ปริมาตร 1.5 mL ตามด้วยสารละลายมาตรฐานคอปเปอร์ (II) ไอออน 50 ppm ปริมาตร 1.25 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายคอปเปอร์ (II) ไอออนเป็น 12.5 ppm จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานปรอท (II) ไอออนความเข้มข้น 50 ppm ลงในขวดวัดปริมาตรตามปริมาณที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนมีความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาตรรวม 5 mL ดังนี้ 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 ppm จากนั้นนำไปวัดการค่าการดูดกลืนแสงโดยสแกนความยาวคลื่นที่ 200-800 nm ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลต วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี โดยใช้ใช้ cuvette ชนิด quartz แสดงดังภาพ (ในส่วนการศึกษาโลหะรบกวนและตัวอย่างจริง ทำการทดลองดังแสดงในข้อ 3.3.3 โดยรายละเอียดแสดงในบทที่ 4 ในส่วนของการศึกษาตัวรบกวนและ การศึกษาร้อยละการได้กลับคืนมา)



3.3.4 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดทางสีของปรอท (II) ที่ใช้ระบบของไหลจุลภาคที่ประดิษฐ์มาจากกระดาษแบบสองชั้น (double layer microfluidic paper-based analytical device, double layer μ PAD)

โดยการออกแบบช่องทางการไหลบนกระดาษที่ใช้สำหรับตรวจวัด เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตรโดยใช้โปรแกรม Microsoft office พื้นฐานที่สามารถสร้างรูปทรงและสีได้ จากนั้นสร้างชิ้นงานส่วนที่เป็นกระดาษด้วยเทคนิค AKD-ink jet printing ดังแสดงในรูปที่ 3.3 โดยบริเวณสีแดง (magenta) ที่ออกแบบคือส่วนที่เป็น hydrophobic และวงกลมสีขาวคือส่วนที่เป็น hydrophilic แทนที่หมึก magenta ด้วย 3% อัลคิลคีทีนไดเมอร์ (Alkyl Ketene Dimer; AKD) ที่ละลายใน เอ็น-เฮปเทน (n-heptane) ปริ้นท์ลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำชิ้นงานมาตัดตามรูปที่ออกแบบไว้ นำชิ้นงานสองชั้นมาวางซ้อนกันแล้วติดกาวเพื่อสร้างเป็น double layer μ PAD จากนั้นเปิดสารละลาย AgNPs ปริมาตร 2 μL หยดลงบนกระดาษที่เตรียมไว้ รอให้แห้งพอหมาด จากนั้นหยด AgNPs ปริมาตร 2 μL ซ้ำอีกครั้ง จากนั้นรอให้แห้ง เปิดสารละลายมาตรฐานปรอท (II) ไอออนความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 7, 10, 25 และ 50 ppm ที่ปริมาตร 2 μL หยดลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดที่เตรียมไว้ รอให้แห้งแล้วนำไปวางในกล่องควบคุมแสงแล้วถ่ายภาพ จากนั้นนำไฟล์ภาพที่ได้มาอ่านค่าสีด้วยโปรแกรม ImageJ (ในส่วนของการศึกษาตัวรบกวน และตัวอย่างจริง ทำการทดลองดังแสดงในข้อ 3.3.4 โดยรายละเอียดแสดงในบทที่ 4 ในส่วนของการศึกษาตัวรบกวนและ การศึกษาร้อยละการได้กลับคืนมา)

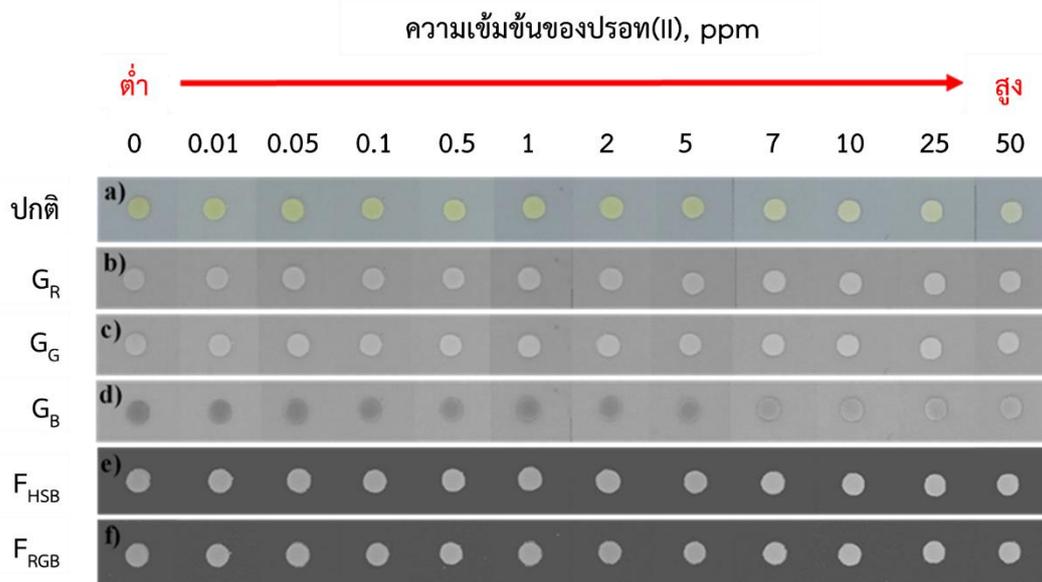


รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดทางสีของปรอท (II) ที่ใช้ระบบของไหลจุลภาคที่ประดิษฐ์มาจากกระดาษแบบสองชั้น (double layer microfluidic paper-based analytical device, double layer μ PAD)

3.3.5 การตรวจวัดทางสีของปรอท (II) ไอออนแบบง่ายและรวดเร็วโดยอาศัยการติดตามการลดลงของอนุภาคเงินนาโน (AgNPs) ที่ไม่ถูกปรับปรุงพื้นผิวบนอุปกรณ์ตรวจวัดที่ใช้ระบบของไหลจุลภาคที่ประดิษฐ์มาจากกระดาษแบบสองชั้น (double layer microfluidic paper-based analytical device, double layer μ PAD) ด้วยเทคนิคการพิมพ์ (printing technique)

เนื่องจากการประยุกต์ใช้การตรวจวัดทางสีของปรอท (II) ไอออนแบบง่ายและรวดเร็วโดยอาศัยการติดตามการลดลงของอนุภาคเงินนาโน (AgNPs) ที่ไม่ถูกปรับปรุงพื้นผิวบนอุปกรณ์ตรวจวัดที่ใช้ระบบของไหลจุลภาคที่ประดิษฐ์มาจากกระดาษแบบสองชั้น (double layer microfluidic paper-based analytical device, double layer μ PAD) ด้วยเทคนิคการพิมพ์ (printing technique) สนใจการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative) สามารถทำได้โดยแปลค่าสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษให้เป็นค่าสัญญาณความเข้มที่แสดงผลเป็นตัวเลขโดยใช้โปรแกรม ImageJ โดยสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาบน double layer μ PAD และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัลตามการทดลองข้อ 3.3.4.

ภาพถ่ายบริเวณตรวจวัด (detection zone) ที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ โดยภาพถ่ายที่ได้จะแสดงได้ 5 แบบ คือ สีเทาในช่องโทนสีแดง (G_R) สีเทาในช่องโทนสีเขียว (G_G) สีเทาในช่องโทนสีน้ำเงิน (G_B) แบบกรองสี HSB (F_{HSB}) และแบบกรองสี RGB (F_{RGB}) โดยในภาพที่เป็นแบบกรองสี HSB และ RGB คือการปรับแต่งค่าเพื่อลดตัวรบกวนจากพื้นหลังโดยใน HSB มีค่า $H = 100, 170, S = 0, 255$ และ $B = 155, 255$ ส่วน RGB มีค่า $R = 129, 159, G = 139, 172$ และ $B = 145, 174$ ดังแสดงในรูปที่ 3.4 จากนั้นได้ศึกษาความไวในการตรวจวัดทางสีโดยพิจารณาจากสัญญาณความเข้มสี 7 ชนิด ซึ่งมาจากการวัดโดยตรง 5 ชนิดจากการแสดงภาพ 5 แบบที่กล่าวข้างต้น และจากการนำค่าความเข้มสี RGB มาคำนวณด้วยสมการ $(R + G + B)/3$ และ $0.2999R + 0.587G + 0.114B$ สำหรับสีเทาเฉลี่ยในอุดมคติ (G_{Avg}) และ สีเทาที่คิดผลของการเรืองแสงจากภายนอก (G_{lum}) ตามลำดับ



รูปที่ 3.4 แสดงภาพของ double layer PAD ที่เคลือบด้วยอนุภาคเงินนาโนที่ไม่มีการปรับปรุงผิวหน้าทำปฏิกิริยากับปรอท (II), ppm a) ภาพที่ถูกแยก สีเทาในช่องโทนสีแดง (G_R) b) สีเทาในช่องโทนสีเขียว (G_G) c) สีเทาในช่องโทนสีน้ำเงิน (G_B) d) แบบกรองสี HSB (F_{HSB}) e) และแบบกรองสี RGB (F_{RGB}) f) ตามลำดับ