

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง

1. ขวดพลาสติก
2. ถังพลาสติก

อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

1. คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ยาว 16.0 เซนติเมตร
2. คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตร ยาว 20.0 เซนติเมตร
3. เข็มฉีดยา (Microsyringe) ขนาด 100 และ 250 ไมโครลิตร ของ Hewlett-Packard
4. เข็มฉีดยา (Syringe) ขนาด 2 มิลลิตร ของ Tops
5. เครื่องเซนตริฟิวจ์ของ Sorvall TC6
6. กระดาษลิตมัส พีเอช 0.5-5 ของ Merck
7. กระดาษกรองเบอร์ 1 ของ Whatman
8. เครื่องปั่น (Blender) ของ Waring
9. แท่งแม่เหล็กคน (Stirrer Magnet) ของ BDH
10. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 4 ตำแหน่ง ของ Mettler Toledo
11. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 5 ตำแหน่ง ของ Mettler AT261
12. เครื่องระเหยสุญญากาศชนิดหมุน (Rotary Evaporator) ของ Buchi รุ่น RE111
13. เครื่องทำความเย็น (Cooling Bath) ของ DT Hetotherm
14. Ultrasonic Bath ของ Crest รุ่น 275 D ที่ความถี่ 50/60 เฮิรตซ์
15. ตู้อบ (Oven) ของ Gallenkamp
16. เตาความร้อนชนิดปรับอุณหภูมิได้ (Hot Plate) Model 21/1
17. เตาเผา (Muffle Furnace) ของ Carbolite รุ่น RHF120

สารเคมี

1. แก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ 99.99%
2. แก๊สฮีเลียมบริสุทธิ์สูง 99.999%
3. น้ำดีไอออไนซ์ (Deionized Water) ความต้านทาน 18.3 เมกะโอมห์
4. เพนทิลแมกนีเซียมโบรไมด์ ($C_5H_{11}MgBr$) ใน ไดเอทิลอีเธอร์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์

ของ Aldrich

5. เอ็น-เฮกเซน (C_6H_{14}) AR Grade ของ BDH
6. เฮกเซน (C_6H_{14}) AR Grade ของ J.T Baker
7. เพนเทน (C_5H_{12}) AR Grade ของ J.T Baker
8. เมทานอล (CH_3OH) AR Grade ของ Fisher Scientific
9. ไดเอทิลอีเธอร์ ($C_4H_{10}O$) AR Grade ของ J.T Baker
10. ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) AR Grade ของ Fisher Scientific
11. กรดไนตริก (HNO_3) 65% ของ Merck
12. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 37% ของ Merck
13. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) 95-97% ของ Merck
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) AR Grade ของ Ajax Chemicals
15. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) AR Grade ของ Ajax Chemicals
16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) AR Grade ของ Ajax Chemicals
17. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) Organic Trace Analysis Grade ของ Merck
18. อะลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3) ขนาด 0.050-0.150 มิลลิเมตร ของ Fluka
19. ซิลิกาเจล (SiO_2) ขนาด 0.063-0.200 มิลลิเมตร ของ Merck
20. ไทรโพลน (Tropolone) 99% ของ Sigma
21. ไตรโพรพิลทินคลอไรด์ (Tripropyltin Chloride) 98% ของ Merck
22. บิวทิลทินไตรคลอไรด์ (Butyltin Trichloride) 95% ของ Aldrich
23. ไดบิวทิลทินไดคลอไรด์ (Dibutyltin Dichloride) 98% ของ Merck
24. ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ (Tributyltin Chloride) 96% ของ Aldrich
25. ฟีนิลทินไตรคลอไรด์ (Phenyltin Trichloride) 98% ของ Aldrich
26. ไดฟีนิลทินไดคลอไรด์ (Diphenyltin Dichloride) 98% ของ Aldrich
27. ไตรฟีนิลทินคลอไรด์ (Triphenyltin Chloride) 98% ของ Merck

เครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) รุ่น HP6890 แมสสเปกโตรเมตรี (MSD) รุ่น HP 5927A และ HP Automatic Sampler รุ่น G1513A ของ Hewlett Packard

วิธีดำเนินการ

1. การเก็บ และรักษาตัวอย่างหอยแมลงภู่ คัดแปลงมาจาก คาร์ลียร์-พินาสเซอ, แอสทริค, ลีสเพส และแอสทริค (Carlier-Pinasseau, Astruc, Lespes, & Astruc, 1996) เก็บตัวอย่างบรรจุใส่ถุงพลาสติก ผูกให้แน่นนำมาที่ห้องทดลอง นำหอยออกจากถุง แช่ในถังที่บรรจุด้วยน้ำทะเลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่เนื้อออกจากเปลือกหอย แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด เพื่อนำเมือกออก หลังจากนั้นนำไปปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกันบรรจุลงในขวดโพลีเอทิลีน ปิดฝาเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ ตัวอย่างหอยแมลงภู่จากอ่างศิลา นำมาใช้ศึกษาการกำจัดสิ่งเจือปน และการสกัดด้วยวิธี Sonication

ตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่นำมาวิเคราะห์ 3 สถานีเก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 29 มิถุนายน พ.ศ. 2546 แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างหอยแมลงภู่ และความยาวของเปลือกที่ใช้ในการทดลอง

สถานี	จำนวน(ตัว)	ความยาวของเปลือกหอย (มิลลิเมตร)
อ่าวทุ่งกระเบน	30	54-70
อ่างศิลา	30	56-89
แหลมแท่น	30	60-75

2. การเตรียมเครื่องแก้วก่อนนำมาใช้ ต้องผ่านขั้นตอนทำความสะอาด โดยล้างด้วยน้ำยาล้างเครื่องแก้ว ล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปแช่ 10:90 (v/v) กรดไนตริก : น้ำกลั่น เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ แล้วทำให้แห้งก่อนนำมาใช้

3. การเตรียมอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ คัดแปลงมาจาก สเตป, แวน แฮททัม, เดอ โวก และบริคแมน (Stab, van Hattum, de Voogt, & Brinkman, 1992)

ซังไตรโพรพิลทินคลอไรด์ 100 มิลลิกรัม ใน Vial ขนาด 20 มิลลิลิตร เติมหะเซน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมกรีนกียาร์ครีเอเจนต์ คือ เพนทิลแมกนิเซียมโบรไมด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที ปิดฝา ใส่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ทำลายกรีนกียาร์ครีเอเจนต์ส่วนเกินด้วยกรดซัลฟิวริก 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดูดสารละลายขึ้นบนด้วย Pasteur Pipette ใส่ใน Vial ขนาด 15 มิลลิลิตรลดปริมาตรด้วยการ Flow แก๊สไนโตรเจนใน Sand Bath อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนเหลือเป็นน้ำมัน แล้วทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการผ่านคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ยาว 16.0 เซนติเมตร ที่บรรจุ ด้วยอะลูมินา จำนวน 6 กรัม ชะด้วยเฮน-เฮกเซน ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ตามด้วยเฮน-เฮกเซน/ ไดเอทิลอีเธอร์ อัตราส่วน 9 : 1 ปริมาตร 35 มิลลิลิตร เก็บ Fraction ละ 2 มิลลิลิตร นำแต่ละ Fraction ไปวัดด้วย GC/MSD/SCAN โดยพิจารณาจากโครมาโตแกรม เลือกเฉพาะ Fraction ที่บริสุทธิ์นำไปรวมกันลดปริมาตร แล้วนำไปชั่ง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณเปอร์เซ็นต์ Yield แล้วนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารหลังทำอนุพันธ์โดยสเปกตรัมของ $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ และ แมสสเปกตรัม ทำซ้ำตามขั้นตอนเดิม เปลี่ยนสารประกอบดิบทุกอินทรีย์เป็นบิวทิลทินไตรคลอไรด์ ไดบิวทิลทินไดคลอไรด์ ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ มอนอฟีนิลทินไตรคลอไรด์ ไดฟีนิลทิน ไคลคลอไรด์ และไตรฟีนิลทินคลอไรด์ ตามลำดับ สรุปดังภาพที่ 2

4. การเตรียมสารเคมี

4.1 การแยกดีแควตซิลิกาเจล นำซิลิกาเจลอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปเก็บในเคชเคเตอร์จนเย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

4.2 การแยกดีแควตอะลูมินา นำอะลูมินาอบ ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเก็บในเคชเคเตอร์จนเย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

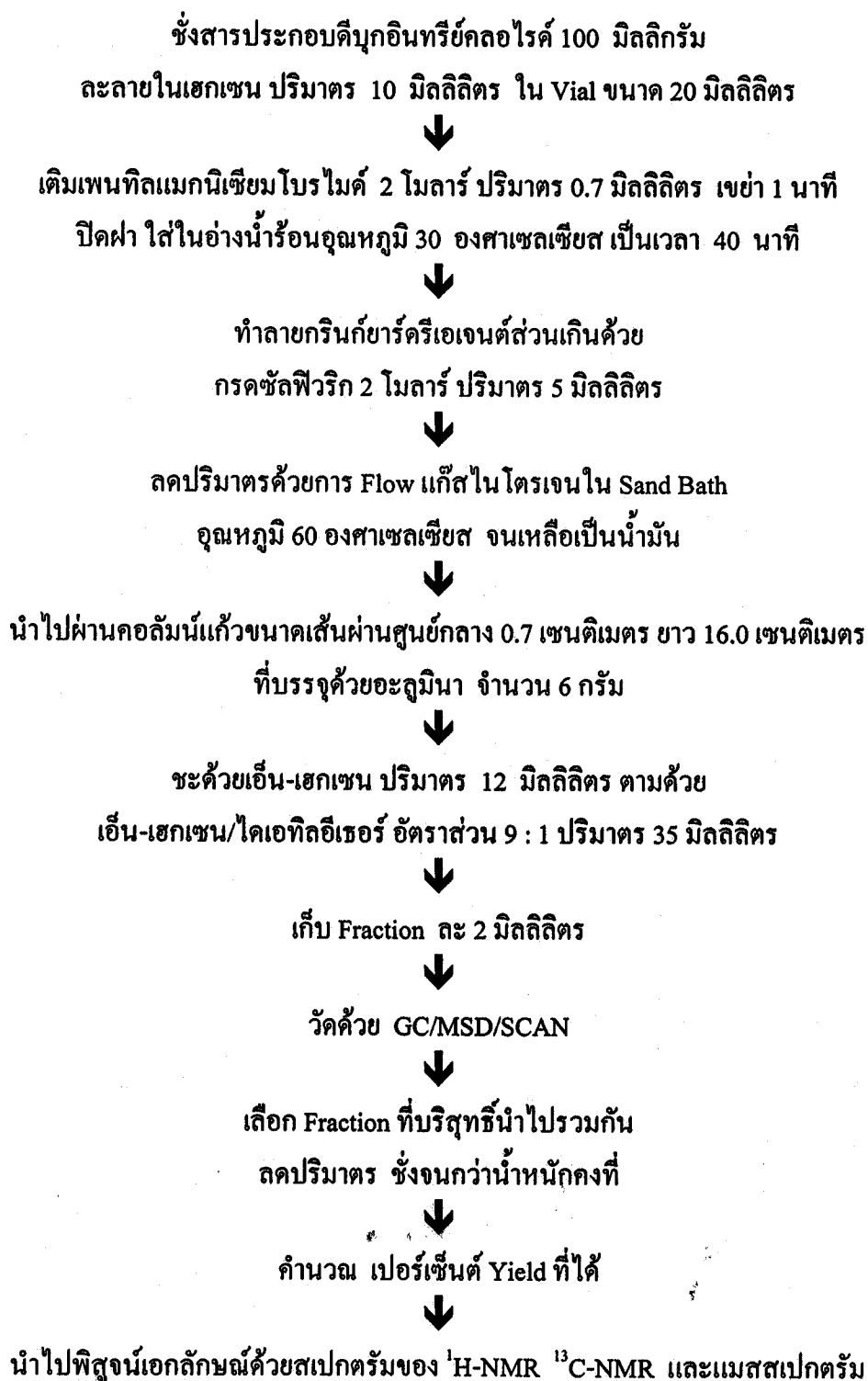
4.3 การเตรียมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต นำโซเดียมซัลเฟต อบที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปเก็บในเคชเคเตอร์จนเย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

4.4 การเตรียมสารละลายไตรโพรพิลเพนทิลทินความเข้มข้น 1000 ppm (น้ำหนักดิบ) โดยซังไตรโพรพิลเพนทิลทิน 0.0269 กรัม ที่เตรียมได้จากข้อ 3 ลงในขวด วัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร

4.5 การเตรียมสารละลาย ไตรโพรพิลเพนทิลทินความเข้มข้น 100 ppm (น้ำหนักดิบ) โดยเปิดสารละลายไตรโพรพิลเพนทิลทินความเข้มข้น 1000 ppm (น้ำหนักดิบ) จากข้อ 4.4 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน จนถึงขีดวัดปริมาตร

4.6 การเตรียมสารละลาย ไตรโพรพิลเพนทิลทินความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดิบ) โดยเปิดสารละลายไตรโพรพิลเพนทิลทินความเข้มข้น 100 ppm (น้ำหนักดิบ) จากข้อ 4.5

ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัด ปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน จนถึง
ขีดวัดปริมาตร เพื่อใช้เป็น Internal Standard



ภาพที่ 2 การเตรียมอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดินุกอินทรีย์

4.7 การเตรียมอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ที่เตรียมได้จากข้อ 3 ความเข้มข้น 1000 ppm (น้ำหนักไดบุก) โดยซึ่งสารอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ คือ มอนอบิวทิลไตรเพนทิลทิน 0.0328 กรัม ไดบูทิลไดเพนทิลทิน 0.0316 กรัม ไตรบูทิลเพนทิลทิน 0.0305 กรัม มอนอฟีนิลไตรเพนทิลทิน 0.0345 กรัม ไดฟีนิลไดเพนทิลทิน 0.0350 กรัม และไตรฟีนิลเพนทิลทิน 0.0355 กรัม ที่เตรียมได้จากข้อ 3 ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร

4.8 การเตรียมอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสมความเข้มข้น 100 ppm (น้ำหนักไดบุก) โดยปิเปตสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 1000 ppm (น้ำหนักไดบุก) จากข้อ 4.7 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร

4.9 การเตรียมอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสมความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักไดบุก) โดยปิเปตสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 100 ppm (น้ำหนักไดบุก) จากข้อ 4.8 ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน จนถึงขีดวัดปริมาตร

4.10 การเตรียมอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสมความเข้มข้น 100 ppb (น้ำหนักไดบุก) โดยปิเปตสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักไดบุก) จากข้อ 4.9 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร

4.11 การเตรียมสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสมความเข้มข้น 50 ppb (น้ำหนักไดบุก) และ Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักไดบุก) โดยปิเปตสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักไดบุก) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และ Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักไดบุก) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน จนถึงขีดวัดปริมาตร ใช้ในการวิเคราะห์สถานะการแยกของ GC/MSD และศึกษาความจำเพาะของสาร

4.12 การเตรียมสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 6.0 ppb (น้ำหนักไดบุก) ตามลำดับ และ Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักไดบุก) โดยปิเปตสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 100 ppb (น้ำหนักไดบุก) ปริมาตร 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200 และ 300 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด

5 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด เติม Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดีบุก) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วย เฮกเซน จนถึงขีดวัดปริมาตร เพื่อใช้ในการหาขีดจำกัดการตรวจวัด และขีดจำกัดการวิเคราะห์ ปริมาณ

4.13 การเตรียมสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 2, 25, 50, 120 และ 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) ตามลำดับ และ Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทินความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) โดยปิเปตสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดีบุก) ปริมาตร 0.10, 0.125, 0.25, 0.60 และ 0.75 มิลลิลิตรลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด เติม Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดีบุก) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร เพื่อใช้ในการศึกษากราฟมาตรฐาน

4.14 การเตรียมสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ผสมความเข้มข้น 2, 25, 50, 120, 150, 200 และ 800 ppb (น้ำหนักดีบุก) ตามลำดับ และ Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) โดยปิเปตสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดีบุก) ปริมาตร 0.10, 0.125, 0.25, 0.60, 0.75, 1.0 และ 4.0 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด เติม Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดีบุก) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน จนถึงขีดวัดปริมาตร เพื่อใช้ในการศึกษาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเชิงเส้น

4.15 การเตรียมสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ผสมความเข้มข้น 50 ppb (น้ำหนักดีบุก) และ Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) โดยปิเปตสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดีบุก) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดีบุก) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร แล้วปรับปริมาตร ด้วยเฮกเซน จนถึงขีดวัดปริมาตร เพื่อใช้ในการศึกษา ความเที่ยงระดับที่ 1

4.16 การเตรียมสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ผสมความเข้มข้น 25, 50 และ 75 ppb (น้ำหนักดีบุก) และ Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) โดยปิเปตสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ผสม

ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดิน) ปริมาตร 0.125, 0.250 และ 0.375 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดิน) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัด ปริมาตร เพื่อใช้ในการศึกษาความเที่ยงระดับที่ 2 และความแม่นยำ

4.17 การเตรียมสารละลายมาตรฐานดินบุกอินทรีย์คลอไรด์ผสม ความเข้มข้น 1000 ppm (น้ำหนักดิน) โดยชั่งสารมาตรฐานดินบุกอินทรีย์คลอไรด์ คือ บิวทิลทินไตรคลอไรด์ 0.0250 กรัม, ไดบิวทิลทินไตรคลอไรด์ 0.0261 กรัม, ไตรบิวทิลทินไตรคลอไรด์ 0.0286 กรัม, ฟีนิลทินไตรคลอไรด์ 0.0260 กรัม, ไดฟีนิลทินไตรคลอไรด์ 0.0302 กรัม และไตรฟีนิลทินไตรคลอไรด์ 0.0331 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

4.18 การเตรียมสารละลายมาตรฐานดินบุกอินทรีย์คลอไรด์ผสม ความเข้มข้น 100 ppm (น้ำหนักดิน) โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานดินบุกอินทรีย์คลอไรด์ผสม ความเข้มข้น 1000 ppm (น้ำหนักดิน) จากข้อ 4.17 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนถึงขีดวัดปริมาตร

4.19 การเตรียมสารละลายมาตรฐานดินบุกอินทรีย์คลอไรด์ผสม ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักดิน) โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานดินบุกอินทรีย์คลอไรด์ผสม ความเข้มข้น 100 ppm (น้ำหนักดิน) จากข้อ 4.18 ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนถึงขีดวัดปริมาตร ใช้ในการ Spike ตัวอย่างในตัวอย่างจริง เพื่อหาร้อยละการกลับคืนอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดินบุกอินทรีย์เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4.20 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์/เมทานอล/น้ำ อัตราส่วน 40:100:100 (w/v/v) โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร เติมเมทานอล 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนถึงขีดวัดปริมาตร

5. หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดินบุกอินทรีย์ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC/MSD)

โดยสภาวะที่เริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง

คอลัมน์	Capillary Column ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร เคลือบด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane หนา 0.25 ไมโครเมตร (HP-5MS)
ปริมาตรที่ฉีด	1 ไมโครลิตร
แก๊สพา	ฮีเลียม อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เทคนิคการฉีด	Splitless

EM Voltage	2106
อิเล็กตรอนมัลติฟายเออร์	70eV
ช่วงมวล	50-450
Dwell Time	100
Cycle/Sec	2.86

ตารางที่ 2 SIM สำหรับอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ (Morabito et al., 1995)

ไอออน	m/z
TPrT	277, 275, 273
MBT	319, 317, 315
DBT	319, 317, 315
TBT	305, 303, 301
MPhT	339, 337, 335
DPhT	345, 343, 341
TPhT	351, 349, 347

การวิเคราะห์หาสถานะที่เหมาะสม ดูจากสภาพไวของสาร การแยก และรีเทนชันไทม์ นำสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 50 ppb (น้ำหนัก ไดบุก) ที่มี Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักไดบุก) ที่เตรียมในข้อ 4.11 มาทำการวิเคราะห์ (n = 3)

ตัวแปรที่ทำการศึกษาได้แก่

5.1 โปรแกรมอุณหภูมิ

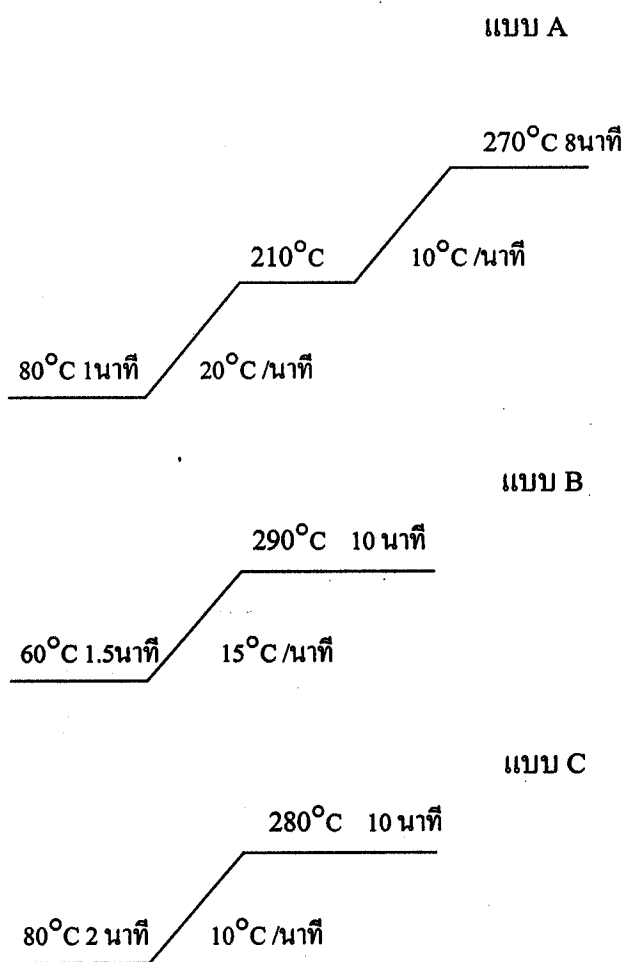
โปรแกรมอุณหภูมิ ที่ใช้ในการทดลองคือ

แบบ A โปรแกรมอุณหภูมิ เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส คงที่ 1 นาที เพิ่มขึ้น 20 องศาเซลเซียส ต่อนาที ถึง 210 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส ต่อนาที ถึง 270 องศาเซลเซียส คงที่ 8 นาที อุณหภูมิช่องฉีดสาร 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดีเทคเตอร์ 280 องศาเซลเซียส

แบบ B โปรแกรมอุณหภูมิ เริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส คงที่ 1.5 นาที เพิ่มขึ้น 15 องศาเซลเซียส ต่อนาที ถึง 290 องศาเซลเซียส คงที่ 10 นาที อุณหภูมิช่องฉีดสาร 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคิตเตอร์ 290 องศาเซลเซียส

แบบ C โปรแกรมอุณหภูมิ เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส คงที่ 2 นาที เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส ต่อนาที ถึง 280 องศาเซลเซียส คงที่ 10 นาที อุณหภูมิช่องฉีดสาร 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคิตเตอร์ 290 องศาเซลเซียส

โปรแกรมอุณหภูมิทั้ง 3 แบบ แสดงดัง ภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โปรแกรมอุณหภูมิในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ อนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบ ดินุกอินทรีย์ผสม ที่ความเข้มข้น 50 ppb (น้ำหนักดีบุก) ที่มี Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) ทำการวิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM

5.2 ศึกษาอัตราเร็วของโปรแกรมอุณหภูมิ

เลือก โปรแกรมอุณหภูมิจากข้อ 5.1 ที่เหมาะสมมา ศึกษาอัตราเร็วของโปรแกรม อุณหภูมิ ที่ 12, 15, 17, 20 และ 22 องศาเซลเซียสต่อนาที

6. การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

ในการทดลองใช้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 5 คือ โปรแกรมอุณหภูมิ เริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส คงที่ 1.5 นาที เพิ่มขึ้น 20 องศาเซลเซียสต่อนาที ถึง 290 องศาเซลเซียส คงที่ 10 นาที อุณหภูมิห้องมืดสาร 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดีเทคเตอร์ 290 องศาเซลเซียส

6.1 ความจำเพาะของสาร นำสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุก อินทรีย์ ความเข้มข้น 50 ppb (น้ำหนักดีบุก) มี Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) ที่เตรียมในข้อ 4.11 นำไปวิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM วิเคราะห์โดยฉีดทั้งหมด 3 ครั้ง พิจารณาจากค่าการแยก (R_s) ของสารแต่ละชนิด

6.2 การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) และการหาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) โดยนำสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 6.0 ppb (น้ำหนักดีบุก) ที่เตรียมในข้อ 4.12 นำไปวิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM วิเคราะห์โดยฉีดความเข้มข้นละ 7 ครั้ง โดยกำหนดให้

ขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) โดยความเข้มข้นของสารที่ให้เป็น 2-3 เท่าของ สัญญาณรบกวน ($S/N = 2-3$) โดยใช้ค่าความสูงของพีค

และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) โดยความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณ เป็น 10-20 เท่าของสัญญาณรบกวน ($S/N = 10-20$) โดยใช้ค่าความสูงของพีค (Huber, 1998)

6.3 กราฟมาตรฐาน (Calibration Curve) นำสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 2, 25, 50, 120 และ 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) มี Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) ที่เตรียมในข้อ 4.13 นำไป วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM วิเคราะห์โดยฉีดความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

6.4 ศึกษาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเชิงเส้น (Linear Dynamic Range) นำสารละลาย อนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 2, 25, 50, 120, 150, 200 และ 800 ppb (น้ำหนักดีบุก) มี Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) ที่เตรียมในข้อ 4.14 นำไปวิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM วิเคราะห์โดยฉีด ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เพื่อสร้างกราฟดูช่วงความเข้มข้นที่เป็นเชิงเส้น

6.5 ความเที่ยง ระดับที่ 1 (Precision Level 1) นำสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 50 ppb (น้ำหนักไดบุก) มี Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักไดบุก) ที่เตรียมในข้อ 4.15 นำไปวิเคราะห์โดย GC/MSD/SIM วิเคราะห์โดยฉีดทั้งหมด 10 ครั้ง คำนวณค่าความเข้มข้นที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานคำนวณค่า % RSD ของความเข้มข้นสารแต่ละชนิด

6.6 ความเที่ยง ระดับที่ 2 (Precision Level 2) นำสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 25 , 50 และ 75 ppb (น้ำหนักไดบุก) มี Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักไดบุก) ที่เตรียมในข้อ 4.16 นำไปวิเคราะห์โดย GC/MSD/SIM วิเคราะห์โดยฉีดทั้งหมด 5 ครั้ง คำนวณค่าความเข้มข้นที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานคำนวณค่า % RSD ของความเข้มข้นสารแต่ละชนิด

6.7 ความแม่นยำ (Accuracy) นำสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 25, 50 และ 75 ppb (น้ำหนักไดบุก) มี Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักไดบุก) ที่เตรียมในข้อ 4.16 นำไปวิเคราะห์โดย GC/MSD/SIM วิเคราะห์โดยฉีดทั้งหมด 5 ครั้ง คำนวณค่าร้อยละการกลับคืนของอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์แต่ละความเข้มข้น

7. ศึกษาสถานะในการเตรียมตัวอย่าง

7.1 ศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกส่วน ทำการศึกษาโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ยาว 16.0 เซนติเมตร ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล 3 กรัม และอะลูมินา 3 กรัม ชะคอลัมน์จนอิ่มตัวด้วยเฮกเซน นำสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักไดบุก) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ และศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารดังต่อไปนี้

7.1.1 ชะด้วย 80:20 (v/v) เฮกเซน/ไดเอทิลอีเธอร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตรเก็บใน KD

7.1.2 ชะด้วย 60:40 (v/v) เฮกเซน/ไดเอทิลอีเธอร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตรเก็บใน KD

7.1.3 ชะด้วย 40:60 (v/v) เฮกเซน/ไดเอทิลอีเธอร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตรเก็บใน KD

นำแต่ละ KD ไปลดปริมาตรในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เติมน้ำ Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักไดบุก) ปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM คำนวณร้อยละการกลับคืนอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์เทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วน

7.2 ศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วน โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในข้อ 7.1 ศึกษาปริมาตรที่ใช้โดยนำสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุก

อินทรีย์ผสม ความเข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่คอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล 3 กรัม และอะลูมินา 3 กรัม แล้วชะด้วย 80:20 (v/v) เฮกเซน/ไดเอทิลอีเธอร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยแบ่งเก็บใน KD โดยชะครั้งละ 8 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำไปลดปริมาตร ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส แล้วเติม Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักคีนุก) ปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM เพื่อหาปริมาณของตัวชะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

เติมสารละลายอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบคีนุกอินทรีย์ผสม
ความเข้มข้น 1 ppm (น้ำหนักคีนุก) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร



ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล 3 กรัม
และอะลูมินา 3 กรัม



ชะด้วย 80:20 (v/v) เฮกเซน/ไดเอทิลอีเธอร์
ปริมาตร 25 มิลลิลิตร



ลดปริมาตรด้วย KD ในอ่างน้ำร้อน
อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส



เติม Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน
ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักคีนุก)
ปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร



วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบคีนุกอินทรีย์ด้วย
GC/MSD/SIM

ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ร้อยละการกลับคืนของอนุพันธ์เพนทิล ของสารประกอบคีนุกอินทรีย์
ชะด้วย 80:20 (v/v) เฮกเซน/ไดเอทิลอีเธอร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่ผ่านซิลิกาเจล
3 กรัม และอะลูมินา 3 กรัม

7.3 ศึกษาการกำจัดสิ่งเจือปน คัดแปลงจาก สเตป, บรีคแมน และโคฟิโน (Stab, Brinkman, & Cofino, 1994)

7.3.1 ขั้นตอนการสกัด และการทำอนุพันธ์ ชั่งเนื้อหอยน้ำหนัก ประมาณ 2 กรัม ใน Centrifuge Tube ขนาด 30 มิลลิตร ใส่แท่งแม่เหล็กคน ทำการกำจัดไขมัน ด้วยวิธี Saponification โดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 40:100:100 (w/v/v) ปริมาตร 6 มิลลิตร ปิดฝาขวดให้สนิท นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็น ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 1.5-2.2 ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม และตัวทำละลาย ไดเอทิลอีเธอร์ /เพนเทน /โทรโปโลน อัตราส่วน 80 : 20 : 0.1 (v/v/w) ปริมาตร 12 มิลลิตร คนด้วยแท่งแม่เหล็กคน 3 วินาที สกัดด้วยวิธี Sonication เป็นเวลา 5 นาที คนอีกครั้งด้วยแท่งแม่เหล็กคน 3 วินาที นำไปเซนตริฟิวจ์ ความเร็ว 2200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายชั้นบนโดยใช้ Pasteur Pipette ใส่ในขวดวัด ปริมาตรขนาด 50 มิลลิตรที่มีโซเดียมซัลเฟต 1-2 กรัม นำสารละลายชั้นล่างสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย ไดเอทิลอีเธอร์/เพนเทน/โทรโปโลน อัตราส่วน 80 : 20 : 0.1 (v/v/w) ปริมาตร 12 มิลลิตร นำสารละลายมารวมกัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงถ่ายใส่ขวดวัดก้นกลม ขนาด 250 มิลลิตร เติมเฮกเซน 10 มิลลิตร ลดปริมาตรด้วยเครื่องสูญญากาศชนิดหมุน ให้เหลือปริมาตรประมาณ 2-3 มิลลิตร ถ่ายใส่ Centrifuge Tube ขนาด 15 มิลลิตร ลดปริมาตร ให้เหลือประมาณ 1 มิลลิตร ด้วยการ Flow แก๊สไนโตรเจน เติมกรีนกียาร์ครีเอเจนต์ คือ เพนทิลแมกนีเซียมโบรไมด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิตร ปิดฝา นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปไว้ในอ่างน้ำเย็นเติมเฮกเซน ปริมาตร 3 มิลลิตร ทำลายกรีนกียาร์ครีเอเจนต์ส่วนเกินด้วย สารละลายเอมโมเนียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิตร นำไปเซนตริฟิวจ์ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบนโดยใช้ Pasteur Pipette ใส่ใน Vial ขนาด 8 มิลลิตร แล้วลดปริมาตรเหลือ 2 มิลลิตร ด้วยการ Flow แก๊สไนโตรเจน

7.3.2 ขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปน หลังจากการสกัด และการทำอนุพันธ์ ทำการกำจัดสิ่งเจือปนด้วยการผ่านคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล 1 กรัมใส่ตัวอย่างที่ได้จากข้อ 7.3.1 ปริมาตร 0.1 มิลลิตร ชะด้วย 80:20 (v/v) เฮกเซน /ไดเอทิลอีเธอร์ ปริมาตร 25 มิลลิตร เก็บใส่ KD ลดปริมาตร เหลือ 0.5 มิลลิตร วัดด้วย GC/MSD/SCAN เพื่อดูแมสสเปกตรัมของกรดไขมันที่ไม่สามารถกำจัดหมด โดยเทียบจากฐานข้อมูล Wiley หลังจากนั้นวิเคราะห์ซ้ำ โดยบรรจุซิลิกาเจล และอะลูมินา อัตราส่วน 1 : 3, 2 : 2 และ 3 : 1 กรัม/กรัม ตามลำดับ เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของซิลิกาเจล และอะลูมินาในการวิเคราะห์

7.3.3 ศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่าง ที่นำไปกำจัดสิ่งเจือปนและแยกส่วน โดยนำสารที่ได้จากข้อ 7.3.1 และเบลงค์ (ทำตามขั้นตอนข้อ 7.3.1 แต่ไม่เติมตัวอย่างหอย) แล้วกำจัดสิ่งเจือปนด้วยคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล 3 กรัม และอะลูมินา 3 กรัม ปริมาตรของตัวอย่างและเบลงค์ที่นำไปกำจัดสิ่งเจือปน และแยกส่วน เป็น 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร ชะด้วย 80:20 (v/v) เฮกเซน / ไดเอทิลอีเธอร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เก็บใส่ KD ลดปริมาตร เดิม Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักดิบ) ปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM และ SCAN และใน GC/MSD/SCAN ที่ปริมาตร 0.6 และ 0.7 มิลลิลิตร

7.3.4 ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการกำจัดสิ่งเจือปนของตัวอย่าง โดยนำส่วนที่สกัดได้จากข้อ 7.3.1 ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล 3 กรัม และอะลูมินา 3 กรัม โดยที่ใช้ปริมาตรตัวอย่างที่นำไปกำจัดสิ่งเจือปน และการแยกส่วนจากข้อ 7.3.3 ในการศึกษาตัวชะที่ใช้คือ 80:20, 60:40 และ 40:60 (v/v) เฮกเซน/ไดเอทิลอีเธอร์ วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SCAN เพื่อดูสิ่งเจือปนของตัวอย่างที่มีตัวชะต่างกัน

8. ศึกษาการสกัดด้วยวิธี Sonication คัดแปลงจาก สเตป, บรีคแมน และโคฟิโน (Stab, Brinkman, & Cofino, 1994)

8.1 ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่าง โดยชั่งเนื้อหอยน้ำหนักประมาณ 2 กรัม ใน Centrifuge Tube ขนาด 30 มิลลิลิตร เติมน้ำประกอบคีนุกอินทรีย์ คลอไรด์ ความเข้มข้น 50 ng/g น้ำหนักตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนข้อ 7.3.1 และสภาวะจากข้อ 7.3.2 – 7.3.4 ในการศึกษาใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้สกัดเป็น ไดเอทิล อีเธอร์/เพนเทน/โทรโปโลน อัตราส่วน 80 : 20 : 0.1 และ 100 : 0 : 0.1 (v/v/w) วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM เพื่อหาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่าง คำนวณร้อยละการกลับคืนอนุพันธ์ของสารประกอบคีนุกอินทรีย์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

8.2 ศึกษาปริมาณโทรโปโลน ที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่าง โดยชั่งเนื้อหอยน้ำหนักประมาณ 2 กรัม ใน Centrifuge Tube ขนาด 30 มิลลิลิตร เติมน้ำประกอบคีนุกอินทรีย์ คลอไรด์ ความเข้มข้น 50 ng/g น้ำหนักตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนตามข้อ 8.1 ที่เลือกใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายแล้ว ในการศึกษาใช้ ปริมาณโทรโปโลนเป็น ไดเอทิลอีเธอร์ / เพนเทน/โทรโปโลน อัตราส่วน 80 : 20 : 0.1 และ 80 : 20 : 0.2 (v/v/w) วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM คำนวณร้อยละการกลับคืนอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบคีนุกอินทรีย์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณโทรโปโลน ที่เหมาะสม

8.3 ศึกษาการสกัดด้วย วิธี Sonication ที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยชั่งเนื้อหอยน้ำหนักประมาณ 2 กรัม ใน Centrifuge Tube ขนาด 30 มิลลิลิตร เติมน้ำประกอบคีนุกอินทรีย์คลอไรด์

ความเข้มข้น 50 ng/g น้ำหนักตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้น ทำตามขั้นตอนตามข้อ 8.2 ที่เลือกใช้ปริมาณโพรโปโลนแล้วในการศึกษาใช้เวลาในการสกัดเป็น 5 และ 10 นาที วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM คำนวณร้อยละการกลับคืนของอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่าง

8.4 ศึกษาจำนวนครั้ง ของ การสกัดด้วยวิธี Sonication โดยทำตามขั้นตอนข้อ 8.3 ที่เลือกใช้เวลาสกัดตัวอย่างแล้วโดยสกัด 2 ครั้ง หลังจากนั้นผ่านขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปน และการแยกส่วนตามลำดับ ลดปริมาตรด้วย KD เดิม Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักไดบุก) ปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM สกัดตัวอย่างเดิมอีก 1 ครั้ง จำนวน 3 ครั้ง นำแต่ละครั้งผ่านการกำจัดสิ่งเจือปน และการแยกส่วน เพื่อศึกษาจำนวนครั้งของการสกัด

8.5 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายกรีนกีย์อาร์คิริเอเจนต์ส่วนเกิน (Excess Grignard) โดยชั่งเนื้อหอยน้ำหนักประมาณ 2 กรัมใน Centrifuge Tube ขนาด 30 มิลลิลิตร โดยเติมสารประกอบไดบุกอินทรีย์คลอไรด์ ความเข้มข้น 25 ng/g น้ำหนักตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนตามข้อ 8.4 ที่เลือกจำนวนครั้งในการสกัดตัวอย่างแล้ว ในการศึกษาใช้ตัวทำละลายกรีนกีย์อาร์คิริเอเจนต์ส่วนเกินคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ และ กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM คำนวณร้อยละการกลับคืนอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อศึกษาชนิดของตัวทำละลายกรีนกีย์อาร์คิริเอเจนต์

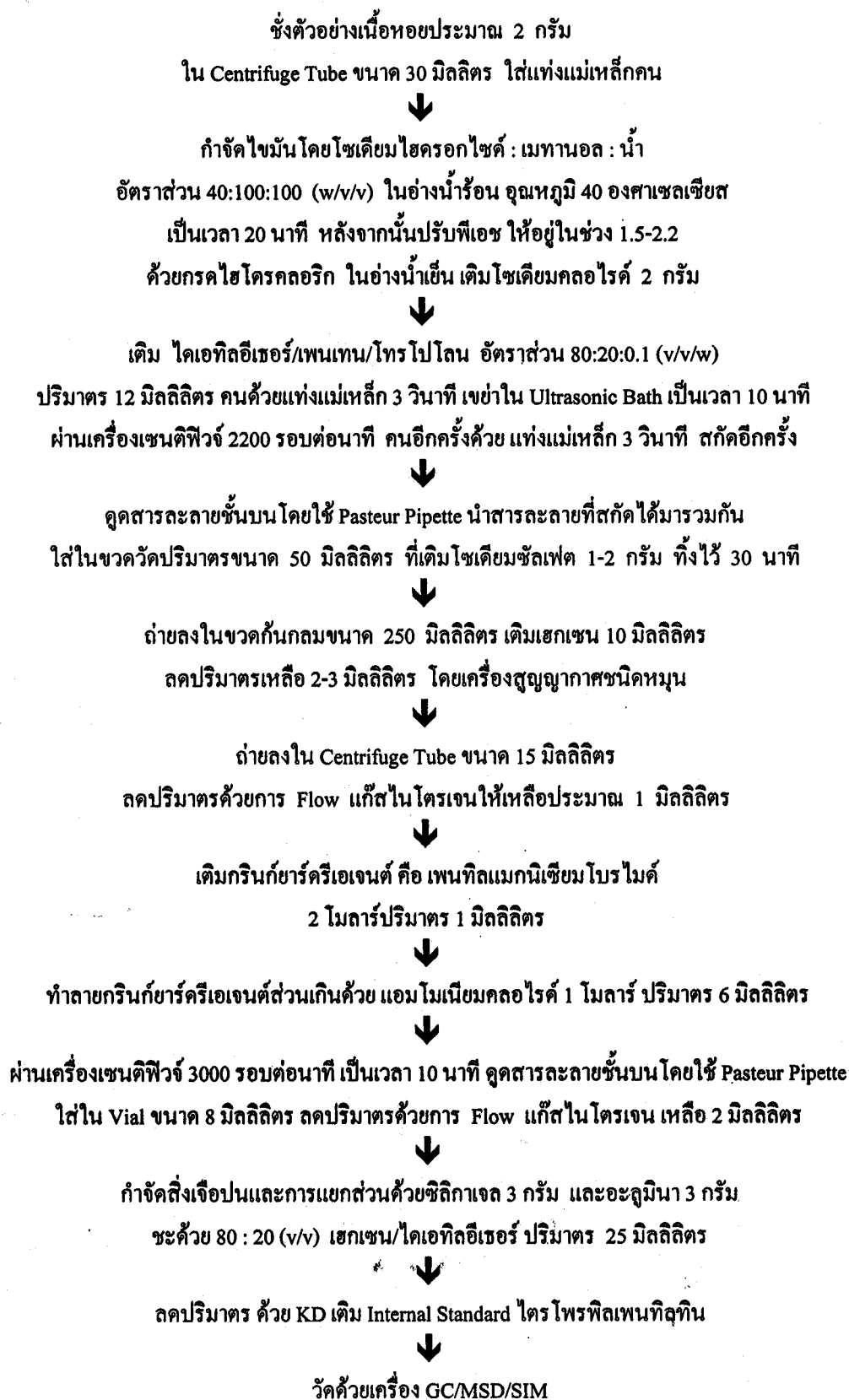
8.6 ศึกษาเวลา ในการกำจัดไขมันโดยวิธี Saponification โดยชั่งเนื้อหอยน้ำหนักประมาณ 2 กรัมใน Centrifuge Tube ขนาด 30 มิลลิลิตร โดยเติมสารประกอบไดบุกอินทรีย์คลอไรด์ ความเข้มข้น 25 ng/g น้ำหนักตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนตามข้อ 8.5 ที่เลือกตัวทำละลายกรีนกีย์อาร์คิริเอเจนต์ส่วนเกินแล้ว ในการศึกษาเวลาในการกำจัดไขมันคือ 20 และ 10 นาที วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM คำนวณร้อยละการกลับคืนอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อศึกษาเวลาในการกำจัดไขมันโดยวิธี Saponification

8.7 ศึกษาอุณหภูมิในการทำอนุพันธ์ด้วยกรีนกีย์อาร์คิริเอเจนต์ โดยชั่งเนื้อหอยน้ำหนักประมาณ 2 กรัมใน Centrifuge Tube ขนาด 30 มิลลิลิตร โดยเติมสารประกอบไดบุกอินทรีย์คลอไรด์ ความเข้มข้น 25 ng/g น้ำหนักตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนตามข้อ 8.6 ที่เลือกเวลาในการกำจัดไขมันด้วยวิธี Saponification แล้ว ในการศึกษาใช้โดยเปลี่ยนเป็นอุณหภูมิในการทำอนุพันธ์คือ 40 และ 32 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM คำนวณร้อยละการกลับคืนอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อศึกษาอุณหภูมิ ในการทำอนุพันธ์ด้วยกรีนกีย์อาร์คิริเอเจนต์

8.8 ศึกษาอัตราการกลับคืนอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์ที่ความเข้มข้น 75 ng/g น้ำหนักตัวอย่าง โดยชั่งเนื้อหอยน้ำหนักประมาณ 2 กรัม ใน Centrifuge Tube ขนาด 30 มิลลิลิตร โดยเติมสารประกอบดีบุกอินทรีย์คลอไรด์ ความเข้มข้น 75 ng/g น้ำหนักตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนตามข้อ 8.7 ที่เลือกที่ใช้อุณหภูมิในการทำอนุพันธ์ด้วยกรีนกัลคาร์บริเอเจนต์แล้ววิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM คำนวณร้อยละการกลับคืนอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบดีบุกอินทรีย์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

9. การวิเคราะห์ตัวอย่าง นำตัวอย่างเนื้อหอยแมลงภู่งจาก อ่าวคุ้งกระเบน แหลมแท่น และอ่างศิลา นำแต่ละตัวอย่างแต่ละสถานีมาสกัดโดย ชั่งเนื้อหอยน้ำหนัก ประมาณ 2 กรัม ใน Centrifuge Tube ขนาด 30 มิลลิลิตร ใส่แท่งแม่เหล็กคน ทำการกำจัดไขมัน ด้วยวิธี Saponification โดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ / เมทานอล / น้ำ อัตราส่วน 40 : 100 : 100 (w/v/v) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้สนิท นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็น ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 1.5-2.2 ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม และตัวทำละลาย ไดเอทิลอีเธอร์ / เพนเทน / โทรโปโลน อัตราส่วน 80 : 20 : 0.1 (v/v/w) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแม่เหล็กคน 3 วินาที สกัดด้วยวิธี Sonication เป็นเวลา 10 นาที คนอีกครั้งด้วยแท่งแม่เหล็กคน 3 วินาที นำไปเซนติฟิวจ์ ความเร็ว 2200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายชั้นบนโดยใช้ Pasteur Pipette ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมซัลเฟต 1-2 กรัม นำสารละลายชั้นล่างสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย ไดเอทิลอีเธอร์ / เพนเทน / โทรโปโลน อัตราส่วน 80 : 20 : 0.1 (v/v/w) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร นำสารละลายมารวมกัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงถ่ายใส่ขวดวัดก้นกลม ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเฮกเซน 10 มิลลิลิตร ลดปริมาตรด้วยเครื่องสูญญากาศชนิดหมุน ให้เหลือปริมาตรประมาณ 2-3 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ Centrifuge Tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ลดปริมาตร ให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร ด้วยการ Flow แก๊สไนโตรเจน เติมกรีนกัลคาร์บริเอเจนต์ คือ เพนทิลแมกนีเซียมโบรไมด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปไว้ในอ่างน้ำเย็นเติมเฮกเซน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทำลายกรีนกัลคาร์บริเอเจนต์ส่วนเกินด้วยสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร นำไปเซนติฟิวจ์ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบนโดยใช้ Pasteur Pipette ใส่ใน Vial ขนาด 8 มิลลิลิตร แล้วลดปริมาตรเหลือ 2 มิลลิลิตรด้วยการ Flow แก๊สไนโตรเจนกำจัดสิ่งเจือปน และการแยกส่วนด้วยคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล 3 กรัม และอะลูมินา 3 กรัม ชะด้วย 80 : 20 (v/v) เฮกเซน / ไดเอทิลอีเธอร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลดปริมาตรด้วย KD เติม Internal Standard ไตรโพรพิลเพนทิลทิน ความเข้มข้น 150 ppb (น้ำหนักดีบุก) แล้วปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC/MSD/SIM สรุปดังภาพที่ 5

10. การหาปริมาณไขมันในตัวอย่างหอยโดยดัดแปลงจาก สเตป, ฟรีนย์, ฟรีริกส์, บริกแมน และโคฟิโน (Stab, Frenay, Freriks, Brinkman, & Cofino, 1995) ชั่งเนื้อหอย (Freeze Dried) 2 กรัม ใส่ลงใน Extraction Thimble เติมหักทำละลายไดคลอโรมีเทน/เพนเทน อัตราส่วน 1 : 1 (v/v) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วย วิธีซอกซ์เลต ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ลดปริมาตร ด้วยเครื่องสูญญากาศชนิดหมุน แล้วนำไปชั่ง หนักน้หนักคงที่ คำนวณเปอร์เซ็นต์ไขมัน



ภาพที่ 5 การวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในตัวอย่างหอย

11. หาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง คัดแปลงจาก สเตรนค์, จากอปเซน, เพเดอร์เซน, และแกรนโม (Strand, Jacobsen, Pedersen, & Granmo, 2003) โดยการชั่งเนื้อหอย (น้ำหนักเปียก) ประมาณ 2 กรัม ใส่ในขวดแก้ว อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นำไปชั่ง อบจนกระทั่ง น้ำหนักคงที่ คำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง

12. การวิเคราะห์ข้อมูล

12.1 วิเคราะห์เชิงปริมาณใช้ GC/MSD/SIM โดยใช้ Internal Standardization Method

12.2 วิเคราะห์เชิงคุณภาพ

12.2.1 ใช้ค่า m/z เพื่อชี้ว่าเป็นสารประกอบคีนุกอินทรีย์ที่สังเคราะห์ได้ และเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน

12.2.2 พิสูจน์เอกลักษณ์หลังการทำอนุพันธ์ด้วยสเปกตรัมของ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ และแมสสเปกตรัม

13. การคำนวณ

13.1 คำนวณเปอร์เซ็นต์ Yield โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ Yield} = \frac{\text{น้ำหนักที่ได้จากการทดลอง}}{\text{น้ำหนักที่ได้ตามทฤษฎี}} \times 100$$

13.2 คำนวณหาร้อยละการกลับคืน โดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{(C_{\text{Std+ Samp}} - C_{\text{Samp}}) \times 100}{C_{\text{Std}}}$$

เมื่อ C_{Std} คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

C_{Samp} คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน

$C_{\text{Samp+Std}}$ คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

13.3 เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซนต์น้ำหนัก} = \frac{W_x}{W_y} \times 100$$

เมื่อ W_x คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่อบแล้ว

W_y คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

13.4 เปอร์เซ็นต์ไขมัน โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} = \frac{Wa \times 100}{Wb}$$

เมื่อ Wa คือ น้ำหนักของไขมันที่ชั่งได้

Wb คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

13.5 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) โดยใช้สูตร

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

เมื่อ x_i คือ ปริมาณอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์ในแต่ละครั้ง

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยปริมาณอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์

n คือ จำนวนครั้งที่ทำการวิเคราะห์

13.6 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation)

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

เมื่อ $\%RSD$ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยปริมาณอนุพันธ์เพนทิลของสารประกอบไดบุกอินทรีย์
ในแต่ละครั้ง

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน