หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

- ถังตักน้ำ
- ขวดเก็บน้ำ, ขวดเก็บดิน และขวดเก็บปลา ซึ่งเป็นขวดแก้วล้างอย่างสะอาด
- ถังเก็บความเย็น
- แผนที่บริเวณที่ต้องการเก็บตัวอย่าง
- ที่ตักดิน แบบ Petersen grab

หมายเหตุ

ขวดเก็บน้ำล้างด้วยสบู่และน้ำ,cleaning solution, น้ำกลั่น, acetone, hexane อบแห้งบุฝาด้วย aluminum foil แช่เย็นกันการกระทำของจุลชีวะซึ่งอาจมี chlorinated hydrocarbonsสะสมในตัว เมื่อตายและเน่าเปื่อยจะทำให้ปริมาณวัตถุมีพิษสูงกว่าความจริง

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

2.1 อุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่าง

- ไม้บรรทัด
- เครื่องชั่งแบบ Triple beam balance ของ OHAUS
- aluminium foil
- ถาดผึ่งดิน

- ตะแกรงร่อนดินขนาด 30 – 40 mesh
- โกร่งบดดิน
- ตู้อบ
- เครื่องบดตัวอย่าง หรือ เครื่องมือสับตัวอย่าง
- dessicator

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้กลั่นสารเคมี

- เครื่องกลั่นที่เป็นแก้ว (All-glass apparatus) ใช้น้ำผ่าน condenser
- เทอร์โมมิเตอร์
- ขวดก้นกลม (Volumetric flask) ขนาด 1000 มล. ใส่สารละลาย
- ขาตั้งและคลิป (Stand and Clip)

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด

- เครื่องสกัดวัตถุมีพิษชนิด Blender, Homogenizer
- เครื่องกรองชนิดระบบสูญญากาศหรือ Fritted glass funnel, medium porosity
- เครื่องเซ็นตริฟิวจ์แบบ Minor MSE
- Separatory funnel ขนาด 1000 มล. ควรใช้ Teflon sptpcocks
- Soxhlet extractors สำหรับสกัด ประกอบด้วย extraction thimble, soxhlet, ขวดก้นกลม

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการ clean up

- chromatographic column with teflon stopcock
- evaporator

2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณตกค้างของวัตถุมีพิษโดยใช้ GLC

- เข็มฉีดสารที่ตรวจวิเคราะห์เข้าเครื่อง GLC(microsyringe ขนาด 10 ul)

- เครื่องแกสโครมาโตรกราฟ (gas chromatography หรือเรียกว่า GLC แบบ Microtek220 หรือ MT 220) ผลิตโดย TRACOR Instrument Inc, Taxas

2.5.1 การตรวจปริมาณวัตถุมีพิษประเภทออร์แกโนคลอรีน (organo-chlorine pesticides) มีภาวะของเครื่องดังนี้

- detector:electron capture detector (ECD)
- อุณหภูมิของ detector:275 °ซ.
- ชนิดของ column packing:1.5% - SP - 2250/1.95% SP - 2401 on supelcon AW DMCS, 100 - 120 mesh
- อุณหภูมิของ column:200 °ซ.
- กาซตัวนำ (carreir gas):ไนโตรเจน (Nitrogen)
- อัตราการไหลของกาซตัวนำ:60 ลบ.ซม./นาที (บรรยากาศ)
- ความดันของกาซตัวนำ:20 PSIG

2.5.2 การตรวจปริมาณวัตถุมีพิษประเภทออร์แกโนฟอสเฟท (Organophosphate) มีภาวะของเครื่องดังนี้

- ชนิดของ detector:Flame Photometric Detector (FPD)
- อุณหภูมิของ detector:175 °ซ.
- ชนิดของ column packing:10%DC 200 on Gaschrom Q, 100 - 120 mesh

– อุณหภูมิของ column ที่เตาอบ (oven): 200 °ซ.

– กาซตัวนำ: ไนโตรเจน

เมื่อเปิดเครื่องครั้งแรกตั้งภาวะของเครื่องดังนี้

– ปรับอัตราการไหลของกาซตัวนำที่ไหลผ่าน column ให้อยู่ระหว่าง 80 – 100 มล./นาที

003576

– ปรับอัตราการไหลของออกซิเจนเป็น 50 มล./นาที

– ปรับอัตราการไหลของไฮโดรเจนเป็น 100 มล./นาที

– ปรับอัตราการไหลของอากาศให้อยู่ระหว่าง 30 – 40 มล./นาที

เมื่อจุดเปลวไฟ (flame) เป็นเวลา 15 – 20 นาที แล้วตั้งภาวะของเครื่องดังนี้

– ปรับอัตราการไหลของกาซตัวนำที่ไหลผ่าน column เป็น 80 มล./นาที

– ปรับอัตราการไหลของออกซิเจนเป็น 20 มล./นาที

– ปรับอัตราการไหลของไฮโดรเจนให้อยู่ระหว่าง 150 – 200 มล./นาที

– ปรับอัตราการไหลของอากาศเป็น 40 มล./นาที

2.6 <u>อุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ทั่ว ๆ ไป</u>

– beaker ขนาด 50, 250, 500, 1000 มล.

– flask ชนิดมีฝาปิดขนาด 200 – 250 มล.

– Erlenmeyer flask ขนาด 500 มล.

– กระบอกตวงขนาด 100, 250 มล.

– glass stoppered cylinder

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด (Extraction)

- n-hexane, AR, จุดเดือด 68 – 69 °ซ.
- anhydrous sodium sulphate, AR, อบที่ 130 °ซ. ตลอดคืน
- chloroform, AR, จุดเดือด 60 – 62 °ซ.
- acetonitrile, AR
- diethyl ether, AR, จุดเดือด 34 – 35 °ซ.
- petroleum ether, AR, จุดเดือด 40 – 60 °ซ.
- tri - distilled water

2. สารเคมีที่ใช้ในการแยกชั้น (hexane partition of acetonitrile extract)

- dichloromethane ($CH_2 Cl_2$), จุดเดือด 39 – 40.5 °ซ.
- phosphate buffer pH 6.0 (ทำได้โดยเติม 5.6 มล. ของ sodium hydroxide 0.1 M. ลงใน 50 มล. ของ 0.1 M. potassium dihydrogen phosphate)
- saturated sodium sulphate solution
- tri-distilled water

3. สารเคมีที่ใช้ในการขจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ (Clean up)

- florisil, PR, 60/100 mesh อบที่ 130 °ซ. ตลอดคืน
- anhydrous sodium sulphate, AR, อบที่ 130 °ซ. ตลอดคืน
- n-hexane, AR, จุดเดือด 68 – 69 °ซ.
- 5%, 10%, 15%, 20%, 30% dichloromethane in hexane
- 5%, 10%, 20%, 30% ethyl acetate in hexane

4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจผลการวิเคราะห์โดยGLC

– n-hexane, AR, จุดเดือด 68 – 69 °ซ.

– acetone, AR, จุดเดือด 56 °ซ.

– สารละลายมาตรฐานของวัตถุมีพิษพวกออร์แกโนคลอรีน ได้แก่ ∝- BHC, lindane, heptachlor, heptachlor epoxide, dieldrin, o,p´- DDT, p,p´- DDT, o,p´- TDE, p,p´- TDE, o,p´- DDE p,p´- DDE, endrin

– สารละลายมาตรฐานของวัตถุมีพิษ พวกออร์แกโนฟอสเฟต ได้แก่ phosdrin, dimethoate, diazinon, methyl parathion, parathion และ malathion

วิธีดำเนินงาน

1. การกำหนดสถานี

ได้ทำการสำรวจเพื่อวางแผนการตั้งสถานีเก็บตัวอย่างในบริเวณชลประทานป่าสักใต้ในเดือนเมษายน 2520 โดยเริ่มสำรวจตั้งแต่บริเวณประตูระบายน้ำพระนารายณ์ จังหวัดสระบุรี ลงมาทางโครงการชลประทานป่าสักใต้จนถึงคลองแสนแสบใกล้มีนบุรี กรุงเทพมหานคร จากนั้นจึงได้กำหนดสถานีที่จะเก็บตัวอย่าง ดังต่อไปนี้

หมายเลขสถานี	บริเวณที่ตั้งสถานีนั้น ๆ
1	ตั้งอยู่ในคลองลำน้ำชัยนาท – ป่าสัก เยื้องกับโรงงานผลิตปูนซีเมนต์ อำเภอเสาไห้ จังหวัดสระบุรี
2	สะพานรถไฟข้ามแม่น้ำป่าสักตอนเหนือ อำเภอเมือง จังหวัดสระบุรี
3	คลองระพีพัฒน์ แยกตกเหนือประตูน้ำพระศรีศิลป์ อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี

หมายเลขสถานี	บริเวณที่ตั้งสถานีนั้น ๆ
4	คลองซอย 3
5.1	ในนาข้าวระหว่างคลองซอย 3 และคลอง 8
5.2	ในบ่อเลี้ยงปลาระหว่างคลองซอย 3 และคลอง 8
6	คลองระบายน้ำสายที่แปด
7	คลองรังสิตซึ่งเป็นคลองระบายน้ำรวมของน้ำทั้งหมดที่ใช้ในโครงการชลประทานบำสักใต้
8	คลองสามวา ในคลองแสนแสบตอนเหนือ อำเภอมีนบุรี กรุงเทพมหานคร
9	สวนส้มอยู่ระหว่างคลอง 9 และคลอง 10

ดังแสดงในแผนที่ประกอบ รูปที่ 1

สถานีที่ 1 และ 2 เป็นสถานีที่ตั้งอยู่เหนือโครงการ สถานีที่ 3 – 7 และสถานีที่ 9 เป็นสถานีที่ตั้งอยู่ในบริเวณโครงการ สถานีที่ 8 ตั้งอยู่ใต้โครงการ

2. การเก็บตัวอย่าง

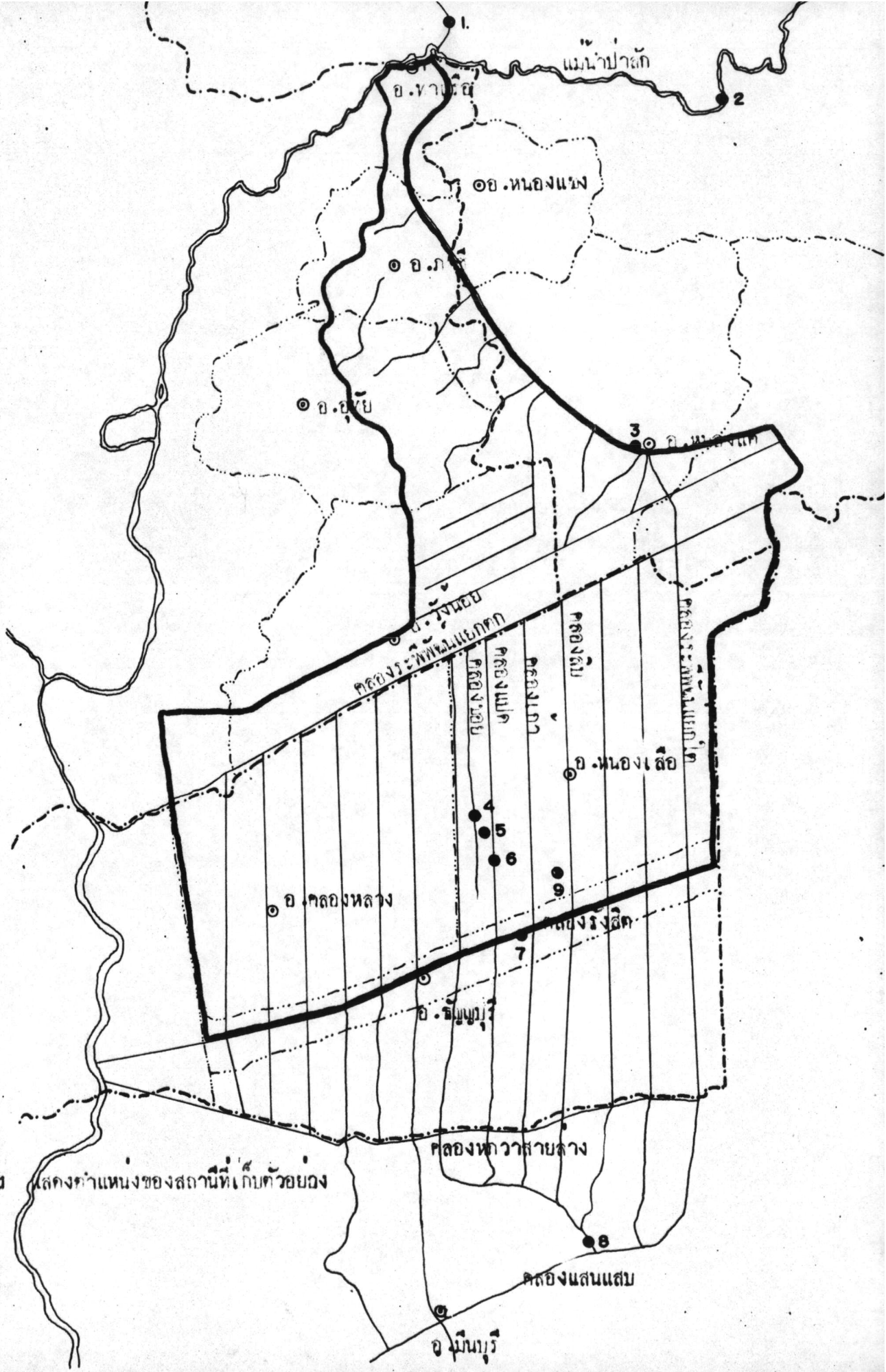
เก็บตัวอย่างทั้งสิ่งมีชีวิตได้แก่ ปลา นก และสิ่งที่ไม่มีชีวิต ได้แก่ ดินและน้ำ

2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำเก็บที่ระดับผิวน้ำ ใส่ขวดเก็บน้ำและแช่เย็น (freeze) หรือแช่เย็นจัดไว้

2.2 การเก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินเก็บโดยใช้ที่ตักดิน (Petersen grab) ใส่ขวดเก็บดิน และนำไปแช่แข็งทันที



รูปที่ แสดงตำแหน่งของสถานีที่เก็บตัวอย่าง

2.3 การเก็บตัวอย่างปลา

ตัวอย่างปลาได้ซื้อจากผู้ที่นั่งขายปลาบริเวณนั้น และสอบถามบริเวณที่จับปลาได้ นำมาแช่แข็งทันที

2.4 การเก็บตัวอย่างนก

ตัวอย่างนกเก็บโดยใช้ปืนยิง

3. การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์

3.1 ตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำที่แช่แข็ง นำมาละลายที่อุณหภูมิห้องจนหมด

3.2 ตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินนำมาผึ่งไว้ในถาด ซึ่งมีแผ่นอาลูมิเนียม (aluminum foil) รองอยู่ ใช้ผ้าขาวบางโปร่ง ๆ ปิดไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 2 สัปดาห์จนแห้ง นำมาบดด้วยโกร่งบดดิน แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 mesh

3.3 ตัวอย่างปลาและนก

นำมาจัดชนิด วัดความยาว และชั่งน้ำหนัก แล่กล้ามเนื้อปลาที่บริเวณส่วนหลัง และแล่กล้ามเนื้อนกบริเวณหน้าอก (ไม่ใช่หนัง) ล้างด้วยน้ำกลั่น นำตัวอย่างมาประมาณ 50 กรัม (ถ้ามีพอ) บดและผสมให้เข้ากัน ถ้ายังไม่วิเคราะห์ทันทีนำตัวอย่างห่อเก็บไว้ด้วย Aluminum foil หรือเก็บไว้ในภาชนะแก้วที่มีฝาปิด แช่แข็งไว้

หมายเหตุ

ในการเก็บ, เตรียมและรักษาตัวอย่างนั้นต้องระวังว่าการใช้ GLC นั้นเป็นเครื่องมือที่มี sensitivity และ accuracy สูงมาก ความผิดพลาดเล็ก ๆ น้อยก็ทำให้ค่าที่ตรวจวิเคราะห์ผิดไป มีหลักใหญ่ ๆ 2 ข้อ คือ

– ต้องพยายามไม่ให้วัตถุมีพิษสลายตัว (degradation) ก่อนการทดลองหรือระหว่างการทดลอง

– ต้องพยายามไม่ให้ contaminate กับ impurity

1. ตัวอย่างทุกตัวอย่างต้องจำแนกชนิด (identify) อย่างละเอียด และบอกรายละเอียดต่าง ๆ

2. หลีกเลี่ยงภาชนะใส่หรือบรรจุที่เป็นยางหรือ Plastic ใช้ภาชนะใส่ตัวอย่างที่เป็นแก้วหรือ teflon

3. ตัวอย่างจะต้องเก็บไว้ในตู้เย็น แช่แข็ง (frozen) ได้ยิ่งดี จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ จึงนำมาทิ้งไว้จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

4. ขณะที่เคลื่อนย้ายตัวอย่างมาควรจะแช่เย็นหรือแช่แข็งมาตลอดเวลา

5. เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วควรจะรีบนำมาวิเคราะห์ทันทีไม่ควรจะทิ้งไว้เกิน 1 สัปดาห์

– ตัวอย่างปลาควรจะ extract ภายใน 24 ชั่วโมง (โดยแช่ตู้เย็นไว้ที่ 5 °ซ.)

– ตัวอย่างน้ำควรจะวิเคราะห์ในวันถัดไป (ไว้ในตู้เย็นที่ 5 °ซ.)

– การตรวจวิเคราะห์พวก organophosphate ทุกตัวอย่างต้องแช่แข็ง เว้นแต่จะทำภายใน 2 – 3 ชั่วโมง

4. <u>การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณตกค้างของวัตถุมีพิษ ในตัวอย่าง</u>

การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ GLC มีขั้นตอนดังนี้

– การสกัด (extraction) เป็นการสกัดเอาวัตถุมีพิษออกมา

– การแยก (partition) เป็นการแยกวัตถุมีพิษออกจากส่วนอื่น ๆ

– การจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ (clean up) เป็นการแยกเอาสารอื่นที่รบกวนออกให้หมด

– การใช้ GLC (gas liquid chromatograph) เป็นการ detect ปริมาณสารมีพิษชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในไดอะแกรมรูปที่ 2

4.1 <u>การตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำ</u> ตามวิธีของ Faust and Suffet (1966)

– ตวงตัวอย่างน้ำที่ละลายที่อุณหภูมิห้องและเขย่าให้เข้ากันอย่างดีมา 800 มล. ใส่ใน 1000 มล. separatory funnel สกัดด้วย 100 มล. hexane หรือ chloroform ตามด้วย 50 มล. hexane อีก 4 ครั้ง ในการสกัดแต่ละครั้งให้เขาอย่างแรงอย่างน้อย20 นาที และเขย่าทั้งแนวนอนและแนวราบ

– ผ่านสารละลายที่สกัดได้ไปยัง anhydrous sodium sulphate ประมาณ 40 กรัม

– นำสารละลายที่ได้มาลดปริมาตรจนเกือบแห้ง ชะ (rinse) ด้วย hexane ประมาณ 5 ครั้ง และปรับปริมาตรเป็น 3 มล.

– เก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วขนาดเล็ก ฝาบุด้วยaluminun foil เพื่อป้องกันการระเหย ถ้ายังไม่ฉีดเข้าเครื่อง GLC ให้นำไปแช่แข็งไว้ก่อน

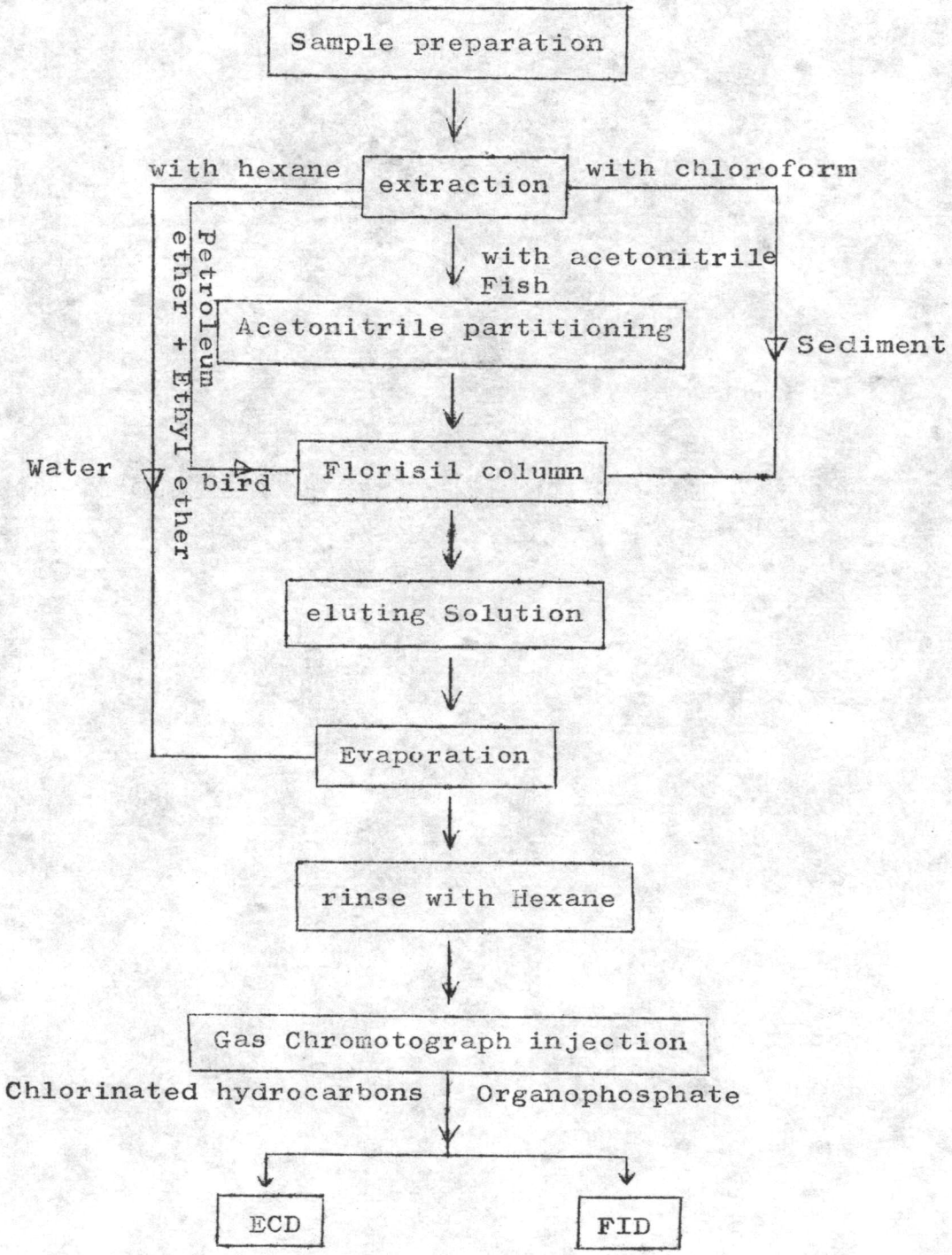
4.2 <u>การตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างปลา</u> ทำตามวิธีของ H.A. Mcleod และ W.R. Ritcey ของ Health Protection Branch ประเทศแคนาดา

4.2.1 <u>การสกัด</u>

– สุ่มตัวอย่างที่บดและผสมกันดีแล้ว 10 กรัม ใส่ลงในเครื่องสกัดชนิดปั่น เติม 32 มล. acetonitrile และน้ำกลั่น 8 มล. ใช้ความเร็วสูงสุดสกัดเป็นเวลา 5 นาที

– กรอง homoginate โดยใช้ระบบสูญญากาศ

– สกัดอีกครั้งโดยใช้ acetonitrile 40 มล. และน้ำกลั่น 3 มล.



รูปที่ 2 ไดอะแกรมแสดงลำดับในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณตกค้างวัตถุมีพิษ

– กรอง homoginate เช่นเดียวกับครั้งแรก

– ถ่ายสารละลายจาก Vacuum flask ใส่ใน stoppered graduated cylinder หรือ flask ที่มีฝาปิด เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. เขย่า 1 นาที

4.2.2 การแยกชั้น hexane

– นำสารละลายจาก 4.2.1 นำมาใส่ใน separating funnel เติม dichloromethane 10 มล. phosphate buffer 20 มล. และ hexane 200 มล. เขย่าอย่างแรง 1 นาที

– เติมน้ำกลั่น 500 มล. และสารละลาย saturated sodium sulphate เขย่าอย่างแรง 2 นาที และปล่อยให้แยกชั้นอย่างสมบูรณ์

– ไขส่วนล่างที่เป็น acetonitrile-water phase ทิ้ง

– ล้างส่วนที่เป็น hexane extract 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 100 มล. เขย่าเบา ๆ ป้องกันการเกิด emulsion ไขชั้นน้ำซึ่งอยู่ข้างล่างออกทิ้ง

– กรอง hexane extract ผ่าน anhydrous sodium sulphate แล้วนำไประเหยปริมาตรจนเหลือ 5 มล. หรือน้อยกว่านั้นเก็บไว้เตรียมไป clean up

4.2.3 ขจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ

– pack chromatographic column โดยใส่ glass wool ลงไปที่ส่วนล่างของ column กดให้แน่นด้วย tamping rod บรรจุ florisil 35 กรัม ลงไปให้แน่นพอควร แล้วเติม anhydrous sodium sulphate 20 กรัม

– เปิด stopcock เต็มที่ นำ flask รองรับ 50 มล. hexane ที่เติมลงไปเพื่อ prewet column

– เมื่อระดับของ hexane ลดลงพอดีชั้นบนของ Na_2SO_4 ค่อย ๆ เติมตัวอย่างที่ได้จาก 4.2.2 ซึ่งเอาไปเติม hexane 25 มล. แล้วล้าง beaker ด้วย hexane 15 มล. 2 ครั้งเติมแต่ละส่วนลงใน column ลักษณะเดียวกับครั้งก่อน ปรับ stopcock ให้อัตราเร็วของการหยดของสารละลายประมาณ 60 – 100 หยดต่อนาที

– เมื่อระดับสารละลายลดลงพอดีที่ชั้นบนของ Na_2SO_4 ค่อย ๆ เท eluting solvent 2 ครั้ง ปริมาตรทั้งหมด 30 มล. เติม eluting solvent อื่น ๆ ตามไปโดยลำดับ eluting solvent ดังนี้

5%	dichloromethane in hexane
10%	dichloromethane in hexane
15%	dichloromethane in hexane
20%	dichloromethane in hexane
30%	dichloromethane in hexane
5%	ethyl acetate in hexane
10%	ethyl acetate in hexane
20%	ethyl acetate in hexane
30%	ethyl acetate in hexane

– นำสารละลายที่ได้ไปลดปริมาตรจนเกือบแห้ง ชะด้วย hexane อย่างน้อย 5 ครั้ง

– เติม Na_2SO_4 เพื่อดูดความชื้น ปรับปริมาตรด้วย hexane

– เก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดแก้วเล็ก ฝาบุด้วย aluminum foil เตรียมไว้ฉีดเข้าเครื่อง GLC

4.3 การตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างนก ทำตามวิธีของ H.A. McLeod และ W.R. Ritcey ของ Health Protection Branch ประเทศแคนาดา

การสกัด

– ชั่งเนื้อนกที่เตรียมไว้มา 10 กรัม ใส่เครื่องสกัดชนิดปั่น (Blender) เติม petroleum ether และ diethyl ether อย่างละ 30 มล. ใช้อัตราเร็วปานกลางปั่นเป็นเวลา 2 นาที

– เท homogenate ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ เซ็นตริฟิวจ์ด้วยอัตราเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

– นำ Supernatant liquid ผ่าน Na_2SO_4 เพื่อดูดความชื้น นำไปลดปริมาตร เตรียม clean up ตาม 4.2.3 เพื่อนำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC

หมายเหตุ

สารละลายไม่มีไขมัน สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำไปฉีดเข้าเครื่อง

4.4 การตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างดิน ตามวิธีของ Carey et al (1976) และเปลี่ยน eluting สารละลายเป็นชนิดเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างปลา

4.4.1 การสกัด

– ผสมตัวอย่างดินที่ร่อนแล้วให้เข้ากัน สุ่มตัวอย่างมา 100 กรัม บรรจุลงใน extraction thimble แล้วใส่ลงใน soxhlet

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

– ตวง chloroform 400 มล. ใส่ในขวดสกัด สกัดที่ 50 – 60°ซ. เป็นเวลา 18 ชั่วโมงติดต่อกัน

– เก็บสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วย beaker ขนาด 500 มล. นำมาลดปริมาตรเหลือ 5 มล. ปิดปาก beaker ด้วย aluminum foil ให้แน่น เพื่อนำไป clean up ต่อไปตาม 4.4.2

4.4.2 การ clean up

– ใช้ eluting สารละลายตามลำดับด้วยกรรมวิธีเหมือน 4.2.3

4.5 การหาชนิดของสาร การคำนวณปริมาณของสารที่ตรวจพบและการหาค่าเปอร์เซ็นต์ recovery

– ปรับปริมาณของสารที่จะฉีดให้แน่นอนด้วย hexane เตรียมฉีดเข้าเครื่อง GLC

4.5.1 การหาชนิดของสาร

– ฉีด standard ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน อาจจะเป็น standard ชนิดเดียว หรือ Mixed standard solution ก็ได้ ถ้า standard ที่นำมาผสมกันนั้นมีค่า retention time ต่างกันพอที่จะแยก peak ออกจากกันได้ วัด retention time ของ standard แต่ละตัวไว้

– ฉีดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์นำค่า retention time ไปเปรียบเทียบกันกับ retention time ของ standard ที่ฉีดไว้แล้ว ถ้าค่า retention time เท่ากัน แสดงว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

4.5.2 การคำนวณเพื่อหาปริมาณของสารที่ตรวจพบมีอยู่ 2 วิธี คือ

– ใช้ Standard peak height ทำ

– ตวง chloroform 400 มล. ใส่ในขวดสกัด สกัดที่ 50 – 60°ซ. เป็นเวลา 18 ชั่วโมงติดต่อกัน

– เก็บสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วย beaker ขนาด 500 มล. นำมาลดปริมาตรเหลือ 5 มล. ปิดปาก beaker ด้วย aluminum foil ให้แน่น เพื่อนำไป clean up ต่อไปตาม 4.4.2

4.4.2 การ clean up

– ใช้ eluting สารละลายตามลำดับด้วยกรรมวิธีเหมือน 4.2.3

4.5 การหาชนิดของสาร การคำนวณปริมาณของสารที่ตรวจพบและการหาเปอร์เซ็นต์ recovery

– ปรับปริมาณของสารที่จะฉีดให้แน่นอนด้วย hexane เตรียมฉีดเข้าเครื่อง GLC

4.5.1 การหาชนิดของสาร

– ฉีด standard ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน อาจจะเป็น standard ชนิดเดียว หรือ Mixed standard solution ก็ได้ ถ้า standard ที่นำมาผสมกันนั้นมีค่า retention time ต่างกันพอที่จะแยก peak ออกจากกันได้ วัด retention time ของ standard แต่ละตัวไว้

– ฉีดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์นำค่า retention time ไปเปรียบเทียบกันกับ retention time ของ standard ที่ฉีดไว้แล้ว ถ้าค่า retention time เท่ากัน แสดงว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

4.5.2 การคำนวณเพื่อหาปริมาณของสารที่ตรวจพบมีอยู่ 2 วิธี คือ

– ใช้ Standard peak height ทำ

standard curve โดย plot ระหว่างความสูงของ peak (peak height) และจำนวน nanograme ของ standard solution ที่ฉีดเข้าไป วัด peak height ของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และนำไปหาค่าจำนวน nanograme จาก standard curve คำนวณปริมาณสารเป็น ppm, ppb หรือ ppt ต่อไป วิธีนี้ดีสำหรับ peak ที่เป็นรูปเข็ม

– ใช้พื้นที่ใต้ peak โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้ peak ของสารตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์กับพื้นที่ใต้ peak ของ standard solution วิธีหาพื้นที่ peak โดยลากเส้น approximate base line แล้วลากเส้นที่สัมผัสด้านทั้งสองของ peak ให้มากที่สุด ลากตัด base จากจุดตัดที่ฐานจะได้ความยาวฐานจากจุดตัดที่ยอด ลากตั้งฉากกับฐานก็จะได้ความสูงของ peak หาพื้นที่ของ peak ได้ วิธีนี้เหมาะสำหรับ peak มีความกว้างของฐาน

พื้นที่ของ peak = $\frac{1}{2}$ x สูง x ฐาน

สมมุติพื้นที่ของ standard DDT = A cm^2

พื้นที่ DDT ของ peak ตัวอย่าง = B cm^2

ฉีด standard เข้าไปทั้งหมด = C ng

ฉีด ตัวอย่างเข้าไป = D µl

ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างที่ฉีด (ที่ปรับไว้) = E ml

พื้นที่ standard A cm^2 = C ng

พื้นที่ตัวอย่าง B cm^2 = $\frac{C \times B}{A}$ ng

สารตัวอย่าง D µl มีเนื้อสาร = $\frac{C \times B}{A}$ ng

สารตัวอย่าง D ml มีเนื้อสาร = $\frac{C \times B}{A}$ µg

สารตัวอย่าง E ml มีเนื้อสาร = $\frac{C \times B}{A} \times \frac{E}{D}$ µg

ถ้า sample ที่นำมาตรวจวิเคราะห์ = F gm

ตัวอย่าง F gm มีเนื้อสาร $= \frac{C \times B}{A} \times \frac{E}{D}$ µg

ตัวอย่าง 1 gm มีเนื้อสาร $= \frac{C \times B}{A} \times \frac{E}{D} \times \frac{1}{F}$ µg

$$\text{ppm ที่ตรวจพบของตัวอย่าง} = \frac{\text{ng standard} \times \text{พื้นที่ของตัวอย่าง} \times \text{ml สุดท้ายของตัวอย่าง} \times 1}{\text{พื้นที่ของ standard} \times \text{µl ของตัวอย่างที่ฉีด} \times \text{น้ำหนักของตัวอย่าง}}$$

ถ้าน้ำที่นำมาตรวจวิเคราะห์ $= 800$ ml

เพราะฉะนั้นน้ำ 800 ml มีเนื้อสาร $= \frac{C \times B}{A} \times \frac{E}{D}$ µg

น้ำ 1000 ml $= \frac{C \times B}{A} \times \frac{E}{D} \times \frac{1000}{800}$ µg

$$\text{ppb ที่ตรวจพบของตัวอย่าง} = \frac{\text{ng standard} \times \text{พื้นที่ของตัวอย่าง}}{\text{พื้นที่ของ standard}} \times \frac{\text{ml ของตัวอย่าง}}{\text{µl ของตัวอย่างที่ฉีดเข้า}} \times \frac{10}{8}$$

4.5.3 การหาค่าเปอร์เซ็นต์ recovery

เนื่องจากการทดลองมีวิธีการที่ซับซ้อนมาก ทำให้สารที่ต้องการหาปริมาณสูญหายไปบางส่วน ฉะนั้นจำเป็นต้องหาเปอร์เซ็นต์ recovery เพื่อทราบปริมาณสารที่หายไป เราทำได้โดยเติม standard ที่ทราบปริมาณและความเข้มข้นแน่นอนลงไปใน sample แล้วหาว่าปริมาณ standard ที่เติมลงไปหายไปเท่าใด เมื่อเอา recovery factor ไปคูณกลับเข้ากับปริมาณสารที่ตรวจพบในตัวอย่าง ก็จะทราบปริมาณดั้งเดิมที่สารนั้นมีอยู่ในตัวอย่าง

เมื่อเติม standard ถ้าตัวอย่างมีพื้นที่ใต้ peak โดยเฉลี่ย = X cm^2

(ทำ 4 ครั้งเหมือน ๆ กัน)

ตัวอย่างที่เติม standard มีพื้นที่ = Y cm^2

standard ที่เติมลงไป = Z ng

ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างที่มี standard = ตัวอย่างที่ไม่เติม standard และจำนวน µl ที่ฉีดเข้าเครื่อง GLC ก็เท่ากัน

เพราะฉะนั้นพื้นที่ที่ได้จากการเติม standard = X - Y cm^2

จากข้อ 4.5.2 พื้นที่ standard A cm^2 มีเนื้อสาร = C ng

ดังนั้นพื้นที่ที่ได้จากการเติม standard X - Y cm^2 เนื้อสาร = $\frac{C \times (X - Y)}{A}$ ng

ฉีดตัวอย่างที่มี standard D µl มีเนื้อสาร = $\frac{C \times (X - Y)}{A}$ ng

ฉีดตัวอย่างที่มี standard E x 1000 µl มีเนื้อสาร = $\frac{C \times (X - Y)}{A} \times \frac{E}{D} \times 1000$ ng

ถ้าได้เนื้อสาร Z ng = 100 %

ถ้าได้ $\frac{C \times (X - Y)}{A} \times \frac{E}{D} \times 1000$ ng = $\frac{C \times (X-Y)}{A} \times \frac{E}{D} \times 1000 \times \frac{100\%}{Z}$

$$\%\text{recovery} = \frac{\text{ng standard}}{\text{พื้นที่ของ standard}} \times \frac{\text{พื้นที่ที่เพิ่มจากการเติม standard}}{\text{ml สุดท้ายของตัวอย่าง µl ที่ฉีดเข้า GLC}} \times \frac{1000 \times 100}{\text{ปริมาณ ng ของ standard ที่เติมลงไป}}$$

เพราะฉะนั้นจำนวนปริมาณสารในตัวอย่าง = ปริมาณสารที่ตรวจพบ $\times \frac{100}{\%\ \text{Recovery}}$

หมายเหตุ การเติม standard ต้องค่อย ๆ หยดยาอย่าให้โดนผิวแก้วที่ใส่ตัวอย่าง เปลี่ยนพื้นที่ผิวตัวอย่างที่หยดน้ำยาจนทั่ว เขย่าให้ทั่วกัน แล้วจึงสุ่มตัวอย่างมาทดลอง

4.6 การเปรอะเปื้อน (Contamination) ระหว่างการทดลอง

เนื่องจาก GLC เป็นเครื่องมือที่มีความไวสูง ดังนั้นจึงต้องระวัง contamination ที่เกิดขึ้นแม้แต่เพียงเล็กน้อย ดังนี้

4.6.1 น้ำกลั่น จะต้องเป็นน้ำกลั่นที่ไม่มีสารอินทรีย์เจือปนอยู่เลย ใช้น้ำกลั่นที่กลั่นซ้ำ 3 ครั้ง(tri-distilled water) หรือ อาจจะนำมากลั่นซ้ำใน all glass apparatus ที่ใช้ teflon lining กับ chromic acid

4.6.2 สารเคมี จะต้องเป็น Analytical reagent grade หรือ pesticide grade ถ้าเป็นของเหลวจะต้องกลั่นซ้ำใน All-glass Apparatus โดยทิ้ง 10% แรกของสารที่กลั่นได้และ 20% ที่เหลืออยู่ใน flask การกลั่นแต่ละครั้งจะต้องล้าง flask และใช้ boiling chip ใหม่ โดยเฉพาะสารเคมีที่ใช้ในขั้น clean up และใช้กับเครื่อง GLC จะต้องกลั่นซ้ำถึง 3 ครั้ง

ถ้าเป็น Acetonitrile เวลากลั่นใส่ $AgNO_3$ 3 กรัมต่อลิตรด้วย ใช้ $AgNO_3$ ใหม่ทุกครั้ง

เมื่อกลั่นแล้วควรจะทดสอบความบริสุทธิ์ (purity) ของตัวทำละลายที่ลดปริมาตรจาก 100 เป็น 1 ไม่ควรมี response peak height ที่เกิดจาก 0.01 ng ของ heptachlor epoxide หรือ peak ที่สามารถ detect ได้ของ organophosphorus pesticides หรือใช้วิธีทำ blank ดูก่อน

สารเคมีพวก Anhydrous Na_2SO_4 อบที่ 200 °ซ. ตลอดคืน ถ้า grade ไม่ดีนักก็อบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 650 °ซ. 7 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ที่เจือปน

Florisil 60/100 mesh ต้อง activate ก่อนใช้ โดยอบที่ 130 °ซ.ตลอดคืน ถ้า Florisil เกรดไม่ดีนัก อบในเตาที่ 300 – 600 °ซ. 8 ชั่วโมง เพื่อทำลายสารอินทรีย์ทั้ง Na_2SO_4 และ Florisil นี้ควรจะอบแล้วทิ้งให้เย็น ใช้ทันที

4.6.3 เครื่องมือต่าง ๆ plastic ไม่ควรใช้ ควรใช้ teflon เพราะว่า inert กว่า ถ้าเป็นเครื่องแก้วต้องล้างให้สะอาดทันทีหลังจากใช้โดยลำดับดังนี้ ชะด้วยน้ำหรือตัวทำละลายที่ใส่ครั้งสุดท้ายในภาชนะนั้น, น้ำสบู่, ล้างน้ำให้เกลี้ยงสบู่,ชะด้วยน้ำร้อน, น้ำกลั่น, acetone 2 ครั้ง และ hexane อบให้แห้งที่ 130 °ซ. นานครึ่งชั่วโมง หรือทิ้งไว้ให้แห้ง เก็บไว้อย่าให้ฝุ่นหรือสิ่งอื่น contaminate ได้ อาจใช้ foil ปิดปากภาชนะนั้นได้

4.6.4 มีสิ่งแปลกปลอมจาก Co-extraction ซึ่งกำจัดยาก เพียงแต่ clean up เพิ่มเติมให้มีน้อยที่สุด

4.7 ปัญหาเกี่ยวกับ GLC

เนื่องจาก GLC เป็นเครื่องมือที่ sensitive มาก ฉะนั้นความผิดพลาดเล็กน้อยก็ทำให้เกิดปัญหาได้ เช่นตัวอย่างปัญหาเกี่ยวกับ GLC

- Column ต้องเลือก column ที่จะให้ผลดีที่สุด ส่วน Packing column ชนิดและความเข้มข้นของสารที่เป็น stationary phase ความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางของ column มีผลต่อ peak และ retention time ทั้งสิ้น

- Carrier gas flow rate มีผลต่อ rentention time, base time อาจขยุกขยิกเวลา Nitrogen เหลือน้อย

- อุณหภูมิไม่คงที่มีผลทำให้ base line ขยับ,retention time เปลี่ยน, อุณหภูมิ ECD ต่ำก็ทำให้ peak ป่านได้, อุณหภูมิสูงเกินไปจน column ดำก็ต้องเปลี่ยน column ใหม่, อุณหภูมิของ oven, detector และ column ต้องสัมพันธ์กัน

อัตราการไหลของกาซตัวนำ ชนิดของ detector ต้องเลือกให้เหมาะสม

- การใช้ microsyringe ต้องสะอาดและไม่มีฟองอากาศ หาปริมาณที่ถูกต้องจริง ๆ ของสารละลายที่ฉีด inject สารอย่างรวดเร็ว และดึงเข็ม

ออกทันทีเมื่อสุดเข็ม การ inject และถอนเข็มต้องไม่ให้เข็มงอ

– ถ้า retention time ยืดออกควรจะ check ว่า Septum แน่นหรือไม่ ถ้า septum หลวม ก็ต้องเปลี่ยน septum ใหม่

– เมื่อฉีดตัวอย่างได้ประมาณ 7 – 8 ตัวอย่าง ควรจะฉีด standard ใหม่ เพื่อ check ค่า retention time อยู่เสมอ เหล่านี้ล้วนต้องอาศัยความชำนาญและเทคนิคในการแก้ปัญหาเพื่อจะได้ peak ที่ดีและถูกต้องที่สุด

4.8 การใช้สถิติในการคำนวณผล

4.8.1 ค่าปริมาณเฉลี่ยของสารแต่ละชนิด (Mean) โดยคำนวณจากสูตร

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

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารที่ตรวจพบ

X = ผลรวมของปริมาณสารทั้งหมด

N = จำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจทั้งหมด

4.8.2 ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Sample standard deviation) คำนวณจากสูตร

$$S.D. = \sqrt{\frac{N \sum X^2 - (\sum X)^2}{N(N-1)}} \quad \text{(Snedecor, 1967)}$$

$S.D.$ = ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาตร

X^2 = ผลรวมของปริมาณสารแต่ละตัวยกกำลังสอง

$(\sum X)^2$ = ผลรวมของปริมาณสารทั้งหมดยกกำลังสอง

N = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

4.8.3 <u>ทดสอบความแตกต่างของปริมาณสารใน 2 กลุ่มตัวอย่าง</u>
โดยใช้ t-test แบบแจงสองทาง [The distribution of t (Two-tailed test)]

4.8.3.1 หาค่า t จากสูตร

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\left(\frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}\right)\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \qquad \text{(Snedecor:1967)}$$

s^2 = $(S.D.)^2$

$\bar{X}_1$ = ปริมาณเฉลี่ยของสารกลุ่มที่ 1

$\bar{X}_2$ = ปริมาณเฉลี่ยของสารกลุ่มที่ 2

s_1^2 = ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารกลุ่มที่ 1 ยกกำลังสอง

s_2^2 = ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารกลุ่มที่ 2 ยกกำลังสอง

n_1 = จำนวนตัวอย่างในกลุ่มที่ 1

n_2 = จำนวนตัวอย่างในกลุ่มที่ 2

4.8.3.2 เปิดตาราง t ที่ degree of freedom $(n_1 + n_2 - 2)$ (Probability of a larger Value, Sign lgnored) ที่ P 0.100 (ระดับความเชื่อมั่น 90%) หรือ P = 0.050 (ระดับความเชื่อมั่น 95%)

4.8.3.3 ถ้าค่า t ที่คำนวณมากกว่าค่า t จากตารางที่ P ใด ๆ แสดงว่าเรามีความเชื่อมั่นที่ระดับนั้นว่า ปริมาณสารในตัวอย่างสองกลุ่มนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ถ้าค่า t ที่คำนวณน้อยกว่าค่า t จากตารางที่ P ใด ๆ แสดงว่าเรามีความเชื่อมั่นที่ระดับนั้นว่า ปริมาณสารในตัวอย่างสองกลุ่มนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.8.4 การหาความสัมพันธ์ของปริมาณ Total DDT และน้ำหนักปลา

4.8.4.1 สมการความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (Straight line equation)

$$Y = \bar{Y} + b(X - \bar{X})$$

a = ค่าของจุดตัดแกน (intercept)

b = ค่าความชันหรือสัมประสิทธิ์การถดถอย (slope, regression coefficient)

X = น้ำหนักของปลา

Y = ปริมาณ Total DDT ที่เปลี่ยนไปตามความยาวของปลา

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักปลา

$\bar{Y}$ = ค่าเฉลี่ยของปริมาณ Total DDT

b หาได้จากสูตร

$$b = \frac{\Sigma xy}{\Sigma x^2}$$

โดยที่ $\Sigma xy = \Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y/N$

$\Sigma x^2 = \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2/N$

$\Sigma y^2 = \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2/N$

I15049619

4.8.4.2 <u>สมการความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง</u>
(Exponential regression) เป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่าง น้ำหนัก และความยาวมาตรฐานของปลา ซึ่งมีสมการเป็น

$$Y = a X^b$$

Y = น้ำหนักปลา

X = ความยาวมาตรฐานของปลา

a, b = เป็นค่าคงที่

สมการนี้เขียนในกระดาษธรรมดาจะได้สมการเส้นโค้ง ซึ่งสามารถแปลงเป็นสมการเส้นตรงโดย logarithmic transformation

$$\ln Y = \ln a + b \ln X$$

ซึ่ง plot ในกระดาษ log - log

$$Y = \bar{Y} + b (X - \bar{X})$$

$$a = \bar{Y} - b \bar{X}$$

$$\ln a = \ln\bar{Y} - b \ln\bar{X}$$

b หาได้จากสูตรใน 4.8.4.1 เช่นเดียวกัน

โดยที่ $\sum xy = \sum \ln X \ln Y - \sum \ln X \sum \ln Y/N$

$$\sum x^2 = \sum (\ln X^2) - (\sum \ln X)^2$$

$$\sum y^2 = \sum (\ln Y^2) - (\sum \ln Y)^2/N$$

หาค่า r เช่นเดียวกับ 4.8.4.3

4.8.4.3 <u>การทดสอบความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่าง Y และ X</u> (method for testing linear relationship between variable Y and X)

จะต้อง ก. ทดสอบนัยสำคัญของค่า b (test of significance of b)

ข. หาค่าสหพันธ์ (Correlation coefficient)

– ทดสอบนัยสำคัญของค่า b เพื่อตัดสินว่าเราจะเชื่อถือสมการที่หาได้แค่ไหน โดยหา - t จากสูตร $t = b/S_b$

- t จากตารางเมื่อขั้นความอิสระ (degree of freedom) = n - 2

ถ้าค่า t จากสูตรมากกว่า t จากตารางที่ P ใด ๆ เราก็เชื่อได้ที่ระดับความเชื่อมั่นนั้น ๆ ว่า สมการนี้เชื่อถือได้ ถ้า t จากสูตรน้อยกว่าจากตารางก็แสดงว่าสมการนี้เชื่อถือไม่ได้

S_b = ความเบี่ยงเบนมาตรฐานจากสัมประสิทธิ์ความถดถอย (samle standard deviation from regression coefficient)

$$S_b = S_{y.x} \Big/ \sqrt{\Sigma x^2}$$

$S_{y.x}$ = ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของความเบี่ยงเบน

$$S_{y.x} = \sqrt{S_{y.x}^2}$$

$\sqrt{S_{y.x}^2}$ = รากที่สองความเบี่ยงเบนกำลังสองจากความถดถอย (Mean square deviation from regression)

$$S_{y.x}^2 = \sum d_{y.x}^2 / n-2$$

$\sum d_{y.x}^2$ = ผลบวกของรากที่สองของความเบี่ยงเบน (sum of square of deviation)

$$\sum d_{y.x}^2 = \sum (Y - \bar{Y})^2$$

$$= \sum Y^2 - (\sum XY^2) / \sum X^2$$

เพราะฉะนั้นแทนค่าใน Sb, Sb

$$= \sqrt{\frac{[\sum Y^2 - \sum (XY)^2 / \sum X^2] / N - 2}{\sum X^2}}$$

- การหาค่าสหพันธ์ เพื่อดูว่าสมการนี้เป็นเส้นตรงเพียงไร ถ้า r = 1 สมการเป็นเส้นตรงที่สุด r หาได้จากสูตร

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}}$$

$$\sum xy = \sum XY - \sum X \sum Y / N$$

$$\sum x^2 = \sum X^2 - (\sum X)^2 / N$$

$$\sum y^2 = \sum Y^2 - (\sum Y)^2 / N$$

ถ้า r ได้ออกมาจะไม่เกิน $\pm$ 1 ข้อมูลสองชุดจะมีความสัมพันธ์กันมากเมื่อ r เข้าใกล้ $\pm$ 1 และจะไม่มีความสัมพันธ์กันเลยเมื่อ r = 0