

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง

1. ตาข่ายสำหรับจับตัวอย่างปลา
2. ถังพลาสติกสำหรับบรรจุตัวอย่าง
3. กระดิกน้ำแข็ง
4. ขวดโพลีเอทิลีน

อุปกรณ์สำหรับการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

1. เครื่องแก้ว
2. คอลัมน์แกวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร
3. ชุด Kuderna – Danish concentrator
4. เข็มฉีดยาตัวอย่าง (microsyringe) ขนาด 100 ไมโครลิตรของ Hamilton
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 4 ตำแหน่งของ Sartorius
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 5 ตำแหน่งของ Mettler
7. เครื่องระเหยสุญญากาศชนิดหมุน (Rotary evaporator) ของ Buchi รุ่น RE111
8. เครื่องทำความเย็น (cooling bath) ของ DT Hetotherm
9. เครื่องอัลตราโซนิก ของ Crest รุ่น 275 D ที่ความถี่ 50/60 Hz
10. ตู้อบ (oven) ของ Gallenkamp
11. เข็มฉีดยาตัวอย่าง (microsyringe) ขนาด 10 , 250 ไมโครลิตรของบริษัท Hewlett

Packard

12. เครื่องบดตัวอย่างปลา ของ Mitsubishi
13. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

สารเคมี

161143

1. เฮกเซน (Hexane) เกรด HPLC ของ Fisher Scientific

๑
6๗๔.๓๐7
๗ 6๗4๘
๑

2. อะซีโตน (Acetone) เกรด HPLC ของ Fisher Scientific
3. ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) เกรด PR ของ Carlo Erba
4. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) เกรด HPLC ของ Fisher Scientific
5. อะซีโตนไทรล์ (Acetonitril) เกรด HPLC ของ Fisher Scientific
6. ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) เกรด AR ของ Mallinckrodt
7. เฮกเซน (Hexane) เกรด AR ของ Mallinckrodt
8. 2,4,5,6- Tetrachloro-*m*-xylene 200 ppm ในตัวทำละลาย เมททานอลของบริษัท

Supelco ซึ่งใช้เป็น internal standard

9. ฟลอริซิล (Florasil) ขนาด 60-100 mesh PR grade ของ Carlo Erba
10. โซเดียมซัลเฟต (anhydrous sodium sulfate) เกรด organic trace analysis ของ

Merck

11. น้ำกลั่น 2 ครั้ง
12. แก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์สูง (ultra high purity nitrogen) 99.999%
13. แก๊สฮีเลียมฮีเลียมบริสุทธิ์สูง (ultra high purity helium) 99.999%
14. สารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 2000 ppm จำนวน 16 ชนิดในตัวทำละลายผสมของ Hexane 50% และ Toluene 50% ของ Supelco มีดังนี้

- 14.1 อัลดริน (aldrin)
- 14.2 แอลฟา-บีเอชซี (α -BHC)
- 14.3 เบตา-บีเอชซี (β -BHC)
- 14.4 เดลตา-บีเอชซี (δ -BHC)
- 14.5 แกมมา-บีเอชซี (γ -BHC)
- 14.6 พารา-พารา-ดีดีดี (p,p'-DDD)
- 14.7 พารา-พารา-ดีดีอี (p,p'-DDE)
- 14.8 พารา-พารา-ดีดีที (p,p'-DDT)
- 14.9 ดีลดริน (dieldrin)
- 14.10 เอนโดซัลฟาน I (endosulfan I)
- 14.11 เอนโดซัลฟาน II (endosulfan II)
- 14.12 เอนโดซัลฟาน ซัลเฟต (endosulfan sulfate)
- 14.13 เอนดริน (endrin)
- 14.14 เอนดริน อัลดีไฮด์ (endrin aldehyde)

14.15 เฮปตาคลอร์ (heptachlor)

14.16 เฮปตาคลอร์ อีพอกไซด์ (heptachlor epoxide)

เครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์

1. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-อิเล็กตรอนแคปเจอร์ (GC-ECD) รุ่น HP 5890 ของ Hewlett Packard คอลัมน์ Ultra 2 ความยาว 25 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร เคลือบด้วย 5% phenyl methyl silicone หน้า 0.52 ไมโครเมตร
2. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) รุ่น HP5972A ของ Hewlett Packard คอลัมน์ HP-5 MS ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร เคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane หน้า 0.25 ไมโครเมตร

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมเครื่องแก้ว นำเครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองมาทำความสะอาด โดยนำยาล้างเครื่องแก้ว ล้างน้ำประปา ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วชะด้วยอะซิโตน อบที่อุณหภูมิ 180-200 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ยกเว้นเครื่องแก้ววัดปริมาตร ชะด้วยตัวทำละลายก่อนนำมาใช้
2. การเก็บและรักษาตัวอย่างปลา เก็บตัวอย่างปลาน้ำจืดแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทั้งที่บ่อเลี้ยงอำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ และสะพานปลา กรุงเทพมหานคร จำนวนที่เก็บดังแสดงในตาราง 1 ทำการวัดขนาดความยาวและชั่งน้ำหนักของปลา หลังจากนั้นแกะเอาแต่เนื้อเยื่อที่รับประทานได้ไม่ติดหนัง นำไปบดด้วยเครื่องบดที่ความเร็วสูงจนละเอียด เก็บใส่ขวดโพลีเอทิลีนแช่เย็นที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
3. การเตรียมสารเคมี
 - 3.1 การแอคติเวตฟลูออริซิล นำฟลูออริซิลอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
 - 3.2 การเตรียมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต นำแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตอบที่อุณหภูมิ 150-200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
 - 3.3 การเตรียมสารละลายออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 100 ppm โดยปีเปตสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 2000 ppm ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร
 - 3.4 การเตรียมสารละลายออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 10 ppm โดยปีเปตสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร

ตารางที่ 1 จำนวนการเก็บตัวอย่างปลาน้ำจืดที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของปลา	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวน(ตัว)
ปลาหมอ	<i>Anabas teatudineus</i>	20-25
ปลาช่อน	<i>Channa striatus</i>	10-12
ปลานุ้	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	12-15
ปลาทับทิม	<i>Oreochromis niloticus</i>	10-12
ปลาฉลาม	<i>Notopterus notopterus</i>	15-20
ปลาตะเพียน	<i>Barbodes gonionotus</i>	10-15
ปลานิล	<i>Oreochromis niloticus</i>	10-15
ปลาไน	<i>Cyprinus carpio</i>	15-20
ปลาสลิค	<i>Trichogaster pectoralis</i>	30-35
ปลากระดี่	<i>Trichogaster microlepis</i>	100-120
กุ้งกุลาดำ	<i>Penaeus monodon</i>	100-110

หมายเหตุ : เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 1 สิงหาคม 2544 ถึง 30 พฤศจิกายน 2544

3.5 การเตรียมสารละลายออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 1 ppm โดยปีเปิดสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร

3.6 การเตรียมสารละลาย 2,4,5,6- tetrachloro-*m*- xylene ความเข้มข้น 10 ppm โดยปีเปิดสารละลายมาตรฐาน 2,4,5,6- tetrachloro-*m*- xylene 200 ppm ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร

3.7 ปีเปิดสารละลายมาตรฐานผสมออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร และสารละลาย 2,4,5,6- tetrachloro-*m*- xylene ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร จะได้สารละลายออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 10 ppb และ

2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สถานะการแยกของ GC-ECD และศึกษาความจำเพาะของสาร

3.8 ปิเปตสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร จะได้สารละลายออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 0.5 ppm และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 5 ppm เพื่อใช้ในการหาสถานะการแยกของเครื่อง GC-MS

3.9 ปิเปตสารละลายออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 0.01, 0.02, 0.04 มิลลิลิตร และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวดตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร จะได้ความเข้มข้นของออร์กาโนคลอรีน 1, 2, 4 ppb และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb เพื่อใช้หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้และหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณวิเคราะห์ได้

3.10 ปิเปตสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 1.20 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 6 ขวดตามลำดับ เติม 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรแต่ละขวด แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร จะได้สารละลายออร์กาโนคลอรีน ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 100, 120 ppb และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb เพื่อใช้ในการศึกษากราฟมาตรฐาน

3.11 เตรียมสารละลายออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 ppb โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 5.00, 10.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด เติมสารละลาย 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb โดยปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร เพื่อใช้ศึกษาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเชิงเส้นของสาร

3.12 ปิเปตสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนผสมที่ความเข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร เติม 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนถึงขีดวัด

ปริมาตร จะได้สารละลายออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 50 และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb เพื่อใช้ศึกษาความเที่ยงระดับที่ 1

3.13 ปิเปตสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 0.05, 0.25, 0.50 มิลลิลิตรลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตรจำนวน 3 ขวด เติม 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวด แล้วปรับปริมาตรด้วย เฮกเซนจนถึงขีดวัดปริมาตร จะได้สารละลายออร์กาโนคลอรีน ความเข้มข้น 10, 50, 100 ppb และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb ตามลำดับเพื่อใช้ศึกษาความเที่ยงระดับที่ 2 และความแม่นยำ

4. หาสภาวะการแยกของสารประกอบออร์กาโนคลอรีน 16 ชนิด

4.1 หาสภาวะการแยกของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ - อิเล็กโตรนแคปเจอร์

(GC-ECD)

นำสารละลายออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 10 ppb ที่มี 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb ที่เตรียมในข้อ 3.7 มาทำการวิเคราะห์ที่สภาวะของเครื่องดังต่อไปนี้ (ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ครั้ง) โปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแสดงในภาพที่ 1

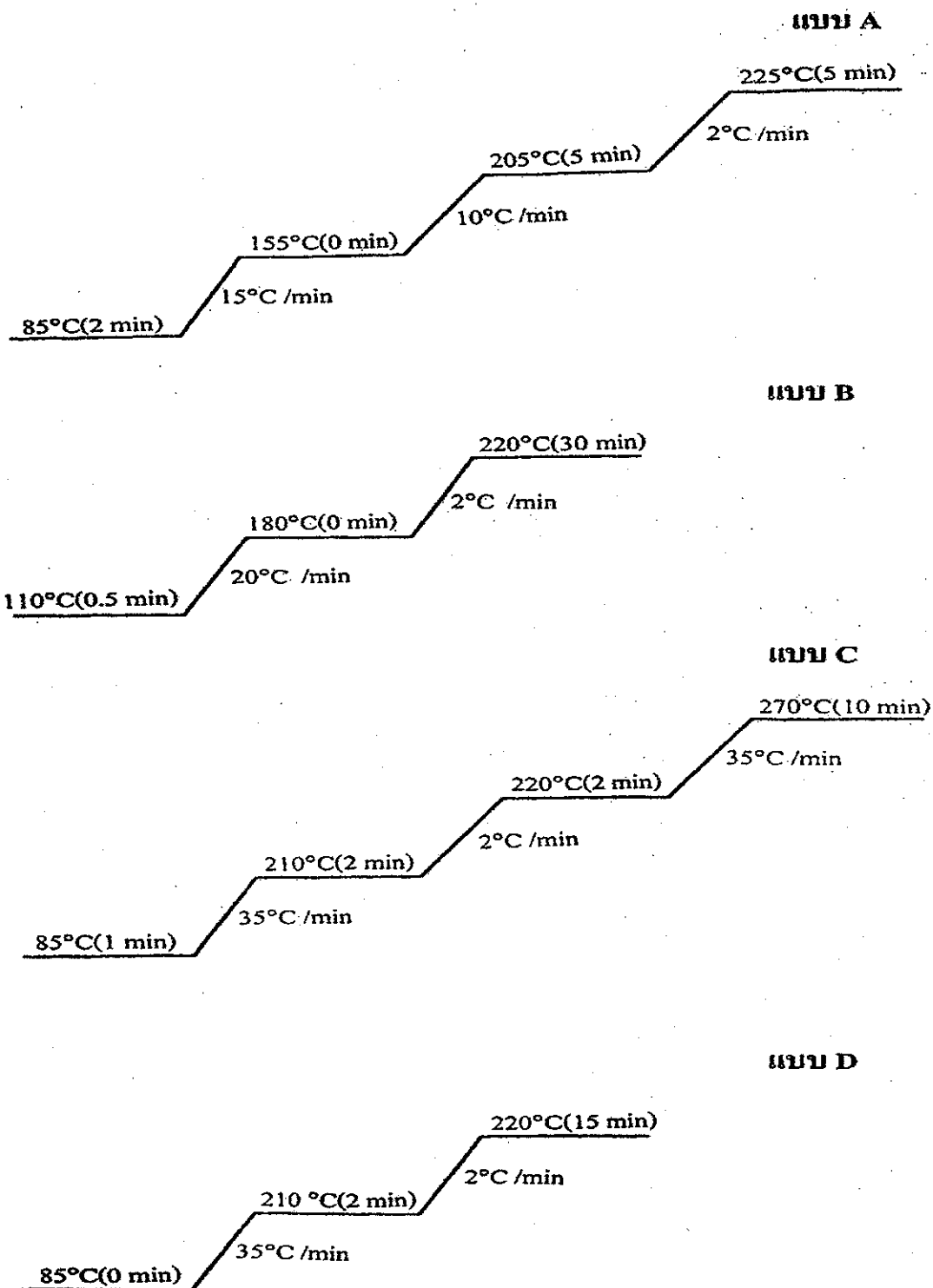
คอลัมน์	Ultra 2 ความยาว 25 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร
	เคลือบด้วย 5% phenyl methyl silicone หน้า 0.52 ไมโครเมตร
แก๊สพา	แก๊สฮีเลียมที่อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
make up gas	แก๊สไนโตรเจนที่ความดัน 40 psi
เทคนิคการฉีด	splitless 1 ไมโครลิตร ที่ purge time 0.5 นาที
อุณหภูมิช่องฉีดสาร	200 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของดีเทคเตอร์	300 องศาเซลเซียส

แบบ A อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 85 °C คงที่ 2 นาที เพิ่มขึ้น 15 °C ต่อนาที จนถึง 155 °C เพิ่มขึ้น 10 °C ต่อนาที จนถึง 205 °C คงที่ 5 นาที เพิ่มขึ้น 2 °C ต่อนาที จนถึง 225 °C คงที่ 5 นาที

แบบ B อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 110 °C คงที่ 0.5 นาที เพิ่มขึ้น 20 °C ต่อนาที จนถึง 180 °C เพิ่มขึ้น 2 °C ต่อนาที จนถึง 220 °C คงที่ 30 นาที

แบบ C อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 85 °C คงที่ 1 นาที เพิ่มขึ้น 35 °C ต่อนาที จนถึง 210 °C เพิ่มขึ้น 2 °C ต่อนาที จนถึง 220 °C คงที่ 2 นาที เพิ่มขึ้น 35 °C ต่อนาที จนถึง 270 °C คงที่ 10 นาที

แบบ D อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 85 °C เพิ่มขึ้น 35 °C ต่อนาที จนถึง 210 °C คงที่ 2 นาที เพิ่มขึ้น 2 °C ต่อนาที จนถึง 220 °C คงที่ 15 นาที



ภาพที่ 1 โปรแกรมอุณหภูมิในการศึกษาการแยกของสารออร์กาโนคลอรีน 16 ชนิดที่ความเข้มข้น 10 ppb มี internal standard 100 ppb ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD

4.2. หาสถานะเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

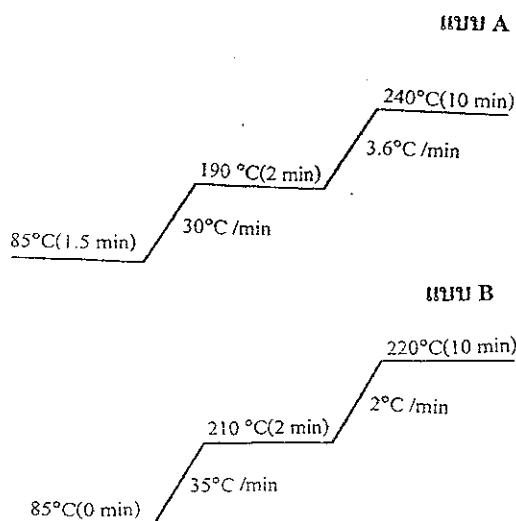
นำสารละลายออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 0.5 ppm ที่มี 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 5 ppm ที่เตรียมในข้อ 3.8 มาทำการวิเคราะห์ที่สถานะของเครื่องดังต่อไปนี้ (ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ชั่วโมง)

คอลัมน์ HP-5 MS (ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร)
เคลือบด้วย 5%phenyl methyl siloxane หนา 0.25 ไมโครเมตร
แก๊สพา แก๊สฮีเลียมที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิตรต่อนาที
เทคนิคการฉีดสาร splitless 1 ไมโครลิตรที่ purge time 0.5 นาที
อุณหภูมิช่องฉีดสาร 200 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิอินเทอร์เฟซ 300 องศาเซลเซียส
ช่วงมวล 50-650
อัตราการสแกนต่อวินาที 1.53
อิเล็กตรอนมัดดีฟายเออร์ 70 eV

โปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแสดงในแผนภาพที่ 2

แบบ A อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 85 °C คงที่ 1.5 นาที เพิ่มขึ้น 30 °C ต่อนาที ถึง 190 °C คงที่ 2 นาที เพิ่มขึ้น 3.6 °C ต่อนาที จนถึง 240 °C คงที่ 10 นาที

แบบ B อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 85 °C เพิ่มขึ้น 35 °C ต่อนาที ถึง 210 °C คงที่ 2 นาที เพิ่มขึ้น 2 °C ต่อนาที จนถึง 220 °C คงที่ 10 นาที



ภาพที่ 2 โปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย GC-MS

5. ศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ทำการวิเคราะห์ (method validation) เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ทำการวิเคราะห์ (จํานงค์ หัยกิจโกศล, 2544) ได้ทำการศึกษาดังนี้คือ

5.1 ความจำเพาะของสาร (specificity) นำสารละลายความเข้มข้นออร์กาโนคลอรีน 10 ppb และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb ที่เตรียมในข้อ 3.7 ไปวิเคราะห์โดยฉีดสารทั้งหมด 3 ครั้ง ตามสภาวะที่เลือกในข้อ 4.1 เพื่อดูค่าการแยก (resolution) และ %RSD ของรีเพนชันใหม่ของสาร

5.2 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of Detection, LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation, LOQ) (จํานงค์ หัยกิจโกศล, 2544)

นำสารละลายความเข้มข้นของออร์กาโนคลอรีน 1, 2, 4 ppb และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb ที่เตรียมในข้อ 3.9 นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-ECD ทำการวิเคราะห์ 7 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) นำค่า SD ที่ได้แต่ละระดับ ความเข้มข้นกับความเข้มข้นของสารมาเขียนกราฟจะได้ค่า SD_0 ณ จุดตัดแกน Y ที่ความเข้มข้นเป็นศูนย์ กำหนดให้ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้มีค่าเป็น 3 เท่าของ SD_0 ตามสมการดังต่อไปนี้

$$LOD = 3 SD_0$$

กำหนดให้ความเข้มข้นต่ำสุดที่หาปริมาณได้มีค่าเป็น 10 เท่าของ SD_0 ตามสมการดังต่อไปนี้

$$LOQ = 10 SD_0$$

5.3 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) นำสารละลายออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 100, 120 ppb และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb ที่เตรียมในข้อ 3.10 นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-ECD วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

5.4 ศึกษาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเชิงเส้น (Linear Dynamic Range, LDR) นำสารละลายออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 ppb ที่มีสารละลาย 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb ที่เตรียมในข้อ 3.11 นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-ECD วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เพื่อสร้างกราฟช่วงความเข้มข้น ที่เป็นเส้นตรง

5.5 ความเที่ยง ระดับที่ 1 (Precision level 1) นำสารละลายออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 50 ppb และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb ที่เตรียมในข้อ 3.12 นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-ECD ฉีดสารทั้งหมด 10 ครั้ง คำนวณค่าความเข้มข้นที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน หา %RSD ของความเข้มข้นสารแต่ละชนิด

5.6 ความเที่ยง ระดับที่ 2 (Precision level 2) นำสารละลายออร์กาโนคลอรีน ความเข้มข้น 10, 50, 100 ppb และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb ที่เตรียมในข้อ 3.13 นำไปวิเคราะห์ โดยฉีดสารความเข้มข้นละ 5 ครั้ง ทำจำนวนค่าความเข้มข้นที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน หา %RSD ของความเข้มข้น สารแต่ละชนิด

5.7 ความแม่นยำ (Accuracy) นำสารละลายออร์กาโนคลอรีนความเข้มข้น 10, 50, 100 ppb และ 2,4,5,6-tetrachloro-*m*-xylene ความเข้มข้น 100 ppb ที่เตรียมในข้อ 3.13 นำไปวิเคราะห์โดยฉีด สารความเข้มข้นละ 5 ครั้ง

คำนวณการร้อยละการกลับคืนของสารแต่ละความเข้มข้น

6 ศึกษาสภาวะในการเตรียมตัวอย่าง

6.1 ศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกส่วน ทำการศึกษาโดยใช้คอลัมน์บรรจุฟลูออริซิล 5 กรัมที่มีไซโคลเฮกซิลเฟออยู่ด้านบน 1 เซนติเมตร จะคอลัมน์จั่นอิมตัวด้วยเฮกเซน อัตราการไหล 2-5 มิลลิลิตรต่อนาที นำสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนที่ความเข้มข้น 100 ppb ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์และศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารดังต่อไปนี้

6.1.1 ชะด้วย 6% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร และชะด้วย 15% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร (แบบ A1) (อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์, 2528)

6.1.2 ชะด้วย 6% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดก้น กลม ขนาด 250 มิลลิลิตร และชะด้วย 50% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร (แบบ A2)

6.1.3 ชะด้วย 6% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซนปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตรชะด้วย 15%(v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซนปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ขวด ก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ชะด้วย 50%(v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ขวดก้นกลม ขนาด 250 มิลลิลิตร (แบบ A3)

6.1.4 ชะด้วยเฮกเซนปริมาตร 100 มิลลิลิตรเก็บในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ชะด้วย 50%(v/v) ไคคลอโรมีเทนในเฮกเซนปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ขวดก้นกลม ขนาด 250 มิลลิลิตร (แบบ B1)

6.1.5 ชะด้วย 20% (v/v) ไคคลอโรมีเทนในเฮกเซนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตรชะด้วย 50% (v/v) ไคคลอโรมีเทนในเฮกเซนปริมาตร

100 มิลลิลิตร ใส่ขวด ก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร (แบบ B2) นิวซัม , แอนดริว และ โคนาเซอร์ (Newsome, Andrews, & Conacher, 1993)

6.1.6 ชะด้วย 20% (v/v) ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตรชะด้วย 50% (v/v) ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซนมี 0.35 %v/v อะซิโตไนโตรล์ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตรใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตรชะด้วย 50% (v/v) ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน มี 1.5 %v/v อะซิโตไนโตรล์ ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตรใส่ขวด ก้น กลมขนาด 250 มิลลิลิตร (แบบ B3) โลเปซ , อาญูลาร์ และ ดาซ์ (Lopez, Aguilar, & Diez, 1992)

6.1.7 ชะด้วย 6% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในปิโตรเลียมอีเทอร์ 100 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตรขนาด 250 มิลลิลิตรชะด้วย 15% (v/v) ไดเอทิล-อีเทอร์ในปิโตรเลียมอีเทอร์ 100 มิลลิลิตรใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ชะด้วย 50% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในปิโตรเลียมอีเทอร์ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดก้น กลมขนาด 250 มิลลิลิตร (แบบ C) โลเปซ , อาญูลาร์ และ ดาซ์ (Lopez, Aguilar, & Diez, 1992)

นำแต่ละขวดที่จะได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศชนิดหมุนให้เหลือ ปริมาตร 2-5 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้มข้นโดยใช้ kuderna-danish concentrator (KD) เติม internal standard ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC-ECD คำนวณค่าร้อยละ กลับคืนเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วน

6.2 ศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วน หลังจากเลือกตัว ทำละลายที่เหมาะสมในข้อ 6.1 แล้วทำการศึกษาปริมาตรที่ใช้โดยนำสารละลายมาตรฐาน ออร์กาโนคลอรีนที่ความเข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ที่บรรจุ ฟลอริชิล 5 กรัมมีโซเดียมอยู่ด้านบน 1 เซนติเมตร แล้วทำการชะด้วย 6% (v/v) ไดเอทิล อีเทอร์ในเฮกเซนปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแบ่งเก็บ 40 มิลลิลิตรใส่ขวดก้น กลมขนาด 250 มิลลิลิตร และชะครั้งต่อไปด้วยปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร อีก 6 ครั้งจนครบ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นชะด้วย 50% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแบ่งเก็บ 60 มิลลิลิตรใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร และ ชะต่อครั้งต่อไปด้วยปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดก้นกลม 25 มิลลิลิตร อีก 4 ครั้งจนครบ 100 มิลลิลิตร นำทั้งหมดไปลดปริมาตร ด้วยเครื่องสูญญากาศชนิดหมุน ให้เหลือปริมาตร 2-5 มิลลิลิตรแล้วทำให้เข้มข้นโดยใช้ KD เติม internal standard ปรับปริมาตร เป็น 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC-ECD เพื่อหาปริมาตรของตัวชะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

6.3 ศึกษาการย่อยและการกลับคืนจากตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกส่วน ทำการศึกษาการย่อยและการกลับคืนจากการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในข้อ 6.1 และปริมาตรที่ใช้ชะในข้อ 6.2 นำมาทำการศึกษาโดยนำสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีน ที่ความเข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (0.1 ไมโครกรัม) ใส่ลงในคอลัมน์ที่บรรจุฟลูออริซิล 5 กรัม ที่มีโซเดียม ซัลเฟตอยู่ด้านบน 1 เซนติเมตร แล้วทำการชะด้วย 6% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ ในเฮกเซนปริมาตร 60 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร และชะต่อด้วย 50% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตร ตามขั้นตอนเหมือนข้อ 6.2 เติม internal standard ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC-ECD กำหนดหาการย่อยและการกลับคืน

6.4 เปรียบเทียบขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปน ทำการศึกษากำจัดสิ่งเจือปน หลังจากการทำสารสกัดด้วยวิธี soxhlet

6.4.1 ขั้นตอนการสกัด ชั่งเนื้อปลาน้ำหนักประมาณ 10 กรัม เติมโซเดียม ซัลเฟต 50 กรัม เพื่อดูดเอาน้ำในเนื้อปลาออก ใส่ใน extraction thimble ทำการสกัดด้วยวิธี soxhlet โดยใช้อัตราส่วนตัว ทำละลายเฮกเซนต่ออะซิโตน 90:10 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการกรองสารละลายที่ได้ใส่ขวดก้นกลม ขนาด 250 มิลลิลิตร ลดปริมาตรด้วยเครื่องสูญญากาศ ชนิดหมุนให้เหลือปริมาตร 2-5 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้มข้นโดยใช้ KD ให้เหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.4.2 ขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปน หลังจากนั้นทำการกำจัดสิ่งเจือปนด้วย คอลัมน์ที่บรรจุฟลูออริซิล 3 กรัม โดยมีโซเดียม ซัลเฟตอยู่ด้านบนประมาณ 1 เซนติเมตร ทำการชะคอลัมน์จนอิมิดด้วยเฮกเซน แล้วใส่สารที่สกัดได้ในข้อ 6.4.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ชะด้วย 6% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน 60 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร และชะต่อด้วย 50% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน 80 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดก้นกลม 250 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรตามขั้นตอนเหมือนข้อ 6.2 เติม internal standard ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC-ECD หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ซ้ำโดยเปลี่ยนจำนวนฟลูออริซิล เป็น 4, 5, 6 กรัม ตามลำดับ เพื่อหาน้ำหนักฟลูออริซิล ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

6.5 ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่าง ชั่งตัวอย่าง เนื้อปลาน้ำหนักประมาณ 10 กรัม ผสมโซเดียมซัลเฟต 50 กรัม เติมสารละลายมาตรฐาน ออร์กาโนคลอรีนที่ความเข้มข้น 40 ng/g ทำการสกัดด้วยวิธี soxhlet ที่อัตราส่วนของตัวทำละลายเฮกเซนต่ออะซิโตน 80:20 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผ่านขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปนและการแยกส่วนตามสถานะที่เหมาะสม ในข้อ 6.4 นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-ECD หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ซ้ำโดยเปลี่ยนตัวทำละลาย ที่สกัดเป็นอัตราส่วน 90:10 เพื่อหาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสม

6.6 ศึกษาปริมาณของตัวอย่างที่นำไปกำจัดสิ่งเจือปนและแยกส่วน ซึ่งตัวอย่างปลานิลน้ำหนักประมาณ 10 กรัม ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยวิธี soxhlet ในข้อ 6.4.1 จนได้ปริมาตรสารที่สกัด 1 มิลลิลิตร ใส่สารที่สกัดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ที่บรรจุฟลูออริซิล 5 กรัม มีโซเดียมซัลเฟตอยู่ด้านบน 1 เซนติเมตร แล้วชะด้วย 6% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน 60 มิลลิลิตร ชะต่อด้วย 50% (v/v) ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน 80 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรเดิม internal standard ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC-ECD หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ซ้ำโดยเปลี่ยนปริมาตรสารที่สกัดเป็น 0.25, 0.75 และ 1 มิลลิลิตรตามลำดับ เพื่อเลือกปริมาตรของตัวอย่างที่เหมาะสมในการทดลอง

6.7 ศึกษาขนาดตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ ซึ่งตัวอย่างเนื้อปลานิลน้ำหนักประมาณ 10 กรัม นำมาวิเคราะห์ โดยผ่านขั้นตอนการ สกัดด้วยวิธี soxhlet ในข้อ 6.4.1 นำสารที่สกัดได้ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร มาผ่านขั้นตอนการ กำจัดสิ่งเจือปน และการแยกส่วนตามสถานะที่เหมาะสมได้จากขั้นตอนต้น ลดปริมาตร เดิม internal standard ปรับ ปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC-ECD ทำการวิเคราะห์ซ้ำโดยเปลี่ยน ขนาดตัวอย่างเป็น 20 และ 30 กรัมตามลำดับ เพื่อหาขนาดของตัวอย่างที่เหมาะสมในการทดลอง

6.8 ศึกษาการสกัดด้วยวิธี sonication ได้ใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิธี soxhlet เพื่อใช้เป็นสถานะในการศึกษาด้วยวิธี Sonication ดังต่อไปนี้

6.8.1 เปรียบเทียบการสกัดด้วยวิธี sonication ที่เวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งตัวอย่างเนื้อปลานิลน้ำหนักประมาณ 10 กรัม ผสมโซเดียมซัลเฟต 50 กรัมใส่ใน ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนที่ความเข้มข้น 24 mg/g ทำการสกัดด้วยวิธี sonication ที่อัตราส่วนของตัวทำละลายเฮกเซนต่อ อะซิโตน 90:10 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิก ใช้เวลา 15 นาที กรองสารละลายที่ได้ใส่ขวดกันกลมและสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้มารวมกัน หลังจากนั้นผ่านขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปนและการแยกส่วนตามลำดับ เติม internal standard วิเคราะห์ด้วย GC-ECD ทำการวิเคราะห์ซ้ำโดยเปลี่ยนเวลาที่สกัดเป็น 30 และ 40 นาที คำนวณการย่อยสลาย กลับคืนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่าง

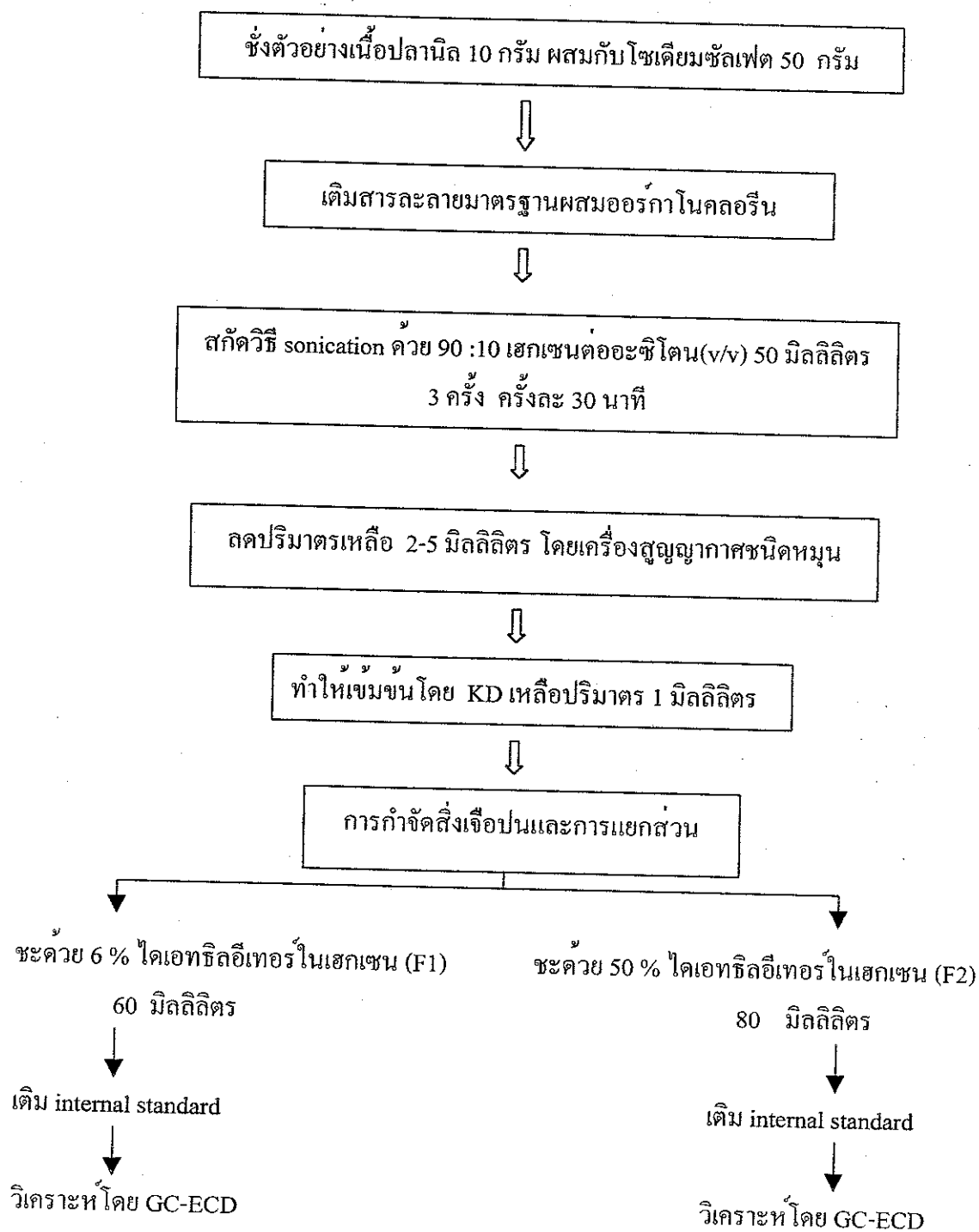
6.8.2 เปรียบเทียบการสกัดด้วยวิธี sonication ที่ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่างกัน ทำการสกัดตัวอย่างตามข้อ 6.8.1 โดยใช้ปริมาตรตัวทำละลายครั้งละ 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 30 นาที ทำการสกัด 1 ครั้ง กรองสารละลายที่ได้ใส่ขวดก้นกลม หลังจากนั้นผ่านขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปน และการแยกส่วนตามลำดับ เติม internal standard วิเคราะห์ด้วย GC-ECD ทำการวิเคราะห์ซ้ำโดยเปลี่ยนจำนวนครั้งที่ใช้สกัดเป็น 2 ครั้ง (ปริมาตรตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร) คำนวณการร้อยละการกลับคืนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่าง

7. หาค่าร้อยละการกลับคืนของสารออร์กาโนคลอรีนโดยเปรียบเทียบระหว่างวิธี soxhlet และ sonication โดเปซ, อาญูการ์ และ ดาซ (Lopez, Aguilar, & Diez, 1992)

7.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาค่าร้อยละการกลับคืน ใช้เนื้อเยื่อปลาฉลามน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน สุ่มเนื้อปลาเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นส่วนที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานผสมออร์กาโนคลอรีน และส่วนที่สองเป็นส่วนที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมออร์กาโนคลอรีน

7.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดระหว่างวิธี sonication และวิธี soxhlet

7.2.1 การสกัดด้วยวิธี sonication ใช้เนื้อปลานิลที่บดละเอียดน้ำหนักประมาณ 10 กรัม ผสม 50 กรัม โซเดียมซัลเฟตเพื่อดูดน้ำในเนื้อปลาออก ใส่ขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 90:10 เฮกเซนต่ออะซิโตน 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิก 30 นาที กรองสารละลายที่สกัดได้ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการสกัดอีกสองครั้ง นำสารที่สกัดได้มารวมกัน ลดปริมาตรด้วยเครื่องสูญญากาศชนิดหมุนให้เหลือปริมาตรประมาณ 2-5 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้มข้นโดยใช้ KD ให้เหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารที่สกัดได้ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผ่านขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปนและการแยกส่วน เติม internal standard ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC-ECD ดังแสดงในภาพ 3



ภาพที่ 3 ฟังการหารอยละการกลับคืนโดยใช้การสกัดวิธี sonication

กำหนดให้ F1 เป็นการเก็บ Fraction ที่ชะด้วย 6 % ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน

กำหนดให้ F2 เป็นการเก็บ Fraction ที่ชะด้วย 50 % ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน

7.2.2 การสกัดด้วยวิธี soxhlet ใช้เนื้อปลานิลที่บดละเอียดน้ำหนักประมาณ 10 กรัม ผสม 50 กรัมโซเดียมซัลเฟตเพื่อดูดน้ำในเนื้อปลาออก ใส่ใน extraction thimble เติมหักทำละลาย 90 : 10 เฮกเซนต่ออะซิโตน 150 มิลลิลิตรลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธี soxhlet ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง กรองสารละลายที่สกัดได้ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ลดปริมาตรตามขั้นตอนเหมือนข้อ 7.2.1 นำสารที่สกัดได้ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผ่านขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปนและการแยกส่วน เติมน internal standard ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย GC-ECD ดังแสดงในภาพที่ 4

7.2.3 ทำการสกัดทั้งวิธี soxhlet และ sonication โดยเติมสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 10 ng/g ตามขั้นตอนการสกัดในข้อ 7.2.1 และ 7.2.2 วิเคราะห์ด้วย GC-ECD หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนผสมความเข้มข้น 24, 40 ng/g กำหนดค่าร้อยละการกลับคืนโดยใช้การคำนวณในข้อ 11.1

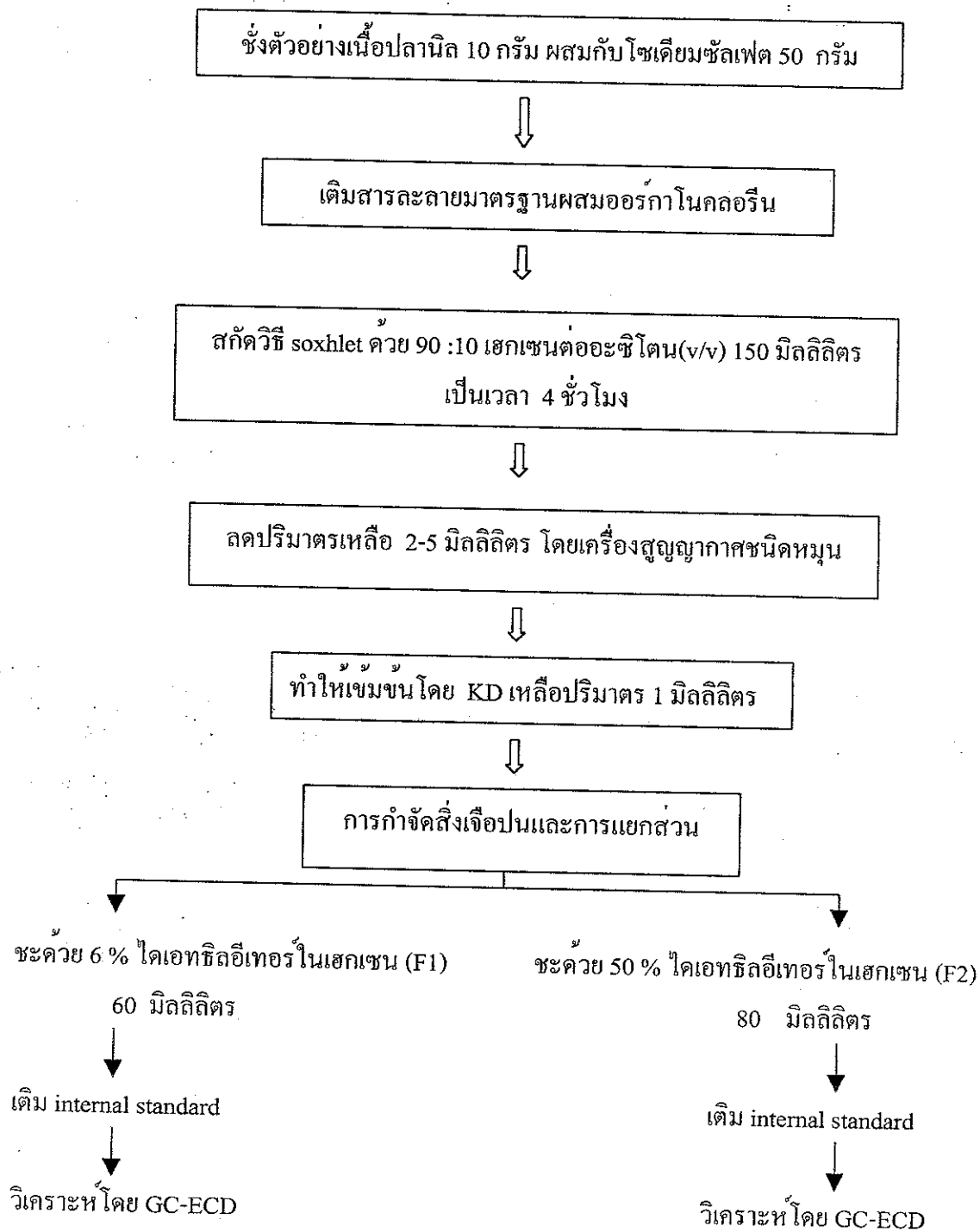
8. การวิเคราะห์ตัวอย่าง นำตัวอย่างเนื้อปลาทั้งที่บดละเอียดอำเภอบางบ่อและสะพานปลาที่บดละเอียดทั้ง 10 ชนิด และเนื้อกุ้งกุลาดำจากอำเภอบางบ่อ ชั่งน้ำหนัก 10 กรัม นำมาทำการสกัดด้วยวิธี sonication ในข้อ 7.2.1 นำไปวิเคราะห์โดยใช้ GC-ECD และตรวจยืนยันผลอีกครั้งโดย GC-MS แสดงในภาพ 5

9. ศึกษาปริมาณไขมันในตัวอย่างปลา ชั่งตัวอย่างปลาน้ำหนักประมาณ 10 กรัม ทำการสกัดด้วยวิธี soxhlet ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่ออะซิโตน 90:10 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำการ soxhlet ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง กรองสารละลายที่สกัดได้ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ลดปริมาตรด้วยเครื่องสูญญากาศชนิดหมุนให้เหลือปริมาตรประมาณ 2-5 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้มข้นโดยใช้ KD ให้เหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดสารที่สกัดได้ 0.25 มิลลิลิตร ใส่ vial อบจนน้ำหนักคงที่ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนำไปชั่งน้ำหนักคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ไขมัน

10. การวิเคราะห์ข้อมูล

10.1 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงคุณภาพเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน และเปรียบเทียบเมสสเปกตรัมของตัวอย่างกับฐานข้อมูล

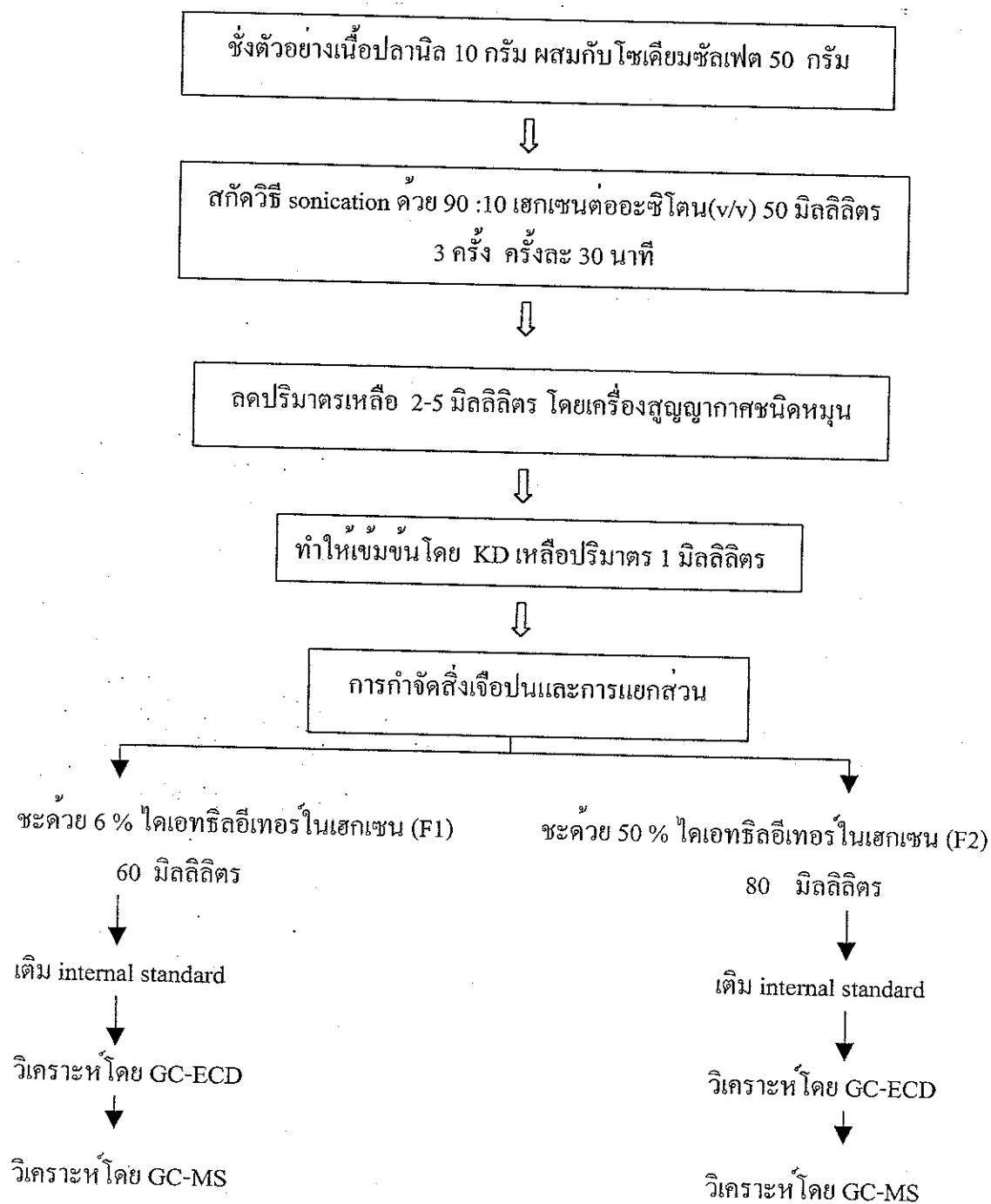
10.2 วิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ Internal Standardization



ภาพที่ 4 ฟังการหาร้อยละการกลับคืนโดยใช้การสกัดวิธี soxhlet

กำหนดให้ F1 เป็นการเก็บ Fraction ที่ชะด้วย 6 % ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน

กำหนดให้ F2 เป็นการเก็บ Fraction ที่ชะด้วย 50 % ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างปลาโดยใช้การสกัดวิธี sonication

กำหนดให้ F1 เป็นการเก็บ Fraction ที่ชะด้วย 6 % ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน

กำหนดให้ F2 เป็นการเก็บ Fraction ที่ชะด้วย 50 % ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน

11. การคำนวณ

11.1 ร้อยละการกลับคืน โดยใช้สูตร

$$((C_d - C_s) \times 100) / C_i$$

C_d = ความเข้มข้นของตัวอย่างปลาที่เดิมสารละลายมาตรฐาน ($\mu\text{g/L}$)

C_s = ความเข้มข้นของตัวอย่างปลา ($\mu\text{g/L}$)

C_i = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ($\mu\text{g/L}$)

11.2 เปอร์เซ็นต์ไขมัน โดยใช้สูตร

$$(100 \times W_a) / W_b$$

W_a = น้ำหนักของไขมันที่ชั่งได้

W_b = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

11.3 การทดสอบแบบ F-test โดยใช้สูตร

$$F = S^2(1) / S^2(2)$$

$S^2(1)$ = ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองโดยวิธีวิเคราะห์ soxhlet

$S^2(2)$ = ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองโดยวิธีวิเคราะห์ sonication

11.4 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) โดยใช้สูตร

$$S.D. = \left[\sum (X - \bar{X})^2 / (N - 1) \right]^{1/2}$$

X = ปริมาณสารประกอบออร์กาโนคลอรีนในแต่ละครั้ง

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออร์กาโนคลอรีน

N = จำนวนครั้งที่ทำการวิเคราะห์

11.5 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

$$RSD = (S.D.) / \bar{X}$$

$$\%RSD = [(S.D.) / \bar{X}] \times 100$$

เมื่อ

RSD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

$S.D.$ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบออร์กาโนคลอรีน

11.6 การทดสอบแบบ T-test โดยใช้สูตร

$$\pm t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}}$$

$\bar{X}_1$ = ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์โดยวิธี soxhlet

$\bar{X}_2$ = ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์โดยวิธี sonication

N_1 = จำนวนครั้งที่ทำการทดสอบโดยวิธี soxhlet

N_2 = จำนวนครั้งที่ทำการทดสอบโดยวิธี sonication

S_p = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวม (pooled standard deviation)

เมื่อ

$$S_p = \sqrt{\frac{(N_1 - 1)S_1^2 + (N_2 - 1)S_2^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$