

SC-O-02**การพัฒนาวิธีไอออนโครมาโทกราฟีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก
ในไลเคน *Parmotrema tinctorum*****Developing Ion Chromatographic Methods for Analyzing Heavy Metals
in the Lichen *Parmotrema tinctorum***

ชุติมา ศรีวิบูลย์¹ และกัณห์กรีย์ บุญประกอบ²

บทคัดย่อ

โลหะหนักที่สะสมในไลเคนสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดมลพิษทางอากาศได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการเฝ้าติดตามรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณที่สะสมในไลเคน และการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักให้ถูกต้อง เทียบตรง จะทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถอธิบายสภาวะแวดล้อมได้ถูกต้องเชื่อถือได้ งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีไอออนโครมาโทกราฟีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในไลเคน *Parmotrema tinctorum* ซึ่งพบทั่วไปในอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ โลหะหนักที่ศึกษาคือ Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} และ Fe^{3+} ใช้คอลัมน์ IonPac CS5A (Dionex) และตัวชะคือสารละลายผสมของ oxalic acid, NaNO_3 , และ LiOH ด้วยระบบการชะแบบแกรเดียนท์ (gradient elution) โดยใช้ PAR(4- (2-pyridylazo) resorcinol) เป็น PCR (post column reagent) พบว่าเงื่อนไขที่เหมาะสมในการชะ คือ ช่วงเวลา 0 - 1 นาที ใช้สารละลาย 35 mM LiOH + 100 mM NaNO_3 + 50 mM Oxalic acid ช่วงเวลา 4 - 14 นาที ใช้สารละลาย 40 mM LiOH + 100 mM NaNO_3 + 50 mM Oxalic acid ช่วงเวลา 14.1 - 19 นาที ใช้สารละลาย 35 mM LiOH + 200 mM NaNO_3 + 50 mM Oxalic acid ช่วงเวลา 19.1 - 25 นาที ใช้สารละลาย 35 mM LiOH + 100 mM NaNO_3 + 50 mM Oxalic acid เมื่อทำการทดสอบการนำไปใช้ได้ทางการวิเคราะห์หาปริมาณ (method validation) พบว่าการวิเคราะห์ให้ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดของโลหะหนักแต่ละชนิดต่ำกว่า 90 ppb ยกเว้น Pb^{2+} มีค่าสูงถึง 320 ppb ค่าความเที่ยง (%RSD) ต่ำกว่า 2.6 ค่าความถูกต้องรายงานเป็นความผิดพลาดสัมพัทธ์ (%RE) มีค่าน้อยกว่า 10 % ความสัมพันธ์เชิงเส้น (r^2) สูงกว่า 0.998 สำหรับค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดโลหะหนักแต่ละชนิดในไลเคนอยู่ในช่วง 0.38 - 10.65 $\mu\text{g/g}$ โดย Pb^{2+} มีค่ามากที่สุด เมื่อศึกษาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับโดยการ spike สารมาตรฐานลงในไลเคนพบว่ามีความคืนกลับในช่วง 81 - 95 % และมีค่าความเที่ยง (%RSD) ในการวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้งต่ำกว่า 12.8 % เมื่อทำการเก็บตัวอย่างไลเคนต่างสถานที่ในเวลาเดียวกัน และสถานที่เดียวกันแต่คนละเวลา พบว่าปริมาณโลหะหนักเกือบทุกชนิดยกเว้น Ni มีความแตกต่างกันระหว่างสถานที่มากกว่าความแตกต่างของเวลาที่เก็บ

คำสำคัญ: ไลเคน *Parmotrema tinctorum* โลหะหนัก ไอออนโครมาโทกราฟี การชะแบบแกรเดียนท์

¹ รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

² รองศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ABSTRACT

Heavy metals accumulated in lichens can be used as bioindicator to monitor air quality. Accurate analysis for the amounts of heavy metals is essential for reliable data and interpretation of the environment status. This study focuses on the development of ion chromatographic method for determination of heavy metals in the lichen *Parmotrema tinctorum*, which is widely distributed at Khao Yai National Park. The heavy metals were Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} and Fe^{3+} . IonPac CS5A column was used and mixed solution of an oxalic acid, NaNO_3 and LiOH was used as eluent by gradient elution and PAR(4- (2-pyridylazo) resorcinol) was employed as PCR (post column reagent). It was found that the optimum solvent programming was at 0 - 1 min using 35 mM LiOH + 100 mM NaNO_3 + 50 mM Oxalic acid, at 4 - 14 min using 40 mM LiOH + 100 mM NaNO_3 + 50 mM Oxalic acid, at 14.1 - 19 min using 35 mM LiOH + 200 mM NaNO_3 + 50 mM Oxalic acid and at 19.1 - 25 min using 35 mM LiOH + 100 mM NaNO_3 + 50 mM Oxalic acid. Validation of the method showed that limit of detection (LOD) of each heavy metals was below 90 ppb, except Pb^{2+} which was 320 ppb, precision (%RSD) < 2.6. The accuracy represented as relative error (%RE) was < 10 %, linearity (r^2) > 0.998. The detection limit for analysis of each heavy metal was in the range 0.38 - 10.65 $\mu\text{g/g}$. The spike recovery of standard metals into lichens were within the ranges of 81 - 95 %, with %RSD < 12.8 % in seven repetitions. Collections of lichens from different locations at the same time, and same location at different times indicated that the heavy metals had more spatial difference than temporal variation. Nevertheless, all of the heavy metals, except Ni, showed greater differences among locations than the times of collections.

Keywords: lichen, *Parmotrema tinctorum*, heavy metals, ion chromatography, gradient elution

บทนำ

โลหะหนักเป็นธาตุที่พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ปริมาณที่พบตามสถานที่ต่างๆ ขึ้นอยู่กับแหล่งธรรมชาติของธาตุนั้นๆ และ กิจกรรมต่าง ๆ ที่เกิดจากมนุษย์ เช่น โรงงานอุตสาหกรรม การเกษตร และการจราจร เป็นต้น (Mendil et al., 2008; Sanobari and Banisaeid, 2007) โลหะหนักเป็นสารมลพิษในสิ่งแวดล้อม มีรายงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาทางเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์โลหะหนักที่ปนเปื้อนในตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย (Abdulla et al., 1999; Bettinelli et al., 2002; Giordano et al., 2005; Tuncel et al., 2004) ไอออนโครมาโตกราฟีเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก การเลือกใช้คอลัมน์และตัวชะตลอดจนวิธีการที่เหมาะสม ทำให้สามารถแยกและวิเคราะห์หาปริมาณไอออนโลหะหนักที่ต้องการศึกษาได้ถูกต้อง (Cardellicchio et al., 1999)

ไลเคนสามารถดูดซับโลหะหนักจากสิ่งแวดล้อมได้ดีและถูกใช้เป็นตัวชี้วัดชีวภาพเพื่อเฝ้าติดตามคุณภาพอากาศได้ (Bargagli, 1998; Helena et al., 2004.) โลหะหนักที่ตรวจพบในไลเคนมีหลายชนิด ส่วนใหญ่จัดเป็นสารอาหารรองในไลเคน โลหะหนักบางชนิดไม่มีบทบาทในการดำรงชีวิตของไลเคนแต่อาจตรวจวัดได้เนื่องจากการปนเปื้อนของสภาพแวดล้อม โลหะหนักบางชนิดที่สะสมในปริมาณมากเป็นอันตรายต่อการดำรงชีวิตของไลเคน (Hutchinson et al., 2004) ในขณะที่โลหะหนักบางชนิดสะสมอยู่ในปริมาณมากโดยไม่เป็นอันตรายต่อไลเคน

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีไอออนโครมาโตกราฟีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในไลเคนที่แตกต่างจากที่เคยศึกษาโดย สุธาร และคณะ (2545) ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ระบบการชะแบบไอโซคราติก และใช้สารละลาย PDCA เป็นตัวชะ ส่วนงานวิจัยนี้ใช้ระบบการชะแบบแกรเดียนท์ และใช้สารละลายผสมของ oxalic acid, NaNO_3 , และ LiOH

เป็นตัวชะ โดยใช้คอลัมน์ IonPac CS5A (250 x 4 mm I.D.) และ PAR เป็น PCR เช่นเดียวกัน ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงให้การวิเคราะห์ Cd^{2+} และ Pb^{2+} มีความไวเพิ่มขึ้นและทำให้ Fe^{3+} ที่มีปริมาณมากในไลเคนออกจากคอลัมน์เป็นไอออนสุดท้าย โลหะหนักที่ศึกษา ได้แก่ Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} และ Fe^{3+} โดยทำการทดลองหาเงื่อนไขที่เหมาะสมและทำการทดสอบการนำไปใช้ได้ทางการวิเคราะห์หาปริมาณ (method validation)

ตัวอย่างไลเคนที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้แก่ *Parmotrema tinctorum* ที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ มีเงื่อนไขในการเก็บสองแบบคือ เก็บจากพื้นที่เดียวกันแต่เวลาต่างกัน และเก็บจากต่างพื้นที่ในช่วงเวลาเดียวกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ไอออนโลหะหนักคือไอออนโครมาโทกราฟี ของบริษัท Dionex รุ่น DX-500 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) ประกอบด้วย GP 50 gradient pump, LC 20 ส่วนบรรจุคอลัมน์ injection valve (Rheodyne model 9126) และ loop, AD 20 UV/VIS absorbance detector, pneumatic controller (PC 10) ใช้สำหรับเติม post column reagent , คอลัมน์วิเคราะห์ IonPac CS5A (Dionex) ขนาด 250 x 4 mm I.D. พร้อม guard column IonPac CG5A ขนาด 50 x 4 mm I.D. และโปรแกรม Peaknet 5.1 สำหรับเก็บข้อมูลและประมวลผล รวมทั้งควบคุมการทำงานของเครื่องมือ

2. สารเคมีและสารละลายมาตรฐาน

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดคือเกรดงานวิเคราะห์ และน้ำที่ใช้ในการเตรียมสารละลายทั้งหมดคือน้ำปราศจากไอออนที่มีความต้านทานมากกว่า 18.0 MΩ-cm

2.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐานโลหะหนักทุกชนิดถูกนำมาอบที่อุณหภูมิ 110 °C เพื่อไล่ความชื้นแล้วเก็บให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำมาเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานของแต่ละไอออนเข้มข้น 1000 ppm จำนวน 100 mL โดยชั่งอย่างละเอียด ตามน้ำหนักที่คำนวณได้ และทำให้สารละลายมี pH ประมาณ 2 ด้วยกรดไนตริกก่อนปรับปริมาตรเป็น 100 mL เก็บสารละลายไว้ใช้เป็นสต็อก (stock standard solution) ในขวดพลาสติกชนิดโพลีโพรพิลีน ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C สารละลายนี้เก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 6 เดือน ยกเว้นสารละลายมาตรฐานสต็อกของเหล็ก ใช้ Certified 1000 mg/L Fe^{3+} จาก Merck นำสต็อกสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1000 ppm ของไอออนแต่ละชนิดเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 100 ppm เก็บไว้ใช้งานภายในหนึ่งสัปดาห์ ใช้สารละลาย 100 ppm ของแต่ละไอออนเตรียมเป็นสารละลายผสมของไอออนโลหะหนักให้มีความเข้มข้นตามต้องการในการสร้างกราฟมาตรฐานและทำการทดสอบการนำไปใช้ได้ทางการวิเคราะห์หาปริมาณ โดยเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรวิเคราะห์

2.2 สารละลายมาตรฐานโลหะหนักที่รับรองจาก SCP Science เข้มข้น 1000 mg/L ของ copper, nickel, zinc, cadmium, manganese, and lead สารละลายเหล่านี้ถูกนำมาเตรียมให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปไว้ใช้สำหรับควบคุมระบบการวิเคราะห์ในการประกันคุณภาพ

2.3 ตัวชะ (eluent) เตรียมโดยใช้ปริมาตรที่เหมาะสมของ oxalic acid, $NaNO_3$, และ LiOH ที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 ชนิด ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 mL จากนั้นเจือจางให้พอดีชั่งด้วยน้ำปราศจากไอออน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 μm แล้วนำไปไล่แก๊สด้วย ultrasonic bath เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายผสมของ oxalic acid, $NaNO_3$, และ LiOH 3 ชนิด มีสัดส่วนผสมดังนี้

35 mM LiOH	+	100 mM $NaNO_3$	+	50 mM Oxalic acid
40 mM LiOH	+	100 mM $NaNO_3$	+	50 mM Oxalic acid
35 mM LiOH	+	200 mM $NaNO_3$	+	50 mM Oxalic acid

2.4 สารละลาย PCR (post column reagent)

สารละลาย PCR ที่ใช้คือ สารผสมของ 0.3 mM PAR(4-(2-pyridylazo)resorcinol), 0.2 M NaOH และ 0.125 M disodium tetraborate ในน้ำปราศจากไอออน เตรียมโดยคำนวณน้ำหนักของสารแต่ละชนิดให้ได้น้ำหนักที่เมื่อนำมาเตรียมเป็นสารละลาย 1000 mL แล้วมีความเข้มข้นตามที่ต้องการ วิธีการเตรียมทำโดยละลาย NaOH และ disodium tetraborate ที่ซ่งมาในน้ำปราศจากไอออน 600 mL คนด้วยเครื่องคนแม่เหล็ก เมื่อละลายหมดให้เติม PAR แล้วคนต่อจนกระทั่ง PAR ละลายหมด จากนั้นจึงอาจให้มีปริมาตรเข้าใกล้ 1000 mL ปรับ pH ให้ได้ 10.5 ± 0.2 แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 1000 mL ก่อนนำไปใช้ให้กรองผ่านเมมเบรนขนาด $0.45 \mu\text{m}$ และไล่แก๊สเป็นเวลา 15 นาที ด้วยเครื่อง ultrasonic bath

3. เงื่อนไขของโครมากราฟีที่ใช้ในการทดลอง

Analytical Column	IonPac CS5A (250 mm x 4 mm)
Guard Column	IonPac CG5A (50 mm x 4 mm)
Detection	UV-Visible at 520 nm following post-column derivatization with 0.3 mM PAR, 0.2 M NaOH and 0.125 M disodium tetraborate
Eluent	oxalic acid, NaNO_3 , and LiOH (ทำการศึกษาหากระบวนการชะแบบแกรเดียนท์ที่เหมาะสม ดูรายละเอียดในหัวข้อ ผลการทดลองและการอภิปราย)
Eluent flow rate	1.0 mL/min
Sample volume	50 μL

4. การเก็บตัวอย่างไลเคน

ไลเคนที่ใช้ในการทดลองคือ *Parmotrema tinctorum* ซึ่งพบเติบโตได้ทั่วไปในอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ พื้นที่เก็บตัวอย่าง ไลเคน *P. tinctorum* ถูกเก็บจากพื้นที่ต่างกันในอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ได้แก่ สนามกอล์ฟ หนองขิง พระตำหนัก เขาเขียว และเขาน้อยโดยเก็บในวันที่ 1-4 พฤศจิกายน พ.ศ. 2548 ตัวอย่างชุดนี้ใช้สำหรับเปรียบเทียบปริมาณไอออนอนินทรีย์ที่พบในไลเคนจากต่างพื้นที่กัน

วันที่เก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างไลเคนจากพื้นที่เดียวกันคือบริเวณหนองผกชี ในเวลาต่างกัน ได้แก่ สิงหาคม 2547 ธันวาคม 2547 และ มิถุนายน 2008 ตัวอย่างชุดนี้ใช้สำหรับเปรียบเทียบปริมาณไอออนอนินทรีย์ที่พบในไลเคนจากพื้นที่เดียวกัน ในเวลาต่างกัน

5. การเตรียมตัวอย่างไลเคน

หลังจากเก็บตัวอย่างแล้ว ทำการผึ่งให้แห้ง ทำความสะอาดโดยขัดเอาเปลือกไม้หรือดินที่ติดกับไลเคนออกนำส่วนหนึ่งไปชั่งให้น้ำหนักละเอียด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 80°C นาน 24 ชม. นำไปชั่งอีกครั้ง เพื่อหาน้ำหนักไลเคนแห้ง นำตัวอย่างไลเคนที่แห้งบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียด จากการวิจัยของ สุชาทร และคณะ (2545) พบว่าการเตรียมตัวอย่างแบบเผาแห้ง (dry ashing) จะให้ผลการวิเคราะห์ดีกว่าการย่อยเปียก (wet digest) และในการเตรียมตัวอย่างได้ใช้ตัวอย่างเพียง 0.1 กรัม ทำให้การวิเคราะห์ ไม่สามารถวิเคราะห์ Co^{2+} , Cd^{2+} และ Pb^{2+} ได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้เพิ่มปริมาณไลเคนเป็น 0.3 กรัม และได้ทำการทดลองเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเผาไหม้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 450, 500, 550 และ 600°C เป็นเวลา 3 ชม. พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 550°C นำถ้ำที่ได้จากการเผาในครุสิเบิลมาเติมน้ำปราศจากไอออนเล็กน้อย เติม 6 M HNO_3 4 mL ให้ความร้อนจนแห้ง เติม 1 M HNO_3 4 mL ให้ความร้อนจนเกือบแห้ง เติม 0.1 M HNO_3 1 mL ให้ความร้อนจนเกือบแห้ง ทุกขั้นตอนต้องระวังไม่ให้กระเด็นและหก เติมน้ำปราศจากไอออน 5 mL คนด้วยแท่งคนแม่เหล็ก 10 นาที เติมน้ำเป็น 10 mL กรองด้วย 0.2 μm Syringe membrane filter จากนั้นนำไปฉีดเข้าเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี

ผลการทดลองและอภิปราย

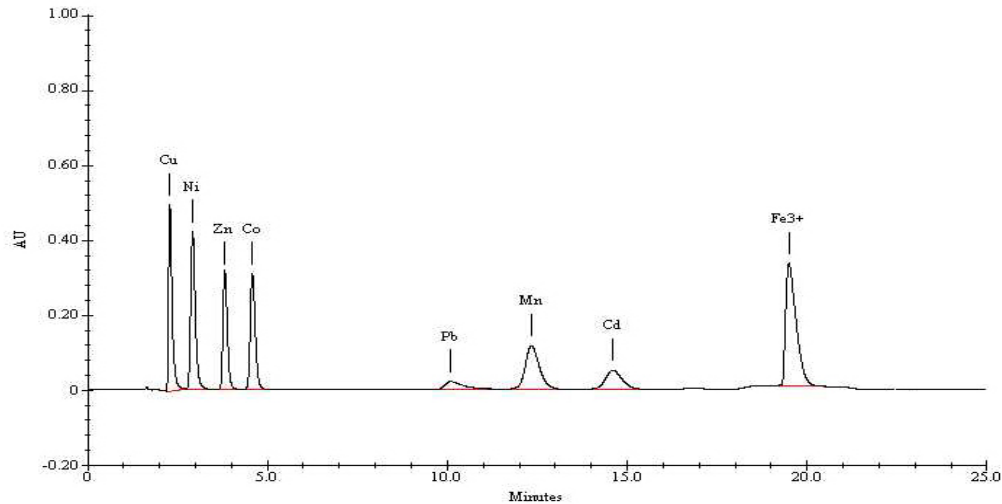
1. การหาเงื่อนไขของโครมาโทกราฟี

เนื่องจากไอออนโลหะหนักส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในไลเคนมีปริมาณน้อยยกเว้นเหล็ก ซึ่งมีอยู่ในปริมาณมากกว่าไอออนอื่น ๆ หลายสิบเท่า การวิจัยจึงมุ่งแยกเหล็กออกจากไอออนอื่น ๆ และออกจากคอลัมน์เป็นตัวสุดท้าย จากการทดลองพบว่าปริมาณ oxalic acid มีผลต่อการแยกไอออนโลหะหนัก ถ้ามีปริมาณ oxalic acid เพิ่มมากขึ้น การแยกจะดีขึ้น แต่ถ้ามากเกินไปมีผลทำให้ตะกั่วไม่แยกออกจากแมงกานีส และในขณะที่ถ้ามีปริมาณไนเตรตน้อยแคดเมียมไม่แยกออกจาก แมงกานีส และไม่สามารถชะ Fe^{3+} ออกจากคอลัมน์ได้ นอกจากนี้ปริมาณความเป็น กรด - เบส ยังมีผลต่อรีเทนชันไทม์ของตะกั่ว แคดเมียม แมงกานีส และเหล็ก จากการวิจัยพบว่าตัวชะที่เหมาะสมสำหรับไอออนแต่ละกลุ่มมีดังนี้ 35 mM LiOH + 100 mM NaNO₃ + 50 mM Oxalic acid เหมาะสำหรับแยก Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเบส โดยให้มีส่วนผสมเป็น 40 mM LiOH + 100 mM NaNO₃ + 50 mM Oxalic acid จะทำให้เหมาะสำหรับแยก Pb²⁺, Cd²⁺, Mn²⁺ และเมื่อปรับตัวชะเป็น 35 mM LiOH + 200 mM NaNO₃ + 50 mM Oxalic acid ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณไนเตรต และลดความเป็นเบสจะทำให้ Fe^{3+} สามารถถูกชะออกจากคอลัมน์เป็นตัวสุดท้ายได้เร็วขึ้น

เมื่อได้ตัวชะที่เหมาะสมสำหรับไอออนโลหะหนักแต่ละกลุ่มได้ทำการศึกษาระบบการชะแบบแกรเดียนท์ พบเงื่อนไขที่เหมาะสมที่สุดตามตารางที่ 1 และโครมาโทแกรมที่แยกได้แสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 1 โปรแกรมการทำการชะแบบแกรเดียนท์ (gradient program)

Step	Time (Min)	Condition	Objective to Study
1	Initial-1.00	35 mM LiOH + 100 mM NaNO ₃ + 50 mM Oxalic acid	To separate Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ with good resolution
2	4.00-14.00	40 mM LiOH + 100 mM NaNO ₃ + 50 mM Oxalic acid	To separate Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , Mn ²⁺ with good resolution
3	14.10-19.00	35 mM LiOH + 200 mM NaNO ₃ + 50 mM Oxalic acid	To separate Fe ³⁺ with short runtime and high sensitivity
4	19.10-25.00	35 mM LiOH + 100 mM NaNO ₃ + 50 mM Oxalic acid	To start next initial condition



ภาพที่ 1 การแยกโลหะหนัก 8 ชนิดตามเงื่อนไขในหัวข้อ 2.3 และ gradient program ตามตารางที่ 1 ความเข้มข้นของไอออนแต่ละชนิดเท่ากับ 2.5 ppm ยกเว้น Pb^{2+} และ Cd^{2+} เท่ากับ 5 ppm โครมาโทแกรมนี้ได้จากการ run blank หักออกจากโครมาโทแกรมของตัวอย่างด้วยโปรแกรม peaknet 5.1 เนื่องจากระบบแตรเดียนท์จะทำให้เส้นฐานไม่เรียบ

2. การทดสอบวิธีโครมาโทกราฟีที่พัฒนาในการวิเคราะห์โลหะหนักเชิงปริมาณ (Validation of Development of Chromatographic Methods for analysis heavy metals)

ได้ทำการทดสอบวิธีโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก (method validation) โดยทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) , ขีดจำกัดของการวัดปริมาณที่ต้องการ (limit of quantitation, LOQ) ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ความไว (sensitivity) ความถูกต้องและความเที่ยง (accuracy and precision)

2.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD)

การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) ทำโดยใช้ความเข้มข้นต่ำ ๆ ของสารละลายแต่ละไอออนในน้ำปราศจากไอออน ที่เครื่องสามารถให้โครมาโทแกรมของไอออนได้ ประมาณ 3 – 5 เท่าที่เครื่องเริ่มวัดได้ โดยทำการวัดทั้งหมด 7 ครั้ง คำนวณหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดจากสมการ

$$LOD = 3 \times S.D.$$

S.D. คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.2 ขีดจำกัดของการวัดปริมาณที่ต้องการ (limit of quantitation, LOQ)

LOQ คือความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (ความเข้มข้น ระดับที่ 1 ในกราฟมาตรฐาน) คำนวณโดยใช้ค่า 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการหาค่า LOD

$$LOQ = 10 \times S.D.$$

ผลที่ได้จากการทดลองแสดงในตารางที่ 2 พบว่าการวิเคราะห์ให้ค่าขีดจำกัดของโลหะหนักแต่ละชนิดต่ำกว่า 90 ppb ยกเว้น Pb^{2+}

ตารางที่ 2 แสดงค่า LOD และ LOQ ของไอออนโลหะหนักที่ศึกษา

Ion	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Cu ²⁺	11.3	37.7
Ni ²⁺	11.7	38.9
Zn ²⁺	13.1	43.5
Co ²⁺	12.4	41.5
Pb ²⁺	319.5	1065.0
Mn ²⁺	35.8	119.5
Cd ²⁺	87.5	291.8
Fe ³⁺	52.4	174.7

2.3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นและความไว (linearity and sensitivity)

ศึกษาโดยใช้ช่วงความเข้มข้นที่มีค่าประมาณ LOQ เป็นจุดแรกของกราฟ และความเข้มข้นสูงสุดครอบคลุมปริมาณไอออนแต่ละชนิดในตัวอย่าง พบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) มากกว่า 0.995 และค่าความไวของแต่ละไอออนพิจารณาจากค่าความชันของกราฟมาตรฐาน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นและความไวของไอออนโลหะหนักที่ศึกษา

Ion	Conc. Range (ppm)	r^2	Sensitivity
Cu ²⁺	0.07-10.00	0.9980	1.05 x 10 ⁶
Ni ²⁺	0.07-10.00	0.9996	1.20 x 10 ⁶
Zn ²⁺	0.08-10.00	0.9983	8.47 x 10 ⁵
Co ²⁺	0.08-10.00	0.9982	9.68 x 10 ⁵
Pb ²⁺	1.20-15.00	0.9990	1.44 x 10 ⁵
Mn ²⁺	0.40-10.00	1.0000	1.06 x 10 ⁶
Cd ²⁺	0.60-10.00	0.9999	5.56 x 10 ⁵
Fe ³⁺	0.20-20.00	0.9983	8.95 x 10 ⁵

2.4 ความถูกต้องและความเที่ยง (accuracy and precision)

ในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ ศึกษาโดย spike ไอออนที่ต้องการวิเคราะห์ลงในน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ระดับ จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณไอออนแต่ละชนิด ความเที่ยง (precision) ของการทำโครมาโทกราฟีศึกษาได้โดยทำการวัดซ้ำในช่วงเวลาเดียวกัน (terms of repeatability) 7 ครั้ง รายงานความเที่ยงด้วยค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ดังแสดงในตารางที่ 4 ผลการทดลองพบว่ามีค่าน้อยกว่า 2.6% ความถูกต้อง (accuracy) รายงานเป็นค่า percentage relative error (%RE) และ range of error (ROE) ที่ 95% confidence level ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 แสดงค่าความเที่ยงในการวิเคราะห์ 7 ครั้งที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

Ion	Low Concentration		Medium Concentration		High Concentration	
	$\bar{X} \pm SD$	%RSD	$\bar{X} \pm SD$	%RSD	$\bar{X} \pm SD$	%RSD
Cu ²⁺	0.481 ± 0.004	0.832	3.020 ± 0.028	0.927	7.095 ± 0.034	0.479
Ni ²⁺	0.471 ± 0.004	0.849	2.982 ± 0.017	0.570	6.970 ± 0.033	0.473
Zn ²⁺	0.484 ± 0.004	0.826	2.912 ± 0.023	0.790	6.908 ± 0.029	0.420
Co ²⁺	0.479 ± 0.003	0.626	2.918 ± 0.018	0.617	6.918 ± 0.030	0.434
Pb ²⁺	1.362 ± 0.034	2.496	5.552 ± 0.127	2.287	11.497 ± 0.131	1.139
Mn ²⁺	0.949 ± 0.008	0.843	2.869 ± 0.018	0.627	6.750 ± 0.026	0.385
Cd ²⁺	0.927 ± 0.012	1.294	2.859 ± 0.029	1.014	6.811 ± 0.048	0.705
Fe ³⁺	0.501 ± 0.013	2.595	7.017 ± 0.131	1.867	14.428 ± 0.103	0.714

ค่าความผิดพลาดสัมพัทธ์ (percentage relative error, %RE) คำนวณจากสมการ:

$$\%RE = \frac{O - T}{T} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

เมื่อ O = ค่าความเข้มข้นที่วัดได้ (concentration found) , T = ค่าความเข้มข้นที่เติม (concentration added)

ค่าพิสัยของความผิดพลาด (range of error, ROE) คำนวณจากสมการ:

$$ROE (\mu - \bar{X}) = \pm \frac{tS}{\sqrt{N}} \dots\dots\dots(2)$$

เมื่อ S = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง

t = แฟคเตอร์ทางสถิติที่ระดับความมั่นใจ 95% (2.36)

ตารางที่ 5 แสดงค่า %RE และ ROE ของการวิเคราะห์ไอออนโลหะหนัก

Ion	Conc. Added (ppm)	Conc. Found (ppm)	%RE	ROE
Cu ²⁺	0.50	0.481	-3.800	± 0.004
	3.00	3.020	0.667	± 0.025
	7.00	7.095	1.357	± 0.030
Ni ²⁺	0.50	0.471	-5.800	± 0.004
	3.00	2.982	-0.600	± 0.015
	7.00	6.970	-0.429	± 0.029
Zn ²⁺	0.50	0.484	-3.200	± 0.004
	3.00	2.912	-2.933	± 0.021
	7.00	6.908	-1.314	± 0.026
Co ²⁺	0.50	0.479	-4.200	± 0.003
	3.00	2.918	-2.733	± 0.016
	7.00	6.918	-1.171	± 0.027
Pb ²⁺	1.50	1.362	-9.200	± 0.030
	6.00	5.552	-7.467	± 0.113
	12.00	11.497	-4.192	± 0.117
Mn ²⁺	1.00	0.949	-5.100	± 0.007
	3.00	2.869	-4.367	± 0.016
	7.00	6.750	-3.571	± 0.023
Cd ²⁺	1.00	0.927	-7.300	± 0.011
	3.00	2.859	-4.700	± 0.026
	7.00	6.811	-2.700	± 0.043
Fe ³⁺	0.50	0.501	0.200	± 0.012
	7.00	7.017	0.243	± 0.117
	14.00	14.428	3.057	± 0.092

จากการทดสอบวิธีโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก พบว่าผลที่ได้ให้ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด ขีดจำกัดของการวัดปริมาณที่ถูกต้อง ความสัมพันธ์เชิงเส้น ความไว ความถูกต้องและความเที่ยง ที่รายงานไว้ในตารางข้างต้นนี้แสดงว่าสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักได้

3. การวิเคราะห์ตัวอย่างไลเคน

3.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัดปริมาณไอออนโลหะหนักในไลเคน

ปริมาณไอออนโลหะหนักต่ำสุดในไลเคนที่เครื่องมือไอออนโครมาโทกราฟีสามารถตรวจวัดได้ คำนวณจากค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) ผลการคำนวณรายงานเป็น LOD_s และปริมาณของไอออนโลหะหนักในไลเคนที่ใช้เป็นค่าขีดจำกัดของการวัดปริมาณที่ถูกต้องรายงานเป็น LOQ_s โดยทำการคำนวณตามสมการที่ 3 และ 4 ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 6

$$LOD_s = \frac{LOD \times V_s}{1000 \times g_s} \dots\dots\dots(3)$$

$$LOQ_s = \frac{LOQ \times V_s}{1000 \times g_s} \dots\dots\dots(4)$$

- เมื่อ LOD_s คือ ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดของตัวอย่าง $\mu\text{g/g}$
- LOQ_s คือ ค่าความเข้มข้นแรกของไอออนในตัวอย่งที่เริ่มวัดค่าได้อย่างน่าเชื่อถือ $\mu\text{g/g}$
- LOD คือ ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดที่เครื่องไอออนโครมาโทกราฟี (ppb)
- LOQ คือ ค่าขีดจำกัดของการวัดปริมาณที่ถูกต้อง (ppb)
- V_s คือ ปริมาตรเป็นมิลลิลิตรที่เตรียมขึ้นของสารละลายตัวอย่างไลเคน
- g_s คือ น้ำหนักเป็นกรัมของตัวอย่างไลเคนที่นำมาเตรียมเป็นสารละลายเพื่อวิเคราะห์

ถ้าผลการวิเคราะห์ให้ค่าต่ำกว่า LOD_s รายงานผลเป็น N.D. (not detect) ถ้าผลการวิเคราะห์ให้ค่าระหว่าง $LOD_s - LOQ_s$ แสดงว่าผลที่ได้ให้ค่าประมาณ ไม่สามารถเชื่อมั่นได้ว่าค่านั้นถูกต้อง ถ้าค่าที่วัดได้มีค่ามากกว่า LOQ_s และอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน แสดงว่าผลที่ได้มีความเชื่อมั่นว่าถูกต้อง

ตารางที่ 6 ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดของตัวอย่าง (LOD_s) และค่าความเข้มข้นแรกของไอออนในตัวอย่งที่เริ่มวัดค่าได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOQ_s)

Ions	$LOD_s (\mu\text{g/g})$	$LOQ_s (\mu\text{g/g})$
Cu^{2+}	0.38	1.26
Ni^{2+}	0.39	1.30
Zn^{2+}	0.44	1.45
Co^{2+}	0.41	1.38
Pb^{2+}	10.65	35.50
Mn^{2+}	1.19	3.98
Cd^{2+}	2.92	9.73
Fe^{3+}	1.75	5.82

3.2 การหาค่าคืนกลับ (% Recovery) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ในการเตรียมตัวอย่าง

ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่างไลเคนต้องศึกษาว่าการใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างดังกล่าวให้ผลถูกต้องและเที่ยงตรงในการวิเคราะห์ ทำโดย spike ไอออนแต่ละชนิดลงในตัวอย่างไลเคนโดยคำนวณให้ได้ความเข้มข้นหลังจากเตรียมตัวอย่างเสร็จแล้วมีความเข้มข้นตามตารางที่ 7 ในขณะที่เดียวกันให้วัดปริมาณของตัวอย่างที่ไม่ได้ spike (blank) ด้วยนำค่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้ของตัวอย่างที่ไม่ได้ spike หักออกจากที่ spike ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง ผลการศึกษาหาค่า %Recovery ของโลหะหนักพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 81 – 95 % และ %RSD น้อยกว่า 12.76 % ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่า %Recovery และ %RSD ของโลหะหนักในไลเคน

Ion	Concentration Added (mg/l)	%Recovery	%RSD
Cu ²⁺	2.00	94.69	3.06
Ni ²⁺	2.00	91.12	1.49
Zn ²⁺	2.00	81.03	2.83
Co ²⁺	2.00	88.82	1.22
Pb ²⁺	4.00	86.18	9.00
Mn ²⁺	2.00	90.14	2.53
Cd ²⁺	4.00	89.14	1.32
Fe ³⁺	2.00	92.13	12.76

3.3 การหาปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างไลเคน

1) เตรียมกราฟมาตรฐานของไอออนโลหะหนักแต่ละชนิด 6 ระดับ โดยมีความเข้มข้นแต่ละระดับตามตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงความเข้มข้นแต่ละระดับของไอออนโลหะหนักในการสร้างกราฟมาตรฐาน

Ions	Level Concentration (ppm)					
	1	2	3	4	5	6
Cu ²⁺	0	0.07	1.00	2.50	5.00	10.00
Ni ²⁺	0	0.07	1.00	2.50	5.00	10.00
Zn ²⁺	0	0.08	1.00	2.50	5.00	10.00
Co ²⁺	0	0.08	1.00	2.50	5.00	10.00
Pb ²⁺	0	1.20	2.50	5.00	10.00	15.00
Mn ²⁺	0	0.40	1.25	2.50	5.00	10.00
Cd ²⁺	0	0.60	1.25	2.50	5.00	10.00
Fe ³⁺	0	0.20	1.00	5.00	10.00	20.00

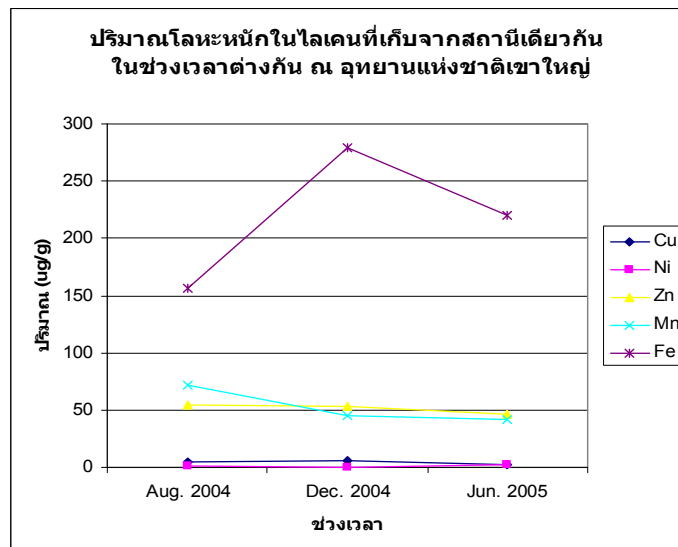
* Level 1 is blank

2) การวิเคราะห์ตัวอย่างไลเคน *Parmotrema tinctorum* การวิเคราะห์ด้วยวิธีไอออนโครมาโทกราฟีปริมาณโลหะหนักจะถูกวัดในรูปของไอออน การรายงานผลแสดงเป็นธาตุของโลหะหนัก ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 9 -10 และภาพที่ 2 -3

ตารางที่ 9 ปริมาณโลหะหนักในไลเคนที่เก็บจากพื้นที่เดียวกันแต่เวลาต่างกัน

ธาตุ ($\mu\text{g/g}$)	เวลา (เดือน)			$\bar{x} \pm SD$	%RSD
	ส.ค. 2547	ธ.ค. 2547	มิ.ย. 2548		
Cu	4.69	5.94	1.96	4.17 ± 2.04	48.92
Ni	1.42	N.D.	2.06	1.16 ± 1.05	90.52
Zn	54.18	53.42	45.96	51.19 ± 4.54	8.87
Co	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
Pb	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
Mn	72.06	44.89	41.46	52.80 ± 16.76	31.74
Cd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
Fe	156.57	278.72	220.30	218.53 ± 61.09	27.95

หมายเหตุ: N.D. = not detected อาจไม่ได้หมายความว่าไม่มีไอออนในไลเคน ปริมาณที่มีนั้นอาจน้อยมากไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธีที่ใช้วิเคราะห์

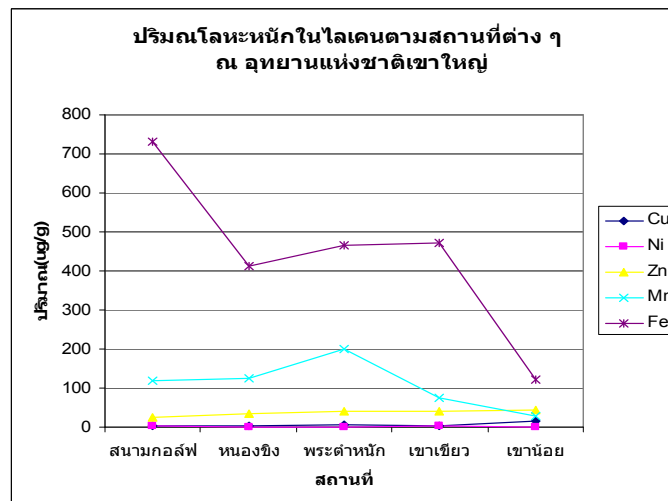


ภาพที่ 2 ปริมาณโลหะหนักในไลเคน *P. tinctorum* ที่เก็บจากพื้นที่เดียวกันในช่วงเวลาต่างกัน ณ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่

ตารางที่ 10 ปริมาณโลหะหนักในไลเคนที่เก็บต่างพื้นที่ในช่วงเวลาเดียวกัน วันที่เก็บ 1-4 พฤศจิกายน พ.ศ. 2548

ธาตุ ($\mu\text{g/g}$)	สนามกอล์ฟ	หนองซิง	พระตำหนัก	เขาเขียว	เขาน้อย	$\bar{x} \pm SD$	%RSD
Cu	3.46	3.61	4.94	3.22	15.64	6.17 ± 5.33	86.38
Ni	2.06	0.87	1.12	1.61	0.55	1.24 ± 0.60	48.39
Zn	25.18	34.26	40.86	41.16	43.81	37.05 ± 7.51	20.27
Co	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
Pb	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
Mn	119.25	126.38	201.38	75.72	28.03	110.15 ± 64.42	58.48
Cd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
Fe	730.33	411.59	464.36	471.34	120.64	439.65 ± 217.18	49.40

หมายเหตุ: N.D. = Not detected อาจไม่ได้หมายความว่าไม่มีไอออนในไลเคน ปริมาณที่มีนั้นอาจน้อยมากไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธีที่ใช้วิเคราะห์



ภาพที่ 3 ปริมาณโลหะหนักในไลเคน *P. tinctorum* ที่เก็บในช่วงเวลาเดียวกันแต่ต่างพื้นที่ ณ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่

เมื่อพิจารณาโลหะหนักแต่ละชนิดพบว่า Zn มีการผันแปรน้อยที่สุดจากการเก็บทั้งสองกรณี (เปรียบเทียบจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์) ดังแสดงในตารางที่ 11 และพบว่าปริมาณโลหะหนักเกือบทุกชนิดยกเว้น Ni มีความแตกต่างกันระหว่างพื้นที่มากกว่าความแตกต่างของเวลาที่เก็บ สำหรับโลหะหนัก Co, Pb, Cd ตรวจไม่พบทั้งสองกรณี ซึ่งไม่อาจจะระบุได้ว่าในไลเคนมี Co, Pb และ Cd หรือไม่ หรือมีอยู่น้อยกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดตามปกติปริมาณ Pb ในไลเคนเกิดจากไลเคนดูดซับ Pb ที่อยู่ในบรรยากาศเนื่องจากการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่มีส่วนผสมของ tetraethyl lead ในรถยนต์ หรือเกิดจากการเผาไหม้ถ่านหินในอุตสาหกรรม (Scerbo et al., 2002) การที่ปัจจุบันประเทศไทยยกเลิกการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่มีส่วนผสมของ tetraethyl lead จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการสะสม Pb น้อย และ ตรวจไม่พบ Pb ในไลเคน สำหรับ Fe เป็นธาตุที่พบมากที่สุดไนไลเคนเนื่องจากเป็นธาตุที่มีอยู่เป็นปริมาณมากทั่วไปในสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในไลเคนที่วิเคราะห์จากพื้นที่เดียวกันแต่ต่างเวลากับที่วิเคราะห์จากพื้นที่ต่างกันแต่เก็บในช่วงเวลาเดียวกัน

ธาตุ ($\mu\text{g/g}$)	พื้นที่เดียวกันเก็บเวลาต่างกัน				พื้นที่ต่างกันเก็บเวลาเดียวกัน			
	$\bar{x} \pm SD$	Max	Min	%RSD	$\bar{x} \pm SD$	Max	Min	%RSD
Cu	4.17 \pm 2.04	5.94	1.96	48.92	6.17 \pm 5.33	15.64	3.22	86.38
Ni	1.16 \pm 1.05	2.06	N.D.	90.52	1.24 \pm 0.60	2.06	0.55	48.39
Zn	51.19 \pm 4.54	54.18	45.96	8.87	37.05 \pm 7.51	43.81	25.18	20.27
Co	N.D.				N.D.			
Pb	N.D.				N.D.			
Mn	52.80 \pm 16.76	72.06	41.46	31.74	110.15 \pm 64.42	201.38	28.03	58.48
Cd	N.D.				N.D.			
Fe	218.53 \pm 61.09	278.42	156.57	27.95	439.65 \pm 217.18	730.33	120.64	49.40

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาวิจัยพบว่าวิธีการไอออนโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการหาปริมาณโลหะหนักในไลเคนได้ โดยการวิเคราะห์โลหะหนักในไลเคนมีขีดจำกัดของการตรวจวัดแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดต่ำกว่า 2.0 $\mu\text{g/g}$ คือ Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} และ Fe^{3+} กลุ่มที่มีค่าสูงกว่า 2.0 $\mu\text{g/g}$ คือ Pb^{2+} และ Cd^{2+} พบว่า Pb^{2+} เป็นไอออนที่มีค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดสูงที่สุด คือ 10.65 $\mu\text{g/g}$ ส่วน Cd^{2+} คือ 2.92 $\mu\text{g/g}$ ทำให้การวิเคราะห์ไม่สามารถตรวจพบไอออนทั้งสองในไลเคน สำหรับ Co^{2+} ไม่สามารถตรวจพบในไลเคนเช่นกัน ซึ่งไม่อาจจะบ่งชี้ได้ว่าในไลเคนมี Co^{2+} , Pb^{2+} และ Cd^{2+} หรือไม่ หรือมีต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด ข้อเสียของระบบที่พัฒนาขึ้นนี้คือใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละครั้งนานถึง 25 นาที ควรมีการวิจัยเพื่อศึกษาหาเงื่อนไขของโครมาโทกราฟีที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลง และสามารถวิเคราะห์ Pb^{2+} และ Cd^{2+} ให้ดีขึ้นต่อไปอีก

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์พื้นที่เดียวกันเก็บเวลาต่างกับพื้นที่ต่างกันเก็บเวลาเดียวกันโดยวิธี t-test (compare mean) พบว่าปริมาณโลหะหนัก Cu, Ni, Mn และ Fe ในไลเคน ยกเว้น Zn มีปริมาณทั้งสองกรณีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความมั่นใจ 95 % และเมื่อพิจารณาจากผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณโลหะหนักในไลเคนส่วนมากมีความผันแปรสูงระหว่างพื้นที่ และเวลา จึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเก็บตัวอย่างจากเขาใหญ่เพื่อใช้เป็นสภาวะควบคุมจึงเก็บได้ทั่วไป ไม่จำกัดพื้นที่ และเวลา แต่ควรมีตัวอย่างจำนวนมากพอที่คลุมความแปรปรวนในช่วงกว้างได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ดำเนินการร่วมกันระหว่างหน่วยวิจัยไลเคน ภาควิชาชีววิทยา กับสาขาเคมีวิเคราะห์ ภาควิชาเคมี โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ผ่านสภากิจการแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยรามคำแหง ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวกิตติยา เจียรนกุล และนางสาวดวงใจ เกษัชชา ที่ทำการวิเคราะห์ทางเคมี

เอกสารอ้างอิง

สุทธธ มาสถิต ชูติมา ศรีวิบูลย์ และกัณห์ริย์ บุญประกอบ. 2545. การวิเคราะห์โลหะหนักในไลเคนจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่โดยวิธีไอออนโครมาโทกราฟี. วารสารรามคำแหง 19(3): 1-13.

Abdulla W., Al-Shawi and Dahl, R. 1999. The determination of cadmium and six other heavy metals in nitrate/phosphate fertilizer solution by ion chromatography. Analytica Chimica Acta, 391: 35-42.

- Bargagli, R. 1998. Trace Elements in Terrestrial Plants. An Ecological Approach to Biomonitoring and Biorecovery, Springer, Berlin.
- Bettinelli, M., Perotti, M., Spezia, S., Baffi, C., Beone, G.M., Alberici, F. et al., 2002. The role of analytical methods for the determination of trace elements in environmental biomonitors, *Microchemical Journal*, 73: 131-152.
- Cardellicchio, N., Cavalli, S., Ragon, P. and Riviello, J.M. 1999. New strategies for determination of transition metals by complexation ion-exchange chromatography and post column reaction. *Journal of Chromatography A*, 847: 251-259.
- Giordano, S., Adamo, P., Sorbo S. & Vingiani, S. 2005. Atmospheric trace metal pollution in the Naples urban area based on results from moss and lichen bags. *Environmental Pollution*. 136(3): 431-442
- Helena, P., Franc, B. and Cvetka, R. L. 2004. Monitoring of Short-Term Heavy Metal Deposition by Accumulation in Epiphytic Lichens (*Hypogymnia Physodes* (L.) Nyl. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 49: 223-230.
- Hutchinson, J., Maynard, D. and Geiser, L. 2004. Air quality and lichens: A literature review emphasizing the Pacific Northwest, USA [Online]. Available URL: <http://www.fs.fed.us/r6/aq/lichen/biblo.html>
- Mendil, D., Tuzen, M. and Soylak, M. 2008. A biosorption system for metal ions on *Penicillium italicum*-loaded on Sepabeads SP 70 prior to flame atomic absorption spectrometric determinations. *Journal of Hazardous Materials*, 152(3): 1171-1178.
- Sanobari, F. and Banisaeid, S. 2007. Determination of atmospheric particulate matter and heavy metals in air of Tabriz City, Iran. *Asian Journal of Chemistry*, 19(6): 4143-4150.
- Scerbo, R., Possenti, L., Lampugnani, L., Ristori, T., Barale, R. and Barghigiani, C. 2002. Lichen (*Xanthoria parietina*) biomonitoring of trace element contamination and air quality assessment in Pisa Province (Tuscany, Italy). *The Science of the Total Environment*, 286: 27-40.
- Tuncel, S.G., Yenisoay-Karakas, S. and Dogangün, A. 2004. Determination of metal concentrations in lichen samples by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy technique after applying different digestion procedures. *Talanta*, 63(2): 273-277.