

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีเชิง
ปริมาณในปลาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR
DETERMINATION OF METHYLMERCURY IN FISH BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเคมี

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMITL-2008-SC-M-012-011

**การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีเชิง
ปริมาณในปลาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR
DETERMINATION OF METHYLMERCURY IN FISH BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**



**สุพัตน์ แสงสวย
SUPAT SANGSUAY**

เลขามุ.....
เลขทะเบียน.....**79811**
วัน,เดือน,ปี...**18** ...**๒๕**...**๒551**

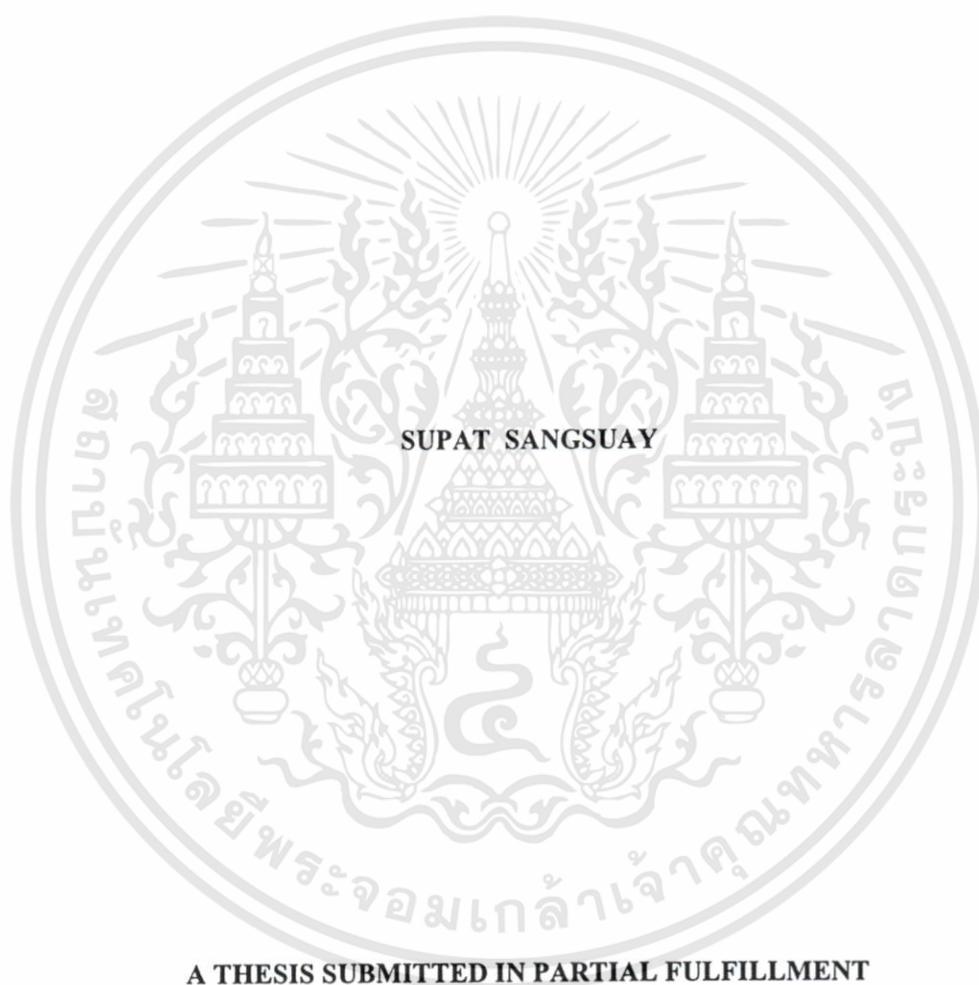
| |
|---------|
| .b..... |
| .i..... |

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2551**

KMITL-2008-SC-M-012-011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR
DETERMINATION OF METHYLMERCURY IN FISH BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2008
KMITL-2008-SC-M-012-011**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2008

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|-----------------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีเชิงปริมาณในปลาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง |
| นักศึกษา | นายสุพัฒน์ แสงสวย |
| รหัสประจำตัว | 46063806 |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| สาขาวิชา | เคมี (เคมีวิเคราะห์) |
| พ.ศ. | 2551 |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ | รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล |

บทคัดย่อ

เมทิลเมอร์คิวรีเป็นสารประกอบที่มีพิษมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปรอทที่อยู่ในรูปอื่นๆ มีการสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะปลาที่เป็นผู้ล่า การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลาเพื่อให้ได้วิธีที่มีความยุ่งยากน้อย มีความไวมากขึ้น มีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบทั่วไปคือวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ การสกัดเมทิลเมอร์คิวรีจากเนื้อเยื่อปลาใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำเข้มข้น 10 โมลาร์ ช่วยให้การสกัดมีความรวดเร็วด้วยการต้มในน้ำเดือด ปรับพีเอชของสารละลายตัวอย่างเป็น 4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ เพื่อเป็นการกำจัดสารรบกวน เพิ่มความเข้มข้นและกำจัดสารรบกวนอีกครั้งด้วยเฟสของแข็งสำหรับสกัดชนิด C-18 SepPak cartridge ที่มีไดโคโนนยึดเกาะอยู่กับเฟสอยู่กับที่ สารประกอบเชิงซ้อนเมทิลเมอร์คิวรี(II) ไดโคโนนด้วยเมทานอล วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในสารละลายด้วยเครื่อง HPLC – UV detector จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้ ค่าขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีเท่ากับ 21.9 และ 147.1 นาโนกรัมต่อเนื้อปลาสด 1 กรัม ตามลำดับ ความเที่ยงของวิธีพิจารณาจากการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่างเนื้อปลาจำนวน 10 ซ้ำ และวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งในสัปดาห์ต่อมา จำนวน 10 ซ้ำเท่าเดิม พบว่าค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนของการวิเคราะห์ทั้งสองครั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ความแม่นยำพิจารณาจากการเติมสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีลงในเนื้อปลาก่อนการสกัดในปริมาณที่แตกต่างกัน 3 ระดับ จำนวนร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 80 – 104 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาสดชนิดต่างๆจำนวน 25 ตัวอย่างและปลาทูน่ากระป๋องจำนวน 10 ตัวอย่าง ผลที่ได้คือค่าต่ำสุดคือน้อยกว่าขีดการตรวจพบและค่าสูงสุดคือ 755 นาโนกรัมต่อน้ำหนักเนื้อปลาสด 1 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|-----------------------|---|
| Thesis | Development and Validation of the Method for Determination of Methylmercury in Fish by High Performance Liquid Chromatography |
| Student | Mr. Supat Sangsuay |
| Student ID | 46063806 |
| Degree | Master of Science |
| Program | Chemistry (Analytical Chemistry) |
| Year | 2008 |
| Thesis Advisor | Assoc. Prof Arunee Kongsakphaisal |

ABSTRACT

Methylmercury is the most toxic compound that compared with all species of mercury. It's to be accumulated in animals, especially in predator fish. A development of determination of methylmercury in fish tissues for ease practiced, more sensitivity and accuracy, and adequate for normally laboratories are aims of this research. The solvent for extracted methylmercury from fish tissues is 10 M sodium hydroxide in de-ionized water, performance efficiently extracted is placed it in boiled water. To adjusted the extracted sample to 4.0 with 1 M hydrochloric acid to remove interferences. To concentrate and remove interferences by using solid phase extraction, C-18 SepPak cartridge, that was adsorbed dithizone in surface of particles. Methylmercury(II)dithizone was eluted with methanol. The final sample was injected to HPLC – UV detector. This method was validated by single laboratory, the results are showed limit of detection and limit of quantitation were 21.9 and 147.1 ng MeHg /g wet sample, respectively. Precision was practiced by analyzed replicates fish samples in-day (n=10) and analyzed the same lot of replicates fish samples (n=10) in next week, the means and variances do not difference between the two test groups. Accuracy test by adding known amount of methylmercury standard into fish samples, 3 levels, the % recoveries of methylmercury from spiked sample ranged 80 – 104. The 25 of fresh fish samples and 10 canned tuna samples found methylmercury ranged between less than LOD and 755 ng/g.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับสำเร็จลงได้ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาจาก รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. สุวรรณ ไชยประสิทธิ์ ผศ.ดร. วินัย นุตมากุล และ ดร. วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ คณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากอาจารย์ทั้งสี่ท่านและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณพี่ๆและเพื่อนๆร่วมงานทุกท่านที่ให้คำปรึกษา สนับสนุน และให้กำลังใจด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณเพื่อนๆสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกคน ที่ให้คำแนะนำในเรื่องต่างๆ และให้กำลังใจตลอดเวลา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่อ่อนสา แสงสวย ที่ให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง ทำให้ข้าพเจ้าทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุพัฒน์ แสงสวย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | I |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | II |
| กิตติกรรมประกาศ..... | III |
| สารบัญ..... | IV |
| สารบัญตาราง..... | VIII |
| สารบัญรูป..... | IX |
| รายการคำย่อและสัญลักษณ์..... | X |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 3 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 4 |
| 2.1 เมทิลเมอร์คิวรี..... | 4 |
| 2.1.1 ปรีทและเมทิลเมอร์คิวรี..... | 4 |
| 2.1.2 เมทิลเมอร์คิวรีและโคโทโซน..... | 4 |
| 2.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง..... | 5 |
| 2.2.1 กระบวนการทางโครมาโทกราฟี..... | 6 |
| 2.2.2 กลไกการหน่วงเหนี่ยวสาร..... | 6 |
| 2.2.3 คำสำคัญ นิยามและความสัมพันธ์ในโครมาโทกราฟี..... | 7 |
| 2.2.4 การจำแนกโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง..... | 14 |
| 2.2.5 ส่วนประกอบของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง..... | 19 |
| 2.3 การสกัดด้วยเฟสของแข็ง..... | 22 |
| 2.3.1 นิยามของการสกัดด้วยเฟสของแข็ง..... | 22 |
| 2.3.2 รูปแบบและองค์ประกอบของการสกัดด้วยเฟสของแข็ง..... | 22 |
| 2.3.3 ขั้นตอนการสกัดด้วยเฟสของแข็ง..... | 23 |
| 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 23 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

| | หน้า |
|--|------|
| บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย..... | 28 |
| 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับงานวิจัย..... | 28 |
| 3.1.1 สารมาตรฐาน..... | 28 |
| 3.1.2 สารเคมี..... | 28 |
| 3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์..... | 28 |
| 3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย..... | 29 |
| 3.2.1 พัฒนาวิธีวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีเชิงปริมาณในตัวอย่างปลา..... | 29 |
| 3.2.2 ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีที่พัฒนาขึ้น..... | 29 |
| 3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาชนิดต่างๆและปลา ทูน่ากระป๋อง..... | 29 |
| 3.2.4 สรุปรวบรวมและประเมินผลการศึกษา..... | 29 |
| 3.3 วิธีดำเนินการ..... | 30 |
| 3.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน..... | 30 |
| 3.3.2 การเตรียมสารมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน..... | 30 |
| 3.3.3 การเตรียมสารเคมี..... | 30 |
| 3.3.4 ศึกษาการตอบสนองของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงที่ติดตั้ง เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี (UV detector) ว่ามีขีดการวัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิง ปริมาณต่อสารประกอบเชิงซ้อนของเมทิลเมอร์คิวรีและ ได ไท โทซัน..... | 32 |
| 3.3.5 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน..... | 32 |
| 3.3.6 ศึกษาหาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดเมทิล- เมอร์คิวรีออกจากเนื้อเยื่อปลา..... | 32 |
| 3.3.7 ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์..... | 34 |
| 3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาและปลาทูน่ากระป๋อง..... | 37 |
| 3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างปลาและปลาทูน่ากระป๋อง..... | 37 |
| 3.4.2 การสกัดเมทิลเมอร์คิวรีจากเนื้อเยื่อปลา..... | 37 |
| 3.4.3 การวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีในสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC..... | 37 |
| 3.4.4 การควบคุมคุณภาพและการรายงานผล..... | 37 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

| | หน้า |
|--|------|
| บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล..... | 39 |
| 4.1 ผลการศึกษาการตอบสนองของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงที่ติดตั้งเครื่องตรวจวัดชนิดยูวี (UV detector) ว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณต่อสารประกอบเชิงซ้อนของเมทิลเมอร์คิวรี(II) ไดโไทโชน..... | 39 |
| 4.2 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี..... | 40 |
| 4.3 ผลการศึกษาหาตัวสกัดและสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกมาจากเนื้อเยื่อปลา..... | 41 |
| 4.4 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์..... | 41 |
| 4.4.1 ขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ..... | 41 |
| 4.4.2 ช่วงที่เหมาะสมในการวิเคราะห์..... | 45 |
| 4.4.3 ความเที่ยงและความแม่นยำ..... | 45 |
| 4.4.4 ความแม่นยำ..... | 46 |
| 4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีที่สะสมในปลาสดและปลาทูน่ากระป๋อง..... | 47 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ | |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย..... | 49 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ..... | 50 |
| เอกสารอ้างอิง..... | 51 |
| ภาคผนวก..... | 55 |
| ภาคผนวก ก. การยืนยันความเป็นเส้นตรงด้วย Mandel fitting test..... | 56 |
| ภาคผนวก ข. แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวัดเมทิลเมอร์คิวรีด้วยเครื่อง HPLC – UV detector..... | 58 |
| ภาคผนวก ค. แสดงข้อมูลเพื่อยืนยันขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ..... | 59 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

| | หน้า |
|---|------|
| ภาคผนวก ง. ความเที่ยงและความแม่นยำ..... | 60 |
| ภาคผนวก จ. ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาสดและปลา ทูน่ากระป๋อง | 63 |
| ประวัติผู้เขียน | 65 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 2.1 | แสดงคุณสมบัติของตัวทำละลายที่นิยมใช้..... | 16 |
| 3.1 | ค่าร้อยละของการคืนกลับของยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ตกค้างในอาหาร (ตามมาตรฐานของCodex)..... | 36 |
| 3.2 | สภาวะของเครื่อง HPLC..... | 37 |
| 4.1 | เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดของสารสกัดต่างกัน..... | 42 |
| 4.2 | แสดงผลของน้ำหนักที่มีต่อการสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกจากเนื้อปลา..... | 43 |
| 4.3 | ผลการทดสอบเพื่อการบ่งชี้ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลา..... | 44 |
| 4.4 | แสดงร้อยละการคืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... | 45 |
| 4.5 | แสดงการทวนซ้ำและการทำซ้ำได้ด้วยห้องปฏิบัติการเดียว ในการวิเคราะห์ตัวอย่างปลากระเบน..... | 46 |
| 4.6 | แสดงความถูกต้องของวิธีด้วยค่าร้อยละการคืนกลับ..... | 47 |
| 4.7 | ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาสดและปลาทูน่ากระป๋อง.... | 48 |
| ก.1 | แสดงพื้นที่ที่พิกและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี..... | 57 |
| ข.1 | แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ที่พิกของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีที่ความเข้มข้นต่างๆ..... | 58 |
| ค.1 | แสดงข้อมูลที่ได้จากการทดสอบขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ..... | 59 |
| ง. 1 | แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละกลุ่มในตัวอย่างที่ทำพร้อมกัน (SD_w) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มข้อมูลที่ต่างวันกัน (SD_w2)..... | 60 |
| ง.2 | แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน Codex และ AOAC | 61 |
| ง.3 | แสดงร้อยละการคืนกลับเมื่อเติมสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีปริมาณ 300 นาโนกรัม ลงในตัวอย่างเนื้อปลาสด..... | 62 |
| จ.1 | แสดงปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีและปรอททั้งหมดในปลาทะเลที่นิยมบริโภคในประเทศไทย..... | 63 |
| จ.2 | แสดงปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีและปรอททั้งหมดในปลาน้ำจืดที่นิยมบริโภคในประเทศไทย..... | 64 |
| จ.3 | ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีและปรอททั้งหมดในปลาทูน่ากระป๋อง..... | 64 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของกรมวิทยาศาสตร์สุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข ห้ามมิให้เผยแพร่หรือใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 2.1 | โครงสร้างของ โมเลกุลสารประกอบเชิงซ้อนของปรอทกับไดไทโชน (บนสุด) ส่วนโครงสร้าง A เป็นไอโซเมอร์ที่ให้สีส้มและจะเปลี่ยนเป็นโครงสร้าง B (สีน้ำเงิน) เมื่อได้รับคลื่นแสง..... | 5 |
| 2.2 | แสดงฟลักของตัวถูกละลายและการพิจารณาประสิทธิภาพคอลัมน์จากฟลักของโครมาโทแกรม..... | 10 |
| 2.3 | ความหมายของการแยก..... | 11 |
| 2.4 | แสดง Van Deemter Curve..... | 13 |
| 2.5 | ไดอะแกรมของระบบ HPLC..... | 19 |
| 2.6 | รูปแบบของเฟสของแข็งสกัด..... | 23 |
| 4.1 | โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีเข้มข้น 100, 300, 500, 700 และ 900 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร..... | 40 |
| 4.2 | กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีในช่วง 100 – 900 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร..... | 41 |
| 4.3 | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในสารละลาย ตัวอย่างและพีเอช..... | 42 |
| 4.4 | โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างที่ไม่ตรวจไม่พบเมทิลเมอร์คิวรี(A) และโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน 300 นาโนกรัม (B)..... | 44 |
| ก.1 | กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี..... | 57 |

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

| | | |
|---------------|---------|---|
| A | หมายถึง | Eddy diffusion หรือ Multipart effect |
| B | หมายถึง | Random molecular diffusion หรือ longitudinal diffusion |
| C | หมายถึง | Mass transfer coefficient |
| Cf | หมายถึง | ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลาที่เติมสารละลายมาตรฐาน (spiked sample) |
| Cs | หมายถึง | ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลา (sample blank) |
| CVAAS | หมายถึง | Cold Vapor Atomic Absorption spectrometry |
| CV - AFS | หมายถึง | Cold vapor – atomic fluorescence spectrometry |
| CV-ICP-AES | หมายถึง | Cold vapor - Inductive couple plasma – atomic emission spectrometry |
| CV – ICP – MS | หมายถึง | Cold vapor - Inductive couple plasma – atomic emission spectrometry - mass spectrometry |
| CV - MIP | หมายถึง | Cold vapor – microwave induce plasma |
| c_s | หมายถึง | ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสอยู่กับที่ |
| c_m | หมายถึง | ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสอยู่เคลื่อนที่ |
| d | หมายถึง | เส้นผ่าศูนย์กลางคอลัมน์ |
| df | หมายถึง | ความหนาของฟิล์มของเฟสอยู่กับที่ (stationary film tickness) |
| EC | หมายถึง | Exclusion Chromatography |
| F_c | หมายถึง | อัตราการไหลเชิงปริมาตร (volumetric flow rate) |
| GC-ECD | หมายถึง | แก๊สโครมาโทกราฟีที่มีเครื่องตรวจวัดดักจับอิเล็กตรอน (Gas Chromatography – Electrons Capture Detector) |
| GC-AA | หมายถึง | Gas Chromatography – Atomic absorption spectrometry |
| H | หมายถึง | ความสูงของเฟส (phase hight) |
| HPLC | หมายถึง | โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง |
| IEC | หมายถึง | โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ |
| ICP-AES | หมายถึง | Inductive couple plasma – atomic emission spectrometry |
| ICP – MS | หมายถึง | Inductive couple plasma – mass spectrometry |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อและสัญลักษณ์(ต่อ)

| | | |
|---------------------------------|---------|--|
| K | หมายถึง | สัมประสิทธิ์การพาร์ทิชัน (partition coefficient) |
| k' | หมายถึง | อัตราส่วนความจุ (capacity ratio) |
| L | หมายถึง | ความยาวคอลัมน์ |
| LLC | หมายถึง | โครมาโทกราฟีแบบของเหลว – ของเหลว |
| LOD | หมายถึง | ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection) |
| LOQ | หมายถึง | ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of Quantitation) |
| LSC | หมายถึง | โครมาโทกราฟีแบบของเหลว – ของแข็ง |
| M | หมายถึง | โมลาร์ (molar) |
| MS | หมายถึง | Mass spectrometer |
| N | หมายถึง | จำนวนเฟส (phase number) |
| N _{eff} | หมายถึง | จำนวนเฟสที่มีผลต่อการแยก (effective plate number) |
| N _{app} | หมายถึง | จำนวนเฟสที่ปรากฏ (the apparent phase number) หรือ จำนวนเฟสทางทฤษฎี (Theoretical phase) |
| ppm | หมายถึง | ส่วนในล้านส่วน |
| ppb | หมายถึง | ส่วนในพันล้านส่วน |
| r | หมายถึง | สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlative coefficient) |
| R | หมายถึง | รัศมีคอลัมน์ |
| R ² | หมายถึง | สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination) |
| Rs | หมายถึง | ค่าการแยก (Resolution) |
| TF | หมายถึง | แฟกเตอร์ของหางพีก (tailing factor) หรือความไม่สมมาตรของพีก (peak asymmetry) |
| TLC | หมายถึง | Thin-Layer Chromatography |
| t _R | หมายถึง | เวลาในการหน่วงเหนี่ยว (Retention time) |
| t _M , t ₀ | หมายถึง | เวลาที่ตัวทำละลายถูกหน่วงเหนี่ยว (solvent hold up time) |
| t' _R | หมายถึง | เวลาการหน่วงเหนี่ยวที่ปรับค่าแล้ว (adjusted retention time) |
| u | หมายถึง | ความเร็วของเฟสเคลื่อนที่ |
| USFDA | หมายถึง | สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา |
| UV | หมายถึง | คลื่นแสงอุลตราไวโอเลต |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อและสัญลักษณ์(ต่อ)

| | | |
|------------|---------|---|
| V_s | หมายถึง | ปริมาตรของเฟสอยู่กับที่ |
| V_m | หมายถึง | ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ |
| V_R | หมายถึง | ปริมาตรการหน่วงเหนี่ยว (Retention volume) |
| V'_R | หมายถึง | ปริมาตรการหน่วงเหนี่ยวที่ปรับค่าแล้ว (adjusted retention volume) |
| ϵ | หมายถึง | ช่องว่างทั้งหมดที่เกิดจากการบรรจุเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์ |
| σ^2 | หมายถึง | ความแปรปรวนของพีค |
| β | หมายถึง | อัตราส่วนของเฟส (phase ratio) |
| α | หมายถึง | ค่าความเลือกเฉพาะคอลัมน์ หรือค่าหน่วงเหนี่ยวสัมพัทธ์ (column selectivity หรือ relative retention) |



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์

การส่งออกอาหารเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีความสำคัญของประเทศไทย สามารถนำเงินตราต่างประเทศเข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี ในปัจจุบันการกีดกันทางการค้าที่ไม่ใช่ทางภาษีถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง หนึ่งในนั้นคือการกำหนดข้อบังคับเกี่ยวกับความปลอดภัยของสินค้า อาหารและวัตถุดิบก็เป็นสินค้าประเภทหนึ่งที่ต้องเจอกับปัญหาดังกล่าว ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารชนิดต่างๆที่ตกค้างในสินค้าจึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งแก้ปัญหานี้ได้ในระดับหนึ่ง การตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจภายในประเทศหรือตรวจที่ประเทศนำเข้าก็ได้ ข้อเสียของการตรวจที่ประเทศนำเข้าคือค่าการตรวจแพงกว่าเนื่องจากค่าแรงแพง และถ้าสินค้านั้นไม่ผ่านข้อบังคับของประเทศที่นำเข้า สินค้านั้นอาจถูกทำลายหรือนำเข้าไม่ได้ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนให้สินค้าทำให้ออกาสในการแข่งขันลดลง ข้อดีของการตรวจที่ประเทศนำเข้าคือผลการวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับของประเทศนำเข้า ส่วนข้อดีของการตรวจในประเทศคือมีราคาถูกกว่าและทราบว่าคุณภาพสินค้าที่ผลิตขึ้นผ่านข้อกำหนดของประเทศที่ต้องการส่งออกหรือไม่ และถ้าไม่ผ่านจะแก้ปัญหายังไง เช่น ส่งไปประเทศอื่นที่มีข้อกำหนดสูงกว่าหรือจำหน่ายภายในประเทศ (ผลการวิเคราะห์ไม่เกินข้อกำหนด) เป็นต้น ซึ่งเป็นการแก้ปัญหามาในระดับหนึ่ง ข้อเสียของการตรวจภายในประเทศก็มีเช่นเดียวกัน เช่น ผลการตรวจวิเคราะห์อาจไม่ได้รับการยอมรับ หรือภายในประเทศยังไม่มีหน่วยงานที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารตามข้อกำหนด หรือถ้ามีหน่วยงานนั้นก็ยังไม่เป็นที่ยอมรับ เป็นต้น จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าประเทศไทยยังไม่มีหน่วยงานใดให้บริการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่างชนิดต่างๆ ทั้งที่ข้อกำหนดในการนำเข้าสินค้าบางชนิดมีการกำหนดไว้ในบางประเทศ

องค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA) กำหนดปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาต้องไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm) และหน่วยงานป้องกันสิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกา (USEPA) กำหนดระดับเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่างปลาต้องไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้นในปลานักล่า เช่น ปลาฉลาม ปลาดาบ ปลาทูน่า เป็นต้น ที่กำหนดให้ระดับเมทิลเมอร์คิวรีในปลาต้องไม่เกิน 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และประกาศให้ข้อแนะนำไม่ให้ผู้หญิงที่กำลังตั้งครรภ์ ผู้หญิงที่อยู่ในช่วงให้นมลูก และเด็ก รับประทานปลานักล่าและปลาหมึกไม่เกิน 12 ออนซ์ต่อสัปดาห์ ส่วนปลาที่มีเมทิลเมอร์คิวรีสะสมอยู่ในระดับสูงไม่ควรรับประทานมากกว่า 6 ออนซ์ต่อสัปดาห์ [1,2]

ในปีพ.ศ.2546 หรือปีค.ศ.2003 คณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญร่วมขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (JECFA) ได้ปรับเปลี่ยนปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีที่ได้รับในหนึ่งสัปดาห์ (Provisional Tolerable Weekly Intake, PTWI) จาก 3.3 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักคนเราหนึ่งกิโลกรัมเป็น 1.6 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักคนเราหนึ่งกิโลกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามนุษย์ควรตระหนักถึงอันตรายของการใช้ปรอทและควรควบคุมการใช้อย่างเข้มงวด[3]

เมทิลเมอร์คิวรี (methylmercury) เป็นสารประกอบโลหะอินทรีย์ (organometallic) ที่มีความเป็นพิษมากที่สุด ในบรรดาสารประกอบของปรอทในรูปต่างๆ (mercury species) เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถถูกส่งผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อสมอง ส่งผลให้เซลล์ประสาทของการมองเห็น (the visual cortex) และเซลล์ประสาทสมองส่วนหน้า (the cerebellum) ถูกทำลาย การได้รับปรอทเข้าสู่ร่างกายติดต่อกันนานๆ จะส่งผลให้ระบบสมองของทารกในครรภ์หยุดการเจริญเติบโต เมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับปรอท [4,5]

ในแต่ละปีปรอทถูกนำไปใช้ทั่วโลกมากกว่า 3,400 ตัน ซึ่งใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมเหมืองทอง อุตสาหกรรมการผลิตแบตเตอรี่ (Chlor-Alkali industry) อุตสาหกรรมการผลิตพลาสติก เป็นต้น [6]

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อเยื่อปลาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ติดตั้งเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (UV detector) ให้สามารถปฏิบัติงานได้ง่าย รวดเร็ว ผลวิเคราะห์มีความแม่นยำและความเที่ยงสูง
2. ตรวจสอบวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่างปลาสดและปลาทูน่ากระป๋อง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการหะเมทิลเมอร์คิวรีออกจากเนื้อเยื่อปลา
2. ทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (validation method) ได้แก่ ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection) ขีดจำกัดการวิเคราะห์หาปริมาณ (limit of quantitation) ความเป็นเส้นตรง (linearity) ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)
3. ตรวจสอบวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาสดจำนวน 25 ตัวอย่างและปลาทูน่ากระป๋องจำนวน 10 ตัวอย่าง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. วิเคราะห์เชิงปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อเยื่อปลา
2. ทราบสถานการณ์ของการตกค้างของเมทิลเมอร์คิวรีในปลาสดและปลาทูน่ากระป๋องที่มีจำหน่ายภายในประเทศไทย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เมทิลเมอร์คิวรี

2.1.1 โปรอทและเมทิลเมอร์คิวรี (mercury and methylmercury) [7,8]

ปรอทเป็นโลหะที่เป็นที่สร้างขึ้นโดยกิจกรรมของมนุษย์ มลภาวะที่เกี่ยวข้องกับปรอทคือการที่อวัยวะต่างๆ ในสัตว์ทะเลซึมซับปรอทไว้ แล้วถูกเปลี่ยนเป็นเมทิลเมอร์คิวรี (methylmercury) ด้วยกระบวนการเมตาบอลิซึม แล้วสะสมไว้ในเนื้อเยื่อ และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในห่วงโซ่อาหาร พิษจากเมทิลเมอร์คิวรีเป็นพิษที่เรื้อรังเนื่องจากการออกฤทธิ์หลักจะเป็นปัญหาต่อระบบเส้นประสาทส่วนกลาง ส่วนพิษของปรอทจะเป็นปัญหาต่อไต เนื่องจากความแตกต่างของสารทั้งสองและเมตาบอลิซึมได้แก่ เมทิลเมอร์คิวรีสามารถละลายได้ในน้ำมันส่วนปรอทไม่สามารถละลายได้ และเมทิลเมอร์คิวรียังสามารถขนส่งผ่านระหว่างเลือดและสมองได้ง่าย เมทิลเมอร์คิวรีสามารถถูกเปลี่ยนเป็นเมอร์คิวริก ไอออนที่มีความเป็นพิษสูงด้วยตัวเร่งที่มีอยู่ในเซลล์สมองรวมทั้งเซลล์ส่วนอื่นๆ ยิ่งไปกว่านั้นเมทิลเมอร์คิวรียังสามารถผ่านจากรกไปสะสมในตัวอ่อน ทำให้เป็นพิษต่อระบบประสาทของตัวอ่อน ดังนั้น NIEHS จึงให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยที่มีการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบที่ร้ายแรงต่อสมอง ไตและระบบภูมิคุ้มกัน ที่อาจเกิดขึ้นจากสารประกอบปรอททุกสปีชีส์

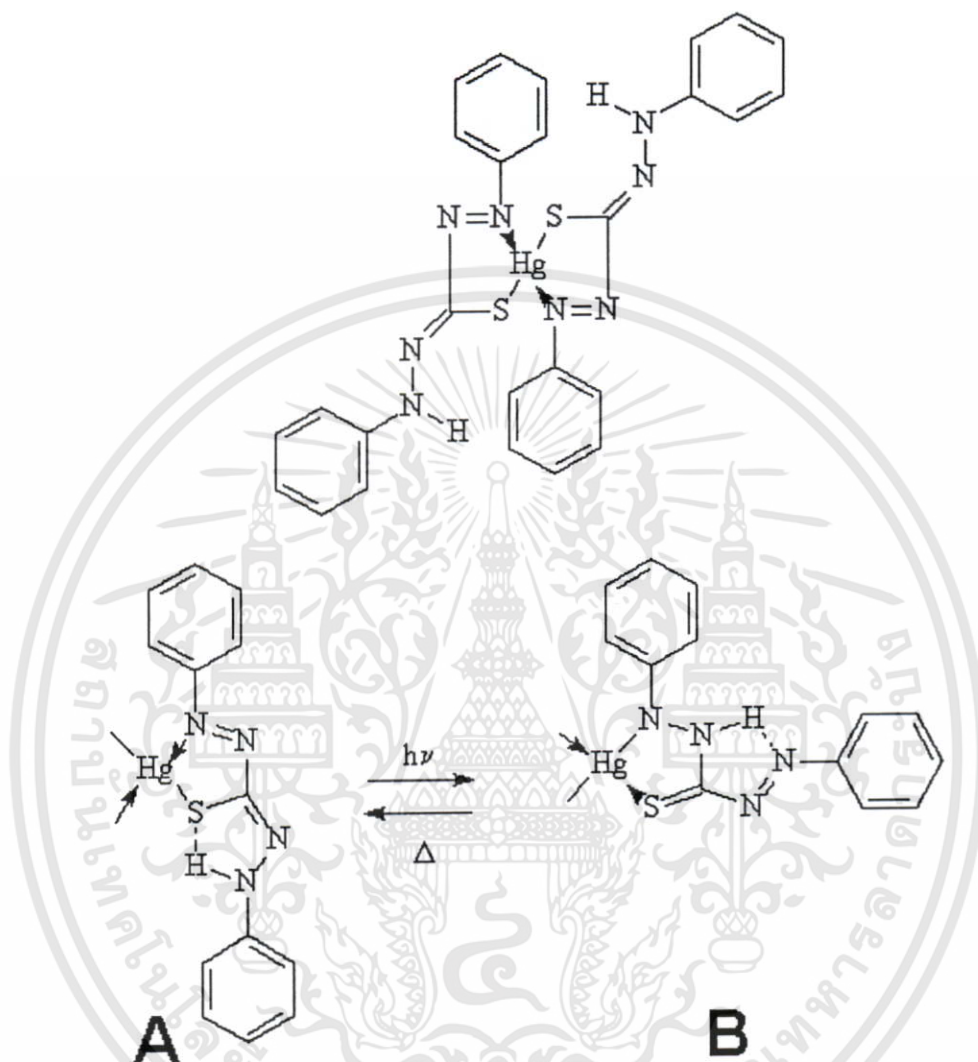
งานวิจัยที่สำคัญสองงานที่ได้รับทุนสนับสนุนจาก NIEHS คือการสืบสวนผลกระทบเรื้อรังจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเมทิลเมอร์คิวรีระดับต่ำในเด็กๆ และการศึกษาเบื้องต้นของคนที่ได้รับเมทิลเมอร์คิวรีก่อนและหลังการตาย ซึ่งโครงการเหล่านี้เป็นการศึกษาที่ใช้เวลานาน โดยใช้ผู้คนที่อยู่หมู่เกาะ Seychelles และหมู่เกาะ Farloes Islands ซึ่งโครงการนี้ยังไม่จบ

2.1.2 เมทิลเมอร์คิวรีและไดไทโซน (methylmercury and dithizone) [9,10]

ไดไทโซนหรือ 1,5-diphenylthiocarbazon เป็นสารเคมีที่เป็นผลึกสีม่วงดำ ไม่ละลายในน้ำแต่ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์มและคาร์บอนเตตราคลอไรด์ สารละลายไดไทโซนที่ละลายในตัวทำละลายทั้งสองนี้สามารถดูดกลืนแสงได้ เนื่องจากสามารถคงอยู่ในรูปไอโซเมอร์สองแบบคือ thione tautomer และ thiol tautomer ไดไทโซนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีและสามารถใช้เป็นสารสกัดเพื่อสกัดโลหะได้หลายชนิด สารประกอบเชิงซ้อนของไดไทโซนกับโลหะสามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคสเปกโทเมตรี ความจำเพาะเจาะจงต่อโลหะขึ้นอยู่กับไอออนหรือโดยใช้ masking reagent เช่น cyanide, thiocyanate, EDTA, citrate, tartrate, thiosulfate เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากไดโทโซนกับปรอทมีโครงสร้างดังรูปที่ 2.1 ซึ่งจะเห็นเป็นสีอะไรขึ้นอยู่กับพีเอชซึ่งจะทำให้การจัดเรียงอะตอมของสารประกอบเชิงซ้อนไม่เหมือนกัน



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลสารประกอบเชิงซ้อนของปรอทกับไดโทโซน(บนสุด)โครงสร้าง A เป็นไอโซเมอร์ที่มีสีส้มและจะเปลี่ยนเป็นโครงสร้าง B เป็นไอโซเมอร์ที่มีสีน้ำเงินเมื่อได้รับคลื่นแสง

2.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) [11,12]

ในปัจจุบันเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นเครื่องมือที่มีความสำคัญมาก ทุกหน่วยงานที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ หรือวิจัยจำเป็นต้องมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 กระบวนการทางโครมาโทกราฟี

ในระบบโครมาโทกราฟีโมเลกุลของตัวถูกละลาย หรือสารที่สนใจจะกระจายตัวอยู่ระหว่างเฟสสองเฟส ซึ่งไม่ละลายซึ่งกันและกัน โดยเฟสหนึ่งเป็นของเหลวและถูกทำให้เคลื่อนที่เรียกว่าเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และอีกเฟสหนึ่งเป็นของแข็งหรือของเหลวเคลือบอยู่บนของแข็งซึ่งจะอยู่กับที่เรียกเฟสนี้ว่า เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) เมื่อเราต้องการแยกสารผสมด้วยระบบโครมาโทกราฟี สารผสมเมื่อเข้าไปสู่ระบบโครมาโทกราฟีจะถูกเฟสเคลื่อนที่พาไป ซึ่งการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดในเฟสของเหลวจะไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสาร เฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่

2.2.2 กลไกการหน่วงเหนี่ยวสาร

การแยกเกิดขึ้นได้จากการที่องค์ประกอบต่างๆ ในตัวอย่างมีการหน่วงเหนี่ยวหรือค้างอยู่ในเฟสอยู่กับที่ได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารแต่ละชนิดที่ผสมกันอยู่ต่อเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ ถ้าสารเกิดการหน่วงเหนี่ยวอยู่ได้จะมีความชอบที่จะกระจายตัวอยู่ในเฟสอยู่กับที่ แต่ถ้าสารนั้นมีการกระจายในเฟสเคลื่อนที่มากกว่าจะหลุดหรือผ่านออกมาอย่างรวดเร็ว ในทางกลับกันถ้ามีการกระจายตัวอยู่ในเฟสอยู่กับที่มาก จะติดค้างอยู่ในคอลัมน์เป็นเวลานานถูกชะออกมาช้า

การหน่วงเหนี่ยว (retention) สารใดจะถูกหน่วงเหนี่ยวนั้นจะขึ้นกับการแข่งขันกันระหว่างสารที่ถูกละลายกับตัวทำละลายในเฟสอยู่กับที่ อันตรกิริยาภายในโมเลกุลจะเป็นแรงที่ดึงดูดสารชนิดต่างๆ ไว้ ความแรงจะมากหรือน้อยขึ้นกับโครงสร้างของโมเลกุล ขณะที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์จะเกิดแรงกระทำต่างๆ คือ

2.2.2.1 อันตรกิริยาไอออนิก (ionic interaction) อันตรกิริยาประเภทนี้จะเกิดมีการแลกเปลี่ยนหรือแทนที่ประจุระหว่างสารที่ถูกละลายกับ โมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่หรือเฟสอยู่กับที่ที่มีประจุหรืออยู่ในรูปไอออน

2.2.2.2 อันตรกิริยาที่มีสภาพขั้ว (polar interaction) อันตรกิริยานี้เป็นผลมาจากการกระจายประจุที่ไม่สมมาตรใน โมเลกุลที่เป็นกลาง

2.2.2.3 อันตรกิริยาพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding interaction) อันตรกิริยานี้จะมีแรงขนาดปานกลาง เกิดขึ้นได้เมื่อ โมเลกุลหนึ่งซึ่งมีอะตอมไฮโดรเจนที่อยู่ในสภาพกรดเข้าใกล้กับ โมเลกุลหนึ่งที่มีอะตอมที่มีอิเล็กตรอนสูง

2.2.2.4 อันตรกิริยากระจายตัว (dispersive interaction) เป็นอันตรกิริยาที่อ่อนมาก เหมือนกับการเหนี่ยวนำให้อะตอมข้างเคียงเกิดสภาพมีขั้วและเปลี่ยนตำแหน่งของสภาพขั้ว หรือเกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนกระจายทั่วโมเลกุล

2.2.2.5 อันตรกิริยาแยกขนาด (size-exclusion interaction) เป็นการยึดเหนี่ยวที่เป็นผลมาจากรูปร่างหรือโครงสร้างของเฟสอยู่กับที่มีรูพรุน โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่าจะเข้าไปอยู่ในรูพรุนได้ลึกกว่าส่วนโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ทำให้โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ก่อน

2.2.3 คำสำคัญ นิยามและความสัมพันธ์ในโครมาโทกราฟี

พฤติกรรมของตัวถูกละลายในโครมาโทกราฟีอธิบายได้โดยใช้ค่าปริมาตรการหน่วงเหนี่ยว (retention volume, V_R) ซึ่งเกี่ยวข้องกับสัมพันธ์กับค่าเวลาที่ใช้ในการหน่วงเหนี่ยว (retention time, t_R) และค่าอัตราการพาที่ขึ้น (partition ratio) หรืออัตราส่วนของความจุ (capacity ratio, k')

เวลาในการหน่วงเหนี่ยว (retention time, t_R) คือเวลาที่เฟสเคลื่อนที่ใช้ในการพาตัวถูกละลายเริ่มตั้งแต่จุดที่ทำการฉีดสารผ่านเข้ามายังเฟสอยู่กับที่จนกระทั่งผ่านเฟสอยู่กับที่ออกมาสู่เครื่องตรวจวัด ซึ่งแสดงให้เห็นที่ตำแหน่งจุดยอดของพีค ส่วนค่าปริมาตรการหน่วงเหนี่ยวเท่ากับค่าเวลาในการหน่วงเหนี่ยวคูณด้วยอัตราการไหลเชิงปริมาตร (volumetric flow rate, F_c) ของเฟสเคลื่อนที่

$$V_R = t_R F_c \quad (2.1)$$

เวลาที่ตัวทำละลายถูกหน่วงเหนี่ยว (solvent hold up time, t_M หรือ t_0) คือเวลาที่ใช้ในการชะสารที่ไม่เกิดการหน่วงเหนี่ยวใดๆ ภายในระบบ เช่น ตัวทำละลาย คำนี้อะบอกถึงปริมาตรที่ว่าง หรือช่องว่างต่างๆ ในคอลัมน์

เวลาหรือปริมาตรการหน่วงเหนี่ยวที่ปรับค่าแล้ว (adjusted retention time, t'_R หรือ adjusted retention volume, V'_R) คือค่าเวลาหรือปริมาตรการหน่วงเหนี่ยวตัวถูกละลายลบออกด้วยค่าเวลาหรือปริมาตรที่ใช้ในการหน่วงเหนี่ยวตัวทำละลาย ค่าเวลานี้จะเป็นค่าเวลาที่แท้จริงที่สารตัวอย่างนั้นอยู่ในเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์

$$t'_R = t_R - t_M \quad (2.2)$$

อัตราเร็วเชิงปริมาตร (volumetric flow rate) ตัวแปลทั้งหมดของค่าอัตราการไหลเชิงปริมาตรแสดงได้ดังสมการ

$$F_c = \frac{\pi d^2}{4} \epsilon \frac{L}{t_M} \quad (2.3)$$

d คือเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของคอลัมน์

L คือความยาวคอลัมน์

ϵ คือ ช่องว่างทั้งหมดที่เกิดจากการบรรจุเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วของเฟสเคลื่อนที่ (velocity of the mobile phase, u) ค่าเฉลี่ยของความเร็วเชิงเส้นของเฟสเคลื่อนที่

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (2.4)$$

สัมประสิทธิ์การพาร์ทิชัน (partition coefficient, K) คืออัตราส่วนความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสอยู่กับที่ เทียบกับเฟสเคลื่อนที่ คำนี้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานอิสระมาตรฐานของตัวถูกละลายที่เคลื่อนที่จากเฟสเคลื่อนที่ไปยังเฟสอยู่กับที่

$$K = \frac{c_s}{c_m} \quad (2.5)$$

c_s คือ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสอยู่กับที่

c_m คือความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่

อัตราส่วนพาร์ทิชัน (partition ratio) หรือ แฟกเตอร์ของความจุ (capacity factor, k') คำนี้นจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าโมเลกุลของสารตัวอย่างจะถูกยึดเหนี่ยวหรือหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ใดภายใต้สภาวะเงื่อนไขการแยกแบบ isocratic หรืออาจแสดงค่าในรูปของเวลาที่ใช้ในการชะตัวถูกละลายลบออกด้วยเวลาการชะตัวถูกละลายที่ไม่หน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ (ซึ่งมีค่า $k' = 0$) หารด้วยเวลาในการชะตัวถูกละลายที่ไม่หน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M} = \frac{KV_s}{V_M} \quad (2.6)$$

V_s คือค่าปริมาตรของเฟสอยู่กับที่

V_M คือค่าปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่

ค่าเวลาที่ใช้ในการหน่วงเหนี่ยวสารมีความสัมพันธ์กับค่า k' ดังสมการต่อไปนี้

$$t_R = t_M(1 + k') = \frac{L}{u}(1 + k') \quad (2.7)$$

u คือความเร็วของการไหลเชิงเส้น

อัตราส่วนการพาร์ทิชันและเวลาในการหน่วงเหนี่ยวสาร นั้นเป็นผลมาจากองค์ประกอบของตัวทำละลาย เฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกนั้น ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวและมีความหนาของเฟส (stationary film thickness, d_r) เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าการแยกของตัวถูกละลายแต่ละตัวที่อยู่ในเฟสอยู่กับที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของเฟส (phase ratio, β) ของคอลัมน์ ค่าสัมประสิทธิ์พาร์ทิชันและอัตราส่วนพาร์ทิชันดังสมการต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$K = \beta k' = \frac{r}{2d_r} k' \quad (2.8)$$

R คือ รัศมีของคอลัมน์

ค่าเวลาที่ใช้ในการหน่วงเหนี่ยวตัวถูกละลายนี้ยังขึ้นกับความเร็วของเฟสเคลื่อนที่และความยาวของคอลัมน์ ควรจำไว้ว่าแม้ค่าเวลาที่ตัวทำละลายถูกหน่วงเหนี่ยวจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้เฟส แต่อัตราส่วนพาร์ทิชันจะมีค่าคงที่

ค่าความเลือกเฉพาะของคอลัมน์หรือค่าเวลาหน่วงเหนี่ยวสัมพัทธ์ (column selectivity or relative retention, α) เป็นตัวบ่งชี้ความเลือกเฉพาะของการหน่วงเหนี่ยวสัมพัทธ์ของตัวถูกละลายหนึ่งเทียบกับตัวถูกละลายอีกตัวหนึ่ง หรือเป็นอัตราส่วนของความจุของพีคสองพีคที่อยู่ติดกันดังสมการนี้

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (2.9)$$

ค่าการเลือกเฉพาะนี้เป็นผลจากอันตรกิริยาระหว่างตัวถูกละลาย เฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่เมื่อคอลัมน์ผ่านการใช้งานค่าการเลือกเฉพาะนี้จะมีค่าเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเกี่ยวข้องกับสภาพเคมีที่พื้นผิวของเฟสอยู่กับที่อาจมีการดูดซับสารตัวอย่างไว้โดยไม่มีการปล่อยออก ทำให้พื้นที่ผิวของเฟสอยู่กับที่หน่วงเหนี่ยวสารลดน้อยลงไป การพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่าการเลือกเฉพาะนี้จะเป็นตัวช่วยบอกให้ทราบว่าเฟสอยู่กับที่ของคอลัมน์นั้นอยู่ในสภาวะดีเพียงใด พีคที่มีค่า α น้อยกว่า 1.01 จะทำให้การแยกเป็นไปได้ยากมาก

ประสิทธิภาพคอลัมน์ วิธีการวัดประสิทธิภาพทางโครมาโทกราฟีที่ใช้กันทั่วไปคือ การเปรียบเทียบจำนวนเพลท (plate number, N) จำนวนเพลทหมายถึงการที่ภายในคอลัมน์แบ่งออกเป็นชั้นย่อยๆ เพื่อคัดสารที่เข้ามาแยกเป็นส่วนๆ ความสูงของเพลท (plate height, H) จะเท่ากับ L/N เมื่อ L คือความยาวของคอลัมน์ ความสูงของเพลทจะเป็นตัวบอกประสิทธิภาพของคอลัมน์และจะเข้าใจได้ง่ายกว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบคอลัมน์ที่มีความยาวต่างกัน

จำนวนเพลทที่มีผลต่อการแยก (effective plate number, N_{eff}) จะบอกถึงจำนวนครั้งที่ตัวถูกละลายเกิดการพาร์ทิชันระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ในระหว่างที่อยู่ภายในคอลัมน์

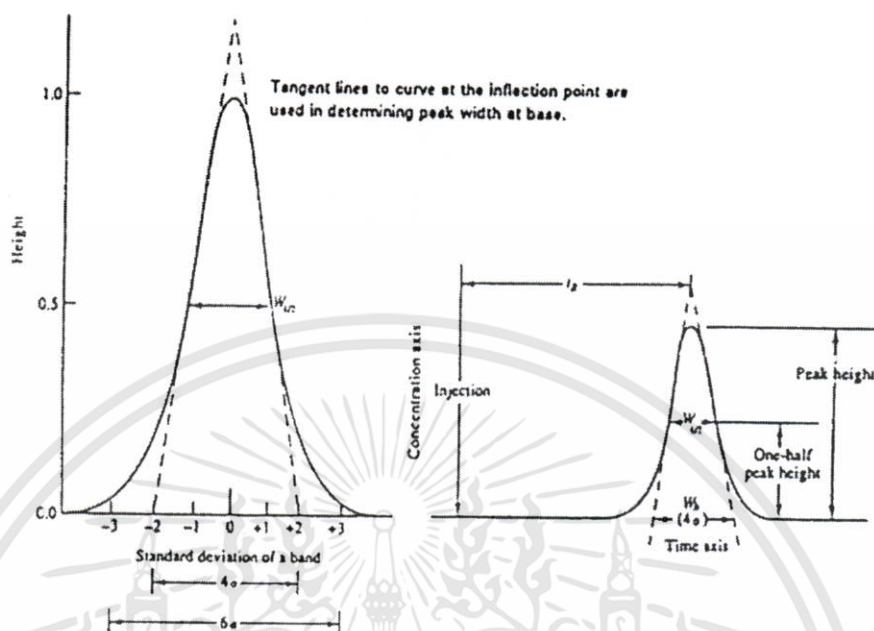
$$N_{eff} = \frac{L}{H} = \left(\frac{t'_R}{\sigma} \right)^2 \quad (2.10)$$

σ^2 คือความแปรปรวนของแถบ ซึ่งมีหน่วยเป็นเวลา

ในสภาวะที่เป็นอุดมคติแถบของตัวถูกละลายหรือพีคของตัวถูกละลายที่อีลิวต์ออกมาควรมีรูปร่างใกล้เคียงกับการกระจายแบบเกาส์เซียน (Gaussian) ตามรูปที่ 2.2 ที่ความกว้างของฐานพีค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วง 4σ จะกินเนื้อที่ถึง 95% ของพีคตัวถูกละลายทั้งหมด และถ้าเป็น 6σ จะนับได้ว่าพื้นที่ใต้พีคจะคิดเป็น 99% และเหลือเพียง 0.5% นอกพีคแต่ละข้าง



รูปที่ 2.2 แสดงพีคของตัวถูกละลายและการพิจารณาประสิทธิภาพคอลัมน์จากพีคของโครมาโทแกรม

จำนวนเพลทสามารถวัดได้จากโครมาโทแกรม ซึ่งประโยชน์คือเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับค่าที่บริษัทผู้ผลิตบอกไว้ โดยการทำที่สภาวะการทดลองเดียวกัน ความกว้างของฐานพีค (W_b) วัดได้โดยการลากเส้นด้านประชิดมุมของสามเหลี่ยมมาตัดกันกับเส้นฐานทำให้เส้นฐานมีค่าเท่ากับ 4 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและ

$$N_{eff} = 16 \left(\frac{t'_R}{W_b} \right)^2 \quad (2.11)$$

จำนวนเพลทที่ปรากฏ (the apparent plate number, N_{app}) หรือจำนวนเพลททางทฤษฎี (Theoretical plate number) จะแตกต่างจาก N_{eff} ตรงที่เวลาการหน่วงเหนี่ยวสารจะใช้ค่า t_R แทน t'_R ก็จะเป็นการวัดประสิทธิภาพของทั้งระบบ ไม่ใช่ประสิทธิภาพของคอลัมน์แต่เพียงอย่างเดียว โดยทั่วไปแล้วในการต่อระบบเครื่องมือจะพยายามทำให้ปริมาตรส่วนเกิน (dead volume) ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการแยกนั้นมีค่าน้อยที่สุด โดยเฉพาะถ้าใช้คอลัมน์ที่มีความยาวและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยๆ ยิ่งต้องให้ความสำคัญในเรื่องนี้เป็นอย่างมาก

ความไม่สมมาตรของพีค (peak asymmetry) อัตราส่วนความไม่สมมาตรของพีคหรือแฟกเตอร์ของหางพีค (tailing factor, TF) หมายความว่าอัตราส่วนของความกว้างของพีคแต่ละส่วนที่ถูกละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

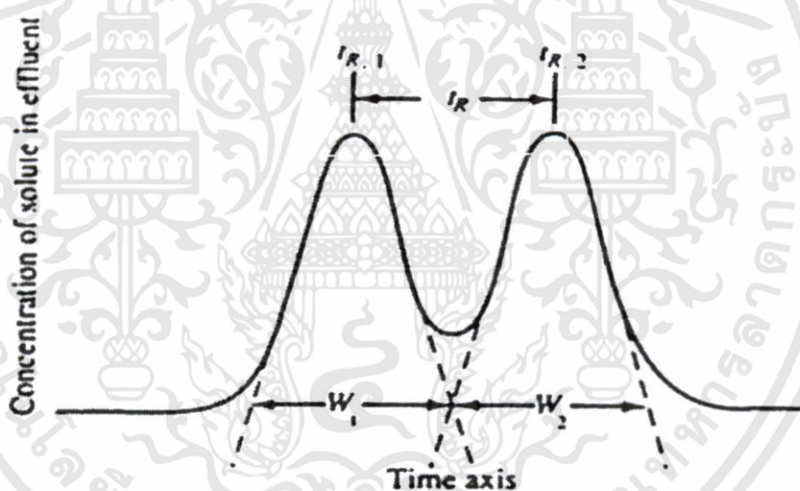
แบ่งออกด้วยเส้นความสูงของพีกจากจุดยอดที่ตำแหน่งหนึ่ง โดยใช้อัตราส่วนพีกครึ่งหลังต่อพีกครึ่งหน้า และนิยมทำการวัดที่ตำแหน่ง 10%ของความสูงพีกนับจากเส้นฐาน

$$TF = \frac{b}{a} \quad (2.12)$$

ถ้าพีกสมมาตรจะมีค่านี้เท่ากับ 1 และถ้าพีกที่ปรากฏมีหางพีก จะมีค่ามากกว่า 1 หรือถ้าพีกมีลักษณะหน้าลาดหลังชัน (fronted peak) จะมีค่าน้อยกว่า 1

โดยทั่วไปคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร ควรให้พีกของสารที่มีค่าความไม่สมมาตรในช่วง 0.9-1.3 และค่านี้มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเมื่อคอลัมน์มีอายุการใช้งานนานขึ้น

การแยก (Resolution, R_s) คือค่าที่บอกถึงความมากน้อยของการแยกพีกสองพีกที่อยู่ติดกัน ซึ่งเป็นค่าระยะทางระหว่างพีกทั้งสองหารด้วยค่าเฉลี่ยของความกว้างของฐานพีกทั้งสองดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ความหมายของการแยก

$$R_s = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0.5(W_2 + W_1)} \quad (2.13)$$

สมการ (2.13) นั้นเพียงแต่บอกความหมายการแยกเท่านั้น แต่ไม่ได้ช่วยทำให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเงื่อนไขขณะทำการทดลองแยก หรือชี้ได้เลยว่าถ้าต้องการปรับปรุงการแยกให้ดีขึ้นจะต้องทำอย่างไร เมื่อค่า R_s มีค่าเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสมการที่ (2.14) จะเป็นสมการที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์นั้นอย่างชัดเจน และถือเป็นสมการหัวใจที่สำคัญยิ่งของการแยก

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (2.14)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมการแวนดีมเตอร์ (The van Deemter Equation) แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของคอลัมน์นอกจากจะขึ้นกับความเร็วของเฟสเคลื่อนที่ เส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์ ขนาดของอนุภาค แล้วยังขึ้นกับชนิดของสารตัวอย่าง กระบวนการหน่วงเหนี่ยวสาร และความหนาของฟิล์มที่เคลือบอยู่บนเฟสอยู่กับที่ สมการแวนดีมเตอร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของเพลทกับความเร็วของเฟสเคลื่อนที่ และตัวแปรต่างๆที่เกี่ยวข้องในเชิงการทดลอง ซึ่งจะมีเทอม A เทอม B และเทอม C อีก 2 ค่า ค่าหนึ่งเป็นค่าการส่งผ่านในเฟสอยู่กับที่และอีกค่าหนึ่งเป็นค่าการส่งผ่านมวลในเฟสเคลื่อนที่ Hawkes ได้ทำการประมวลผลสมการอัตราความเร็วต่างๆ และได้แสดงการประยุกต์ผลรวมไว้ดังนี้

$$H = A + \frac{B}{u} + C_{stationary}u + C_{mobile}u \quad (2.15)$$

เทอม A เรียกว่า Eddy diffusion หรือ Multipart effect เขียนในรูปสมการได้เป็น

$$A = 2\lambda d_p \quad (2.16)$$

ค่า d_p คือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ และ λ เป็นค่าที่แสดงถึงความสม่ำเสมอของการบรรจุและรูปร่างของอนุภาค เทอม A จะมีค่าเพิ่มขึ้นถ้าความเร็วของการไหลไม่สม่ำเสมอและมีความยาวของระยะทางรอบๆอนุภาคมากขึ้น เมื่อตัวถูกละลายที่ผ่านมากับเฟสเคลื่อนที่มีช่องเลือกในการเดินทางได้หลายทาง และแต่ละเส้นทางมีระยะทางไม่เท่ากัน จะทำให้ตัวถูกละลายออกจากคอลัมน์ได้ไม่เท่ากัน ส่งผลให้พีคของสารที่ถูกชะออกมามีความกว้างมากขึ้น

เทอม B เกิดจากการแพร่ของโมเลกุลอย่างอิสระ หรือการแพร่ตามแนวยาว (Random molecular diffusion หรือ longitudinal diffusion) ซึ่งขึ้นกับตัวแปรต่างๆคือ

$$B = 2\gamma D_M \quad (2.17)$$

โดยที่ γ เป็นแฟกเตอร์ที่ขัดขวางการแพร่ในแนวแกนหรือแนวคอลัมน์ โดยการที่มีอนุภาคบรรจุเป็นตัวขวาง และ D_M เป็นค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ โมเลกุลจะแพร่กระจายจากความเข้มข้นสูงจากจุดศูนย์กลางไปยังที่ที่ความเข้มข้นต่ำเป็นสัดส่วนกับ D_M เวลาที่มีผลต่อการแพร่ด้วย คือถ้าเวลาเพิ่มขึ้นการกระจายจะมากขึ้น ซึ่งจะทำให้แถบกระจายของสารกว้าง ในการทำโครมาโทกราฟีส่วนใหญ่ จะใช้ความเร็วของเฟสเคลื่อนที่เร็วมากจนเทอม B ไม่ส่งผลกับประสิทธิภาพการแยกเท่าใดนัก

เทอม C เรียกว่าเป็นสัมประสิทธิ์การส่งผ่านมวลระหว่างเฟส (Mass transfer coefficient between phase) เกิดขึ้นในขณะที่ตัวถูกละลายกระจายตัวในระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

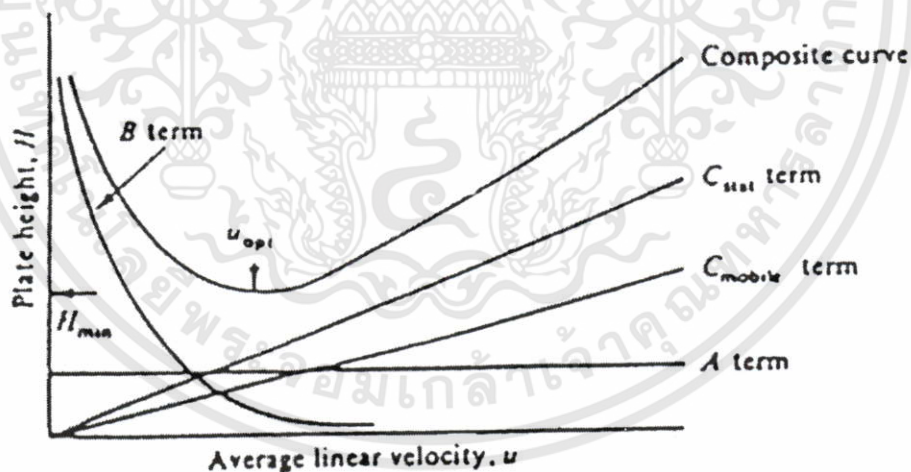
โดยการกระจายตัวนั้นเกิดขึ้นไม่เท่ากันในทุกโมเลกุลหรือไม่สมดุล ซึ่งจะแปรผันตรงกับความเร็วในการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ ถ้าเคลื่อนที่เร็วจะมีความแตกต่างของการเกิดสมมูลน้อย แต่ถ้าเคลื่อนที่ช้าจะมีความแตกต่างของการเกิดสมมูลมาก เทอมนี้แยกพิจารณาได้เป็น 2 กรณีคือ

กรณีแรกการส่งผ่านมวลในเฟสอยู่กับที่ ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลว สัมประสิทธิ์การส่งผ่านมวลจะแปรผันตรงกับกำลังสองของความหนาของฟิล์มของเหลวที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่นั้น และจะเป็นส่วนกลับกับสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสปิซีนั้นในเฟสอยู่กับที่ ถ้าฟิล์มที่ใช้หนา โมเลกุลจะเดินทางในฟิล์มกลับมาสู่พื้นผิวด้วยระยะทางเฉลี่ย และถ้าสารนั้นมีการกระจายตัวต่ำจะยิ่งทำให้การเดินทางช้าลง

นั่นคือเทอม $C_{stationary}$ จะแปรผันกับ d_f^2/D_s โดยที่ d_f คือความหนาของเฟสอยู่กับที่และ D_s คือสัมประสิทธิ์การแพร่ของตัวถูกละลายในเฟสอยู่กับที่

อีกกรณีหนึ่งคือการส่งผ่านมวลในเฟสเคลื่อนที่ (stationary phase transfer, C_{mobile}) เทอม C_{mobile} จะแปรผันกับ d_p^2/D_M เมื่อ d_p คือเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์และ D_M คือสัมประสิทธิ์การแพร่ของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่

สมการแวนเดอมเตอร์สามารถเขียนในรูปของกราฟแสดงประสิทธิภาพของคอลัมน์เทียบกับอัตราการไหล(ความเร็วเชิงเส้น) ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดง Van Deemter Curve

เวลาการวิเคราะห์และการแยก (time of analysis and resolution) เวลาการหน่วงเหนี่ยวจะสัมพันธ์กับจำนวนเพลท การแยก อัตราการพาร์ทิชัน ความสูงของเพลทและความเร็วเชิงเส้นของเฟสเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$t_R = N_{req} (1+k') (H/u) \quad (2.18)$$

หรือ

$$t_R = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right) \left(\frac{(1+k')^3}{(k')^2} \right) \left(\frac{H}{u} \right) \quad (2.19)$$

แต่ละคอลัมน์จะมีช่วงอัตราการใช้ของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ค่าเวลาในการวิเคราะห์จะมีค่าน้อยที่สุดหรือเหมาะสมที่สุดเมื่อ $k' = 2$ คือเมื่อ $t_R = 3t_M$ ถ้าเฟสเคลื่อนที่มีความเร็วมากกว่าที่เหมาะสมจะทำให้ประสิทธิภาพมีค่าลดลงและเวลาในการทำการวิเคราะห์จะเร็วขึ้น ซึ่งการแยกอาจเกิดขึ้นได้ไม่คืนัก ดังนั้นในการทำการวิเคราะห์ควรที่จะพิจารณาทั้ง 3 ปัจจัย คือ ประสิทธิภาพ การแยก และความเร็วในการวิเคราะห์ให้มีความเหมาะสมให้มากที่สุด

2.2.4 การจำแนกประเภทโครมาโทกราฟีชนิดของเหลว

โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวหมายถึงโครมาโทกราฟีที่มีเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว เมื่อแบ่งตามอันตรกิริยาที่ทำให้เกิดการแยกจะแบ่งได้เป็นหลายประเภท เช่น ถ้าเกิดการพาร์ทิชันของตัวอย่างระหว่างของเหลวที่ไม่ผสมกันสองชนิดเรียกว่า โครมาโทกราฟีแบบของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid chromatography, LLC) และถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวที่ยึดติดกับของแข็งเนื้อที่เป็นตัวช่วยพยุงให้ของเหลวเกิดพันธะกับของแข็งเนื้อ เรียกว่า Bonded-Phase Chromatography, BPC ถ้าเป็นการเกิดแรงทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของผิวของเฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งเรียกว่าโครมาโทกราฟีแบบของเหลว-ของแข็ง (Liquid-Solid Chromatography, LSC) ถ้าเกิดการแลกเปลี่ยนประจุของเฟสอยู่กับที่เรียกว่า โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange Chromatography, IEC) ถ้าเกิดการแยกโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลเรียกว่า Exclusion Chromatography, EC นอกจากนี้ยังจำแนกตามลักษณะของการทำการแยกทางโครมาโทกราฟี เช่น ทำภายในคอลัมน์เรียกว่าโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography) หรือทำบนพื้นผิวที่เรียบเช่นกระดาษเรียกว่า Planar Chromatography ซึ่งหมายถึง Thin-Layer Chromatography, TLC และอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis, CE)

2.2.4.1 โครมาโทกราฟีประเภทของเหลวของแข็ง หรือ โครมาโทกราฟีประเภทการดูดซับ (liquid-solid chromatography หรือ adsorption chromatography)

เป็นโครมาโทกราฟีของเหลวประเภทแรกที่ทำกันขึ้นมาใช้ในการแยกสารประกอบอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วต่ำจนถึงปานกลาง หลักการแยกโครมาโทกราฟีชนิดนี้คือตัวถูกละลายและตัวทำละลายจะเข้าแข่งขันกันในการจับหรือดูดซับกันบนผิวของเฟสอยู่กับที่ ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้ซิลิกาเจล ตำแหน่งที่เกิดการดูดซับจะเกิดที่กลุ่มซิลานอลซึ่งจะวางตัวในทิศทางที่ชี้ออกจากผิวของอนุภาคซิลิกาที่มีความพรุนและมีช่องว่างภายในอนุภาคมากมาย เฟสอยู่กับที่ชนิดอื่นๆ ได้แก่ อลูมิ-

นาและคาร์บอน เนื่องจากเฟสอยู่กับที่มีโครงสร้างที่ตายตัวและตำแหน่งของสภาพขั้วก็ตายตัวจึง ทำให้มีความเลือกเฉพาะตัวที่แตกต่างจากโครมาโทกราฟีของเหลวชนิดอื่น

ดังนั้นการเลือกเฟสเคลื่อนที่จึงเป็นตัวแปรที่สำคัญในการทำให้การยึดเหนี่ยวของตัวถูกละลายมีค่าเปลี่ยนแปลงไป นั่นคือความแรงของตัวทำละลายจะเป็นตัวควบคุมค่า k' ของตัวถูกละลาย ตารางที่ 3 แสดงชนิดของตัวทำละลายที่นิยมใช้ในโครมาโทกราฟีแบบนี้ โดยเรียงตามลำดับความแรงของตัวทำละลาย (ϵ^0) (การเพิ่มขึ้นของความมีขั้ว) และค่า $\log k'$ จะแปรผันโดยตรงกับค่าความแรงของตัวทำละลาย

ในทางปฏิบัติเฟสเคลื่อนที่ที่เลือกใช้จะต้องมีความเหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ศึกษา ถ้า k' มีค่าน้อย (สารจะถูกชะออกมาเร็ว) จะต้องใช้ตัวทำละลายที่มีความแรงน้อยหรือมีสภาพขั้วต่ำ ตัวทำละลายที่มีความแรงมาก (มีสภาพขั้วสูง) จะใช้ในกรณีที่สารตัวอย่างไม่ชะออกมาในเวลาที่เหมาะสม หรือมีค่า k' สูงมาก อาจใช้ตัวทำละลายผสมเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีกว่าการใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ชนิดเดียวกันพบว่าถ้าเพิ่มความแรงของตัวทำละลายขึ้น 0.05 จะลดค่า k' ได้ 3-4 เท่า โดยทั่วไปจะใช้ตัวทำละลายผสมที่จะให้ค่า $k' > 1$ เพื่อให้การแยกเกิดขึ้นได้และไม่มากกว่า 10 เพื่อไม่ให้ใช้เวลาในการแยกนานเกินไป

Adsorption chromatography สามารถใช้แยกสารที่ต่างหมู่ฟังก์ชันกันออกจากกันได้ ใช้แยกสารที่เป็นไอโซเมอร์ได้ ข้อเสียคือพีคจะมีหาง คอลัมน์มีความจุต่ำ เวลาการหน่วงเหนี่ยวคลาดเคลื่อน เนื่องจากถ้ามีน้ำอยู่ในตัวทำละลายแม้แต่น้อยจะทำให้ น้ำถูกดูดซับที่เฟสเคลื่อนที่ ซึ่งจะทำให้ตำแหน่งการดูดซับที่ผิวของเฟสอยู่ที่นั้นลดลง

2.2.4.2 โครมาโทกราฟีประเภทพาร์ทิชัน (partition chromatography)

โครมาโทกราฟีประเภทนี้เป็นประเภทที่ใช้กันมากที่สุดเมื่อเทียบกับโครมาโทกราฟีประเภทอื่นๆ แบ่งย่อยออกเป็น 2 ประเภทคือ แบบ liquid-liquid และ แบบ bonded-phase ซึ่งทั้งสองประเภทนี้แตกต่างกันที่วิธีการที่เฟสอยู่กับที่จับอยู่กับอนุภาคค้ำจุ ในกรณีของ liquid-liquid เฟสอยู่กับที่จะเป็นของเหลวที่ติดอยู่บนผิวของอนุภาค โดยการเกาะติดทางกายภาพ สำหรับ bonded-phase เฟสอยู่กับที่จะเกิดพันธะเคมีกับอนุภาคค้ำจุ ในระยะเริ่มแรกของโครมาโทกราฟีแบบพาร์ทิชันจะเป็นแบบ liquid-liquid แต่ในปัจจุบันวิธีการ bonded-phase จะมีความเด่นและนิยมใช้กันมากกว่า เพราะระบบ liquid-liquid มีข้อเสียอยู่หลายประการคือ มีการสูญเสียเฟสอยู่กับที่โดยการละลายไปกับเฟสเคลื่อนที่ได้ง่ายทำให้การเคลือบอนุภาคค้ำจุอยู่เป็นระยะๆ และจากปัญหาการละลายหรือหลุดออกของเฟสอยู่กับที่จึงทำให้ไม่สามารถใช้กับระบบ gradient elution ได้ ดังนั้นในที่นี้จะขอกกล่าวถึงเฉพาะ โครมาโทกราฟีแบบ bonded-phase เท่านั้น

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติของตัวถูกละลายที่นิยมใช้

| ตัวทำละลาย | ความแรงของ ตัวทำละลาย | | จุดเดือด °C | UV cut off, nm | ความหนืดที่ 20°C, mN·s·m ⁻² | ดัชนีหักเห |
|---------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------------|--|------------|
| | $\epsilon^0(\text{SiO}_2)$ | $\epsilon^0(\text{Al}_2\text{O}_3)$ | | | | |
| ฟลูออโรอัลเคน | -0.19 | -0.25 | | | | 1.25 |
| เพนเทน | 0.00 | 0.00 | 36 | 210 | 0.24 (15°C) | 1.358 |
| ไอโซออกเทน | 0.01 | | 99 | 215 | 0.50 | 1.392 |
| เฮกเซน | | 0.01 | 69 | 210 | 0.31 | 1.404 |
| ไซโคลเฮกเซน | 0.03 | 0.04 | 81 | 210 | 0.98 | 1.426 |
| คาร์บอนไดซัลไฟด์ | 0.11 | 0.15 | 46 | 380 | 0.36 | 1.626 |
| คาร์บอนเตตระคลอไรด์ | 0.14 | 0.18 | 77 | 265 | 0.97 | 1.466 |
| 1-คลอโรบิวเทน | | 0.26 | 78 | 220 | 0.43 | 1.402 |
| ออร์โท-ไซลีน | 0.20 | 0.26 | 144 | 290 | 0.81 | 1.505 |
| ไดไอโซโพรพิลอีเทอร์ | 0.22 | 0.28 | 68 | 220 | 0.38(25 °C) | 1.369 |
| โทลูอิน | 0.22 | 0.29 | 111 | 286 | 0.59 | 1.497 |
| คลอโรเบนซีน | 0.23 | 0.40 | 132 | | 0.80 | 1.525 |
| เบนซีน | 0.25 | 0.32 | 80 | 280 | 0.65 | 1.501 |
| ไดเอทิลอีเทอร์ | 0.29 | 0.38 | 35 | 218 | 0.25 | 1.353 |
| ไดเอทิลซัลไฟด์ | | 0.38 | 92 | 290 | 0.45 | 1.443 |
| คลอโรฟอร์ม | 0.31 | 0.40 | 62 | 245 | 0.57 | 1.443 |
| ไดคลอโรมีเทน | 0.32 | 0.42 | 40 | 235 | 0.44 | 1.425 |
| 4-เมทิล-2-เพนทาโนน | 0.33 | 0.43 | 118 | 335 | 0.42(15 °C) | 1.396 |
| เตตระไฮโดรฟูแรน | 0.35 | 0.45 | 66 | 220 | 0.55 | 1.407 |
| 1,2-ไดคลอโรอีเทน | | 0.49 | 84 | 228 | 0.80 | 1.445 |
| 2-บิวทาโนน | 0.39 | 0.51 | 80 | 330 | 0.42(15 °C) | 1.379 |
| 1-ไนโตรโพรเพน | | 0.53 | 131 | 380 | 0.80(25 °C) | 1.402 |
| อะซิโตน | 0.43 | 0.56 | 56 | 330 | 0.32 | 1.359 |
| 1,4-ไดออกเซน | 0.43 | 0.56 | 107 | 215 | 1.44(15 °C) | 1.420 |
| เอทิลอะซิเตท | 0.45 | 0.58 | 77 | 255 | 0.45 | 1.372 |
| เมทิลอะซิเตท | | 0.60 | 56 | 260 | 0.48(15 °C) | 1.362 |
| 1-เพนทานอล | 0.47 | 0.61 | 138 | 210 | 4.1 | 1.410 |
| ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ | 0.48 | 0.62 | 189 | 265 | 2.47 | 1.478 |
| ไดเมทิลเอไมน์ | | 0.63 | 56 | 275 | 0.33 | 1.386 |
| ไนโครมีเทน | 0.49 | 0.64 | 114 | 380 | 0.67 | 1.394 |
| อะซิโตนไนโตร | 0.50 | 0.65 | 82 | 190 | 0.37 | 1.344 |
| ไพรีดีน | | 0.71 | 115 | 330 | 0.97 | 1.510 |
| 2-บิวทอกซีเอทานอล | | 0.74 | 170 | 220 | 3.15(25 °C) | 1.420 |
| 2-โพรพานอล | 0.63 | 0.82 | 82 | 210 | 2.50 | 1.377 |
| เอทานอล | 0.630.68 | 0.88 | 78 | 210 | 1.20 | 1.361 |
| เมทานอล | 0.78 | 0.95 | 64 | 210 | 0.59 | 1.328 |
| เอทิลีนไกลคอล | 0.86 | 1.11 | 197 | 210 | 21.8 | 1.432 |
| กรดอะซิติก | มาก | มาก | 118 | 260 | 1.23 | 1.372 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคที่เป็นตัวค้ำจุนในการทำ bonded-phase ในกระบวนการโครมาโทกราฟีแบบพาร์ทิชันนั้น ส่วนใหญ่จะเตรียมจาก ซิลิกาที่มีโครงสร้างคงตัว หรือที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นซิลิกา เม็ดของแข็งจะทำการเตรียมให้มีขนาดเท่าๆกัน มีความพรุนและความแข็งแรงทนทาน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางในช่วง 3, 5 หรือ 10 ไมโครเมตร บริเวณพื้นผิวอนุภาคจะเต็มไปด้วยหมู่ซิลิกาที่ถูกไฮโดรไลซ์(การไฮโดรไลซ์ทำโดยการเติมกรดไฮโดรลิกเข้มข้น 0.1M และให้ความร้อนทิ้งไว้ประมาณ 1-2 วัน) ซึ่งจะทำให้เกิดหมู่ Si-OH ที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี

โครมาโทกราฟีแบบ bonded-phase นี้แยกออกได้เป็น 2 ประเภท คือ โครมาโทกราฟีเฟสปกติ(normal-phase chromatography) และโครมาโทกราฟีเฟสผกกลับ (reversed-phase chromatography) โดยแยกตามคุณสมบัติของ R group ถ้า -R เป็นหมู่สารที่มีสภาพขั้วจะเป็นแบบ Normal-Phase Chromatography แต่ถ้า -R เป็นหมู่ของสารที่ไม่มีสภาพขั้วจะเป็นแบบ Reversed-Phase Chromatography

โครมาโทกราฟีเฟสปกติ เป็นการแยกบน bonded-phase ที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่มีสภาพขั้ว และเฟสเคลื่อนที่ไม่มีสภาพขั้ว หรือมีขั้วต่ำกว่าเมื่อเทียบกับเฟสอยู่กับที่ บางครั้งอาจมีการเติมสารปรับสภาพขั้ว (polar modifier) เช่น 2- โพรพานอลหรือน้ำลงในเฟสเคลื่อนที่ เพื่อที่จะลดการเกิดอันตรกิริยาหน่วงเหนี่ยวลำดับที่สองกับผิวซิลิกา คือ ลดความไวของคอลัมน์ลง เมื่อทำการแยกสารที่มีสภาพขั้วน้อยที่สุดจะผ่านออกมาก่อนและถ้าเพิ่มสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ให้สูงขึ้น เวลาในการหน่วงเหนี่ยวจะลดลง เฟสอยู่กับที่นั้นนิยมใช้หมู่ไนโตรเจน หมู่ไฮยาโม หมู่ไดออลและหมู่เอมีน ส่วนเฟสเคลื่อนที่นิยมใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีสภาพขั้ว เช่น ไฮโดรคาร์บอนและคลอโรคาร์บอน หรืออาจใช้น้ำและแอลกอฮอล์

โครมาโทกราฟีแบบผกกลับได้ หลักการแยกจะใช้เฟสอยู่กับที่ไม่มีสภาพขั้วหรือมีสภาพขั้วต่ำและใช้เฟสเคลื่อนที่มีสภาพขั้วสูงกว่า ดังนั้นน้ำจึงเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูง จึงจัดเป็นตัวชะที่อ่อนและตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วต่ำกว่า เช่น เมทานอล อะซิโตน ไตรคลอโรเอทิลีนเป็นตัวชะที่มีความแรง ตัวถูกละลายที่มีสภาพขั้วสูงจะหลุดออกมาก่อนและเรียงลำดับการชะตามการลดลงของสภาพขั้วของตัวถูกละลาย อนุภาคที่ใช้ในโครมาโทกราฟีแบบนี้ส่วนใหญ่นิยมใช้ซิลิกาเป็นอนุภาคค้ำจุน ซึ่งมีทั้งที่อยู่ในรูปทรงกลมและแบบที่มีรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกัน ซึ่งถ้าใช้ซิลิกาไม่ควรใช้กับสารละลายที่มีพีเอชสูงกว่า 8.5 เพราะซิลิกาจะเกิดการละลาย ดังนั้นอาจใช้สารโพลีเมอร์เป็นอนุภาคค้ำจุน ซึ่งโดยทั่วไปเป็นโพลีสไตรีนแบบร่างแห ซึ่งทำให้สามารถใช้ได้กับสารละลายที่มีพีเอชในช่วง 0-12 แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของอนุภาคค้ำจุนที่เป็นโพลีเมอร์จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าซิลิกา การสร้างวัสดุบรรจุชนิดเฟสผกกลับจะใช้ปฏิกิริยา silanization เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไว้ใน bonded-phase โดยหมู่ R ของ siloxane (- Si-O-Si-R) จะเป็นสารไม่มีขั้วส่วนใหญ่ใช้สารไฮโดรคาร์บอน (methyl, ethyl, propyl, butyl, octyl, octadecyl, phenyl) ซึ่งส่วนใหญ่จะนิยมใช้ octadecyl(C18) และ octyl(C8) มากที่สุด อนุภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ใช้ในทาง reversed-phase นั้นที่มาจากบริษัทผู้ผลิตต่างกัน แม้ว่าจะมีหมู่ R ตัวเดียวกัน แต่จะมีคุณสมบัติการเลือกเฉพาะที่ต่างกันซึ่งอาจเกิดจาก ผิวที่เกิดพันธะกับหมู่ R ความมากน้อยของจำนวนหมู่ R ชนิดของพันธะ (เป็นแบบ monoric หรือ polymeric) การ end-capping เป็นต้น การที่หมู่ไฮโดรคาร์บอนที่มีสายยาวมาเกาะ บางครั้งสายของไฮโดรคาร์บอนจะเกาะเกี่ยวกันทำให้การแยกเกิดขึ้นไม่ดีนัก ดังนั้นเพื่อช่วยให้ตัวถูกละลายแทรกตัวเข้าไปยัง bonded-phase ได้จึงต้องทำให้เปียกหรือมีความชุ่มให้ทั่วถึงกันก่อน โดยการผ่านสารช่วยปรับสภาพคอลัมน์ได้แก่ เมทานอลหรืออะซิโตนในไตรด์ก่อน เพื่อให้ประสิทธิภาพการแยกเกิดได้ดีขึ้น การที่จะพัฒนาการแยกให้ดีขึ้นจำเป็นจะต้องคำนึงถึงการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ซึ่งต้องพิจารณาจากความแรงของตัวชะ ความเลือกจำเพาะ ชนิดของตัวทำละลาย การอำพรางไอออน และสารช่วยปรับสภาพ

2.2.4.3 โครมาโทกราฟีแบบคู่อิออน (ion-pair chromatography)

จะเป็นการแยกแบบ reversed-phase partition chromatography ใช้กับการแยกแบบวิเคราะห์สารที่เป็นไอออนิกสปีชีส์ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในน้ำ ตัวทำละลายใช้เมทานอลหรืออะซิโตนในไตรด์และสารประกอบไอออนิกที่มีประจุตรงกันข้ามกับสารที่ทำการวิเคราะห์ โดยที่ไอออนที่มีประจุตรงกันข้ามนี้จะเข้าจับคู่รวมตัวกับไอออนของสารที่วิเคราะห์ เกิดในรูปของคู่อิออนเกิดเป็นสปีชีส์ที่เป็นกลางและถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ reversed phase ได้

2.2.4.4 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange chromatography)

หลักการพื้นฐานของการแลกเปลี่ยนไอออนคือการแลกเปลี่ยนไอออนตัวถูกละลายกับไอออนที่ผิวหน้าที่มีประจุตรงกันข้ามกับเฟสที่อยู่กับที่ เฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งประกอบด้วยกลุ่มไอออนิกที่เกิดพันธะ โควเลนซ์อยู่กับตัวรองรับ ที่จับอยู่กับไอออนที่ผิวหน้า (counter ion) ที่มีประจุตรงข้าม เฟสเคลื่อนที่จะมีไอออนที่ผิวหน้า หลักการแยกคือการแข่งขันระหว่างไอออนของสารตัวอย่างกับไอออนที่ผิวหน้าที่มีต่อประจุตรงข้ามที่เฟสเคลื่อนที่ ถ้าเฟสอยู่กับที่มีประจุบวก เรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออน การแลกเปลี่ยนเกิดขึ้นระหว่างไอออนที่ผิวหน้าที่มีประจุลบกับไอออนตัวถูกละลายที่มีประจุลบ ถ้าเฟสอยู่กับที่มีประจุลบเรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนแคทไอออน การแลกเปลี่ยนเกิดขึ้นระหว่างไอออนผิวหน้าที่มีประจุบวกกับไอออนตัวถูกละลายที่มีประจุบวก หลักการแยกคือสมดุลของไอออนสารตัวอย่างที่แตกต่างระหว่างเฟส 2 เฟส จะขึ้นกับสัมพรรคภาพสัมพัทธ์ของไอออนที่ผิวหน้า เทคนิคนี้จะมีประโยชน์สำหรับแยกสารประกอบไอออนิก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไอออนของสารอนินทรีย์ โปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโน

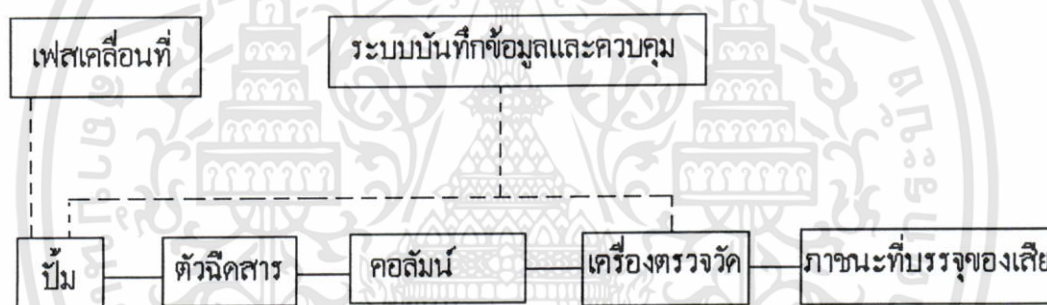
2.2.4.5 โครมาโทกราฟีแบบแยกขนาด (size exclusion chromatography)

เป็นวิธีการแยกโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล ใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางโพลีเมอร์และเชิงชีวโมเลกุลซึ่งเป็นสารขนาดใหญ่และมีน้ำหนักโมเลกุลหลากหลาย ในทางโพลีเมอร์จะใช้ตัวชะที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เรียกชื่อวิธีการแยกโดยอาศัยหลักการนี้เฉพาะลงไป เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูเขงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่า Gel Permeation Chromatography, GPC ส่วนในทางชีวเคมีใช้สารละลายน้ำเป็นตัวชะจะเรียกว่า Gel Filtration Chromatography, GFC และ โครมาโทกราฟีแบบแยกขนาดแตกต่างจากวิธีการแยกอื่นๆตรงที่จะไม่มีอันตรกิริยาภายใน โมเลกุลใดๆเกิดขึ้นกับเฟสอยู่กับที่และไม่มีการปรับสภาวะที่เหมาะสมของตัวชะแต่อย่างใด

2.2.5 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง(instrumentation of HPLC)

ใน HPLC ตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ซึ่งผ่านการกรองแล้วและเก็บไว้ใน solvent reservoir จะถูกดูดโดยปั๊มเข้าสู่คอลัมน์ ขณะเดียวกันก็พาเอาสารผสมที่ฉีดเข้าบริเวณ injector เข้าสู่คอลัมน์เพื่อแยกด้วย สารประกอบแต่ละชนิดที่แยกออกมาจากคอลัมน์สามารถตรวจวัดโดยใช้เครื่องตรวจวัด (detector) และบันทึกผลออกมาเป็นพีคที่เครื่องประมวลผล ดังนั้นส่วนประกอบที่สำคัญอย่างน้อยที่สุดที่เครื่อง HPLC ควรจะมีคือ เฟสเคลื่อนที่และที่เก็บ ปั๊ม ตัวฉีดสาร(injector) คอลัมน์ เครื่องตรวจวัด และเครื่องประมวลผล ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.5 ไลอะแกรมของระบบ HPLC

2.2.5.1 เฟสเคลื่อนที่และภาชนะที่ใช้บรรจุ (mobile phase and mobile phase reservoir) การเลือกชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่ต้องคำนึงถึง ความสามารถในการละลายซึ่งกันและกันของเฟสเคลื่อนที่ ชนิดของคอลัมน์ ความสามารถในการละลายตัวอย่าง คุณภาพและคุณสมบัติของตัวทำละลาย และชนิดของเครื่องตรวจวัด ส่วนภาชนะที่ใช้บรรจุตัวทำละลายควรพิจารณาจากวัสดุที่ใช้ทำควรเป็นแก้วจะดีกว่า ควรเป็นภาชนะที่มีปากแคบ ตำแหน่งต้องไม่อยู่ในตำแหน่งที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงง่าย และควรว่างภาชนะอยู่เหนือปั๊ม

2.2.5.2 ปั๊มหรือระบบขนส่งเฟสเคลื่อนที่ (pump or solvent delivery system) เป็นส่วนที่ใช้ในการดูดสารละลายจากภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์และผ่านไปยังเครื่องตรวจวัด ปั๊มที่ดีควรมีลักษณะคือ เปลี่ยนชนิดของเฟสเคลื่อนที่ได้ง่ายและรวดเร็ว มีปริมาตรภายในต่ำ อัตราการไหลแต่ละครั้งคงที่ สามารถทำงานที่ความดันสูงๆ (3000 - 6000 psi) สามารถ

เปลี่ยนแปลงอัตราการไหลได้ ทนต่อสารเคมี มีระบบรักษาความปลอดภัยที่อาจเกิดจากความดันสูงเกิน วัดหรือปรับอัตราการไหลของสารละลายได้ง่าย และขั้นตอนการบำรุงรักษาน้อย

2.2.5.3 ตัวฉีดสาร (injector) เป็นส่วนที่นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เข้าสู่คอลัมน์ ลักษณะที่ดีควรมีดังนี้ ใช้ฉีดตัวอย่างชนิดใดก็ได้ สะดวกต่อการใช้งาน ปริมาณของตัวอย่างที่ฉีดแต่ละครั้งต้องเท่ากัน ฉีดตัวอย่างในขณะที่มีแรงดันกลับสูงๆ ได้

2.2.5.4 คอลัมน์ (column) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของเครื่อง HPLC มีหน้าที่แยกสารประกอบในตัวอย่างออกจากกัน อนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์มีตั้งแต่ 3 ถึง 20 ไมครอน อนุภาคที่มีขนาด 3 – 10 ไมครอนมักใช้ในงานที่วิเคราะห์มีราคาแพง ส่วนอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมครอนจะนำไปใช้ในงานเตรียมตัวอย่าง (preparative)

2.2.5.5 เครื่องตรวจวัด (detector) นับเป็นส่วนที่มีความสำคัญมากเช่นกัน เพราะนอกจากใช้ตรวจวัดตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์แล้ว ยังเป็นส่วนที่บอกความผิดปกติของระบบได้ด้วย แบ่งกว้างๆ ได้เป็น 2 แบบคือ แบบ bulk property หรือ universal property (เป็นแบบที่ใช้งานได้กว้างกว่า) และ แบบ solute property selectivity หรือ specific detector (มีความจำเพาะเจาะจงกว่าแต่มีความไวสูง) บางครั้งจะแบ่งเครื่องตรวจวัดออกตามวิธีที่ใช้ว่าเป็นแบบทำลายตัวอย่าง (destructive) หรือไม่ทำลายตัวอย่าง (nondestructive) นอกจากนี้ยังแบ่งเป็นประเภทย่อยๆ ได้อีกได้แก่

2.2.5.5.1 เครื่องตรวจวัด ยูวี-วิสิเบิล (UV-Visible detector) ในการตรวจวัดการดูดกลืนกลืนแสงยูวี (190-350 nm) หรือวิสิเบิล (350-900 nm) โดยตรงด้วยสารจะแสดงการดูดกลืนกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ติดตามน้อยมาก เมื่อตัวถูกละลายได้รับรังสี รังสีจะถูกดูดกลืนโดยการจัดเรียงตัวของอิเล็กตรอนเฉพาะของสารประกอบ เครื่องตรวจวัดชนิดนี้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเนื่องจากความไวสัมพัทธ์ต่อการอุณหภูมิจและการทำ gradient ค่าและสารประกอบส่วนมากยังดูดกลืนกลืนแสงในช่วงนี้ หน้าที่ของตัวตรวจวัดคือติดตามแสงที่เคลื่อนที่ผ่านสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ เมื่อมีสารประกอบที่ดูดกลืนกลืนแสงได้ละลายในเฟสเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในตัวตรวจวัด จะดูดกลืนแสงบางส่วนที่จะไปตกบนตัวตรวจวัด การลดของแสงจะมีผลต่อการลดของสัญญาณทางไฟฟ้าที่ออกมาจากตัวตรวจวัดเข้าสู่ระบบข้อมูล ความเข้มข้นของตัวถูกละลายและความเข้มของแสงที่ผ่านออกมาจากโฟร์เซลล์จะมีความสัมพันธ์กัน โดยกฎของเบียร์ เครื่องตรวจวัดนี้มีการออกแบบได้หลายอย่างคือ Fixed wavelength UV detector จะติดตามความยาวคลื่นได้เพียงค่าเดียวเท่านั้น ข้อดีคือมีราคาไม่แพง Variable wavelength สามารถติดตามความยาวคลื่นต่างๆ ที่เวลาต่างๆ ในระหว่างการวิเคราะห์ เพื่อให้แน่ใจว่าแต่ละพีคถูกติดตามที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนสูงสุด และ Diode array detector ความยาวคลื่นเดี่ยวจากโฟโตไดโอดที่เลือกหรือทั้งสเปกตรัมจาก photodiode array ทั้งหมดสามารถถูกติดตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5.5.2 เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ เครื่องตรวจวัดชนิดนี้มีสภาพไวสูงกว่ายูวีถึง 1000 เท่า ใช้วิเคราะห์สารประกอบที่เรืองแสงได้เองหรือเตรียมเป็นอนุพันธ์ให้สามารถเรืองแสงได้ โดยมีหลักการคือแสงจากแหล่งกำเนิดแสงผ่านฟิลเตอร์ เพื่อคัดเลือกแสงกระตุ้นที่ต้องการผ่านไปยังโฟลว์เซลล์ เมื่อตัวอย่างผ่านมายังเซลล์จะดูดกลืนแสงและปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นมากกว่าออกมา แสงนั้นจะผ่านไปยังฟิลเตอร์เพื่อเลือกแสงความยาวคลื่นที่ต้องการ จากนั้นส่งไปวัดความเข้มโดย photomultiplier tube ที่ทำมุม 90 องศาับแสงที่เข้ามา การฟลูออเรสเซนซ์จะพบในโมเลกุลที่มีอะโรมาติก หรือมีพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวที่มีความเสถียรของเรโซแนนซ์สูง เฟสเคลื่อนที่มีบทบาทสำคัญมากต่อการฟลูออเรสเซนซ์ของโมเลกุล ดังนั้นจึงต้องเลือกอย่างระมัดระวัง ส่วนใหญ่เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้จะต้องไม่มีอะตอมฮาโลเจนอยู่ในโมเลกุล นอกจากนี้สภาพขั้วและพีเอชก็มีผลต่อการให้ฟลูออเรสเซนซ์ด้วย

2.2.5.5.3 เครื่องตรวจวัด conductivity หลักการคือการบังคับให้ไอออนในสารละลายเคลื่อนที่ไปยังอิเล็กโทรดที่มีประจุตรงข้ามโดยการใส่ค่าศักย์ไฟฟ้า ถ้า conductance จะเป็นสัดส่วนผกผันกับความต้านทานจะขึ้นโดยตรงกับจำนวนสปีชีส์ที่มีประจุในสารละลาย ดังนั้น ion exchange และ ion-pair chromatography จึงนำตัวตรวจวัดชนิดนี้มาใช้มากที่สุด

2.2.5.5.4 เครื่องตรวจวัด amperometric วิธีนี้จะวัดกระแสหรือประจุที่เป็นผลเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันของสารที่สนใจที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าทำงาน การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันของสารที่สนใจเกิดจากการใส่ค่าความต่างศักย์ระหว่างขั้วทำงานและขั้วไฟฟ้าอ้างอิงในเซลล์ amperometry

2.2.5.5.5 เครื่องตรวจวัดดัชนีหักเห (refractive index detector) ทำงานโดยอาศัยการตอบสนองในการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหของตัวถูกละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ เครื่องตรวจวัดนี้ จะใช้สำหรับการเตรียมสาร หรือ gel permeation chromatography ซึ่งความไวไม่ใช่สิ่งสำคัญ ยิ่งไปกว่านั้นยังมีความเสถียรและใช้ง่าย การควบคุมอุณหภูมิของสารที่ออกมาจากคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเป็นสิ่งสำคัญ แต่ไม่เหมาะกับการชะแบบ gradient

2.2.5.5.6 แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer, MS) แมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นเครื่องมือใช้ตรวจวัดมวลของโมเลกุลมีประจุไฟฟ้าหรือไอออน แมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ หาปริมาณสารประกอบ อธิบายลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของโมเลกุล มีข้อดีที่สำคัญคือมีความจำเพาะ ต่อโมเลกุล (molecular specificity) สูงและมีความไวสูงในการตรวจวัด (detection sensitivity) ไอออนในแมสสเปกโตรมิเตอร์นั้นจะถูกจัดเก็บเป็นมวลต่อประจุ (m/z) เฉพาะแต่ละไอออนสัญญาณที่ได้จากดีเทคเตอร์เกิดจากการเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าขนาดของสัญญาณไฟฟ้านั้นจะสอดคล้องกับมวลต่อประจุที่ถูกเปลี่ยนให้เป็นแมสสเปกตรัม (mass spectrum) โดยระบบข้อมูล (data system)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

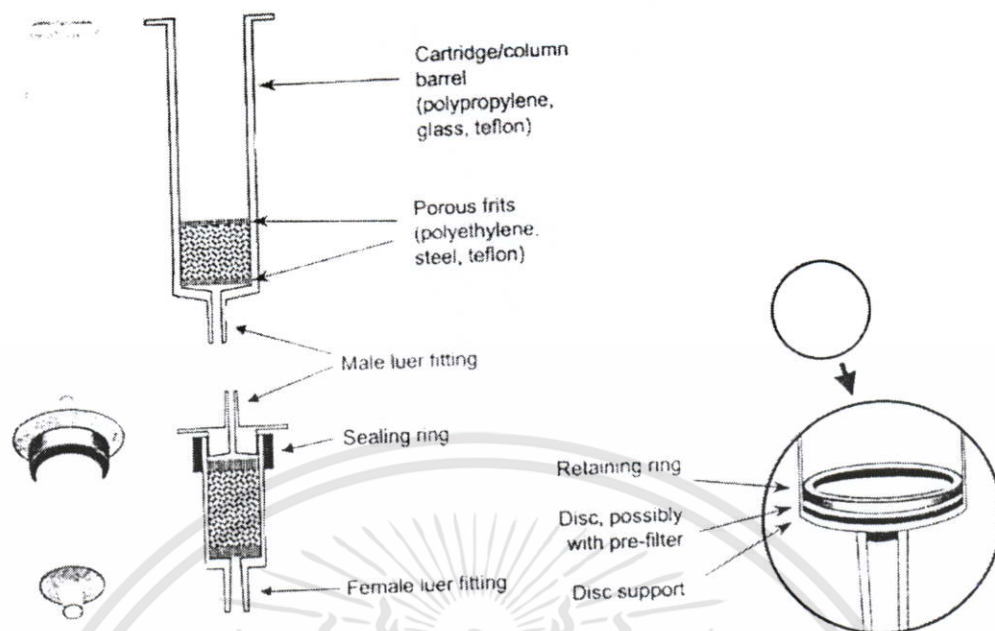
2.3 การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid phase extraction) [13,14,15]

2.3.1 นิยามของการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

การสกัดด้วยของแข็งเป็นเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างที่อยู่ระหว่างขั้นตอนการรวบรวมตัวอย่างและขั้นตอนการวิเคราะห์ หลักการคือ การสกัดตัวถูกละลายจากเฟสที่เป็นของเหลวให้ไปอยู่ในเฟสที่เป็นของแข็งโดยอาศัยการซึมซับหรือการ partition ซึ่งหลักการจะเหมือนกับใน HPLC จุดประสงค์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจ เปลี่ยนเฟสของสารที่สนใจ และกำจัดสารรบกวน ซึ่งเป็นการเพิ่มความไวของวิธีวิเคราะห์นั่นเอง

2.3.2 รูปแบบและองค์ประกอบของการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

โดยทั่วไปรูปแบบของอุปกรณ์ของการสกัดด้วยเฟสของแข็งจะมี 2 รูปแบบคือ cartridge และ discs ดังรูปที่ 2.6 รูปแบบ cartridge หรือบางครั้งจะเรียกว่าคอลัมน์ โดยถูกสร้างให้มีรูปร่างเป็นท่อ (syringe barrel shape) โดยปกติทำจากวัสดุโพลีเมอร์(โพลีเอทิลีน)และบางโอกาสอาจสร้างจากเหล็กกล้าไร้สนิมหรือเทฟลอน ภายในบรรจุตัวดูดซับ(sorbent bed) ในปริมาณหนึ่งในสามของปริมาตรภายใน(ส่วนใหญ่น้ำหนักของตัวดูดซับจะอยู่ระหว่าง 10 มิลลิกรัม – 10 กรัม หรือมากกว่า) ตัวดูดซับจะมีลักษณะและคุณสมบัติคล้ายกับเฟสอยู่กับที่ใน HPLC และรูปแบบ discs ในทางการค้าจะมี 3 ชนิดคือ 1) ตัวดูดซับบรรจุอยู่ระหว่างรูของจาน (porous disc) 2) ตัวดูดซับถูกจัดให้เรียงตัว (enmeshed) อยู่ในเส้นใย (a web) ของเทฟลอนหรือโพลีเมอร์เนื้อชนิดอื่นๆ และ 3) ตัวดูดซับจะถูกกักขังไว้ในเส้นใยแก้วหรือตัวกรองกระดาษ ซึ่งเป็นแบบที่นิยมมากที่สุด วัสดุที่ใช้ทำตัวดูดซับก็เหมือนกับที่บรรจุอยู่ใน cartridge ซึ่งได้แก่ ซิลิกา ซิลิกาเคลือบหรือเกิดพันธะกับหมู่ $-R$, ออกไซด์ของธาตุอื่นๆ และโพลีเมอร์ ข้อได้เปรียบของรูปแบบ discs คือ การสกัดทำได้เร็วกว่าเนื่องจากมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่กว้างกว่าทำให้ตัวถูกละลายมีพื้นที่สัมผัสกับตัวซับมากกว่า



รูปที่ 2.6 รูปแบบของเฟสของแข็งสกัด

2.3.3 ขั้นตอนการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

ขั้นตอนในการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบ่งเป็น 5 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 เป็นการเลือกตัวดูดซับที่เหมาะสมกับองค์ประกอบต่างๆในตัวอย่าง ทั้งชนิด รูปแบบ และปริมาณของตัวดูดซับ ขั้นตอนที่ 2 เป็นการปรับสภาพของตัวดูดซับเพื่อให้พร้อมสำหรับการหน่วงเหนี่ยวด้วยอันตรกิริยากับสารที่สนใจ และยังเป็นการทำจัดสิ่งปลอมปนที่อาจหลงเหลืออยู่ในตัวดูดซับ ขั้นตอนที่ 3 เป็นการใส่ตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่างที่ใส่อาจเป็นไมโครลิตรหรือหลายลิตรก็ได้ ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของตัวอย่าง ชนิดและปริมาณของสารที่สนใจ ชนิดและปริมาณของตัวดูดซับ เป็นต้น ขั้นตอนที่ 4 เป็นการล้างหรือกำจัดสารรบกวนที่อาจส่งผลกระทบต่อวิเคราะห์สารที่สนใจ โดยเลือกสารละลายที่เหมาะสมอาจเป็นสารละลายบริสุทธิ์หรือสารละลายผสมก็ได้ และอาจจำเป็นต้องปรับพีเอชช่วยด้วย จุดที่สำคัญที่พึงระวังคือสารละลายนั้นต้องไม่ละลายสารที่สนใจออกมาจากตัวดูดซับ ขั้นตอนที่ 5 ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายเป็นการชะสารที่สนใจออกมา โดยใช้สารละลายปริมาตรน้อยที่สุดที่สามารถชะสารที่สนใจออกมาและทิ้งสารปนเปื้อนให้คงอยู่ไว้ในตัวดูดซับ

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hong Wu และคณะ [16] ศึกษาการตรวจหาปรอทและเมทิลเมอร์คิวรีในน้ำทะเลและปลาทะเลโดยตรง โดยการทำให้ปรอทเกิดปฏิกิริยากับ diethyl dithiophosphate และเมทิลเมอร์คิวรีทำปฏิกิริยากับ dithizone เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน แล้วผ่านเข้าไปยัง knotted reactor ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนจะคงอยู่ที่ผนังภายในของ knotted reactor จากนั้นชะสารที่สนใจออกมาด้วยเอกซตรานเป็นเอกซตรานที่สงวนไว้สำหรับการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 15 และทำปฏิกิริยารีดักชันกับสารละลาย KBH_4 แล้วตรวจวัดด้วยเทคนิค atomic fluorescence spectrometry การสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกจากเนื้อปลาทำโดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในเนื้อปลาหนัก 0.5 กรัม นำไปแช่ใน ultrasonic bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 10 นาที แยกเนื้อปลาที่ไม่ละลายออกทิ้งไปและนำของเหลวที่ได้ปรับพีเอชให้เป็น 2.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10M ด้วยวิธีนี้จะได้ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection) ของเมทิลเมอร์คิวรีเท่ากับ 2.0 ng l^{-1} ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 95-110

Chun-Mao Tseng และ คณะ [17] ตรวจสอบปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในดินตะกอนเนื้อเยื่อปลาและน้ำโดยระบบ on-line flow injection และเทคนิค atomic fluorescence spectrometry ซึ่งเป็นการเชื่อมต่อบริเวณ (hyphenated system) การนำตัวอย่างเข้า ปฏิกิริยาเอทิลชันในเฟสน้ำ การเพิ่มความเข้มข้นโดยใช้ Tenax แยกด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี และการตรวจวัดด้วยเทคนิค cold vapor atomic fluorescence การสกัดตัวอย่างเป็นการย่อยตัวอย่างด้วยสารละลาย tetramethylammonium hydroxide (TMAH) ในน้ำเข้มข้นร้อยละ 25 ด้วยวิธีนี้จะได้ขีดจำกัดของการตรวจพบในดินตะกอนแห้ง เนื้อเยื่อปลาแห้ง และน้ำประมาณ 0.01 ng g^{-1} , 0.1 ng g^{-1} และ 0.01 ng L^{-1} ตามลำดับ

George A. Zachariadis และ คณะ [18] วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในน้ำและน้ำปัสสาวะด้วยวิธี non-chromatographic on-line cold vapour atomic absorption spectrometric โดยการเตรียมคอลัมน์ที่ภายในบรรจุ polytetrafluoroethylene (PTFE) ขึ้นเองเนื่องจากตัวดูดซับนี้มีประสิทธิภาพในการจับกับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเมทิลเมอร์คิวรีกับ pyrrolidine dithiocarbamate ให้คงอยู่ในคอลัมน์ได้ ขีดจำกัดของการตรวจประมาณ $0.08 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$

Xiu-Ping และ คณะ [19] ตรวจสอบวิธีใหม่ที่ไม่ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีสำหรับหาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีระดับต่ำมาก (ultratrace) ในปลา ขั้นตอนการสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกจากเนื้อปลาทำโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลเข้มข้น 25% ในเนื้อปลาหนัก 100 มิลลิกรัมและแช่ใน ultrasonic bath จนเนื้อปลาละลายหมดจากนั้นปรับสารละลายตัวอย่างให้มีพีเอช 6.8 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของ KH_2PO_4 วิธีนี้เป็นการพัฒนาการเพิ่มความเข้มข้นให้สารละลายตัวอย่างโดยการนำสารละลายตัวอย่างเข้าสู่ระบบแบบ flow injection เพื่อให้เมทิลเมอร์คิวรีดูดซับในไมโครคอลัมน์จากนั้นตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค electrothermal atomic absorption spectrometry ในการดูดซับที่ไมโครคอลัมน์เมทิลเมอร์คิวรีจะอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับ diethyldithiocarbamate (DDTC) ขีดจำกัดของการตรวจในตัวอย่างปลาเท่ากับ 3.4 ng g^{-1} ค่าร้อยละของการคืนกลับ 97 ถึง 108

F. Ubilus และ คณะ [20] วิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีในปลาด้วยเทคนิค cold vapour generation atomic absorption spectrometry ขั้นตอนการวิเคราะห์คือนำตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาสดมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตให้ถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรรมใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งตัวอย่าง 0.25 -0.3 กรัม ใน หลอดทดลองที่มีฝาปิดที่สนิท เติมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ในน้ำเข้มข้น 10M ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร นำไปวางบนน้ำเดือด 25 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วเทใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริกเข้มข้น 7.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1% นำสารละลายตัวอย่างนี้ไปวัดหาปริมาณปรอทด้วยเทคนิค cold vapour generation atomic absorption spectrometry โดยใช้สารละลาย SnCl_2 เข้มข้น 1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเป็นตัวรีดิวซ์ จากนั้นเมื่อเครื่องวัดปรอทเสร็จแล้วจึงเติมตัวรีดิวซ์ที่แรงขึ้นซึ่งก็คือ สารละลาย NaBH_4 เข้มข้น 1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อวัดปริมาณเมทิลเมอร์คิวรี ชีดจำกัดของการตรวจเท่ากับ 183 ng g^{-1} รัย ละเอียดของการคืนกลับอยู่ในช่วง 96.2 – 121.6

Lu Yang และคณะ [21] ประยุกต์ใช้หลักการเจือจางไอโซโทปสำหรับการตรวจ วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อเยื่อปลาโดยเทคนิค solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry เนื้อเยื่อปลาจะถูกย่อยสลายด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮ-ดรอกไซด์ในเมทานอล เมทิลเมอร์คิวรีทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ NaBPr_4 แล้วถูกทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย เทคนิค SPME headspace ชีดจำกัดของการตรวจ $0.037 \mu\text{g g}^{-1}$

I. Gelaude และคณะ [22] ทำการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในวัสดุชีวภาพ (biological materials) โดยใช้เทคนิค Solid sampling-electrothermal vapourization-inductively coupled plasma-isotope dilution-mass spectrometry ข้อได้เปรียบของวิธีนี้เหนือวิธีอื่นคือไม่ต้อง เตรียมตัวอย่างทำให้การวิเคราะห์รวดเร็วและมีความไว นอกจากนี้วิธีนี้ยังตัดปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อน การสูญเสียสารที่สนใจและที่สำคัญคือสภาวะดั้งเดิมของสารที่สนใจไม่มีการเปลี่ยนแปลง ชีดจำกัดของการตรวจเท่ากับ 6 ng g^{-1} สำหรับตัวอย่างหนัก 1 มิลลิกรัม

E. Ramalhosa และคณะ [23] พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในตะกอน การสกัดเมทิลเมอร์คิวรีดังนี้ ชั่งตะกอน 0.25 กรัม เติมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน ultrasonic bath นาน 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนปริมาตร 6 มิลลิลิตรสองครั้ง เก็บชั้นสารละลายอินทรีย์เติมน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ใช้แก๊สไนโตรเจน เป่าให้สารอินทรีย์ระเหยทิ้งไป วิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิด ของเหลวประสิทธิภาพสูง โดยใช้เครื่องตรวจวัดเทคนิค cold vapor atomic fluorescence spectrometry

Shubo Han และคณะ [24] พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีโดยใช้ a methylene blue-mediated enzyme electrode ชีดจำกัดการตรวจเท่ากับ 0.1 ng l^{-1}

Sofie Slaets และ Freddy C. Adam [25] พัฒนาเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์เมทิลเมอร์-คิวรีในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม หลักการของเครื่องมือนี้คือการเพิ่มความเข้มข้นของสารด้วย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิค purge and trap ใช้ตู้อบชนิดควบคุมอุณหภูมิเป็นที่ติดตั้งคอลัมน์ชนิดคาปิลลารีจำนวนหลายอันเพื่อแยกเมทิลเมอร์คิวรี และใช้เครื่องตรวจวัดคือ miniature microwave induced plasma emission detector ด้วยเครื่องมือที่สร้างขึ้นนี้สามารถตรวจวัดเมทิลเมอร์คิวรีที่มีขีดจำกัดการตรวจได้เท่ากับ 0.8 pg ml^{-1}

S. Rio-Segade และ C. Bendicho [26] ตรวจวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีเชิงปริมาณในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำด้วยเทคนิค reversed-phase high performance chromatography โดยต่อกับเครื่องตรวจวัดชนิด cold vapour atomic absorption spectrometry คอลัมน์ที่ใช้คือ reversed-phase C_{18} column โดยการทดสอบพารามิเตอร์หลายตัว(เช่นส่วนประกอบและอัตราการใช้ของเฟสเคลื่อนที่) เพื่อหาความเหมาะสมสำหรับ HPLC นอกจากนี้ยังศึกษาพารามิเตอร์ของเทคนิค CV-AAS ได้แก่ ความเข้มข้นและอัตราการใช้ของ sodium borohydride และ sodium hydroxide ที่ใช้เป็นตัวรีดิวซ์ ความยาวของคอลัมน์ที่เกิดปฏิกิริยารีดักชันและอัตราการใช้ของไนโตรเจน ร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 97.88 – 103.6

S. Rio-Segade และ C. Bendicho [27] ศึกษาการใช้เครื่อง ultrasonic ช่วยในการสกัดเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อเยื่อปลา นำส่วนของเหลวหลังการแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงไปฉีดเข้าโดยตรงกับระบบเทคนิค flow injection cold vapour atomic spectrometry การสกัดเมทิลเมอร์คิวรีจากเนื้อเยื่อปลาทำโดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2M แล้วเขย่าใน ultrasonic bath หาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีด้วยการใช้ โซเดียมเตตราไฮโดรโบรเมตเป็นตัวรีดิวซ์ พบว่าค่าร้อยละของการคืนกลับมากกว่า 92 ขีดจำกัดการตรวจเท่ากับ 5 ng g^{-1}

D.M. Sánchez และคณะ [28] หาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่างน้ำทะเล โดยใช้เทคนิคการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid phase extracton) และนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิด reversed phase ขั้นตอนการทำให้เข้มข้นคือ หลังจากปรับสภาพ C_{18} Sep-Pak cartridge ด้วยเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 แล้ว เติมไดโทโซนเพื่อให้อัดเกาะที่เฟสของแข็งเพื่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเมทิลเมอร์คิวรีซึ่งมีอยู่ในตัวอย่างน้ำทะเล ขั้นตอนต่อมาคือผ่านตัวอย่างน้ำทะเล และล้าง cartridge ด้วยสารละลายผสมของบัฟเฟอร์ของกรดอะซิติกและ โซเดียมอะซิเตตกับ EDTA ขั้นตอนสุดท้าย สารประกอบเชิงซ้อนออกด้วยเมทานอล ขีดจำกัดการตรวจเท่ากับ 0.58 นาโนกรัม ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 95-101

R. Wagemann และคณะ [29] หาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในทะเลอาร์กติก การสกัดเมทิลเมอร์คิวรีจากเนื้อเยื่อใช้สารละลายกรดของโซเดียมโบรไมด์ผสมคิวปริกซัลเฟต และทำเข้มข้นขึ้นและสะอาดขึ้นด้วยการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์คือ เมทิลีนคลอไรด์ เฮกเซน โทลูอิน จากนั้นนำไปหาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีด้วยเทคนิค CVAAS และ GC-ECD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R. Fishcher, S. Rapsomanikis และ M.O. Andreae[30] หาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่างปลาโดยใช้ GC/AA และทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับโซเดียมเตตราเอทิลบอเรต เนื้อปลาต้องทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze-dried fish) ย่อยสลายด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลเข้มข้น 25% เขย่าใน ultrasonic bath นาน 2 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งเนื้อเยื่อละลายหมด เจือจางด้วยเมทานอล ทำสารละลายตัวอย่างให้อยู่ในน้ำและปรับพีเอชเป็น 4.5 โดยการนำสารละลายตัวอย่างไปทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับโซเดียมเตตราเอทิลบอเรตเข้มข้น 1% ตรวจสอบปริมาณด้วย GC/AA

AOAC official method 983.20[31] เป็นวิธีวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีในปลาและปลาหมึก ใช้อะซิโตนและเฮกซันล้างไขมันออกจากเนื้อเยื่อปลา แล้วสกัดเมทิลเมอร์คิวรีด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50% โดยปริมาตร ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการสกัดให้ไปอยู่ในเฮกซันแล้วระเหยเฮกซันทิ้งนำไปวัดด้วย GC-ECD



บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับงานวิจัย

3.1.1 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี(II)คลอไรด์ (methylmercury(II)chloride) มีความบริสุทธิ์ 92 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์ของ Sigma-Aldrich

3.1.2 สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) Proanalysis grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodiumhydroxide) Proanalysis grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck
3. กรดอะซิติก (glacial acetic acid 100%) Proanalysis grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck
4. เมทานอล (methanol) HPLC grade ผลิตภัณฑ์ของ J.T. Bager
5. เมทานอล (methanol) AR grade ผลิตภัณฑ์ของ J.T. Bager
6. ไดไทโซน (dithizone หรือ 1,5 diphenylthiocarbazone) A.C.S. reagent ผลิตภัณฑ์ของ Sigma aldrich
7. โซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรต (sodium acetate 3 hydrate) HPLC grade ผลิตภัณฑ์ของ BHD
8. อะซิโตน (acetone) A.C.S. reagent ผลิตภัณฑ์ของ J.T. Bager
9. เบนซีน (benzene) Proanalysis grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck
10. เตตราไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran) HPLC grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck
11. แอมโมเนียเข้มข้น 25% (25% ammonia) Proanalysis grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck
12. เอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซิติกแอซิดไดโซเดียม (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) AR grade ผลิตภัณฑ์ของ APS Finechem
13. น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องบดตัวอย่าง
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ผลิตภัณฑ์ของ Kubota รุ่น Z400
3. หลอดพลาสติกสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge tube) พลาสติก

ชนิด polypropylene copolymer ขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิดพลาสติกชนิด polypropylene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. micropipett ขนาด 5- 40, 40-200 และ 200-1000 ไมโครลิตร
5. เครื่องผสมสารสำหรับหลอดทดลอง (vortex mixture) VORTEX-2 GENIE
6. syringe filter ชนิดไนลอน (nylon) รูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร แบบ disposable
7. เฟสของแข็งสกัด (C18 Sep Pak cartridges) ผลิตภัณฑ์ของ Milipore Corporation
8. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น CG840 ผลิตภัณฑ์ของ SCHOTT
9. คอลัมน์ ODS-2 Hypersil ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Milipore Corporation
10. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง Satorius model AC 211S
11. เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวแบบสมรรถนะสูงของบริษัท Milipore Corporation ประกอบด้วยปั๊มแบบ binary pump รุ่น water 501 เครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (auto injector) รุ่น water 712 WISP และเครื่องตรวจวัดชนิด tunable absorbance detector รุ่น water 486 ระบบประมวลผลใช้ software chromatography CSW32

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 พัฒนาวิธีวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีเชิงปริมาณในตัวอย่างปลา

3.2.1.1 ศึกษาการตอบสนองของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงที่ติดตั้งเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (HPLC - UV detector) เพื่อหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณต่อสารประกอบเชิงซ้อนของเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดไทโชน

3.2.1.2 ศึกษาชนิดของสารสกัดและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัดเมทิลเมอร์คิวรีในปลา ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงที่ติดตั้งเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต

3.2.2 ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีเชิงปริมาณที่พัฒนาขึ้น

3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาสดชนิดต่างๆและปลาทูน่ากระป๋อง

โดยการเก็บตัวอย่างปลา 25 ตัวอย่างและปลาทูน่ากระป๋องจำนวน 10 ตัวอย่างที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

3.2.4 สรุปรวบรวมและประเมินผลการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีดำเนินการ

3.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

3.3.1.1 สารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (stock standard solution)

ชั่งสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีคลอไรด์ 0.0582 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 6 เดือน

3.3.1.2 สารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (intermediate standard solution)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

3.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration standard solution)

เตรียมละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีเข้มข้น 100, 300, 500, 700, และ 900 นาโนกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อ 3.3.1.2) ปริมาตร 10, 30, 50, 70, และ 90 ไมโครลิตร ลงในขวดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วยสารละลายไดโทโซนเข้มข้น 0.0067% (ข้อ 3.3.3.2) เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร 15 วินาที

3.3.3 การเตรียมสารเคมี

3.3.3.1 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1:1

ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เทลงในน้ำจืดไอออน ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.3.3.2 สารละลายไดโทโซนในเมทานอลเข้มข้น 0.0067% (w/v)

ชั่งไดโทโซน 0.0017 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 25 มิลลิลิตร

3.3.3.3 สารละลายไดโทโซนในน้ำเข้มข้น 0.005% (w/v)

ชั่งไดโทโซน 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยแอมโมเนียเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เทใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับพีเอชให้เป็น 9.0 ด้วยกรดอะซิติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 202 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3.4 สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ , พีเอช 4

ปีเปตกรดอะซิติกจำนวน 24.2 มิลลิลิตรและชั่งโซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรตปริมาณ 10.47 กรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3.5 สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ , พีเอช 4

ปีเปตกรดอะซิติกจำนวน 2.4 มิลลิลิตรและชั่งโซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรตปริมาณ 1.05 กรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3.6 สารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ EDTA เข้มข้น 0.01 โมลาร์ , พีเอช 4

ปีเปตกรดอะซิติกจำนวน 24.2 มิลลิลิตรชั่งโซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรตปริมาณ 10.47 กรัม และ EDTA disodium salt ปริมาณ 3.72 กรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3.7 สารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และ EDTA เข้มข้น 0.01 โมลาร์ , พีเอช 4

ปีเปตกรดอะซิติกจำนวน 2.42 มิลลิลิตรชั่งโซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรตปริมาณ 1.05 กรัม และ EDTA disodium salt ปริมาณ 3.72 กรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.3.8 สารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และ EDTA เข้มข้น 166 ไมโครโมลาร์ , พีเอช 4

ปีเปตกรดอะซิติกจำนวน 4.84 มิลลิลิตรชั่งโซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรตปริมาณ 2.09 กรัม และ EDTA disodium salt ปริมาณ 0.062 กรัม เทใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน กรองผ่านกระดาษกรองชนิด cellulose acetate ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน

3.3.3.9 สารละลายเฟสเคลื่อนที่

ผสมเมทานอล เตตราไฮโดรฟูแรนและสารละลายผสมบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.1M และ EDTA เข้มข้น 166 μ M , พีเอช 4 ในอัตราส่วน 3.5 :3.5 :3.0 ตามลำดับ

3.3.4 ศึกษาการตอบสนองของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ติดตั้งเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (UV detector) เพื่อหาขีดความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณต่อสารประกอบเชิงซ้อนของเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดไทโชน

ขั้นตอนการศึกษา

เตรียมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปิดสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อ 3.3.1.2) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในขวดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายไดไทโชนเข้มข้น 0.0067% (ข้อ 3.3.3.2) เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร 15 วินาที นำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง โดยปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์เช่น ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีด อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จนได้พีคที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีให้มีความเข้มข้นน้อยลงเรื่อยๆ และนำไปวัด จนกระทั่งเครื่อง HPLC ไม่สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้

3.3.5 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

ขั้นตอนการศึกษา

เตรียมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีหลายความเข้มข้น โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำสุดที่หาได้จากข้อ 3.3.4 แล้ว คือ 100, 300, 500, 700, และ 900 นาโนกรัมต่อลิตร นำค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีคไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง โดยมาคำนวณหาสมการเส้นถดถอย (regression line) โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (the method of least squares) หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) หรือ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ต้องไม่ต่ำกว่า 0.995 [32] ยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นความเป็นเส้นตรงด้วย Mandel fitting test

3.3.6 ศึกษาหาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกจากเนื้อเยื่อปลา

3.3.6.1 ศึกษาหาตัวทำละลายเหมาะสมที่ใช้ในการสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกจากเนื้อเยื่อปลา

ขั้นตอนการศึกษา

นำปลานักล่าในที่นี่ใช้ปลาเก๋าขนาดใหญ่มาแล้วเอาเฉพาะเนื้อแล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆนำไปบดด้วยเครื่องปั่นเนื้อสัตว์ให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งใส่หลอดพลาสติก (centrifuge tube) หนักประมาณ 2 กรัม จำนวน 12 หลอด ส่วนที่เหลือเก็บใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิทนำไปเก็บในตู้เย็นในช่องแช่แข็ง นำตัวอย่างไปสกัดดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่หนึ่งตัวอย่างสามหลอดแรกนำไปสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกผสมน้ำ อัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่งปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วขี้ให้เนื้อเยื่อปลาสัมผัสกับสารละลาย สกัดให้มากที่สุด นำไปเขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลองนาน 1 นาที แล้วนำไปแยกส่วนของเหลวและของแข็งออกจากกันด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงโดยตั้งความเร็วรอบ 2500 รอบ ต่อนาที แยกเอาส่วนของเหลวไปปรับพีเอชเป็น 4.0 ด้วยแอมโมเนียเข้มข้น 25% ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสมของสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 ของโซเดียมอะซิเตด-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ EDTA เข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปผ่าน C18 Sep-Pak cartridge ที่เตรียมไว้พร้อมใช้งาน (ปรับสภาพ C18 Sep-Pak cartridge ด้วยการผ่านเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตรและสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 ของโซเดียมอะซิเตด-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผ่านสารละลายไดโทโซนเข้มข้น 0.005% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อให้ไดโทโซนคงอยู่ที่ cartridge จากนั้นปรับสภาพด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 ของโซเดียมอะซิเตด-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 ของโซเดียมอะซิเตด-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) ด้วยอัตราการไหล 4 มิลลิลิตรต่อนาที จนสารละลายตัวอย่างหมด ถึง cartridge นี้ด้วยสารละลายผสมของสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 ของโซเดียมอะซิเตด-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และ EDTA เข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ขั้นตอนสุดท้ายจะเอาสารประกอบเชิงซ้อนไดโทโซน และเมทิลเมอร์คิวรีด้วยเมทานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC – UV detector

กลุ่มที่สองตัวอย่างหลอดที่ 4, 5 และ 6 นำไปล้างเอาไขมันออก โดยการเติมอะซิโตนปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วขี้ให้เนื้อเยื่อกระจายให้มากที่สุดแล้วนำไปเขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลองนาน 30 วินาที จากนั้นทำต่อเหมือนกับตัวอย่างในกลุ่มที่หนึ่ง

กลุ่มที่สามตัวอย่างหลอดที่ 7, 8 และ 9 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปวางในอ่างน้ำเดือดนาน 30 นาที ยกกลงแช่ในน้ำ และปรับพีเอชให้เป็น 4.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นนำไปผ่าน Sep-Pak cartridge เหมือนกับกลุ่มที่ 1

เปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองทั้งสามกลุ่ม โดยเลือกสารละลายสกัดที่สามารถสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกมาได้มากที่สุดไปทดลองในข้อต่อไป

3.3.6.2 ศึกษาน้ำหนักของตัวอย่างที่เหมาะสมในการสกัด

เปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวอย่าง 2.0, 4.0 และ 6.0 กรัม สกัดด้วยสารสกัด (จากข้อ 3.3.6.1) เปรียบเทียบผลการทดลองโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของเมทิลเมอร์คิวรีในสารละลายตัวอย่าง การอุดตันของ cartridge และลักษณะของพีคของสารที่สนใจและพีคของสารรบกวนอื่นๆ

3.3.6.3 ศึกษาพีเอชของสารละลายตัวอย่างที่เหมาะสม

ปรับพีเอชของสารละลายตัวอย่างก่อนผ่าน Sep-Pak cartridge โดยกำหนดให้ตัวแปรอื่นๆ คงที่

3.3.6.4 ทดสอบความแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้น

นำตัวอย่างปลาสดที่บดจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี วิเคราะห์หาเมทิลเมอร์คิวรี โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น(ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ) คำนวณหาร้อยละการคืนกลับ (%recovery)

3.3.7 ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ [29]

เมื่อได้สารสกัดและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมทิลเมอร์คิวรีในปลาแล้ว ก็มาถึงขั้นทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยเตรียมตัวอย่างปลาที่ไม่มีเมทิลเมอร์คิวรีหรือมีแต่วิธีนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้ (sample blank) (ตัวอย่างนี้ได้ตรวจสอบปริมาณปรอททั้งหมดแล้วพบว่าปริมาณปรอททั้งหมดในเนื้อปลาเท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อกรัม) บดปลาให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในภาชนะเก็บในถุงพลาสติกปิดสนิทและแช่ในตู้เย็นช่องแช่แข็ง และก่อนทำการทดลองหนึ่งคืนให้นำมาไว้ในช่องเก็บเนื้อสัตว์เพื่อให้ตัวอย่างละลายพร้อมที่จะชั่ง

3.3.7.1 ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ชั่งตัวอย่างปลาที่ไม่มีเมทิลเมอร์คิวรีหนักประมาณ 2 กรัมใส่หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยงจำนวน 10 หลอด เติมสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีปริมาณ 300 นาโนกรัม นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลา คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละการคืนกลับ

การคำนวณ

$$\text{ค่าร้อยละการคืนกลับ (\%recovery)} = [(C_f - C_s) / C_{cal}] \times 100 \quad (3.1)$$

เมื่อ C_f หมายถึง ปริมาณปรอทในเนื้อปลาที่เติมสารละลายมาตรฐาน (fortified sample หรือ spiked sample) ได้จากการทดลอง มีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อกรัม

C_s หมายถึง ปริมาณปรอทในเนื้อปลา (blank sample) ได้จากการทดลอง มีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อกรัม

C_{cal} หมายถึง ปริมาณปรอทในเนื้อปลาที่เติมสารละลายมาตรฐาน ได้จากการคำนวณ

ค่าร้อยละการคืนกลับที่คำนวณได้ ต้องเป็นค่าที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน Eurachem, IUPAC, ISO และ AOAC (ตารางที่ 3.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ค่าร้อยละการคืนกลับที่ยอมรับได้ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารที่สนใจ (analyte)

| ความเข้มข้นของสารที่สนใจ | พิสัยของค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 100% | 98 – 102 |
| 10% | 98 – 102 |
| 1% | 97 – 103 |
| 0.1% | 95 – 105 |
| 100 ppm | 90 – 107 |
| 10 ppm | 80 – 110 |
| 1 ppm | 80 – 110 |
| 100 ppb | 80 – 110 |
| 10 ppb | 60 – 115 |
| 1 ppb | 40 – 120 |

ถ้าร้อยละของการคืนกลับยังยอมรับได้ สามารถลดปริมาณการเติมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีลงอีกจนกระทั่งค่าร้อยละของการคืนกลับไม่สามารถยอมรับได้ ดังนั้นค่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณคือค่าต่ำสุดของสารมาตรฐานที่เติมลงไปในตัวอย่างไม่ให้มีเมทิลเมอร์คิวรี แล้วค่าร้อยละของการคืนกลับที่ได้จากคำนวณอยู่ในเกณฑ์

จากนั้นคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S_u) ของปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลาที่ระดับขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ เพื่อหาขีดจำกัดการตรวจพบ ซึ่งขีดจำกัดการตรวจพบจะเท่ากับสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3.7.2 พิสัยหรือช่วงการใช้งาน (working range) และความเป็นเส้นตรง (linearity)

ทำการทดสอบดังนี้ นำตัวอย่างปลาที่ไม่มีเมทิลเมอร์คิวรีมาชั่งใส่หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยงโดยมีน้ำหนักประมาณ 2 กรัม เติมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีปริมาณ 300, 600, 2000, 4000, 8000 และ 16000 ng (ทำจุดละ 3 ซ้ำ) นำไปตรวจวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรี นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคต่อปริมาณเมทิลเมอร์คิวรี ($\text{ng CH}_3\text{Hg}^+$) ในเนื้อปลา (g) ประเมินความเป็นเส้นตรงด้วยการคำนวณหาสมการเส้นถดถอย (regression line) โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (the method of least squares) หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) หรือ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ต้องไม่ต่ำกว่า 0.995 และยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นและความเป็นเส้นตรงด้วย Mandel fitting test

3.3.7.3 ความเที่ยง (precision)

ศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ 2 แบบ คือ การทวนซ้ำได้ (repeatability) เมื่อทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียว (within day) และ การทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility) เมื่อทำการวิเคราะห์ต่างวัน (between day) พิจารณาความเที่ยงของการวิเคราะห์ทั้ง 2 แบบจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์ ค่าที่ได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับโดยการประเมินด้วย Horwitz's equation และ HORRAT และเปรียบเทียบข้อมูลทั้งสองกลุ่มด้วย Mean t-test

3.3.7.4 ความแม่นยำ (accuracy)

เนื่องจากการทดสอบความแม่นยำของวิธีที่น่าเชื่อถือที่สุด คือการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็น known sample เช่น วัสดุอ้างอิง (reference material) ซึ่งอาจเป็นวัสดุอ้างอิงที่ได้รับการรับรอง (certified reference material) จากหน่วยงานที่มีความน่าเชื่อถือ และวัสดุนั้นต้องมีคุณสมบัติเหมือนกับหรือใกล้เคียงกับตัวอย่างจริง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากวัสดุอ้างอิงที่ได้รับการรับรองมีราคาแพง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกวิธีทดสอบความแม่นยำของวิธี ด้วยการการเติมสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีลงในตัวอย่างปลาที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณร้อยละการคืนกลับ ผลการศึกษาความแม่นยำ ต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

เมื่อประเมินทุกหัวข้อผ่านแล้วจึงนำวิธีนี้ไปใช้สำรวจการปนเปื้อนเมทิลเมอร์คิวรีในปลาและปลาทูน่ากระป๋อง โดยการซื้อตัวอย่างที่มีจำหน่ายอยู่ในตลาดสดหรือซูเปอร์มาเก็ต ปลาที่นำมาวิเคราะห์จะเป็นปลาหลายชนิดทั้งปลาทะเลและปลาน้ำจืดที่นิยมบริโภคในประเทศไทย ส่วนปลาทูน่ากระป๋องเลือกจากยี่ห้อต่างๆ

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาและปลาทูน่ากระป๋อง

3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างปลาและปลาทูน่ากระป๋อง

แต่เอาเฉพาะเนื้อปลาแล้วหั่นเป็นชิ้นๆ นำไปบดด้วยเครื่องบดเนื้อสัตว์ให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนปลาทูน่ากระป๋องนำเฉพาะเนื้อปลาไปบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน (น้ำมันหรือน้ำเกลือให้ทิ้ง)

3.4.2 การสกัดเมทิลเมอร์คิวรีจากเนื้อเยื่อปลา

เมื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมได้แล้ว ให้ทำตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่อธิบายไว้ในหัวข้อที่ผ่านๆ มา

3.4.3 การวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีในสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC

ตั้งสภาวะของเครื่อง HPLC ตามตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะของเครื่อง HPLC

| | |
|--------------------------|--|
| Column: | ODS-2 Hypersil 4.6 x 250 mm, 5 μ m |
| Detector: | UV tunable absorbance detector |
| Wavelength: | 475 nm |
| Injection volume: | 50 μ l |
| Flow rate: | 1.2 ml min ⁻¹ |
| Pump mode: | isocratic |
| Mobile phase: | (35/35/30%) Methanol/tetrahydrofuran/acetic acid-sodium acetate 0.1M + 166 μ M EDTA buffer |
| Run time: | 8 min |

นำสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีความเข้มข้น 0.100, 0.300, 0.500, 0.700, และ 0.900 มิลลิกรัมต่อลิตร มาฉีดสร้างกราฟมาตรฐาน นำสารละลายตัวอย่างมาฉีดแล้วเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในสารละลายตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลาจากสูตรการคำนวณดังต่อไปนี้

การคำนวณ

$$C_s = (A_s \times V_f) / W_s \quad (3.2)$$

เมื่อ

C_s หมายถึง ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่างเนื้อปลา มีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อกรัม

A_s หมายถึง ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในสารละลายตัวอย่าง มีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

V_f หมายถึง ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่าง มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร

W_s หมายถึง น้ำหนักตัวอย่าง มีหน่วยเป็นกรัม

3.4.4 การควบคุมคุณภาพและการรายงานผล

การควบคุมคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์

- หินที่ได้พีคของสารละลายมาตรฐานในแต่ละครั้งที่วิเคราะห์ต้องไม่แตกต่างกันเกินร้อยละ 10
- ทำซ้ำ (duplicate) ทุกครั้งของกลุ่มตัวอย่าง 1 กลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง ทุกครั้งของกลุ่มตัวอย่าง 1 กลุ่ม การรายงานผลวิเคราะห์
- กรณีค่าที่ได้น้อยกว่าขีดจำกัดการตรวจพบ รายงานว่า “ตรวจไม่พบ”
- กรณีค่าที่ได้อยู่ระหว่างขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ รายงานว่า “น้อยกว่าขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ”
- กรณีค่าที่ได้มากกว่าหรือเท่ากับขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ รายงาน “ค่าจริง”



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

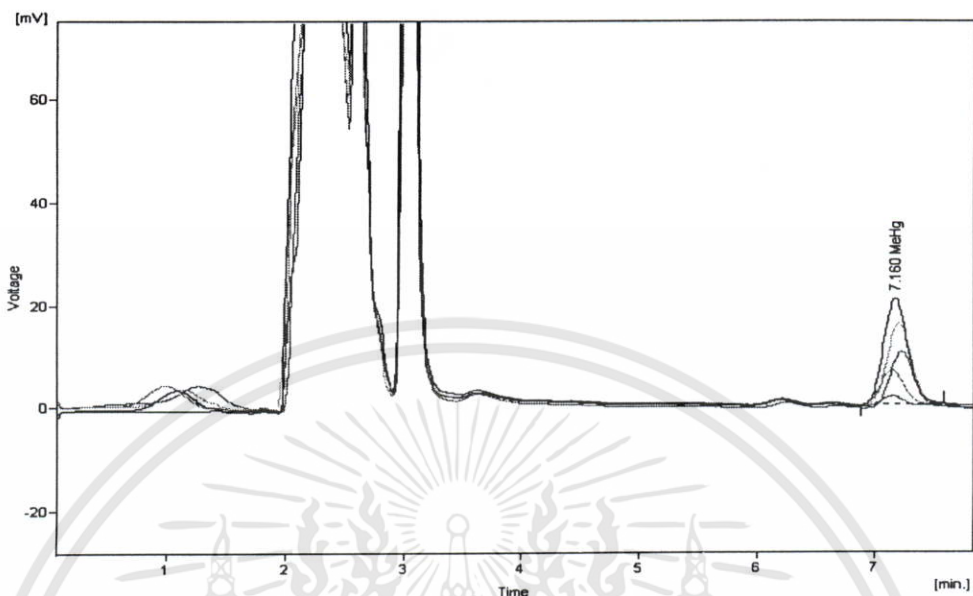
4.1 ผลการศึกษาการตอบสนองของเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงที่ติดตั้งเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนคลื่นแสงยูวี (HPLC – UV detector) ว่ามีขีดการวัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณต่อสารประกอบเชิงซ้อนของเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดไทโชน

การวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาสามารถใช้เทคนิคทางเครื่องมือได้หลายเทคนิค แต่ที่นิยมและเป็นที่ยอมรับกันมากที่สุดในยุคแรกจนถึงปัจจุบันคือการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ และต่อมาก็มักมีการใช้เครื่องมือชนิดอื่นๆ เช่น เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทมิเตอร์(AAS) เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง เป็นต้น การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงยังมีการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดธรรมดา (photometric) และชนิดพิเศษที่ต้องต่อเชื่อม(hyphented) กับเทคนิคอื่นได้แก่ ICP-AES, CV-ICP-AES, CV-AAS, CV-AFS, ICP-MS, CV-MIP, CV-ICP-MS ซึ่งเทคนิคหลังเป็นที่ต้องใช้ผู้วิเคราะห์ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษและการลงทุนสูง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เครื่องโครมาโทกราฟสมรรถนะสูงชนิดของเหลวที่มีเครื่องตรวจวัดชนิดธรรมดา (photometric) ประเภทเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวี ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ห้องปฏิบัติการหรือห้องวิเคราะห์และทดสอบมีใช้อยู่เกือบทุกหน่วยงาน

เมทิลเมอร์คิวรีไม่ดูดกลืนคลื่นแสงยูวี ดังนั้นต้องเติมโคร โมฟอร์โดยการทำให้ปฏิกิริยากับไดไทโชน เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ดูดกลืนคลื่นแสงยูวี การตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟแต่ละเครื่องจะมีการตอบสนองต่อการวิเคราะห์สารที่สนใจไม่เท่ากัน ถึงแม้สารที่สนใจเป็นสารชนิดเดียวกันและปริมาณเท่ากัน ดังนั้นจึงต้องมีการทดลองหาความไวของการตอบสนองและขีดจำกัดของการวัดของเครื่องเป็นขั้นตอนแรก จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่นแสง 475 นาโนเมตร แยกสารเชิงซ้อนเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดไทโชนออกจากสารรบกวนโดยใช้คอลัมน์ ODS-2 Hypersil 4.6 x 250 mm อนุภาคขนาด 5 ไมครอน วิธีการชะแบบไอโซเครติก เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลผสมเตตราไฮโดรฟูแรนผสมสารละลายบัฟเฟอร์(โซเดียมอะซิเตดเข้มข้น 0.02 โมลาร์, กรด-อะซิติกเข้มข้น 0.08 โมลาร์ และเอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซิเตดเข้มข้น 166 ไมโครโมลาร์) อัตราส่วน 3.5 : 3.5 : 3 ตามลำดับ อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที พีคของสารประกอบเชิงซ้อนเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดไทโชนจะปรากฏให้เห็นในช่วง 6.9-7.3 นาที (รูปที่ 4.1) ผลการทดสอบพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณปรอทกับพื้นที่พีคมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ยืนยันผลด้วย Mandel's fitting test

(ภาคผนวก ก) และความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีที่ตรวจพบและมีความเที่ยงที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนำมาใช้เพื่อประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

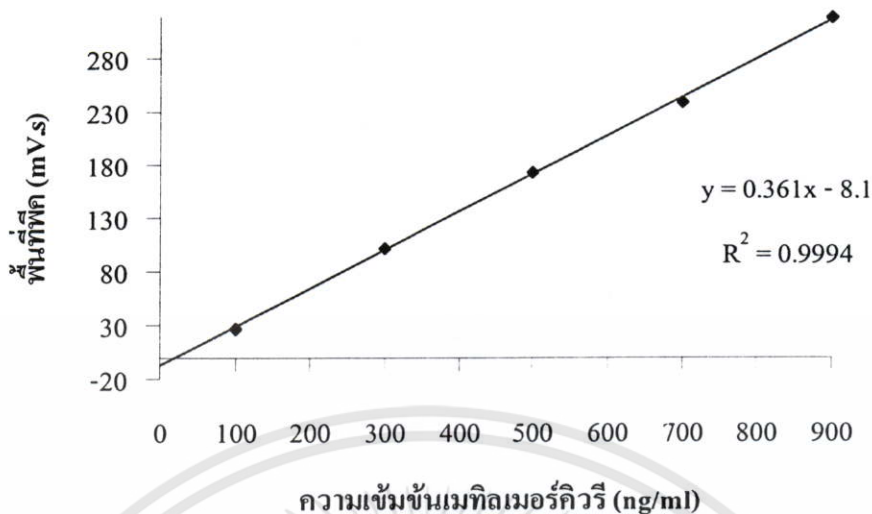
ได้ เท่ากับ 5 นาโนกรัม หรือเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อฉีดสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข)



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีเข้มข้น 100, 300, 500, 700 และ 900 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี

เตรียมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีความเข้มข้น 100, 300, 500, 700 และ 900 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายไดโทโซนในเมทานอลเข้มข้น 0.0067% ฉีดเข้าเครื่อง HPLC-UV detector ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ จำนวน 5 วัน หาค่าเฉลี่ยพื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานทุกๆจุด สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเมทิลเมอร์คิวรี(แกน x) และพื้นที่ได้พีค(แกน y) ซึ่งการคำนวณนี้ได้จากซอฟต์แวร์ไมโครซอฟต์ออฟฟิศ, โปรแกรมเอกเซล ได้กราฟมาตรฐาน(รูปที่ 4.1) และสมการที่ได้คือ $y = 0.356x - 6.6$ ความชันเท่ากับ 7.12 จุดตัดแกน y เท่ากับ -6.6 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) = 0.9996 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และพิสูจน์ว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณปรอทและพื้นที่พีค มีความเป็นเส้นตรงด้วย Mendel's fitting test (ภาคผนวก ก) และทุกครั้งทีวิเคราะห์จะสร้างกราฟมาตรฐานใหม่ทุกครั้งด้วยซอฟต์แวร์ chromatography station CSW32 พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจมากกว่า 0.999



รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีในช่วง 100 – 900 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3 ผลการศึกษาสารสกัดและสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกจากเนื้อเยื่อปลา

จากการทบทวนเอกสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสกัดเมทิลออกจากเนื้อปลา สามารถจำแนกได้ 2 ประเภทตามชนิดสารละลายสกัด คือการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50% (v/v) และ ค่างเข้มข้น (สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลเข้มข้น 25% หรือน้ำเข้มข้น 10 โมลาร์และสารละลายเตตราเมทิลแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในน้ำเข้มข้น 25%)

4.3.1 ผลการศึกษาสารสกัดที่เหมาะสม

ในงานวิจัยนี้ทดสอบสารสกัดด้วยสารละลาย 2 ชนิด คือ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50% และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำเข้มข้น 10 โมลาร์ จากตัวอย่างเนื้อปลาเก๋าบดละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มดังที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกมาได้มากที่สุดและมีความเที่ยงมากที่สุด เพราะสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ย่อยโปรตีนของเนื้อปลาให้เป็นสารละลายเมื่อให้ความร้อน และไม่ทำให้เฟสของแข็งสกัดเกิดการอุดตัน ส่วนสารละลายไฮโดรคลอริกไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้หมดทำให้สกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกมาได้ไม่หมดและยังทำให้เฟสของแข็งสกัดอุดตันระหว่างทำให้เข้มข้น ไม่ว่าจะล้างตัวอย่างเนื้อปลาด้วยอะซิโตนก่อนสกัดหรือไม่ก็ตาม นอกจากนี้อะซิโตนยังสามารถสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกมาจากเนื้อปลาได้ด้วย

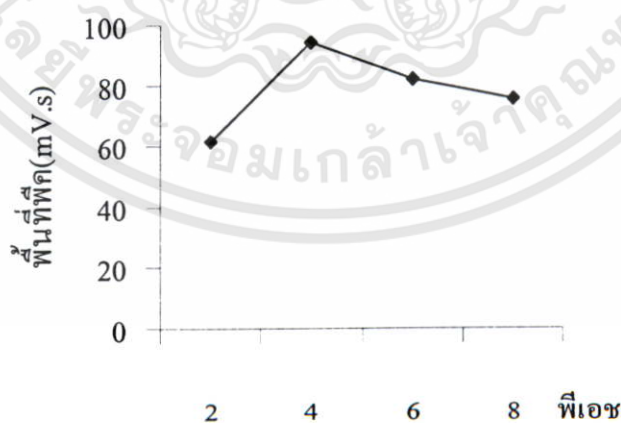
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดของสารสกัดต่างกัน

| สารสกัด | ความเข้มข้นของเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลา (ng/g) |
|--|--|
| กรดไฮโดรคลอริกในน้ำเข้มข้น 50 % (v/v) | |
| - กลุ่มที่ 1 ไม่ล้างอะซิโตนก่อนสกัด | 181.5, 193.4, 148.3 |
| - กลุ่มที่ 2 ล้างอะซิโตนก่อนสกัด | 171.2, 177.5, 165.9 |
| สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำเข้มข้น 10 โมลาร์ (กลุ่มที่ 3) | 232.7, 235.6, 234.9 |

4.3.2 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสม

เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะชนิดต่างๆที่เป็นสารรบกวน เมทิลเมอร์คิวรีและไดโทโซน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบพีเอชสารละลายตัวอย่างหลังผ่านขั้นตอนการสกัด ด้วยการปรับพีเอชสารละลายตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 2, 4, 6 และ 8 ก่อนผ่านสารละลายตัวอย่างเข้าสู่ cathode เฟสของแข็งสกัดที่อนุภาคดูดซับโมเลกุลไดโทโซนไว้แล้ว ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3 สารละลายตัวอย่างพีเอช 4 จะทำให้การเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเมทิลเมอร์คิวรี(II) ไดโทโซนได้ดีที่สุด ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hong Wu และคณะ[16] และ D.M. Sanchez และคณะ[28]



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในสารละลายตัวอย่างและพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลการศึกษาน้ำหนักที่เหมาะสม

เนื่องจากต้องการเพิ่มน้ำหนักตัวอย่างให้ได้มากที่สุด เพื่อให้เป็นตัวแทนของตัวอย่างที่ดีและไม่รบกวนการวิเคราะห์ ตัวอย่างที่ใช้ทดลองคือ เนื้อปลากระเบนบดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ช่วงน้ำหนักที่ทดลองคือ 2, 4 และ 6 กรัม สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำเข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในน้ำเดือด 30 นาที ปล่อยให้เย็นและปรับพีเอชสารละลายตัวอย่างให้เป็น 4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการผ่านเฟสของแข็งสกัดและชะสารประกอบเชิงซ้อนเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดโทโซนด้วยเมทานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายตัวอย่างไปฉีดหาปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีด้วยเครื่อง HPLC-UV detector ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลากระเบนเมื่อน้ำหนัก 2 และ 4 กรัม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในขั้นตอนการผ่านเฟสของแข็งสกัดตัวอย่างหนัก 4 กรัม อัตราการไหลของสารละลายตัวอย่างจะช้ากว่าตัวอย่างน้ำหนัก 2 กรัม ดังนั้นงานวิจัยนี้เลือกน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม เป็นน้ำหนักที่เหมาะสมในการสกัด

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของน้ำหนักตัวอย่างที่มีต่อการสกัดเมทิลเมอร์คิวรีออกจากเนื้อปลา

| น้ำหนักตัวอย่าง (g) | จำนวนตัวอย่าง | ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่าง (ng/g) | | |
|---------------------|---------------|---|--------|------------------|
| | | ต่ำสุด | สูงสุด | เฉลี่ย \pm SD |
| 2 | 3 | 428.4 | 471.3 | 455.9 \pm 23.9 |
| 4 | 3 | 407.5 | 469.0 | 437.0 \pm 30.8 |
| 6 | 3 | 337.0 | 443.6 | 395.2 \pm 54.0 |

4.4 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

4.4.1 ซีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ

วิธีหาขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณมีหลายวิธี ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีเติมสารมาตรฐานเท่ากับปริมาณต่ำสุดที่เครื่องมือวิเคราะห์สามารถวัดได้และมีความเที่ยง ซึ่งเท่ากับ 5 นาโนกรัม ในการฉีดสารละลายมาตรฐาน 50 ไมโครลิตร จากการทดลองในหัวข้อที่ผ่านมา พบว่าในการชะสารประกอบเชิงซ้อนเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดโทโซนต้องใช้เมทานอล 3 มิลลิลิตร ดังนั้นเมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นของเมทิลเมอร์คิวรีในสารตัวอย่างจะได้เท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อคำนวณเป็นปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในสารละลายตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร จะมีปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีเท่ากับ 300 นาโนกรัม ซึ่งเป็นปริมาณสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีที่ต้องเติมลงในตัวอย่างเนื้อปลา (sample blank)

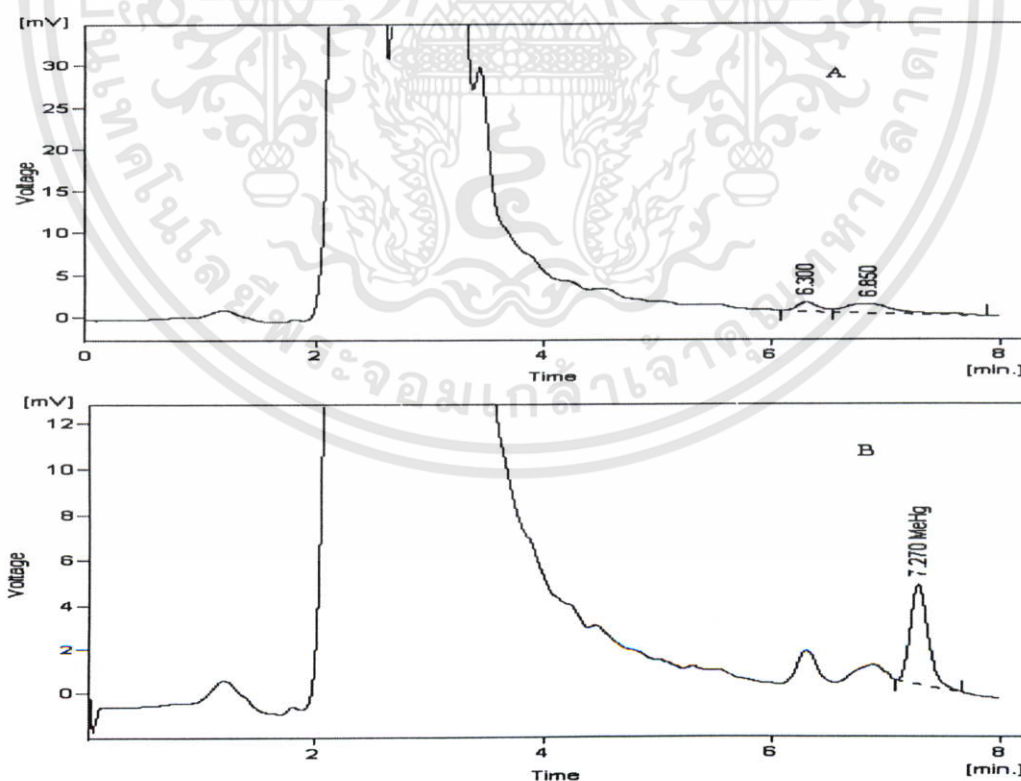
จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อปลาทุย(sample blank) และตัวอย่างเนื้อปลาทุยที่เติมสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีปริมาณ 300 นาโนกรัม(spiked bank) ได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.4 และนำข้อมูลทั้งหมดมาคำนวณร้อยละการกลับคืนได้ผลตามตารางที่ 4.3 ซึ่จัดจำกัการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาเท่ากับ 147.1 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งจากการวิเคราะห์จริงได้ค่าร้อยละการคืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และซึ่จัดจำกัการตรวจพบเท่ากับ 21.9 นาโนกรัมต่อกรัม (ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบเพื่อการบ่งชี้ซึ่จัดจำกัการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลา

| ตัวอย่างที่ | ปริมาณสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีที่เติม (ng) | ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลา (ng/g)* | | | ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลาที่ตรวจพบ (ng/g)** | | | ร้อยละการคืนกลับ | | |
|-------------|---|--|--------|--------|--|--------|--------|------------------|--------|--------|
| | | ต่ำสุด | สูงสุด | เฉลี่ย | ต่ำสุด | สูงสุด | เฉลี่ย | ต่ำสุด | สูงสุด | เฉลี่ย |
| | | | | | | | | | | |
| 1 – 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| 11 – 20 | 300 | 139.5 | 154.6 | 147.1 | 128.0 | 163.1 | 143.8 | 89.6 | 105.0 | 97.8 |

*จากการคำนวณ

**จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเมทิลเมอร์คิวรี(A) และ โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน 300 นาโนกรัม (B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ช่วงที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

เติมสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีปริมาณ 300, 600, 2000, 4000, 8000 และ 16000 นาโนกรัม ลงในตัวอย่างปลาทุ (sample blank) หนักประมาณ 2 กรัม หรือคำนวณเป็นความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในปลาประมาณ 150, 300, 1000, 2000, 4000 และ 8000 นาโนกรัมต่อกรัม จำนวนระดับละ 3 ครั้ง แล้วนำตัวอย่างเหล่านี้ไปผ่านขั้นตอนการสกัดและการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ นำข้อมูลมาประมวลผล พบว่าค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 81.9 – 99.2 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 9.2 (ตารางที่ 4.4) ทั้งสองค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4.4 แสดงร้อยละการกลับคืนและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้นเมทิล- เมอร์คิวรีที่เติมในเนื้อ ปลาเฉลี่ย \pm SD (ng/g)* | ความเข้มข้นเมทิล- เมอร์คิวรีในเนื้อปลาที่ ตรวจพบเฉลี่ย \pm SD (ng/g)** | ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์ (%) | ร้อยละการ กลับคืน (%) | จำนวนซ้ำ |
|--|---|--|-----------------------------|----------|
| 0 | 0 | 0 | - | 3 |
| 142.3 \pm 10.9 | 137.1 \pm 12.6 | 9.2 | 96.3 | 3 |
| 302.7 \pm 7.7 | 248.3 \pm 12.3 | 4.9 | 82.0 | 3 |
| 994.5 \pm 3.0 | 814.8 \pm 25.7 | 3.2 | 81.9 | 3 |
| 1994.6 \pm 61.3 | 1684.4 \pm 128.5 | 7.6 | 84.4 | 3 |
| 3994.0 \pm 63.6 | 3962.6 \pm 247.6 | 6.2 | 99.2 | 3 |
| 7924.1 \pm 435.9 | 6551.8 \pm 500.7 | 7.6 | 82.6 | 3 |

*จากการคำนวณ

**จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้

4.4.3 ความเที่ยง

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อปลากระเบนบดละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ทำซ้ำจำนวน 10 ครั้ง ภายในวันเดียว และวิเคราะห์อีกครั้งในสัปดาห์ต่อมาจำนวน 10 ครั้ง ได้ผลดังตารางที่ 4.5 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของตัวอย่างทั้งสองกลุ่มเท่ากับ 0.07 และ 0.06 ซึ่งจากการทดสอบด้วย mean t-test พบว่าตัวอย่างทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก จ) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีการทวนซ้ำได้ (repeatability) และการทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการเดียวได้ (within laboratory reproducibility)

ตารางที่ 4.5 แสดงการทวนซ้ำและการทำซ้ำได้ด้วยห้องปฏิบัติการเดียว ในการวิเคราะห์ตัวอย่างปลากระเบน

| ตัวอย่างที่ | วิเคราะห์ครั้งที่ 1 | | ตัวอย่างที่ | วิเคราะห์ครั้งที่ 2 | |
|-----------------------------|---------------------|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| | น้ำหนัก (g) | ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่าง | | น้ำหนัก (g) | ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่าง |
| 1 | 2.113 | 471.4 | 1 | 2.026 | 450.2 |
| 2 | 2.017 | 428.4 | 2 | 2.020 | 404.0 |
| 3 | 2.116 | 467.9 | 3 | 2.114 | 462.7 |
| 4 | 2.057 | 466.7 | 4 | 2.003 | 455.3 |
| 5 | 2.028 | 381.7 | 5 | 2.010 | 400.0 |
| 6 | 2.019 | 478.5 | 6 | 2.005 | 454.9 |
| 7 | 2.037 | 418.3 | 7 | 2.064 | 482.6 |
| 8 | 2.019 | 454.7 | 8 | 2.029 | 455.4 |
| 9 | 2.130 | 476.1 | 9 | 2.093 | 444.3 |
| 10 | 2.039 | 453.1 | 10 | 2.029 | 419.9 |
| ค่าเฉลี่ย | | 449.6 | ค่าเฉลี่ย | | 442.9 |
| ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน | | 31.1 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน | | 26.6 |
| ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ | | 0.07 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ | | 0.06 |

4.4.4 ความแม่นยำ

เดิมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีปริมาณ 300, 1000 และ 2000 นาโนกรัม ลงในตัวอย่างเนื้อปลา (sample bank) ระดับละ 10 ครั้ง แล้วนำไปสกัดและวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟ จำนวนร้อยละการกลับคืนทั้งสามระดับได้เท่ากับ 97.8, 97.1 และ 99.8 ตามลำดับ(ตารางที่ 4.6) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เนื่องจากการเติมสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีลงไปในตัวอย่างไม่อาจจะไม่เหมือนเมทิลเมอร์คิวรีที่อยู่ในเนื้อปลาดจริง ทำให้ค่าร้อยละการกลับคืนอาจสูงกว่าความเป็นจริง ทำให้การทดสอบความถูกต้องของวิธี ด้วยวิธีร้อยละการกลับคืนไม่ใช่วิธีที่รับประกันว่าความถูกต้องของวิธีที่ดีที่สุด แต่เป็นทางเลือกหนึ่งที่ยอมรับได้ในระดับหนึ่ง

ตารางที่ 4.6 แสดงความความแม่นยำของวิธีด้วยร้อยละการกลับคืน

| ตัวอย่างที่ | ปริมาณสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีที่เติม (ng) | ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลา (ng/g)* | | | ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลาที่ตรวจพบ (ng/g)** | | | ร้อยละการคืนกลับ | | |
|-------------|---|--|--------|--------|--|--------|--------|------------------|--------|--------|
| | | ต่ำสุด | สูงสุด | เฉลี่ย | ต่ำสุด | สูงสุด | เฉลี่ย | ต่ำสุด | สูงสุด | เฉลี่ย |
| | | 1-10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - |
| 11-20 | 300 | 139.5 | 154.6 | 147.1 | 128.0 | 163.1 | 143.8 | 89.6 | 104.0 | 97.8 |
| 21-30 | 1000 | 486.4 | 510.2 | 494.2 | 448.5 | 510.0 | 480.0 | 92.4 | 102.0 | 97.1 |
| 31-40 | 2000 | 966.2 | 1025.6 | 990.4 | 975.0 | 1018.5 | 988.3 | 97.5 | 103.0 | 99.8 |

*จากการคำนวณ

**จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้

4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีที่สะสมในเนื้อปลาสดและปลาทูน่ากระป๋อง

การสะสมของเมทิลเมอร์คิวรีในปลาน้ำจืดและปลาทะเลชนิดต่างๆ มีการสะสมในปริมาณไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับอาหารที่กินและระยะเวลาของสิ่งมีชีวิตนั้น ดังนั้นจึงได้สำรวจเพื่อทราบสถานะอย่างคร่าวๆ ของการสะสมปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาที่จำหน่ายในตลาดแห่งหนึ่งในประเทศไทย ได้ผลการวิเคราะห์ตามตารางที่ 4.7 ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาสดและปลาทูน่ากระป๋องที่ตรวจมีค่าต่ำสุดคือตรวจไม่พบ จนถึงสูงสุดเท่ากับ 756.8 นาโนกรัมต่อกรัม

ปลาน้ำจืดที่นิยมบริโภคในประเทศไทย ได้แก่ ปลาช่อน ปลาดุก ปลานิล และปลาตะเพียน วิเคราะห์อย่างละ 1 ตัวอย่าง พบว่าปลาช่อนมีการสะสมเมทิลเมอร์คิวรีสูงสุดเท่ากับ คือน้อยกว่า 147.1 นาโนกรัมต่อกรัม และตรวจไม่พบการสะสมเมทิลเมอร์คิวรีในปลาชนิดอื่นๆ ที่กล่าว เนื่องจากปลาเหล่านี้มีระยะเวลาในการเลี้ยงไม่นาน ส่วนปลาช่อนเนื่องจากเป็นปลานักล่าและตัวอย่างที่นำมาตรวจมีขนาดใหญ่จึงน่าจะมีระยะเวลาในการเลี้ยงนาน ดังนั้นจึงมีการสะสมของเมทิลเมอร์คิวรีมากกว่าปลาน้ำจืดตัวอย่างอื่นๆ

ปลาทะเลที่นิยมบริโภคในประเทศไทย จากตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์พบว่าปลาเก๋ามีการสะสมของเมทิลเมอร์คิวรีสูงสุดเท่ากับ 756.8 นาโนกรัมต่อกรัม (ภาคผนวก จ.) ส่วนปลาทูเป็นปลาทะเลชนิดเดียวที่ตรวจไม่พบการสะสมของเมทิลเมอร์คิวรี และเมื่อเรียงลำดับการสะสมจากมากไปน้อย จะจัดเรียงได้ดังนี้ ปลาเก๋ ปลาทูน่า ปลาริวกิว ปลาซาบะ ปลาชันมะ ปลาหมึก ปลาแซลมอน และปลาทู เหตุผลการสะสมน่าจะเหมือนกับในปลาน้ำจืด

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปลาน้ำจืดและปลาทะเลพบว่าปลาทะเลมีการสะสมมากกว่าปลาน้ำจืดมาก อาจเป็นเพราะในทะเลเป็นแหล่งรวมของแร่ธาตุและสารต่างๆ และอายุของปลาที่จับมาบริโภคอาจจะมากกว่า และเมื่อคำนวณร้อยละของปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีต่อโปรตีนทั้งหมดในเนื้อ

ปลาสดและปลาทูน่ากระป๋อง จะเท่ากับ 86.8 และ 72.8 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งบ่งชี้ว่าเมทิลเมอร์คิวรีสูญเสียไปเมื่อผ่านการให้ความร้อนในขบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง แต่ไม่สามารถบ่งชี้ได้ในงานวิจัยนี้ว่าความสูญเสียนี้เป็นการระเหยไปของเมทิลเมอร์คิวรีหรือเปลี่ยนไปเป็นปรอทในรูปสารประกอบอื่น

ข้อกำหนดปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาของประเทศสหรัฐอเมริกาเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(หรือเท่ากับ 1,000 นาโนกรัมต่อกรัม) ยกเว้นปลานักล่ามีข้อกำหนดเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(หรือเท่ากับ 2,000 นาโนกรัมต่อกรัม) [3] ดังนั้นตัวอย่างปลาทั้งหมดที่ตรวจในงานวิจัยนี้จึงมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ตารางที่ 4.7 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาสดและปลาทูน่ากระป๋อง

| ตัวอย่าง | จำนวน | ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีเฉลี่ย (นาโนกรัมต่อกรัม) |
|-----------------|-------|--|
| ปลาน้ำจืด | | |
| ปลานิล | 1 | ไม่พบ |
| ปลาคู | 1 | ไม่พบ |
| ปลาช่อน | 1 | น้อยกว่า 147.1 |
| ปลาหับทิม | 1 | ไม่พบ |
| ปลาทะเล | | |
| ปลาทู | 3 | ไม่พบ |
| ปลาทูน่า | 6 | 182 |
| ปลาเก๋า | 3 | 585.2 |
| ปลาชახะ | 4 | น้อยกว่า 147.1 |
| ปลาแซลมอน | 2 | ไม่พบ |
| ปลาริวกิว | 4 | 219.1 |
| ปลากระพงแดง | 1 | น้อยกว่า 147.1 |
| ปลาหมึกสาย | 1 | น้อยกว่า 147.1 |
| ปลาทูน่ากระป๋อง | 10 | 33.8 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีเชิงปริมาณในปลาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (HPLC - UV detector) งานวิจัยนี้มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็ว สารเคมี เครื่องแก้ว อุปกรณ์และเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงมีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการทั่วไป ไม่ต้องลงทุนเพิ่มในส่วนนี้อีกมากนัก นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้วันละประมาณ 40 ตัวอย่าง โดยฉีดสารละลายตัวอย่างค้างคืน และนำผลมาประมวลได้ในรุ่งขึ้น

การตรวจวิเคราะห์สารละลายเมทิลเมอร์คิวรีโดยตรงด้วยเครื่อง HPLC-UV detector เป็นไปไม่ได้เนื่องจากเมทิลเมอร์คิวรีไม่ดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต ดังนั้นจึงต้องทำปฏิกิริยากับสารชนิดอื่นก่อน สารที่เลือกในงานวิจัยนี้คือไดไทโชน ปฏิกิริยาระหว่างเมทิลเมอร์คิวรีกับไดไทโชนจะเกิดเป็นเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดไทโชนซึ่งเป็นสารประกอบที่ดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีได้ด้วยเครื่อง HPLC-UV detector

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลา คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำเข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และให้ความร้อนด้วยการต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที ปรับพีเอชของสารละลายสกัดให้เป็น 4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเฟสของแข็งสกัด (C18 Sep-Pak cartridge) ที่ดูดซับสารประกอบเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดไทโชนไว้ที่อนุภาค เซลล์สารประกอบเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดไทโชนด้วยเมทานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตร

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เมื่อใช้คอลัมน์แบบเฟสผันกลับ(reversed phase)สามารถแยกสารประกอบเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดไทโชนออกจากสารรบกวนที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่างได้ คอลัมน์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ ODS - 2 Hypersil เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเตตราไฮโดรฟูแรนผสมเมทานอลผสมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตด-กรดอะซิติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซิติกแอซิดเข้มข้น 166 ไมโครโมลาร์ อัตราส่วนเท่ากับ 3.5 ต่อ 3.5 ต่อ 3 การชะเป็นแบบไอโซเครติก อัตราการไหลเท่ากับ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร พบว่าพีคของสารประกอบเมทิลเมอร์คิวรี(II)ไดไทโชนจะปรากฏที่เวลาประมาณ 6.9 - 7.3 นาที

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เมทิลเมอร์คิวรีเชิงปริมาณในปลาที่พัฒนาขึ้น

นี้เป็นการปฏิบัติโดยใช้ห้องปฏิบัติการเดียวและบุคคลเดียว ได้คำชี้แจงจำกัดการตรวจพบและเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 21.9 นาโนกรัมต่อกรัม และ 147.1 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คือ 100 – 900 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R^2) มากกว่า 0.999 เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีลงในตัวอย่างเนื้อปลาให้มีระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 147.1 ถึง 8290.2 นาโนกรัมต่อกรัม (ppb) พบว่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 80.4 – 105 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 10 จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปลากระเบน พบว่ามีการทวนซ้ำได้ (repeatability) ภายในวันเดียวมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 6.9 และการทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility) จากการวิเคราะห์ต่างวันกันมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 8.2 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งสองกลุ่มทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ประเมินความความแม่นยำโดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 147.1, 494.2 และ 990.4 นาโนกรัมต่อกรัม พบว่าร้อยละการกลับคืนมีค่าเท่ากับ 97.8, 97.1 และ 99.8 ตามลำดับ

วิเคราะห์การสะสมของเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลาน้ำจืด ปลาทะเล และปลาทUNA กระป๋อง จำนวน 35 ตัวอย่าง พบว่าระดับเมทิลเมอร์คิวรีในตัวอย่างจะอยู่ระหว่างตรวจไม่พบถึง 756.8 นาโนกรัมต่อกรัม เมื่อจำแนกตามประเภทของปลาพบว่าปลาน้ำจืดส่วนใหญ่ตรวจไม่พบ และปลาทะเลมีทั้งที่ตรวจพบและไม่พบ ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ปลาเก๋ามีการสะสมเมทิลเมอร์คิวรีสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 585.2 นาโนกรัมต่อกรัม ส่วนปลาทUNA สดและปลาทUNA กระป๋องพบว่ามี การสะสมแต่ไม่เกินข้อกำหนดของประเทศสหรัฐอเมริกา และปลาทูซึ่งนิยมบริโภคมากที่สุดในประเทศไทย ตรวจไม่พบว่ามี การสะสมของเมทิลเมอร์คิวรี

5.2 ข้อเสนอแนะ

การเพิ่มพื้นที่หน้าตัดของ cartridge ในเฟสของแข็งสกัด แต่ใช้ปริมาณอนุภาคเท่าเดิม หรือมากกว่าเดิมเล็กน้อย จะสามารถลดเวลาในการสกัดเพื่อลดขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณได้ สามารถลดการใช้เมทานอลที่เป็นสารชะออกได้ด้วย และยังสามารถใช้ตัวอย่างที่มากขึ้นด้วย หรือการเพิ่มขนาดอนุภาคที่บรรจุในเฟสของแข็งสกัดก็เป็นทางเลือกหนึ่งในการลดเวลาการสกัด และการศึกษาหาสารประกอบที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเมทิลเมอร์คิวรีได้สารประกอบชนิดใหม่ที่มีความสามารถในการดูดกลืนแสงก็เป็นหัวข้อหนึ่งที่น่าสนใจ

เอกสารอ้างอิง

- [1] U.S. Food and Drug Administration, "FDA announce advisory on methylmercury in fish", [online], Available :
<http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2001/ANS01065.html>.
- [2] U.S. Environmental Protection Agency, "What you need to know about mercury in fish and shellfish", [online], Available :
<http://www.epa.gov/waterscience/fishadvice/advice.html>
- [3] EUROPA press releases, "Environment: commission propose ban on Eu mercury export", [online], Available :
<http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/06/1481&format=HTML&aged=1&language=EN&guiLanguage=en>
- [4] U.S. Environmental Protection Agency, "Methylmercury (MeHg) (CASRN 22967-92-6)", [online], Available :
<http://www.epa.gov/iris/subst/0073.htm>
- [5] European Food Safety Authority, "Opinion of the CONTAM panel related to mercury and methylmercury in food", [online], Available :
http://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam_opinions/259.html
- [6] United nations environment programme, "Mercury Programme", [online], Available :
<http://www.chem.unep.ch/mercury/Report/JECFA-PTWI.htm>
- [7] Environment & safety online, "Mercury/methylmercury", [Online], Available:
<http://www.ehso.com/ehshome/MedicalMethylHg.htm>
- [8] Dralf Wisconsin mercury sourcebook: chemical, "Mercury use: chemical manufacturer user", [Online], Available:
<http://www.epa.gov/glnpo/bnsdocs/hgsbook/chemical.pdf>
- [9] Thomas R Dulski, "A manual for the chemical analysis of metal", Ann Arbor, MI,1996.
- [10] Babara Paci and Jean-Michel Nunzi, "Picosecond anisotropy of the transient absorption of the photochromic mercury dithizone complex in solution", [Online], Available:
http://www.photobiology_com-photoiupac2000-petkov-Image270_gif.htm
- [11] วชิร ชาติกิตติคุณวงศ์, "โครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง", สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2542.

- [12] วัชรารักษ์ สิริพัฒน์ไพบุลย์, คู่มือการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “Instrumental analysis of food (HPLC)”, กรมวิทยาศาสตร์แพทย, 2539.
- [13] Nigel J.K.Simpson. “Solid-Phase extraction principles, Technical : and Application”, Marcel Dekker Inc., New York , 2000.
- [14] Guide to solid phase extraction[Online], Available:
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- [15] Sigma Aldrich, “An overview of SPE” [Online], Available:
http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Analytical_Chromatography/Sample_Preparation/SPE/SPE_Overview.html
- [16] Hong Wu, Yan Bin, Qiang Miao and Shuping, “Non-chromatographic speciation analysis of mercury by flow injection on-line preconcentration in combination with chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry”, *Spectrochimica Acta Part B*, Vol.61, 2006, pp.831-840.
- [17] Chun-Mao Tseng, Chad R. Hammerschidt and William F. Fitzgerrald, “Determination of methylmercury in environmental matrixes by on-line flow injection and atomic fluorescence spectrometry”, *Anal. Chem.* Vol.76, 2004, pp. 7131 – 7136.
- [18] George A. Zachariadis, Artimidis N. Anthermidis, Emmanouil I.Daftsis and John A.Stratis, “On-line speciation of mercury and methylmercury by cold vapour atomic absorption spectrometry using selective solid phase extraction”, *J. Anal. At. Spectrom.*, Vol.20, 2005, pp.63-65.
- [19] Xiu-Ping, Yan Li and Yan Jiang, “Selective measurement of ultratrace methylmercury in fish by flow injection on-line microcolumn displacement sorption preconcentration and separation coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry”, *Anal. Chem.*, Vol.75, 2003, pp. 2251-2255.
- [20] F. Ubilus, A. Aligria, R. Barbera, R. Farre and M. J. Lagarda, “ Methylmercury and inorganic mercury determination in fish by cold vapour generation atomic absorption spectrometry”, *Food Chemistry*, Vol.71, 2000, pp. 529 – 533.
- [21] Lu Yang, Venessa Colombini, Paulette Maxwell, Zoltan Mester and Ralp E. Sturgeon, “Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1011, 2003, pp.135-142.

- [22] I. Gelaude, R. Dams, M. Resano, F. Vanhaecke and L. Moens, "Direct determination of methylmercury and inorganic mercury in biological material by solid sampling-electrothermal vaporization inductively coupled plasma-isotope dilution-mass spectrometry", *Anal. Chem.*, Vol.74, 2002, pp. 3833-3842.
- [23] E. Ramalhosa, S. Rio Segade, E. Pereira, C. Vale and A. Duarte, "Simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high-performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry", *Analitica Chimica Acta*, Vol.448, 2001, pp.135-143.
- [24] Shubo Han, Min Zhu, Zhuobin Yuan and Xin Li, "A methylene blue-mediated enzyme electrode for the determination of trace mercury(II), mercury(I), methylmercury, and mercury-glutathione complex", *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.16, 2001, pp.9-16.
- [25] Sifje Slaets and Fleddy C. Adams, "Determination organomercury compounds with a miniaturized automated speciation analyzer", *Analitica Chimica Acta*, Vol.414, 2000, pp.141-149.
- [26] S. Rio-Segade and C. Bendicho, "On-line high-performance liquid-chromatographic separation and cold vapor atomic absorption spectrometric determination of methylmercury and inorganic mercury", *Talanta*, Vol.48, 1999, pp.477-484.
- [27] Susana Rio-Segade and Carlos Bendicho, "Ultrasound-assisted extraction for speciation by the flow injection-cold vapor technique", *J. Anal. At. Spectrom.*, Vol.14, 1999, pp.263-268.
- [28] D. M. Sanchez, R. Martin, R. Morante, J. Marin and M. L. Munuera, "Preconcentration speciation method for mercury compounds in water samples using solid phase extraction followed by reverse phase high performance liquid chromatography", *Talanta*, Vol.52, 2000, pp. 671-679.
- [29] R. Wagemann, E. Trebacz, G. Boila and W. L. Lockhart, "Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals", *The Science of the Total Environment*, Vol.218, 1998, pp.19-31.
- [30] Ralf Fischer, Spyridon Rapsomanikis and Meinrat O. Andreae, "Determination of methylmercury in fish samples using GC/AA and sodiumtetraethylborate derivatization", *Anal. Chem.* Vol. 64, 1993, pp.763-766.
- [31] William Horwitz (editor), "AOAC official method 983.20 : Mercury(methyl) in fish and shellfish", *Official methods of analysis of AOAC international*(17th Edit.), 2005.

- [32] ทิพวรรณ นิ่งน้อย, “แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว”ม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข, 2549.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

การยืนยันความเป็นเส้นตรงด้วย Mandel's fitting test

Mandel's fitting test คือ การทวนสอบความเป็นเส้นตรง เป็นวิธีการคณิตศาสตร์ ดังนี้
 สมการเส้นตรง หรือ the first order calibration function : $y = a + bx$ และ
 สมการยกกำลังสอง หรือ the second order calibration function : $y = a + bx + cx^2$
 เมื่อหาความแตกต่างของความแปรปรวน (DS^2) ของสมการทั้งสองที่กล่าวมา จากสูตร

$$DS^2 = (N - 2) s_{y_1}^2 - (N - 3) s_{y_2}^2 \text{ ด้วยองศาความอิสระ } f = 1 \quad (\text{ก.1})$$

เมื่อ $s_{y_1}^2$ คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน residual จากสมการเส้นตรง

$s_{y_2}^2$ คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน residual จากสมการยกกำลังสอง

ค่าทดสอบ (testing value, TV) เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณดังนี้

$$TV = DS^2 / s_{y_2}^2 \quad (\text{ก.2})$$

นำค่าทดสอบที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับค่า F ($f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99\%$) จากตาราง

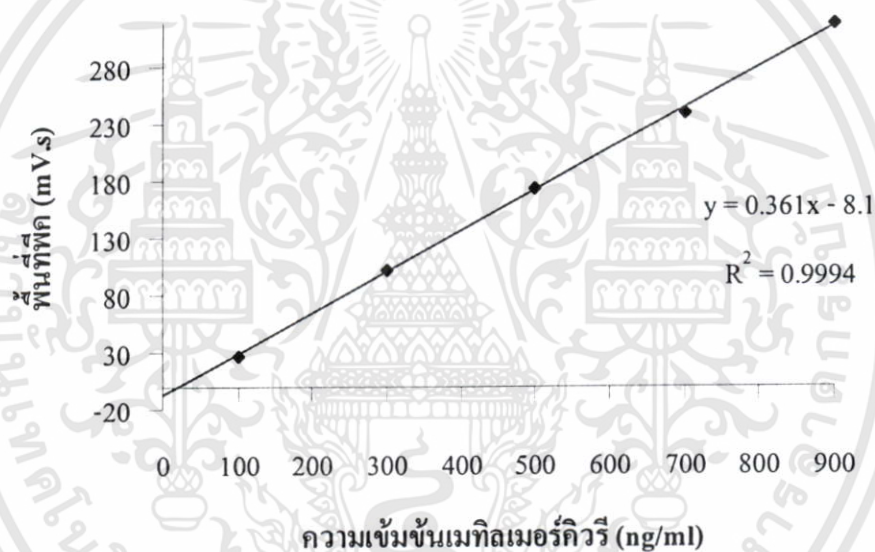
ถ้า $TV \leq F$ ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่าง x และ y มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง ไม่

จำเป็นต้องใช้สมการยกกำลังสอง

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยการนำสารละลายมาตรฐาน 5
 ระดับความเข้มข้น คือ 100 – 900 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ข้อ 4.1) โดยวิเคราะห์ระดับละ 5 ซ้ำ ต่าง
 วันกัน นำผลการทดสอบที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานโดยแสดงความสัมพันธ์กันระหว่างพื้นที่
 ฟิค (แกน y) และความเข้มข้นของเมทิลเมอร์คิวรี (แกน x) (ตารางที่ ก.1 และ รูปที่ ก.1) และ
 ทดสอบความเป็นเส้นตรงของสมการด้วย Mandel's fitting test พบว่าค่าทดสอบที่คำนวณได้เท่ากับ
 -0.90 ซึ่งน้อยกว่า ค่า F ($f_1 = 1, f_2 = 2, P = 99\%$) จากตารางที่เท่ากับ 98.50 แสดงว่าความสัมพันธ์
 ระหว่างพื้นที่ฟิคและความเข้มข้นของเมทิลเมอร์คิวรีมีความเป็นเส้นตรง

ตาราง ก.1 แสดงพื้นที่ที่พิกและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี

| ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี (ng/ml) | พื้นที่ที่พิก (mV.s) | | | | | เฉลี่ย |
|--|----------------------|------------|------------|------------|------------|--------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ครั้งที่ 4 | ครั้งที่ 5 | |
| 100 | 27 | 26 | 25 | 31 | 28 | 27 |
| 300 | 102 | 96 | 101 | 106 | 95 | 102 |
| 500 | 174 | 165 | 178 | 178 | 180 | 174 |
| 700 | 240 | 228 | 239 | 249 | 250 | 240 |
| 900 | 319 | 313 | 327 | 318 | 329 | 319 |



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวัดเมทิลเมอร์คิวรีด้วย เครื่อง HPLC – UV detector

วิธีการศึกษา คือ เตรียมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีที่ความเข้มข้นต่ำๆ ฉีดเข้า
เข้าเครื่อง HPLC – UV detector จำนวน 5 วัน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่ทุกครั้ง ผลการ
ทดสอบแสดงในตาราง ข.1 ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มี
ค่ามากกว่าร้อยละ 20 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับไม่ได้ ซึ่งแสดงถึงข้อมูลมีความแปรปรวนมาก และเมื่อ
เพิ่มความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมากกว่า 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเบี่ยงเบน
มาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 10 ซึ่งเป็นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตาราง ข.1 แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่พีคของ
สารละลายสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีความเข้มข้นต่ำๆ

| ความเข้มข้นสารละลาย มาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรี (ng/ml) | พื้นที่พีค (mV.s) | | | | | SD | %RSD |
|--|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----|------|
| | ครั้งที่1 | ครั้งที่2 | ครั้งที่3 | ครั้งที่4 | ครั้งที่5 | | |
| 50 | 12 | 10 | 7 | 9 | 5 | 2.7 | 31.4 |
| 100 | 23 | 20 | 23 | 22 | 23 | 1.9 | 8.5 |
| 200 | 52 | 47 | 50 | 51 | 52 | 3.5 | 6.8 |
| 400 | 110 | 103 | 105 | 108 | 107 | 7.9 | 7.2 |
| 600 | 165 | 155 | 162 | 160 | 163 | 7.4 | 4.5 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

แสดงข้อมูลเพื่อยืนยันขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณของวิธี

ในงานวิจัยนี้ขีดจำกัดการตรวจพบคำนวณจากสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของตัวอย่างที่ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ ได้จากการทดลองเติมสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีปริมาณ 300 นาโนกรัม ลงในตัวอย่างปลาที่ไม่มีเมทิลเมอร์คิวรี (ตัวอย่างที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดแล้วตรวจไม่พบ) จำนวน 10 ซ้ำ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ ก.1 ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 147.1 นาโนกรัมต่อกรัม และขีดจำกัดการตรวจพบเท่ากับ 21.9 นาโนกรัมต่อกรัม

ตารางที่ ก.1 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทดสอบขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ

| ตัวอย่างที่ | น้ำหนัก(g) | ปริมาณสารมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีที่เติม (ng) | ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลา (ng/g)* | ความเข้มข้นเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลา (ng/g)** | ร้อยละการกลับคืน |
|-------------|------------|---|--|---|------------------|
| 1 | 2.01 | 0 | 0 | 0 | - |
| 2 | 2.06 | 0 | 0 | 0 | - |
| 3 | 2.02 | 0 | 0 | 0 | - |
| 4 | 2.10 | 0 | 0 | 0 | - |
| 5 | 2.00 | 0 | 0 | 0 | - |
| 6 | 2.04 | 0 | 0 | 0 | - |
| 7 | 2.05 | 0 | 0 | 0 | - |
| 8 | 2.00 | 0 | 0 | 0 | - |
| 10 | 2.10 | 0 | 0 | 0 | - |
| 11 | 1.94 | 300 | 154.6 | 152.5 | 98.6 |
| 12 | 1.99 | 300 | 150.8 | 142.6 | 94.6 |
| 13 | 2.00 | 300 | 150.0 | 145.8 | 97.2 |
| 14 | 2.12 | 300 | 141.5 | 139.8 | 98.8 |
| 15 | 2.10 | 300 | 142.9 | 128.0 | 89.6 |
| 16 | 1.94 | 300 | 154.6 | 153.1 | 99.0 |
| 17 | 2.06 | 300 | 145.6 | 143.6 | 98.6 |
| 18 | 2.10 | 300 | 142.9 | 148.0 | 104 |
| 19 | 2.02 | 300 | 148.5 | 139.0 | 93.6 |
| 20 | 2.15 | 300 | 139.5 | 146.0 | 105 |
| เฉลี่ย = | | | 147.1 | 143.8 | 97.8 |
| | | | SD = | 7.29 | |
| | | | 3SD = | 21.9 | |

*จากการคำนวณ

** จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

ความเที่ยงและความแม่นยำ

ง.1 ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงของการวิเคราะห์ ซึ่งบ่งด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่ม และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างข้อมูลสองกลุ่มที่วิเคราะห์ต่างวันกัน แล้วเปรียบเทียบว่ามีความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งสองกลุ่มหรือไม่ โดยใช้ t - test โดยตั้งสมมติฐานว่าความแปรปรวนของข้อมูลทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน เนื่องจากใช้วิธีวิเคราะห์วิธีเดียวกัน ผลที่ได้แสดงในตารางที่ ง.1 จากการทดสอบทางสถิติข้อมูลทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน

ตาราง ง.1 แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละกลุ่มในตัวอย่างที่ทำพร้อมกัน (SD_{w1}) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มข้อมูลที่ทำต่างวันกัน (SD_{w2})

| วิเคราะห์ครั้งที่ 1 (กลุ่มที่ 1) | | วิเคราะห์ครั้งที่ 2 (กลุ่มที่ 2) | |
|---|------------------------------|---|------------------------------|
| ตัวอย่างที่ | ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรี (ng/g) | ตัวอย่างที่ | ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรี (ng/g) |
| 1 | 471.3 | 1 | 450.1 |
| 2 | 428.3 | 2 | 404.0 |
| 3 | 467.8 | 3 | 462.6 |
| 4 | 466.7 | 4 | 455.3 |
| 5 | 381.7 | 5 | 400 |
| 6 | 478.5 | 6 | 454.8 |
| 7 | 418.3 | 7 | 482.6 |
| 8 | 454.7 | 8 | 455.4 |
| 9 | 476.1 | 9 | 444.3 |
| 10 | 453.2 | 10 | 420.0 |
| ค่าเฉลี่ย (mean) | 449.7 | ค่าเฉลี่ย (mean) | 442.9 |
| ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD_{w1}) | 31.1 | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD_{w2}) | 26.6 |
| %ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ($\%RSD_{w1}$) | 6.9 | %ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ($\%RSD_{w2}$) | 6.0 |

ตาราง ง.2 แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐาน Codex และ AOAC

| ความเข้มข้นของสารที่สนใจ | Horwitz %RSD | AOAC PVM %RSD |
|--------------------------|--------------|---------------|
| 100% | 2 | 1.3 |
| 10% | 2.8 | 2.8 |
| 1% | 4 | 2.7 |
| 0.1% | 5.7 | 3.7 |
| 100 ppm | 8 | 5.3 |
| 10 ppm | 11.3 | 7.3 |
| 1 ppm | 16 | 11 |
| 100 ppb | 22.6 | 15 |
| 10 ppb | 32 | 21 |
| 1 ppb | 45.3 | 30 |

ง. 2 ความแม่นยำ(Accuracy)

ในงานวิจัยนี้ความแม่นยำของการวิเคราะห์ แสดงในรูปร้อยละการกลับคืน โดยเติมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีที่ทราบค่าที่แน่นอนลงไปในตัวอย่างไม่อย่างปลาที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานและเติมสารละลายมาตรฐาน ไปผ่านขั้นตอนทุกขั้นตอนของการวิเคราะห์ จากนั้นนำข้อมูลมาประมวลผล ผลที่ได้แสดงในตาราง ง.3

ตาราง ง. 3 แสดงร้อยละการกลับคืนเมื่อเติมสารละลายมาตรฐานเมทิลเมอร์คิวรีปริมาณ 300 นาโนกรัม ลงในตัวอย่างเนื้อปลาสด

| ตัวอย่างที่ | น้ำหนัก (กรัม) | ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีที่เติม (ng) | ความเข้มข้นของเมทิลเมอร์คิวรีที่เติมในเนื้อปลา (ng/g)* | ความเข้มข้นของเมทิลเมอร์คิวรีในเนื้อปลาที่ได้จากการวิเคราะห์ (ng/g)** | ร้อยละการกลับคืน |
|-------------|----------------|-----------------------------------|--|---|------------------|
| 1 | 2.01 | 0 | 0 | 0 | |
| 2 | 2.04 | 0 | 0 | 0 | |
| 3 | 2.03 | 0 | 0 | 0 | |
| 4 | 1.94 | 300 | 154.6 | 152.5 | 98.6 |
| 5 | 1.99 | 300 | 150.8 | 142.6 | 94.6 |
| 6 | 2.00 | 300 | 150.0 | 145.8 | 97.2 |
| 7 | 2.12 | 300 | 141.5 | 139.8 | 98.8 |
| 8 | 2.10 | 300 | 142.9 | 128.0 | 89.6 |
| 9 | 1.94 | 300 | 154.6 | 153.1 | 99.0 |
| 10 | 2.06 | 300 | 145.6 | 143.6 | 98.6 |
| 11 | 2.10 | 300 | 142.8 | 148.0 | 104.0 |
| 12 | 2.02 | 300 | 148.5 | 139.0 | 93.6 |
| 13 | 2.15 | 300 | 139.5 | 146.0 | 105.0 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีในปลาสด และปลาทูน่ากระป๋อง

จ.1 ปลาทะเล

ตารางที่ จ.1 ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีและปรอททั้งหมดในปลาทะเลที่นิยมบริโภคในประเทศไทย

| ปลาทะเล | ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรี (นาโนกรัมต่อกรัม) | ปริมาณปรอททั้งหมด (นาโนกรัมต่อกรัม)* |
|----------------|--|---|
| ปลาทู No.1 | ตรวจไม่พบ | ตรวจไม่พบ |
| ปลาทู No.2 | ตรวจไม่พบ | ตรวจไม่พบ |
| ปลาทู No.3 | ตรวจไม่พบ | ตรวจไม่พบ |
| ปลาทูน่า No.1 | ไม่พบ | 32 |
| ปลาทูน่า No.2 | 551.5 | 728 |
| ปลาทูน่า No.3 | 364.9 | 375 |
| ปลาทูน่า No.4 | น้อยกว่า 147.1 | 189 |
| ปลาทูน่า No.5 | ไม่พบ | น้อยกว่า 12 |
| ปลาทูน่า No.6 | 175.8 | 179 |
| ปลาเก๋า No.1 | 703.3 | 920 |
| ปลาเก๋า No.2 | 756.8 | 844 |
| ปลาเก๋า No.3 | 295.4 | 326 |
| ปลาชား No.1 | น้อยกว่า 147.1 | 108 |
| ปลาชား No.2 | น้อยกว่า 147.1 | 159 |
| ปลาชား No.3 | น้อยกว่า 147.1 | 130 |
| ปลาชား No.4 | น้อยกว่า 147.1 | 122 |
| ปลาแซลมอน No.1 | ตรวจไม่พบ | 20 |
| ปลาแซลมอน No.2 | ตรวจไม่พบ | 24 |
| ปลาริวกิว | 219.1 | 274 |
| ปลากระพงแดง | น้อยกว่า 147.1 | 77 |
| ปลาหมึกสาย | น้อยกว่า 147.1 | 24 |

*ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอท (Mercury analyzer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.2 ปลาน้ำจืด

ตารางที่ จ.2 ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีและปรอททั้งหมดในปลาน้ำจืดที่นิยมบริโภคในประเทศไทย

| ตัวอย่าง | ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรี (นาโนกรัมต่อกรัม) | ปริมาณปรอททั้งหมด (นาโนกรัมต่อกรัม)* |
|-----------|--|---|
| ปลานิล | ตรวจไม่พบ | ตรวจไม่พบ |
| ปลาคู | ตรวจไม่พบ | ตรวจไม่พบ |
| ปลาช่อน | น้อยกว่า 147.1 | 40 |
| ปลาทับทิม | ตรวจไม่พบ | น้อยกว่า 12 |

*ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอท (Mercury analyzer)

จ.3 ปลาหูน้ำกระป๋อง

ตารางที่ จ.3 ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรีและปรอททั้งหมดในปลาหูน้ำกระป๋อง

| ตรา | ปริมาณเมทิลเมอร์คิวรี (นาโนกรัมต่อกรัม) | ปริมาณปรอททั้งหมด (นาโนกรัมต่อกรัม)* |
|-----|--|---|
| 1 | น้อยกว่า 147.1 | 93 |
| 2 | 156.0 | 210 |
| 3 | น้อยกว่า 147.1 | 34 |
| 4 | น้อยกว่า 147.1 | 65 |
| 5 | น้อยกว่า 147.1 | 59 |
| 6 | น้อยกว่า 147.1 | 101 |
| 7 | 182.0 | 254 |
| 8 | ตรวจไม่พบ | 82 |
| 9 | ตรวจไม่พบ | 61 |
| 10 | ตรวจไม่พบ | 82 |

*ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอท (Mercury analyzer)

ประวัติผู้เขียน

| | |
|----------------------|--|
| ชื่อ – นามสกุล | นายสุพัฒน์ แสงสวຍ |
| วัน เดือน ปีเกิด | 7 พฤษภาคม พ.ศ. 2515 ที่จังหวัดสุรินทร์ |
| ที่อยู่ | 423 ซอยศรีสุข(ลาดพร้าว 34) แขวงสามเสนนอก เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร |
| ประวัติการศึกษา | 2540 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยรามคำแหง |
| ประสบการณ์ทำงาน | |
| พ.ศ. 2541 – ปัจจุบัน | รับราชการ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข |
| ผลงานวิจัย | <ol style="list-style-type: none"> 1. ผู้ร่วมวิจัยเรื่อง “แคดเมียมในอาหารทะเล ระหว่างปีพ.ศ. 2538 – 2548” วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 49 ฉบับที่ 1 พ.ศ.2550 2. ผู้ร่วมวิจัยเรื่อง “การปนเปื้อนปรอทในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ระหว่างปีพ.ศ. 2543 – 2548” ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์. |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้