

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- 1.1 เครื่อง GC-ECD HP6890 Hewlett Packard
- 1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 5 ตำแหน่ง BP210 D Sartorius
- 1.3 ไมโครปิเปต ขนาด 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครลิตร
- 1.4 ตู้อบร้อน (Hot air Oven) Memmert 500
- 1.5 Vortex Mix II
- 1.6 เตาเผาอุณหภูมิสูง CW-2000
- 1.7 อ่างน้ำร้อน Memmert
- 1.8 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator)
 - Rotavapor Buchi R-114
 - Vacuum Controller Buchi B-720
 - Waterbath Buchi B-480
 - Vacuum-system Buchi B-169
 - Refrigeration Neslab RTE-111

2. เครื่องแก้วและอุปกรณ์

- 2.1 ชุดเครื่องแก้ว (Kuderna-Danish, KD)
- 2.2 คอลัมน์แก้วขนาด 25 x 300 มม.
- 2.3 ขวดกั่นกลมปริมาตร 250 มล. ขนาด 29 มม.
- 2.4 กรวยแยกปริมาตร 125 มล.

3. สารเคมี

- 3.1 n-Hexane For The Analysis of Pesticide Residues < 98% CARLO ERBA
- 3.2 Acetone Analytical Reagent 99.5% LAB-SCAN
- 3.3 Diethyl Ether Analytical Reagent A.R. LAB-SCAN
- 3.4 Sodium Sulfate Crystals For Analysis 99.0% CARLO ERBA
- 3.5 Aluminum Oxide (Neutral) For Chromatography CARLO ERBA
- 3.6 Celite 545 Chemika 22140 FLUKA

3.7 Sulfuric Acid 98% Analytical Reagent A.R. LAB-SCAN

3.8 Sodium Hydroxide Anhydrous Pellets ACS-ISO For Analysis

CARLO ERBA

4. สารมาตรฐาน

4.1 alpha-BHC 99.3% CHEM SERVICE

4.2 gamma-BHC (Lindane) 99% CHEM SERVICE

4.3 Heptachlor 99.0 % Dr.Ehrentorfer GmbH

4.4 Aldrin (HHDN) 96.0% Dr.Ehrentorfer GmbH

4.5 alpha-Endosulfan 99.8% RdH

4.6 pp-DDE 99.5% CHEM SERVICE

4.7 beta-Endosulfan 99.9% RdH

4.8 pp-DDD 99.3% CHEM SERVICE

4.9 Endosulfan Sulfate 97.6% RdH

4.10 pp-DDT 98.6% PS-699 CHEM SERVICE

4.11 2,4,5,6- Tetrachloro- m-xylene

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมเครื่องแก้ว นำเครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองมาทำความสะอาด โดยนำยาล้างเครื่องแก้ว ล้างน้ำประปา ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วชะด้วยอะซีโตน และเฮกเซน ตามลำดับ นำไปอบในตู้อบร้อน อุณหภูมิ 200 °C นาน 2 ชั่วโมง ยกเว้นเครื่องแก้ววัดปริมาตร ชะด้วยอะซีโตนก่อนนำมาใช้งาน

2. การเก็บตัวอย่าง นำขวดสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมจากข้อ 1 มอบให้ผู้เลี้ยงโคนมในเขต อ.โพธาราม และ อ.บ้านโป่ง รวมทั้งสิ้น 36 ฟาร์ม ผู้เลี้ยงโคนมจะทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเช้าและส่งตัวอย่างนมในช่วงเช้าวันเดียวกัน ทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 2 ฟาร์ม ในช่วงเดือนมกราคม – มีนาคม พ.ศ. 2548

3. การเก็บรักษาตัวอย่างนม เก็บรักษาในตู้แช่อุณหภูมิไม่เกิน 8°C เก็บรักษาได้ 1 สัปดาห์ ถ้าวิเคราะห์ไม่ทัน สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้นโดย ชั่งตัวอย่างนม 10 กรัม ลงในหลอดแก้วชนิดมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร เติม อะซีโตน 60 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที แล้วเก็บในตู้แช่อุณหภูมิไม่เกิน 8 °C

4. การเตรียมสารเคมี

4.1 การเตรียมสารมาตรฐาน ออร์กาโนคลอรีนผสม 10 ชนิดเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนคลอรีนทั้ง 10 ชนิด ชนิดละ 1 มิลลิกรัม ละลายรวมกันด้วยเฮกเซนลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน

4.2 การเตรียมสารมาตรฐาน Internal standard เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่ง 2,4,5,6- Tetrachloro- m- xylene 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยเฮกเซนลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน

4.3 การเตรียมสารมาตรฐาน Internal standard เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารมาตรฐาน Internal standard เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน

4.4 การเตรียมสารมาตรฐานผสม ออร์กาโนคลอรีนผสมเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ปิเปตสารมาตรฐาน ออร์กาโนคลอรีนผสมเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 จำนวน 10, 25, 50, 100 และ 250 ไมโครลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ เติมสารมาตรฐาน Internal standard เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.2 จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรแต่ละใบ และ ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน

4.5 การเตรียมสารมาตรฐาน ออร์กาโนคลอรีนผสมเข้มข้น 1.0, 2.5, 5.0, และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ปิเปตสารมาตรฐาน ออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 จำนวน 10, 25, 50, และ 100 ไมโครลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ใบ เติมสารมาตรฐาน Internal standard เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.2 จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรแต่ละใบ และปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน

4.6 การเตรียมแอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์, ซีไลต์ 545, แอคติเวตฟลอริซิล และโซเดียมซัลเฟต อบอะลูมินัมออกไซด์, ซีไลต์ 545, ฟลอริซิล หรือโซเดียมซัลเฟต ในชามเซรามิกทนความร้อนขนาด 1,000 มิลลิลิตร ในเตาเผาที่ อุณหภูมิ 350°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อไล่สารอินทรีย์ ทั้งให้เย็นในเตาเผา และเก็บในขวดแก้ว ฝาเกลียว ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

4.7 การเตรียม ดีแอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์ สำหรับการขจัดสิ่งรบกวน ซึ่ง แอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์ 7 กรัม ลงในขวดแก้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจนเป็นผงละเอียด

4.8 การเตรียม ดีแอคติเวตฟลอริซิล สำหรับการขจัดสิ่งรบกวน ซึ่ง แอคติเวตฟลอริซิล 7 กรัม ลงในขวดแก้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจนเป็นผงละเอียด

5. การหาสถานะการแยกโดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟิก – อีเล็กตรอนแคปเจอร์ดีเทคเตอร์ (GC-ECD)

นำสารละลายมาตรฐานผสมออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.4 มาฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟในสถานะต่างๆ ดังนี้

แบบ A

- Injection : ใช้เครื่องฉีดสารแบบอัตโนมัติ (Auto Sample) โปรแกรมการล้างเข็ม ล้างเข็มด้วยเฮกเซนก่อนฉีดตัวอย่าง 3 ครั้ง ล้างเข็มด้วยตัวอย่างก่อนฉีด 3 ครั้ง และล้างเข็มด้วยเฮกเซนหลังการฉีดตัวอย่าง 15 ครั้ง ฉีดตัวอย่าง 2.0 ไมโครลิตร
- Inlet : Splitless 0.5 นาที อุณหภูมิ 200°C
: ตัวพา ฮีเลียม / ไนโตรเจน อัตราการไหลรวม 75 มิลลิลิตรต่อนาที
- Column : HP 5 (5% phenyl methyl silicone) 2.5 mm. X 30 m. ความหนาของฟิล์ม 0.25 μm .
: อัตราไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
- Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 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
- Detector : ECD อุณหภูมิ 300°C

แบบ B

- Injection : เหมือนแบบ A
- Inlet : Splitless 3 นาที อุณหภูมิ 250°C
: ตัวพา ฮีเลียม / ไนโตรเจน อัตราการไหลรวม 75 มิลลิลิตรต่อนาที
- Column : HP 5 (5% Phenyl Methyl Silicone) 2.5 mm. X 30 m. ความหนาของฟิล์ม 0.25 μm .
: อัตราไหล 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที
- Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 70°C คงที่อุณหภูมิ 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 140°C คงที่อุณหภูมิ 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 20°C ต่อนาที ถึง 200°C คงที่อุณหภูมิ 10 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 300°C คงที่อุณหภูมิ 6 นาที
- Detector : ECD อุณหภูมิ 330°C

แบบ C

เหมือนแบบ B เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 85°C , ในส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

แบบ D

เหมือนแบบ B เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C , ในส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

(ภาพแสดงโปรแกรมอุณหภูมิของ Oven ในสภาวะแบบ A, B และ D ดังแสดงในภาพที่ 1)

แบบ E

เหมือนแบบ B เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

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

แบบ F

เหมือนแบบ B เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

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

แบบ G

เหมือนแบบ B เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

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

แบบ H

เหมือนแบบ B เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

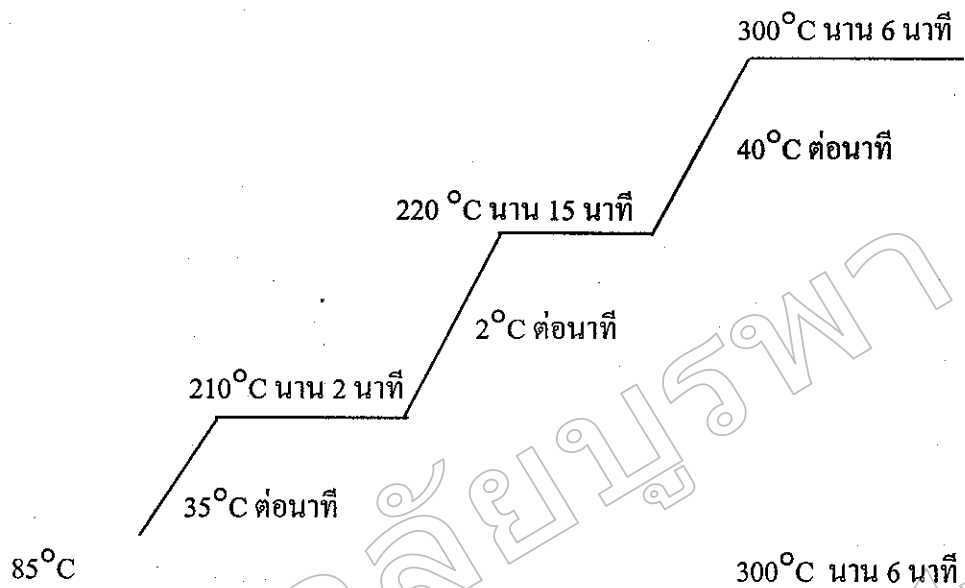
Oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 95°C คงที่อุณหภูมินาน 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40°C ต่อนาที ถึง 150°C คงที่อุณหภูมินาน 3 นาที, ในส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

แบบ I

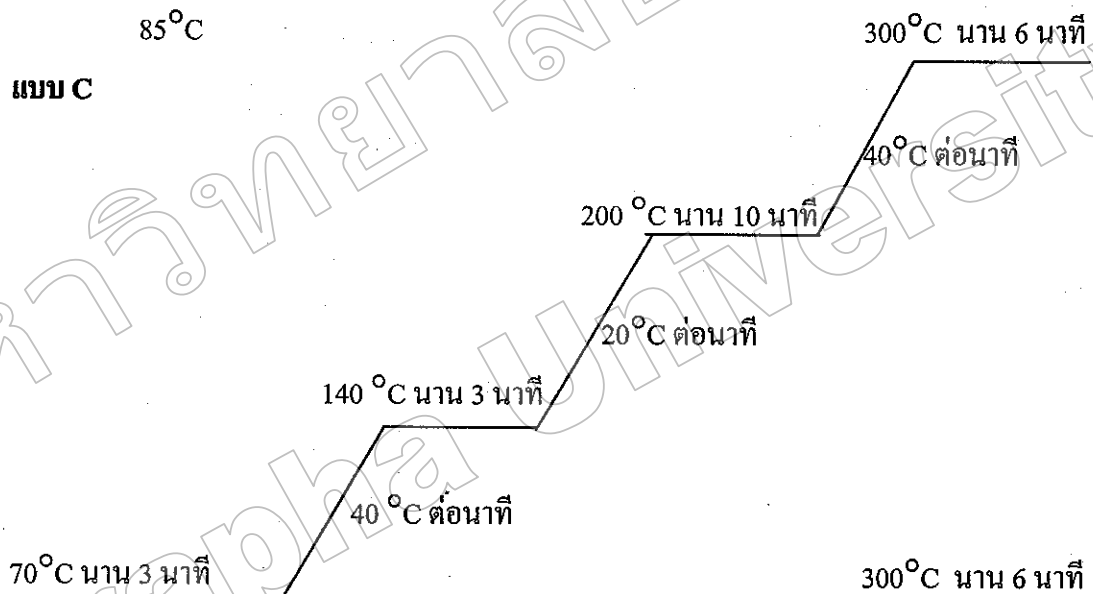
เหมือนแบบ B เปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วน oven

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

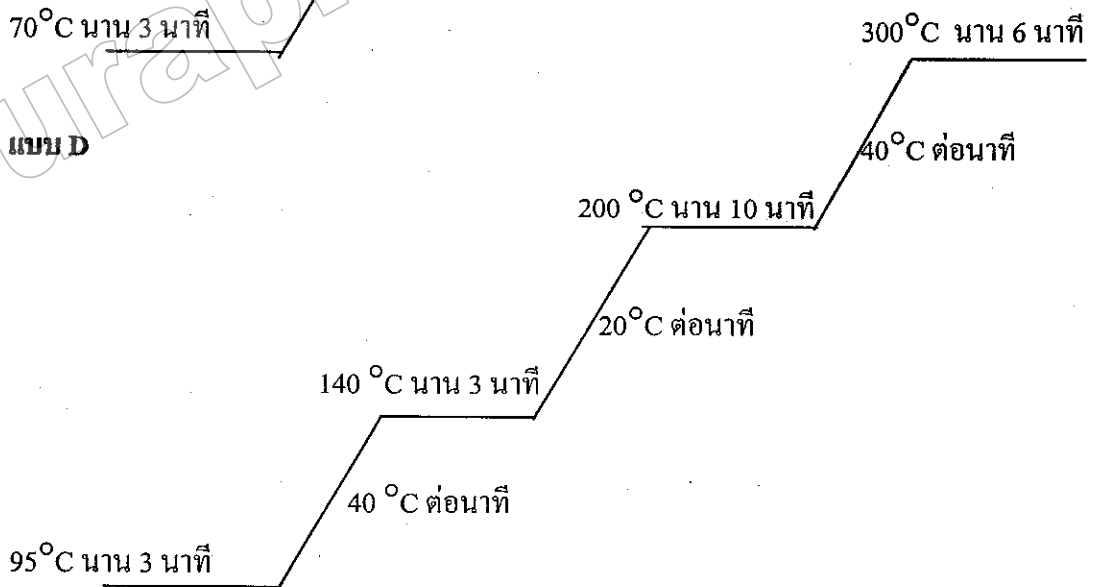
แบบ A



แบบ C



แบบ D



ภาพที่ 1 แสดงโปรแกรมอุณหภูมิของ Oven ในสภาวะแบบ A, B และ D

6. การศึกษาความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Methods Validation)

6.1 . การสร้างกราฟมาตรฐาน นำสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 10, 25, 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เตรียมในข้อ 4.4 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD ตามสถานะที่ได้ตั้งข้อ 5 วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD, Standard Deviation) หาค่า ความชัน (m, Slope) จุดตัดแกน y (b, Intercept) และคำนวณค่าความเป็นเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน (r^2)

ค่าแสดงความเป็นเส้นตรง (Linearity, Correlation Coefficient, r^2) เป็นค่าแสดงการแปรปรวนของความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยคำนวณการถดถอยเชิงเส้น (Regression line) (Miller, 1993) ดังสมการต่อไปนี้

$$r^2 = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2] [\sum_i (y_i - \bar{y})^2]}^{1/2}$$

6.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of Detection, LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ (Limit of Quantitation, LOQ) นำสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 1.0, 2.5, 5.0, และ 10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เตรียมในข้อ 4.5 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD ตามสถานะที่เหมาะสม ดังข้อ 5 วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง คำนวณหาค่า SD นำค่า SD ที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมาพลอตกราฟ ระหว่างค่า SD และความเข้มข้น จะได้ค่า SD_0 ตัดที่แกน y ที่ความเข้มข้นเท่ากับศูนย์

กำหนดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้เท่ากับ $3 SD_0$ ตามสมการดังต่อไปนี้

$$LOD = 3 SD_0$$

กำหนดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถรายงานได้เท่ากับ $10 SD_0$ ตามสมการดังต่อไปนี้

$$LOQ = 10 SD_0$$

6.3 การหาค่าความเที่ยง (Precision) เป็นตัวเลขที่แสดงค่าความแม่นยำของผลที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยคำนวณหาเป็นเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD, Relative Standard Deviation) และค่า SD จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน

6.4 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) เป็นค่าที่แสดงความใกล้เคียงค่าแท้จริง (True Value) มากที่สุด โดยคำนวณเป็นค่าร้อยละของการกลับคืน

การหาค่าร้อยละการกลับคืน นำสารมาตรฐานออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่เตรียมในข้อ 4.4 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD ตามสถานะที่ได้ตั้งข้อ 5 โดยใช้กราฟมาตรฐานที่ได้ในข้อ 6.1 ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 8 ครั้ง คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละการกลับคืนดังสมการข้างล่างนี้

$$\text{ค่าร้อยละของการกลับคืน} = 100 \times (C_s - C_A) / C_{A^*}$$

C_s = ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C_A = ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน

C_{A^*} = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

7. ศึกษาการเตรียมตัวอย่าง

7.1 ศึกษาการใช้ Solid Phase สำหรับกรองตะกอนและหาตัวชะคอลัมน์ที่เหมาะสม

7.1.1 การเตรียมคอลัมน์แอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์สำหรับกรองตัวอย่าง นำสำลีอุดปลายก้นคอลัมน์แก้ว ขนาด 25 x 300 มม. เติมแอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์เล็กน้อย เติมอะซีโตน 15 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ เคาะคอลัมน์เล็กน้อยเพื่อให้อากาศในคอลัมน์ออก ค่อย ๆ เติมแอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์ 3 กรัม ลงในคอลัมน์ แล้วชะคอลัมน์ด้วย อะซีโตน 10 มิลลิลิตร

7.1.2 การเตรียมคอลัมน์ซีไลต์ 545 สำหรับกรองตะกอนนม วิธีการเตรียมเหมือนข้อ 7.1.1 เปลี่ยนจาก แอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์ 3 กรัม เป็น ซีไลต์ 545 จำนวน 3 กรัม ส่วนอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

7.1.3 ชั่งน้ำ 10 กรัม ลงในหลอดแก้วชนิดมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานผสมออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที เติมอะซีโตน 60 มล. เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที

7.1.4 นำสารละลายไปผ่านคอลัมน์ ที่บรรจุด้วยแอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์ ในข้อ 7.1.1 ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ด้วยอะซีโตน 60 มิลลิลิตร

7.1.5 นำสารละลายที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ ในอ่างน้ำร้อน อุณหภูมิ 60°C. ควบแน่นที่ อุณหภูมิ 10°C ความดัน 300 มม.ปรอท นาน 20 นาที นำสารละลายที่

เหลื้อมาสกัดด้วยเฮกเซน 3 ครั้งๆละ 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 40 มิลลิลิตร นำสารละลายเฮกเซนที่ได้ไประเหยจนเหลือ 2-3 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกทรายร้อน (Sand Bath) (โดยนำทรายหยาบมาผ่านการล้างดิน ฝุ่นละออง และอบในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 350°C นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้ว นำทรายมาใส่ในกระบอกโลหะให้มีชั้นทรายสูง 1 นิ้ว ตั้งกระบอกทรายบน เตาไฟฟ้าให้ความร้อนและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ $80-90^{\circ}\text{C}$)

7.1.6 นำสารละลายที่เหลือ เทใส่ลงในชุดเครื่องแก้ว KD ตั้งบีกเกอร์ด้วยเฮกเซนเล็กน้อย เติม Internal Standard เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.2 จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไประเหยแห้งในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80°C จนเกือบแห้ง ปรับปริมาณเป็น 1 มิลลิลิตรด้วยเฮกเซน นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-ECD ตามสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 5

7.1.7 ทำการทดลองซ้ำจาก ข้อ 7.1.3 ถึง ข้อ 7.1.6 โดยเปลี่ยนคอลัมน์จาก แอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์เป็น ซิลิโคน 545 ในข้อ 7.1.2

7.1.8 การหาปริมาณที่เหมาะสมของอะซีโตน ผลจากข้อ 7.1.3 ถึง ข้อ 7.1.7 เลือก Solid Phase ที่เหมาะสม ทำการทดลองซ้ำจาก ข้อ 7.1.3 ถึง ข้อ 7.1.6

7.1.9 เติมอะซีโตน 20 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ที่ผ่านการชะแล้วในข้อ 7.1.8 ลงในบีกเกอร์ขนาด 40 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วยกระบอกทรายร้อน จนเหลือ 2-3 มิลลิลิตร เติมหะกเซน 10 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วยกระบอกทรายร้อนอีกครั้ง จนเหลือ 2-3 มิลลิลิตร และตรวจวิเคราะห์ตามข้อ 7.1.6

7.1.10 ทำการทดลองซ้ำในข้อ 7.1.9 อีก สองครั้ง
แสดงแผนผังการทดลองดังภาพที่ 2

7.2 ศึกษาการเติมน้ำมันพืช มีผลต่อค่าร้อยละการกลับคืนในน้ำมันโค โดยเลือกใช้ Solid phase และตัวชะที่เหมาะสม ที่ศึกษาในข้อ 7.1 วิเคราะห์ตัวอย่าง 3 แบบ ได้แก่ 1. น้ำมัน+สารมาตรฐาน, 2. น้ำ+น้ำมันพืช+สารมาตรฐาน และ 3. น้ำมัน+น้ำมันพืช+สารมาตรฐาน

7.2.1 การเตรียมคอลัมน์ดีแอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์ สำหรับการขจัดสิ่งรบกวน นำสำลีอุดปลายก้นคอลัมน์แก้วขนาด 25×300 มม. ชนิดมีก๊อช เติมโซเดียมซัลเฟต 2 กรัม ลงในคอลัมน์ เติมหะกเซน 15 มิลลิลิตร เคาะคอลัมน์เล็กน้อยเพื่อไล่อากาศในคอลัมน์ออก ค่อยๆเติมดีแอคติเวตอะลูมินัมออกไซด์ 7 กรัม ในข้อ 4.7 แล้วโรยทับด้านบนด้วย โซเดียมซัลเฟต 2 กรัม ตามลำดับ ล้างคอลัมน์ด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร

7.2.2 การเตรียมตัวอย่าง ชั่งน้ำมัน 10 กรัม ลงในหลอดแก้วชนิดมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง เติมหะกเซนมาตรฐานผสมออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที เติมหะกเซน 60

มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที นำไปผ่านคอลัมน์ Solid Phase ที่ศึกษาในข้อ 7.1 และชะคอลัมน์ด้วยอะซีโตน โดยใช้ปริมาตรตามที่ศึกษาในข้อ 7.1.8 ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตรนำไประเหยแห้ง และสกัด ดังการทดลองข้อ 7.1.5

7.2.3 เติมน้ำมันพืชที่เหลือลงในคอลัมน์ที่บรรจุ ดีแอกติเวตอะลูมินัมออกไซด์ 7 กรัม ในข้อ 7.2.1 สั่งปิกเกอร์ด้วยเฮกเซนเล็กน้อย ชะคอลัมน์ด้วย เฮกเซน 50 มิลลิลิตร ลงในชุดเครื่องแก้ว KD เดิม Internal Standard เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.2 จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไประเหยแห้งในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80°C จนเกือบแห้ง ปรับปริมาณเป็น 1 มิลลิลิตรด้วย เฮกเซน นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-ECD

7.2.4 ชั่งน้ำ 10 กรัม ลงในหลอดแก้วชนิดมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำมันพืช 0.2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที เติมน้ำมันมาตรฐานผสม ออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที เติมน้ำมันอะซีโตน 60 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที นำไปผ่านคอลัมน์ ระเหยแห้ง และสกัด ตามข้อ 7.1.4 ถึง 7.1.6 ตามลำดับ

7.2.5 ชั่งน้ำมัน 10 กรัม ลงในหลอดแก้วชนิดมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำมันพืช 0.2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที เติมน้ำมันมาตรฐานผสม ออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที เติมน้ำมันอะซีโตน 60 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที นำไปผ่านคอลัมน์ ระเหยแห้ง และสกัด ตามข้อ 7.1.4 ถึงข้อ 7.1.6 ตามลำดับ แสดงแผนผังการทดลองดังภาพที่ 3

7.3 ศึกษาผลการดีแอกติเวตอะลูมินัมออกไซด์ ด้วยกรดซัลฟูริก

7.3.1 ชั่งน้ำมัน 10 กรัม ทำการทดลองในข้อ 7.2.2 ถึง ข้อ 7.2.3 เปลี่ยนการดีแอกติเวตอะลูมินัมออกไซด์ 7 กรัมด้วยน้ำ 1 มิลลิลิตร ในข้อ 4.7 เป็น 10% กรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร

7.3.2 ทำการทดลองซ้ำในข้อ 7.3.1 สองครั้ง โดยเปลี่ยนการดีแอกติเวตอะลูมินัมออกไซด์ 7 กรัมด้วย 10% กรดซัลฟูริก เป็น 25% และ 50% กรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงแผนผังการทดลองดังภาพที่ 4

7.4 ศึกษาการจัดตั้งระบบกวนด้วยแอกติเวตฟลอริซิล และหาตัวชะคอลัมน์ที่เหมาะสม

7.4.1 การเตรียมคอลัมน์แอกติเวตฟลอริซิลสำหรับการจัดตั้งระบบกวน นำสำลีอุดปลายก้นคอลัมน์แก้วขนาด 25 x 300 มม. ชนิดมีก๊อกไข เติมน้ำมันซัลเฟต 2 กรัม ลงในคอลัมน์

เติมเฮกเซน 15 มิลลิลิตร เคาะคอลัมน์เล็กน้อยเพื่อให้อากาศในคอลัมน์ออก ค่อยๆเติมแอกติเวต-ฟลูออริซิล 7 กรัม แล้วโรยทับด้านบนด้วย โซเดียมซัลเฟต 2 กรัม ตามลำดับ ล้างคอลัมน์ด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร

7.4.2 การหาปริมาณตัวชี้ที่เหมาะสม ปีเปิดสารมาตรฐานผสม

ออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ในข้อ 7.4.1 ด้วยเฮกเซน 40 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 140 มิลลิลิตร นำสารละลายเฮกเซนที่ได้ไประเหยจนเกือบเหลือ 2-3 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกทรายร้อน

7.4.3 ล้างด้วยเฮกเซน จำนวนน้อยที่สุด ลงในชุดเครื่องแก้ว KD เดิม

Internal Standard เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.2 จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไประเหยแห้งในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80°C จนเกือบแห้ง ปรับปริมาณเป็น 1 มิลลิลิตรด้วยเฮกเซน นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-ECD

7.4.4 ชะคอลัมน์ในข้อ 7.4.2 ซ้ำด้วยเฮกเซน อีก 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 40 มิลลิลิตร ทำการทดลองต่อตามข้อ 7.4.3

7.4.5 ทำการทดลองซ้ำในข้อ 7.4.4 อีกสองครั้ง

7.4.6 ชะคอลัมน์ในข้อ 7.4.2 ซ้ำด้วย 9% สารละลายไดเอทิลอีเทอร์:เฮกเซน (v/v) 30 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปทำการทดลองต่อในข้อ 7.4.3

7.4.7 ชะคอลัมน์ในข้อ 7.4.2 ซ้ำด้วย 9% สารละลายไดเอทิลอีเทอร์:เฮกเซน (v/v) 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 40 มิลลิลิตร 3 ซ้ำ ในแต่ละ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปทำการทดลองต่อในข้อ 7.4.3

7.4.8 ทำการทดลองซ้ำในข้อ 7.4.2 ถึง 7.4.7 อีกครั้ง โดยเปลี่ยน จาก 9% เป็น 15% สารละลายไดเอทิลอีเทอร์:เฮกเซน (v/v) 30 มิลลิลิตร แสดงแผนผังการทดลองดังภาพที่ 5

7.5 ศึกษาผลของการใช้ แอกติเวตฟลูออริซิล และดีแอกติเวตฟลูออริซิล ในการขจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่างน้ำมัน

7.5.1 การเตรียมตัวอย่าง ชั่งน้ำมัน 10 กรัม ลงในหลอดแก้วชนิดมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานผสมออร์กาโนคลอรีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้อ 4.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที เติมอะซีโตน 60 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที นำไปผ่านคอลัมน์ Solid Phase ที่ศึกษาในข้อ 7.1 และชะคอลัมน์ด้วยอะซีโตน โดยใช้ปริมาตรตามที่ศึกษาในข้อ 7.1.8 ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตรนำไประเหยแห้ง และสกัด ดังการทดลองข้อ 7.1.5

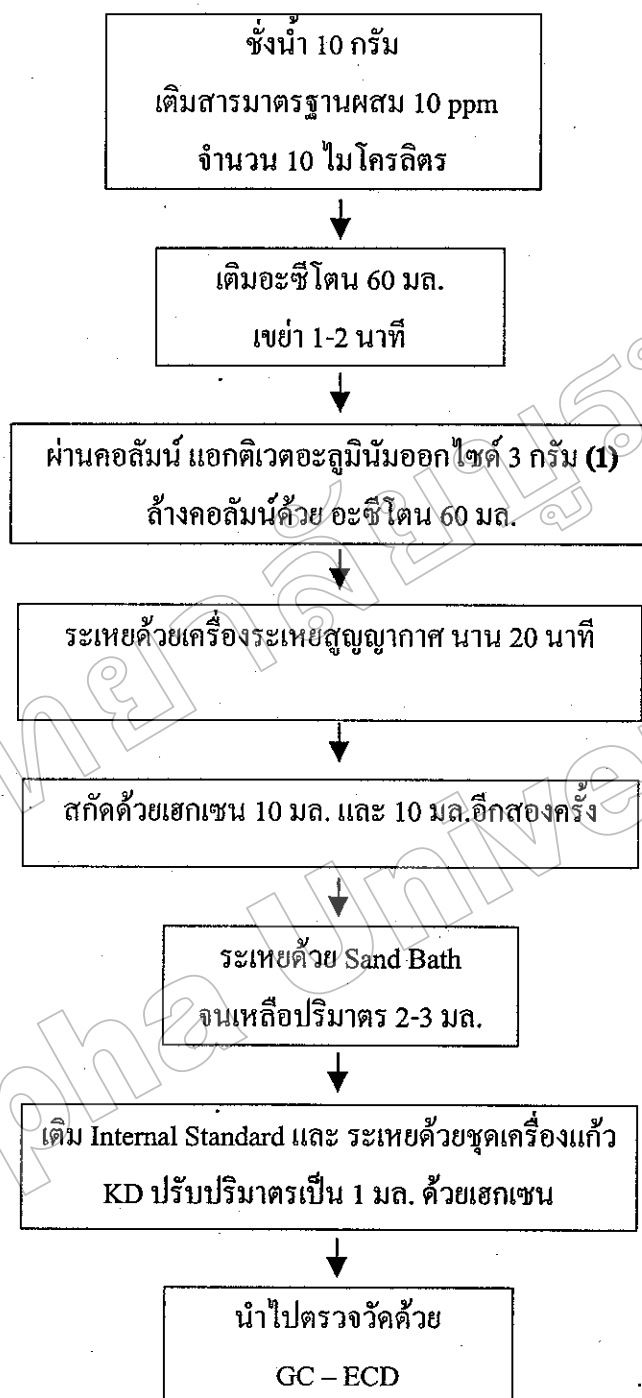
7.5.2 เทสารละลายที่เหลือ ในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยแอกติเวตฟลอริซิล 7 กรัมในข้อ 4.8 ล้างบีกเกอร์ด้วยเฮกเซนเล็กน้อย ชะคอลัมน์ด้วย เฮกเซน 50 มิลลิลิตร และตามด้วย 15% สารละลายไดเอทิลอีเทอร์:เฮกเซน (v/v) 40 มิลลิลิตร ลงใน บีกเกอร์ขนาด 140 มิลลิลิตร นำสารละลายเฮกเซนที่ได้ไประเหยจนเหลือ 2-3 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกทรายร้อน ทำการตรวจวัดโดยทดลองต่อในข้อ 7.4.3

7.5.3 ทำการทดลองซ้ำในข้อ 7.5.1 และ 7.5.2 โดยเปลี่ยนแอกติเวตฟลอริซิล เป็นดีแอกติเวตฟลอริซิล แสดงแผนผังการทดลองดังภาพที่ 6

7.6 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันโค

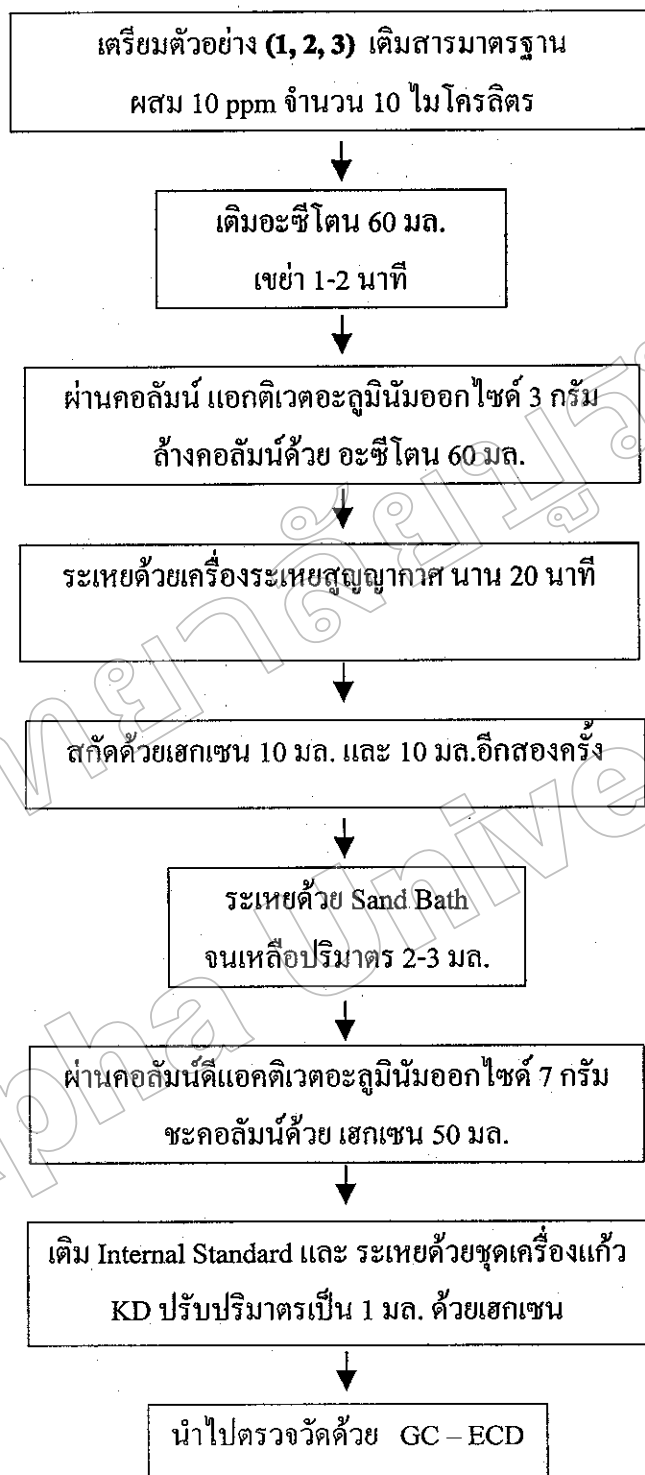
7.6.1 การเตรียมตัวอย่าง ชั่งน้ำมัน 10 กรัม ลงในหลอดแก้วชนิดมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร เติมอะซีโตน 60 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex นาน 1-2 นาที นำไปผ่านคอลัมน์ Solid phase และชะด้วยสารละลาย ที่ศึกษาในข้อ 7.1 และชะคอลัมน์ด้วย อะซีโตน โดยใช้ปริมาตรตามที่ศึกษาในข้อ 7.1.8 ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตรนำไประเหยแห้ง และสกัด ดังการทดลองข้อ 7.1.5

7.6.2 เทสารละลายที่เหลือ ในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย ดีแอกติเวตอะลูมินัมออกไซด์ ที่เหมาะสม จากข้อ 7.3 จำนวน 7 กรัม ล้างบีกเกอร์ด้วยเฮกเซนเล็กน้อย ชะคอลัมน์ด้วย เฮกเซน 50 มิลลิลิตร ลงใน บีกเกอร์ขนาด 140 มิลลิลิตร นำสารละลายเฮกเซนที่ได้ไประเหยจนเหลือ 2-3 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกทรายร้อน ทำการตรวจวัดโดยทดลองต่อในข้อ 7.4.3



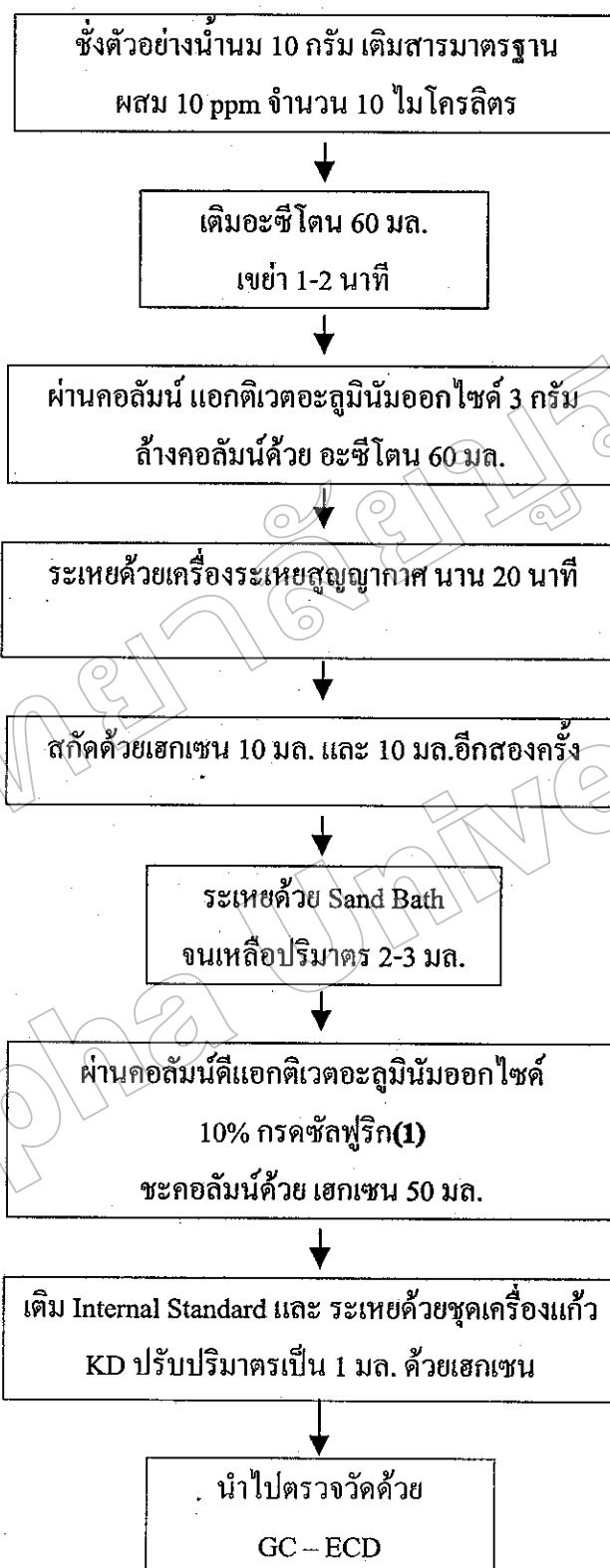
(1) เปลี่ยนเป็น ซิลิกา 545 จำนวน 3 กรัม

ภาพที่ 2 แสดงแผนผัง ศึกษาการใช้ Solid Phase สำหรับกรองตะกอนนม และหาตัวชะคอลัมน์ที่เหมาะสม



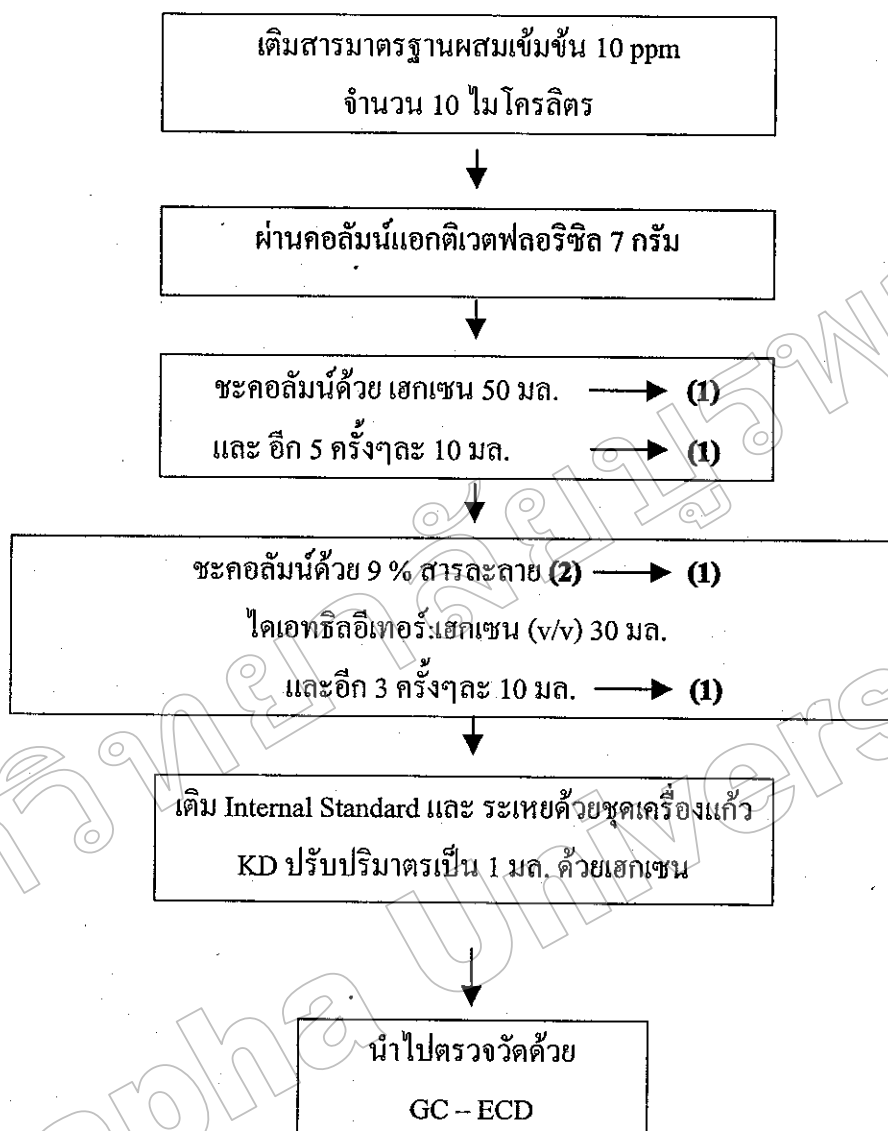
- (1) ชั่งน้ำมัน 10 กรัม+สารมาตรฐาน
- (2) ชั่งน้ำ 10 กรัม+น้ำมันพืช 0.2 มิลลิลิตร+สารมาตรฐาน
- (3) ชั่งน้ำมัน 10 กรัม+น้ำมันพืช 0.2 มิลลิลิตร+สารมาตรฐาน

ภาพที่ 3 แสดงแผนผัง ศึกษาผลการเติมน้ำมันพืชที่มีผลต่อค่าร้อยละการกลับคืนในน้ำมันโค



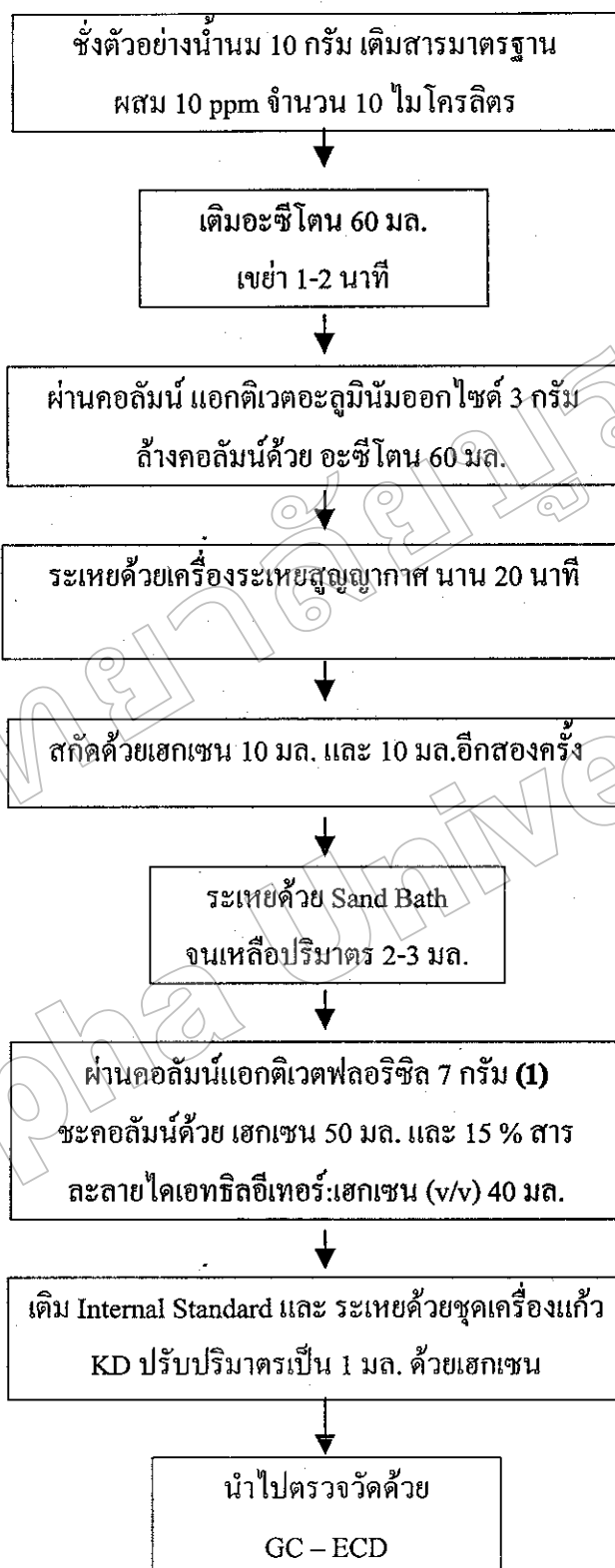
(1) เปลี่ยนจากการดีแอคติเวตเตดด้วยกรดซัลฟูริก 10% เป็น 1 มล. ของ 25% และ 50% กรดซัลฟูริก

ภาพที่ 4 แสดง แผนผัง ศึกษาผลการดีแอคติเวตเตดอะลูมินัมออกไซด์ ด้วยกรดซัลฟูริก



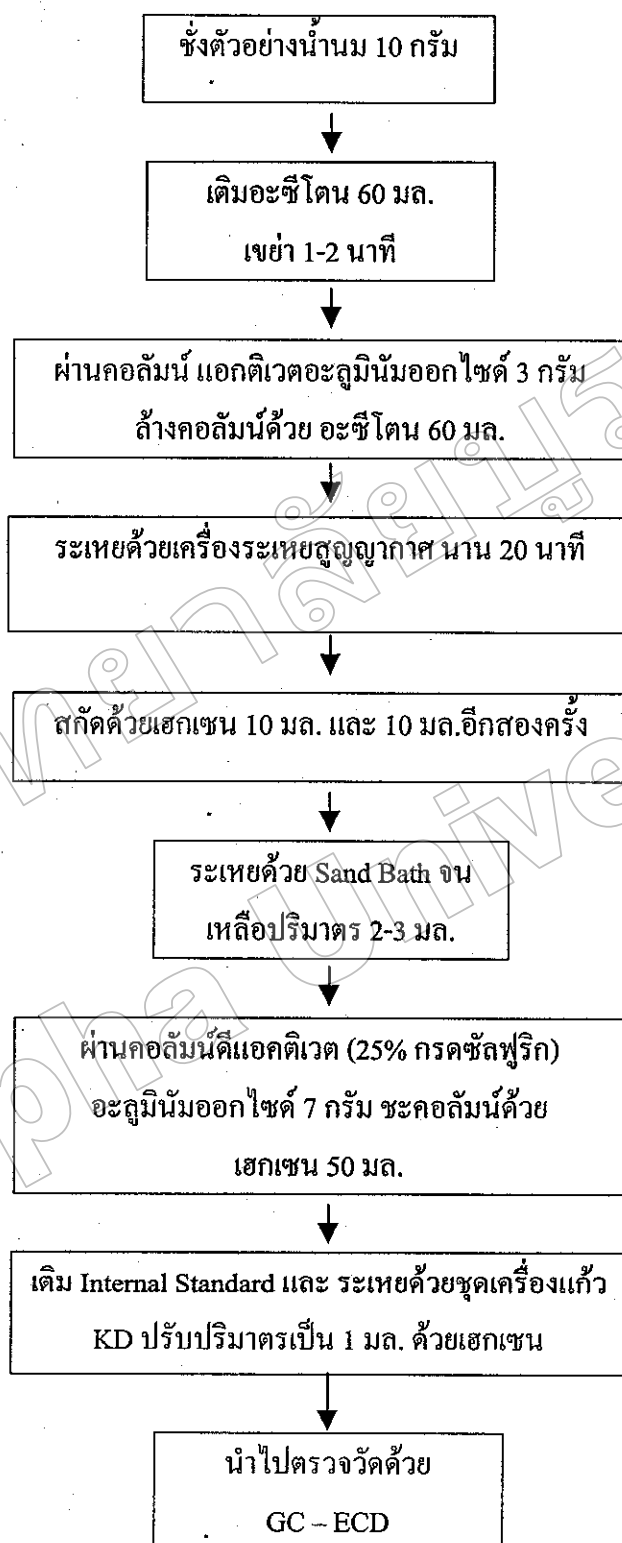
- (1) นำไปเติม ISTD ระเหยด้วย KD และนำไปตรวจด้วย GC-ECD
(2) เปลี่ยนจาก 9% เป็น 15% สารละลายไดเอทิลอีเทอร์:เฮกเซน (v/v)

ภาพที่ 5 แสดงแผนผัง ศึกษาการจัดตั้งระบบกวนด้วยแอกติเวตฟลูออริซิล และหาตัวชะคอลัมน์ที่เหมาะสม



(1) เปลี่ยนจากแอคติเวตฟลูออริซิล เป็นดีแอคติเวตฟลูออริซิล

ภาพที่ 6 แสดงแผนผัง ศึกษาผลของการใช้แอคติเวต ฟลูออริซิล และดีแอคติเวตฟลูออริซิล



ภาพที่ 7 แสดงแผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันโค