บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

เรือสำรวจ ได้แก่ เรือสำรวจของแผนกวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล และเรือสำรวจประมง 2; Gravity core sampler แบบของ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต; อวนและแห; ถังเก็บน้ำขนาด 5 ลิตร; ถุงพลาสติก; ปากกา permanent-ink; ถังเก็บความเย็น; แผนที่แม่น้ำเจ้าพระยา; ไม้บรรทัด; เครื่องชั่ง

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้กลั่นสารเคมี

คอลัมน์กลั่นลำดับส่วน; thimble; glass beads; เทอร์โมมิเตอร์; ขาตั้งและคลิป; volumetric flasks ขนาด 500 ml.

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด

waring blender, explosion-proof, 30 speeds selection; vacuum pump; vacuum flask ขนาด 1000 ml.; fritted glass funnel; กระดาษกรองชนิด G.F.C.; flask ชนิดมีฝาปิดขนาด 200 – 250 ml.; เครื่องเซ็นตริฟิวจ์ แบบ Minor MSE; หลอดเซ็นตริฟิวจ์; Erlenmeyer flask 500 ml.; aluminum foil; กระบอกตวงขนาด 100, 250 ml.; separatory funnel ขนาด 1000 ml.; บีกเกอร์ขนาด 100, 500, 1000 ml.; กรวย; ตะแกรงสำหรับร่อนดินขนาด

30 mesh; โกร่งสำหรับบดดิน ; เครื่องชั่งชนิดละเอียด แบบ Bosch S 2000; ตู้อบที่ทำอุณหภูมิได้สูง 400°C; dessicator

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการ clean up และการทำ silicic acid column separation

chromatographic column with teflon stopcock; evaporator; Erlenmeyer flask 500 ml.; tamping rod; glass wool; ขวดแก้วขนาดเล็ก ฝาบุด้วย aluminum foil

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเครื่อง Gas chromatograph

gas chromatograph เครื่องที่ใช้คือ Microtek 200 ซึ่งมีภาวะของเครื่องดังนี้

detector : electron capture detector

detector temperature : 275°C

packing column; 3% OV - 1 สำหรับสารพวก DDT

: 10% DC 200 on Gaschrome Q สำหรับสารพวก PCB's

column temperature : 200°C

carrier gas : Nitrogen

hyperdemic syringe ขนาด 10 µl.

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

สารเคมีทุกชนิดต้องเป็น AR grade หรือ pesticide grade และถ้าเป็นของเหลวก่อนใช้จะต้องกลั่นเสียก่อน

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด (extraction) และการทำ hexane partition

n-hexane; petroleum ether; ethyl ether;

000602

anhydrous sodium sulphate, coarse granular, อบที่ 130°C ตลอดคืน ; acetonitrile; น้ำกลั่น; saturated sodium sulphate solution; dichloromethane หรือ methylene dichloride; phosphate buffer pH 6.0 (ทำได้โดยเติม 5.6 ml. ของ sodium hydroxide 0.1 M. ลงใน 50 ml. ของ 0.1 M. potassium dihydrogen phosphate แล้วเขย่าให้เข้ากันดี)

2. สารเคมีที่ใช้ในการ clean up และการทำ silicic acid column separation

n-hexane; dichloromethane; ethyl acetate; anhydrous sodium sulphate, coarse granular, อบที่ 130°C ตลอดคืน ; florisil 60/100 mesh, อบที่ 130°C ตลอดคืน petroleum ether; acetonitrile; silicic acid-Mallinckrodt (เป็นผงขนาด 100 mesh); celite 545 (acid washed)

3. สารเคมีที่ใช้สำหรับ GLC

standard solutions ของสารพวก DDT และ PCB's n-hexane.

วิธีดำเนินงาน

1. การสำรวจและกำหนดสถานี (station)

มีการสำรวจเพื่อวางแผนการตั้งสถานีเก็บตัวอย่างในบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2518 โดยเริ่มสำรวจตั้งแต่บริเวณปากแม่น้ำจนถึงบริเวณตำบลอ้อมเกร็ด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี และบริเวณโครงการชลประทานรังสิต จังหวัดปทุมธานี จากนั้นจึงได้กำหนดสถานีที่จะเก็บตัวอย่าง โดยถือ

หลักว่าให้สถานีนั้น ๆ เป็นตัวแทนในเขต marine environment เขตปากแม่น้ำ เขตอุตสาหกรรมและเขตเกษตรกรรม ซึ่งมีทั้งหมด 12 สถานี ดังต่อไปนี้

เลขที่สถานี	ตำแหน่งสถานี
1	Lat 13° 29′ 00″ N, Long 100° 36′ 00″ E
2	Lat 13° 25′ 00″ N, Long 100° 35′ 00″ E
3	Lat 13°, 10′ 00″ N, Long 100° 30′ 00″ E
4	ใต้โรงจักรพระนครใต้
5	เหนือพระปะแดง
6	เหนือโรงกลั่น Summit
7	สะพานกรุงเทพ
8	ปากคลองผดุงกรุงเกษม
9	เหนือสะพานพระรามหก
10	คลองชลประทานรังสิต 1 (คลองหลวง)
11	บริเวณในนาทดลองพันธุ์ข้าวของศูนย์เกษตรคลองหลวง
12	คลองระบายน้ำออกบริเวณคลองหลวง

ดังแสดงในแผนที่ประกอบ รูปที่ 1

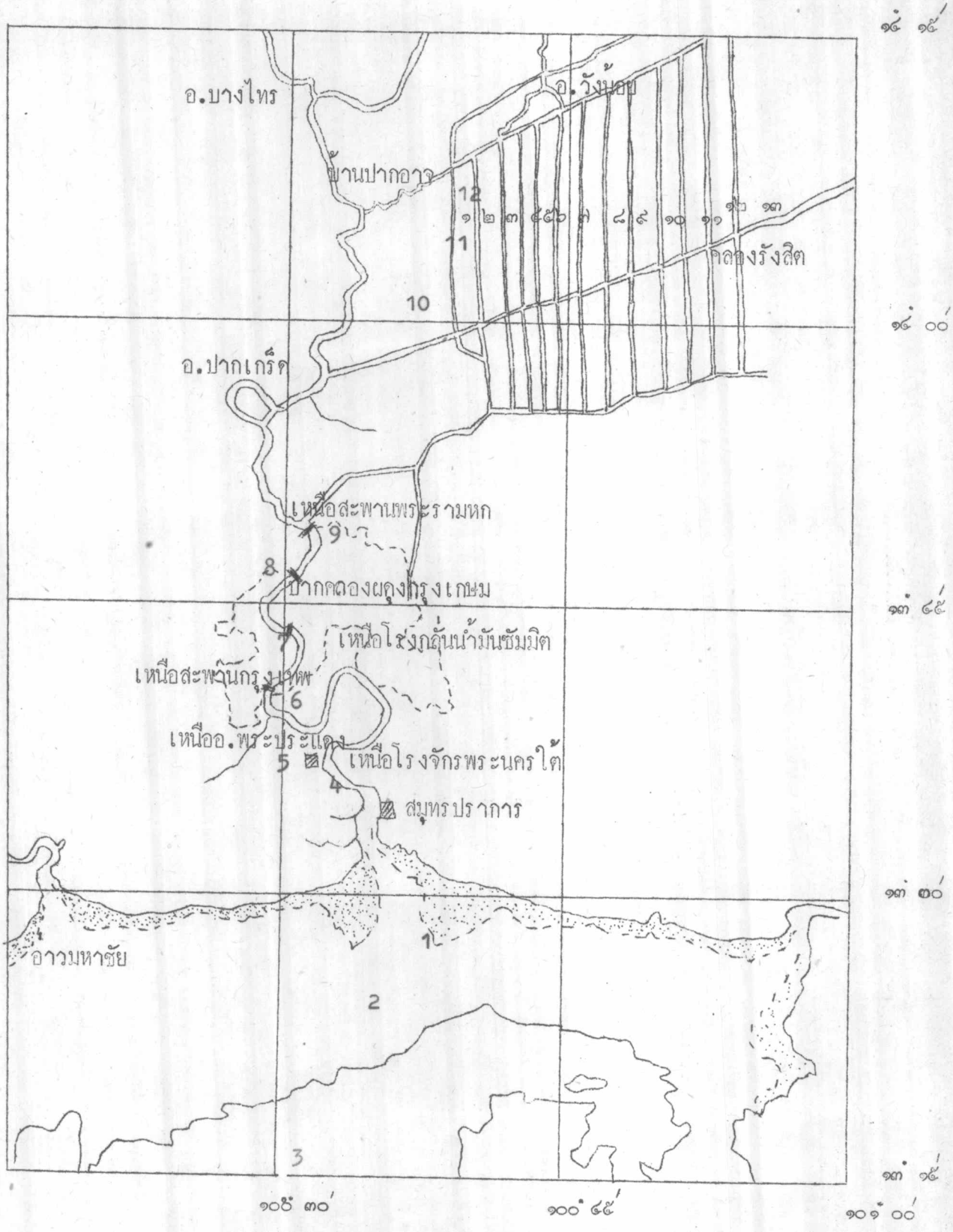
2. <u>การเก็บตัวอย่าง</u>

ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 เดือนมกราคม 2519

ระยะที่ 2 เดือนพฤษภาคม 2519

การเก็บตัวอย่างในเดือนมกราคมก็เพื่อเป็นตัวแทนในปลายฤดูน้ำหลาก ส่วนในเดือนพฤษภาคมก็เพื่อเป็นตัวแทนในปลายฤดูแล้ง



รูปที่ 1 แผนที่แม่น้ำเจ้าพระยา และเขตชลประทานรังสิต

2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำเก็บที่ระดับผิวน้ำ โดยใช้ถังใส่น้ำขนาด 5 ลิตร ตักขึ้นมา และ freeze ทันที

2.2 การเก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินเก็บโดยใช้ gravity core sampler และ freeze ทันที

2.3 การเก็บตัวอย่างปลาและกุ้ง

ตัวอย่างปลาและกุ้งเก็บโดยอาศัยเครื่องมือจับปลา ได้แก่ แห และอวน และ freeze ทันที

2.4 การเก็บตัวอย่างนก

ตัวอย่างนกเก็บโดยใช้ปืนยิง และ freeze ทันที

3. การเตรียมตัวอย่าง

นำเอาตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตมา classify ชนิด วัดความยาว และชั่งน้ำหนัก แล่เนื้อล้างด้วยน้ำกลั่น ห่อด้วย aluminum foil แล้ว freeze นำเอาตัวอย่างดินมาผึ่งในถาด ซึ่งมี aluminum foil รองอยู่จนแห้ง ตัวอย่างน้ำให้ freeze เอาไว้

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสาร DDT และ PCB's ในตัวอย่าง

ใช้วิธีที่รวบรวมโดย H.A. Mc Leod และ W.R. Ritchey ของ Health Protection Branch ประเทศแคนาดา

4.1 การหาปริมาณสาร DDT และ PCB's ในตัวอย่างน้ำ

การสกัด

1. นำตัวอย่างน้ำที่ freeze เอาไว้ มาละลายที่อุณหภูมิห้องจนหมด

2. ตวงน้ำ 800 ml. ใส่ใน 1000 ml. separatory funnel สกัดด้วย 100 ml. hexane ตามด้วย 50 ml. hexane อีก 4 ครั้ง ในการสกัดแต่ละครั้งให้เขย่าอย่างแรงอย่างน้อย 3 นาที

3. ผ่าน solvent ที่สกัดได้ ไปยัง anhydrous sodium sulphate ประมาณ 40 gm. เพื่อดูดความชื้น

4. นำ solvent ที่ได้มาลดปริมาตรบน evaporator ให้เหลือ 3 ml.

5. เก็บ solvent นี้ ในขวดแก้วขนาดเล็ก ฝาบุด้วย aluminum foil เพื่อป้องกันการระเหย sample ที่ได้นี้พร้อมที่จะฉีดเข้าเครื่อง GLC

4.2 การหาปริมาณสาร DDT และ PCB's ในตัวอย่างดิน

การสกัด

1. นำตัวอย่างดินที่ผึ่งแห้งแล้ว มาบดด้วยโกร่งบดดิน แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 mesh

2. ชั่งดินที่ร่อนแล้ว 100 gm. บรรจุลงใน extraction thimble แล้วใส่ลงใน soxhlet

3. ตวง 300 ml. chloroform ใส่ลงในขวดสกัด

4. ทำการสกัดที่ 60 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงติดต่อกัน

5. เก็บ solvent ที่ได้จากการสกัดด้วยบีกเกอร์ขนาด 500 ml. แล้วนำมาระเหยบน evaporator จนเหลือปริมาตรประมาณ 5 ml.

6. ปิดปาก beaker ด้วย aluminum foil ให้แน่น เพื่อทำ florisil clean up ต่อไป

การทำ florisil clean up

1. นำ chromatographic column มา pack ด้วยสาร ดังต่อไปนี้ florisil 35 gm.; anhydrous sodium sulphate 20 gm.

สำหรับการ pack column ให้ทำดังนี้

ใส่ glass wool ลงไปที่ส่วนล่างของ column กดให้แน่นด้วย tamping rod ค่อย ๆ บรรจุ florisil ลงไปก่อนให้แน่น แล้วจึงเติม anhydrous sodium sulphate ลงไป

2. เปิด stopcock ให้เต็มที่ นำ flask 500 ml. มารองรับ แล้วเติม 50 ml. hexame ลงไปเพื่อ pre-wet column

3. เมื่อระดับของ hexane ลดลงพอดีที่ชั้นของ sodium sulphate ค่อย ๆ เติมตัวอย่างที่ลดปริมาตรเอาไว้ลงไป ล้างบีกเกอร์ด้วย chloroform เล็กน้อยและเทลงใน column

4. ปรับ stopcock ให้อัตราเร็วของการหยดของ solvent ประมาณ 60 – 100 หยดต่อนาที

5. เมื่อระดับสารลดลงพอดีที่ชั้นของ sodium sulphate ค่อย ๆ เติม 150 ml. ของ eluting agent ชนิดที่หนึ่งลงไป (hexane:ether 95:5 V/V

6. เมื่อ eluting solvent ชนิดที่หนึ่ง ลดลงพอดีที่ชั้น sodium sulphate ค่อย ๆ เติม eluting agent ชนิดที่สองลงไป 75 ml. (hexane:ether 85:15 V/V)

7. นำ solvent ที่ได้ไปลดปริมาตรบน evaporator จนเหลือ 5 ml.

8. เก็บไว้ในขวดแก้วขนาดเล็ก ฝาบุด้วย aluminum foil sample นี้พร้อมที่จะฉีดเข้าเครื่อง GLC

4.3 การหาปริมาณสาร DDT และ PCB's ในตัวอย่างปลาและกุ้ง

การสกัด

1. ชั่ง tissue sample 10 gm. บดให้ละเอียดใน waring blender โดยใช้ maximum speed ประมาณ 5 นาที

2. เติม 20 ml. acetonitrile และ 5 ml. น้ำกลั่น ปิดฝาเดินเครื่องเพื่อให้ผสมกันดี (homogenization) ด้วย maximum speed ประมาณ 3 นาที

3. กรอง homogenate ผ่าน fritted funnel ภายใต้ vacuum

4. re-extract อีกครั้ง โดยใช้ 20 ml. acetonitrile และ 5 ml. น้ำกลั่น

5. กรอง homogenate เช่นเดียวกับครั้งแรก

6. นำ acetonitrile extract ที่ได้ใส่ใน flask ที่มีฝาปิด ขนาด 250 ml. เพิ่มปริมาตรให้เป็น 100 ml. ด้วยน้ำกลั่น เขย่า 1 นาที

การทำ hexane partition

1. นำ acetonitrile extract มาใส่ใน 1000 ml. separatory funnel

2. เติม 10 ml. dichloromethane (CH_2CL_2) 20 ml. phosphate buffer pH 6.0 และ 200 ml. hexane เขย่าอย่างแรง 1 นาที

3. เติม 500 ml. น้ำกลั่น และ 50 ml. saturated sodium sulphate solution เขย่าอย่างแรงอีกประมาณ 2 นาที จนเห็นการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์

4. ไขส่วนล่างซึ่งเป็นส่วน acetonitrile - water phase ออกทิ้ง

5. ล้าง hexane extract 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 100 ml. เขย่าเบา ๆ เพื่อป้องกันการเกิด emulsion ไขชั้นน้ำซึ่งอยู่ข้างล่างออกทิ้ง

6. กรอง hexane extract ผาน anhydrous sodium sulphate เก็บใน flask ขนาด 500 ml.

7. นำไประเหยบน evaporator ให้เหลือปริมาตร 5 ml. เก็บใน 100 ml. บีกเกอร์ปิดปากด้วย aluminum foil เก็บไว้ clean up ต่อไป

การทำ florisil clean up

1. ใส่ glass wool ลงไปที่ส่วนล่างของ chromatographic column กดให้แน่น

2. เติม florisil ลงไปให้แน่น สูงประมาณ 15 ซ.ม.

3. เติม anhydrous sodium sulphate ลงไปให้สูงประมาณ 2 ซ.ม.

4. เปิด stopcock อย่างเต็มที่ เอา flask 500 ml. มารองรับเติม 50 ml. hexane ลงไปเพื่อ pre-wet column

5. นำ sample ที่พร้อมจะ clean up มา re-dissolve ด้วย 25 ml. hexane แล้วเทลงใน column ในขณะที่ชั้นของ hexane ที่ pre-wet column ลดลงที่ชั้นของ sodium sulphate พอดี

6. ล้างบีกเกอร์ด้วย 15 ml. hexane เทลงใน column ปรับ stopcock ในอัตราการหยดประมาณ 60 – 100 หยดต่อนาที

7. เมื่อระดับของ solvent ลดลงพอดีที่ชั้นของ sodium sulphate ค่อย ๆ เท eluting agent ครั้งละ 30 ml. 10 ครั้ง ตามลำดับของ eluting agent ดังนี้

n-hexane

5% dichloromethane in hexane

10% " "

15% " "

20% " "

30% " "

5% ethyl acetate "

10% " "

20% " "

30% " "

8. นำ solvent ที่ได้ไประเหยบน evaporator ให้เหลือปริมาตร 3 ml.

9. เก็บ sample ในขวดแก้วขนาดเล็ก ฝาบุด้วย aluminum foil sample ที่ได้นี้พร้อมที่จะฉีดเข้าเครื่อง GLC

4.4 การหาปริมาณสาร DDT และ PCB's ในตัวอย่างนก

การสกัด

1. ชั่ง tissue ของนกมา 10 ml. บดใน waring blender โดยใช้ maximum speed ประมาณ 5 นาที

2. เติม 15 ml. ether และ 15 ml. petroleum ether ลงไปแล้ว homogenize ด้วย maximum speed 2 นาที

3. เท homogenate ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์

4. เซ็นตริฟิวจ์ ด้วยอัตราเร็ว 2000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที

5. เท supernatant ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 ml. นำไประเหยบน evaporator จนเหลือปริมาตร 5 ml. ปิดปากด้วย aluminum foil เพื่อ clean up ต่อไป

การทำ florisil clean up

วิธีการต่าง ๆ เหมือนกับการ clean up ปลาและกุ้งทุกประการ

4.5 การทำ silicic acid column separation

clean up silicic acid

1. อบ 400 gm. silicic acid ที่ 130°C ตลอดคืนแล้ว cool ใน dessicator

2. เติม 500 ml. ของ eluting mixture (1% acetonitrile, 19% hexane, 80% dichloromethane V/V คนให้เข้ากัน

3. ค่อย ๆ รินลงไปใน 1000 ml. separatory funnel ซึ่งมี glass wool รองข้างล่าง ปล่อย solvent ทิ้ง

4. เติม eluting mixture ลงไปอีก 500 ml. ปล่อย solvent ทิ้ง

5. นำ silicic acid นี้ใส่จาน วางผึ่งใน fume hood จนกระทั่งหมดกลิ่นของ solvent

6. นำไปอบที่ 130°C เป็นเวลานาน 7 ชั่วโมงแล้ว cool ใน dessicator

activation

1. ชั่ง silicic acid 95 gm. ใส่ลงใน 250 ml. stoppered bottle

2. pipette น้ำกลั่น 5 ml. ใส่ลงใน silicic acid

3. ปิดฝา, seal ด้วย tape ให้แน่น เขย่าขวดจนไม่มีการจับเป็นก้อน

4. นำไปใส่ dessicator 16 ชั่วโมง เป็นอย่างน้อยจึงจะนำมาใช้ได้

5. เมื่อใช้ silicic acid แล้วทุกครั้ง ให้นำไปเก็บใน dessicator เสมอ และ silicic acid ที่ activate แล้วนี้ มีอายุการใช้งานไม่เกิน 5 วัน

การทำ silicic acid column

1. ใส่ glass wool ที่ส่วนล่างของ chromatographic column อัดให้แน่นด้วย tamping rod

2. ชั่ง 5 gm. celite 545 (acid washed) กับ 20 gm. activated silicic acid รวมกันในบีกเกอร์ขนาด 250 ml.

3. เติม 80 ml. petroleum ether คนให้เข้ากันดี

4. เปิด stopcock เต็มที่ นำ flask ขนาด 500 ml. มารองรับ ค่อย ๆ เทของผสมนี้ลงใน column

5. ล้างบีกเกอร์ด้วย petroleum ether เล็กน้อย แล้วเทลงใน column

6. ใช้ tamping rod คนใน column เพื่อไล่ฟองอากาศ

7. ปล่อยให้ petroleum ether ไหลออกจาก column ระวังอย่าให้ column แห้ง

8. เมื่อชั้น petroleum ether อยู่เหนือผิวหน้าของ gel ประมาณ 3 m.m. ล้าง column ด้วย 300 ml. petroleum ether และทิ้งส่วนที่รองรับเอาไว้

9. ค่อย ๆ เติม sample จากการ clean up แล้ว ลงใน column ล้างด้วย petroleum ether เล็กน้อย

10. นำ flask 500 ml. มารองรับ แล้ว elute ด้วย petroleum ether 175 ml.

11. นำ solvent ที่ได้ไประเหยบน evaporator ให้เหลือปริมาตร 3 ml.

12. เก็บ sample ในขวดแก้วขนาดเล็ก ฝาบุด้วย aluminum foil sample นี้พร้อมที่จะฉีดเข้าเครื่อง GLC

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การทำ recovery

จุดประสงค์ในการทำ recovery ก็เพื่อจะแสดงให้เห็นว่า วิธีการที่ใช้ในการหาปริมาณของสารนั้น ให้ผลออกมามากน้อยเพียงใด

วิธีการทำ recovery of the sample

1. นำตัวอย่างของน้ำ, ดิน, ปลา และนก มาอย่างละ 3 ตัวอย่าง

2. แบ่งตัวอย่างเหล่านั้นออกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งเอาไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร DDT และ PCB's ตามวิธีดังกล่าวมาแล้ว

3. นำตัวอย่างอีกส่วนหนึ่ง มาเติม standard ที่ทราบปริมาณและความเข้มข้นอย่างแน่นอนลงไป แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร DDT และ PCB's ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วเช่นกัน

6. การตรวจหาปริมาณสาร DDT และ PCB's โดยใช้เครื่อง GLC

การเตรียม standard solution

standard ที่ใช้มีความเข้มข้น 0.1 ng./µl

วิธีเตรียม

นำ standard ของสารแต่ละชนิด ซึ่งมีความเข้มข้น 100 ng./µl (100 ppm) มา dilute ด้วย hexane ดังนี้

1. ใช้ pipette ขนาด 10 ml. ดูด 10 ml. hexane ใส่ไว้ในขวดแก้วที่มีฝาบุด้วย aluminum foil

2. ใช้ micropipette ขนาด 25 µl. ดูด standard แต่ละชนิด ชนิดละ 10 µl. ใส่ลงในขวดแก้วบรรจุ hexane แต่ละขวด เขย่าให้เข้ากัน

3. สำหรับ standard DDE และ TDE สามารถทำเป็น mixed standard ได้ เนื่องจากค่า retention time แตกต่างกันมาก วิธีการทำก็โดยใช้ micropipette ขนาด 25 µl. ดูดเอา standard DDE และ TDE อย่างละ 10 µl. ใส่ลงในขวดแก้วที่บรรจุ 10 ml. hexane เขย่าให้เข้ากัน

เทคนิคการใช้ hyperdemic syringe

hyperdemic syringe เป็นเครื่องมือที่มี precision สูง และราคาแพงมาก การใช้จึงต้องระมัดระวังอย่างดี การล้าง syringe ต้องทำทุกครั้งที่ดูด standard หรือ sample โดยล้างใน solution ต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้

ethyl acetate	เพื่อล้างสารที่อาจติดอยู่ในเข็มออกให้หมด
hexane	เพื่อล้าง ethyl acetate ออก
hexane	เพื่อล้างอีกครั้งให้สะอาด

ในกรณีที่ syringe เกิดอุดตันให้ล้างโดยใช้ concentrated nitric acid ซึ่งจะไปละลายสารอุดตัน แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น และ organic solvent ทั้งสามนั้น ตามลำดับ

ในกรณีที่ syringe ฝืด ทำให้ฉีดหรือดูดสารลำบาก ให้นำก้านเหล็กของ syringe ถูกับปลายจมูก เพื่อให้เข็มลื่นและเคลื่อนที่ได้สดวก

ในกรณีที่มีฟองอากาศติดค้างในขณะที่ดูด standard หรือ sample ให้ปฏิบัติดังนี้คือ

1. ดูด standard หรือ sample ขึ้นมา หงายเข็มขึ้นฉีดไล่ฟองอากาศออก

2. จุ่มปลายเข็มลงใน standard หรือ sample อีก แล้วฉีดออกอีกเล็กน้อย เพื่อป้องกันฟองอากาศที่อาจติดอยู่ที่ปลายเข็ม

3. ดูด standard หรือ sample ขึ้นอย่างช้า ๆ จะได้ solution ใน syringe ที่ไม่มีฟองอากาศและมีปริมาตรถูกต้องแน่นอน

การวิเคราะห์หาปริมาณสาร DDT และ metabolites, PCB's และ pesticides อื่น ๆ โดยวิธีแกสโครมาโตรกราฟฟี่ นับเป็นวิธีที่ให้ผลค่อนข้างละเอียดและเชื่อถือได้ โดยสามารถที่จะตรวจได้ถึง 1 – 5 ppb (Warnick and Gaufin, 1965) เนื่องจากเครื่องแกสโครมาโตรกราฟฟี่เป็นเครื่องมือที่มีความไวสูง ดังนั้นถ้ามี contamination เกิดขึ้นแม้เพียงเล็กน้อยก็อาจเป็นเหตุให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ขึ้นได้ แหล่งที่มาของการ contamination ได้แก่

1. สารเคมีที่ใช้จะต้องเป็น A.R. grade หรือ pesticide grade ถ้าเป็นของเหลวจะต้องกลั่นซ้ำก่อนใช้เสมอ

2. น้ำกลั่น จะต้องเป็นน้ำกลั่นที่บริสุทธิ์ไม่มีสารอินทรีย์เจือปนอยู่เลย

3. เครื่องใช้ที่เป็นพลาสติกไม่ควรใช้ เพราะ solvent ที่ใช้ในการทดลองเป็นพวก organic solvent และสามารถละลายพลาสติกได้ ซึ่งจะทำให้เกิดการ response ต่อเครื่องแกสโครมาโตรกราฟ ควรใช้ teflon แทน

4. เครื่องแก้วทุกชิ้นต้องล้างให้สะอาด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย acetone, ethyl acetate และ hexane ตามลำดับ

5. สิ่งแปลกปลอมจากการสกัดตัวอย่าง ในตัวอย่างมีสารหลายชนิดอาจมีสารบางอย่างถูกสกัดออกมาด้วย และให้ response กับเครื่องแกสโครมาโตรกราฟ การกำจัดสารพวกนี้ให้หมดไปจริง ๆ ทำได้ยากมาก สามารถทำได้เพียงให้สิ่งสกปรกเหล่านี้มีน้อยที่สุด โดยการ clean up เพิ่มเติม

ส่วนปัญหาที่จะต้องทราบเกี่ยวกับเครื่องแกสโครมาโตรกราฟนั้นได้แก่ ภาวะของเครื่อง ถ้าไม่อยู่ในภาวะที่เหมาะสมก็จะให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ ภาวะที่สำคัญได้แก่การเลือก column supporting material ซึ่งขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้ทดลอง เนื่องจากมีสารที่ใช้ pack column มากมายนับร้อยชนิด จึงจำเป็นต้องเลือกสารชนิดที่ให้ response ต่อเครื่องแกสโครมาโตรกราฟอย่างดีที่สุดและต่อชนิดของ pesticides ที่ต้องการจะตรวจ ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือก 3% OV - 1 สำหรับสารพวก DDT และ metabolites 10% DC 200 on Gaschrome Q สำหรับสารพวก PCB's บางครั้ง gas nitrogen เหลือน้อย อาจทำให้ peak และ baseline ผิดปกติ แก้ไขได้โดยเปลี่ยน gas ใหม่ บางครั้ง baseline ของเครื่องไม่คงที่ทำให้ได้ peak ที่ผิดพลาด แก้ไขได้โดยปรับสภาพเครื่องให้นานขึ้นไปอีก เหล่านี้เป็นปัญหาที่มักเกิดขึ้นเสมอในการทดลอง ซึ่งต้องแก้ไขให้เหมาะสมเพื่อความสมบูรณ์ในการทดลอง

6.3 การหาค่า retention time

ฉีด 5 µl. ของ standard แต่ละชนิด เข้าเครื่อง GLC วัดค่า retention time ของสารแต่ละตัวเอาไว้

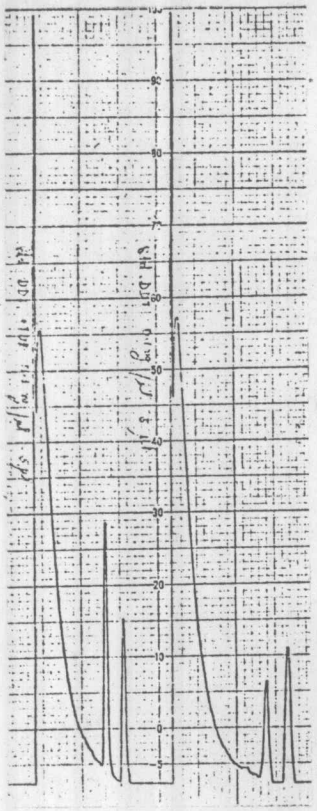
6.4 การฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง GLC

1. ฉีด standard แต่ละชนิดครั้งละ 5 µl.
2. ฉีด sample ตัวอย่างละ 5 µl.
3. ฉีด recovery ตัวอย่างละ 5 µl.

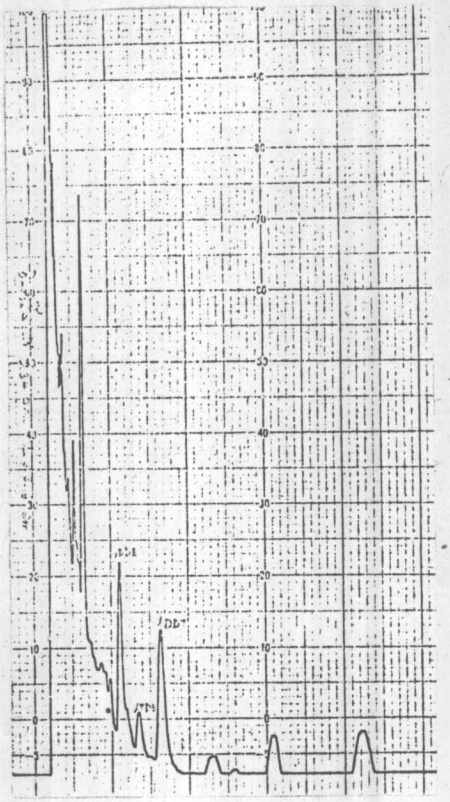
7. การคำนวณผลจาก chromatogram

7.1 การตรวจ peak ที่ต้องการ

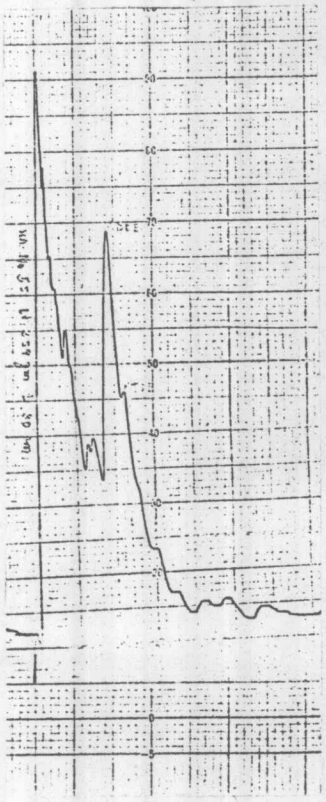
เทียบค่า retention time ของ peak จาก chromatogram ของ standard กับของ sample ดังตัวอย่างที่แสดงประกอบ รูปที่ 2 – 11



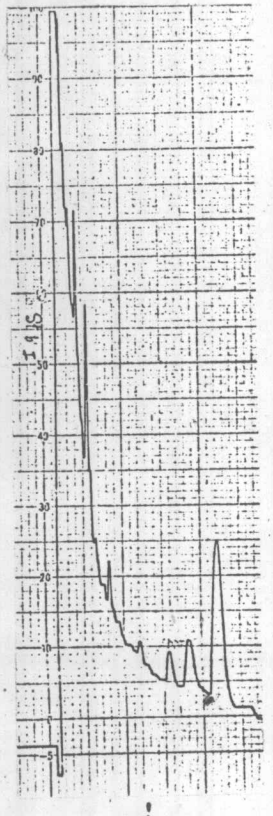
รูปที่ ๒



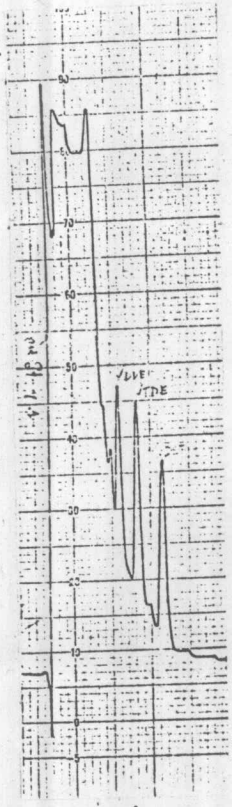
รูปที่ ๓



รูปที่ ๔

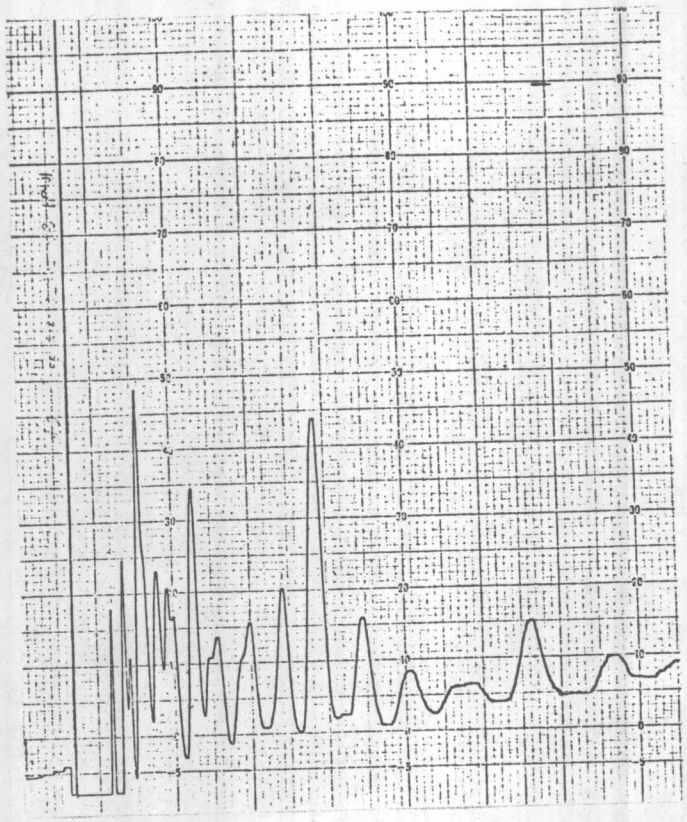


รูปที่ ๕

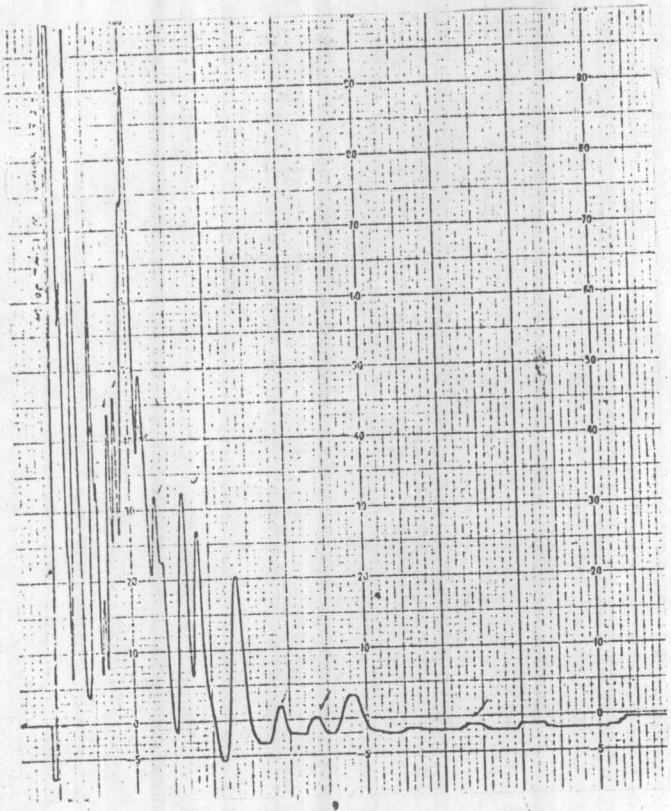


รูปที่ ๖

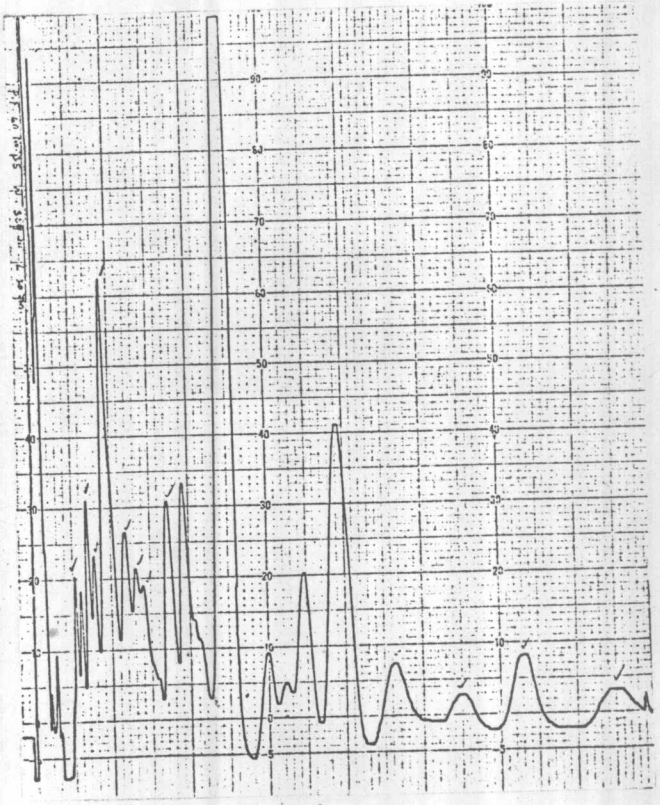
ตัวอย่าง chromatogram ของ standardDDE+TDE และ standardDDT (รูปที่ ๒) เปรียบเทียบกับตัวอย่างปลา (รูปที่ ๓) , นก (รูปที่ ๔) , น้ำ (รูปที่ ๕) , ดิน (รูปที่ ๖)



รูปที่ ๗

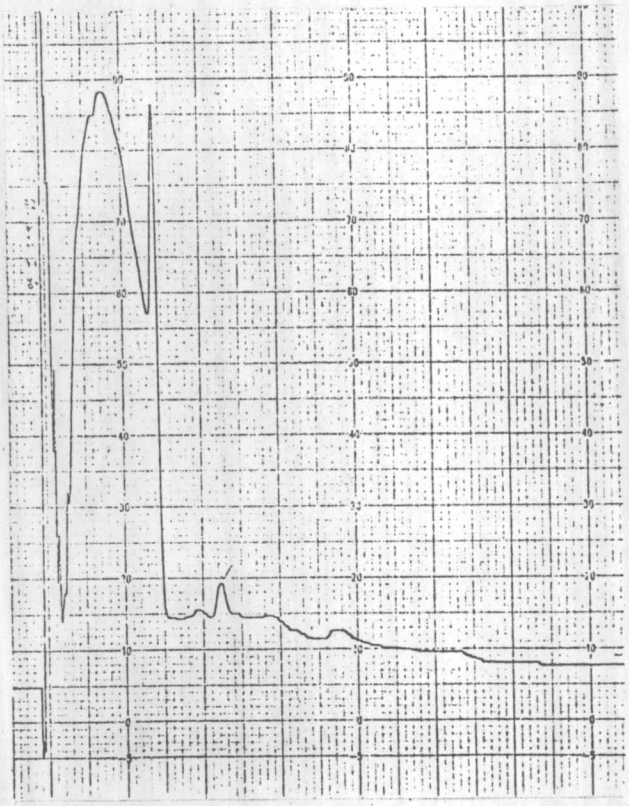


รูปที่ ๘



รูปที่ ๙

ตัวอย่าง chromatogram ของ mixed standard PCB's (รูปที่๗) เปรียบเทียบกับ
ตัวอย่างปลา (รูปที่๘) , นก (รูปที่๙) , น้ำ (รูปที่ ๑๐) , ดิน (รูปที่๑๑)



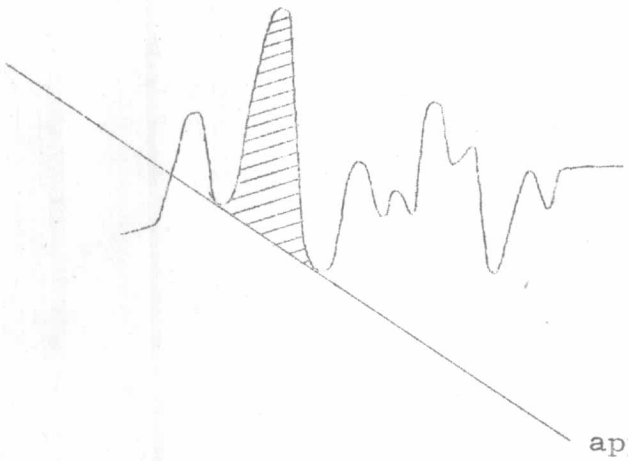
รูปที่ ๑๐

รูปที่ ๑๑

7.2 การหาพื้นที่ peak

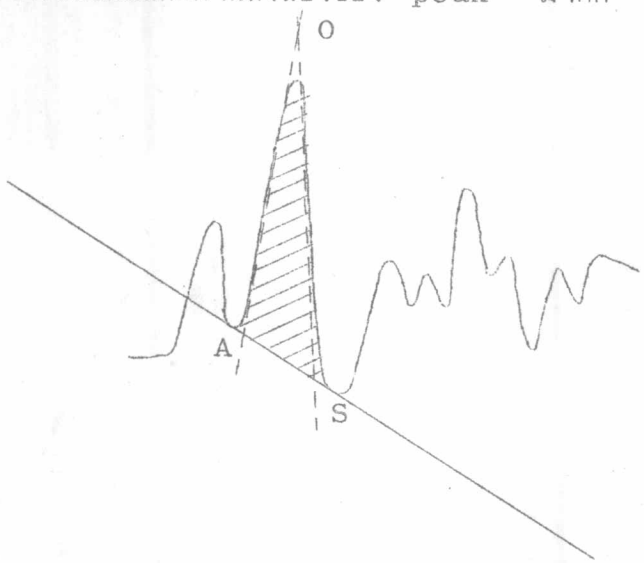
วิธีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือวิธี standard peak height ทำได้โดย

1. ลากเส้น approximate base line มีหลักคือ พยายามหา baseline ที่เป็นค่าเฉลี่ยสำหรับ peak ที่ต้องการหาพื้นที่ ดังรูป



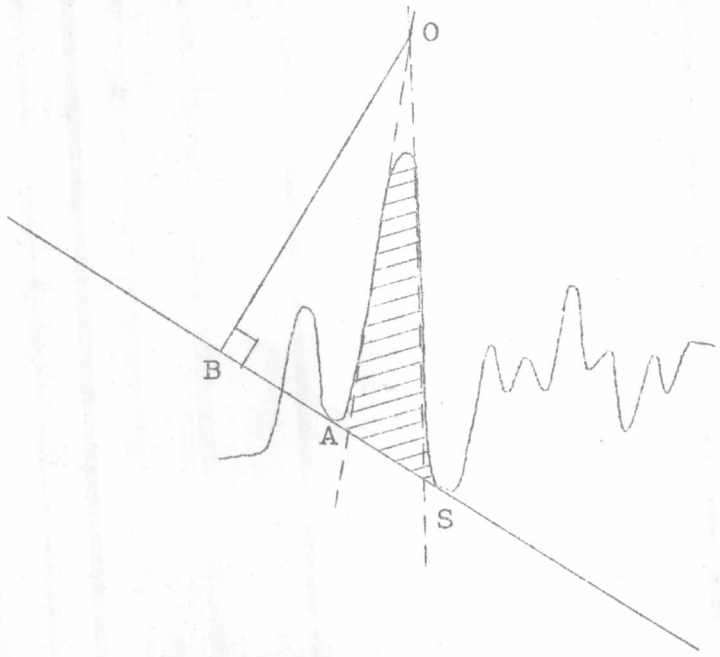
approximate baseline

2. ลากเส้นสัมผัสกับด้านทั้งสองของ peak มาตัด baseline ดังรูป



วัดฐาน curve คือ AS เอาไว้

3. หาความสูงของ peak โดยลากเส้นจากจุดยอดที่ได้จากการตัดของเส้นที่ลากในข้อ (2) มาตั้งฉากกับ baseline ที่ลากในข้อ (1) ดังรูป



4. หาพื้นที่ของ peak โดยสูตร

พื้นที่ของ peak $= \frac{1}{2}$ x ฐานของ curve จาก (2) x standard peak height จาก (3)

7.3 <u>การเทียบพื้นที่มาเป็นปริมาณสาร</u>

จากการเตรียม standard ทำให้ทราบแน่นอนว่า standard ที่ฉีดเข้าไป 5 µl. นั้น มีปริมาณสาร 0.5 ng. และยังสามารถคำนวณหาพื้นที่ใต้ peak ของ standard ได้เช่นกัน นำมาคำนวณเทียบกับ sample ดังนี้

สมมติพื้นที่ standard DDT = X cm^2

พื้นที่ peak DDT ของ sample = Y cm^2

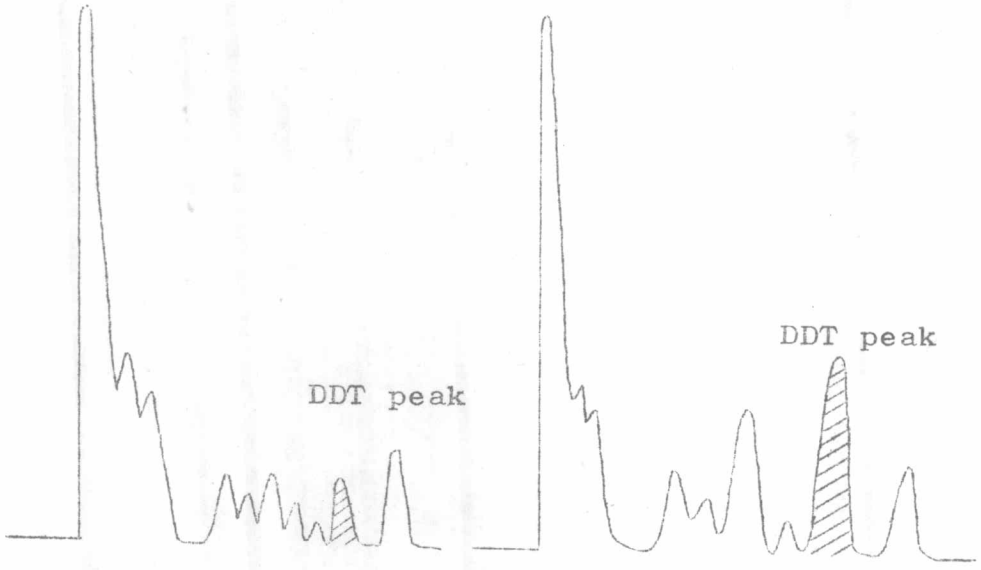
พื้นที่ X cm^2 มีเนื้อสาร DDT อยู่ = 0.5 ng.

พื้นที่ Y, cm^2 มีเนื้อสาร DDT อยู่ = $0.5 \times \frac{Y}{X}$ ng.

I16487398

7.4 การหาเปอร์เซ็นต์ recovery

สมมติตัวอย่างที่ทำ recovery ด้วยนั้น ได้ผลดังรูป



(1) ไม่เติม standard มีพื้นที่ใต้ peak DDT = A cm^2

(2) เติม standard DDT 0.1 ng./µl. 2 ml. มีพื้นที่ DDT peak = B cm^2

ดังนั้นพื้นที่ใต้ peak DDT ที่ได้จาก standard = B - A cm^2

จากข้อ 7.3 พื้นที่ X cm^2 มีเนื้อสาร DDT = 0.5 ng.

พื้นที่ B - A มีเนื้อสาร DDT = $\frac{0.5}{X}$ (B - A)

จากนี้จะทราบได้ว่าการทดลองเหลือ DDT มา = $\frac{0.5}{X}$ (B - A)

จาก standard ที่เติมลงไป 0.1 ng./µl. จำนวน 2 ml. = 200 ng.

ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้มี DDT สูญหายไป 200 - $\frac{0.5}{X}$ (B - A) ng.

ถ้าวัดเนื้อสารได้ 200 ng. คิดเป็น % recovery = 100%

ถ้าวัดเนื้อสารได้ 0.5 (B - A) ng. recovery = $\frac{100}{200}$ x $\frac{0.5}{X}$ (B - A)%

7.5 การหาปริมาณสารเป็น ppm ในตัวอย่าง

คำนวณโดยใช้สูตร

จำนวน ppm ในสารตัวอย่าง

$$= \text{ng. standard} \times \frac{\text{พ.ท. sample}}{\text{พ.ท. standard}} \times \frac{1}{\text{น.น. sample}} \frac{1}{\mu\text{l. ที่ฉีดเข้า GLC}} \times$$

$$\text{ปริมาตรสุดท้ายของ sample} \times \frac{100}{\% \text{ recovery}}$$

7.6 การหา significant test (t-test)

7.6.1 หาปริมาณเฉลี่ยของสารแต่ละชนิด โดยคำนวณจากสูตร

$$\bar{X} = \frac{\Sigma X}{N} \quad \text{(Garrett, 1966:27)}$$

$\bar{X}$ คือค่าเฉลี่ยของปริมาณสารที่ตรวจพบ

ΣX คือผลรวมของปริมาณสาร

N คือ จำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจ

7.6.2 หาความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)ของปริมาณสาร

จากสูตร $S.D. = \frac{N \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}{N(N-1)}$ (Guilford, 1950:91)

S.D คือ ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณสาร

ΣX คือ ผลรวมของปริมาณสาร

ΣX^2 คือ ผลรวมของปริมาณสารแต่ละตัวอย่างยกกำลังสอง

N คือ จำนวนตัวอย่างแต่ละกลุ่ม

7.6.3 ทดสอบความแตกต่างของปริมาณสารในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้สูตร

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2}\left(\frac{1}{n} + \frac{1}{n}\right)}}$$ (Ferguson, 1966:136)

$\bar{X}$ คือ ปริมาณเฉลี่ยของสาร

S_1^2 คือ ความแปรปรวนของปริมาณสารกลุ่มที่ 1 = $(S.D)^2$

S_2^2 คือ ความแปรปรวนของปริมาณสารกลุ่มที่ 2

n คือ จำนวนตัวอย่างในกลุ่ม