

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องคาปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis System) รุ่น G 1600A ของ Hewlett - Packard
2. คอลัมน์สำหรับเครื่องคาปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นคาปิลลารีชนิดฟิวส์ซิลิกา ความยาวของคาปิลลารี 68.0 เซนติเมตร ความยาวของคาปิลลารีที่ใช้ในการแยก 59.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ของ Polymicro Technologies
3. เครื่องดูดสูญญากาศ (vacuum pump) ของ Benton harbor
4. คอลัมน์แก้ว เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.8 เซนติเมตร ยาว 10.0 เซนติเมตร
5. เข็มฉีดยาตัวอย่าง (microsyringe) ขนาด 100 และ 250 ไมโครลิตร ของ Hamilton
6. ตู้อบ (oven) ของ Gallen kamp
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 4 ตำแหน่งของ Mettler
8. เครื่อง Ultrasonic bath ของ Crest รุ่น 275 D
9. pH meter ของ Beckman
10. syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ของ Hewlett - Packard
11. ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ (ขวดแก้วสี่ขาฝาเกลียว)
12. ตะแกรงร่อนขนาด 0.25 มิลลิเมตร ของ Nalgene
13. กระดาษกรองเบอร์ 1 ของ Whatman

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide ; NaOH) AR grade ของ Merck
2. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. hydrochloric acid ; HCl) AR grade ของ Merck
3. เมทานอล (methanol ; CH₃OH) AR grade ของ Merck
4. อะซิโตนไนไตร์ (acetonitrile ; CH₃CN) AR grade ของ BDH

5. ไดโซเดียมเตตระโบเรตเดคาไฮเดรต (di-sodium tetraborate decahydrate; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) AR grade ของ Merck
6. เพนตะคลอโรฟีนอล (pentachlorophenol) ความเข้มข้น 500 ppm 98.9% ของ Sulpelco
7. ฟีนอล (phenol) ความเข้มข้น 500 ppm 99.0% ของ sulpelco
8. 2-เมทิล-4,6-ไดไนโตรฟีนอล (2-methyl-4,6-dinitrophenol) ความเข้มข้น 500 ppm 99.0% ของ Sulpelco
9. 2-ไนโตรฟีนอล (2-nitrophenol) ความเข้มข้น 500 ppm 99.0% ของ Sulpelco
10. 2,4-ไดคลอโรฟีนอล (2,4-dichlorophenol) ความเข้มข้น 500 ppm 99.0% ของ Sulpelco
11. 2,4-ไดเมทิลฟีนอล (2,4-dimethylphenol) ความเข้มข้น 500 ppm 98.0% ของ Sulpelco
12. 2,4-ไดไนโตรฟีนอล (2,4-dinitrophenol) ความเข้มข้น 500 ppm 99.0% ของ Sulpelco
13. 2,4,6-ไตรคลอโรฟีนอล (2,4,6-trichlorophenol) ความเข้มข้น 500 ppm 99.0% ของ Sulpelco
14. 4-คลอโร-3-เมทิลฟีนอล (4-chloro-3-methylphenol) ความเข้มข้น 500 ppm 99.0% ของ sulpelco
15. 4-ไนโตรฟีนอล (4-nitrophenol) ความเข้มข้น 500 ppm 99.0% ของ Sulpelco
16. เรซิน Amberlite XAD-4 (Polystyrene divinylbenzene) ของ Sulpelco
17. ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของสารละลายผสมกลุ่มฟีนอลของ Sulpelco

ดังตาราง 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของสารละลายผสมกลุ่มฟีนอล

| สาร | ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ความบริสุทธิ์ (%) |
|----------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Phenol | 501.0 | 99.0 |
| 4-chloro-3-methylphenol | 2501.0 | 99.0 |
| Pentachlorophenol | 2500.0 | 97.0 |
| 2,4,6-trichlorophenol | 1501.0 | 99.0 |
| 2,4-dichlorophenol | 500.5 | 99.0 |
| 2-methyl-4,6-dinitrophenol | 2501.0 | 99.0 |
| 2-chlorophenol | 499.0 | 99.0 |
| 2,4-dinitrophenol | 1501.0 | 99.0 |
| 4-nitrophenol | 2500.0 | 99.0 |
| 2-nitrophenol | 499.5 | 99.0 |

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมบอแรกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายโซเดียมบอแรก 1.9063 กรัม ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่น ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมบอแรกความเข้มข้น 15 มิลลิโมลต่อลิตร pH 9.4, 9.6, 9.8 และ 10.0 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโซเดียมบอแรกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 4 ใบ เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์แต่ละใบ ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ให้ได้ pH 9.4, 9.6, 9.8 และ 10.0 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

1.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมบอแรกความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิโมลต่อลิตร pH 9.6 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโซเดียมบอแรกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 2.50, 5.00, 7.50, 10.00 และ 12.50 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาด 25

163882

๐
 549.612
 ๐ ๓๕๖๗
 ๐

มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์แต่ละใบ ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ให้ได้ pH 9.6 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

1.4 การเตรียมสารละลายโซเดียมบอเรตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลต่อลิตร ที่มี 10% และ 30% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เมธานอล pH 9.6 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโซเดียมบอเรตความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ และเติมเมธานอลปริมาตร 2.50 และ 7.50 มิลลิลิตร ตามลำดับลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ให้ได้ pH 9.6 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

1.5 การเตรียมสารละลายโซเดียมบอเรตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลต่อลิตร ที่มี 10% และ 30% (ปริมาตรต่อปริมาตร) อะซิโตนไนไตร์ pH 9.6 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโซเดียมบอเรตความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ และเติมอะซิโตนไนไตร์ปริมาตร 2.50 และ 7.50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ให้ได้ pH 9.6 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

1.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอล 3 ความเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นกลุ่มฟีนอลช่วง 49.90 - 250.10, 24.95 - 125.05 และ 19.96 - 100.04 (ความเข้มข้นของฟีนอลแต่ละตัวดูตาราง 2 แถว A B C) มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลสต็อกช่วงความเข้มข้น 499.50 - 2500.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.50, 0.25 และ 0.20 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรสารละลายด้วยเมธานอลให้ถึงขีดวัดปริมาตร

1.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอล 3 ความเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นกลุ่มฟีนอลช่วง 4.90 - 25.01, 3.99 - 20.01 และ 2.99 - 15.0 (ความเข้มข้นของฟีนอลแต่ละตัวดูตาราง 2 แถว D E F) มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลช่วงความเข้มข้น 19.96 - 100.04 (ดูตาราง 2 แถว C) มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.25, 1.00 และ 0.75 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรสารละลายด้วยเมธานอลให้ถึงขีดวัดปริมาตร

1.14 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอล ช่วงความเข้มข้น 0.50 – 2.50 (ความเข้มข้นของฟีนอลแต่ละตัวคูตาราง 2 แถว M) มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลช่วงความเข้มข้น 1.00 – 5.00 (คูตาราง 2 แถว K) มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรสารละลายด้วยเมธานอลให้ถึงขีดวัดปริมาตร

1.15 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอล ช่วงความเข้มข้น 0.25 – 1.25 (ความเข้มข้นของฟีนอลแต่ละตัวคูตาราง 2 แถว N) มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลช่วงความเข้มข้น 0.50 – 2.50 (คูตาราง 2 แถว M) มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรสารละลายด้วยเมธานอลให้ถึงขีดวัดปริมาตร

1.16 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอล ช่วงความเข้มข้น 0.10 – 0.50 (ความเข้มข้นของฟีนอลแต่ละตัวคูตาราง 2 แถว O) มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลช่วงความเข้มข้น 0.50 – 2.50 (คูตาราง 2 แถว M) มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรสารละลายด้วยเมธานอลให้ถึงขีดวัดปริมาตร

1.17 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอล ช่วงความเข้มข้น 1.00 - 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นของฟีนอลแต่ละตัวคูตาราง 3 แถว A) ที่ประกอบไปด้วยบัพเฟอร์โซเดียมบอเรตความเข้มข้น 2 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลช่วงความเข้มข้น 2.00 – 10.00 (คูตาราง 2 แถว H) มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยสารละลายบัพเฟอร์โซเดียมบอเรตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดวัดปริมาตร

1.18 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอล ช่วงความเข้มข้น 0.15 – 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นของฟีนอลแต่ละตัวคูตาราง 3 แถว B) pH 2.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลช่วงความเข้มข้น 49.90 – 250.10 มิลลิกรัมต่อลิตร (คูตาราง 2 แถว A) ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำที่มี pH 2.0 และ 5.0 ให้ถึงขีดวัดปริมาตร

1.19 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอล ช่วงความเข้มข้น 0.10–0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นของฟีนอลแต่ละตัวดูตาราง 3 แถว C) pH 2.0 และ 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลช่วงความเข้มข้น 49.90 – 250.10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดูตาราง 2 แถว A) ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำที่มี pH 2.0 และ 5.0 ตามลำดับให้ถึงขีดวัดปริมาตร

1.20 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอล ช่วงความเข้มข้น 0.05–0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้นของฟีนอลแต่ละตัวดูตาราง 3 แถว D) pH 2.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลช่วงความเข้มข้น 49.90 – 250.10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดูตาราง 2 แถว A) ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำที่มี pH 2.0 ให้ถึงขีดวัดปริมาตร

ก่อนการวิเคราะห์ นำสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรตไปกำจัดอากาศโดยใช้ ultrasonic bath เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายผ่านเยื่อกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ลงใน vial แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องคาปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายที่ป้อนแต่ละตัวในเมทริกซ์ที่วางความเข้มข้นต่าง ๆ

| ช่วงความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | Phenol | 4-chloro-3-methylphenol | Pentachlorophenol | 2,4,6-trichlorophenol | 2,4-dichlorophenol | 2-methyl-4,6-dinitrophenol | 2-chlorophenol | 2,4-dinitrophenol | 4-nitrophenol | 2-nitrophenol |
|---------------------------------------|--------|-------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|----------------|-------------------|---------------|---------------|
| A 49.90 - 250.10 | 50.15 | 250.10 | 250.00 | 150.10 | 50.05 | 250.10 | 49.90 | 150.10 | 250.00 | 49.95 |
| B 24.95 - 125.05 | 25.08 | 125.05 | 125.00 | 75.05 | 25.03 | 125.05 | 24.95 | 75.05 | 125.00 | 24.98 |
| C 19.96 - 100.04 | 20.06 | 100.04 | 100 | 60.04 | 20.02 | 100.04 | 19.96 | 60.04 | 100.00 | 19.98 |
| D 4.99 - 25.01 | 5.02 | 25.01 | 25.00 | 15.01 | 5.01 | 25.01 | 4.99 | 15.01 | 25.00 | 5.00 |
| E 3.99 - 20.01 | 4.01 | 20.01 | 20.00 | 12.01 | 4.00 | 20.01 | 3.99 | 12.01 | 20.00 | 4.00 |
| F 2.99 - 15.01 | 3.01 | 15.01 | 15.00 | 9.01 | 3.00 | 15.01 | 2.99 | 9.01 | 15.00 | 3.00 |
| G 2.50 - 12.51 | 2.51 | 12.51 | 12.50 | 7.51 | 2.50 | 12.51 | 2.50 | 7.51 | 12.50 | 2.50 |
| H 2.00 - 10.00 | 2.01 | 10.00 | 10.00 | 6.00 | 2.00 | 10.00 | 2.00 | 6.00 | 10.00 | 2.00 |
| I 1.50 - 7.50 | 1.50 | 7.50 | 7.50 | 4.50 | 1.50 | 7.50 | 1.50 | 4.50 | 7.50 | 1.50 |
| J 1.25 - 6.25 | 1.25 | 6.25 | 6.25 | 3.75 | 1.25 | 6.25 | 1.25 | 3.75 | 6.25 | 1.25 |
| K 1.00 - 5.00 | 1.00 | 5.00 | 5.00 | 3.00 | 1.00 | 5.00 | 1.00 | 3.00 | 5.00 | 1.00 |
| L 0.75 - 3.75 | 0.75 | 3.75 | 3.75 | 2.25 | 0.75 | 3.75 | 0.75 | 2.25 | 3.75 | 0.75 |
| M 0.50 - 2.50 | 0.50 | 2.50 | 2.50 | 1.50 | 0.50 | 2.50 | 0.50 | 1.50 | 2.50 | 0.50 |
| N 0.25 - 1.25 | 0.25 | 1.25 | 1.25 | 0.75 | 0.25 | 1.25 | 0.25 | 0.75 | 1.25 | 0.25 |
| O 0.10 - 0.50 | 0.10 | 0.50 | 0.50 | 0.30 | 0.10 | 0.50 | 0.10 | 0.30 | 0.50 | 0.10 |

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของสารละลายที่ออกแต่ละตัวในน้ำที่ช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ

| ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | Phenol | 4-chloro-3-methylphenol | Pentachlorophenol | 2,4,6-trichlorophenol | 2,4-dichlorophenol | 2-methyl-4,6-dinitrophenol | 2-chlorophenol | 2,4-dinitrophenol | 4-nitrophenol | 2-nitrophenol |
|-----------------------------------|--------|-------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|----------------|-------------------|---------------|---------------|
| A 1.00 - 5.00 | 1.00 | 5.00 | 5.00 | 3.00 | 1.00 | 5.00 | 1.00 | 3.00 | 5.00 | 1.00 |
| B 0.15 - 0.75 | 0.15 | 0.75 | 0.75 | 0.45 | 0.15 | 0.75 | 0.15 | 0.45 | 0.75 | 0.15 |
| C 0.10 - 0.50 | 0.10 | 0.50 | 0.50 | 0.30 | 0.10 | 0.50 | 0.10 | 0.30 | 0.50 | 0.10 |
| D 0.05 - 0.25 | 0.05 | 0.25 | 0.25 | 0.15 | 0.50 | 0.25 | 0.50 | 0.15 | 0.25 | 0.05 |

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ โดยเทคนิคคาปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส สภาวะเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง

| | | |
|---------------------------------------|------|------------------------|
| ความยาวของคาปิลลารี | 68.0 | เซนติเมตร |
| ความยาวของคาปิลลารีที่ใช้ในการแยก | 59.5 | เซนติเมตร |
| เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน | 75 | ไมโครเมตร |
| นำสารตัวอย่างเข้าคาปิลลารีด้วยความดัน | 50 | มิลลิบาร์ นาน 1 วินาที |
| อุณหภูมิ | 25 | องศาเซลเซียส |
| ศักย์ไฟฟ้า | 15 | กิโลโวลต์ |
| ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น | 200 | นาโนเมตร |
| ความกว้างของช่องแสง | 20 | นาโนเมตร |

ก่อนการนำสารตัวอย่างเข้าคาปิลลารีในแต่ละครั้ง มีการปรับสภาพผิวด้านในของคาปิลลารีโดยการผ่านสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร 2 นาที น้ำ 2 นาทีและสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรต 2 นาที ตามลำดับ

การวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสม ดูจากค่าไมเกรชันไทม์ (migration time) และค่าการแยก (resolution)

ตัวแปรที่ทำการศึกษาได้แก่

2.1 ศึกษาอิทธิพลของ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรต

ศึกษาอิทธิพลของ pH ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรตความเข้มข้น 15 มิลลิโมลต่อลิตร ที่ pH ต่าง ๆ คือ 9.4, 9.6, 9.8 และ 10.0 นำไปวิเคราะห์สารผสมของฟีนอลความเข้มข้นช่วง 24.95 - 125.05 (ดูตาราง 2 แถว B) มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรต

ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรตโดยเลือกใช้ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรตที่ได้จากการผลการทดลอง ข้อ 2.1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิโมลต่อลิตร นำไปวิเคราะห์สารผสมของฟีนอลความเข้มข้นช่วง 24.95 - 125.05 (ดูตาราง 2 แถว B) มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิของคาปิลลารีที่ใช้ในการแยก

ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้ในแยก โดยเลือกใช้ pH และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรตที่ได้จากการผลการทดลอง ข้อ 2.1 และ 2.2 ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์สารผสมของฟีนอลความเข้มข้นช่วง 24.95 - 125.05 (ดูตาราง 2 แถว B) มิลลิกรัมต่อลิตร

2.4 ศึกษาอิทธิพลของเวลาในการนำสารตัวอย่างเข้าคาน้ำปัสสาวะ

ศึกษาอิทธิพลของเวลาในการนำสารตัวอย่างเข้าคาน้ำปัสสาวะ โดยเลือกใช้ pH และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรตและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกที่ได้จากการผลการทดลองข้อ 2.1, 2.2 และ 2.3 ที่เวลาต่าง ๆ คือ 5, 10 และ 15 วินาที นำไปวิเคราะห์สารผสมของฟีนอลความเข้มข้นช่วง 1.00 - 5.00 (คูตาราง 2 แถว K) มิลลิกรัมต่อลิตร

2.5 ศึกษาการเพิ่มสภาพไว

ศึกษาการเพิ่มสภาพไวโดยการใช้เทคนิค stacking โดยเลือกใช้ pH และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรตและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกที่ได้จากการผลการทดลอง ข้อ 2.1, 2.2 และ 2.3 นำสารตัวอย่างเข้าคาน้ำปัสสาวะที่เวลาต่าง ๆ คือ 5, 10, 15 และ 20 วินาที นำไปวิเคราะห์สารผสมของฟีนอลความเข้มข้นช่วง 1.00 - 5.00 (คูตาราง 3 แถว A) มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรต 2 มิลลิโมลต่อลิตร

2.6 ศึกษาองค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรตในสารละลายเมธานอลและอะซิโตนไคร้

ศึกษาเปอร์เซ็นต์ของเมธานอลและอะซิโตนไคร้ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรต โดยเลือกใช้ pH และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมบอเรต, อุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกและเวลาในการนำสารตัวอย่างเข้าคาน้ำปัสสาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการผลการทดลองข้อ 2.1, 2.2, 2.3 และ 2.4 เปอร์เซ็นต์ที่ทำการศึกษาได้แก่ 10% และ 30% นำไปวิเคราะห์สารผสมของฟีนอลความเข้มข้นช่วง 1.00 - 5.00 (คูตาราง 2 แถว K) มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การหาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (method validation)

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2

3.1 การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection) ของสารกลุ่มฟีนอล หาความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวัด โดยความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (S/N = 3) (AOAC International, 1993) โดยใช้ค่าความสูงพีค

3.2 การหาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation) ของสารกลุ่มฟีนอล

หาความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 6 เท่าของสัญญาณรบกวน (S/N = 6) (AOAC International, 1993) โดยใช้ค่าความสูงพีค

3.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสารกลุ่มฟีนอล

โดยการนำสารมาตรฐานผสมฟีนอลที่รู้ปริมาณแน่นอนหลาย ๆ ความเข้มข้นมาวิเคราะห์ จากนั้นวัดขนาดของพีคแต่ละอันโดยการวัดขนาดของพื้นที่พีค แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานโดยการพลอตระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่พีค

3.4 การหาช่วงการเป็นเส้นตรง (linearity) ของสารกลุ่มฟีนอล

หาช่วงความเข้มข้นของสารที่ทำให้ความสัมพันธ์ของกราฟเป็นเส้นตรงโดยทำการพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟีนอลกับพื้นที่พีค

3.5 การหาความเที่ยง (precision) ของสารกลุ่มฟีนอล

เป็นการหาความเที่ยงของเครื่องคาลิเบรารีอิเล็กโทรโพรสิสที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยหาค่าความเที่ยงของไมเกรชันไทม์ พื้นที่พีคและความสูงพีค โดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD)

3.6 การหาความแม่นยำ (accuracy) ของสารกลุ่มฟีนอล

เป็นการศึกษาความแม่นยำของการนำสารตัวอย่างเข้าคาลิเบรารีของเครื่องคาลิเบรารีอิเล็กโทรโพรสิสที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยเตรียมสารละลายผสมฟีนอลที่รู้ปริมาณความเข้มข้น แล้วนำไปวิเคราะห์โดยคำนวณหาความเข้มข้นที่เครื่องตรวจวัดได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานว่ามีความเบี่ยงเบนไปจากค่าจริงเท่าไร แล้วรายงานผลเป็นร้อยละความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (% relative error)

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างน้ำโดย solid-phase extraction (SPE)

4.1 ศึกษา pH ของสารละลายตัวอย่าง โดยทำการศึกษาที่ pH 2.0 และ 5.0

4.1.1 เตรียมเรซิน Amberite XAD-4 (polystyrene divinylbenzene) ขนาดเล็กกว่า 0.25 มิลลิเมตร บดเรซินให้ละเอียดแล้วนำไปผ่านตะแกรงร่อนที่มีขนาด 0.25 มิลลิเมตร

4.1.2 เตรียมคอลัมน์และบรรจุเรซินในคอลัมน์ นำคอลัมน์แก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.8 เซนติเมตร ความยาว 10.0 เซนติเมตร ที่ส่วนล่างใส่สำลีเล็กน้อย ซึ่งเรซินที่ได้จากข้อ 4.1.1 จำนวน 0.40 กรัม ใส่ลงในคอลัมน์แก้วแล้วใช้สำลีใส่ส่วนบนของคอลัมน์ จากนั้นผ่านเมธานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร และตามด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใช้ปั๊ม

4.1.3 ผ่านสารละลายผสมฟีนอลจากข้อ 1.19 ความเข้มข้นช่วง 0.10 – 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดูตาราง 3 แถว C) pH 2.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ โดยใช้ปั๊ม

4.1.4 หลังจากสารละลายผสมฟีนอลผ่านเรซินหมดแล้ว นำขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ไปวางรอที่ส่วนล่างของคอลัมน์

4.1.5 ทำการชะสารในคอลัมน์ด้วยเมธานอล เก็บปริมาตรของสารละลายจนปริมาตรของสารละลายถึงขีดวัดปริมาตร แล้วนำขวดวัดปริมาตรที่ใส่สารละลายออกจากคอลัมน์เขย่าให้เข้ากัน

4.1.6 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4.1.5 ไปวิเคราะห์หาร้อยละการกลับคืน (% recovery) โดยใช้ค่าพื้นที่ที่พิกเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยเครื่องคาปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส ภายใต้สภาวะที่ได้จากข้อ 2

4.1.7 ผ่านสารละลายผสมฟีนอลจากข้อ 1.19 ความเข้มข้นช่วง 0.10–0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดูตาราง 3 แถว C) pH 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ แล้วดำเนินการเหมือนข้อ 4.1.4–4.1.6

4.2 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการชะ เลือก pH ของสารละลายที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 ตัวทำละลายที่ศึกษาได้แก่เมธานอลและอะซิโตนไนไตร์ ปริมาตรอย่างละ 5 มิลลิลิตร

4.1.1 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อที่ 4.1.1-4.1.2

4.2.2 ผ่านสารละลายผสมฟีนอลจากข้อ 1.19 ความเข้มข้นช่วง 0.10–0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดูตาราง 3 แถว C) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้ปัม

4.2.3 หลังจากสารละลายผสมฟีนอลผ่านเรซินหมดแล้ว ใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ไปวางรอที่ส่วนล่างของคอลัมน์

4.2.4 ทำการชะสารในคอลัมน์ด้วยเมธานอล เก็บปริมาตรของสารละลายจนปริมาตรของสารละลายถึงขีดวัดปริมาตร แล้วนำขวดวัดปริมาตรที่ใส่สารละลายออกจากคอลัมน์เขย่าให้เข้ากัน

4.2.5 ดำเนินการเหมือนข้อ 4.2.1 – 4.2.4 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายอินทรีย์ในการชะ จากเมธานอลเป็นอะซิโตนไนไตร์แทน

4.2.6 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4.2.4 และ 4.2.5 ไปวิเคราะห์หาร้อยละการกลับคืนโดยใช้ค่าพื้นที่ที่พิกเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยเครื่องคาปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส ภายใต้สภาวะที่ได้จากข้อ 2

เมื่อวิเคราะห์แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการชะ โดยอาศัยการกระจายข้อมูลแบบ F-test และ T-test

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลในตัวอย่างน้ำ

5.1 การรักษาตัวอย่างน้ำ เก็บตัวอย่างน้ำใส่ขวดแก้วสีชาฟอสฟอรัสใน
ถังน้ำแข็ง แล้วนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ กรองน้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้ว
แช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ภายใน 7 วัน หลังจากเก็บ
(American Public Health Association, 1995)

5.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำโดยวิธี solid-phase extraction

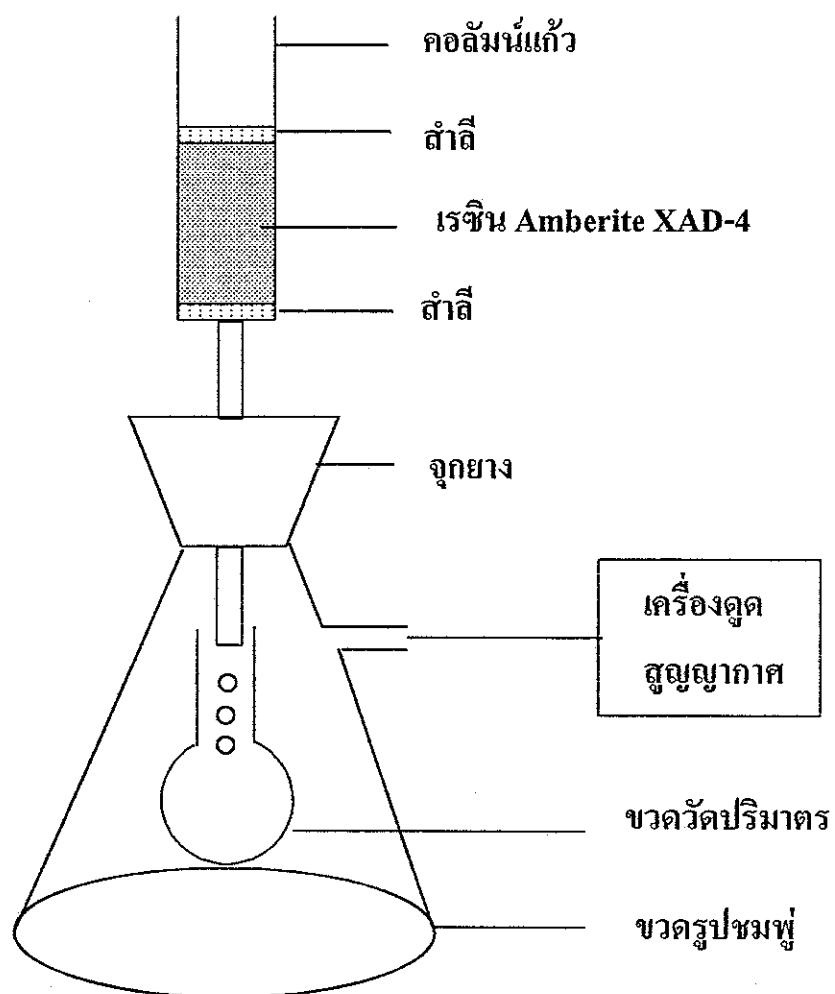
5.2.1 ตัวอย่างน้ำจากโรงกลั่นน้ำมันและโรงงานกระดาษ ตวงน้ำปริมาตร
500 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ ตามลำดับ ปรับ pH ด้วยกรด
ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ให้ได้ pH 2.0

5.2.2 ตัวอย่างน้ำจากข้อ 5.2.1 ไปผ่านคอลัมน์ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1.2
แล้วดำเนินการตามข้อ 4.2.3 และตามด้วยข้อ 4.2.5

5.2.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 5.2.2 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องคาปิลลารี
อิเล็กโทรโฟรีซิส ภายใต้สภาวะการทดลองที่ได้จากข้อ 2

5.2.4 ตัวอย่างน้ำจากโรงงานผลิตกระดาษ ตวงน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร
ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร
ให้ได้ pH 2.0 แล้วดำเนินการเหมือนข้อ 5.2.2 – 5.2.3

5.2.5 ตัวอย่างน้ำจากฟาร์มไก่ ตวงน้ำปริมาตร 400 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์
ขนาด 600 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ให้ได้ pH
2.0 แล้วดำเนินการเหมือนข้อ 5.2.2 – 5.2.3



ภาพที่ 7 เครื่องมือการสกัดแบบ solid-phase extraction

การคำนวณ

1. ค่าการแยก (Skoog, West, & Holler, 1991)

$$R_s = \frac{2[(t_m)_2 - (t_m)_1]}{W_2 + W_1} \quad (9)$$

เมื่อ

R_s คือ ค่าการแยก

$(t_m)_2$ คือ ไมเกรชันใหม่ของพีคที่ 2 (นาที)

$(t_m)_1$ คือ ไมเกรชันใหม่ของพีคที่ 1 (นาที)

W_2 คือ ความกว้างของฐานพีคที่ 2 (นาที)

W_1 คือ ความกว้างของฐานพีคที่ 1 (นาที)

2. % การกลับคืน (% Recovery)

$$\% \text{ การกลับคืน} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นที่เตรียม}} \times 100 \quad (10)$$

3. F-test (Zar, 1984)

$$F = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad (11)$$

เมื่อ

S_1 คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของวิธีที่ 1

S_2 คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของวิธีที่ 2

4. t-test (Zar, 1984)

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (12)$$

เมื่อ

 X_1 คือ ค่าเฉลี่ยของวิธีที่ 1 X_2 คือ ค่าเฉลี่ยของวิธีที่ 2 S_1 คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของวิธีที่ 1 S_2 คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของวิธีที่ 2 n_1 คือ จำนวนตัวอย่างของวิธีที่ 1 n_2 คือ จำนวนตัวอย่างของวิธีที่ 2

5. ร้อยละความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (% Relative error)

$$E_r = \frac{X_i - X_t}{X_t} \times 100 \quad (13)$$

เมื่อ

 E_r คือ ร้อยละความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ X_i คือ ค่าจริง X_t คือ ค่าที่วิเคราะห์ได้

6. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative standard deviation)

$$\% RSD = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100 \quad (14)$$

เมื่อ

 σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน \bar{X} คือ ค่าเฉลี่ย