บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ชนิดและองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นวัตถุดิบหรือสารตั้งต้น สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่จะนำไปใช้ในขบวนการผลิตผงซักฟอก ซึ่งในธุรกิจด้านการซื้อ-ขาย สารเคมีสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมจะเรียกสารดังกล่าวนี้ว่า สารลดแรงตึงผิว เช่นกัน การเปลี่ยนสูตรของผงซักฟอกก็เป็นการเปลี่ยนสารตั้งต้นของสารลดแรงตึงผิวจาก Branched alkylbenzene sulphonic acid ไปเป็น Linear alkylbenzene sulphonic acid นั่นเอง สารทั้งสองตัวนี้จะประกอบด้วยกลุ่มอัลคิลที่มีคาร์บอนอะตอม 12 อะตอม และมีชื่อเฉพาะว่า Dodecylbenzene sulphonic acid ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะใช้คำย่อ ABS-ACID แทน Branched alkylbenzene sulphonic acid และใช้คำว่า LAS-ACID แทน Linear alkylbenzene sulphonic acid โดยมีชื่อทางการค้า คุณสมบัติ รวมทั้งลักษณะของการดูดกลืนแสงอินฟาเรด (Absorption of infra-red spectrum) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 รูปที่ 1 และรูปที่ 2 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 คุณสมบัติของสารตั้งต้นของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการทดลอง

	ABS-ACID	LAS-ACID
Trade name	DBS-100	SBS-12-100
Chemical components	$C_{12}H_{25}$	S_3OH
Active ingredients (%)	96 min	96.3 (96 min)
Free sulphuric acid (%)	1.5 max	1.2 (1.5 max)
Petroleum ether		
Souble matter (%)	2.5 max	2.5 max
Water contents (%)	10.3 max	0.7 (10.3 max)
Free oil (%)	-	1.8
Type	Hard	Soft
Bleaching	Unbleach	Unbleach

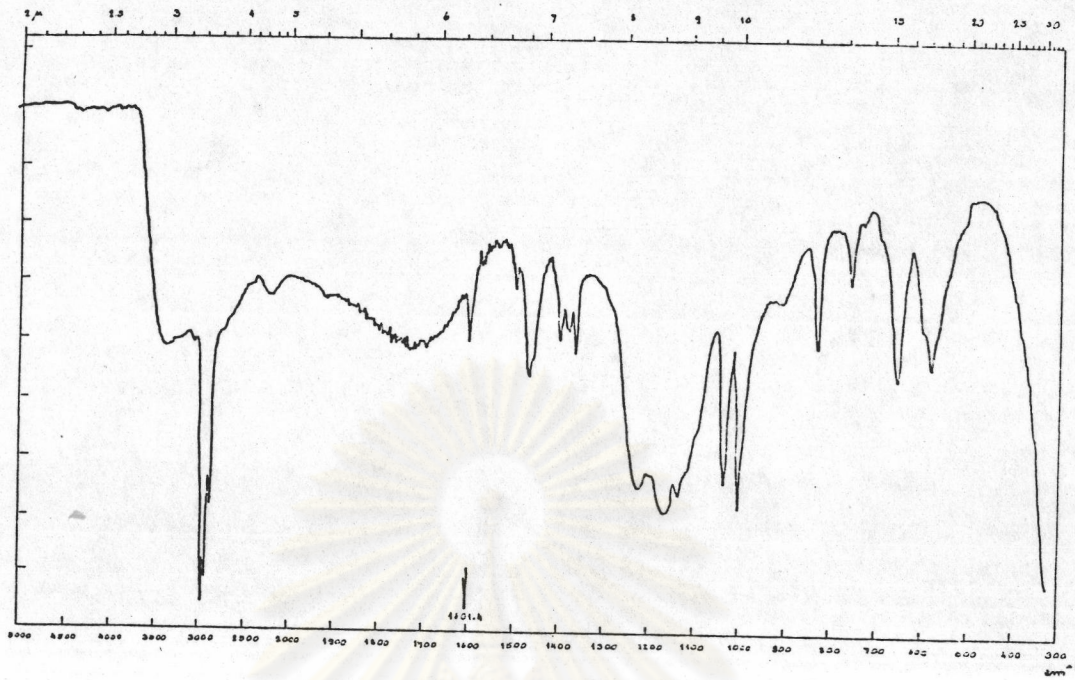
การหาความเข้มข้นของสาร ABS-ACID และ LAS-ACID ที่ใช้ในการทดลอง

ทำการวัดความถ่วงจำเพาะของสารเคมีทั้งสองชนิด ตามวิธีซึ่งดัดแปลงมาจาก American Socicty for Testing and Materials (1980) นำค่า ความถ่วงจำเพาะที่หาได้ไปคำนวณเป็นค่าความหนาแน่น

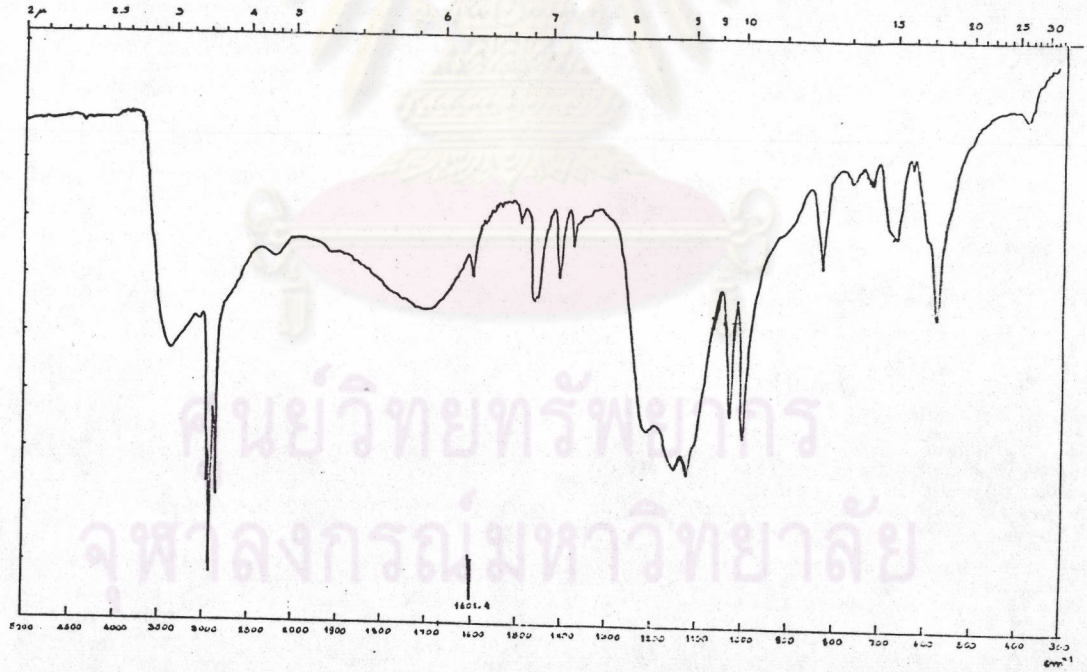
$$P_s = P_{\text{water at } T_R} \times \text{ค่าที่อ่านได้จาก Hydrometer}$$

เมื่อ P_s = ความหนาแน่นของสารที่ต้องการ มีหน่วยเป็นกรัม/มิลลิลิตร

$P_{\text{water at } T_R}$ = ความหนาแน่นของน้ำ ณ อุณหภูมิที่ทำการทดลองในที่นี้มีค่าเป็น 0.996232 กรัม/มิลลิลิตร (Weast 1969)



รูปที่ 1. การดูดกลืนแสงอินฟาเรด ของ ABS– ACID



รูปที่ 2. การดูดกลืนแสงอินฟาเรด ของ LAS – ACID

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เนื่องจากสารที่ใช้ทดลองอยู่ในสภาพของเหลว การเตรียมสารละลายมาตรฐานจำเป็นต้องใช้วิธีการคำนวณหาปริมาณของสารที่จะถูกนำมาละลายน้ำให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นตามต้องการ

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ คือ

$$N_1 V_2 = N_2 V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ใช้ ซึ่งมีค่าเท่ากับความหนาแน่นในหน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร

V_1 = ปริมาตรของสารตั้งต้นที่ใช้ (มิลลิลิตร)

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ (มิลลิกรัม/ลิตร)

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ (มิลลิลิตร)

การเตรียมสารละลายดังกล่าว จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนลำดับแรกจะเป็นการเตรียม Stock solution ที่มีความเข้มข้นลดลง 20 เท่าของสารเคมีตั้งต้นที่เข้มข้น Stock solution ที่ได้จะถูกนำไปเจือจางเป็นสารละลายมาตรฐาน (Standard solution ที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมน้ำสำหรับการทดลอง

เตรียมน้ำที่มีความเค็มสำหรับใช้ในการทดลอง โดยเติมสารประกอบต่าง ๆ 6 ชนิดคือ โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต แมกนีเซียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ โปแตสเซียมคลอไรด์ และโซเดียมไบคาร์บอเนต ลงในน้ำจืดตามอัตราส่วนที่ระบุไว้โดย Spotte (1979) น้ำเค็มที่เตรียมได้โดยวิธีนี้จะมีความเค็มอยู่ระหว่าง 33-34 ส่วนในพันส่วน คุณภาพน้ำที่ทำการทดลองได้แก่ อุณหภูมิ 22-24 ซ และ pH ประมาณ 7.2 ปริมาณออกซิเจน ระหว่าง 4.5-6.0 มก./ล. น้ำที่เตรียมได้จะถูกตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนและกรองด้วยผ้ากรองขนาดตา 70 ไมครอนก่อนนำมาเจือจางให้ได้ความเค็มที่ต้องการ

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร ABS-ACID และ LAS-ACID ต่อลูกปลานิลที่ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน

สัตว์ทดลอง

ลูกปลานิล (Tilapia nilotica Linn.) ที่นำมาทดลองจัดอยู่ในสายพันธุ์จิตรลดา (Chitralada strain) มีขนาดความยาวตั้งแต่ 1.5-3.5 เซนติเมตร นำมาจากสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติและบ่อเลี้ยงของเอกชน การขนย้ายมายังห้องทดลองของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นั้น ใช้บรรจุมาในถุงพลาสติกอัดอากาศ นำลูกปลามาเลี้ยงไว้ในน้ำจืด มีการให้อากาศพร้อมทั้งดูดตะกอนและเปลี่ยนน้ำทุกวัน เริ่มให้อาหารสำเร็จรูปหลังจากวันที่มาถึงห้องทดลอง ประมาณวันที่ 4 เริ่มทำการเพิ่มความเค็มทีละน้อยทุกวัน โดยการเติมน้ำที่มีความเค็มสูงกว่าน้ำในตู้เลี้ยง ลงไปแทนน้ำที่ดูดออกมาพร้อมตะกอน ประมาณ 7-10 วันจนถึงความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน จากนั้นเลี้ยงลูกปลาในน้ำที่มีระดับความเค็มดังกล่าวประมาณ 4-6 วัน โดยงดให้อาหารในช่วง 2-3 วันก่อนการทดลอง

การหาช่วงความเข้มข้นของสารเคมีที่สูงที่สุดซึ่งปลาสามารถอยู่ได้และความเข้มข้นต่ำสุด ที่มีผลให้ปลาตายทั้งหมด

การหาค่าความเข้มข้นของสารเคมีที่สูงที่สุดซึ่งลูกปลาสามารถอยู่ได้และความเข้มข้นต่ำสุดที่ลูกปลาตายทั้งหมด ใช้วิธีการทดลองชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (Static bioassay) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในน้ำที่มีความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน โดยใช้สาร ABS-ACID ที่มีความเข้มข้น 0,0.1 ,1.0 ,10.0 และ 56.0 มก./ล. และ LAS-ACID ความเข้มข้น 0, 0.1, 1.0, 10.0 และ 32.0 มก./ล. ตามลำดับ การทดลองนี้ทำในตู้กระจกขนาด 25X50X25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งบรรจุน้ำ 15 ลิตร ใช้ลูกปลานิลที่ถูกปรับสภาพไว้ในน้ำเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน จำนวน 20 ตัว ต่อความเข้มข้นแต่ละค่า ขณะทดลองให้อากาศตลอดเวลา ตรวจจำนวนและแยกสัตว์ทดลองที่ตายออกมาในเวลา 0,1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการหาระดับความเข้มข้นของสาร ABS-ACID และ LAS-CAID ที่ทำให้ลูกปลารอดชีวิตทั้งหมด และความเข้มข้น

ที่ทำให้ลูกปลาทั้งหมดตาย สำหรับนำไปใช้ในการทดลองตอนต่อไป

การทดลองศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร ABS-ACID และ LAS-ACID ต่อลูกปลานิล ที่ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ได้กล่าวมาข้างต้นรวม 3 ซ้ำ แต่เปลี่ยนระดับความเข้มข้นของสาร ABS-ACID และ LAS-ACID ทั้ง 5 ระดับ ให้มีค่าอยู่ระหว่างความเข้มข้นที่ไม่มีพิษต่อลูกปลา และระดับความเข้มข้นที่ทำให้ลูกปลาตายทั้งหมด พร้อมทั้งจัดให้มีตู้ควบคุม (Control) คือพวกที่เลี้ยงไว้ในความเค็มปกติด้วยเพื่อใช้เปรียบเทียบ ก่อนและหลังจากการทดลองทำการตรวจคุณสมบัติของน้ำคืออุณหภูมิน้ำและปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำด้วยเครื่อง Oxygen meter-YSI Model 51 B (Simpson Electric Co., Elgin III, 60120 U.S.A.) วัด pH ของน้ำโดยใช้ pH paper ช่วง 6-8 และปริมาณ Unionized ammonia ตามวิธีของ Koroloeff (1976) เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการวัดปริมาณสารเคมีทั้งสองชนิดในสภาพอนุมูลประจุลบ โดยวิธีของ Wang et al. (1975) สังเกตจำนวนของสัตว์ทดลองที่ตายในเวลาที่กำหนด เช่น เดียวกับการทดลองที่ผ่านมา คำนวณค่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองร้อยละ 50 ตาย ภายในเวลา 96 ชั่วโมง หรือค่า 96 ชั่วโมง LC_{50} (Median lethal concentration) โดยวิธีโปรบิท (ปรีชา สมมณี, 2520) จากนั้นคำนวณระดับความเข้มข้นที่เริ่มเป็นพิษ (Lethal threshold concentration) ตามวิธีของ ปรีชา สมมณี (2525)

การศึกษาความเป็นพิษของสาร ABS-ACID และ LAS-ACID ในระดับความเค็มต่าง ๆ

สัตว์ทดลอง

นำลูกปลานิลขนาด 1.5-3.5 เซนติเมตร มาปรับสภาพให้คุ้นเคยกับน้ำตัวกลางที่มีความเค็ม 10 ถึง 30 ส่วนในพันส่วน ตามวิธีเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา

การทดลอง

ทำการทดลองชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่งในเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้สาร ABS-ACID และ LAS-ACID ที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่าความเข้มข้นที่เป็นค่า 96 ชั่วโมง

LC_{50} ของสารแต่ละชนิด ซึ่งได้มาจากการทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันดังกล่าว ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในน้ำที่มีความเค็มต่างกัน 5 ระดับ คือ 10, 15, 20, 25 และ 30 ส่วนในพันส่วน จัดให้มีการเปรียบเทียบกับพวกที่เป็นประเภทควบคุม (Control) ทุกระดับความเค็ม ตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำและปริมาณสารทั้งสองชนิด เช่นเดียวกับการทดลองที่แล้ว สังเกตจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายภายในเวลา 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบอัตราการตายสะสม

พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกในปลาทดลองที่สัมผัสกับสาร ABS-ACID และ LAS-ACID ความเข้มข้นต่ำ ในระดับความเค็มต่าง ๆ

สัตว์ทดลอง

ทำการทดลองกับลูกปลานิลที่ถูกปรับสภาพไว้ในน้ำความเค็ม 10 , 20 และ 30 ส่วนในพันส่วน

การทดลอง

ดำเนินการทดลองชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง โดยใช้สาร ABS-ACID และ LAS-ACID ที่มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 25 , 50 , และ 75 ของระดับเริ่มเป็นพิษที่คำนวณได้จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน ทั้งนี้จะต้องมีประเภทควบคุมทุกระดับความเค็มตลอดระยะการทดลอง 28 วัน ให้อาหารสำเร็จรูปวันละครั้งพร้อมทั้งช้อนตะกอนออกทุกวัน ทุก ๆ สามวัน ทำการวัดอุณหภูมิ pH และปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ จากนั้นทำการเปลี่ยนน้ำประมาณ 1/3 ของปริมาตรน้ำในตู้ทดลอง (ประมาณ 5 ลิตร) น้ำที่เติมลงไปแทนจะมีสารเคมีที่ใช้ทดลองละลายอยู่ในความเข้มข้นร้อยละ 50 ของระดับความเข้มข้นตั้งต้นในแต่ละตู้ เพื่อรักษาระดับความเข้มข้นของสารในแต่ละตู้ให้ค่อนข้างคงที่ เนื่องจากสารทั้งสองชนิดมีการสลายตัวโดยขบวนการทางชีวภาพซึ่งคาดว่าในเวลา 4 วัน ปริมาณสารดังกล่าวจะลดลงไม่เกินร้อยละ 50 ของความเข้มข้นตั้งต้น ทำการเก็บน้ำที่ดูดออกมาจากตู้ทดลองแต่ละตู้ไปวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียตามวิธีของ Koroloeff (1976) ทุกวันที่ 7, 14, 21, และ 28 ของการทดลอง ทำการสุ่มตัวอย่างลูกปลาจำนวน 3-5 ตัว จากแต่ละตู้มาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือก

การเตรียมเนื้อเยื่อเหงือกของลูกปลาเพื่อศึกษาพยาธิสภาพ

นำลูกปลาแช่ในน้ำแข็งเพื่อให้ชาแทนการทำให้สลบ วัดขนาดความยาวจนถึงปลายหางและชั่งน้ำหนัก จากนั้นตัดเอาเหงือกทั้งสองข้างออกมา และทำการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก (คู่มือปฏิบัติการวิชา Microtechnique ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. Fixation

นำเหงือกปลามาแช่ใน Bouin's Fluid (ภาคผนวก ค.) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70 % เพื่อล้าง Picric acid ที่เกินพอ

2. Dehydration

เปลี่ยนน้ำยาที่แช่เหงือกปลาจาก 70 % แอลกอฮอล์เป็น

- 90 % แอลกอฮอล์ 3 ชั่วโมง
- 95 % แอลกอฮอล์ 3 ชั่วโมง
- บิวทานอล (n-butyl alcohol) - 1 ชั่วโมง

3. Clearing

แช่เนื้อเยื่อเหงือกในไซลีน (Xylene) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เนื้อเยื่อใส

4. Impregnation

ขั้นตอนนี้มีจุดมุ่งหมายให้ Wax ซึมผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อ และต้องดำเนินการภายในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ประมาณ 58° ซ โดยนำตัวอย่างแช่ในสารต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้

- Xylene+molten wax (1 : 1) 1 ชั่วโมง
- Wax (58° C) 1 ชั่วโมง
- Wax (58° C) ½ ชั่วโมง

จากนั้นนำเนื้อเยื่อเหงือกมาฝังลงใน Filtered wax โดยจัดให้เนื้อเยื่อเรียงตัวอยู่ในทิศทางที่เหมาะสมแก่การตัด Section

5. Section cutting

นำแท่ง Paraffin wax ที่มีเนื้อเยื่อเหงือกฝังอยู่มาตัดให้เป็นแผ่นบางขนาด 8 ไมครอน ด้วยเครื่อง Rotary microtome นำสไลด์ที่ตัดได้มาติดบนกระจกสไลด์ ทิ้งไว้

ให้แห้ง

6. Preparation wax section for staining

นำแผ่นสไลด์ที่มี Wax section ติดอยู่ มาแช่ในน้ำยาต่าง ๆ คือ

- Xylene 5 นาที เพื่อละลาย Wax ออก
- n-butyl alcohol 3-5 นาที
- แอลกอฮอล์ 95 % 3-5 นาที
- แอลกอฮอล์ 90 % 3-5 นาที
- นำสไลด์ไปแช่น้ำกลั่น เพื่อนำไปย้อมสีต่อไป

7. Masson's Trichrome Stain

7.1 นำสไลด์ที่ปราศจาก Wax มาย้อมใน Hansen's Iron Trioxyhaematin (ภาคผนวก ค.) เป็นเวลา 5-10 นาที

7.2 ทำการแยกสี (Differentiate) ในสารละลายอิ่มตัว Picric acid จนไซโตปลาสซึมปราศจากสี

7.3 นำสไลด์ไปล้างในน้ำที่ไหลอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 15 นาที

7.4 ย้อมสีด้วย Xylidene Ponceau จนไซโตปลาสซึมติดสีเข้มเกินต้องการเล็กน้อย ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที

7.5 ชะสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

7.6 Differentiate ใน 1 % Phosphomolybdic acid 5-10 นาที

7.7 ชะด้วยน้ำกลั่น

7.8 ย้อมด้วย Light Green (ภาคผนวก ค.) เป็นเวลา $\frac{1}{2}$ - 2 นาที เพื่อให้ติดสีเข้มเกิดต้องการเล็กน้อย

7.9 ล้าง Light Green ที่มากเกินพอออกโดยแช่ใน 1 % Phosphomolybdic acid เป็นเวลา 1-2 นาที

8. Dehydration and Clearing

นำสไลด์ที่ล้าง Light Green ที่มากเกินพอออกแล้วมาเช็ดรอบ ๆ ให้แห้งแล้วแช่ใน 90 % แอลกอฮอล์, 95 % แอลกอฮอล์ และ n-butyl alcohol ขั้นละ 2-3 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน Xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เพื่อให้ตัวอย่าง

ใส หยด Permount ลงบนสไลด์ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง

การย้อมเนื้อเยื่อด้วย Masson's Trichrome Stain จะแสดงผลดังนี้

- นิวเคลียส จะติดสีม่วงแก่จนถึงดำ
- ไซโตปลาสซึม มีสีแดงในระดับต่างๆ กัน
- เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) Matrix of cartilage รวมทั้ง Mucous cells และ Mucous จะติดสีเขียว

<u>การตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือก</u>

นำสไลด์ของเนื้อเยื่อที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope) กำลังขยาย 200 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย