

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารประกอบออร์กาโนคลอรีน

หาสภาวะเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-อิเล็กตรอนแคปเจอร์(GC-ECD) ผลการศึกษาเมื่อนักวิเคราะห์มาตรฐานผสมออร์กาโนคลอรีน เข้มข้น 100 ppb และ 2,4,5,6-tetrachloro-m-xylene ความเข้มข้น 100 ppb ที่สภาวะของเครื่องดังต่อไปนี้

แบบ A

ใช้เครื่องฉีดสารแบบอัตโนมัติ (Auto sample) โปรแกรมการล้างเข็ม ล้างเข็มด้วยเฮกเซน ก่อนฉีดตัวอย่าง 3 ครั้ง ล้างเข็มด้วยตัวอย่างก่อนฉีด 3 ครั้ง และล้างเข็มด้วยเฮกเซน หลังการฉีด ตัวอย่าง 15 ครั้ง ฉีดตัวอย่าง 2.0 ไมโครลิตร

สภาวะของเครื่องที่ใช้ เวลา Splitless 0.5 นาที อุณหภูมิอินเลท 200°C ตัวพา ฮีเลียม / ในโตรเจน 75 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ที่ใช้ HP5 (5% phenyl methyl silicone) 2.5 mm. x 30 m. ความหนาฟิล์ม $0.25\ \mu\text{m}$. อัตราไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที โปรแกรมอุณหภูมิ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 85°C เพิ่มอุณหภูมิ 35°C ต่อนาที ถึง 210°C อุณหภูมิคงที่นาน 2 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 2°C ต่อนาที ถึง 220°C อุณหภูมิคงที่นาน 15 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 300°C อุณหภูมิคงที่นาน 6 นาที ดีเทคเตอร์ (ECD) ใช้อุณหภูมิคงที่ 300°C

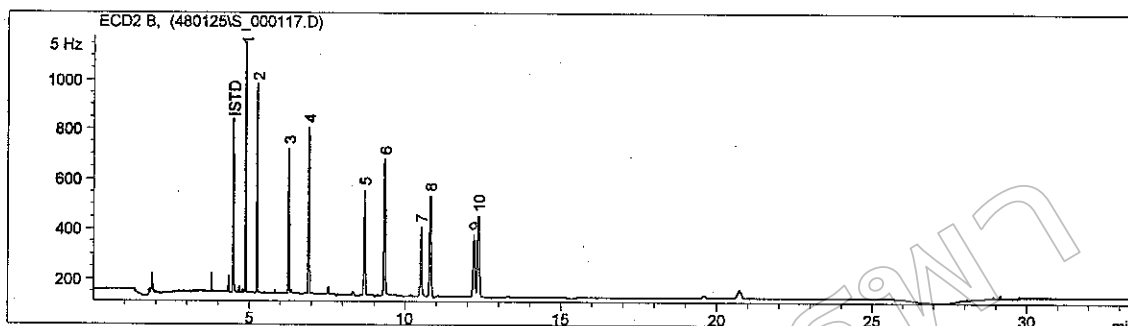
แบบ B

ใช้โปรแกรมการล้างเข็ม เช่นเดียวกับแบบ A

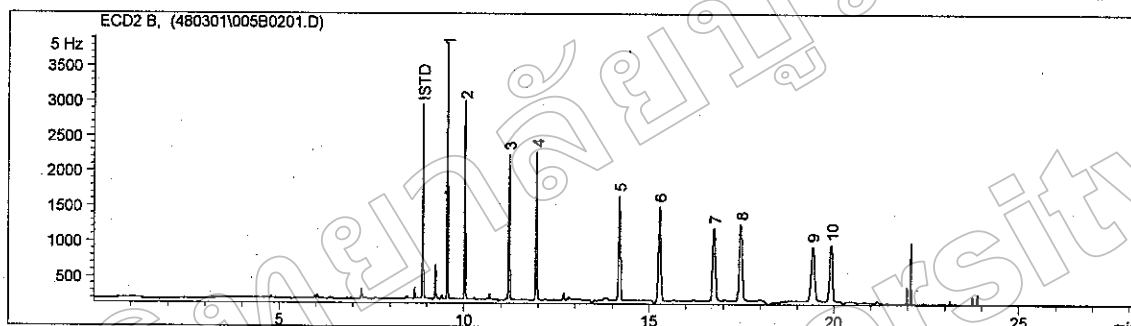
สภาวะของเครื่องที่ใช้ เวลา Splitless 3 นาที อุณหภูมิอินเลท 250°C ตัวพา ฮีเลียม / ในโตรเจน 75 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ที่ใช้ HP5 (5% phenyl methyl silicone) 2.5 mm. x 30 m. ความหนาฟิล์ม $0.25\ \mu\text{m}$. อัตราไหล 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที โปรแกรมอุณหภูมิ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 70°C อุณหภูมิคงที่นาน 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 140°C อุณหภูมิคงที่นาน 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 20°C ต่อนาที ถึง 200°C อุณหภูมิคงที่นาน 10 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 300°C อุณหภูมิคงที่นาน 6 นาที ดีเทคเตอร์ (ECD) ใช้อุณหภูมิคงที่ 330°C

ผลโปรแกรมอุณหภูมิแบบ A และ B แสดงเป็นโครมาโตแกรม ดังภาพที่ 8

แบบ A



แบบ B



ภาพที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมระหว่างสภาวะแบบ A และ B

ISTD (Internal Standard)= 2,4,5,6-tetrachloro-m-xylene, 1=alpha-BHC, 2= gamma-BHC, 3=Heptachlor, 4=Aldrin, 5=alpha-Endosulfan, 6=pp-DDE, 7=beta-Endosulfan, 8=pp-DDD, 9=Endosulfan Sulfate, 10=pp-DDT

นำโปรแกรมแบบ B มาหาอุณหภูมิเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยคงที่ค่าพารามิเตอร์ในส่วนต่าง ๆ ทั้งหมด ยกเว้นอุณหภูมิเริ่มต้น ใช้ที่ 85°C เป็นแบบ C และที่ 95°C เป็นแบบ D

แบบ C

เหมือนแบบ B เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 85°C , ในส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

แบบ D

เหมือนแบบ B เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C , ในส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

ผลโปรแกรมอุณหภูมิแบบ C และ D แสดง ดังภาพที่ 9

นำโปรแกรมอุณหภูมิแบบ D ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C มาหาเวลาคงที่ ที่เหมาะสมโดยคงที่ค่าพารามิเตอร์ในส่วนต่างๆทั้งหมด ยกเว้นในขั้นอุณหภูมิที่ 2 เปลี่ยนเวลาคงที่ จาก 3 นาที เป็น 5 และ 8 นาที ดังแบบ E และ F ตามลำดับ

แบบ E

เหมือนแบบ D เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C อุณหภูมิคงที่นาน 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 140°C นาน 5 นาที, ในส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

แบบ F

เหมือนแบบ D เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C อุณหภูมิคงที่นาน 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 140°C นาน 8 นาที, ในส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

ผลโปรแกรมอุณหภูมิแบบ E และ F แสดง ดังภาพที่ 10

นำโปรแกรมอุณหภูมิแบบ D ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C มาหาอุณหภูมิคงที่ ที่เหมาะสม โดยคงที่ค่าพารามิเตอร์ในส่วนต่าง ๆ ทั้งหมด ยกเว้นในขั้นอุณหภูมิที่ 2 เปลี่ยนอุณหภูมิคงที่ จาก 140 เป็น 130, 150 และ 160°C ดังแบบ G, H และ I ตามลำดับ

แบบ G

เหมือนแบบ D เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C อุณหภูมิคงที่นาน 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 130°C นาน 3 นาที, ในส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

แบบ H

เหมือนแบบ D เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

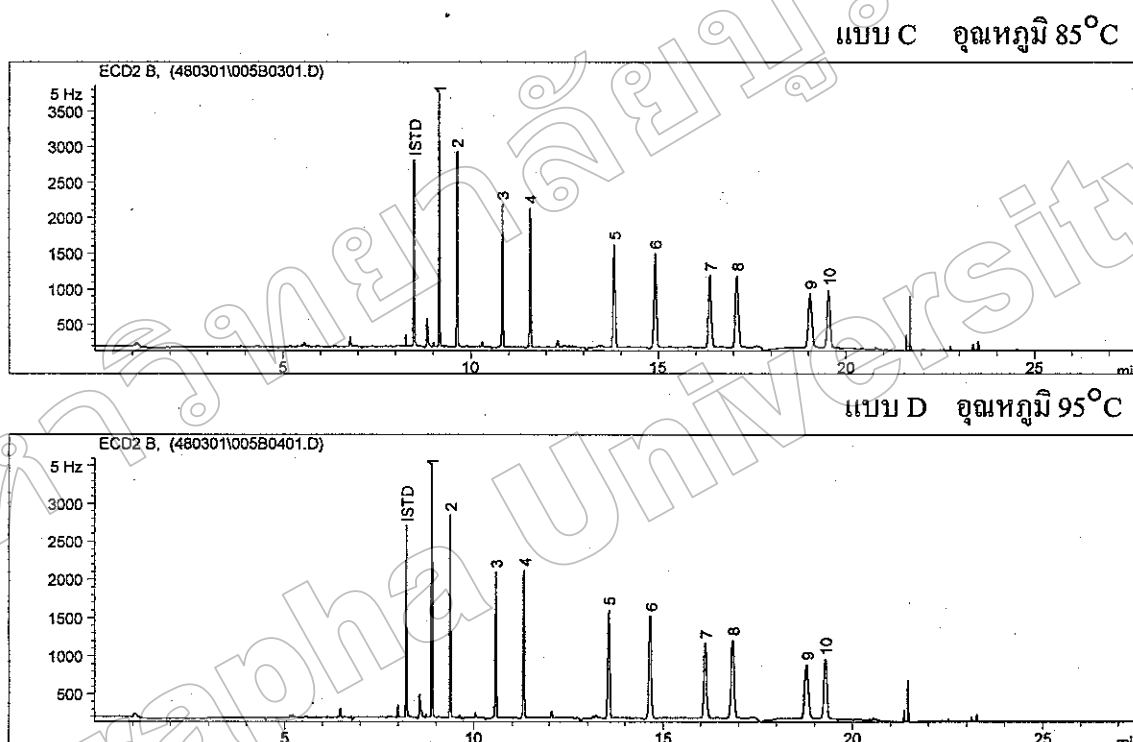
Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C อุณหภูมิคงที่นาน 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 150°C นาน 3 นาที, ในส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

แบบ I

เหมือนแบบ D เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

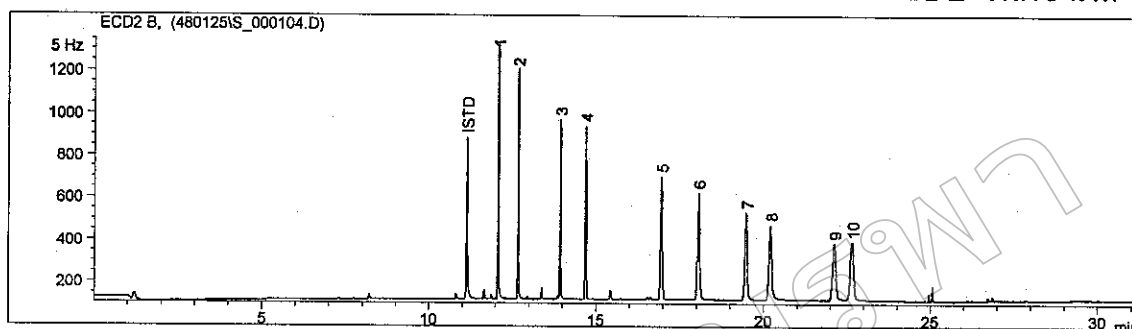
Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C อุณหภูมิคงที่นาน 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 160°C นาน 3 นาที, ในส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

ผลโปรแกรมอุณหภูมิแบบ G, H และ I แสดง ดังภาพที่ 11

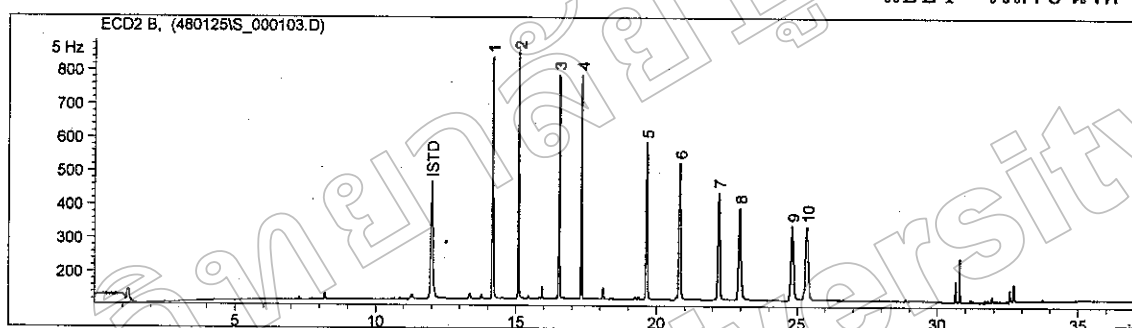


ภาพที่ 9 แสดงสภาวะ C และ D ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 85 และ 95°C

แบบ E เวลา 5 นาที

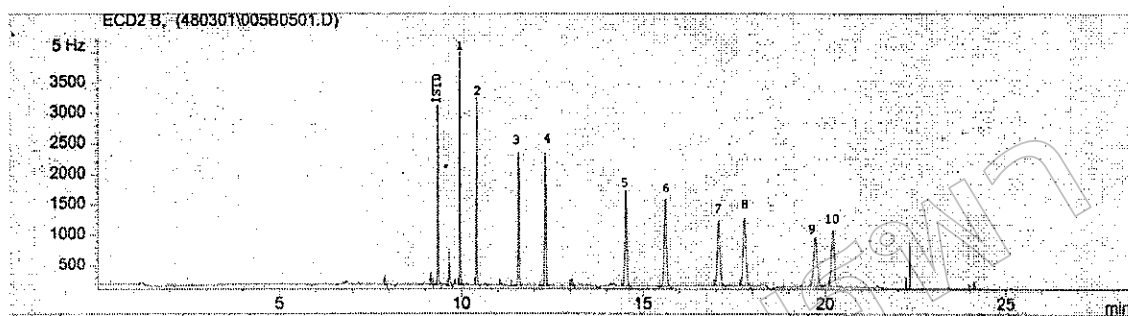


แบบ F เวลา 8 นาที

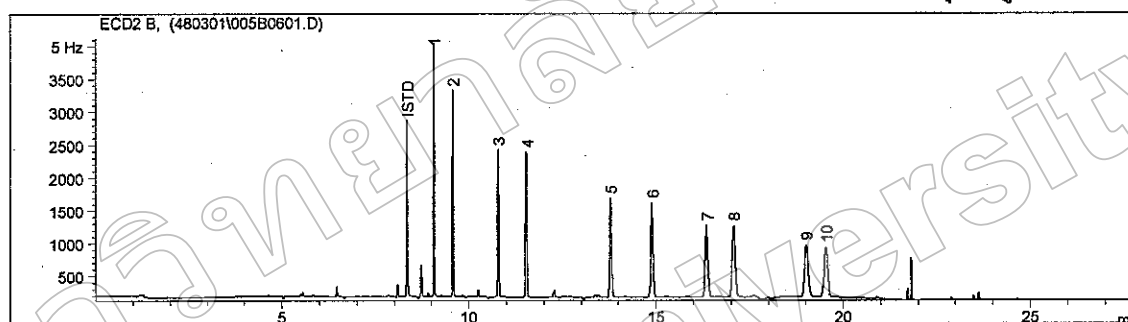


ภาพที่ 10 แสดงโครมาโตแกรมสภาวะ E และ F เวลาคงที่ ที่ 5 และ 8 นาที

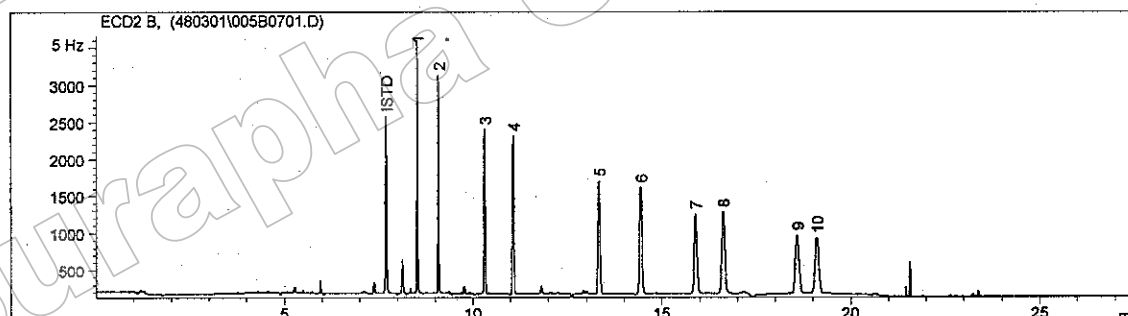
แบบ G อุณหภูมิ 130°C



แบบ H อุณหภูมิ 150°C



แบบ I อุณหภูมิ 160°C



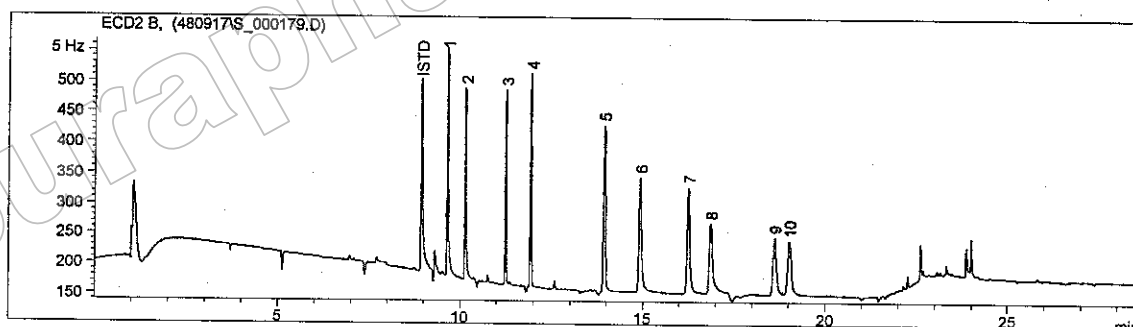
ภาพที่ 11 แสดงโครมาโตแกรมสภาวะ G, H และ I อุณหภูมิคงที่ 130, 150 และ 160°C

ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

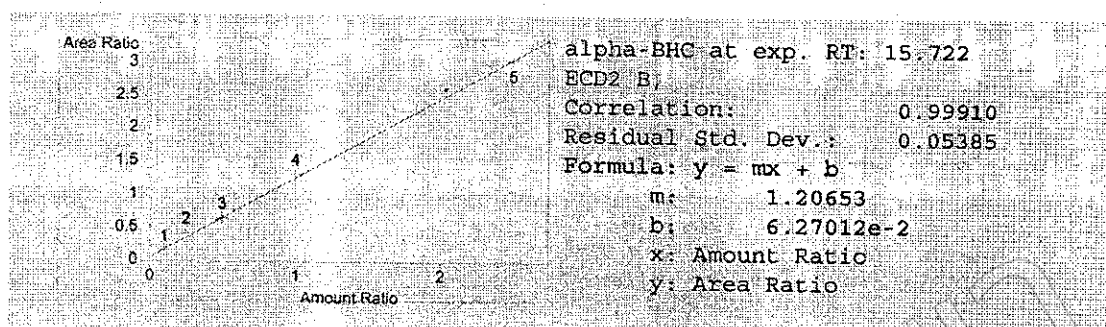
1. เลือกใช้โปรแกรมอุณหภูมิ แบบ D ซึ่งหาได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของ เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-อิเล็กตรอนแคปเจอร์ (GC-ECD) ดังรายละเอียดต่อไปนี้ สภาวะของ เครื่องที่ใช้ เวลา Splitless 3 นาที อุณหภูมิในช่องฉีดตัวอย่าง 250°C ตัวพาแก๊ส ฮีเลียม / ไนโตรเจน 75 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ที่ใช้ HP 5 (5% phenyl methyl silicone) 2.5 mm. x 30 m. ความหนาฟิล์ม $0.25\ \mu\text{m}$. อัตราไหล 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที โปรแกรมอุณหภูมิ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C อุณหภูมิคงที่นาน 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 140°C อุณหภูมิคงที่นาน 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 20°C ต่อนาที ถึง 200°C อุณหภูมิคงที่นาน 10 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 300°C อุณหภูมิคงที่นาน 6 นาที ดีเทคเตอร์ (ECD) ใช้อุณหภูมิคงที่ 330°C

2. การสร้างกราฟมาตรฐาน นำสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เตรียมในข้อ 4.4 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD ตามสภาวะ ดังข้อ 1 วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง แสดงผลโครมาโตแกรมดังภาพที่ 12 จำนวนค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD, Standard Deviation) หาค่า ความชัน (m, slope) จุดตัดแกน y (b, intercept) และ ค่าความเป็นเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน (r^2) แสดงตัวอย่างดัง ภาพที่ 13

ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 250 ppb ด้วยเครื่อง GC-ECD จำนวนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของความเข้มข้น และ ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ แสดงผลดังตารางที่ 1 และ 2



ภาพที่ 12 แสดงโครมาโตแกรมของ สารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 10 ppb



ภาพที่ 13 แสดงกราฟมาตรฐาน และ ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของ alpha-BHC ในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงค่า SD ของสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 250 ppb ที่มี Internal Standard 100 ppb (n=5)

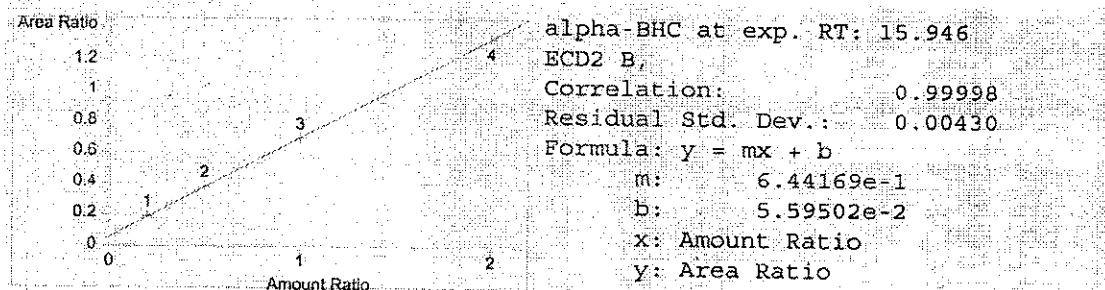
สาร	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)				
	10 ppb	25 ppb	50 ppb	100 ppb	250 ppb
alpha-BHC	0.256	0.398	0.180	0.377	1.415
gamma-BHC	0.397	0.652	0.477	0.753	2.296
Heptachlor	0.916	1.260	2.753	2.854	5.200
Aldrin	0.171	0.759	0.496	1.266	1.018
Alpha-Endosulfan	0.298	0.836	0.624	1.387	2.210
DDE	0.291	0.819	0.598	1.414	0.760
Beta-Endosulfan	0.491	1.039	1.102	1.956	1.616
DDD	0.656	1.442	2.565	3.733	2.430
Endosulfan Sulfate	0.603	0.755	0.779	1.171	3.506
DDT	0.739	1.615	2.277	3.8763	5.929

ตารางที่ 2 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆของกราฟมาตรฐานสารออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 250 ppb ที่มี Internal Standard 100 ppb (n=5)

สาร	m	b	r^2	Residual SD.
alpha-BHC	1.206	0.063	0.99910	0.054
gamma-BHC	0.870	0.050	0.99899	0.041
Heptachlor	0.576	0.038	0.99820	0.036
Aldrin	0.839	0.035	0.99935	0.032
Alpha-Endosulfan	0.787	0.055	0.99854	0.045
DDE	0.990	0.038	0.99934	0.038
Beta-Endosulfan	0.634	0.037	0.99886	0.032
DDD	1.334	0.056	0.99942	0.048
Endosulfan Sulfate	0.668	0.043	0.99861	0.037
DDT	0.363	0.004	0.99904	0.019

กำหนดให้ m = ความชันของกราฟ, b = จุดตัดแกน y ของกราฟ, r^2 = Correlation Coefficient

3. การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of Detection, LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ (Limit of Quantitation, LOQ) นำสารละลายมาตรฐานผสมออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 1.0, 2.5, 5.0, และ 10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เตรียมในข้อ 4.5 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง สร้างกราฟมาตรฐาน แสดงดังภาพที่ 14 หา ค่าความชัน (m) จุดตัดแกน y (b) และค่าความเป็นเส้นตรง ดังตารางที่ 3 แสดง กราฟมาตรฐาน ตัวอย่างดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดงกราฟมาตรฐานของ alpha-BHC ที่ความเข้มข้น 1.0, 2.5, 5.0, และ 10 ppb

ตารางที่ 3 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆของกราฟมาตรฐานสารออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1.0, 2.5, 5.0 และ 10.0 ppb ที่มี Internal Standard 5.0 ppb (n=5)

สาร	m	b	r^2	Residual SD.
alpha-BHC	0.644	0.056	0.99998	0.004
gamma-BHC	0.376	0.231	0.99945	0.012
Heptachlor	0.521	0.057	0.99952	0.016
Aldrin	0.535	0.179	0.98272	0.097
Alpha-Endosulfan	0.702	0.052	0.99997	0.006
DDE	0.778	0.048	0.99990	0.010
Beta-Endosulfan	0.486	0.046	0.99899	0.021
DDD	0.992	0.116	0.99926	0.037
Endosulfan Sulfate	0.671	0.084	0.99899	0.029
DDT	0.390	0.022	0.99937	0.013

กำหนดให้ m = ความชันของกราฟ b = จุดตัดแกน y ของกราฟ

r^2 = Correlation Coefficient

ผลการคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเข้มข้น จากการฉีด 5 ครั้ง แสดงผลดังตารางที่ 4 และผลการคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น แสดงผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 แสดงค่า %RSD ของสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1.0, 2.5, และ 10.0 ppb ที่มี Internal Standard 5.0 ppb (n=5)

สาร	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)			
	1 ppb	2.5 ppb	5 ppb	10 ppb
alpha-BHC	0.40	0.72	0.34	0.16
gamma-BHC	5.50	2.44	1.26	0.33
Heptachlor	15.70	3.88	3.24	2.28
Aldrin	17.60	4.64	0.34	0.90
Alpha-Endosulfan	5.80	1.04	0.82	1.10
DDE	6.60	1.24	1.32	0.79
Beta-Endosulfan	6.80	0.88	1.12	1.15
DDD	18.90	1.96	1.42	0.49
Endosulfan Sulfate	6.10	1.00	1.56	1.31
DDT	0.70	3.44	1.74	0.73

ตารางที่ 5 แสดงค่า SD ของสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1.0 2.5 5.0 และ 10.0 ppb ที่มี Internal Standard 5.0 ppb (n=5)

สาร	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)			
	1 ppb	2.5 ppb	5 ppb	10 ppb
alpha-BHC	0.004	0.018	0.017	0.016
gamma-BHC	0.055	0.061	0.063	0.033
Heptachlor	0.157	0.097	0.162	0.228
Aldrin	0.176	0.116	0.017	0.090
Alpha-Endosulfan	0.058	0.026	0.041	0.110
DDE	0.066	0.031	0.066	0.079
Beta-Endosulfan	0.068	0.022	0.056	0.115
DDD	0.189	0.049	0.071	0.049
Endosulfan Sulfate	0.061	0.025	0.093	0.131
DDT	0.007	0.086	0.086	0.073

การหาค่า LOD และ LOQ จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สร้างกราฟระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและความเข้มข้น โดยใช้ข้อมูลในตารางที่ 5 จะได้กราฟที่มีจุดตัดแกน y (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้น (แกน x) เท่ากับศูนย์ มีค่าเป็น SD_0 กำหนดให้ค่า LOD เท่ากับ $3 SD_0$ และค่า LOQ เท่ากับ $10 SD_0$ แสดงค่า LOD, LOQ และ SD_0 ของสารมาตรฐานทั้ง 10 ชนิด ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ (LOQ) (n=5)

สาร	SD ₀	LOD(ppb)	LOQ(ppb)
alpha-BHC	0.01	0.03	0.10
gamma-BHC	0.07	0.20	0.65
Heptachlor	0.11	0.33	1.10
Aldrin	0.14	0.42	1.39
Alpha-Endosulfan	0.02	0.07	0.25
DDE	0.05	0.14	0.46
Beta-Endosulfan	0.03	0.09	0.31
DDD	0.14	0.42	1.39
Endosulfan Sulfate	0.03	0.09	0.32
DDT	0.04	0.12	0.42

การหาค่า LOD และ LOQ จากกราฟมาตรฐานระหว่างแกน y เท่ากับ Area Ratio และแกน x เท่ากับ Amount Ratio โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของกราฟมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1.0, 2.5, 5.0 และ 10 ppb จากตารางที่ 3

ตัวอย่างการคำนวณสารแอลฟา-บีเอชซี โดยพิจารณาจากค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่แสดงในตารางที่ 3 หรือ ภาพที่ 27

$$\begin{aligned}
 \text{Area สาร/Area ISTD (Area ratio) ที่ 5 ppb} &= 104.85/78.16 = 0.745 \\
 \text{จุดตัดแกน y (b)} &= 0.056 \\
 \% \text{ ความเข้มข้นสารที่จุดตัดแกน y} &= (0.056 \times 100)/0.745 = 7.51\% \\
 \% \text{ ความเข้มข้นสารที่จุดตัดแกน x} &= 7.51/\text{slope} = 7.51/0.64 = 11.66\% \\
 \text{คิดเป็นความเข้มข้นที่จุดตัดแกน x (LOD)} &= (11.66 \times \text{Amount Ratio})/100 \\
 &= (11.66 \times 2)/100 \\
 &= 0.23 \text{ ppb} \\
 \text{LOQ} &= 3 \text{ LOD} = 3 \times 0.23 = 0.70
 \end{aligned}$$

ผลการคำนวณค่า LOD และ LOQ โดยใช้กราฟมาตรฐาน ช่วงความเข้มข้น 1.0 ถึง 10 ppb
คำนวณที่ความเข้มข้น 5 ppb ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการคำนวณค่า LOD และ LOQ จากกราฟมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 ถึง 10 ppb

สาร	จุดตัดแกน y	Area Ratio	%สารแกน y slope	%สารแกน x	LOD	LOQ	
alpha-BHC	0.056	0.745	7.51	0.64	11.66	0.23	0.70
gamma-BHC	0.023	0.644	3.59	0.38	9.54	0.19	0.57
Heptachlor	0.057	0.605	9.42	0.52	18.10	0.36	1.09
Aldrin	0.179	0.806	22.20	0.53	41.75	0.83	2.50
Alpha-Endosulfan	0.052	0.816	6.37	0.70	9.08	0.18	0.54
DDE	0.048	0.873	5.50	0.78	7.07	0.14	0.42
Beta-Endosulfan	0.046	0.562	8.19	0.49	16.83	0.34	1.01
DDD	0.116	1.172	9.90	0.99	9.98	0.20	0.60
Endosulfan Sulfate	0.084	0.798	10.52	0.67	15.67	0.31	0.94
DDT	0.022	0.437	5.04	0.39	12.92	0.26	0.77

4. การหาค่าความเที่ยง (Precision) เป็นตัวเลขที่แสดงค่าความแม่นยำของผล ที่ได้จาก การวิเคราะห์ซ้ำๆ กันหลายครั้ง แสดงโดยคำนวณเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ดังตารางที่ 4 และ แสดงโดยคำนวณเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังตารางที่ 5

5. ค่าความถูกต้อง (Accuracy) เป็นค่าที่แสดงความใกล้เคียงค่าแท้จริง (true value) มากที่สุด โดยคำนวณเป็นค่าร้อยละการกลับคืน

การหาค่าร้อยละการกลับคืน นำสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เตรียมในข้อ 4.4 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD ตามสภาวะที่ได้ตั้งข้อ 5 โดยใช้กราฟมาตรฐานที่ได้ในข้อ 6.1 ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 8 ครั้ง คำนวณหาค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน และค่าร้อยละการกลับคืน

ตารางที่ 8 แสดงค่าความถูกต้องของผลการศึกษาร้อยละการกลับคืนของสารละลายมาตรฐาน
ออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิดที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 250 ppb ที่มี Internal Standard
100 ppb (n=8)

สาร	ความเข้มข้น 50 ppb	ความเข้มข้น 100 ppb	ความเข้มข้น 250 ppb
	% Recovery $\pm$ SD	% Recovery $\pm$ SD	% Recovery $\pm$ SD
alpha-BHC	98.50 $\pm$ 1.01	102.87 $\pm$ 1.54	98.73 $\pm$ 0.13
gamma-BHC	98.89 $\pm$ 1.29	103.30 $\pm$ 2.12	98.42 $\pm$ 0.53
Heptachlor	85.60 $\pm$ 3.86	97.48 $\pm$ 6.22	92.80 $\pm$ 2.59
Aldrin	97.80 $\pm$ 2.49	102.91 $\pm$ 1.86	99.52 $\pm$ 0.51
Alpha-Endosulfan	100.82 $\pm$ 1.14	104.61 $\pm$ 2.30	98.05 $\pm$ 0.56
DDE	96.64 $\pm$ 2.81	102.45 $\pm$ 2.54	99.17 $\pm$ 0.42
Beta-Endosulfan	100.81 $\pm$ 2.71	104.49 $\pm$ 2.03	98.83 $\pm$ 1.28
DDD	104.98 $\pm$ 3.05	104.79 $\pm$ 5.00	101.90 $\pm$ 2.12
Endosulfan Sulfate	100.63 $\pm$ 0.99	106.83 $\pm$ 4.81	97.86 $\pm$ 1.49
DDT	97.74 $\pm$ 3.57	100.32 $\pm$ 4.10	97.48 $\pm$ 3.59

ตารางที่ 9 แสดงค่าความถูกต้อง ในรูปความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิดที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 250 ppb ที่มี Internal Standard 100 ppb (n=8)

สาร	ความเข้มข้น 50 ppb		ความเข้มข้น 100 ppb		ความเข้มข้น 250 ppb	
	ความเข้มข้นเฉลี่ย		ความเข้มข้นเฉลี่ย		ความเข้มข้นเฉลี่ย	
	(ppb ± SD)	%RSD	(ppb ± SD)	%RSD	(ppb ± SD)	%RSD
alpha-BHC	49.25 ± 0.50	1.02	102.87 ± 1.54	1.50	246.82 ± 0.31	0.13
gamma-BHC	49.45 ± 0.64	1.30	103.30 ± 2.12	2.05	246.06 ± 1.33	0.54
Heptachlor	42.80 ± 1.93	4.51	97.48 ± 6.22	6.38	231.99 ± 6.47	2.79
Aldrin	48.90 ± 1.25	2.55	102.91 ± 1.86	1.80	248.81 ± 1.28	0.51
Alpha-Endosulfan	50.41 ± 1.14	2.25	104.61 ± 2.30	2.20	245.12 ± 1.40	0.57
DDE	48.32 ± 1.41	2.91	102.45 ± 2.54	2.48	247.93 ± 1.05	0.42
Beta-Endosulfan	50.41 ± 1.36	2.69	104.49 ± 2.03	1.94	247.08 ± 1.28	0.52
DDD	52.49 ± 3.05	5.80	104.79 ± 5.00	4.77	254.75 ± 5.30	2.08
Endosulfan Sulfate	50.32 ± 0.99	1.96	106.83 ± 4.81	3.91	244.65 ± 3.73	1.52
DDT	48.87 ± 2.79	5.71	100.32 ± 4.10	4.09	243.70 ± 5.47	2.24

การศึกษาการเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างโดยทั่วไปจะมี 4 ขั้นตอนหลัก คือ 1. การจัดการตัวอย่าง (Matrix Modification) 2. การสกัด 3. การขจัดสิ่งรบกวน และ 4. การตรวจวัด ซึ่งการตรวจวัดในขั้นตอนที่ 4 ได้กระทำศึกษาไปก่อนแล้วข้างต้น ในหัวข้อศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารประกอบออร์กาโนคลอรีน และหัวข้อศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ส่วนขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอื่นที่เหลือ จะทำการศึกษาเฉพาะขั้นตอนการจัดการตัวอย่าง และ ขั้นตอนการขจัดสิ่งรบกวน

เนื่องจากขั้นตอนการจัดการตัวอย่าง เริ่มต้นจากการตกตะกอนน้ำมันด้วยอะซีโตน และ กรองตะกอนด้วย Solid Phase จึงมีหัวข้อศึกษา 2 หัวข้อ คือ 1. ศึกษาการใช้ Solid Phase สำหรับ กรองตะกอนนม และหาตัวชะคอลัมน์ที่เหมาะสม และ 2. ศึกษาไขมันในน้ำมัน มีผลต่อค่าร้อยละ การกลับคืนในน้ำมันโค

ส่วนขั้นตอนการขจัดสิ่งรบกวนมีหัวข้อศึกษา 3 หัวข้อ คือ 1. ศึกษาการดีแอกติเวต-อะลูมินัมออกไซด์ ด้วยกรดซัลฟูริก 2. ศึกษาการขจัดสิ่งรบกวนด้วยแอกติเวตฟลอริซิล และหาตัวชะคอลัมน์ที่เหมาะสม และ 3. การเปรียบเทียบการขจัดสิ่งรบกวนด้วยแอกติเวตฟลอริซิล และ

ดีแอกติเวตฟลอริซิล

- ศึกษาการใช้ Solid Phase สำหรับกรองตะกอนและหาตัวชะลอกลับคืนที่เหมาะสม

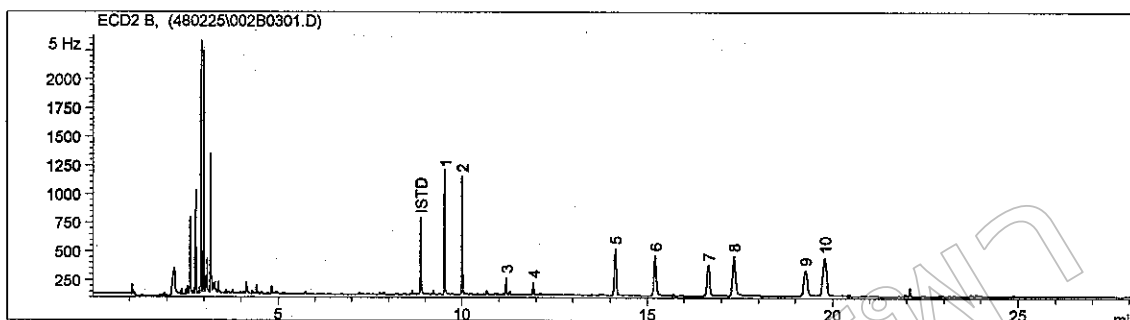
1.1 หาค่าร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ความเข้มข้น 100 ppb ที่มี Internal Standard 100 ppb โดยเปรียบเทียบ Solid Phase ระหว่าง อะลูมินัมออกไซด์ และ ซีโลท 545 แสดงผลในตารางที่ 10 และโครมาโตแกรมภาพที่ 15

1.2 การหาปริมาณที่เหมาะสมของอะซีโตน ในการชะสารมาตรฐานออกจากตะกอนและตัวกรองได้ทั้งหมด แสดงโครมาโตแกรมภาพที่ 16

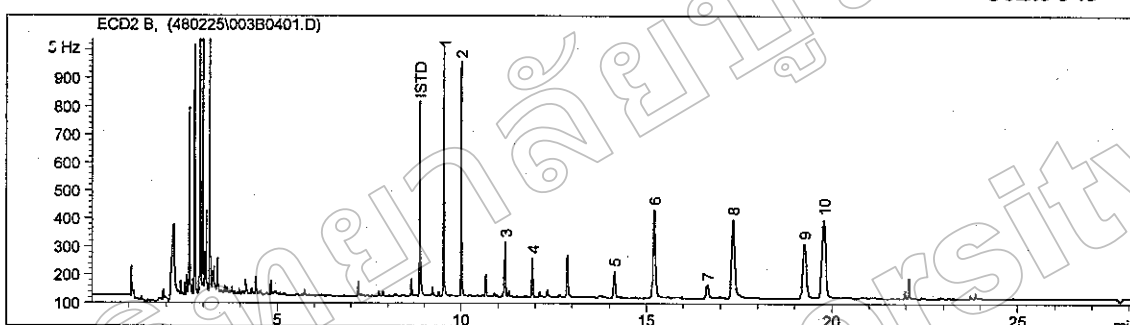
ตารางที่ 10 แสดงค่าร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ความเข้มข้น 100 ppb ที่มี Internal Standard 100 ppb เปรียบเทียบ Solid Phase ระหว่าง Aluminum Oxide และ Celite 545 (n=4)

สาร	Aluminum Oxide $\pm$ SD	Celite 545 $\pm$ SD
alpha-BHC	83.86 $\pm$ 1.47	86.96 $\pm$ 20.59
gamma-BHC	92.78 $\pm$ 3.50	94.37 $\pm$ 20.89
Heptachlor	28.54 $\pm$ 7.77	39.15 $\pm$ 4.65
Aldrin	19.62 $\pm$ 5.57	22.62 $\pm$ 4.25
Alpha-Endosulfan	94.36 $\pm$ 4.97	82.56 $\pm$ 4.19
DDE	83.46 $\pm$ 0.63	110.81 $\pm$ 49.63
Beta-Endosulfan	105.77 $\pm$ 5.56	70.66 $\pm$ 7.15
DDD	110.30 $\pm$ 5.57	124.76 $\pm$ 37.98
Endosulfan Sulfate	144.39 $\pm$ 3.68	113.63 $\pm$ 18.39
DDT	109.50 $\pm$ 8.55	129.26 $\pm$ 45.80

Aluminum Oxide



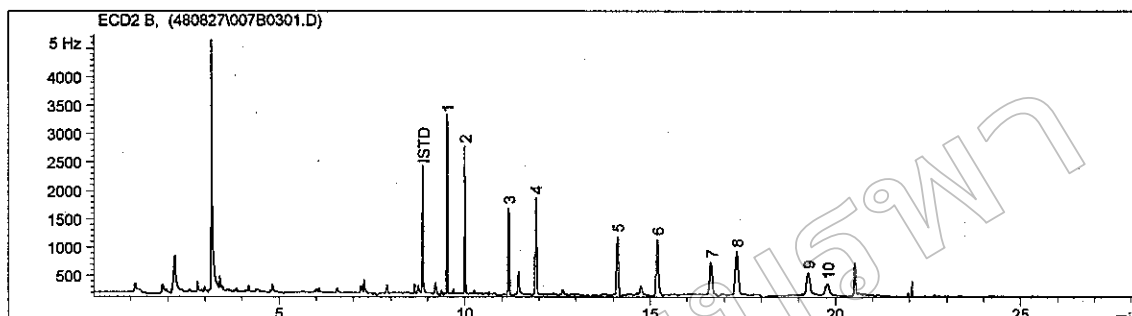
Celite 545



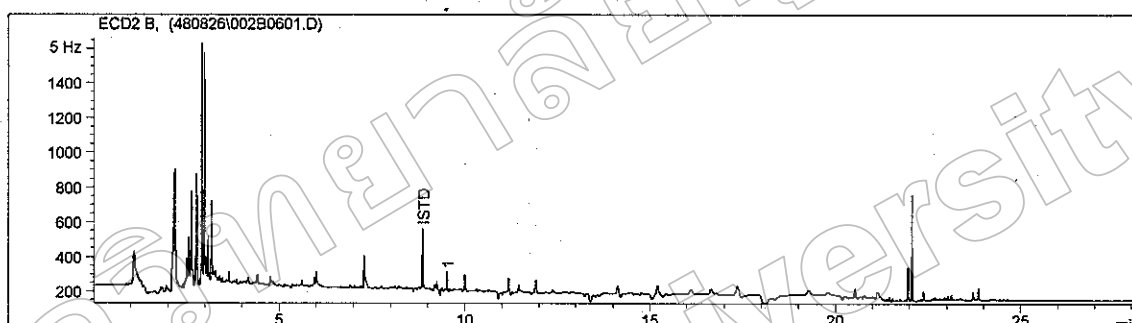
ภาพที่ 15 แสดงโครมาโตแกรมเปรียบเทียบระหว่าง Aluminum Oxide และ Celite 545

ผลการหาปริมาณที่เหมาะสมของอะซีโตน ต้องใช้อะซีโตนอย่างน้อย 60 มิลลิลิตร
ในการชะสารมาตรฐานออกจากตะกอนและตัวกรองได้ทั้งหมด

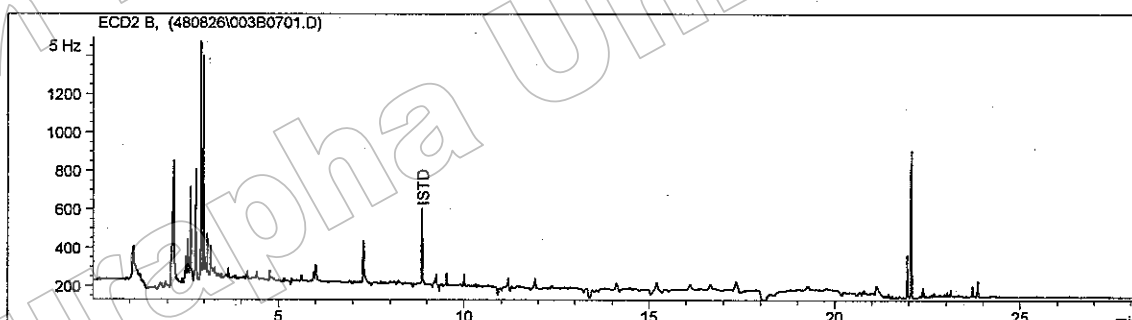
ล้างคอลัมน์ด้วยอะซีโตน 40 มิลลิลิตร



ล้างคอลัมน์ซ้ำครั้งแรกด้วย อะซีโตน 20 มิลลิลิตร



ล้างคอลัมน์ซ้ำครั้งที่ 2 ด้วย อะซีโตน 20 มิลลิลิตร



ภาพที่ 16 แสดงโครมาโตแกรมหลังการชะคอลัมน์อะคูมินัมออกไซด์ ด้วยอะซีโตน 40 มิลลิลิตร
และซ้ำอีก 5 ครั้งๆละ 20 มิลลิลิตร

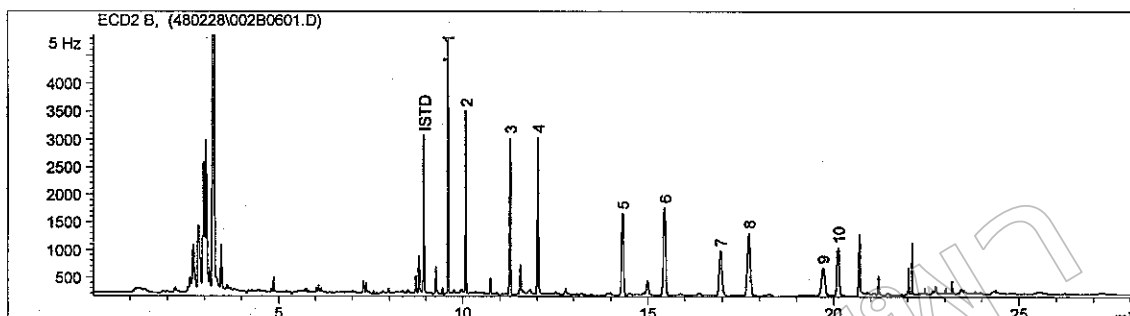
2. ศึกษาไขมันในน้ำมัน มีผลต่อค่าร้อยละการกลับคืนในน้ำมันโค

แสดงผลของค่าร้อยละการกลับคืนเกี่ยวข้องกับไขมันในน้ำมัน โดยเลือกใช้แอกติเวตอะลูมินัมออกไซด์เป็นตัวกรองตะกอนและ ชะด้วยอะซีโตน 60 มิลลิลิตร แสดงผลในตารางที่ 11 และโครมาโตแกรมในภาพที่ 17

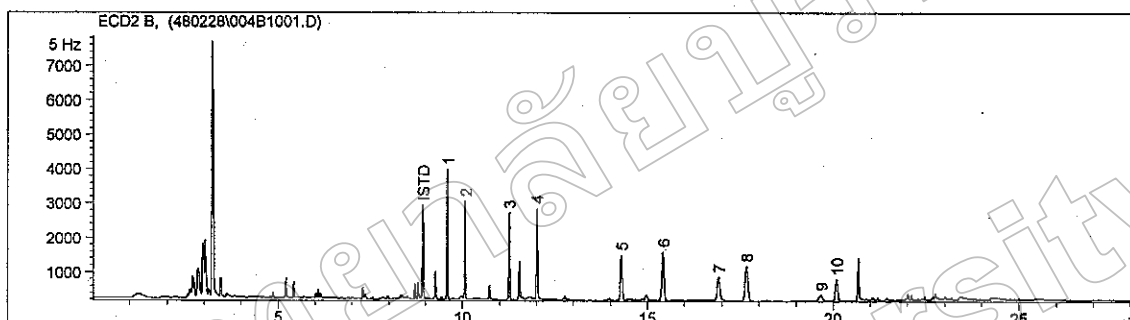
ตารางที่ 11 แสดงค่าร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ความเข้มข้น 100 ppb ที่มี Internal Standard 100 ppb ในน้ำมันและน้ำมันที่มีการเติม น้ำมันพืช 0.2 มิลลิลิตร (n=4)

สาร	% Recovery			
	น้ำ ± SD	น้ำ+oil ± SD	น้ำมัน ± SD	นม+oil ± SD
alpha-BHC	83.86 ± 1.47	91.06 ± 1.97	101.72 ± 10.59	91.96 ± 2.10
gamma-BHC	92.78 ± 3.50	99.21 ± 3.33	98.73 ± 4.27	88.11 ± 4.41
Heptachlor	28.54 ± 7.77	93.80 ± 2.66	108.45 ± 1.57	96.30 ± 3.22
Aldrin	19.62 ± 5.57	90.65 ± 4.90	116.59 ± 7.99	109.08 ± 5.57
Alpha-Endosulfan	94.36 ± 4.97	92.63 ± 4.51	102.17 ± 3.07	92.95 ± 3.76
DDE	83.46 ± 0.63	88.38 ± 5.75	116.98 ± 10.28	106.65 ± 3.46
Beta-Endosulfan	105.77 ± 5.565	88.88 ± 5.44	99.45 ± 0.64	87.97 ± 4.57
DDD	110.30 ± 5.57	83.05 ± 7.14	122.02 ± 1.75	108.07 ± 4.00
Endosulfan Sulfate	144.36 ± 3.68	89.66 ± 6.78	144.39 ± 3.68	66.66 ± 22.46
DDT	109.50 ± 8.55	84.63 ± 9.71	90.25 ± 0.96	48.28 ± 30.53

น้ำมัน + STD



น้ำมัน + น้ำมันพืช + STD



ภาพที่ 17 แสดงโครมาโตแกรมเปรียบเทียบระหว่างน้ำมันและน้ำมันที่มีการเติม น้ำมันพืช
0.2 มิลลิลิตร

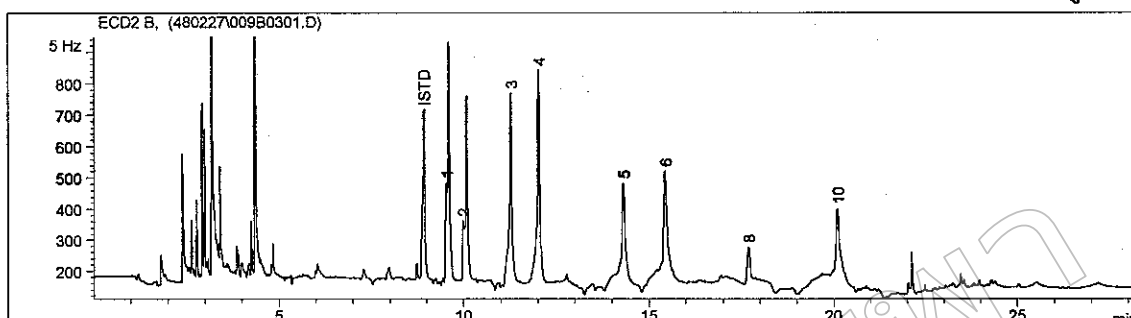
3. ศึกษาการดีแอกติเวตเตทอะลูมิเนียมออกไซด์ ด้วยกรดซัลฟูริก

การเปลี่ยนการดีแอกติเวตอะลูมิเนียมออกไซด์จากน้ำเป็นกรดซัลฟูริก เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในขั้นตอนการจัดตั้งรบกวนของดีแอกติเวตอะลูมิเนียมออกไซด์ เพื่อจะเปลี่ยนสารรบกวนประเภทที่ไม่มีขั้วให้เป็นสารประเภทมีขั้ว โดยสารรบกวนจะถูกไฮโดรไลซ์ที่คอลัมน์และถูกดูดซับไว้ เฉพาะสารประเภทไขมัน ในการทดลองจะทำทดลองที่ความเข้มข้นของกรดต่าง ๆ แสดงผลการทดลองในตารางที่ 12 และแสดงโครมาโตแกรมดัง ภาพที่ 18

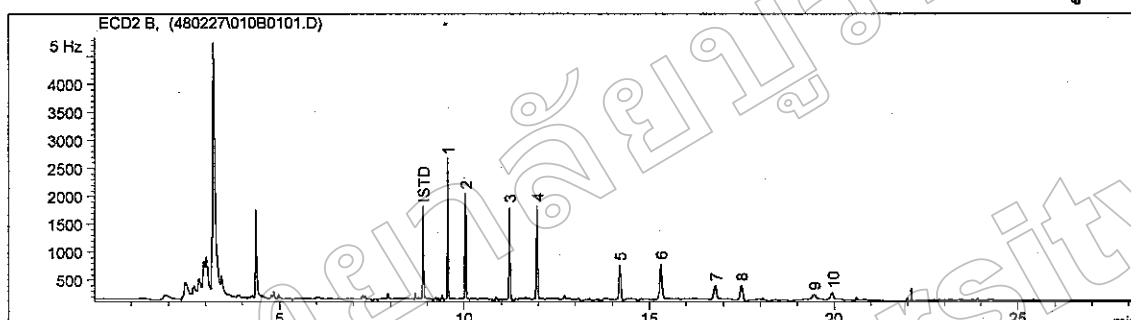
ตารางที่ 12 แสดงค่าร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 ppb ที่มี Internal Standard 100 ppb โดยใช้กรดซัลฟูริกในอะลูมิเนียมออกไซด์ 7 กรัม ที่ความเข้มข้นกรดร้อยละ 0, 10, 25 และ 50 (n=4)

สาร	% Recovery			
	0% ± SD	10% ± SD	25% ± SD	50% ± SD
alpha-BHC	91.06 ± 1.97	87.85 ± 1.83	101.27 ± 2.01	102.51 ± 2.32
gamma-BHC	99.21 ± 3.33	82.09 ± 2.35	96.60 ± 2.56	99.19 ± 3.54
Heptachlor	93.80 ± 2.66	67.05 ± 2.36	83.68 ± 4.51	87.59 ± 5.32
Aldrin	90.65 ± 4.90	86.43 ± 3.63	102.04 ± 3.14	101.38 ± 3.11
Alpha-Endosulfan	92.63 ± 4.51	78.09 ± 6.36	98.57 ± 4.25	98.48 ± 5.69
DDE	88.38 ± 5.75	73.51 ± 4.71	95.07 ± 3.56	101.86 ± 4.78
Beta-Endosulfan	88.88 ± 5.44	69.73 ± 6.95	84.15 ± 5.42	-
DDD	83.05 ± 7.14	71.90 ± 4.51	93.73 ± 1.97	101.24 ± 5.23
Endosulfan Sulfate	89.66 ± 6.78	137.35 ± 20.89	91.24 ± 5.38	-
DDT	84.63 ± 6.78	-	56.27 ± 6.39	78.92 ± 5.49

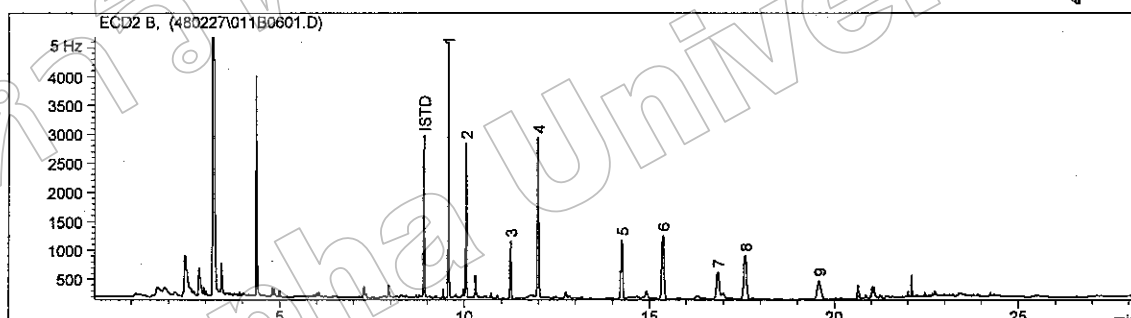
50% กรดซัลฟูริก



25% กรดซัลฟูริก



10% กรดซัลฟูริก

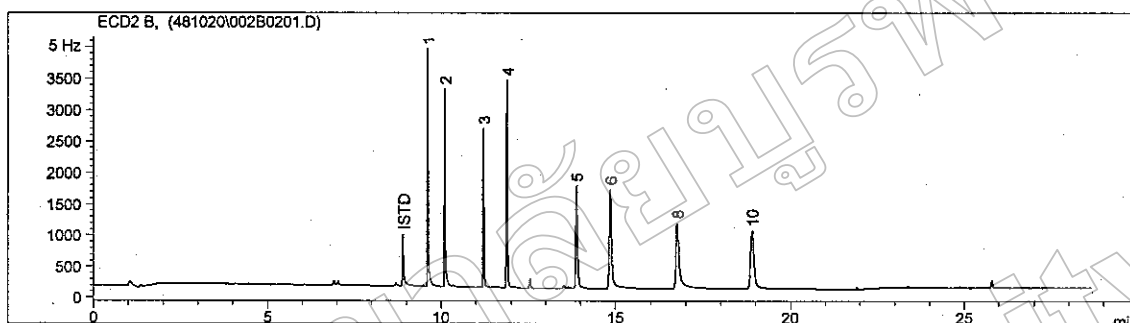


ภาพที่ 18 แสดงผลการ Deactivate อะลูมินัมออกไซด์ด้วย 50, 25 และ 10% กรดซัลฟูริก

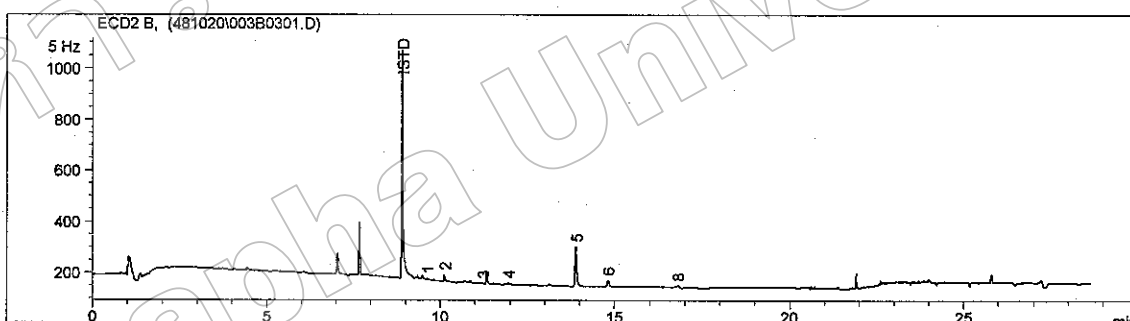
4. ศึกษาการจัดตั้งรบกวนด้วยแอกติเวตฟลูออริซิล และหาตัวชะคอัลมันน์ที่เหมาะสม

4.1 การหาปริมาณตัวชะที่เหมาะสมสำหรับแอกติเวตฟลูออริซิล เพื่อศึกษาหา

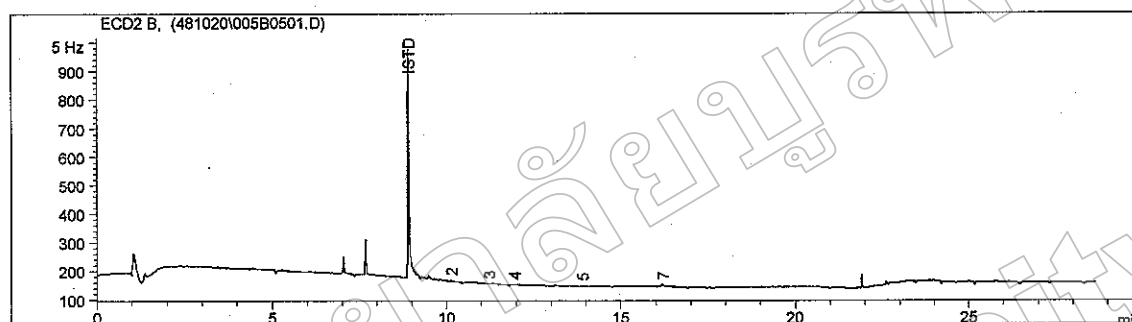
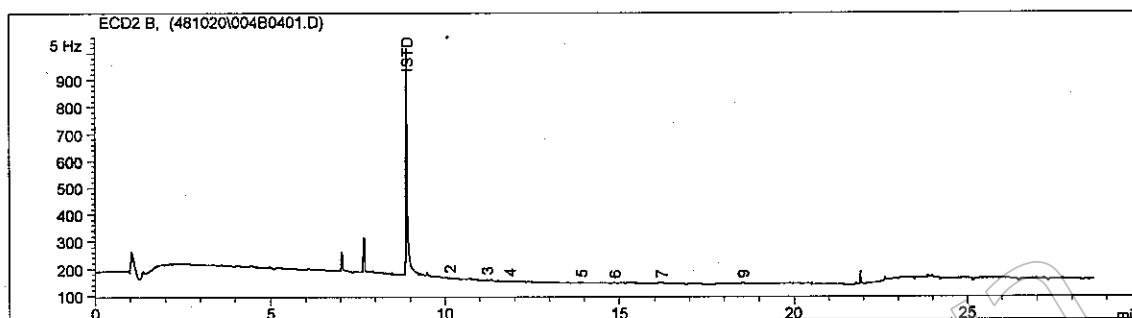
ปริมาณเฮกเซน, สารละลาย 9% และ 15% สารละลายไดเอทิลอีเทอร์:เฮกเซน (v/v) ที่ใช้ในการชะคอัลมันน์ในปริมาณที่น้อยหรือเหมาะสมที่สุด ในการดึงสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนทั้งหมดออกจากแอกติเวตฟลูออริซิล ในสถานะที่ยังไม่มีตัวอย่างน้ำมัน แสดงในภาพที่ 19 ถึง ภาพที่ 23



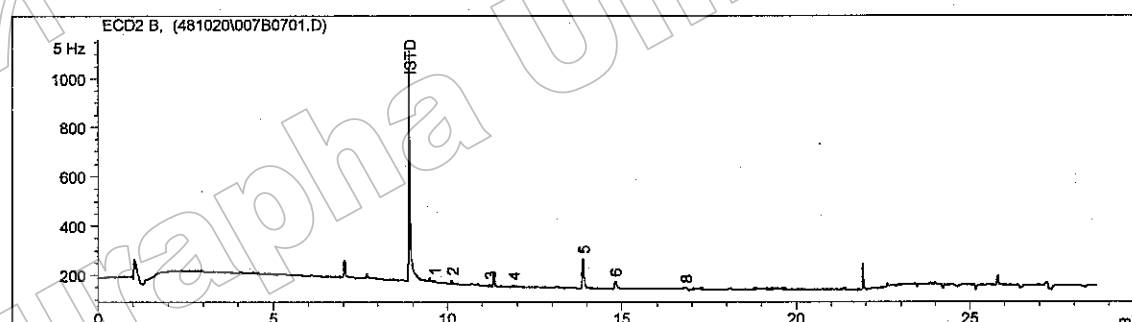
ภาพที่ 19 แสดงโครมาโตแกรมที่ผ่านการชะแอกติเวตฟลูออริซิลด้วย เฮกเซน 50 มิลลิลิตร



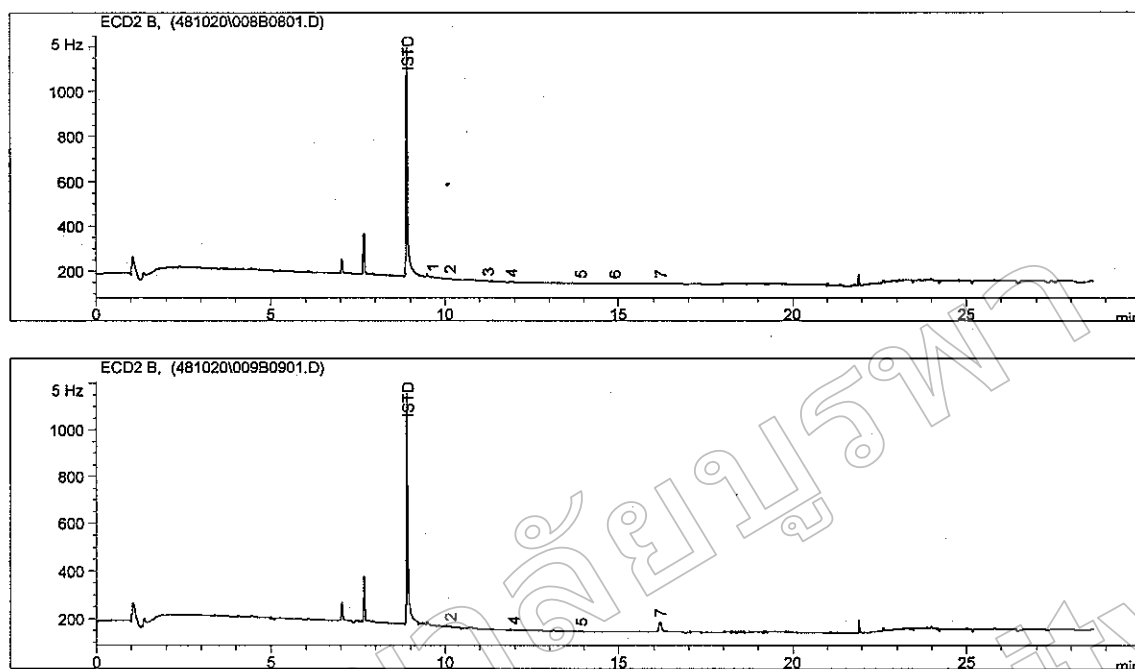
ภาพที่ 20 แสดงโครมาโตแกรมที่ผ่านการชะแอกติเวตฟลูออริซิลซ้ำด้วย 9% สารละลายไดเอทิลอีเทอร์:เฮกเซน (v/v) 30 มิลลิลิตร หลังผ่านการชะด้วยเฮกเซน 50 มิลลิลิตร ภาพที่ 19



ภาพที่ 21 แสดงโครมาโตแกรมที่ผ่านการชะแอกติเวตฟลอร์ซิลซ์ด้วย 9% สารละลายไดเอทิล-
อีเทอร์: เฮกเซน (v/v) 10 มิลลิลิตร ซ้ำสองครั้ง



ภาพที่ 22 แสดงโครมาโตแกรมที่ผ่านการชะแอกติเวตฟลอร์ซิลซ์ด้วย 15% สารละลายไดเอทิล-
อีเทอร์: เฮกเซน (v/v) 30 มิลลิลิตร หลังผ่านการชะด้วยเฮกเซน 50 มิลลิลิตร ภาพที่ 19



ภาพที่ 23 แสดงโครมาโตแกรมที่ผ่านการชะแอกติเวตฟลอร์ซิลด้วย 15% สารละลายไดเอทิล-
อีเทอร์: เฮกเซน (v/v) 10 มิลลิลิตร ซ้ำสองครั้ง

5. การเปรียบเทียบระหว่างแอกติเวตฟลอริซิด และ ดีแอกติเวตฟลอริซิด เพื่อศึกษาผลของค่าร้อยละการกลับคืนของสารละลายมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนคลอรีน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอกติเวตฟลอริซิดด้วยน้ำโดยใช้ ตัวชะเป็นเฮกเซน 50 มิลลิลิตร ตามด้วย 15% สารละลายไดเอทิลอีเทอร์:เฮกเซน (v/v) 40 มิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 13 และแสดงโครมาโตแกรมภาพที่ 24

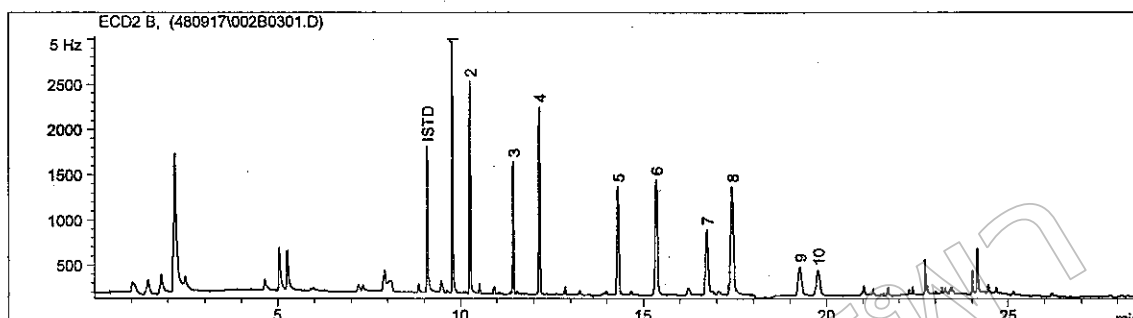
ตารางที่ 13 แสดงค่าร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน 10 ชนิด ความเข้มข้น 100 ppb ที่มี Internal Standard 100 ppb เปรียบเทียบระหว่างแอกติเวตฟลอริซิด และ ดีแอกติเวตฟลอริซิด โดยใช้ตัวชะเป็นเฮกเซน และ 15% สารละลายไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน (n=2)

สาร	% Recovery	
	Activated $\pm$ RPD	Deactivated $\pm$ RPD
alpha-BHC	99.74 $\pm$ 0.37	91.08 $\pm$ 3.09
gamma-BHC	98.05 $\pm$ 2.75	87.12 $\pm$ 3.54
Heptachlor	99.24 $\pm$ 1.07	96.77 $\pm$ 1.06
Aldrin	97.99 $\pm$ 7.09	88.97 $\pm$ 3.12
Alpha-Endosulfan	93.40 $\pm$ 9.34	81.22 $\pm$ 2.10
DDE	90.93 $\pm$ 13.12	75.09 $\pm$ 2.37
Beta-Endosulfan	92.11 $\pm$ 11.16	80.42 $\pm$ 0.41
DDD	95.89 $\pm$ 5.82	82.86 $\pm$ 2.66
Endosulfan Sulfate	66.90 $\pm$ 4.39	91.27 $\pm$ 12.35
DDT	90.12 $\pm$ 13.97	84.36 $\pm$ 11.44

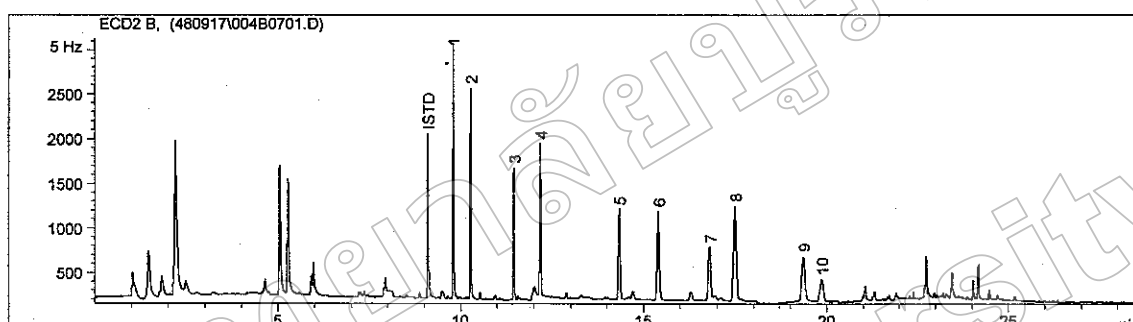
RPD = relative percent different

$$= \frac{(X_{\max} - X_{\min}) \times 100}{X_{\text{mean}}}$$

แก๊สโครมาโทกราฟี



แก๊สโครมาโทกราฟี

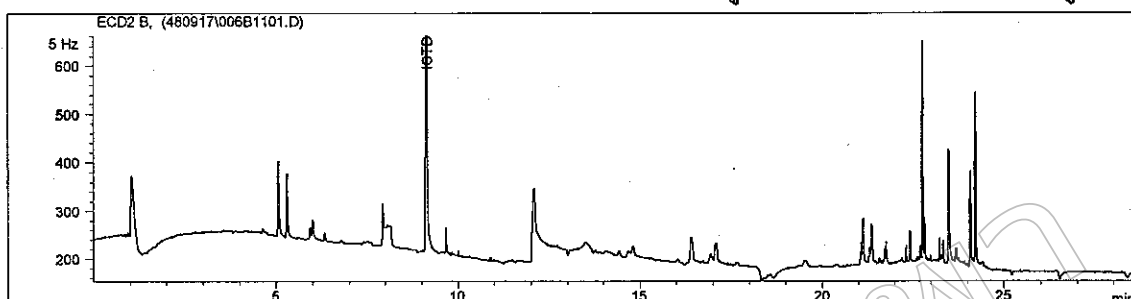


ภาพที่ 24 แสดงโครมาโทแกรมตัวอย่างที่ผ่านแก๊สโครมาโทกราฟีและแก๊สโครมาโทกราฟี

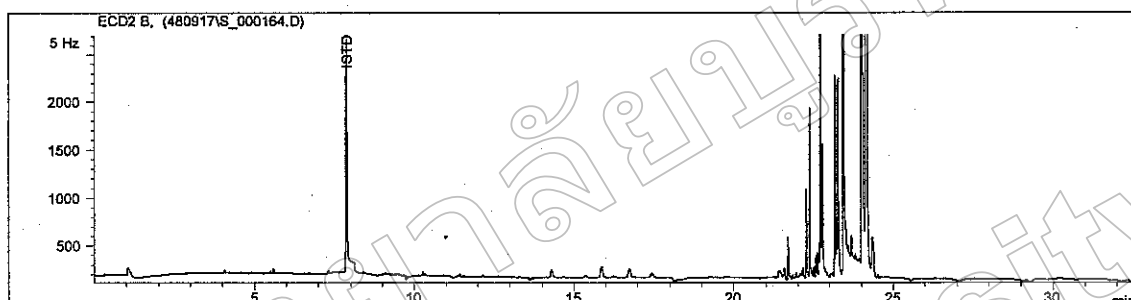
ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันโค จากจังหวัดราชบุรีจำนวน 36 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างน้ำมัน 10 กรัม ตกตะกอนด้วยอะซีโตน 60 มิลลิลิตร กรองตะกอนด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี 3 กรัม ล้างตะกอนด้วยอะซีโตน 60 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศนาน 20 นาที สกัดด้วยเฮกเซน 3 ครั้งๆละ 10 มิลลิลิตร และกำจัดสิ่งรบกวนด้วย แก๊สโครมาโทกราฟี 25% กรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร จำนวน 7 กรัม สะท้อนด้วย เฮกเซน 50 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้ง ด้วยชุด KD และปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร และนำไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี อีเล็กตรอนแคปเจอร์ ดีเทคเตอร์ 2 ไมโครลิตร ผลการทดลองพบว่า ไม่พบสารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีนทั้ง 10 ชนิด ในตัวอย่างน้ำมัน แสดงโครมาโทแกรมผลการทดลองในภาพที่ 25

ผ่าน ดีแอกติเวตอะลูมินัมออกไซด์ (25% กรดซัลฟูริก)



ไม่ผ่านการขจัดสิ่งรบกวน



ภาพที่ 25 แสดงโครมาโตแกรมระหว่างตัวอย่างที่ผ่านการขจัดสิ่งรบกวนด้วย ดีแอกติเวต-อะลูมินัมออกไซด์ (25% กรดซัลฟูริก) และไม่ได้ผ่านการขจัดสิ่งรบกวน

ตารางที่ 14 แสดง การเปรียบเทียบปริมาณการใช้ตัวทำละลายในวิธีต่าง ๆ

Step	Technique		
	Conventional	Deactivated Al_2O_3	Deactivated florisil
Matrix Modification	Methanol 100 ml. Sodium oxalate 1 g.	Acetone 120 ml.	Acetone 120 ml.
Extraction	Petroleum ether 100 ml. Ether 100 ml.	Hexane 30 ml.*	Hexane 30 ml.*
Clean up	Petroleum ether 50 ml. Ether 42 ml. Petroleum ether 358 ml.	Hexane 15 ml. Hexane 50 ml.	Hexane 15 ml. Ether 7.5 ml. Hexane 92.5 ml.
Detection	Adjust 10 ml. Petroleum ether	Adjust 1 ml. Hexane	Adjust 1 ml. Hexane

Conventional = Leon,. (1996). AOAC Official method 970.52, Deactivated Al_2O_3 (25% กรดซัลฟูริก)แสดงวิธีในภาพที่ 6, Deactivated florisil แสดงวิธีในภาพที่ 7

* ไม่เกิดอิมัลชันในการสกัด