บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

1.0) สัตว์ทดลอง

หอยนางรมที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณการสะสมของDDT และสาร Metabolites ของ DDT พวกสาร DDD และ DDE ครั้งนี้เป็นหอยนางรมในสกุล Ostrea ที่เกิดในธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยงบริเวณหาดศิลาพิพย์ ต.อ่างศิลา จ.ชลบุรี

การเก็บหอยนางรมเก็บเดือนละครั้ง ตั้งแต่กรกฎาคมถึงธันวาคม พ.ศ. 2514 หอยนางรมที่ใช้ทดลองต้องเจาะออกจากเปลือกใหม่ ๆ

เวลาที่เก็บ	น.น.ตัวเป็นกรัม (น้ำหนักเปียก)
25 กรกฎาคม 2514	0.40
22 สิงหาคม 2514	0.50
19 กันยายน 2514	0.45
24 ตุลาคม 2514	1.00
21 พฤศจิกายน 2514	1.05
19 ธันวาคม 2514	1.08
30 ธันวาคม 2514	1.00

2.0) อุปกรณ์และน้ำยาเคมี

อุปกรณ์

Aluminum foil

Beakers 300 , 400 ml

Bottles

Chromatographic column : 15 mm i.d X 45 cm

Chromatographic chamber

Clamps and holders

Elenmeyer flask

Glass plates : 8 X 8"

Glass Wool

Filter paper

Funnels

Measuring cylinders

Microliter syringe

Pipets

Separatory funnels 125, 1000 ml

004520

Stirring rods

TLC Coater

Ultraviolet light source

Water bath temperature adjust to 0 - 100°C

น้ำยาเคมี

Adsorbent : Silica gel G

Acetonitrile : Reagent grade , saturated with Petroleum ether

Chromatogenic agent : - Silver nitrate (0.1000 gm / ml)

- 2 - phenoxy ethanol
- Acetone
- 30% Hydrogen
- and Shandon Laboratory Spray Gun No.2046

ดูดสารละลาย Silver nitrate 0.5 มิลลิลิตร ใส่ 2-phenoxy ethanol 10 มิลลิลิตร แล้วใส่ Acetone ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

หยด 30% Hydrogen peroxide ลงไป 1 หยด เขย่าให้เข้ากัน น้ำยานี้เตรียมและเก็บไว้ใช้ได้นาน 4 วัน

Distilled water

Eluting solvent mixtures : Ethyl ether + Petroleum (6+94 by Volume)

Ethyl ether : P.R. grade

Florisil : P.R. grade 60 / 100 mesh

n - hexane : A.R. grade redistilled

Petroleum ether : A.R. grade ,b.p 30-60°C Redistilled

Sodium Sulfate : Anhydrous reagent grade, granular, also prepare a solution containing 1 - 2 gm / 100 ml of water

3.0) วิธีดำเนินการทดลอง

การดำเนินการทดลองดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Mills (1959) และที่ปฏิบัติกันที่ the U.S. Bureau of Commercial Fisheries , and the California Department of Fish and Game.

การสกัด (Extraction)

ชั่งหอยนางรม 1 กิโลกรัม (น้ำหนักเปียก) ปั่นใน Waring Blender จนละเอียด ตัก Sampling มาครั้งละ 50 กรัม ใส่ Anh. Na_2SO_4 50 กรัม เติม Petroleum ether 150 มิลลิลิตรปั่นเข้าด้วยกัน 2 นาที กรองส่วนที่เป็นของเหลวไว้ นำไปลดปริมาตรโดยตั้งทิ้งไว้ให้ระเหย หรือ ระเหยบน Water bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 40 องศาเซ็นติเกรด จนปริมาตรของสารเหลือ 5 - 10 มิลลิลิตร

Acetonitrile Partitioning

นำสาร (5-10 มิลลิลิตร) ที่ลดปริมาตรแล้วใส่ใน Separatory Funnel ขนาด 125 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile ที่ Saturated with Petroleum ether 25 มิลลิลิตร เขย่า

ด้วยกัน ทิ้งให้ชั้นของ Acetonitrile และ Petroleum ether แยกออกจากกัน ถ่ายชั้นล่าง (Acetonitrile)ใส่ Separatory funnel ขนาด 1 ลิตรที่บรรจุน้ำที่มี Na_2SO_4 1 -2% สกัดและแยกชั้นโดยใช้ Acetonitrile Saturated with Petroleum ether 25 มิลลิลิตรดังกล่าวมาแล้วซ้ำอีกสองครั้ง และถ่ายชั้น Acetonitrile สองครั้งหลังนี้ปนกับAcetonitrileครั้งแรกใน Separatory funnel ขนาด 1 ลิตรนั้น เติม Petroleum ether 100มิลลิลิตรใน funnel เขย่าสักครู่ ทิ้งให้สารแยกชั้น ไขส่วนล่าง (น้ำ)ทิ้ง ล้างส่วนที่เหลือ (Petroleum ether)ด้วยน้ำกลั่น (ที่มี 2% Na_2SO_4)100มิลลิลิตร สองครั้ง ลดปริมาตรของ Petroleum ether ให้เหลือ5-10 มิลลิลิตร

Cleanup with Florisil Column

Florisil ที่ใช้เป็นตัวดูด (Adsorbent) ก่อนบรรจุลงในคอลัมน์ (Chromatographic column)ต้องอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซ็นติเกรดอย่างน้อย5 ชั่วโมง บรรจุ Glass wool ก่อนที่ปลายของคอลัมน์ส่วนล่าง ค่อย ๆเท Florisil ลงในคอลัมน์ให้ชั้นของ Florisil สูงประมาณ 4 นิ้ว และชั้นบนของ Florisil บรรจุ Anh. Na_2SO_4 สูง ½ นิ้ว ค่อย ๆเท Petroleum ether ผ่านกรวย (Funnel) ลงไปในคอลัมน์30มิลลิลิตรก่อนเป็นการ Prewet เมื่อ Petroleum ether ลงหมดจากผิวบนของ Anh. Na_2SO_4 ค่อย ๆเทสารที่ลดปริมาตรมาแล้วจากข้างต้นลงในคอลัมน์ เมื่อสารนี้พ้นผิวบนของ Anh. Na_2SO_4 จึงใส่ Eluting solvent mixtures ลงไป ให้อัตราเร็วของสารที่ถูกชะออกมาเร็วประมาณ5 มิลลิลิตรต่อนาที Eluting solvent mixtureที่ใช้นี้มีปริมาตร200 มิลลิลิตร เก็บสารที่ชะออกมาใน Beaker นำสารนี้ไปลดปริมาตรและเก็บใน n-hexane จัดปริมาตรที่เก็บเท่ากับ2 มิลลิลิตร ในขวด ปิดขวดด้วย Aluminum foilและจุก เก็บในตู้เย็น สำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร DDT,DDD และDDE โดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟต่อไป

4.0) น้ำยาตัวอย่างมาตรฐาน (Standard Pesticide Solution)

เตรียมน้ำยามาตรฐานของสาร DDT, DDD และDDE ให้มีความเข้มข้น1 mg/mlในn-hexane น้ำยาที่ได้เป็น Stock solutionสำหรับนำไปทำให้เจือจางในความเข้มข้นต่าง ๆตามต้องการ

5.0) การหาประสิทธิภาพของวิธีดำเนินการทดลอง (Percent Recovery)

ใช้ Pipet ขนาด2 มิลลิลิตรดูดน้ำยามาตรฐาน DDT, DDD และ DDE ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ปนในหอยนางรมที่ Sampling มา 50 กรัม แล้วดำเนินการทดลองขั้นต่อไปเช่นเดียวกับข้อ 3.0 เพื่อเก็บไว้วิเคราะห์หาปริมาณ DDT, DDD และ DDE ในเครื่องแกสโครมาโตกราฟ

6.0) การทำ (Confirmation)

การเคลือบแผ่นกระจกด้วยตัวดูด (Adsorbent)

ล้างแผ่นกระจกให้สะอาด เมื่อกระจกแห้งแล้วเช็ดกระจกด้วย Acetone ไม่ให้มีรอยนิ้วมือที่แผ่นกระจก วางแผ่นกระจกติดแน่นกับฐานวางกระจกและให้อยู่ในระดับเดียวกัน ตรงรอยต่อของกระจกทุกแผ่นต้องต่อกันเรียบสนิทและเสมอกัน นำ Spreader มาวางบนแผ่นกระจกตั้งความหนาของผิวที่จะเคลือบให้มีความหนาที่ต้องการ คือ 0.25 มิลลิเมตร ลองลาก Spreader ไปบนแผ่นกระจก ก่อนจะเริ่มเคลือบด้วย Silica gel G เช็ดผิวกระจกที่จะเคลือบอีกครั้งด้วย Acetone

ในการเคลือบกระจก5 แผ่นด้วย Silica gel G ใช้ Silica gel G 30 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask เติมน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร เขย่าให้น้ำและ Silica gel G ผสมกัน ถ้ามี Silica gel G จับเป็นเม็ดต้องใช้แท่งแก้วคนและกดไม่ให้เป็นเม็ด การเขย่าต้องระวังไม่เขย่าแรงเกินไปจนเกิดฟองอากาศซึ่งจะไปติดบนผิวที่เคลือบด้วย เมื่อเขย่าเข้ากันแล้วเทส่วนผสมลงใน Spreader แล้วค่อย ๆลากไปตามแผ่นกระจกโดยลากให้ช้าสม่ำเสมอ

กระจกที่เคลือบผิวเสร็จแล้ว ตั้งทิ้งไว้จนผิวที่เคลือบแห้ง ก่อนนำกระจกไปใช้ต้องอบในตู้ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซ็นติเกรด เวลา 30 นาที

การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับวิธีกระจกเคลือบ (Thin-Layer Chromatography)

สกัดหอยนางรม 1 กิโลกรัม(น้ำหนักเปียก)ด้วย Petroleum ether 2 ลิตร ใน Waring Blender หลังจากที่สกัดแล้วกรองส่วนที่เป็นของเหลว (Petroleum ether)ไว้นำไปลดปริมาตรให้เหลือ2 มิลลิลิตร (ในส่วน2 มิลลิลิตรนี้ถ้ามีน้ำปนอยู่ด้วยต้องดูดน้ำออกโดยใส่ Anh. Na_2SO_4 ลงไป จนไม่มีน้ำเหลืออยู่) เก็บใส่ขวดเพื่อนำไปตรวจหาปริมาณ DDT , DDD

และDDE ต่อไปโดยวิธีกระจกเคลือบ (Thin - Layer Chromatography) และสกัดจากกระจกเคลือบนำมาตรวจอีกครั้งหนึ่งโดยวิธีแกสลิควิดโครมาโตกราฟฟี่

การทำกระจกเคลือบ (Thin -Layer chromatography)วิธีของ Walker and Beroza (1963)

ใช้ Microliter Syringe ดูดน้ำยามาตรฐานและสารตัวอย่างที่สกัดจากหอยนางรม 1 กิโลกรัมดังกล่าวข้างต้น หยดลงบนกระจกที่เคลือบผิวด้วย Silica gel G ในปริมาตร 50 มิลลิกรัมของน้ำยามาตรฐานและปริมาณมาก ๆของสารตัวอย่าง เมื่อหยดสารบนผิว Silica gel Gแห้งดีแล้วนำไปอบในควันของไอโอดีนใน Chromatographic chamber จนหยดน้ำยามาตรฐาน DDT, DDD,DDE และสารตัวอย่างเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง นำแผ่นกระจกออกจาก chamber ขูด Silica gel G ในบริเวณที่หยดสารตัวอย่างออกมาละลายและเก็บใน n-hexane จัดปริมาตรให้เป็น2 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวด เพื่อตรวจหาปริมาณของสารDDT, DDD และDDE โดยวิธีแกสลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ต่อไป

การทำกระจกเคลือบ (Thin-Layer Chromatography)ดัดแปลงจากวิธีของ Siewierski and Helrich (1967)

แผนกระจกที่จะใช้หยดสารต้องนำมาขีดเส้นและกะระยะก่อน โดยวางกระจกตามแนวทิศทางที่เคลือบ Adsorbent จากขอบล่างของกระจกขีดเส้นขึ้นมาประมาณ5½ นิ้วบน Adsorbent เส้นนี้จะเป็น Solvent front คือน้ำยา (Developing solvent) จะวิ่งมาถึงจากขอบล่างของกระจกขึ้นมา 1 นิ้วขีดเส้นทำเครื่องหมายที่ริมแผ่นกระจก เส้นสมมุตินี้เป็นเส้นที่จะหยดสาร ทุก ๆจุดบนเส้นนี้เป็นจุดตั้งต้นที่สารจะเริ่มถูกน้ำยาพาไปจนถึงเส้น Solvent front ขีดเส้นแบ่งครึ่งบน Adsorbent ซีกซ้ายมือสำหรับหยดน้ำยามาตรฐานของสาร DDT, DDD และ DDE ซีกขวามือสำหรับหยดตัวอย่างสาร การหยดสารดังกล่าวใช้ Microliter syringe

น้ำยาที่ใช้Develope คือn-hexane เมื่อใส่ n-hexaneใน Chromatographic chamber แล้วต้องมีปริมาณน้ำยามากพอที่จะท่วมขอบกระจกด้านที่จุ่มน้ำยาขึ้นมาประมาณ1 เซ็นติเมตร หลังจากใส่ n-hexane ในchamber แล้วใส่กระดาษกรองที่ชุ่มด้วย n-hexane และปล่อยให้ไอของ n-hexane กระจายทั่วไป จนบรรยากาศภายในchamber นี้อิ่มตัวด้วยไอของ n-hexane ใส่แผ่นกระจกที่หยดสารน้ำยามาตรฐานและสารตัวอย่างลงในchamber ปิดฝา chamber ให้สนิทโดยใช้วาสลินทารอบ ๆฝา เมื่อ n-hexane วิ่งมาถึง Solvent front ที่กำหนดไว้ เปิดฝาออก นำ

แผ่นกระจกออกมาตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

นำแผ่นกระจกที่ตากแห้งดีแล้วมาปิดด้วย Aluminum foil ตรงส่วนที่หยดสารตัวอย่าง แล้วตั้งในตู้ระบายควัน พ่นน้ำยา Chromatogenic agent จากขวดลงบนแผ่นกระจกส่วนที่เปิดในแนวตามขวางของแผ่นจนทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งจึงเอาไปส่องไฟ โดยวางแผ่นกระจกในตู้ให้ถูกแสงอุลตราไวโอเลต จนเกิดจุด (Spot) ซึ่งจะเริ่มเห็นจุดได้เมื่อส่องไฟแล้วประมาณ 5-7 นาที

นำแผ่นกระจกที่เกิดจุดแล้ว มาวัดแนวระยะของจุดที่เกิดจากน้ำยามาตรฐาน DDT , DDD และ DDE ขีดเส้นในส่วนที่หยดสารตัวอย่าง ซึ่งเชื่อว่าถ้ามีสารชนิดเดียวกับน้ำยามาตรฐาน จะต้องวิ่งมาอยู่ในแนวเดียวกัน ขูด Silica gel G ในแนวที่ขีดเส้นแล้วทางด้านที่หยดสารตัวอย่างออกมาละลายสารด้วย n -hexane ใส่ขวดลดปริมาตรให้เหลือ 2 มิลลิลิตร สำหรับตรวจหาสาร DDT, DDD และ DDE ในเครื่องแกสโครมาโตกราฟต่อไป

5.0) <u>การตรวจหาปริมาณสารโดยวิธีแกสลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (Gas-Liquid Chromatography)</u>

เครื่องแกสลิควิดโครมาโตกราฟที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสาร DDT , DDD และ DDE ครั้งนี้เป็นชนิด Tracor MT - 220 สภาวะ (Condition) ที่ใช้มีดังนี้คือ.-

Column : length 6 ft. X 1/4" (glass column packed with 5% OV-1 -

Column temperature 200°C } on 80/90 mesh Chromport XXX.)

Detector temperature 240°C

Inlet temperature 225°C

Outlet temperature 225°C

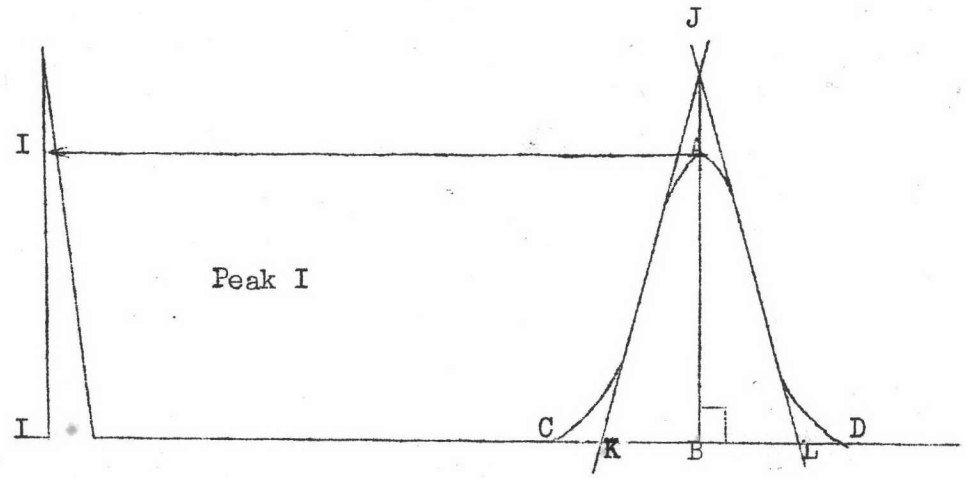
Carrier Gas : Nitrogen flow rate 150 ml per minute

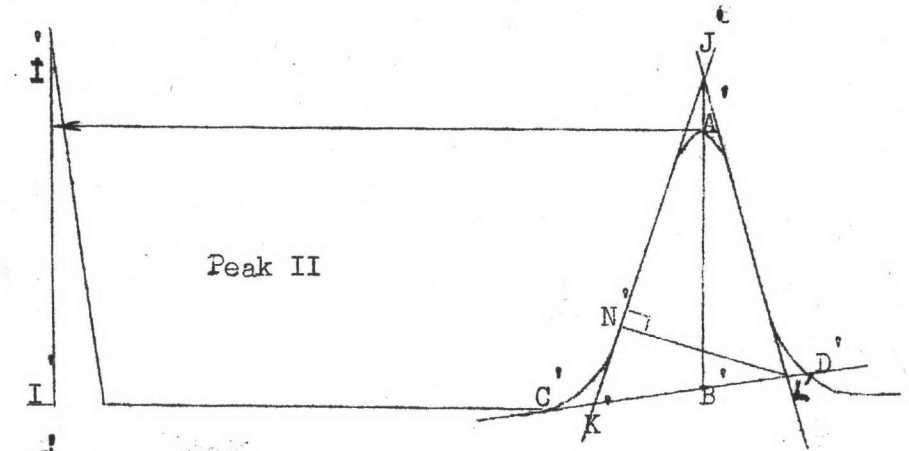
Detector : Ni^{63}

ใช้ Microliter syringe ฉีดสารน้ำยามาตรฐาน DDT , DDD, DDE และสารตัวอย่างเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟ ครั้งละ 2 ไมโครลิตร หรือ 10 Ng การฉีดน้ำยามาตรฐานและสารตัวอย่างต้องฉีดสลับกันเสมอ ๆ เครื่องแกสโครมาโตกราฟจะ Detect สารที่มีในตัวอย่างออกมาเป็น Peak ต่าง ๆของ Chromatogram

การทราบชนิดของสารต่าง ๆที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง ทำโดยการเปรียบเทียบ Retention time (ระยะที่เริ่มนำสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟถึงยอดของ Peak ของสารนั้น) ของ Peak น้ำยามาตรฐานกับPeak ของสารตัวอย่าง ถ้าในสารตัวอย่างมีระยะ Retention time เท่ากับ Retention time ของสารมาตรฐานตัวใด ก็กล่าวได้ว่าในสารตัวอย่างอาจมีสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐานนั้น ๆ

การคำนวนหาปริมาณของสารที่พบว่ามีเป็นปริมาณเท่าใด คำนวนเป็นพื้นที่ของ Peak ของ Chromatogram ตามวิธีที่กล่าวไว้วิธีหนึ่งโดย Gaul (1966) เมื่อคำนวนพื้นที่ของ Peak ในสารตัวอย่างแล้ว นำไปเปรียบเทียบพื้นที่ของ Peak ของน้ำยามาตรฐานซึ่งทราบปริมาณความเข้มข้น ก็สามารถคำนวนปริมาณความเข้มข้นของสารที่มีในสารตัวอย่างได้



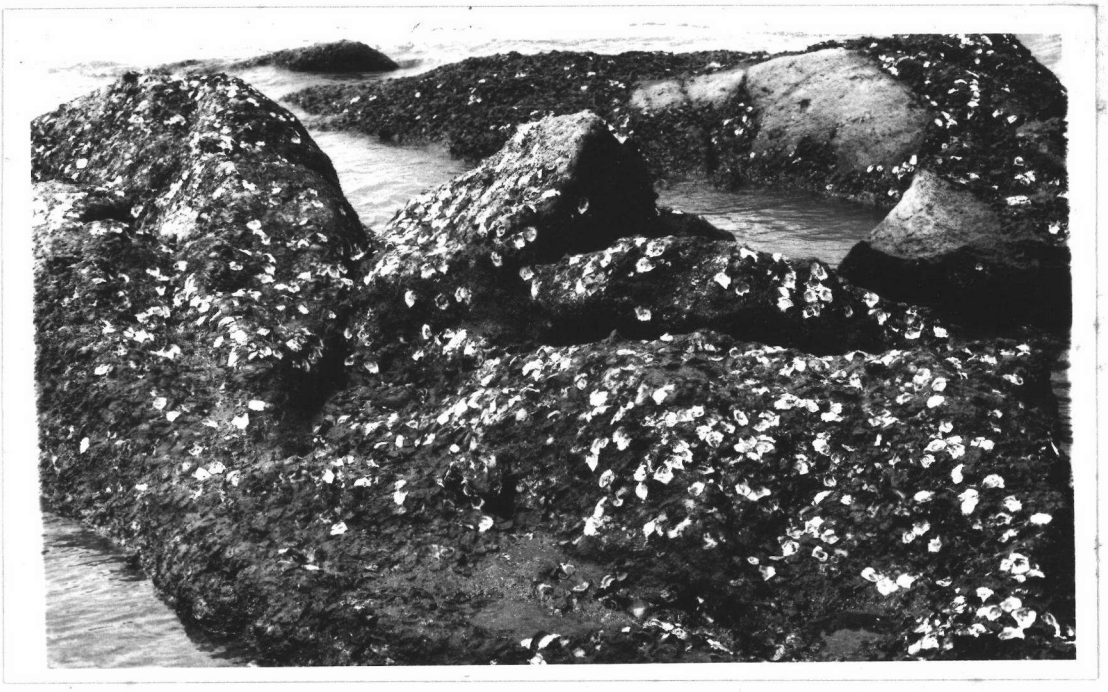


รูปที่ 1

Peak I	Peak Parameter	Peak II
IA	Apparent retention time	$I''A''$
CD	Base line	$C''D''$
A	Zone Center of Peak	A'
AB	Peak Height	$A'B'$
KJ+JL	Inflection tangents	$K''J''+J''L''$
KL	Base (Triangulated Peak)	$J''K''$
JB	Height (Triangulated Peak)	$I''N''$

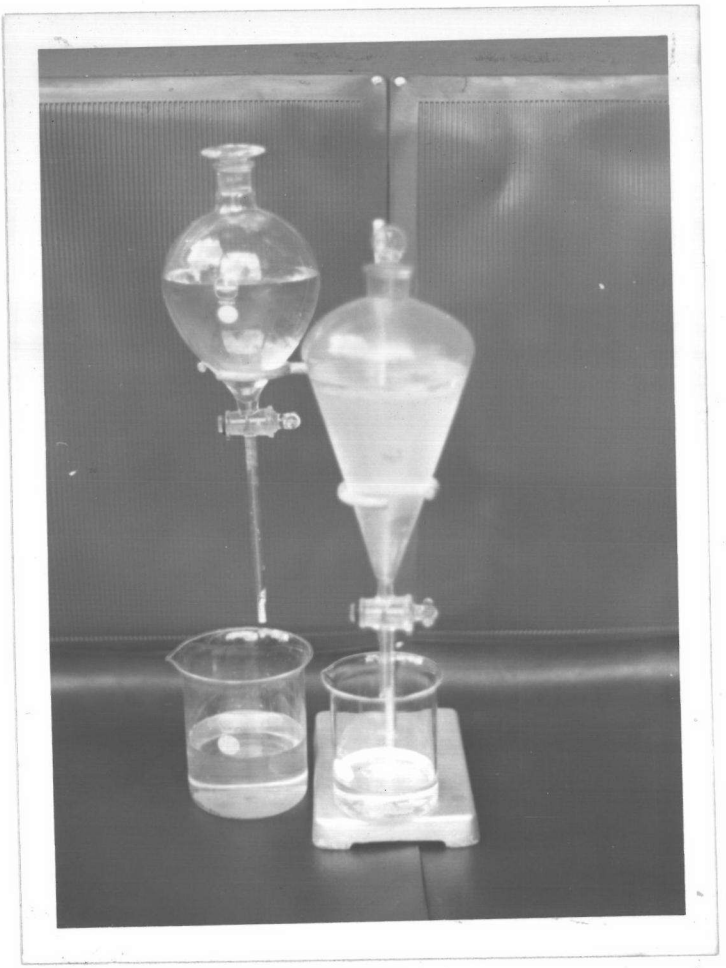
Peak Area = $\frac{1}{2}$ X Base X Height

รูปที่ 2. หอยนางรมเจาะ



<u>รูปที่ 3.</u> หอยนางรมที่เกิดในธรรมชาติ บริเวณหาดศิลาทิพย์ ต.อ่างศิลา จ.ชลบุรี

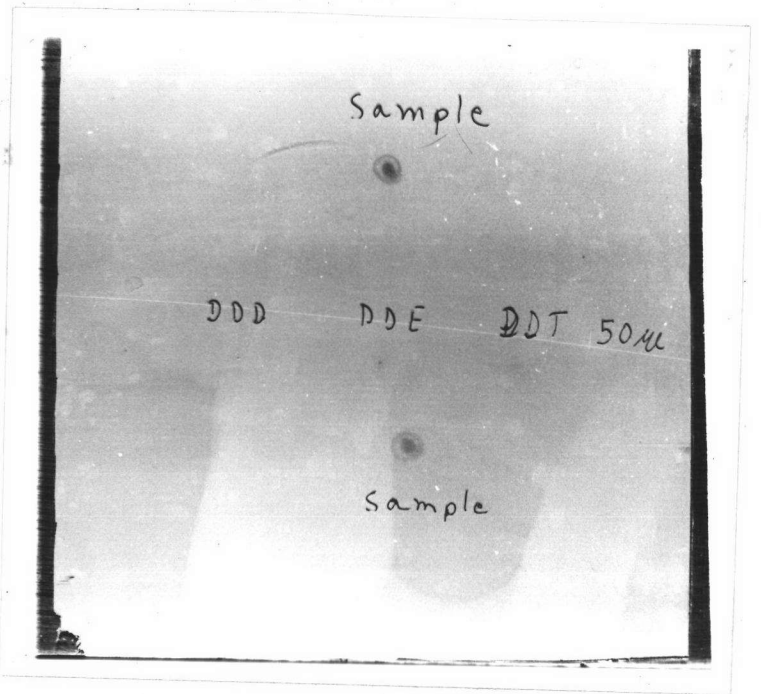
รูปที่ 4. หอยนางรมที่เพาะเลี้ยง บริเวณหาดศิลาทิพย์ ต.อ่างศิลา จ.ชลบุรี

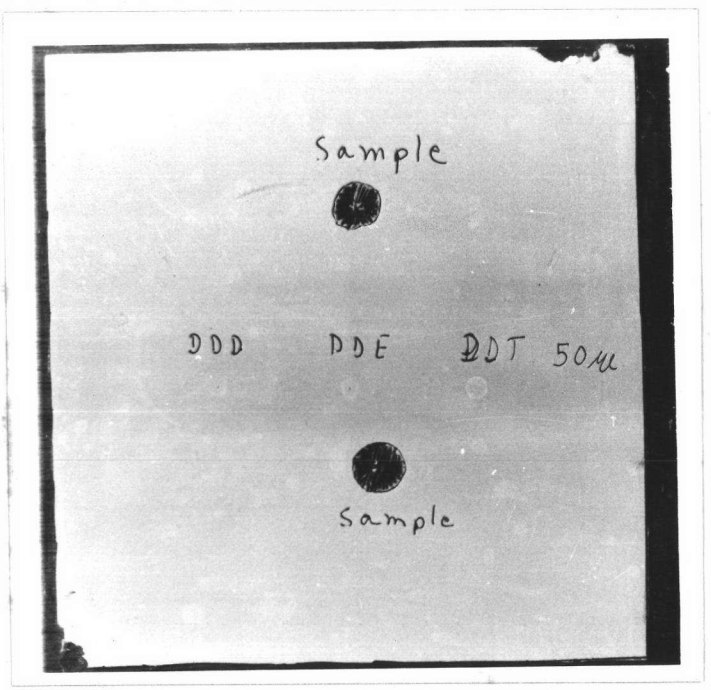


รูปที่ 5. การทำ Partitioning

รูปที่ 6. การ Cleanup ผ่าน Chromatographic column

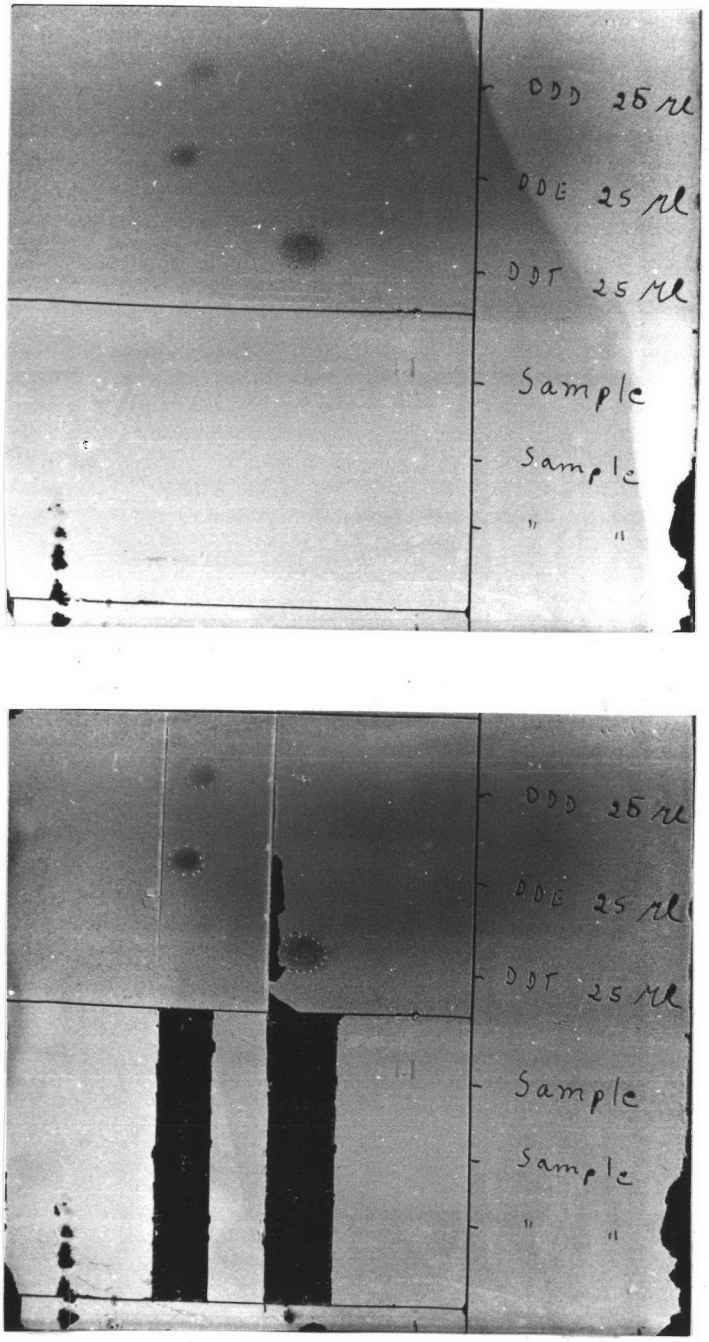
รูปที่ 7. เครื่องแกสโครมาโตกราฟชนิด Tracor MT -220





รูปที่ 8. การทำกระจกเคลือบ (Thin - Layer Chromatography)โดยอบในควันของไอโอดีน (Iodine)

รูปที่ 9. การ Develope ใน Chromatographic chamber



รูปที่ 10. Confirmation โดยวิธีกระจกเคลือบ (Thin - Layer Chromatography)