บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

3.1.1 ครุภัณฑ์

1. เครื่องเขย่า (Orbital shaker) รุ่น 503 บริษัท Stuart Scientific , UK
2. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น PB 153 บริษัท Mettler Toledo , Switzerland
3. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 420 A บริษัท Orion , USA
4. เครื่องผสมสารและให้ความร้อน (Magnetic Stirrer) รุ่น A-160 บริษัท SBS
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Diacent-12 บริษัท Diamed , Switzerland
6. หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) รุ่น ES-315 บริษัท Tomy , Japan
7. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น Shel lab 1555 บริษัท Sheldon
8. ตู้อบแห้ง (Hot air oven) รุ่น UM-600 บริษัท Memmert , Germany
9. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น BX50 บริษัท Olympus , Japan
10. อุปกรณ์ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ รุ่น PM-30 และ PM C35 DX บริษัท Olympus , Japan
11. ตู้ถ่ายสารเคมี (Chemical hood) รุ่น Toxicap บริษัท Captair, France
12. เครื่องฟูริเออร์ ทรานสฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโทรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrometer : FT –IR) รุ่น 1760X บริษัท Perkin-Elmer U.S.A.
13. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติก เรโซแนนซ์ สเปกโทรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer : NMR) รุ่น JNM-A 500 บริษัท JEOL , Japan
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น KR-20000 T บริษัท KUBOTA , Japan
15. เครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟ- แมส สเปกโทรมิเตอร์ (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer : GC-MS) รุ่น SATURN GC/MS/MS 4D บริษัท Varian U.S.A.

3.1.2. เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมออกตะโนเอต ($CH_3 (CH_2)_6 CO_2Na$) บริษัท Aldrich Chemical
2. ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2 HPO_4$) บริษัท Fluka Chemica
3. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2 PO_4$) บริษัท J. T. Baker
4. แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) บริษัท J. T. Baker
5. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต ($MgSO_4 .7H_2O$) บริษัท Merck
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck
8. กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) บริษัท Merck
9. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท J. T. Baker
10. กรดปาล์มิติก ($C_{16} H_{32} O_2$) บริษัท Merck
11. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) บริษัท Merck
12. เอธานอล (C_2H_5OH) บริษัท Merck
13. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck
14. อะซีโตน (CH_3COCH_3) บริษัท Merck
15. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 . 7H_2O$) บริษัท Merck
16. แมงกานัสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl . 4H_2O$) บริษัท J. T. Baker
17. โคบอลท์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($CoSO_4 . 7H_2O$) บริษัท Fluka Chemica
18. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) บริษัท J. T. Baker
19. คิวปริกคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 . 2H_2O$) บริษัท Fluka Chemica
20. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 . 7H_2O$) บริษัท J. T. Baker
21. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท Fluka Chemica

ทุกชนิดเป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (Analytical grade)

3.1.3. สีย้อม

1. สีแกรมสำเร็จรูป (Gram-color Staining Set) บริษัท Merck
2. สีไนล์ บลู เอ (Nile Blue A) บริษัท Sigma

3.2. จุลินทรีย์

ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 (TISTR 1097) ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1. น้ำมันปาล์มดิบ

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยไขมันและน้ำมัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2. น้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย : (SCPO) (Williamson, 1994)

ชั่งน้ำมันปาล์มดิบ 0.18 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วก้นกลม แล้วเติมเอธานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ ละลายอยู่ 0.18 กรัม ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ต่อขวดแก้วกับเครื่องควบแน่น รีฟลักซ์ (reflux) ให้เดือดเล็กน้อยบนอ่างทรายร้อน เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปตกตะกอนในน้ำเกลือ โดยใส่เกลือ 0.8 กรัม ละลายน้ำ 3 มิลลิลิตร กรองตะกอนด้วยผ้าขาวบาง ล้างด่างที่เหลือจากปฏิกิริยาและเกลือออกจากตะกอน โดยใช้น้ำกลั่นเย็น 4 มิลลิลิตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ แล้วบดเป็นผง เก็บไว้ในภาชนะที่มีฝาปิด

3.3.3. อาหารสูตรเกลือแร่ (modified E medium) (Brandl และคณะ, 1988)

ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 889 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.10	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.80	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.70	กรัม

(สำหรับ ค่าพีเอช 7.00)

หรือ

แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.10	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.80	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.96	กรัม

(สำหรับ ค่าพีเอช 8.00)

2. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต

ความเข้มข้น100 มิลลิโมลาร์	10	มิลลิลิตร

3. สารละลายแร่ธาตุ (trace element) 1 มิลลิลิตร

ใน 1 ลิตรของกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล ประกอบด้วย

เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	2.78	กรัม
แมงกานัสคลอไรด์เตตระไฮเดรต	1.98	กรัม
โคบอลท์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	2.81	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	1.26	กรัม
คิวปริกคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.17	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.29	กรัม

เก็บไว้ในขวดสีชามีฝาปิดสนิท

4. แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เมื่อเติมสารคาร์บอนลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้ว ปรับค่าพี เอช แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน) แยกนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต และ สารละลายแร่ธาตุ เมื่อเย็นแล้วจึงเติมลงตอนหลัง

3.3.4. อาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ

ประกอบด้วยอาหารสูตรเกลือแร่ ที่มีโซเดียมออกตะโนเอต 10 มิลลิโมลาร์ และผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร ต้มจนวุ้นละลาย แล้วใส่หลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 25 x 150 มิลลิลิตร จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ทำเป็นอาหารแข็งเอียง (agar slant) โดยวางหลอดแก้วให้เอียงเท่า ๆ กัน

3.3.5. อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

ประกอบด้วยอาหารสูตรเกลือแร่ ที่มีโซเดียมออกตะโนเอต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน

3.3.6. อาหารแข็งสำหรับนับโคโลนี

ให้อาหารสูตรอุดม ของบริษัท OXOID ประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	2	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ	1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

เติมน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพี เอช ให้เป็น 7.0 + 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 60 – 70 °ซ จึงนำมาเทลงจานเพาะเชื้อที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ให้ได้ปริมาตร 15 -20 มิลลิลิตร

3.3.7. อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHA

ประกอบด้วยอาหารสูตรเกลือแร่ ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน จำนวน 2 มิลลิโมลาร์ โดยเตรียมในรูปต่างๆ ดังนี้

1. น้ำมันปาล์มดิบ (CPO)
2. น้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย (SCPO) พี เอช 7.00
3. น้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย (SCPO) พี เอช 8.00
4. น้ำมันปาล์มดิบผสมกับน้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย (CPO+ SCPO) อัตราส่วน 1: 1 พี เอช 7.00
5. น้ำมันปาล์มดิบผสมกับน้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการสะพอนิฟาย (CPO+ SCPO) อัตราส่วน 1: 1 พี เอช 8.00

3.4. วิธีการเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.4.1. การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

กระจายเชื้อบนจานเพาะให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{0}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี มาเพาะในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อในข้อ 3.3.5. ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใส่ขวดเขย่าปริมาตร 125 มิลลิลิตร แล้ววางบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ^{0}ซ นาน 20 ชั่วโมง นำเชื้อจากขวดเขย่า 1 ลูพ (loop) มาเพาะบนอาหารแข็งเอียงสำหรับเก็บเชื้อในข้อ 3.3.4. โดยกระจายให้ทั่วผิวหน้าวุ้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{0}ซ นาน 24 ชั่วโมง ปิดฝาให้สนิท เก็บที่ 4 ^{0}ซ ได้นาน 3 เดือน

3.4.2. การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อมาเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเขย่าปริมาตร 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้ออยู่ 50 มิลลิลิตร เขย่า 200 รอบต่อนาที บ่มที่ 30 ^{0}ซ นาน 20 ชั่วโมง

3.4.3. การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHA

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.4.2. มาเลี้ยงในขวดเขย่า ที่มีอาหารเหลวในข้อ 3.3.7. ปริมาตร 2 ใน 5 ของขวดเขย่า โดยใส่เชื้อร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ของอาหารเหลว เขย่าความเร็วรอบเท่าเดิมและอุณหภูมิเท่าเดิม

3.5. การติดตามการเจริญของเชื้อ (Singleton, 1981)

โดยการนับเซลล์ที่มีชีวิต จะเก็บตัวอย่างเชื้อจากขวดเขย่าที่เตรียมในข้อ 3.4.3. เก็บตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 ครั้งละ 0.2 มิลลิลิตร มาเจือจางลงเรื่อยๆ ครั้งละ 10 เท่า ดูดเชื้อในหลอดที่เจือจางแล้วมา 20 ไมโครลิตร หยดลงบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.6. กระจายเชื้อให้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 1.5 เซนติเมตร นับโคโลนีจากการ เจือจางที่สามารถนับได้อย่างน้อย 15-20 โคโลนี 1 โคโลนี มาจาก 1 เซลล์ การคำนวณจำนวนเซลล์จะคิดจากจำนวนโคโลนี ปริมาตรของหยด และค่าการเจือจาง การหยดตัวอย่างเชื้อจะใช้ไปเปตอันเดียวกันตลอด โดยเริ่มดูดจากหลอดที่เจือจางมากที่สุด ไปหาหลอดที่มีความเข้มข้นมากที่สุด แล้วเขียนกราฟระหว่างจำนวนโคโลนีต่อปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU/mL) กับเวลา (ชั่วโมง)

3.6. การตรวจดูการสะสม PHA ในเซลล์แบคทีเรีย (Ostle และ Holt, 1982)

<u>การเตรียมสีไนล์ บลู เอ</u>

ชั่งผงสีมา 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองก่อนใช้ เก็บในขวดทึบแสง

<u>การย้อมสีแบคทีเรียด้วยสีไนล์ บลู เอ</u>

ป้ายเชื้อบนแผ่นกระจกสไลด์ ผึ่งให้แห้งแล้วผ่านเปลวไฟเพื่อให้เซลล์ติดแน่น แช่สไลด์ลงใน สีไนล์ บลู เอ ปิดฝาแล้วนำไปบ่มที่ 55 ^{0}ซ เป็นเวลา 30 นาที นำสไลด์ขึ้นมาล้างน้ำ แล้วหยดสารละลายกรดอะซีติก 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้างสีที่เกินออก ล้างน้ำอีกครั้ง ซับให้แห้ง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ทันที โดยหยดน้ำลงบนสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ดูด้วยเลนส์กำลังขยาย 1000 เท่า แบคทีเรียจะติดสีน้ำเงินจาง เมื่อปรับเป็นแสงฟลูออเรสเซนต์โดยใช้แผ่นกรองแสงสีน้ำเงิน จะมองเห็นกรานูลของ PHAเป็นเม็ดกลมเรืองแสงสีส้มอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย

3.7. การศึกษาลักษณะเซลล์แบคทีเรียโดยการย้อมสีแกรม

ป้ายเชื้อบนแผ่นกระจกสไลด์ ผึ่งให้แห้ง แล้วผ่านเปลวไฟให้เซลล์ติดแน่น (heat fix) วางบนถาดย้อมสี หยดคริสตัลไวโอเลตท่วมเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำ หยดแกรมไอโอดีนท่วมเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำ แล้วล้างสีที่เกินออกด้วย เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างน้ำ แล้วหยดซาฟรานินโอไว้ 30 วินาที ล้างน้ำ ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.8. การสกัด PHA จากเซลล์แบคทีเรีย (Lageveen และคณะ, 1997)

นำน้ำหมัก มาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ อัตราเร็ว 6,700 รอบ/นาที นาน 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) พี เอช 7.00 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ 3 ครั้ง นำไปทำแห้งเยือกแข็ง (lyophilize) ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง แล้วนำผงเซลล์ไปรีฟลักซ์ในคลอโรฟอร์ม 50 มิลลิลิตร นาน 4 ชั่วโมง โดยกรองเศษเซลล์ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้น ระเหยให้คลอโรฟอร์มเหลือปริมาตรอยู่ 1 ใน 4 ส่วน แล้วตกตะกอน PHA โดยค่อย ๆเติมลงในเอธานอล สัดส่วนเอธานอล ต่อคลอโรฟอร์ม เท่ากับ 10 : 1 กวนให้ผสมกันแล้ว ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง รินส่วนผสมของคลอโรฟอร์มและเอธานอลที่ใสออก เหลือตะกอนที่มีลักษณะคล้ายเจล (gel-like precipitate) ให้ละลายในคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร แล้วตกตะกอนในเอธานอลซ้ำอีกครั้งแล้วละลายในคลอโรฟอร์ม เมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออกจะได้โพลีเมอร์ที่มีลักษณะเป็นฟิล์มบาง

3.9. การหาปริมาณ PHA

ชั่งน้ำหนัก PHA ที่สกัดได้ คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย ที่นำมาสกัด โดยเก็บตัวอย่างมาหาปริมาณทุก 5 ชั่วโมง นำมาเขียนกราฟระหว่างปริมาณ PHA กับเวลา (ชั่วโมง)

3.10. การวิเคราะห์โพลีเมอร์

3.10.1. ศึกษาสูตรโครงสร้าง

การเตรียมตัวอย่างโพลีเมอร์

ละลายโพลีเมอร์ที่สกัดได้ ในดิวเทอโรคลอโรฟอร์ม (deutero chloroform) ความเข้มข้นประมาณ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วสำหรับนำไปวิเคราะห์ด้วย NMR ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ปิดด้วยจุกพลาสติก

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยวิธีนิวเคลียร์ แมกเนติค เรโซแนนซ์ สเปกโทรสโคปี (NMR)

ศึกษาจากสเปกตรัมของโปรตอน (^{1}H-NMR) และสเปกตรัมของคาร์บอน 13 (^{13}C-NMR) ของตัวอย่างโพลีเมอร์ ที่บันทึกโดย เครื่อง NMR ของบริษัท JEOL รุ่น JNM-A500 ที่ความถี่ 500 MHz บันทึกสเปกตรัมโปรตอน ที่อุณหภูมิ -152.0 ^{0}ซ ใช้ acquisition time 3.2768 วินาที รายงานค่า Chemical ship เป็น ppm (part per million) โดยใช้คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) (δ = 7.24) เป็นตัวอ้างอิง (internal reference) สเปกตรัมคาร์บอน 13 บันทึกที่อุณหภูมิ 29.3 ^{0}ซ เทียบ Chemical shift กับ ดิวเทอโรคลอโรฟอร์ม ($CDCl_3$) (δ = 77.0) Pulse width 55.0 μsec Relaxation delay 2.0 sec Data point 16 K

3.10.2. ศึกษาหมู่ฟังก์ชัน

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันโดยวิธีฟูริเออร์ ทรานสฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโทร สโคปี (FT-IR)

ศึกษาสเปกตรัมของโพลีเมอร์ โดยเครื่อง FT-IR ของบริษัท Perkin Elmer รุ่น 1760 X ในช่วงความถี่ 400 - 4,000 cm^{-1} โดยใช้สารตัวอย่างในรูปของแข็ง

3.10.3. การหาสัดส่วนโพลีเมอร์

การเตรียมสารตัวอย่าง (Brandl และคณะ, 1988 และ Cromwick และคณะ, 1996)

นำ PHA จำนวน 4 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร เมธานอล 0.85 มิลลิลิตร และกรดซัลฟุริก 0.15 มิลลิลิตร นำไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 ^{0}ซ เป็นเวลา 140 นาที โพลีเมอร์จะถูกย่อยเป็นเมธิล เอสเทอร์ของ กรดบีตา-ไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิค (β-hydroxy carboxylic methyl esters) หลังจากสารละลายเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน แล้วรอจนแยกชั้นจากนั้นดูดชั้นล่างที่เป็นสารอินทรีย์ (organic phase) ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็ก เติมโซเดียมซัลเฟตเพื่อขจัดน้ำที่ปนอยู่ แล้วดูดสารตัวอย่างเก็บในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดแน่น เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป หรือเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 ^{0}ซ

การวิเคราะห์สัดส่วนโพลีเมอร์ โดยแก๊ส โครมาโตกราฟี-แมส สเปกโทรเมทรี (GC-MS)

แยกสารโดยใช้คอลัมน์ DB5-MS ขนาด 30 mm X 0.25 mm X 25 μm อุณหภูมิในส่วน injector เท่ากับ 230 ^{0}ซ ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา (carrier gas) อุณหภูมิภายใน oven เท่ากับ 170 ^{0}ซ ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 0.5 ไมโครลิตร