บทที่ 3

วิธีการ

3.1 การทำให้สารบริสุทธิ์

การทำให้ เอทานอล, ไซโคลเฮกเซน และโทลูอีน บริสุทธิ์ ใช้วิธีการกลั่นลำดับส่วน (Fractional Distillation) แล้วเก็บส่วนที่ออกจากเครื่องกลั่นที่อุณหภูมิ 78, 80 และ 110 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.2 การเตรียมสารละลายโทลูอีนมาตรฐานและ internal standard

3.2.1 สารละลายโทลูอีนมาตรฐาน

เตรียมสารละลายโทลูอีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.2165 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายโทลูอีน 250 ไมโครลิตร ด้วย เอทานอล 2 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายนี้ 225 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3.2.2 สารละลายไซโคลเฮกเซน (internal standard)

เตรียมสารละลายไซโคลเฮกเซนความเข้มข้น 0.194 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยละลายไซโคลเฮกเซน 5 ไมโครลิตร ด้วยเอทานอล 20 มิลลิลิตร

3.3 การเตรียมคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

3.3.1 การเตรียมสารละลาย ไดเมทิลไดคลอโรไซเลน 5% โดยปริมาตร

นำไดเมทิลไดคลอโรไซเลน 0.5 มิลลิลิตร มาเติมโทลูอีนจนครบ 10 มิลลิลิตร

3.3.2 การเตรียมสารละลายเดคอน 3% โดยปริมาตร

นำเดคอน 90 มา 3 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.3.3 การทำความสะอาดคอลัมน์

นำคอลัมน์แก้วจากบริษัท Pye Unicam Ltd ; England และจากบริษัท Varian AG, Switzerland ขนาด 1500 x 4 มิลลิเมตร และ 2000 x 2 มิลลิเมตร ตามลำดับ มาล้างด้านในคอลัมน์ โดยผ่านเมทิลแอลกอฮอล์ และน้ำร้อนตามลำดับ โดยให้สารละลายแต่ละชนิดผ่านคอลัมน์อย่างละประมาณ 100 มิลลิลิตร เติมเดคอน 3 % โดยปริมาตร (จากข้อ 3.3.2) ลงในคอลัมน์ แช่ทิ้งค้างคืนไว้ แล้วล้างเดคอนออกจนสะอาดด้วยน้ำ ทำให้คอลัมน์แห้งโดยผ่าน เมทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง แล้วเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน

3.3.4 การซิลาไนซ์คอลัมน์

นำคอลัมน์ที่ล้างสะอาดและแห้ง มาเติมไดเมทิลไดคลอโรซิเลน 5 % โดยปริมาตร (จากข้อ 3.3.1) ลงในคอลัมน์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จึงเทออก แล้วล้างคอลัมน์ด้วย เมทิลแอลกอฮอล์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร โดยใช้เวลาประมาณ 5 นาที แล้วเป่าให้คอลัมน์แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน

3.3.5 การเตรียมใยแก้ว

แช่ใยแก้วในไดเมทิลไดคลอโรไซเลน 5% โดยปริมาตร เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างในเมทิลแอลกอฮอล์ 3 ครั้ง นำใยแก้วที่ได้ไปเกลี่ยบนกระดาษกรอง เปลี่ยนกระดาษกรองหลาย ๆ ครั้ง แล้วเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนจนใยแก้วแห้ง เก็บใยแก้วที่ได้ในขวดปิดฝาสนิท ก่อนใช้นำไปอบที่ 80-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3.6 การบรรจุสารลงในคอลัมน์

นำใยแก้วที่ล้างสะอาดและแห้งแล้วใส่ปลายข้างหนึ่งของคอลัมน์ให้ได้ความยาวของใยแก้วประมาณ $\frac{1}{2}$ นิ้ว แล้วต่อปลายด้านนี้เข้ากับเครื่องดูดอากาศซึ่งตั้งความดันไว้ 5-8 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้สายยางสั้น ๆ ต่อปลายของคอลัมน์อีกด้านหนึ่งเข้ากับกรวย เทสารที่ต้องการจะบรรจุ คือ Parapak Q ลงในกรวย เปิดเครื่องดูดอากาศ แล้วยกขึ้นเขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า เพื่อให้สารลงไปในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำซ้ำเช่นเดิมจนสารที่ต้องการบรรจุเกือบเต็มคอลัมน์ จึงใส่ใยแก้วเข้าที่ปลายคอลัมน์อีกด้านหนึ่ง

3.3.7 การเตรียมคอลัมน์สำหรับใช้งาน

นำคอลัมน์ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.6 ไปผ่านแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิสูงสุดที่จะใช้งานหรือมากกว่าเล็กน้อย แต่ไม่เกินอุณหภูมิจำกัดที่คอลัมน์จะทนได้ สำหรับคอลัมน์ Parapak Q นี้ นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนที่ 200 องศาเซลเซียสนาน 24-30 ชั่วโมง ในระหว่างที่ผ่านแก๊สไนโตรเจน ทดลอบ base line เป็นครั้งคราว จนได้ base line ที่เรียบพอที่จะใช้งานได้

3.4 การเตรียมสารละลายและการวิเคราะห์ส่วนผสมในตัวอย่างทินเนอร์และแลคเกอร์เชิงคุณภาพโดยแก๊สโครมาโตกราฟี

3.4.1 การเตรียมสารละเหยมาตรฐานที่อาจพบในทินเนอร์และแลคเกอร์

เตรียมสารตามรายการข้างล่างนี้ให้มีความเข้มข้นที่พอเหมาะสำหรับแต่ละสาร แล้ววิเคราะห์ทางคุณภาพด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน

อะซีโตน	5% ในน้ำ
เบนซีน	99.5%
ไดคลอโรมีเทน	98 %
เอทานอล	10 % ในน้ำ
เอทิลอะซีเตท	99.5 %
นอร์มัล-เฮกเซน	99 %
นอร์มัล-เฮปเทน	99 %
ไอโซโปรปานอล	99.5 %
ไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์	99 %
เมทานอล	10 % ในน้ำ
เมทิลเอทิลคีโตน	99 %
โทลูอีน	100 %
ไซลีน	99 %

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 การวิเคราะห์สารมาตรฐานเชิงคุณภาพ

วิเคราะห์สารมาตรฐานที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.1 โดยใส่สารละลายปริมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร ในขวดแก้ว ปิดขวดด้วยจุกยาง แล้วปิดทับด้วยฝาอะลูมิเนียม เขย่าสารละลายในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37-40 องศาเซลเซียส นาน 10-30 นาที แล้วดูดไอของสารละลายมาตรฐานเหนือของเหลวในขวดปริมาณ 0.05-0.2 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟของบริษัท Pye Unicam ใช้คอลัมน์แก้วขนาด 1500 x 4 มิลลิเมตร บรรจุด้วย Porapak Q, 80-100 mesh ใช้ดีเทคเตอร์แบบ Flame Ionization Detector (FID) อุณหภูมิของคอลัมน์ 170 องศาเซลเซียส และใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นตัวพาด้วยอัตราเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที บันทึกค่า retention time ของสารแต่ละชนิดไว้

3.4.3 การวิเคราะห์ส่วนผสมในตัวอย่างทินเนอร์ และแลคเกอร์ เชิงคุณภาพ

วิเคราะห์หาส่วนผสมในตัวอย่างทินเนอร์และแลคเกอร์เชิงคุณภาพ จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในขวด แล้วปิดให้แน่นด้วยจุกยาง และฝาอะลูมิเนียม แล้ววิเคราะห์โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2

3.4.4 การตรวจเพื่อยืนยันการวิเคราะห์โทลูอีนในตัวอย่างทินเนอร์ และแลคเกอร์ เชิงคุณภาพ

การตรวจเพื่อยืนยันส่วนผสมหลักในตัวอย่างทินเนอร์และแลคเกอร์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ในข้อ 3.4.2 ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ของบริษัท Pye unicam ใช้คอลัมน์แก้วขนาด 1500 x 4 มิลลิลิตร บรรจุด้วย carbopack C/0.2 % Carbowax 1,500, 80-100 mesh ใช้ดีเทคเตอร์แบบ FID อุณหภูมิคอลัมน์ 125 องศาเซลเซียส และใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นตัวพาด้วยอัตราเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อนาที

3.5 การศึกษาหาภาวะเหมาะสมในการวิเคราะห์โทลูอีนเชิงคุณภาพ

การศึกษาทำโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟของบริษัท Varian, model 3700 ใช้คอลัมน์แก้วขนาด 2000 x 2 มิลลิเมตร บรรจุด้วย Porapak Q, 80 - 100 mesh ใช้ดีเทคเตอร์ชนิด FID และใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นตัวพาด้วยอัตราเร็ว 30 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 180 องศาเซลเซียส

3.5.1 การเตรียมสารละลายไซโคลเฮกเซน 0.389 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลายไซโคลเฮกเซนความเข้มข้น 0.389 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายไซโคลเฮกเซน 10 ไมโครลิตรด้วยเอทานอล 20 มิลลิลิตร

3.5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้เกิดภาวะสมดุลย์ระหว่างสารละลายโทลูอีนกับไอ

เตรียมตัวอย่างโดยใช้สารละลายโทลูอีนมาตรฐานในข้อ 3.2.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในขวดแก้วที่เตรียมไว้ เติมสารละลายไซโคลเฮกเซนจากข้อ 3.5.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น internal standard แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 มิลลิลิตร ปิดขวดด้วยลูกยางแล้วปิดทับด้วยฝาอะลูมิเนียม เขย่าตัวอย่างนี้ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้นาน 10 นาที ทำการศึกษาในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส ห่างกันช่วงละ 5 องศาเซลเซียส แล้วดูดเฉพาะไอของสาร 0.5 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟวัดความสูงของพีค (peak height) ของไซโคลเฮกเซน และโทลูอีน หาอัตราส่วนของความสูงของพีคของสารทั้งสอง แล้วเขียนกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูงของพีคของโทลูอีนต่อไซโคลเฮกเซน กับอุณหภูมิที่ทำการทดลอง

3.5.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำให้เกิดภาวะสมดุลย์ระหว่างสารละลายโทลูอีนกับไอ

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 3.5.2 แล้วเขย่าตัวอย่างในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิที่เลือกแล้วในข้อ 3.5.2 เป็นเวลานาน10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ตามลำดับ แล้วดูดเฉพาะไอของสาร 0.5 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูงของพีคของโทลูอีนต่อไซโคลเฮกเซน กับเวลาที่ทำการทดลอง

3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณโทลูอีน

เตรียมตัวอย่างที่จะศึกษาหรือวิเคราะห์ในขวดแก้วที่ปิดแน่นด้วยฝาอะลูมิเนียม แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เกิดภาวะสมดุลย์ระหว่างสารละลายในขวดและไอของมันในอ่างน้ำที่ตั้งอุณหภูมิและเวลาไว้ตามที่เลือกแล้วจากข้อ 3.5.2 และ 3.5.3 แล้วดูดเฉพาะไอที่อยู่เหนือของ

เหลว 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟ โดยใช้อุณหภูมิคอลัมน์ 190 องศาเซล-เซียส

3.6 การเตรียมสารละลายและการวิเคราะห์หาปริมาณโทลูอีนในตัวอย่างทินเนอร์และแลคเกอร์

3.6.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของโทลูอีนในน้ำ

เตรียมตัวอย่างที่มีสารละลายโทลูอีนมาตรฐาน 2.16, 4.32, 8.64, 10.8 และ 12.96 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยนำสารละลายโทลูอีนมาตรฐานจากข้อ 3.2.1 ปริมาตร 10, 20, 40 , 50 และ 60 ไมโครลิตร มาเติมสารละลายไซโคลเฮกเซน จากข้อ 3.2.2 ตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำขวดตัวอย่างไปเขย่าในอ่างน้ำที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ โดยใช้สภาวะที่เลือกแล้วในข้อ 3.5 ดูดเฉพาะไอของสาร 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ วัด retention time ของโทลูอีน ไซโคลเฮกเซนไว้ และวัดความสูงของพีคของโทลูอีนและไซโคลเฮกเซน หาอัตราส่วนระหว่างความสูงของพีคของสารทั้งสอง แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูง ของพีคโทลูอีนต่อไซโคลเฮกเซนกับความเข้มข้นของโทลูอีน

3.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโทลูอีนในตัวอย่างทินเนอร์และแลคเกอร์

เตรียมตัวอย่างทินเนอร์หรือแลคเกอร์ที่จะวิเคราะห์โดยละลายสารตัวอย่างทินเนอร์หรือแลคเกอร์ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเอทานอล 4 มิลลิลิตร ซึ่งโทลูอีนในตัวอย่างเหล่านี้สามารถละลายได้ดีในเอทานอล ดังแสดงไว้ในภาคผนวกหน้า แล้วจึงนำเฉพาะส่วนใสส่วนบนมา 45 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เติมสารละลายไซโคลเฮกเซน จากข้อ 3.2.2 ตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร เพื่อเป็น internal standard และปรับปริมาตรสุดท้าย เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น การวิเคราะห์ทำตามสภาวะในข้อ 3.6.1 แล้วหาปริมาณโทลูอีน โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.6.1

3.7 การสร้างกราฟมาตรฐานของโทลูอีนในซีรัม

3.7.1 การเตรียมสารละลายไซโคลเฮกเซน 0.097 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำสารละลายไซโคลเฮกเซน จากข้อ 3.2.2 มา 2 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยเอทานอล 2 มิลลิลิตร

3.7.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของโทลูอีนในซีรัม

เตรียมตัวอย่างที่มีสารละลายโทลูอีนมาตรฐาน 1.08, 2.16, 3.24, 4.32 และ 5.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยนำสารละลายโทลูอีนมาตรฐานจากข้อ 3.2.1 ปริมาตร 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร มาเติมสารละลายไซโคลเฮกเซน ความเข้มข้น 0.097 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร (จากข้อ 3.7.1) 5 ไมโครลิตร เพื่อเป็น internal standard ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตรด้วยซีรัมคนปกติ นำขวดตัวอย่างไปเขย่าในอ่างน้ำที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ โดยใช้สภาวะที่เลือกแล้วในข้อ 3.5 แล้วดูดเฉพาะไอสาร 1 มิลลิลิตรฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ วัดความสูงของพีคของโทลูอีนและไซโคลเฮกเซน แล้วหาอัตราส่วนระหว่างความสูงของพีคของสารทั้งสอง เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูงของพีคโทลูอีนต่อไซโคลเฮกเซนกับความเข้มข้นของโทลูอีน

3.7.3 การศึกษาอิทธิพลของซีรัมต่อกราฟมาตรฐาน

ผสมสารต่าง ๆ ตามปริมาณที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยใช้ปริมาณซีรัมเป็น 250, 500 และ 950 ไมโครลิตร สารละลายโทลูอีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.2165 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (จากข้อ 3.2.1) 10, 20, 30 และ 40 ไมโครลิตร ตามลำดับ สารละลายไซโคลเฮกเซน ความเข้มข้น 0.259 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร แล้ววิเคราะห์ตัวอย่างนี้ตามสภาวะที่เลือกแล้วในข้อ 3.5 ดูดเฉพาะไอของสาร 1 มิลลิลิตรฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูงของพีคของโทลูอีนต่อไซโคลเฮกเซนกับความเข้มข้นของโทลูอีน เมื่อใช้ปริมาณซีรัมต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 1 การศึกษาอิทธิพลของซีรัมต่อกราฟมาตรฐาน

สารละลายโทลูอีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.2165 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	สารละลายไซโคลเฮกเซนความเข้มข้น 0.259 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	ปริมาณซีรัม		
		ชุดที่ 1 (ul)	ชุดที่ 2 (ul)	ชุดที่ 3 (ul)
10	5	250	500	950
20	5	250	500	950
30	5	250	500	950
40	5	250	500	950

แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.8 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์

3.8.1 การศึกษาความไว (Sensitivity)

ในการศึกษาครั้งนี้กำหนดให้ความเข้มข้นของโทลูอีนที่ให้ความสูงของพีค 2 เซนติเมตร เป็นความไวของการวัดปริมาณโทลูอีนโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟ การศึกษาทำโดยนำสารละลายโทลูอีนมาตรฐานจากข้อ 3.2.1 มา 5 ไมโครลิตร เจือจางลง 200 เท่าด้วยการเติมฮีรัมของคนปกติให้ครบ 1 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์สารละลายนี้โดยใช้สภาวะในข้อ 3.5 โดยฉีดไอของสาร 1 มิลลิลิตรเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.8.2 การศึกษาความแม่นยำของวิธี (Precision)

3.8.2.1 การเตรียมสารละลายไซโคลเฮกเซน 0.259 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลายไซโคลเฮกเซนความเข้มข้น 0.259 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารละลายไซโคลเฮกเซน 5 ไมโครลิตรด้วยเอทานอล 1.5 มิลลิลิตร

3.8.2.2 การศึกษาความแม่นยำของวิธี

นำสารละลายโทลูอีนมาตรฐานจากข้อ 3.2.1 มา 2 ชุด โดยใช้ปริมาณ 10 และ 20 ไมโครลิตร ชุดละ 10 ตัวอย่าง แล้วเติมสารละลายไซโคลเฮกเซนความเข้มข้น 0.259 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากข้อ 3.8.2.1 ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยฮีรัมคนปกติ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณโทลูอีนโดยใช้สภาวะที่เลือกแล้วในข้อ 3.5 โดยฉีดเฉพาะไอของสาร 1 มิลลิลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ และอ่านค่าปริมาณโทลูอีนจากกราฟมาตรฐานโทลูอีนในข้อ 3.7.2 ศึกษาความแม่นยำโดยทำซ้ำกัน 3 การทดลอง แล้วเปรียบเทียบความแม่นยำของการวิเคราะห์ในการทดลองเดียวกัน และระหว่างการทดลอง โดยใช้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

$$\text{สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน} = \frac{\text{ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่ามัชฌิมเลขคณิต}} \times 100$$

3.8.3 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

นำสารละลายโทลูอีนมาตรฐาน จากข้อ 3.2.1 10 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์หาปริมาณโทลูอีนตามสภาวะในข้อ 3.8.2 และ 3.5 โดยอ่านค่าโทลูอีนจากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.7.2 แล้วเติมสารละลายโทลูอีน (จากข้อ 3.2.1) ลงไป 2.16 และ 4.32 ไมโครกรัม

ความเข้มข้นละ 2 ตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโทลูอีนอีกครั้งหนึ่ง นำค่าที่ได้มาคำนวณความถูกต้องของวิธีทดลอง (percentage recovery) ดังนี้

การคำนวณค่าความถูกต้องของวิธีทดลอง

สมมุติความเข้มข้นของโทลูอีนในตัวอย่างที่เตรียมขึ้น เมื่ออ่านค่าจากกราฟมาตรฐานเท่ากับ x ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

และความเข้มข้นของโทลูอีนในตัวอย่างที่เติมสารละลายโทลูอีนอีก 2.16 ไมโครกรัม เมื่ออ่านค่าจากกราฟมาตรฐานเท่ากับ y ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นที่คาดไว้เป็น $x + 2.16$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่วัดได้เป็น y ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

" " 100 " " $\frac{100\ y}{x + 2.16}$ "

% รีคอบเวอรี่ เท่ากับ $\frac{100\ y}{x + 2.16}$

3.8.4 <u>การศึกษาเสถียรภาพของโทลูอีนในซีรัม</u>

เตรียมตัวอย่างที่มีสารละลายโทลูอีนมาตรฐานจากข้อ 3.2.1 15 และ 25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยซีรัมคนปกติ เก็บตัวอย่างที่จะศึกษานี้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แล้วนำออกมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณโทลูอีนเป็นระยะ ๆ คือ 0 วัน, 2 สัปดาห์, 4 สัปดาห์, 5 สัปดาห์, 6 สัปดาห์, 9 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ และอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานโทลูอีน จากข้อ 3.7.2 แล้วนำค่าความเข้มข้นของโทลูอีนที่วิเคราะห์ได้นี้มาเปรียบเทียบเพื่อหาความเสถียรของโทลูอีนในซีรัม

3.9 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณโทลูอีนในซีรัมของกลุ่มบุคคลที่ศึกษา</u>

3.9.1 <u>การเก็บตัวอย่างซีรัม</u>

แช่หลอดที่จะใส่เลือด และขวดที่จะเก็บซีรัมในน้ำแข็งหรือในตู้เย็นให้เย็นก่อนใช้งาน เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่แขนประมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่เตรียมไว้ ปิดด้วยกระดาษอะลูมิเนียม และพันให้แน่นด้วยพาราฟิลม์ ทิ้งเลือดให้แข็งตัว โดยแช่หลอดในน้ำแข็งหรือตู้เย็น นำเลือดมาปั่นด้วยเครื่องปั่นที่มีระบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ 4-10 องศาเซลเซียส

ด้วยความเร็ว 2500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แยกซีรัมเก็บในขวดที่เตรียมไว้ ขวดละ 1 มิลลิลิตร เก็บแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

3.9.2 <u>การวิเคราะห์ปริมาณโทลูอีนในซีรัมจากกลุ่มบุคคลที่ศึกษา</u>

นำซีรัมจากข้อ 3.9.1 มา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายไซโคลเฮกเซนในข้อ 3.7.1 จำนวน 5 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น Internal Standard แล้วนำมาวิเคราะห์ตามสภาวะในข้อ 3.5 แล้วหาปริมาณโทลูอีน โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.7.2