การวิเคราะห์สารระเหยไฮโดรคาร์บอนในอาหารทะเลแช่แข็งโดยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี

Analysis of Volatile Hydrocarbon Compounds in Frozen Seafood by Gas Chromatography

ปาริฉัตร สุขเพ็ง

Parichat Sukpeng

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Analytical Chemistry

Prince of Songkla University

2544

ว
QD305.H9 ป164 2544 ฉ.2
Key 217059
28 ก.ค. 2547

ชื่อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์สารระเหยไฮโดรคาร์บอนในอาหารทะเลแช่แข็งโดยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี
ผู้เขียน	นางปาริฉัตร สุขเพ็ง
สาขาวิชา	เคมีวิเคราะห์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปณต ถาวรังกูร)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปณต ถาวรังกูร)

.....กรรมการ
(อาจารย์ดร.อุดม จริงจิตร)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ลือพงศ์ แก้วศรีจันทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์สารระเหยไฮโดรคาร์บอนในอาหารทะเลแช่แข็งโดยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี
ผู้เขียน	นางปาริฉัตร สุขเพ็ง
สาขาวิชา	เคมีวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์สารระเหยไฮโดรคาร์บอนในอาหารทะเลแช่แข็งคือ ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนด้วยเทคนิคเฮดสเปซแก๊สโครมาโทกราฟี สามารถทำได้โดยใช้เฟสอยู่กับที่ชนิดของแข็งและของเหลว ซึ่งในที่นี้ใช้ โครโมซอร์บ 103 (Chromosorb 103) ขนาด 80/100 เมช และ 4% คาร์โบแวกซ์ 20 เอ็ม /0.8% โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ บน คาร์โบแพกบี (4%Carbowax 20M /0.8% KOH on CarbopackB) ขนาด60/80 เมช ตามลำดับ ในการแยกด้วยคอลัมน์ยาว 2 ม.× 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) ผลการศึกษาพบว่าคอลัมน์ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช สภาวะการทดลองที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิคอลัมน์ อุณหภูมิหัวฉีด / อุณหภูมิตัวตรวจวัด 120 และ 170 องศาเซลเซียสตามลำดับ อัตราเร็วแก๊สพา (ไนโตรเจน) 20 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ตัวตรวจวัดเป็นชนิดเฟลมไอออนไนเซชั่น จากการศึกษาพบว่า สำหรับไดเมธิลเอมีนมีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 1.5 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร การตอบสนองเป็นเชิงเส้นตั้งแต่ 3×10^{-1} ถึง 3×10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ในกรณีของไตรเมธิลเอมีนพบว่า ขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ที่ 2.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร และการตอบสนองเชิงเส้นในช่วง 1.4×10^{-2} ถึง 1.4×10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร เมื่อใช้คอลัมน์ขนาด 2 ม.× 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) โดยใช้ 4% Carbowax 20M / 0.8% โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่ สภาวะการทดลองที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิคอลัมน์ อุณหภูมิหัวฉีด / อุณหภูมิตัวตรวจวัดที่ 75 และ 110 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อัตราเร็วแก๊สพา (ไนโตรเจน) 20 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิด

เฟลมไอออนไนเซชั่น พบว่า สำหรับไดเมธิลเอมีน มีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ 0.17 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร การตอบสนองเชิงเส้นตั้งแต่ 3×10^{-1} ถึง 3×10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ในกรณีของไตรเมธิลเอมีนพบว่า ขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ที่ 0.16 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร การตอบสนองเชิงเส้นตั้งแต่ 1.4×10^{-2} ถึง 1.4×10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ทั้งนี้ต้องเลือกใช้อุณหภูมิเตรียมเฮดสเปซ อัตราส่วนเฟสและความเข้มข้นของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม

ในการศึกษาปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างอาหารทะเลที่เก็บรักษาที่สองสภาวะต่างกันคือ ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้คอลัมน์ยาว 2 ม.× 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) 4% Carbowax 20M /0.8% โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่ พบว่า มีปริมาณไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมากกว่า แสดงว่า อุณหภูมิการเก็บรักษามีผลต่อการเน่าเสียของตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างด้วยเฟสอยู่กับที่ทั้งสองชนิด โดยใช้สภาวะการทดลองที่ศึกษาพบว่า เมื่อเฟสอยู่กับที่ชนิด 4% Carbowax 20M /0.8% โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช ปริมาณไดเมธิลเอมีนอยู่ระหว่าง ไม่พบ ถึง 3.9 ไมโครกรัม-ไนโตรเจนต่อกรัม เมื่อใช้ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่ ปริมาณไดเมธิลเอมีนอยู่ระหว่างไม่พบ ถึง 9.9 ไมโครกรัม-ไนโตรเจนต่อกรัม สำหรับไตรเมธิลเอมีนตรวจพบน้อยมากคือ อยู่ระหว่าง ไม่พบถึง 0.3 ไมโครกรัม-ไนโตรเจนต่อกรัม เมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ทั้งสองชนิด

จากการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ โดยเทคนิคการเพิ่มความเข้มข้นของไอระเหยไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีนบนตัวดูดซับชนิด ซิลิกา เจล 40 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเฮดสเปซแก๊สโครมาโทกราฟีได้ พบว่าสามารถจะใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนได้ แต่จะต้องปรับปรุงและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ต่อไปเพื่อให้สามารถวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณไปพร้อมกัน

Thesis Title	Analysis of Volatile Hydrocarbon Compounds in Frozen Seafood by Gas Chromatography
Author	Ms.Parichat Sukpeng
Major Program	Analytical Chemistry
Academic Year	2001

Abstract

Dimethylamine and trimethylamine were analyzed by Headspace GSC and GLC techniques. Chromosorb 103, 80/100 mesh was used as the gas- solid stationary phase, while the gas-liquid phase was 4% Carbowax 20M /0.8% KOH on Carbopack B, 60/80 mesh in 2 m × 2.6 mm (I.D) glass column . Using an FID detector the optimum column temperature of the Chromosorb 103, 80/100 mesh was 120°C, and 170°C for injector /detector temperature where the optimum carrier gas flow rate was 20 ml/min. The linearity range of dimethylamine was from 3×10^{-1} to 3×10^{2} mg-N/L and the lower detection limit was 1.5 mg-N/L. For trimethylamine, the lower detection limit was 2.4 mg-N/L and linearity was from 1.4×10^{-2} to 1.4×10^{2} mg-N/L.

Optimum temperatures when using 4% Carbowax 20M /0.8% KOH on Carbopack B, 60/80 mesh were 75°C for column and 110°C for injector / detector. The optimum flow rate was 20 ml/min with FID detector. The linearity of dimethylamine was from 3×10^{-1} to 3×10^{2} mg-N/L and the lower detection limit was 0.17 mg-N/L. For trimethylamine, the lower detection limit was 0.16 mg-N/L and linear range was from1.4×10^{-2} to 1.4×10^{2} mg-N/L. For both stationary phases it was necessary to choose the optimum headspace conditions, i.e., headspace temperature, phase ratio and quantity of potassium hydroxide.

When dimethylamine and trimethylamine in seafood that preserved at two temperatures i.e. room temperature and 4°C were determine, the trimethylamine from sample preserved at room temperature was greater than the one preserved at cool temperature (4°C). The results showed that the decomposition of samples was related to the preserving temperature. Quantity of dimethylamine was found to be between non- detectable to 3.9 ug-N/ g for 2 m × 2.6 mm (I.D.) 4% Carbowax 20M/ 0.8% KOH on Carbopack B, 60/80 mesh and non- detectable to 9.9 ug-N/g for 2 m × 2.6mm (I.D.) Chromosorb 103, 80/100 mesh. The determination of trimethylamine with the two stationary phases was very trace and the range was non-detectable to 0.3 ug-N/g.

The preliminary study on preconcentration of dimethylamine and trimethylamine was carried out using an adsorbent (silica gel 40) tube then analyzed with headspace gas chromatography. The results showed both dimethylamine and trimethylamine could be analyzed but better conditions have to be found to improve both qualitative and quantitative aspects of the analyses.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้เขียนได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร. เพริศพิชญ์ คณาธารณา อาจารย์ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร.ปณต ถาวรังกูร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาและแนะแนวทางให้ รวมถึงผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลา คุณเกริก รัตอาภา ที่กรุณาส่งเสริมให้ผู้เขียนได้มีโอกาสศึกษาต่อ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอบพระคุณคณะกรรมการควบคุมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจทาน ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่กรุณาถ่ายทอดให้ความรู้และประสบการณ์ ทำให้มีความรู้แตกฉานเชิงวิชาการ ขอบพระคุณบุคลากรภาควิชาเคมีทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการ จัดซื้อ จัดหาอุปกรณ์และสารเคมี ขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย และภาควิชาเคมีที่สนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ ขอบคุณคุณสุดชฎา ศรประสิทธิ์ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านคอมพิวเตอร์และคำแนะนำ ขอบคุณน้อง ๆ ปริญญาโทเคมีวิเคราะห์ทุกท่านที่คอยให้กำลังใจ

สุดท้ายขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว ที่สนับสนุนให้กำลังใจ ทุนทรัพย์และสละเวลาให้ได้ศึกษาเล่าเรียนเต็มที่ จนสำเร็จ

ปาริฉัตร สุขเพ็ง

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(11)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	9
วัตถุประสงค์	13
2 วิธีวิจัย	15
วัสดุ	15
อุปกรณ์	16
วิธีดำเนินการ	18
3 ผล	36
4 บทวิจารณ์	60
5 บทสรุป	77
บรรณานุกรม	80
ภาคผนวก	86
ประวัติผู้เขียน	88

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1. ตารางเปรียบเทียบข้อดี ข้อเสียของวิธีการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 วิธี	8
2. สภาวะการทดลองเพื่อศึกษาอัตราเร็วแก๊สพาที่เหมาะสมเมื่อใช้คอลัมน์ 4% Carbowax 20M/ 0.8%KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช	20
3. สภาวะการทดลองที่เหมาะสมเพื่อศึกษาอุณหภูมิเฮดสเปซที่มีประสิทธิภาพสูงสุด	22
4. สภาวะการทดลองเพื่อศึกษาอัตราส่วนเฟสที่เหมาะสม	24
5. สภาวะการทดลองเพื่อศึกษาอัตราเร็วแก๊สพาที่เหมาะสมเมื่อใช้คอลัมน์ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช	27
6. สภาวะการทดลองเมื่อใช้ 5%KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่	30
7. สภาวะการทดลองเมื่อใช้ 5%KOH/ 10% Carbowax 20M บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่	31
8. สภาวะการทดลองเมื่อใช้ 5%KOH / 2% Carbowax 20M บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมชเป็นเฟสอยู่กับที่	32
9. ตารางแสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน	36
10. ตารางแสดงอัตราเร็วของแก๊สพาและความสูงของเพลทตามทฤษฎี	37
11. ตารางแสดงผลการแยกสารละลายมาตรฐานเมื่อใช้อุณหภูมิคอลัมน์ 60- 85 องศาเซลเซียส	38
12. ตารางแสดงผลการแยกสารละลายมาตรฐานเมื่อใช้อุณหภูมิตัวตรวจวัด 110 –140 องศาเซลเซียส	39
13. ตารางแสดงสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับสัญญาณตอบสนอง สัมพัทธ์ของไดเมธิลเอมีนต่อโพรพิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนต่อโพรพิลเอมีน	44
14. ตารางแสดงค่า S_0 และขีดจำกัดการตรวจวัดของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน เมื่อใช้คอลัมน์ 4% Carbowax 20M/ 0.8%KOH on Carbopack B ขนาด 60/80 เมช	46
15. ตารางแสดงอัตราเร็วของแก๊สพาและความสูงของเพลทตามทฤษฎี	46

16. ตารางแสดงผลการแยกสารละลายมาตรฐานเมื่อใช้อุณหภูมิคอลัมน์ 120 –135 องศาเซลเซียส 48
17. ตารางแสดงผลการแยกสารละลายมาตรฐานเมื่อใช้อุณหภูมิตรวจวัด 170 –210 องศาเซลเซียส 48
18. ตารางแสดงสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับสัญญาณตอบสนองสัมพัทธ์ของไดเมธิลเอมีนต่อโพรพิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนต่อโพรพิลเอมีน 50
19. ตารางแสดงค่า S_0 และขีดจำกัดการตรวจวัดของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน 51
20. ตารางแสดงผลการศึกษาปริมาณไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและปริมาณเบสทั้งหมดที่ระเหยได้ 57

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1. แสดงกลไกการเกิดไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน	6
2. แสดงบล้อคไดอะแกรมการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นด้วยหลอดบรรจุตัวดูดซับ	34
3. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของแก๊สพากับความสูงของเพลททางทฤษฎีของไตรเมธิลเอมีนเมื่อใช้ 4% Carbowax 20M/0.8%KOH บน Carbopack B ขนาด60/80 เมชเป็นเฟสอยู่กับที่	37
4. โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน เมื่อใช้ 4% Carbowax 20M /0.8% KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่	39
5. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกของไตรเมธิลเอมีนในเฮดสเปซที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ	40
6. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกของไดมธิลเอมีนในเฮดสเปซที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ	41
7. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสกับแฟกเตอร์การตอบสนอง	42
8. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์กับแฟกเตอร์การตอบสนอง	43
9. กราฟมาตรฐานของ (ก) ไดเมธิลเอมีน และ (ข) ไตรเมธิลเอมีน	45
10. กราฟแวนดีมเตอร์ของไตรเมธิลเอมีนเมื่อใช้ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมชเป็นเฟสอยู่กับที่	47
11. โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน เมื่อใช้ Chromosorb 103 ขนาด 60/80 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่	49
12. กราฟมาตรฐานของ (ก) ไดเมธิลเอมีน และ (ข) ไตรเมธิลเอมีน เมื่อใช้ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่	51
13. โครมาโทแกรมของไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและ โพรพิลเอมีน เมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิด 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช	52

14. โครมาโทแกรมของไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและ โพรพิลเอมีน เมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิด 5% KOH/ 10% Carbowax บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช 53
15. โครมาโทแกรมของไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและ โพรพิลเอมีนเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิด 5% KOH / 5%Carbowax 20M บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช 54
16. โครมาโทแกรมของไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและ โพรพิลเอมีนเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิด 5% KOH /2%carbowax 20M บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช 55
17. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไตรเมธิลเอมีน กับระยะเวลาการเก็บที่สองสภาวะต่างกัน 56
18. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไตรเมธิลเอมีนที่วิเคราะห์ด้วย 4% Carbowax 20M/0.8%KOH on Carbopack B ขนาด60/80 เมช และ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช 58
19. โครมาโทแกรมของไตรเมธิลเอมีนเมื่อเพิ่มความเข้มข้น ด้วยหลอดบรรจุตัวดูดซับ 59
20. โครมาโทแกรมของไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างเมื่อเพิ่มความเข้มข้นด้วยหลอดบรรจุตัวดูดซับ 59
21. แสดงหลอดบรรจุตัวดูดซับ 87

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปริมาณและมูลค่าสินค้าขาออกภาคเกษตรกรรมที่เป็นสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ซึ่งรายงานโดยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในช่วงปี 2536 – 2540 (www.oae.go.th/newsinfo/yearbook/1996-97/part125.html) มีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความนิยมบริโภคของประชากร ทั้งยังสามารถนำเป็นวัตถุดิบเพื่อการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้จำหน่ายได้ทั้งในและต่างประเทศได้อีกด้วย ในการตัดสินคุณภาพอาหารทะเลโดยทั่วไปมักเลือกใช้ความสดเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญ เพราะนอกจากจะเป็นตัวแปรบ่งบอกถึงคุณภาพแล้ว ยังส่งผลถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปด้วย ในทางกลับกันแทนที่จะพิจารณาความสด อาจใช้ความเสื่อมสภาพของอาหารนั้นเป็นตัวชี้วัดแทนได้ ความเสื่อมคุณภาพนี้เกิดจากปัจจัยหลายอย่างรวมกันได้แก่ ปัจจัยด้านจุลชีวะ ปัจจัยด้านเคมี และกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

วิธีที่ใช้ในการตัดสินคุณภาพปลาสดไม่อาจทำได้ด้วยการพิจารณาตัดสินจากตัวแปรเพียงค่าเดียว ได้แก่ การใช้ประสาทสัมผัส วิธีทางจุลชีวะ วิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดี ข้อเสียและข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป

การตัดสินโดยใช้ประสาทสัมผัส ทำโดยการพิจารณาจากการมองเห็น การสัมผัสและการสังเกตกลิ่น เช่นการพิจารณาบริเวณตา เหงือก และผิวหนัง การใช้นิ้วสัมผัสโดยตรง พิจารณาความยืดหยุ่น ความแน่นของเนื้อปลาและผิวสัมผัส ตลอดถึงความชุ่มชื้น และลักษณะเมือก

ในการพิจารณากลิ่นซึ่งเป็นตัวแปรที่มีน้ำหนักในการตัดสินคุณภาพของปลาอย่างชัดเจน ปลาสดจะมีกลิ่นที่มีลักษณะเฉพาะตัวของปลา หรืออาหารทะเลแต่ละชนิด ๆไป เมื่อมีการเน่าเสียเนื่องจากแบคทีเรีย จะเริ่มส่งกลิ่นแตกต่างกันไป ในการพิจารณาจะนำผลการตรวจสอบโดยใช้ประสาทสัมผัสทั้งหมดมารวมกันเพื่อแสดงถึงคุณภาพ การทดสอบโดยใช้ประสาทสัมผัสมีความสำคัญ เนื่องจากมีความสัมพันธ์กันโดยตรงกับการรับรู้และความรู้สึกของผู้บริโภค การใช้ประสาทสัมผัสได้รับการยอมรับมาเป็นเวลานาน และมีความถูกต้องแม่นยำในการตัดสินคุณภาพ (กฤษณา โสภณพงษ์, 2539) อย่างไรก็ดี การใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพ จะต้องอาศัยผู้ทดสอบที่มีความชำนาญที่ผ่านการฝึกอบรม และเข้ารับการทดสอบเพื่อทบทวน และประเมินความสามารถอย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นจึงมีข้อเสียคือ หากปฏิบัติงานติดต่อกันเป็นเวลานาน ผู้ตรวจสอบจะเกิดความอ่อนล้าได้ และจะทำให้การตรวจสอบคุณภาพเกิดความผิดพลาดได้

วิธีทางจุลชีววิทยา ในช่วงเริ่มต้นของการเน่าเสียของปลาเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรีย จึงใช้จำนวนแบคทีเรียเป็นตัวแปรแสดงความสดได้ แต่ไม่สามารถบอกถึงระยะเวลาของการเปลี่ยนแปลงคุณภาพได้ เพราะตัวการที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียไม่ได้เกิดจากแบคทีเรียทุกชนิด การทดสอบโดยวิธีนี้มีข้อจำกัดคือต้องใช้เวลานาน 2- 3วันจึงจะเสร็จสิ้นสมบูรณ์

วิธีทางกายภาพ ได้แก่การใช้อุปกรณ์ในการติดตามผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของปลา ที่เปลี่ยนไปตามระยะเวลาการเก็บรักษา เช่น การพิจารณาค่าดัชนีหักเห (refractive index) ค่าการนำไฟฟ้า ค่าแรงตึงผิว (surface tension) ค่าความหนืด การทดสอบโดยวิธีเหล่านี้มักให้ผลที่มีความสัมพันธ์ถึงความสดได้ไม่ดีนัก

วิธีทางเคมี เนื่องจากมีสารประกอบทางเคมีหลายชนิดที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี หรือเกิดจากแบคทีเรีย สารเคมีเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีวัดความเสื่อมคุณภาพสภาพได้ดังนี้ คือ

1. Proximate Analysis

เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ โปรตีน ความชื้น ไขมัน และเถ้า ขึ้นอยู่กับการเก็บรักษา และอาจมีผลต่อสารประกอบที่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงควรหาองค์ประกอบทางเคมีก่อนจะเริ่มทดลอง การวิเคราะห์ค่าเหล่านี้ทำจะเพียงครั้งแรกที่ชักตัวอย่างเท่า

นั้น แต่ถ้าฤดูกาลเปลี่ยนแปลง ควรจะตรวจสอบอีกครั้งหนึ่ง เพราะฤดูกาลมีผลต่อส่วนประกอบทางเคมีของสัตว์น้ำ (พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, ม.ป.ป.)

2. Total Volatile Base (TVB)

ได้แก่สารประกอบที่ระเหยได้ ที่เกิดขึ้นหลังจากปลาตาย ส่วนใหญ่หมายถึงแอมโมเนีย และไตรเมธิลเอมีน (Trimethylamine : TMA) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการสลายตัวของไตรเมธิลเอมีนออกไซด์จากการกระทำของแบคทีเรีย ปลาบางชนิดมีปริมาณเบสทั้งหมดที่ระเหยได้ ไตรเมธิลเอมีนและ การให้คะแนนทางประสาทสัมผัสที่มีความสัมพันธ์กันอย่างดี ปริมาณเบสทั้งหมดที่ระเหยได้ในปลาส่วนใหญ่จะมีค่าสูงขึ้นเมื่อปลาจวนจะเน่าเสีย หรือใกล้ระดับที่ไม่เป็นที่ยอมรับ การวิเคราะห์ปริมาณเบสทั้งหมดที่ระเหยได้และไตรเมธิลเอมีนเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับวัดคุณภาพของปลา ปริมาณเบสทั้งหมดที่ระเหยได้ของสัตว์น้ำที่ถือว่าไม่สดมีค่าสูงกว่า 30 มิลลิกรัม - ไนโตรเจนต่อ 100 กรัมของเนื้อสัตว์น้ำ (นงลักษณ์ สุทธิวนิช , 2531 : 179)

3. Total Volatile Acids (TVA)

สารประกอบในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดฟอร์มิค กรดอะซิติค กรดโปรปีโอนิค และกรดบิวทิริค ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของไขมัน การใช้ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (TVA) เป็นดัชนีวัดคุณภาพ ได้ผลดีในระยะหลังของการเน่าเสีย และใช้ได้ดีกับปลาบางชนิดเท่านั้น วิธีนี้เหมาะกับปลาที่มีไขมันสูง (พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, ม.ป.ป.)

4. Volatile Reducing Substance (VRS)

การหาค่า VRS เป็นการประเมินกลิ่นของผลิตภัณฑ์อาหาร กลิ่นดังกล่าวประกอบด้วยสารที่ระเหยได้ต่าง ๆได้แก่ กรดแลคติค ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เอมีน เมอแคปแทน อินโดล และอื่น ๆ ที่เกิดจากการกระทำของแบคทีเรียในระยะหลังของการเน่าเสีย (พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, ม.ป.ป.)

5. Hypoxanthine (Hx)

เป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของนิวคลีโอไทด์ ข้อดีของการใช้ค่า Hx เป็นดัชนีวัดความสดเนื่องจาก Hx จะค่อย ๆเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่ไม่เป็นที่นิยมนักเพราะวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก (พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, ม.ป.ป.)

6. K-value

เป็นดัชนีวัดความสดที่คำนวณได้จากการนำเอาผลจากการสลายตัวของนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ มาคำนวณ ค่า K เหมาะสำหรับใช้กับปลาสดเท่านั้น แต่ไม่เหมาะกับผลิตภัณฑ์แช่แข็ง ในปลาสดจะมีค่า Kต่ำ ถ้าค่า K สูงแสดงว่าปลาคุณภาพไม่ดี (พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, ม.ป.ป.)

7. Peroxide value

ค่า POV นิยมใช้เป็นดัชนีวัดความเสื่อมของปลาที่มีไขมันสูง (Ellis, Silva and Lee, 1997)

8.Thiobabituric acid value (TBA)

เป็นการวิเคราะห์ปริมาณกรดไทโอบาบิทูริค ที่ทำปฏิกิริยากับมาโลอัลดีไฮด์ (maloaldehyde) ในปลา ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535นาโนเมตร ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ขึ้นกับชนิดของปลา ปลาที่เสื่อมสลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันได้ดี จะวิเคราะห์ค่าTBA ได้สูง (Ellis, Silva and Lee, 1997)

9. อินโดล (Indole)

ใช้เป็นดัชนีวัดความเสื่อมสภาพของกุ้ง แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณอินโดลต่ำอาจเป็นกุ้งที่เสื่อมสภาพได้ โดยกุ้งที่มีค่าอินโดลสูงจะเป็นกุ้งที่เสื่อมสภาพแน่นอน อินโดลเป็นดัชนีที่ไม่ดีนักในการวัดความเสื่อมสภาพของกุ้ง เนื่องจากการเน่าเสียที่อุณหภูมิต่ำ โดยเฉพาะกุ้งที่ถูกแช่อยู่ในน้ำแข็งเป็นเวลานาน ๆ แม้กุ้งจะเสื่อมสภาพไปแล้ว แต่ปริมาณอินโดลก็ยังต่ำอยู่ แต่ถ้ามีการเน่าเสียที่อุณหภูมิสูง ปริมาณอินโดลจึงจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (กฤษณา โสภณพงศ์, 2539)

10. ฮิสตามีน (Histamine)

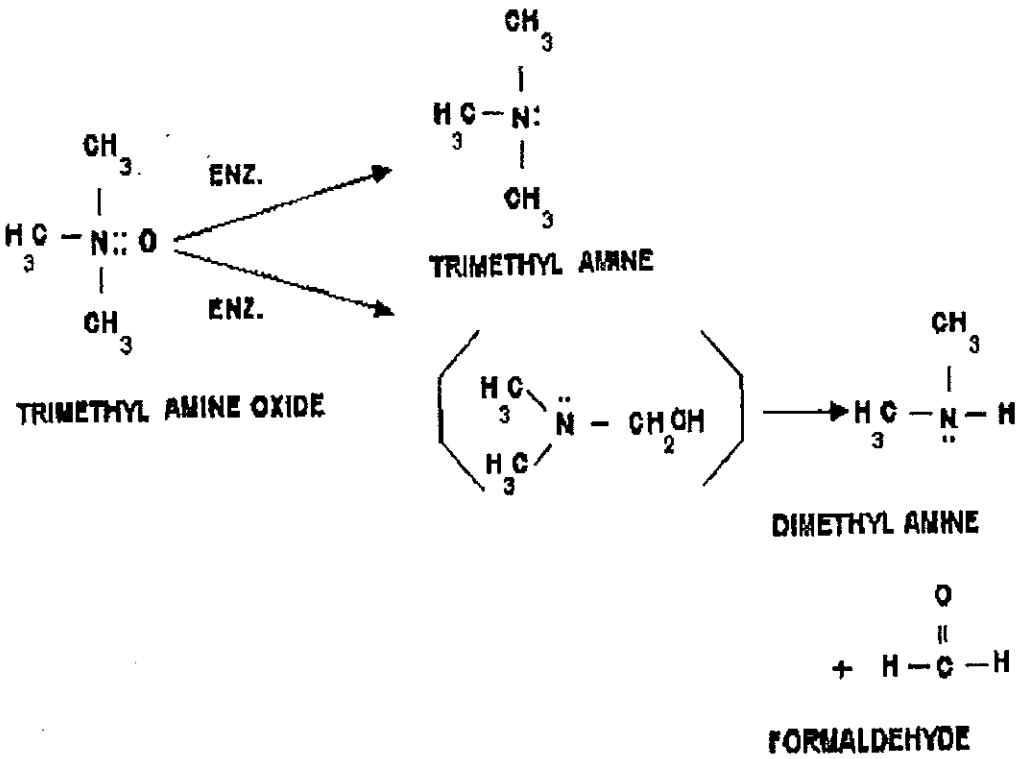
เกิดจากการสลายตัวของฮิสติดีน โดยการกระทำของน้ำย่อยจากแบคทีเรีย ฮิสตามีนใช้เป็นดัชนีวัดคุณภาพของปลาบรรจุกระป๋อง (พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, ม.ป.ป.)

ไดเมธิลเอมีน (Dimethylamine: DMA) เป็นเอมีนที่ระเหยได้ พบมากในปลาแช่เยือกแข็ง เกิดจากปฏิกิริยารีดักชั่นของเอนไซม์ TMAO-ase ในปลาสดทั่วไปมีไดเมธิลเอมีน ประมาณ 0.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อ100 กรัม ในปลาที่เริ่มเน่าเสียตรวจพบได

เมธิลเอมีน ถึง 1.5 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อ100กรัม(นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531 : 178) ขณะแช่เยือกแข็งหรือได้รับความร้อนภายใต้ความดันจะพบไดเมธิลเอมีนร่วมกับฟอร์มัลดีไฮด์ เนื่องจากมักพบไดเมธิลเอมีนในปลาบางชนิดและมีปริมาณไม่สูงมากนัก จึงไม่ค่อยนิยมใช้เป็นตัวชี้วัดความเสื่อมคุณภาพในสัตว์น้ำ ไดเมธิลเอมีนไม่ใช่สารพิษ แต่ถ้าทำปฏิกิริยากับสารประกอบไนไตรท์ในอาหารจะมีโอกาสเกิดเป็นสารพิษคือ ไนโตรโซไดเมธิลเอมีน (Nitroso-dimethylamine) (Fiddler et al., 1991; Lundstorm and Racicot, 1983; Fiddler et al., 1972; Lijinsky and Epstein, 1970)

ไตรเมธิลเอมีน (Trimethylamine : TMA) พบมากในสัตว์น้ำเค็ม เกิดจากการแตกตัวของไตรเมธิลเอมีนออกไซด์ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยทั่วไป ไตรเมธิลเอมีนออกไซด์จะแตกตัวให้ไตรเมธิลเอมีนโดยมีเอนไซม์จากแบคทีเรียเข้ามามีบทบาท การวิเคราะห์ไตรเมธิลเอมีน จะให้ผลดีในปลาที่เสื่อมคุณภาพในระยะหลัง ไตรเมธิลเอมีนไม่ใช่ตัวบ่งชี้ที่ดีในการตรวจความสดที่ค่อย ๆ ลดลงในปลาที่ถูกจับใหม่ ๆ ในปลาน้ำจืดและปลาที่มีกล้ามเนื้อสีเข้ม อย่างไรก็ดีคณะกรรมการ Codex (Codex Alimentarius Committee of the FAO/WHO) ได้เสนอให้ใช้ไตรเมธิลเอมีนเป็นตัวแปรหลักในการตัดสินคุณภาพปลาและผลิตภัณฑ์ปลา (Pedrosa-Menabrito and Regenstein, 1990 : 209-223) ปริมาณไตรเมธิลเอมีนที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่ายังไม่เน่าเสียคือ ไม่เกิน 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อปลา 100 กรัม ในปลาทะเลเขตร้อนที่มีคุณภาพไม่เป็นที่ยอมรับมีไตรเมธิลเอมีน 0.5 ถึง 1.5 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อปลา 100 กรัม และมีสารประกอบไนโตรเจนทั้งหมดที่ระเหยได้ 15 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อปลา 100 กรัม (พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, 2539)

ไตรเมธิลเอมีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide :TMAO) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนในสัตว์น้ำ ทำหน้าที่คล้ายยูเรีย หรือกรดยูริคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ช่วยกำจัด และปรับสภาพไนโตรเจนให้คงที่ ในสัตว์ทะเลต่างชนิดกัน จะมีไตรเมธิลเอมีนออกไซด์ปริมาณต่างกัน ขึ้นกับชนิด ฤดูกาล ขนาด อายุ และสภาพแวดล้อม ในปลาสดไตรเมธิลเอมีนออกไซด์จะสลายตัวเป็น ไตรเมธิลเอมีนผ่านปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์จากแบคทีเรีย และในปลาแช่แข็ง จะสลายตัวเป็นไดเมธิลเอมีน และฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde : FA) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 1



ภาพประกอบที่ 1 แสดงกลไกการเกิดไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน
(Lindsay, 1996: 754)

การวิเคราะห์ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนโดยวิธีทางเคมี สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ วิธีทำให้เกิดสีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Colorimetry) (Dyer, 1945) วิธีนี้ไม่สามารถหาปริมาณไดเมธิลเอมีนอย่างมีนัยสำคัญได้ (Ruiter and Wessman, 1976) วิธีการใช้ไอออนซีเล็คทีฟอิเล็คโทรด (Ion Selective Electrode) เป็นวิธีที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อไตรเมธิลเอมีนแต่มีข้อเสียคือจะถูกรบกวนโดยแอมโมเนีย ไดเมธิลเอมีนและเอมีนส์ตัวอื่น ๆ (Chang, Chang and Lew, 1976) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์แก๊สโครมาโทกราฟเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจ เพราะมีข้อได้เปรียบคือ สามารถจำแนกและหาปริมาณสารที่สนใจในกลุ่มเดียวกันได้เกือบทุกตัวในการวิเคราะห์คราวเดียวกันและมีความไววิเคราะห์สูง

การวิเคราะห์โดยเทคนิคเฮดสเปซ (Headspace Analysis) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์สารที่ระเหยได้ในตัวอย่างที่เป็นของแข็ง หรือของเหลว ความหมายของคำว่า " Headspace" หมายถึง ปริมาตรของไอระเหย หรือบริเวณที่เป็นเฟสแก๊สเหนือตัวอย่าง ซึ่งโดยทั่วไปจะทำในภาชนะที่เป็นระบบปิด ในการวิเคราะห์สารที่ระเหยได้ โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography : GC) ทั่วไปจะมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างได้ 3 แบบ คือ

ก. สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent Extraction)

ข. ฉีดสารตัวอย่างเข้าแก๊สโครมาโทกราฟโดยตร ง (Direct Aqueous Injection)

ค. ฉีดไอเฮดสเปซโดยตรง (Direct Injection of the Headspace Volume)

ทั้ง 3 วิธีต่างมีข้อดี-ข้อเสียแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบข้อดี ข้อเสียของวิธีการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 วิธี

ก	ข	ค
มักใช้ในการวิเคราะห์สารที่ไม่ระเหย	เป็นการฉีดตัวอย่างที่เป็นของเหลวเข้าแก๊สโครมาโทกราฟโดยตรง	ฉีด ไอของสารระเ หยจากเฟสแก๊สเข้าแก๊สโครมาโทกราฟโดยตรง
<u>ข้อเสีย</u> ● ใช้เวลานาน ● ความแม่นยำต่ำ โดยเฉพาะเมื่อวิเคราะห์สารที่มีจุดเดือดต่ำ ● มีสัญญาณ (พีก) รบกวน จึงควรใช้ตัวทำละลายที่มีความบริสุทธิ์สูง	<u>ข้อเสีย</u> ● ทำให้เกิดการปนเปื้อนต่อ injection port และคอลัมน์ เนื่องจากเมตริกซ์ของสารตัวอย่าง ●เบสไลน์(baseline) ไม่เสถียร ● ความไววิเคราะห์ไม่ดี ● มีไอน้ำเข้าไปรบกวน การแยก	<u>ข้อเสีย</u> ● การทำให้เป็นระบบอัตโนมัติ ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงขึ้น เนื่องจากต้องใช้อุปกรณ์ที่ซับซ้อนขึ้น
<u>ข้อดี</u> ● เพิ่มความไววิเคราะห์ ● เหมาะกับสารประกอบที่มีจุดเดือดสูง	<u>ข้อดี</u> ● วิเคราะห์เร็ว ● เตรียมง่าย	<u>ข้อดี</u> ● สะดวก รวดเร็ว ● หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนเนื่องจากเมตริกซ์ของสารตัวอย่างและตัวทำละลายอินทรีย์ ● สามารถเลือกใช้กับระบบอัตโนมัติได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มความแม่นยำในการตรวจวัดด้วย ● มี ความไววิเคราะห์ดี

การวิเคราะห์โดยเทคนิคเฮดสเปซ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. แบบสแตติก (Static Headspace)
2. แบบไดนามิก (Dynamic Headspace)

แบบสแตติก

เป็นการปล่อยให้เกิดสมดุลย์ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่สามารถระเหยได้ ระหว่าง 2 เฟส คือ เฟสที่เป็นของแข็งหรือของเหลวซึ่งในที่นี้คือตัวอย่าง กับเฟสที่เป็นแก๊ส ณ อุณหภูมิที่กำหนด จากนั้นชักตัวอย่างที่เป็นไอในเฟสที่เป็นแก๊สด้วยเข็มฉีด ซึ่งควรเป็นเข็มฉีดเฉพาะสำหรับใช้วิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นแก๊ส เพื่อทำการแยกด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟต่อไป

แบบไดนามิก

ในระยะแรก เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างโดยการแทนที่สารที่จะวิเคราะห์ในบริเวณเฮดสเปซ ด้วยแก๊สเฉื่อยแบบต่อเนื่องเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ต่อมาขั้นตอนนี้อาจเปลี่ยนแปลงได้ โดยการชักตัวอย่างอากาศที่มีไอระเหยของสารที่จะวิเคราะห์ด้วยอัตราเร็วคงที่ค่าหนึ่งในเวลาที่กำหนด ผ่านอุปกรณ์ที่สามารถจับสารที่ต้องการวิเคราะห์ไว้ จัดเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้สารที่จะวิเคราะห์มีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งสามารถทำได้ 2 แบบ
ได้แก่

1) ใช้ cryogenic trap
2) ใช้ตัวดูดซับที่เหมาะสม (adsorbent trap) จากนั้นคืนการดูดซับด้วยความร้อน เพื่อให้สารที่จะวิเคราะห์เคลื่อนที่เข้าแก๊สโครมาโทกราฟต่อไป

การตรวจเอกสาร

การวิเคราะห์ไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีน โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) ในการตรวจวัดไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีนนั้นมีข้อดี คือ เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถจำแนก และหาปริมาณสารได้ในคราวเดียวกัน มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิคนี้มากมายหลายชิ้น ซึ่งแต่ละชิ้นต่างก็

มีความแตกต่างกันในขั้นตอนต่าง ๆ เช่นการเตรียมตัวอย่าง การเลือกใช้คอลัมน์ และสภาวะการทดลอง รวมตลอดถึง วิธีการตรวจวัดที่แตกต่างกัน ดังนี้

Huges (1959) อธิบายถึงการวิเคราะห์เอมีนที่ระเหยได้ ซึ่งสกัดจากปลาด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติค (Trichloroacetic acid :TCA) นำมาปรับให้เป็นกลาง แล้วผ่านกระบวนการกลั่นด้วยไอน้ำ จะได้เกลือเอมีนไฮโดรคลอไรด์ จากนั้นทำให้แห้งแล้วนำเกลือนี้มาละลายในน้ำ ฉีดสารละลายที่ได้เข้าสู่พรีคอลัมน์ (precolumn) ซึ่งภายในบรรจุด้วยโซดาไลม์ (soda lime) จะได้เอมีนอิสระ (free amines) ออกมา แยกเอมีนดังกล่าวด้วยคอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ ซึ่งภายในบรรจุด้วย n-hendecanol-n-octadecane (4+1 v/w) เคลือบบน acid -and-alkaline-washed Celite ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดไทเทรชั่นเซลล์(titration cell detector) Smith และ Radford (1961) ได้อธิบายถึงการแยกไดเอมีนส์ (diamines ที่ไม่ใช่ไดเมธิลเอมีน) ด้วยซัพพอร์ท (solid support) 4 ชนิด คือ Firebrick, Chromosorb P, Chromosorb W และ Celite พบว่า Chromosorb W เหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นซัพพอร์ท จากนั้นได้ปรับปรุงสมรรถนะของเฟสอยู่กับที่ให้เหมาะสมยิ่งขึ้นโดยการนำมาเคลือบด้วยโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ และ Carbowax 20M ซึ่งการเคลือบดังกล่าวทำให้การแยกดีขึ้น และสามารถลดพีกที่มีเทลลิ่งลงด้วย Nonaka, Mitani และ Koizumi (1967) ได้พยายามหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโทกราฟีด้วยการสกัดไตรเมธิลเอมีนในกรดไตรคลอโรอะซิติค (Trichloroacetic acid : TCA) ปรับให้เป็นกลางด้วยโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ เอมีนอิสระที่ได้จะถูกสกัดไปเก็บไว้ใน n-heptane วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟแยกด้วยคอลัมน์ 20% cetylalcohol-2%KOH บน C-22 Firebrick แล้วตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออนไนเซชั่น Gruger (1972) ได้ทดลองเตรียมตัวอย่างโดยสกัดด้วย กรดเปอร์คลอริค (Perchloric acid :PCA) แทนการใช้กรดไตรคลอโรอะซิติค (Trichloroacetic acid : TCA) และเปลี่ยนเอมีนที่สกัดได้ให้อยู่ในรูปเกลือซัลเฟต จากนั้นทำการแยกด้วยเฟสอยู่กับที่ชนิดUntreated Chromosorb 103 และตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออนไนเซชั่น Keay และ Hardy (1972) สกัดเอมีนด้วยกรดเปอร์คลอริค (Perchloric acid :PCA) แล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์ จากนั้นฉีด ผ่านเข้าคอลัมน์วิเคราะห์โดยตรง ซึ่งประกอบด้วย 2 คอลัมน์ คอลัมน์

แรกบรรจุโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อเปลี่ยนเกลือเอมีนให้เป็นเอมีนอิสระ คอลัมน์ที่สองบรรจุ Dowfax9N9+KOH บน Silocell C-22 จากนั้นตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออนไนเซชั่น Miller และคณะ (1972) ได้พยายามดัดแปลงวิธี เพื่อหลีกเลี่ยงความยุ่งยากในขั้นตอนการกลั่นด้วยไอน้ำ โดยใช้เทคนิคเฮดสเปซ (Headspace : วิเคราะห์ตัวอย่างที่อยู่ในเฟสที่เป็นไอในสภาวะสมดุล) แทน โดยการบรรจุตัวอย่าง และ โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ไว้ในภาชนะปิด ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ดูดไอจากเฮดสเปซ ฉีด ผ่าน คอลัมน์ 2% Tetraethylenepentamine บน Graphon ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดไนโตรเจนฟอสฟอรัสเฟลมไอออนไนเซชั่น Ritskes (1975) เตรียมตัวอย่างโดยสกัดด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติค (Trichloroacetic acid : TCA) ทำให้เอมีนอยู่ในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์ จากนั้นปรับให้เป็นกลาง ฉีด สารละลายที่ได้ผ่านพรีคอลัมน์ (precolumn) ที่เป็นด่าง แล้วจึงผ่านคอลัมน์วิเคราะห์ ซึ่งบรรจุด้วย 15% Carbowax 400 และ 5% polyethyleneimine บน Chromosorb W/NAW ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออนไนเซชั่น Dunn, Simenhoff และ Wesson,Jr. (1976) วิเคราะห์ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างชีววัตถุโดยใช้คอลัมน์ 2 คอลัมน์ คอลัมน์แรกเป็น 10% Amine 220/ 10% KOH บน acid washed Chromosorb W, 80 /100 เมช ทำหน้าที่แยกไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนออกจากกัน เมื่อผ่านคอลัมน์ที่สองจะแยกไดเมธิลเอมีนและโมโนเมธิลเอมีนจากกัน ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออนไนเซชั่น Tokunaga Iida และ Miwa (1977) ใช้วิธีคล้ายกับวิธีของ Nonaka แต่วิเคราะห์ได้ทั้งไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในคราวเดียวกัน โดยการสกัดด้วยกรดเปอร์คลอริค (Perchloric acid : PCA) เติมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ สกัดเอมีนอิสระที่ได้ด้วย n-amyl alcohol แยกด้วยคอลัมน์ 20% Squalene-2.5% Glycerine-2.5% KOH บน Diasolid L แล้วตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออนไนเซชั่น Lundstrom และ Racicot (1983) ได้ทำการวิเคราะห์ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในคราวเดียวกัน โดยสกัดด้วยกรดเปอร์คลอริค (Perchloric acid : PCA) กรองผ่านกระดาษกรอง แล้วเก็บสารที่กรองได้ไว้ในขวด (vial) แบบฝาเกลียว เติมเบนซีนและโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที เขย่าเพื่อให้เกิดการสกัด

ดีที่สุด แล้วจึงนำไปปั่นแยก(centrifuge) เพื่อแยกเอาชั้นเบนซีนไว้ แล้วแย กด้วยคอลัมน์ Chromosorb 103 ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดไนโตรเจนฟอสฟอรัสเฟลมไอออนไนเซชั่น Kuwata และคณะ (1983) วิเคราะห์อะลิฟาติกเอมีนในบรรยากาศโดยใช้ตัวดูดซับชนิด Sep-Pak C_{18} คอลัมน์วิเคราะห์เป็น GHP-1 / 1% KOH คายการดูดซับบนตัวดูดซับด้วยเมธานอล : น้ำ (1:1) จากนั้นปรับ pH ของสารละลายที่ถูกชะออกมาให้เท่ากับ 10 ด้วย 2 นอร์มัลโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ วิเคราะห์สารละลาย ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟ Perez Martin และคณะ (1987) วิเคราะห์ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในปลา โดยสกัดด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติค (Trichloroacetic acid : TCA) เติมเบนซีนและโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ในตัวอย่างที่สกัดได้ เขย่าแล้วฉีดส่วนที่สกัดได้จากชั้นเบนซีน คอลัมน์ที่ใช้แยกมี 4 ชนิดคือ

- Carbowax 20M-KOH ตามที่ Smith และ Radford (1961) เคยใช้
- Carbopack B ที่เคลือบด้วย Carbowax 20Mและ KOH ซึ่งพัฒนาโดย Dicorcia และ Samperi (1964)
- Chromosorb W/NAW ที่เคลือบด้วย Carbowax 400 และ polyethyleneimine (PEI) ตามวิธีของ Ritskes (1975)
- Chromosorb 103 โดยวิธีของ Gruger (1972) , Lundstrom และ Racicot (1983)

พบว่า คอลัมน์ชนิดที่ 2 และ3 ให้ผลการแยกดีที่สุด แต่มีข้อเสียคือ อายุการใช้งานสั้น ใช้ได้ประมาณ 150 ครั้ง (injections) เนื่องจากเป็นการฉีด ส่วนที่เป็นของเหลวเข้าไปโดยตรงทำให้เกิดปัญหาที่เฟสอยู่กับที่ Fiddler, Doerr และ Gates (1991) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีน และไตรเมธิลเอมีนออกไซด์ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์ปลาโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีควบคู่กับเทคนิคเฮดสเปซ เขาได้แก้ปัญหาที่เกิดขึ้น เช่นสัญญาณจากตัวอย่างหายไป, เกิดพีคที่เรียกว่า “ghosting peak” และกรณีที่เกิดพีกที่มีเทลลิ่ง อันมีสาเหตุมาจากการเกิดการดูดซับซึ่งกันและกัน ระหว่างเอมีนกับเฟสอยู่กับที่โดยการเติมสารที่มีความเป็นด่างอย่างแรงเช่น โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์หรือแอมโมเนียเข้าไปพร้อมกับแก๊สพา สารที่ได้จากการสกัดด้วยกรด จะถูกฉีดเข้าไปในสภาพไอที่ได้จากบริเวณเฮดสเปซ แล้วแยกด้วยคอลัมน์ Chromosorb 103

Krzymien และ Elias (1990) ศึกษาความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์ไตรเมธิลเอมีนโดยวิธีสกัดจากเนื้อปลา และฉีดของเหลวเพื่อทำการแยกด้วยแก๊สโครมาโทกราฟโดยตรง เปรียบเทียบกับเทคนิคเฮดสเปซ และได้ทดลองใช้ตัวดูดซับเก็บไอระเหยของไตรเมธิลเอมีน แล้วคายการดูดซับด้วยความร้อน วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟ สำหรับไดเมธิลเอมีนวิเคราะห์โดยวิธีเดียวกันแต่ตรวจไม่พบ Krzymien, Elias และ Sim (1992 : 216-224) วิเคราะห์ไตรเมธิลเอมีนจากเฮดสเปซในภาชนะบรรจุปลาโดยไม่ทำให้ตัวอย่างถูกทำลาย โดยเตรียมสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นด้วยหลอดที่บรรจุตัวดูดซับที่เหมาะสม คายการดูดซับด้วยความร้อนโดยต่อกับส่วนหัวฉีดโดยตรง และวิเคราะห์ปริมาณเอมีนด้วยแก๊สโครมาโทกราฟ สามารถจำแนกความแตกต่างของปลาเกรดต่าง ๆ ได้สำเร็จ Vciana-Nogues และคณะ (1996) ศึกษาการวิเคราะห์เอมีนส์ที่ระเหยได้ในปลา โดยการสกัดด้วย 0.6 นอร์มัลกรดเปอร์คลอริค ปรับให้เป็นด่างด้วย 65% โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (w/w) สกัดด้วยโทลูอีน ตรวจพบทั้งไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน โดยที่โมโนเมธิลเอมีนไม่รบกวนผลการวิเคราะห์

1.3 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการแยกไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนโดยเทคนิคเฮดสเปซ ควบคู่กับแก๊สโครมาโทกราฟี เมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิดของเหลว และของแข็ง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเฮดสเปซ
3. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในในการเพิ่มความเข้มข้นไอระเหยของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน โดยการดูดซับบนตัวดูดซับ และคายการดูดซับด้วยตัวทำละลาย
4. ประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวข้างต้นในการวิเคราะห์ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนจากสัตว์น้ำบางชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน โดยใช้เทคนิคเฮดสเปซแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งช่วยลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

2. ได้ข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธีที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปฏิบัติงานประจำเพื่อวัดคุณภาพความสดของสัตว์น้ำ

ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาสมรรถนะของเฟสอยู่กับที่ชนิดของเหลว และของแข็ง ในเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีในการแยกไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน
2. ศึกษาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมในการแยกและหาปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน
3. ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เฟสอยู่กับที่ที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้แยกไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเฮดสเปซ และการเพิ่มความเข้มข้นของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน โดยการดูดซับบนตัวดูดซับ และคายการดูดซับด้วยตัวทำละลาย
5. วิเคราะห์ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างสัตว์น้ำ โดยใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้างต้น

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย

2.1. วัสดุและสารเคมี

2.1.1. ไดเมธิลเอมีน 40% ในน้ำ (Dimethylamine, Assay 40% in water, AR grade, Fluka, Switzerland)

2.1.2. ไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ (Trimethylamine hydrochloride 98% assay, AR grade, Sigma, USA.)

2.1.3 โพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ (n-Propylamine hydrochloride 99% assay, AR grade, Aldrich Chem. Co., USA.)

2.1.4 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, AR grade, Merck, Germany)

2.1.5 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, AR grade, Merck, Germany)

2.1.6 โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide, AR grade, BDH, England)

2.1.7 เมธานอล (Methanol, AR grade, Labscan, Ireland)

2.1.8 Chromosorb W (Regular, Varian aerograph, USA)
ขนาด 80/100 เมช (mesh) เป็นของแข็ง (solid support) สำหรับใช้ฉาบเฟสอยู่กับ ที่ (stationary phase) ชนิดของเหลว (liquid phase)

2.1.9 Carbowax 20M (Varian aerograph, USA.) เป็นเฟสอยู่กับที่ ชนิดของเหลว

2.1.10 4% Carbowax® 20M/0.8% KOH on Carbopak™ B , Supelco, USA.)
ขนาด 60 /80 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่สำเร็จรูปชนิดที่มีของเหลวฉาบอยู่บนของแข็ง

2.1.11 Chromosorb 103® (Supelco , USA.) ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่สำเร็จ รูปชนิดของแข็ง (Solid phase)

2.1.12 ซิลิกาเจล 40 (Silica gel 40) (Fluka, Switzerland)
สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ขนาด 35 / 70 เมช ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ

2.1.13 ใยแก้ว (Glass wool)

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

2.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ และเครื่องประมวลผล

2.2.1.1 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Gas Chromatograph) รุ่น GC-8A (Shimadzu, Japan) ตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออนไนเซชั่น (Flame Ionization Detector : FID) เครื่องบันทึกและประมวลผล (Integrator) รุ่น C- R6A Chromatopac (Shimadzu, Japan)

2.2.1.2. อุปกรณ์ฉีดสารตัวอย่าง

ก. เข็มฉีดแก๊ส (Gas Tight Syringe, Dynatech, USA) Series A-2 ปริมาตร 0 – 2.0 มิลลิลิตร หัวเข็มชนิดโคนทิพ (Cone Tip, Supelco, USA)

ข. เข็มฉีดขนาดไมโครลิตร (Microliter ™ Syringe, Hamilton, Switzerland) ขนาด 0 –10 ไมโครลิตร

2.2.1.3 อุปกรณ์ทำความสะอาดเข็มฉีด (Syringe Cleaner, Hamilton Company, USA.)

2.2.1.4 ขวดแก้วสำหรับบรรจุตัวอย่าง (Glass Vial) ขนาด 60 มิลลิลิตร จุกยางชนิดคลอโรบิวทิลรับเบอร์ (Chlorobutyl rubber stopper) และฝาปิดอลูมิเนียม (Aluminium seal)

2.2.1.5 อุปกรณ์เย็บฝาอะลูมิเนียม (Hand Crimper)

2.2.1.6 อุปกรณ์สำหรับวัดอัตราเร็วของแก๊สพา (Flow meter)

2.2.2 อุปกรณ์สำหรับเตรียมเฟสอยู่กับที่และการบรรจุเฟสอยู่กับที่ลงคอลัมน์วิเคราะห์

2.2.2.1 คอลัมน์แก้ว (Glass column) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก

5 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง ภายใน 2.6 มิลลิเมตร ยาว 2.0 เมตร

2.2.2.2 แก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์สูง

2.2.2.3 ขวดรูปชมพู่แบบมีแขน พร้อมจุกยางเจาะรูเสียบแท่งแก้วสำหรับระบายอากาศ

2.2.2.4 ปั๊มสำหรับทำสุญญากาศชนิดไม่ใช้น้ำมัน

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับเตรียมเฮดสเปซ (Headspace)

2.2.3.1 อ่างน้ำสแตนเลสสตีลพร้อมขดลวดให้ความร้อนที่ปรับอุณหภูมิได้

2.2.3.2 ขวดแก้วสำหรับบรรจุตัวอย่างและสารมาตรฐาน (Glass vial) ขนาด 60 มิลลิลิตร

2.2.3.3 จุกยางชนิดคลอโรบิวทิลรับเบอร์

2.2.3.4 ฝาอะลูมิเนียม (Aluminium seal)

2.2.3.5 อุปกรณ์เย็บฝาอะลูมิเนียม (Hand crimper)

2.2.3.6 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

2.2.4 อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เข้มข้นมากขึ้น (Preconcentrate Analyte)

2.2.4.1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างอากาศ (24 –Hour Air Sampler, Supelco, USA) รุ่น 1064

2.2.4.2 โรตามิเตอร์ (Rotameter, Cole-Parmer Instrument Co., USA) พร้อมขาตั้ง สำหรับวัดอัตราการไหลของแก๊ส

2.2.4.3 อุปกรณ์ตัดหลอดแก้วบรรจุตัวดูดซับ (ORBO Tube Cutter, Supelco, USA)

2.2.4.4 หลอดแก้วบรรจุตัวดูดซับ (Adsorbent tube) หลอดแก้วปลายเปิดสองด้าน ยาว 70 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 6 มิลลิเมตร

2.2.4.5 พีคทิวบ์ (PEEK tube) เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 3.5 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1.5 มิลลิเมตร

2.2.4.6 หัวเข็มเบอร์ 23 G (Nipro, Thailand) ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร ยาว 40 มิลลิเมตร

2.3 วิธีดำเนินการ

2.3.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

2.3.1.1 สารละลายไตรเมธิลเอมีน 1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อมิลลิลิตร : อบไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (Zhang, Mitchell and Smith, 1999) ชั่งไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ (98% assay) ให้ได้เนื้อสาร 0.682 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (1+3 โดยปริมาตร) 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร (Hungerford, 1998 : 7)

2.3.1.2 สารละลายโพรพิลเอมีน 1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อ 1 มิลลิลิตร : ดูดความชื้นของโพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ด้วยแคลเซียมคลอไรด์ (Zhang, Mitchell and Smith, 1999) ในเดสิเคเตอร์ (dessicator) ชั่งโพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ (99% assay) ให้ได้เนื้อสาร 0.682 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (1+3 โดยปริมาตร) 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.3.1.3 สารละลายไดเมธิลเอมีน 1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อ 1 มิลลิลิตร : หาปริมาณไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบโดยวิธีกลั่นไอน้ำและไทเทรท (FAO, 1986 : 140) คำนวณปริมาณไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบ ปิเปตสารละลายมาตรฐานไดเมธิลเอมีนให้ได้เนื้อไนโตรเจน 1 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (1+3 โดยปริมาตร) 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

ในการศึกษาปริมาณอะลิฟาติกเอมีนโดยใช้เทคนิคสแตติกเฮดสเปซ (static headspace) ให้ได้ผลดี ควรจะศึกษาตัวแปรต่าง ๆที่ทำให้ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในเฮดสเปซมีปริมาณมากที่สุด ได้แก่การศึกษาสมรรถนะของเครื่องมือวิเคราะห์เพื่อให้ได้สภาวะการแยกและการตรวจวัดดีที่สุด การศึกษาสภาวะการเตรียมเฮดสเปซเพื่อเพิ่มปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้อยู่ในเฮดสเปซมากที่สุดและการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม ซึ่งสามารถทำการทดลองย่อย ๆได้ดังนี้

2.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารมาตรฐานเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิด 4% Carbowax 20M /0.8% KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช

2.3.2.1 ศึกษาอัตราเร็วที่เหมาะสมของแก๊สพา (Carrier gas)

ศึกษาอัตราเร็วที่เหมาะสมของแก๊สพาที่อัตราเร็วต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 15 ถึง 60 มิลลิลิตรต่อนาทีโดยใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สพา ต่ออุปกรณ์วัดอัตราเร็วของแก๊สพาเข้ากับท่อทางเดินแก๊สบริเวณทางออกที่ตัวตรวจวัด ปล่อยแก๊สพาพร้อมจับเวลาอัตราเร็วของฟองสบู่เมื่อเคลื่อนที่จาก 0 ถึง 10 มิลลิลิตร หาอัตราเร็วของแก๊สพาจากสูตร

อัตราเร็ว (มิลลิลิตร/นาที) = (10 มิลลิลิตร/เวลาเป็นวินาที)×(60 วินาที /1นาที)

เตรียมสารมาตรฐานไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1.7×10^{-2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร โดยเจือจางจากสารละลายในข้อ 2.3.1 ดึงไอจากเฮดสเปซด้วยเข็มฉีดแก๊ส 2 มิลลิลิตร ฉีดไอของสารมาตรฐานเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Gas Chromatograph : GC) วิเคราะห์อัตราเร็วละ 3 ซ้ำ เมื่อเปลี่ยนอัตราเร็วของแก๊สพาควรรอจนอัตราเร็วของแก๊สคงที่ จึงเริ่มทดลองที่อัตราเร็วถัดไป ในการทดลองใช้สภาวะการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ตารางที่ 2 สภาวะการทดลองเพื่อศึกษาอัตราเร็วแก๊สพาที่เหมาะสมเมื่อใช้คอลัมน์ 4% Carbowax 20M / 0.8% KOH บน Carbopack B / ขนาด 60/80 เมช

แก๊สโครมาโทกราฟ	Shimadzu GC 8A ต่อกับอินทิเกรเตอร์ C-R 6A Chromatopac
คอลัมน์	2.0ม.×2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) คอลัมน์แก้ว บรรจุด้วย 4% Carbowax 20M / 0.8% KOH บน Carbopak B ขนาด 60/80 เมช
แก๊สพา	แก๊สไนโตรเจนอัตราเร็ว 15, 20, 25, 30, 40 และ 60 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิ : คอลัมน์	70 องศาเซลเซียส ไอโซเทอร์มัล (isothermal)
: หัวฉีด/ ตัวตรวจวัด	180 องศาเซลเซียส
ตัวตรวจวัด	เฟลมไอออนไนเซชั่น
	อัตราเร็วแก๊สไฮโดรเจน : อากาศ 1: 10
ปริมาตรที่ฉีด	2.0 มิลลิลิตร

นำผลที่ได้มาคำนวณหาความสูงของเพลทตามทฤษฎี (Height Equivalent to a Theoretical Plates :HETP) เขียนกราฟแวนดีมเตอร์ (Van Deemter) เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของแก๊สพาและ HETP อัตราเร็วของแก๊สพาที่เหมาะสมที่สุดคืออัตราเร็วที่ให้ค่า HETP น้อยที่สุด (Johnson, 1972 : 9)

2.3.2.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกและตรวจวัด

ศึกษาอุณหภูมิการแยกที่เหมาะสมโดยใช้อัตราเร็วของแก๊สพาที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.2.1 เปลี่ยนอุณหภูมิคอลัมน์จาก 60 ถึง 85 องศาเซลเซียส อุณหภูมิหัวฉีด/ตัวตรวจวัด 110 องศาเซลเซียส คอลัมน์เดิมตามข้อ 2.3.2.1 เตรียมสารมาตรฐานไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ไดเมธิลเอมีนความเข้มข้นสุดท้าย 3.4×10^{-1} และ 2.5 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร โพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 3.2 มิลลิกรัม-

ไนโตรเจนต่อลิตร เป็นสารละลายอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (Internal standard solution) ตามลำดับโดยเจือจางจากสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.1 ในสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 65% : น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ดึงไอสารมาตรฐานจากเฮดสเปซด้วยเข็มฉีดแก๊ส 2.0 มิลลิลิตร ฉีดไอของสารมาตรฐานเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Gas Chromatograph : GC) เปรียบเทียบสัญญาณที่ได้เมื่อใช้อุณหภูมิคอลัมน์ 60, 70, 75, 80 และ 85 องศาเซลเซียส วิเคราะห์อุณหภูมิละ 3 ซ้ำ เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ผ่านคอลัมน์ (retention time) จากจุดเริ่มต้น ถึงจุดสูงสุดของพีก (peak) ค่าการแยก (resolution) และลักษณะของเส้นฐาน (baseline)

ศึกษาอุณหภูมิตัวตรวจวัดที่เหมาะสมโดยทำการทดลองทำนองเดียวกับการศึกษาอุณหภูมิคอลัมน์ที่เหมาะสม แต่เปลี่ยนอุณหภูมิตัวตรวจวัดแทนการเปลี่ยนอุณหภูมิคอลัมน์ ใช้อุณหภูมิคอลัมน์ที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองที่ 2.3.2.2วรรคที่ 1 เตรียมสารมาตรฐานไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ไดเมธิลเอมีนและโพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1.7×10^{-1}, 2.5 และ1.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร โดยเจือจางจากสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.1 ในสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 65% : น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ฉีดไอสารมาตรฐานที่ดึงจากเฮดสเปซเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ใช้สภาวะการทดลองอื่น ๆเช่น คอลัมน์ แก๊สพา ตัวตรวจวัด และปริมาตรที่ฉีดดังแสดงในตารางที่ 2 วิเคราะห์อุณหภูมิละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบสัญญาณที่ได้โดยเลือกจากสภาวะที่ให้สัญญาณที่วัดได้สูงที่สุด

2.3.2.3 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมเฮดสเปซ

ในการเตรียมเฮดสเปซให้ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนมีความเข้มข้นมากที่สุด โดยศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่ต่าง ๆ กัน สัญญาณที่ตรวจวัดได้ของสารมาตรฐานมีสัญญาณสูงที่สุดและมีความเที่ยงมากที่สุด โดยความเที่ยงพิจารณาจากความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (relative standard deviation)

เตรียมสารมาตรฐานไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ และไดเมธิลเอมีนความเข้มข้น 1 และ 12 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับ โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.1 ในสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 65% : น้ำ

อัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำขวดสารมาตรฐานที่ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมที่เย็บติดแน่นแช่ในอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่ละอุณหภูมิแช่ไว้นาน 10, 20, 30, 40และ 50 นาที ตามลำดับ ฉีดไอสารมาตรฐานที่ได้จากเฮดสเปซเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟที่สภาวะการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่ใช้ศึกษาอุณหภูมิเฮดสเปซที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

แก๊สโครมาโทกราฟ	Shimadzu GC 8A ต่อกับอินทิเกรเตอร์ C-R6A Chromatopac
คอลัมน์	2.0 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) คอลัมน์แก้ว บรรจุด้วย4% Carbowax 20M / 0.8% KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช
อุณหภูมิ : คอลัมน์	90 องศาเซลเซียส ไอโซเทอร์มัล
:หัวฉีด / ตัวตรวจวัด	180 องศาเซลเซียส
แก๊สพา	แก๊สไนโตรเจนอัตราเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อนาที
ตัวตรวจวัด	เฟลมไอออนไนเซชั่น อัตราเร็วแก๊สไฮโดรเจน : อากาศ 1: 10
อุณหภูมิเฮดสเปซ	40องศาเซลเซียสนาน10, 20, 30, 40และ50นาที 50องศาเซลเซียสนาน10, 20, 30, 40และ50นาที 60องศาเซลเซียสนาน10, 20, 30, 40และ50นาที 70องศาเซลเซียสนาน10, 20, 30, 40และ50นาที 80องศาเซลเซียสนาน10, 20, 30, 40และ50นาที
ปริมาตรที่ฉีด	2.0 มิลลิลิตร

2.3.2.4 ศึกษาปริมาตรตัวอย่างที่เหมาะสม

ในการศึกษานี้ เป็นการทดลองเพื่อหาปริมาตรตัวอย่างที่เหมาะสม โดยการเปลี่ยนอัตราส่วนเฟส (phase ratio : VG/VL) ระหว่างของเหลวและไอ ในขณะที่ใช้สารมาตรฐานทั้งสามที่มีมวลสารคงที่ค่าหนึ่ง เมื่อนำสัญญาณที่ตรวจวัดได้มาคำนวณและรายงานผลในรูปแฟกเตอร์การตอบสนอง (response factor : F) เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสกับแฟกเตอร์การตอบสนอง จะทราบปริมาตรที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ไดเมธิลเอมีนและโพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ปริมาณ 0.3 , 9.6 และ 12.6 ไมโครกรัม-ไนโตรเจน โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.1 ในตัวทำละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 65% ปริมาตร 15, 20, 25, 30, 35และ40 มิลลิลิตรในขวดเตรียมตัวอย่างขนาด 60 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมที่เย็บแน่น แช่ขวดสารมาตรฐานในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.3.2.3 ฉีดไอสารมาตรฐานที่ดึงจากบริเวณเฮดสเปซเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ โดยใช้สภาวะการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สภาวะการทดลองเพื่อศึกษาอัตราส่วนเฟสที่เหมาะสม ด้วยคอลัมน์ 4% Carbowax 20M/ 0.8% KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช

แก๊สโครมาโทกราฟ	Shimadzu GC 8A ต่อกับอินทิเกรเตอร์ C-R6A Chromatopac
คอลัมน์	2.0 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) คอลัมน์แก้ว บรรจุด้วย 4% Carbowax 20M / 0.8% KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช
อุณหภูมิ : คอลัมน์	75 องศาเซลเซียส ไอโซเทอร์มัล
: หัวฉีด / ตัวตรวจวัด	110 องศาเซลเซียส
แก๊สพา	แก๊สไนโตรเจนอัตราเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อนาที
ตัวตรวจวัด	เฟลมไอออนไนเซชั่น
	อัตราเร็วแก๊สไฮโดรเจน : อากาศ 1: 10
ปริมาตรที่ฉีด	2.0 มิลลิลิตร
ปริมาตรตัวอย่าง	15, 20, 25, 30, 35 และ40 มิลลิลิตร
สภาวะเฮดสเปซ	อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

2.3.2.5 ศึกษาปริมาณโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม

เนื่องจากในการศึกษานี้ ใช้สารประกอบเอมีนไฮโดรคลอไรด์ เป็นสารมาตรฐาน ในการเตรียมสารมาตรฐานต้องมีการเติมด่างเพื่อเปลี่ยนรูปสารประกอบเอมีนไฮโดรคลอไรด์ในชั้นของเหลว เป็นสารประกอบเอมีนอิสระซึ่งมีคุณสมบัติสามารถระเหยได้ที่อุณหภูมิต่ำ จากนั้นจึงใช้สภาวะการเตรียมเฮดสเปซที่เหมาะสมเพื่อให้เอมีนอิสระย้ายไปอยู่ในเฮดสเปซมากที่สุด ทำให้ต้องศึกษาปริมาณโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม โดยการเจือจางโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 65% ปริมาตรต่าง ๆ กันในน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรสุดท้ายรวม 40 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดลอง ข้อ 2.3.2.4

เตรียมสารมาตรฐานในสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 65% สัดส่วน 3 ถึง 50 % ของปริมาตรทั้งหมดโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ปริมาตรรวม 40 มิลลิลิตร ไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ไดเมธิลเอมีนและโพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 6.9×10^{-3}, 2.4×10^{-1} และ 3.2×10^{-1} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับ เจือจางจากสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.1 ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมที่เย็บแน่น แช่ขวดสารมาตรฐานในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ฉีดไอสารมาตรฐานที่ดึงจากบริเวณเฮดสเปซเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ สภาวะการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.3.2.4 เปรียบเทียบสัญญาณที่ได้โดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้กับแฟกเตอร์การตอบสนองที่ตรวจวัดได้ ความเข้มข้นของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมที่สุดจะให้แฟกเตอร์การตอบสนองค่ามากที่สุด

2.3.2.6 ศึกษาการตอบสนองเชิงเส้น (Linearity range) การเตรียมกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) และค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection)

การทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษาการตอบสนองเชิงเส้นของสัญญาณที่ตรวจวัดได้ เตรียมกราฟมาตรฐานและหาขีดจำกัดการตรวจวัด ในการศึกษาการตอบสนองเชิงเส้นของสัญญาณที่ตรวจวัดได้จะทำการทดลองโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน 6 ช่วงความเข้มข้น ใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.2.1 – 2.3.2.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ไดเมธิลเอมีนเข้มข้น $1.4\times10^{-2} - 1.4\times10^{2}$ และ $3.1\times10^{-1} - 3.1\times10^{3}$ มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรและโพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ 6.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ในโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3.25% โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.1 ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมที่เย็บแน่น แช่ขวดสารมาตรฐานในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ฉีดไอสารมาตรฐานที่ดึงจากบริเวณเฮดสเปซเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ สภาวะการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 นำค่าสัญญาณที่วัดได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง

ความเข้มข้นกับสัญญาณที่ตรวจวัดได้ จากกราฟจะได้ความเข้มข้นที่ให้การตอบสนองเชิงเส้น จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานโดยเลือกความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงการตอบสนองเชิงเส้นและเหมาะสมกับปริมาณที่คาดว่าจะตรวจพบในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ใช้สภาวะการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4

ขีดจำกัดการตรวจวัดหาได้จากการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานกับความเข้มข้น ให้แกน x แทนความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แกน y แทนค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้ข้อมูลจากการทดลองหาการตอบสนองเชิงเส้น จากการเขียนกราฟจะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ของทั้งสองค่า คำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัดได้โดยการแทนค่าลงในสมการให้ $x = 0$ จะทราบค่า y (s_0) นำค่าที่ได้ (s_0) คูณ 3 จะเป็นค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Taylor, 1987 : 79)

2.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารมาตรฐานเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิด Chromosorb 103 ขนาด 80 / 100 เมช

ศึกษาตัวแปรต่าง ๆที่มีผลต่อการแยกสารมาตรฐาน ทำนองเดียวกับการแยกด้วยคอลัมน์ 4% Carbowax 20M / 0.8% KOH บน Carbopak B ข้อ 2.3.2.1 – 2.3.2.2 และ 2.3.2.6 ใช้คอลัมน์Chromosorb 103 แทน ดังนี้

2.3.2.1 ศึกษาอัตราเร็วที่เหมาะสมของแก๊สพา (Carrier gas)

ทำการทดลองทำนองเดียวกับการทดลองที่ 2.3.2.1 โดยเตรียมสารมาตรฐานไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1.4×10^{-1} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ที่เจือจางจากสารละลายมาตรฐานในข้อ 2.3.1 ใช้อัตราเร็วของแก๊สพา 15 ,20, 25, 30, 40 และ 50 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้สภาวะการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สภาวะการทดลองเพื่อศึกษาอัตราเร็วแก๊สพาที่เหมาะสมเมื่อใช้คอลัมน์ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช

แก๊สโครมาโทกราฟ	Shimadzu GC 8A ต่อกับอินทิเกรเตอร์ C-R 6A Chromatopac
คอลัมน์	2.0ม.×2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) คอลัมน์แก้ว บรรจุด้วย Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช
อุณหภูมิ : คอลัมน์	140 องศาเซลเซียส ไอโซเทอร์มัล
: หัวฉีด / ตัวตรวจวัด	230 องศาเซลเซียส
แก๊สพา	แก๊สไนโตรเจนอัตราเร็ว 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 มิลลิลิตรต่อนาที
ตัวตรวจวัด	เฟลมไอออนไนเซชั่น
	อัตราเร็วแก๊สไฮโดรเจน : อากาศ 1: 10
ปริมาตรตัวอย่าง	40 มิลลิลิตรในโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3.25%
สภาวะเฮดสเปซ	อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
ปริมาตรที่ฉีด	2.0 มิลลิลิตร

2.3.3.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกและตรวจวัด

เตรียมสารมาตรฐานไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ไดเมธิลเอมีน และโพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 1.4×10^{-1} 2.4 และ 6.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรตามลำดับโดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานในข้อ 2.3.1 ทำการทดลองทำนองเดียวกับการทดลองที่ 2.3.2.2 วรรคที่ 1 สภาวะการทดลองทำนองเดียวดังแสดงในตารางที่ 5 แต่ใช้อุณหภูมิคอลัมน์ 120-135 องศาเซลเซียสและ อุณหภูมิหัวฉีด/ตัวตรวจวัดที่ 170 องศาเซลเซียสแทน วิเคราะห์อุณหภูมิละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบสัญญาณที่วัดได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ศึกษาอุณหภูมิหัวฉีด/ตัวตรวจวัด โดยเตรียมสารมาตรฐานไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ไดเมธิลเอมีนและโพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น

1×10^{-1}, 1.8 และ 4.7 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานใน ข้อ 2.3.1 สภาวะการทดลองดังแสดงในตาราง 5 ใช้อุณหภูมิคอลัมน์ 120 องศาเซลเซียส (ซึ่งได้จากการทดลองที่2.3.3.2 วรรคแรก) อุณหภูมิหัวฉีด/ตัวตรวจวัด 170 ถึง 210 องศาเซลเซียส วิเคราะห์อุณหภูมิละ 3 ซ้ำ

2.3.3.3 ศึกษาการตอบสนองเชิงเส้น การเตรียมกราฟมาตรฐานและค่าขีดจำกัดกา ตรวจวัด

ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.3.2.6

เตรียมสารมาตรฐานไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ไดเมธิลเอมีนความเข้มข้น 1.4×10^{-2} ถึง 1.4×10^{2} และ 3.1×10^{-1} ถึง 3.0×10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร โพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ 6.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานในข้อ 2.3.1 ใช้สภาวะจากข้อ 2.3.3.2

ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นดังนี้ ไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.14, 0.68 , 1.38 , 6.88, 13.75 และ 68.75 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตรในโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3.25% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ไดเมธิลเอมีน 5, 10, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัม - ไนโตรเจน ต่อลิตร ในโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3.25% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และใช้โพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 6.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตรในโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3.25 % ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.3.2.6

2.3.4 ศึกษาการแยกสารมาตรฐานบนเฟสอยู่กับที่ที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ

ในการทดลองนี้ได้เตรียมเฟสอยู่กับที่ชนิดลิควิดเฟส 4 ชนิด เคลือบเองในห้องปฏิบัติการโดยวิธีระเหย รายละเอียดวิธีการเคลือบได้แสดงไว้ในภาคผนวก บรรจุเฟสอยู่กับที่ลงในคอลัมน์แก้วขนาด 2.0 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) นำมาศึกษาความสามารถในการแยกสารมาตรฐาน เฟสอยู่กับที่ทั้ง 4 ชนิดได้แก่

5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช

10% Carbowax 20 M / 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช

5% Carbowax 20 M / 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช

และ 2% Carbowax 20 M / 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช

เตรียมสารละลายไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์และโพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐาน ในข้อ 2.3.1 ในสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ นำขวดสารละลายมาตรฐานที่ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมเย็บแน่น แช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ฉีดไอจากเฮดสเปซเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ แสดงสภาวะการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 6-8

ตารางที่ 6 แสดงสภาวะการทดลองเมื่อใช้ 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80 / 100 เมชเป็นเฟสอยู่กับที่

แก๊สโครมาโทกราฟ	Shimadzu GC 8A ต่อกับอินทิเกรเตอร์ C-R6A Chromatopac
คอลัมน์	2.0 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) คอลัมน์แก้ว บรรจุด้วย 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด80 /100 เมช
อุณหภูมิ : คอลัมน์	85 องศาเซลเซียส ไอโซเทอร์มัล
: หัวฉีด / ตัวตรวจวัด	140 องศาเซลเซียส
แก๊สพา	แก๊สไนโตรเจนอัตราเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อนาที
ตัวตรวจวัด	เฟลมไอออนไนเซชั่น
	อัตราเร็วแก๊สไฮโดรเจน : อากาศ เท่ากับ 1: 10
ไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลไรด์	6.8×10^{-3}, 1.4×10^{-2}, 3.4×10^{-2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร
ไดเมธิลเอมีน	7.7×10^{-1}, 1.9, 3.8 และ 1.2×10 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร
ปริมาตรตัวอย่าง	40 มิลลิลิตรในโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3.25%
สภาวะเฮดสเปซ	อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
ปริมาตรที่ฉีด	2.0 มิลลิลิตร

ตารางที่ 7 แสดงสภาวะการทดลองเมื่อใช้ 10% Carbowax 20 M / 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80 /100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่

แก๊สโครมาโทกราฟ	Shimadzu GC 8A ต่อกับอินทิเกรเตอร์ C-R6A Chromatopac
คอลัมน์	2.0 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) คอลัมน์แก้ว บรรจุด้วย 10% Carbowax 20M / 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด80 /100 เมช
อุณหภูมิ : คอลัมน์	70 องศาเซลเซียส ไอโซเทอร์มัล
:หัวฉีด / ตัวตรวจวัด	180 องศาเซลเซียส
แก๊สพา	แก๊สไนโตรเจนอัตราเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อนาที
ตัวตรวจวัด	เฟลมไอออนไนเซชั่น
	อัตราเร็วแก๊สไฮโดรเจน : อากาศ 1 : 10
ไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์	1.6×10^{-1} และ 9.6×10^{-2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร
ไดเมธิลเอมีน	1.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร
ปริมาตรตัวอย่าง	20 มิลลิลิตรในโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 32.5%
สภาวะเฮดสเปซ	อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
ปริมาตรที่ฉีด	2.0 มิลลิลิตร

สภาวะการทดลองเมื่อใช้ 5% Carbowax 20 M / 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่ ใช้สภาวะดังแสดงในตารางที่ 6 เตรียมสารละลายมาตรฐานไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 6.8, 1.4 และ 3.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ไดเมธิลเอมีนเข้มข้น 1.8 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร และ โพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร

เมื่อใช้ 2% Carbowax 20 M / 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่ ใช้สภาวะการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงสภาวะการทดลองเมื่อใช้ 2% Carbowax 20 M/ 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/ 100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่

แก๊สโครมาโทกราฟ	Shimadzu GC 8A ต่อกับอินทิเกรเตอร์ C-R6A Chromatopac
คอลัมน์	2.0 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) คอลัมน์แก้ว บรรจุด้วย 2% Carbowax 20 M/ 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80 /100 เมช
อุณหภูมิ : คอลัมน์	60 องศาเซลเซียส ไอโซเทอร์มัล
: หัวฉีด / ตัวตรวจวัด	110 องศาเซลเซียส
แก๊สพา	แก๊สไนโตรเจนอัตราเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อนาที
ตัวตรวจวัด	เฟลมไอออนไนเซชั่น
	อัตราเร็วแก๊สไฮโดรเจน : อากาศ 1 : 10
ไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์	6.8×10^{-2} , 1.4×10^{-1} , 1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร
ไดเมธิลเอมีน	5×10^{-1} และ 1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร
โพรพิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์	1.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร
ปริมาตรตัวอย่าง	40 มิลลิลิตรในโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3.25%
สภาวะเฮดสเปซ	อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
ปริมาตรที่ฉีด	2.0 มิลลิลิตร

2.3.5 ศึกษาปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างในสองสภาวะที่แตกต่างกัน

ทำการทดลองติดตามปริมาณไดเมธิลเอมีนและ ไตรเมธิลเอมีนในปลา เมื่อเก็บรักษาที่ 2 สภาวะต่างกัน ปลาที่ใช้ในการทดลองเป็นปลาสำลีที่ซื้อจากตลาดสด เนื่องจากไม่สามารถทราบได้ว่าปลาที่ซื้อมานั้นจับได้จริงตั้งแต่เมื่อไร จึงกำหนดให้วันที่ซื้อมาวันแรกเป็นวันที่ศูนย์ เตรียมตัวอย่างปลาโดยแล่เนื้อส่วนที่รับประทานได้ นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนัก บรรจุลงในขวด ขวดละ 20 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร จำนวน 51 ขวด แบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 ชุด ชุดที่หนึ่งและสอง ชุดละ 24 ขวด ชุดที่หนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ชุดที่สองเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 - 10 องศาเซลเซียส เมื่อจะวิเคราะห์ ปิดจุกยางเย็บฝาอลูมิเนียม ทำการทดลองและใช้สภาวะการทดลองเดียวกัน กันกับข้อ 2.3.2.6 เพื่อติดตามปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างทั้ง 2 ชุด เป็นเวลานาน 16 วัน โดยฉีดวันเว้นวัน ข้อมูลของวันแรกเก็บข้อมูลจากตัวอย่างชุดที่สามซึ่งมี 3 ขวด เป็นตัวอย่างเดียวกับวันที่ซื้อมาจากตลาดหลังจากเตรียมตัวอย่างเสร็จ

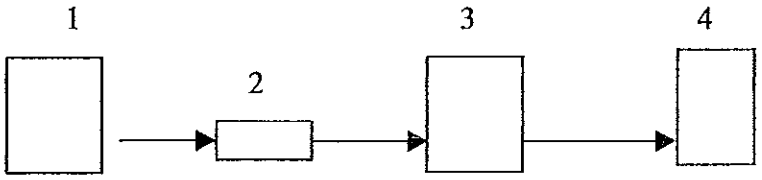
2.3.6 ศึกษาปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างอาหารทะเลสดและอาหารทะเลแช่แข็ง

เตรียมตัวอย่างปลาสด ปลาแช่แข็ง กุ้ง ปลาหมึก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งตัวอย่างบรรจุลงในขวด ขวดละ 20 กรัม พร้อมบันทึกน้ำหนัก เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปิดจุกยางและฝาอลูมิเนียมเย็บแน่น แช่ขวดในอ่างน้ำร้อนปรับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที ฉีดไอจากบริเวณเฮดสเปซปริมาตร 2 มิลลิลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ เพื่อศึกษาปริมาณไดเมธิลเอมินและไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่าง โดยใช้คอลัมน์วิเคราะห์ชนิด 4% Carbowax 20 M / 0.8 % KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช และChromosorb103 ขนาด 80 /100 เมช สภาวะการทดลองจากข้อ 2.3.2.6 และ 2.3.3.3 ตามลำดับ และหาปริมาณเบสทั้งหมดที่ระเหยได้ (Total Volatile Base : TVB) เปรียบเทียบผลที่ได้

2.3.6 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยหลอดบรรจุตัวดูดซับ (adsorbent tube)

เตรียมสารละลายมาตรฐานไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 และ 1.3×10^{-3} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ต่อหลอดบรรจุตัวดูดซับเข้ากับเครื่องปั๊มดังแสดงเป็นบล็อคไดอะแกรมในภาพประกอบที่ 2 ภายในหลอดบรรจุซิลิกา เจล 40 เป็นตัวดูดซับ (อธิบายวิธีเตรียมในภาคผนวก) เปิดเครื่องดูดอากาศให้ไอระเหยของสารละลายมาตรฐานไหลผ่านหลอดบรรจุตัวดูดซับ ด้วยอัตราเร็ว 25 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลานาน 16 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดดึงทิวบ์ออก ถ่ายซิลิกาเจลลงในขวด (vial) ใบใหม่ ซึ่งภายในบรรจุโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3.25 % 40 มิลลิลิตร รีบปิดจุกยางและฝาอลูมิเนียมเย็บฝาให้แน่น แช่ขวดในอ่างน้ำร้อนปรับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ฉีดไอจากบริเวณแฮดสเปซเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

เตรียมตัวอย่างปลาทู แล่เอาเฉพาะเนื้อปลาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปิดจุกยางและฝาอลูมิเนียมเย็บแน่น ดำเนินการเช่นเดียวกับกับการเตรียมสารมาตรฐานให้เข้มข้นขึ้นด้วยหลอดบรรจุตัวดูดซับ ใช้คอลัมน์วิเคราะห์ชนิด 4% Carbowax 20 M / 0.8 % KOH on Carbopak B ขนาด 60/ 80 เมช สภาวะการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.3.2.6



ภาพประกอบที่ 2 แสดงบล็อคไดอะแกรมการเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยใช้หลอดบรรจุตัวดูดซับ

1 แทน ขวด (vial) ใส่สารละลายมาตรฐาน / ตัวอย่าง

2 แทน หลอดบรรจุตัวดูดซับที่ตัดปลายออกทั้ง 2 ด้าน

3 แทน โรตามิเตอร์

4 แทน อุปกรณ์เก็บตัวอย่างอากาศ

บทที่ 3

ผล

3.1 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

จากการเตรียมสารละลายไตรเมธิลเอมีน โพรพิลเอมีน และไดเมธิลเอมีนตามวิธีในข้อ 2.3.1.1, 2.3.1.2 และ 2.3.1.3 และคำนวณปริมาณไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบ ผลที่ได้นำมาคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

สารมาตรฐาน	%ไนโตรเจน ที่เป็นองค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มก.-ไนโตรเจนต่อลิตร)
สารละลายไตรเมธิลเอมีน	0.1375	1,375
สารละลายโพรพิลเอมีน	0.1264	1,264
สารละลายไดเมธิลเอมีน	12.0093	120,093

3.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารมาตรฐานเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิด 4% Carbowax 20M/ 0.8% KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช

3.2.1 ผลการศึกษาอัตราเร็วที่เหมาะสมของแก๊สพา

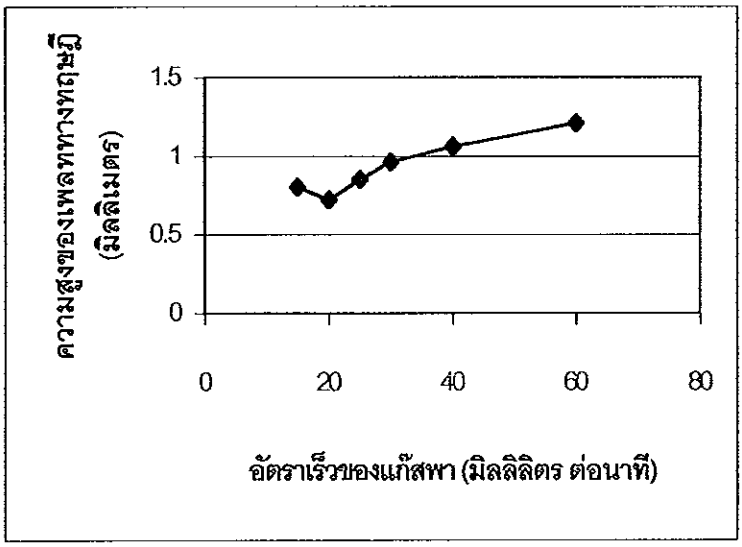
จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 เมื่อนำความสูงและพื้นที่ใต้พีกมาคำนวณหาค่าความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง (bandwidth at half-height, $W_{0.5}$) จำนวนเพลททางทฤษฎี (Theoretical plate number) และความสูงของเพลททางทฤษฎี (Height of theoretical plates) นำค่าความสูงของเพลททางทฤษฎีที่อัตราเร็วต่าง ๆกันของแก๊สพา

มาเขียนกราฟแวนดีมเตอร์ จะหาอัตราเร็วของแก๊สพาที่เหมาะสมได้ที่ 20 มิลลิลิตรต่อนาที ดังแสดงข้อมูลจากการคำนวณในตารางที่ 10 และแสดงกราฟแวนดีมเตอร์ในภาพประกอบที่ 3

ตารางที่ 10 แสดงอัตราเร็วของแก๊สพาและความสูงของเพลททางทฤษฎี

อัตราเร็วของแก๊สพา (มิลลิลิตรต่อนาที)	ความสูงของเพลททางทฤษฎี (มิลลิเมตร)*
15	0.8
20	**0.7**
25	0.8
30	1.0
40	1.1
60	1.2

N=3 , %RSD ไม่เกิน 5%



ภาพประกอบที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของแก๊สพากับความสูงของเพลททางทฤษฎีของไตรเมธิลเอมีน

3.2.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกและตรวจวัด

ทดลองแยกสารมาตรฐาน 3 ชนิด ใช้อัตราเร็วของแก๊สพา 20 มิลลิลิตร ต่อนาที อุณหภูมิการแยกที่ 60 – 85 องศาเซลเซียส ดังสภาวะการทดลองข้อ 2.3.2.2 พบว่า อุณหภูมิการแยกที่เหมาะสมที่สุดคือ 75 องศาเซลเซียส โดยมีรีเทนชั่นไทม์ (retention time) ของไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีน และโพรพิลเอมีนเท่ากับ 4.7, 7.3 และ 16.7 นาที ตามลำดับ ค่าการแยก (resolution) ระหว่างไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนเท่ากับ 3.45 แสดงผลในตารางที่ 11 และ 12 และแสดงโครมาโทแกรมในภาพประกอบที่ 4

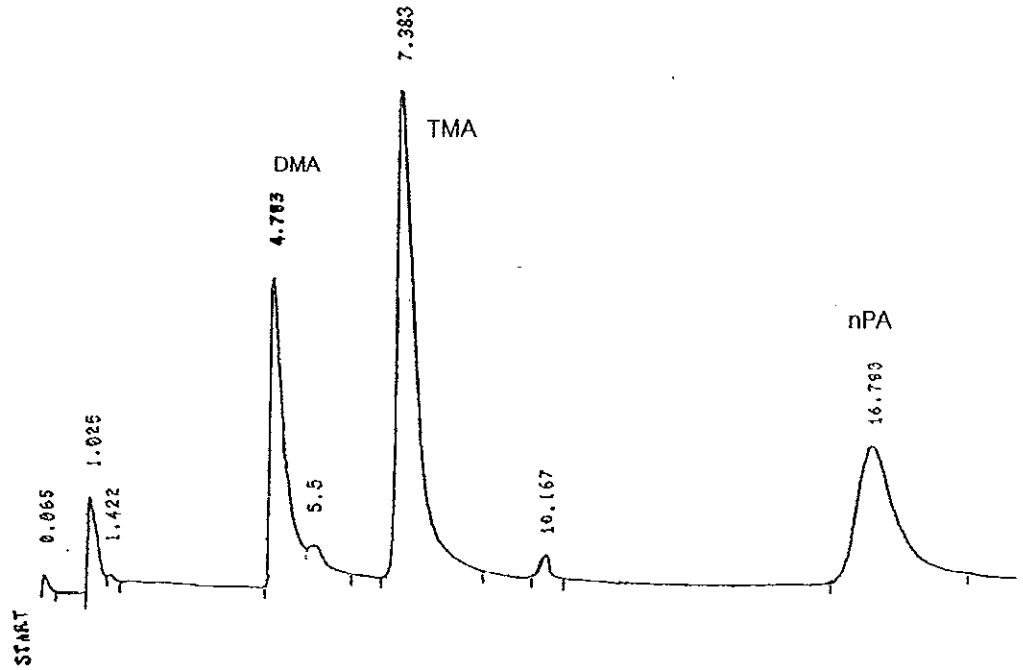
ตารางที่ 11 แสดงผลการแยกสารละลายมาตรฐาน เมื่อใช้อุณหภูมิคอลัมน์ 60 – 85 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิคอลัมน์	อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกระหว่างไดเมธิลเอมีนกับโพรพิลเอมีน	อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกระหว่างไตรเมธิลเอมีนกับโพรพิลเอมีน	ค่าการแยก	หมายเหตุ
60	0.35	1.75	3.83	-
70	0.38	1.55	3.77	-
75	**0.36**	**1.34**	**3.45**	**-**
80	0.31	1.72	3.20	เทลลิ่งพีก
85	0.27	1.64	2.98	เทลลิ่งพีก

จากการศึกษาอุณหภูมิตรวจวัดที่เหมาะสม ในช่วง 110 – 140 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิตรวจวัดที่เหมาะสม เนื่องจากให้อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกระหว่างไดเมธิลเอมีนกับโพรพิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนกับโพรพิลเอมีนสูงที่สุด ดังผลการทดลองในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงอัตราส่วนของพื้นที่พีกระหว่างไดเมธิลเอมีน และ ไตรเมธิลเอมีนกับโพรพิลเอมีนที่อุณหภูมิตรวจวัด 110 –140 องศาเซลเซียส

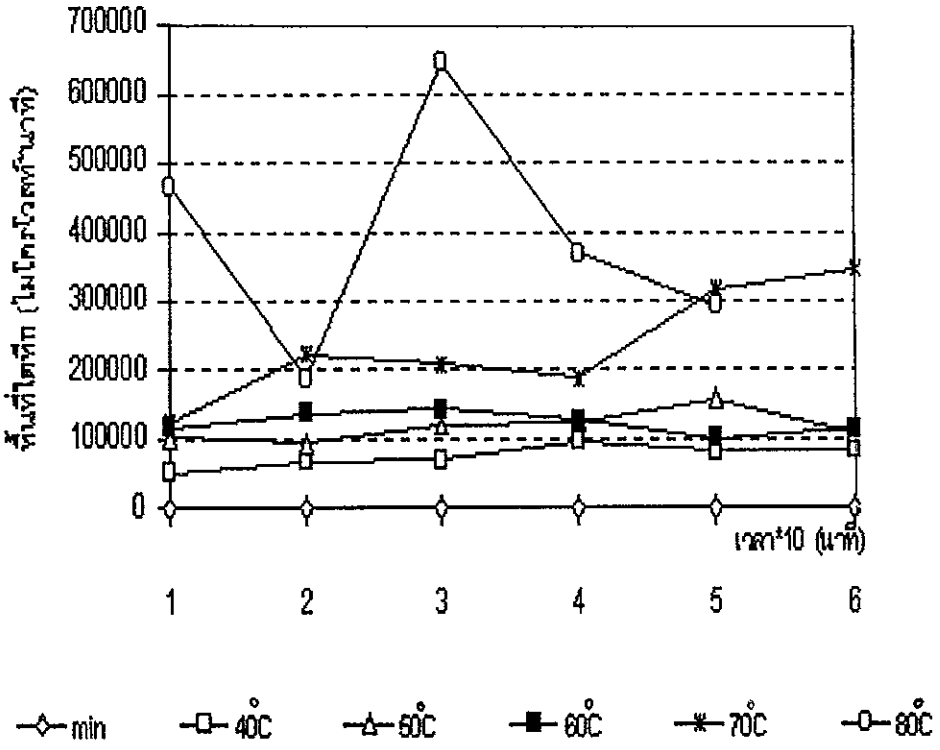
อุณหภูมิตรวจวัด	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกระหว่างไดเมธิลเอมีนกับโพรพิลเอมีน	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกระหว่างไตรเมธิลเอมีนกับโพรพิลเอมีน
110	**0.78**	**1.75**
120	0.70	1.54
130	0.76	1.15
140	เบสไลน์ไม่เรียบ	



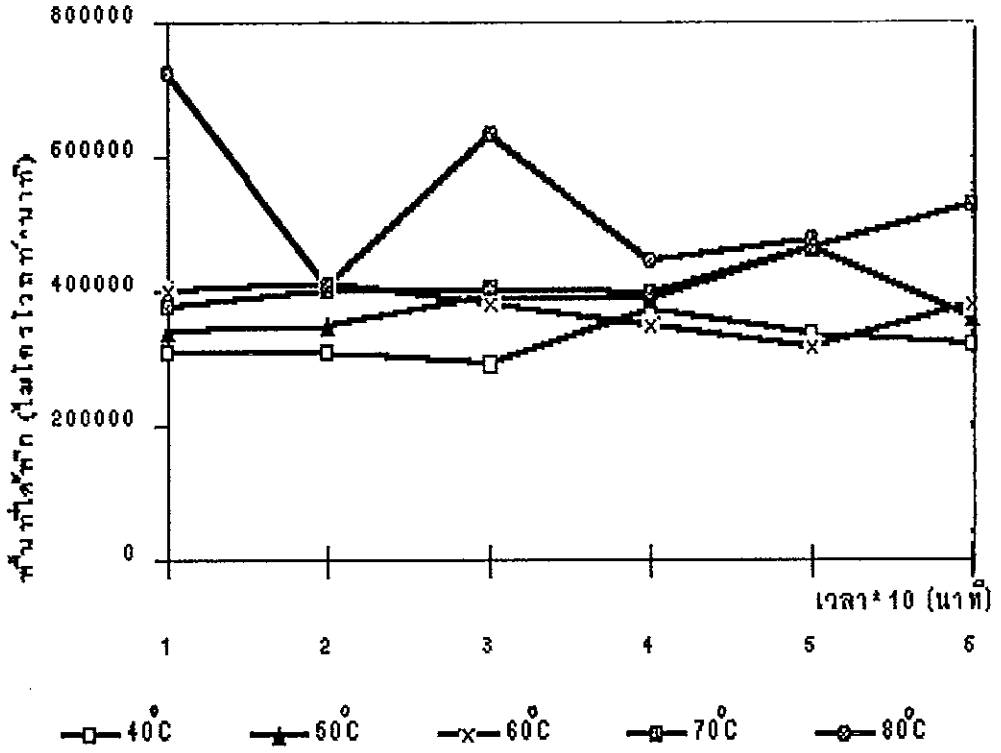
ภาพประกอบที่ 4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและโพรพิลเอมีน เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ 2 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) 4% Carbowax 20M / 0.8% KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช

3.2.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเฮดสเปซ

จากสภาวะการทดลองข้อ 2.3.2.3 พบว่าเมื่อนำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพื้นที่ใต้พีก อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมเฮดสเปซ คือ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ดังแสดงในภาพประกอบที่ 5 และ 6



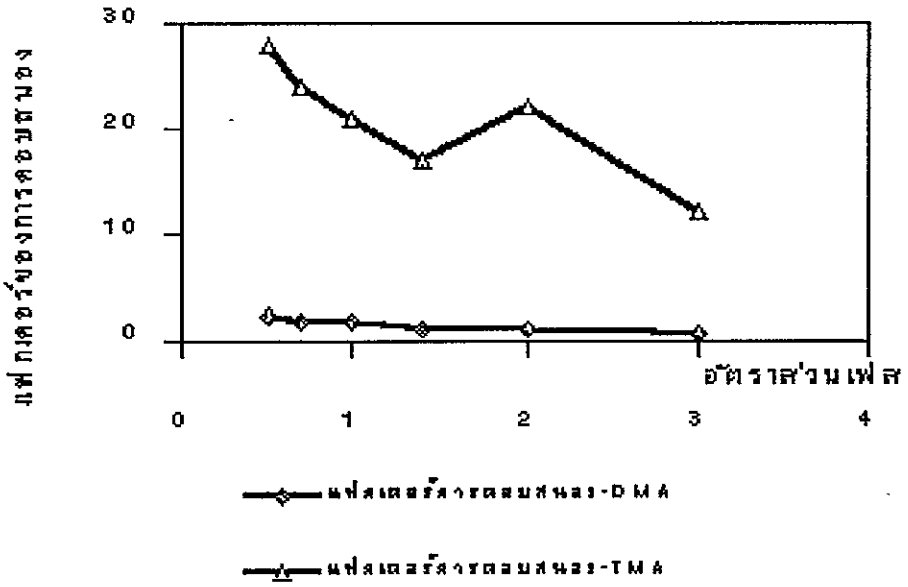
ภาพประกอบที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกไตรเมธิลเอมีนในเฮดสเปซที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ



ภาพประกอบที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกไดเมธิลเอมีนในเฮดสเปซ ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

3.2.4 ผลการศึกษาปริมาตรตัวอย่างที่เหมาะสม

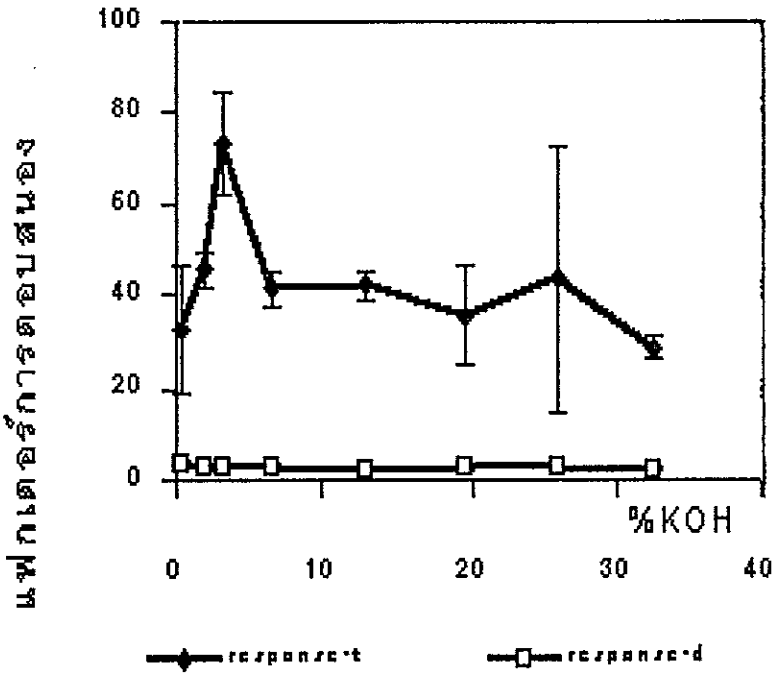
จากการทดลองศึกษาปริมาตรตัวอย่างที่เหมาะสมตามสภาวะข้อ 2.3.2.4 นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณแฟกเตอร์การตอบสนองที่อัตราส่วนเฟสต่าง ๆ กัน ในขณะที่ใช้สารมาตรฐานที่มีมวลสารคงที่ค่าหนึ่ง เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างอัตราส่วนเฟสกับแฟกเตอร์การตอบสนอง โดยให้แกน x แทนอัตราส่วนเฟส และแกน y แทนแฟกเตอร์การตอบสนอง พบว่าอัตราส่วนเฟสที่เหมาะสมคือ 0.5 คือต้องใช้ปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 40 มิลลิลิตร ในขวดบรรจุ (vial) ขนาด 60 มิลลิลิตร เนื่องจากที่อัตราส่วนเฟสค่านี้จะให้แฟกเตอร์การตอบสนองสูงที่สุด ดังแสดงในภาพประกอบที่ 7



ภาพประกอบที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสกับแฟกเตอร์การตอบสนอง

3.2.5 ผลการศึกษาสัดส่วนของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม

จากการทดลองตามสภาวะข้อ 2.3.2.5 เมื่อทดลองใช้โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์สัดส่วนต่าง ๆกัน นำผลที่ได้มาคำนวณแฟกเตอร์การตอบสนอง เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์กับแฟกเตอร์การตอบสนองพบว่า ใช้โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3.25 % จะให้แฟกเตอร์ของสัญญาณดีที่สุด ดังแสดงผลการทดลองในภาพประกอบที่ 8



ภาพประกอบที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์กับแฟกเตอร์การตอบสนอง

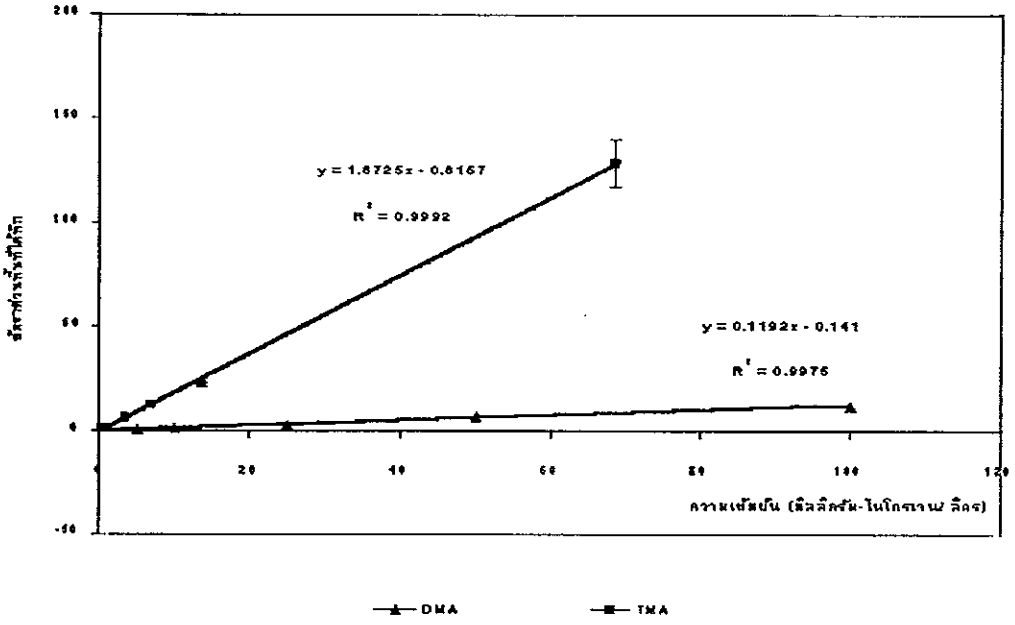
3.2.6 ผลการศึกษาการตอบสนองเชิงเส้น กราฟมาตรฐาน และค่าขีดจำกัดการตรวจวัด

จากการทดลองตามสภาวะข้อ 2.3.2.6 พบว่าเมื่อนำอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกระหว่างสารมาตรฐานกับโพรพิลเอมีนมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ โดยให้แกน x แทนค่าของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และแกน y แทนอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความสัมพันธ์ตามสมการ $y = mx + b$ ดังแสดงในตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่า ไดเมธิลเอมีนให้การตอบสนองเชิงเส้น ในช่วงความเข้มข้น 3×10^{-1} ถึง 3×10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร และไตรเมธิลเอมีนให้การตอบสนองเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 1.4×10^{-2} ถึง 1.4×10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร

ตารางที่ 13 แสดงสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับสัญญาณตอบสนอง สัมพัทธ์ของไดเมธิลเอมีนต่อโพรพิลเอมีน และไตรเมธิลเอมีนต่อโพรพิลเอมีน

สารมาตรฐาน	สมการความสัมพันธ์	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
ไดเมธิลเอมีน	y = 0.091x - 0.0402	1.0000
ไตรเมธิลเอมีน	y = 1.0967x + 1.7251	0.9984

จากการตอบสนองเชิงเส้นดังกล่าว เตรียมกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่กำหนด โดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีก จะได้กราฟมาตรฐานของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนดังแสดงในภาพประกอบที่ 9



ภาพประกอบที่ 9 กราฟมาตรฐานของ (ก)ไดเมธิลเอมีน และ (ข)ไตรเมธิลเอมีน

เมื่อนำความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละชนิดและความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่แต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ โดยให้แกน x แทนความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แกน y แทนความเบี่ยงเบนมาตรฐาน จะได้สมการความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง จากสมการดังกล่าวเมื่อแทนค่า x เป็น 0 จะคำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ x = 0 (s_0) และค่าขีดจำกัดการตรวจวัดได้ ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงค่า s_0 และค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน

สารมาตรฐาน	สมการความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นกับความเบี่ยงเบนมาตรฐาน	s_0	ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด
ไดเมธิลเอมีน	$y = 0.0085x - 0.0581$, $r^2 = 0.9965$	0.0581	0.17
ไตรเมธิลเอมีน	$y = 0.0624x + 0.0546$, $r^2 = 0.9994$	0.0546	0.16

3.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารมาตรฐานเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิด Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช

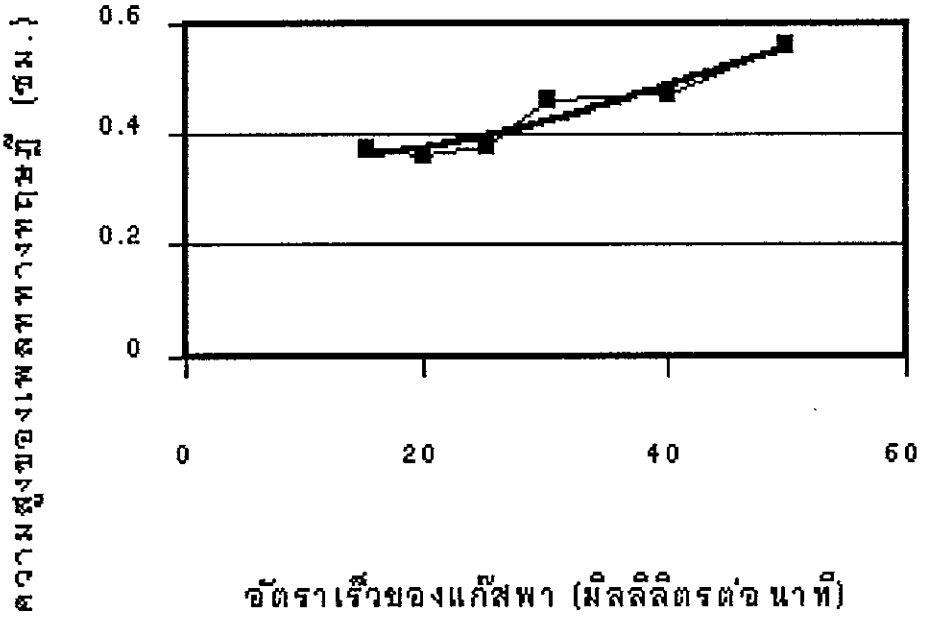
3.3.1 ผลการศึกษาอัตราเร็วแก๊สพาที่เหมาะสม

จากการทดลอง ข้อ 2.3.3.1 พบว่าอัตราเร็วแก๊สพาที่เหมาะสมสำหรับเฟสอยู่กับที่ชนิด Chromosorb 103 80/100 เมช เท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที ดังแสดงผลในตารางที่ 15 และกราฟแวนดีมเตอร์ในภาพประกอบที่ 10

ตารางที่ 15 แสดงอัตราเร็วของแก๊สพาและความสูงของเพลททางทฤษฎี

อัตราเร็วของแก๊สพา (มิลลิลิตรต่อนาที)	ความสูงของเพลททางทฤษฎี (เซนติเมตร)*
15	0.37
20	**0.36**
25	0.38
30	0.46
40	0.47
50	0.56

*n=3 ,%RSD ไม่เกิน 5%



ภาพประกอบที่ 10 กราฟแวนดีมเตอร์ ของไตรเมธิลเอมีนเมื่อใช้ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่

3.3.1 ผลการศึกษาอุณหภูมิการแยกและตรวจวัดที่เหมาะสม

จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 พบว่าอุณหภูมิการแยกไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนที่เหมาะสมคือที่ 120 องศาเซลเซียส โดยมีลำดับการแยกลำดับที่1 2 และ3 คือ ไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีน และโพรพิลเอมีน มีรีเทนชั่นไทม์ 7.8, 10.2, และ 23.3 นาที ตามลำดับ แสดงผลการทดลองที่ได้ในรูปอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกในตารางที่ 16

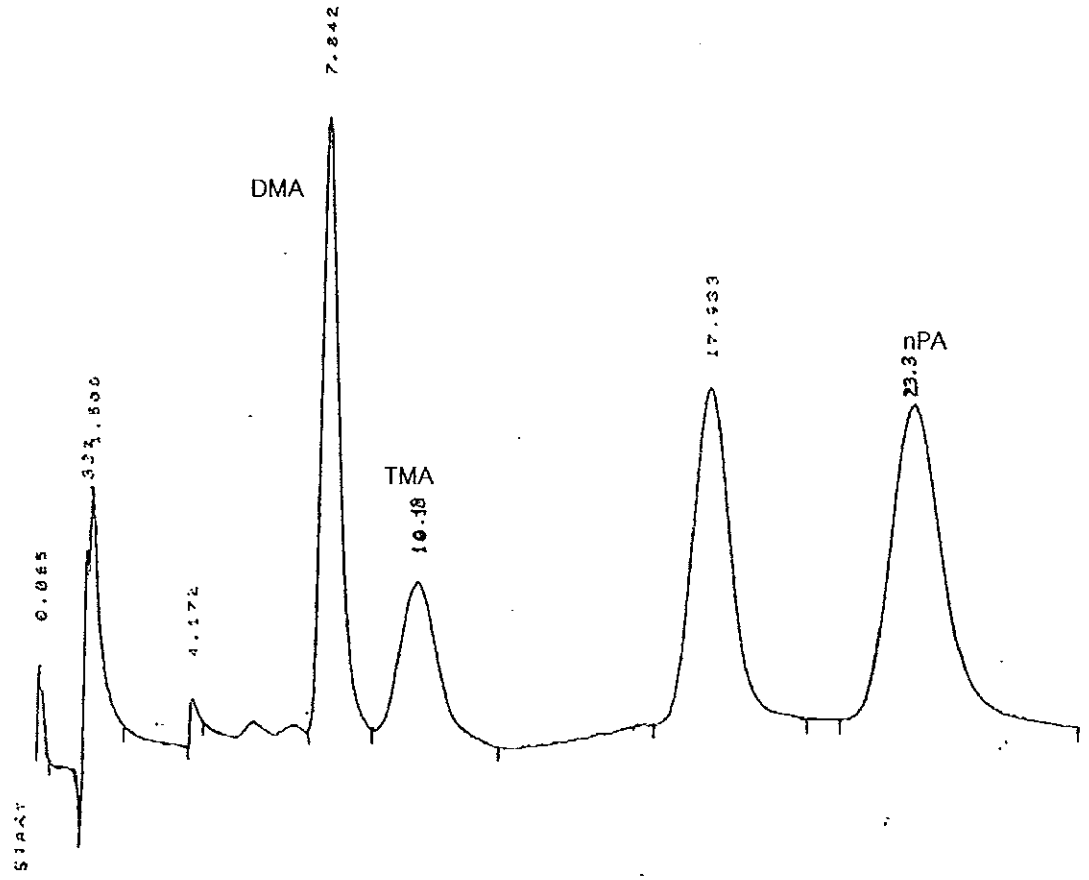
ตารางที่ 16 แสดงผลการแยกสารละลายมาตรฐานเมื่อใช้อุณหภูมิคอลัมน์ 120 - 135 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิคอลัมน์	อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีก (DMA/ nPA)	อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีก (TMA/ nPA)	ค่าการแยก	หมายเหตุ
120	**0.22**	**0.54**	**1.34**	-
125	0.18	0.30	1.29	เทลลิ่งพีก
130	0.17	0.34	1.19	-
135	0.32	0.22	1.39	เบสไลน์ไม่เรียบ

สำหรับอุณหภูมิตรวจวัดที่เหมาะสม จากการทดลองใช้อุณหภูมิตรวจวัดที่ 170 – 210 องศาเซลเซียสได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 17 สภาวะที่เหมาะสมคือ 120 /170 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีกของไดเมธิลเอมีน / โพรพิลเอมีน และไตรเมธิลเอมีน / โพรพิลเอมีน สูงที่สุด และแสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานในภาพประกอบที่11

ตารางที่ 17 แสดงผลอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกเมื่อใช้อุณหภูมิตรวจวัด 170 –210 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิคอลัมน์/อุณหภูมิตรวจวัด (องศาเซลเซียส)	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก (ไดเมธิลเอมีน /โพรพิลเอมีน)	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก (ไตรเมธิลเอมีน /โพรพิลเอมีน)
120 / 170	**0.22**	**0.54**
120 / 180	0.21	0.40
120 / 190	0.17	0.34
120 / 200	0.17	0.28
120 / 210	0.14	0.33



ภาพประกอบที่ 11 แสดง โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ 2 ม. × 2.6 มม.(เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) บรรจุ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่

3.3.2 ผลการศึกษาการตอบสนองเชิงเส้น กราฟมาตรฐาน และค่าขีดจำกัดการตรวจวัด

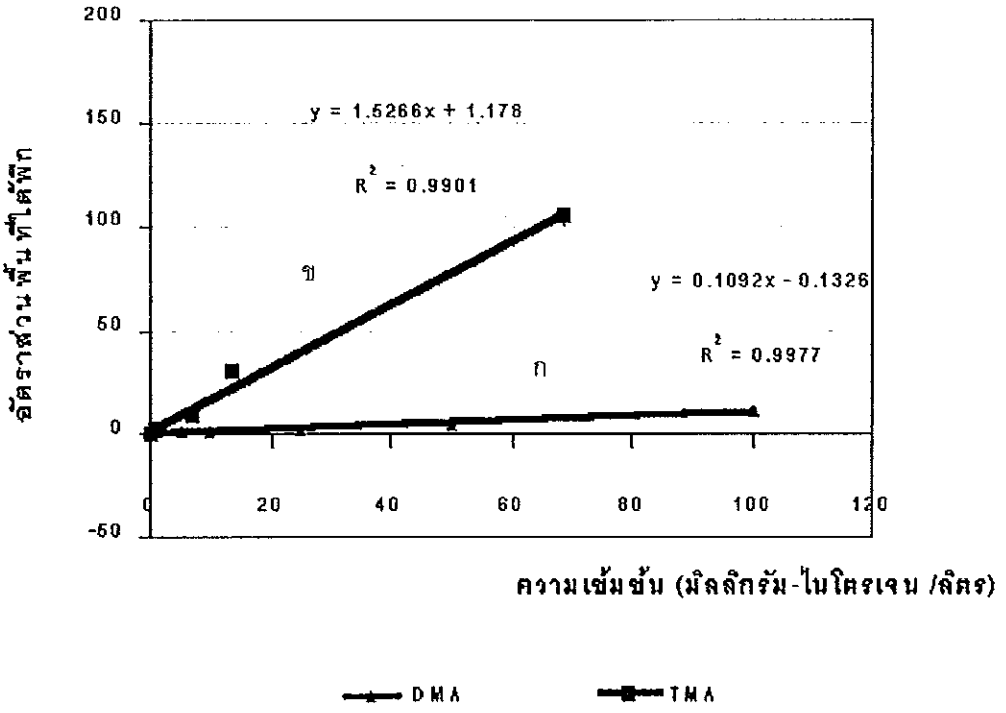
จากการทดลองตามสภาวะข้อ 2.3.3.3 พบว่าเมื่อนำอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกระหว่างสารมาตรฐานกับโพรพิลเอมีนมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ โดยให้แกน x แทนค่าของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และแกน y แทนอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความสัมพันธ์ตามสมการ $y = mx + b$ ดังแสดงในตารางที่ 18

แสดงให้เห็นว่า ไดเมธิลเอมีนให้การตอบสนองเชิงเส้น ในช่วงความเข้มข้น 3×10^{-1} ถึง 3×10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร และไตรเมธิลเอมีนให้การตอบสนองเชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 1.4×10^{-2} ถึง 1.4×10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร

ตารางที่ 18 แสดงสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับสัญญาณตอบสนอง สัมพัทธ์ของไดเมธิลเอมีนต่อโพรพิลเอมีน และไตรเมธิลเอมีนต่อโพรพิลเอมีน

สารมาตรฐาน	สมการความสัมพันธ์	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
ไดเมธิลเอมีน	$y = 0.1032 x + 0.0291$	0.9999
ไตรเมธิลเอมีน	$Y = 1.5312 x + 0.8456$	0.9996

จากการตอบสนองเชิงเส้นดังกล่าว เตรียมกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่กำหนด โดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีก ดังแสดงในภาพประกอบที่ 12



ภาพประกอบที่ 12 แสดงกราฟมาตฐานของ (ก) ไดเมธิลเอมีนและ (ข)ไตรเมธิลเอมีน เมื่อใช้ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมชเป็นเฟสอยู่กับที่

เมื่อนำความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละชนิดและความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่แต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ โดยให้แกน x แทนความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แกน y แทนความเบี่ยงเบนมาตรฐาน จะได้สมการความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง จากสมการดังกล่าวเมื่อแทนค่า x เป็น 0 จะคำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเมื่อ $x = 0$ (s_0) และค่าขีดจำกัดการตรวจวัดได้ ดังแสดงในตารางที่ 19

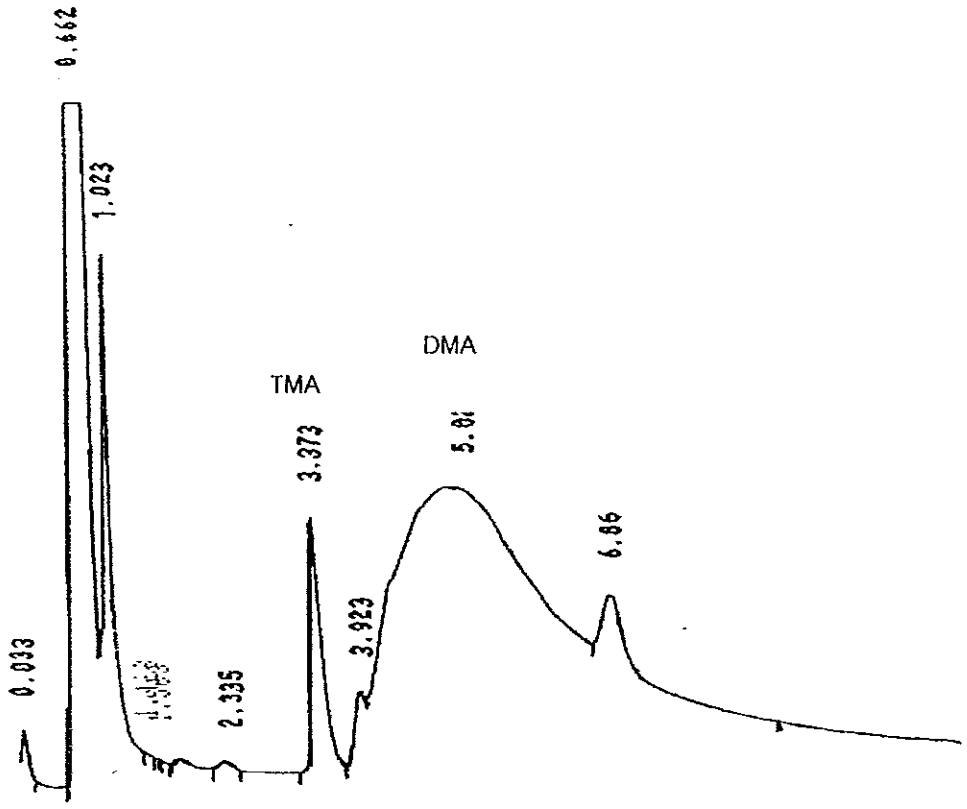
ตารางที่ 19 แสดงค่า s_0 และค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน

สารมาตรฐาน	สมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับความเบี่ยงเบนมาตรฐาน	s_0	ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด
ไดเมธิลเอมีน	$Y = 0.051x - 0.4995$, $r^2 = 0.9919$	0.4995	1.5
ไตรเมธิลเอมีน	$Y = 0.3657x - 0.8047$, $r^2 = 0.997$	0.8047	2.4

3.4 ผลการแยกสารมาตรฐานด้วยเฟสอยู่กับที่ที่เตรียมเอง

3.4.1 เฟสอยู่กับที่ 5% KOH on Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช ในคอลัมน์แก้ว ยาว 2 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน)

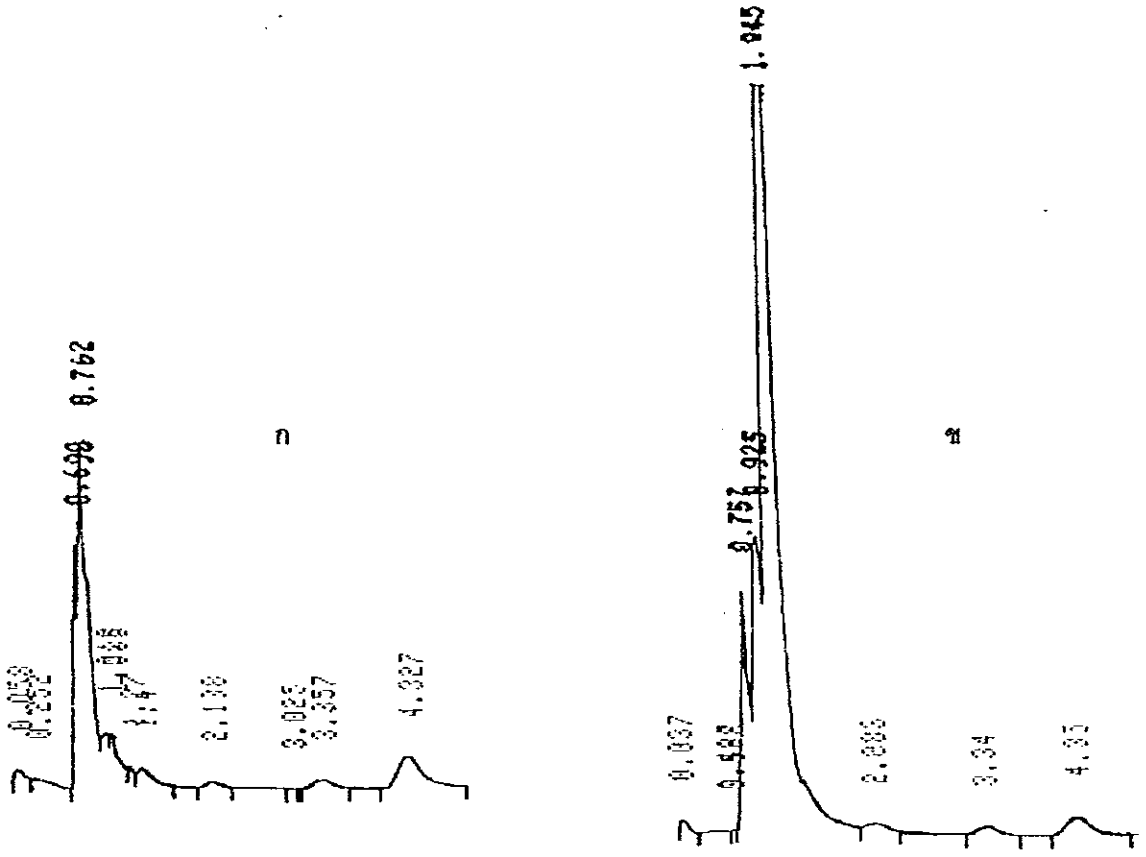
เมื่อทดลองแยกไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน ได้ผลดังแสดงในโครมาโทแกรมในภาพประกอบที่13 ซึ่งเห็นได้ว่าเฟสอยู่กับที่ชนิดนี้ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้แยกไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน แม้ว่าจะให้พีกไตรเมธิลเอมีนที่มีลักษณะสมมาตร แต่พีกไดเมธิลเอมีนที่ได้มีลักษณะเป็นพีกกว้าง (broad peak) และไม่ให้สัญญาณของโพรพิลเอมีน



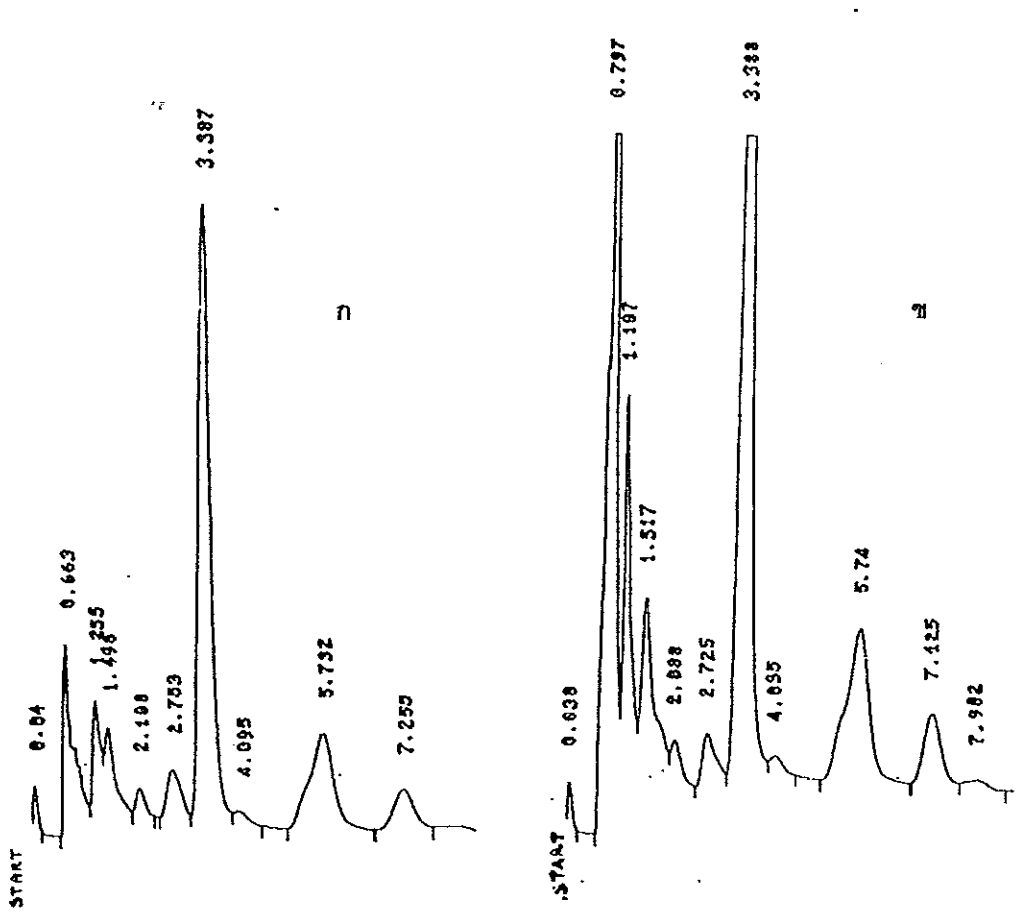
ภาพประกอบที่ 13 โครมาโทแกรมของไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและโพรพิลเอมีน เมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช ในคอลัมน์แก้วยาว 2 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน)

3.4.1 เฟสอยู่กับที่ 5% KOH / 10% Carbowax 20M บน Chromosorb W 5% KOH / 5% Carbowax 20M บน Chromosorb W และ 5% KOH / 2% Carbowax 20M บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช ในคอลัมน์แก้วยาว 2 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน)

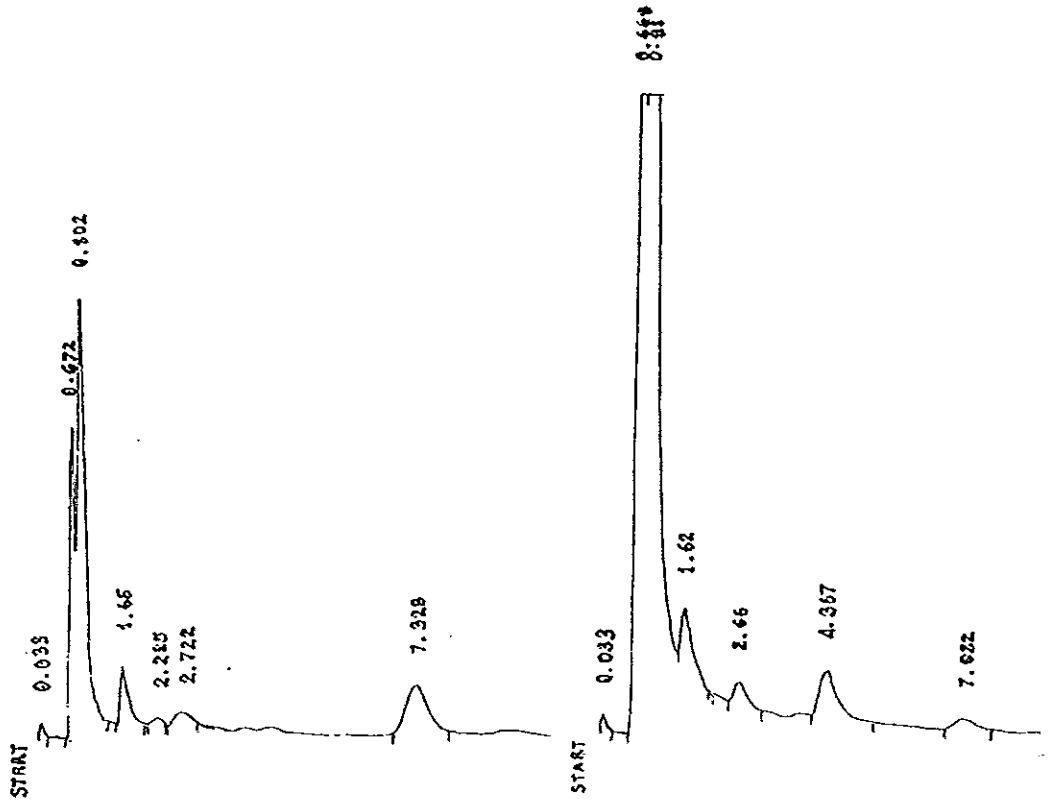
จากการใช้เฟสอยู่กับที่ทั้งสามชนิดแยกสารมาตรฐาน พบว่าเฟสอยู่กับที่ทั้งสามชนิดนี้ไม่เหมาะ เนื่องจากไม่สามารถแยกไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนออกจากกันอย่างสมบูรณ์ มีค่าการแยกต่ำมาก และให้พีกเร็วเกินไปดังแสดงในภาพประกอบที่ 14 15 และ 16



ภาพประกอบที่ 14 โครมาโทแกรมของไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและโพรพิลเอมีนเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ 5% KOH /10% Carbowax 20M on Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช ในคอลัมน์แก้วยาว 2 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) (ก) 3.25% KOH (ข) สารมาตรฐานใน 3.25 %KOH



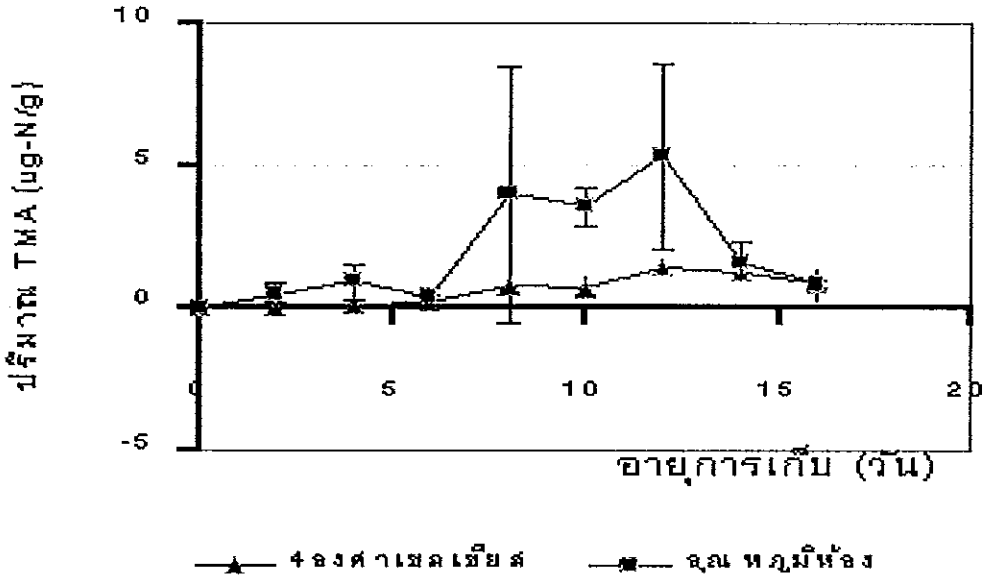
ภาพประกอบที่ 15 โครมาโทแกรมของไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและโพรพิลเอมีน
เมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ 5% KOH / 5% Carbowax 20M on Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช ในคอลัมน์แก้วยาว 2 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน)
(ก) 3.25 %KOH และ (ข) สารมาตรฐานใน 3.25 %KOH



ภาพประกอบที่ 16 โครมาโทแกรมของไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและโพรพิลเอมีน เมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ 5% KOH/ 2% Carbowax 20M on Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช ในคอลัมน์แก้วยาว 2 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) (ก) 3.25%KOH และ (ข) สารมาตรฐานใน 3.25 %KOH

3.5 ผลการศึกษาปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างที่เก็บรักษาที่สองสภาวะแตกต่างกัน

จากการทดลองเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ติดตามปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนดังรายละเอียดในการทดลองที่ 2.3.5 พบว่าตรวจไม่พบไดเมธิลเอมีนทั้งสองสภาวะ ขณะที่ไตรเมธิลเอมีนที่ตรวจพบ มีปริมาณเพิ่มขึ้น แล้วค่อย ๆลดลงหลังวันที่ 12 ของการเก็บเมื่อรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังวันที่ 6 ของการเก็บเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และเริ่มลดลงในวันที่ 12 ของการเก็บ ดังแสดงในกราฟภาพประกอบที่17



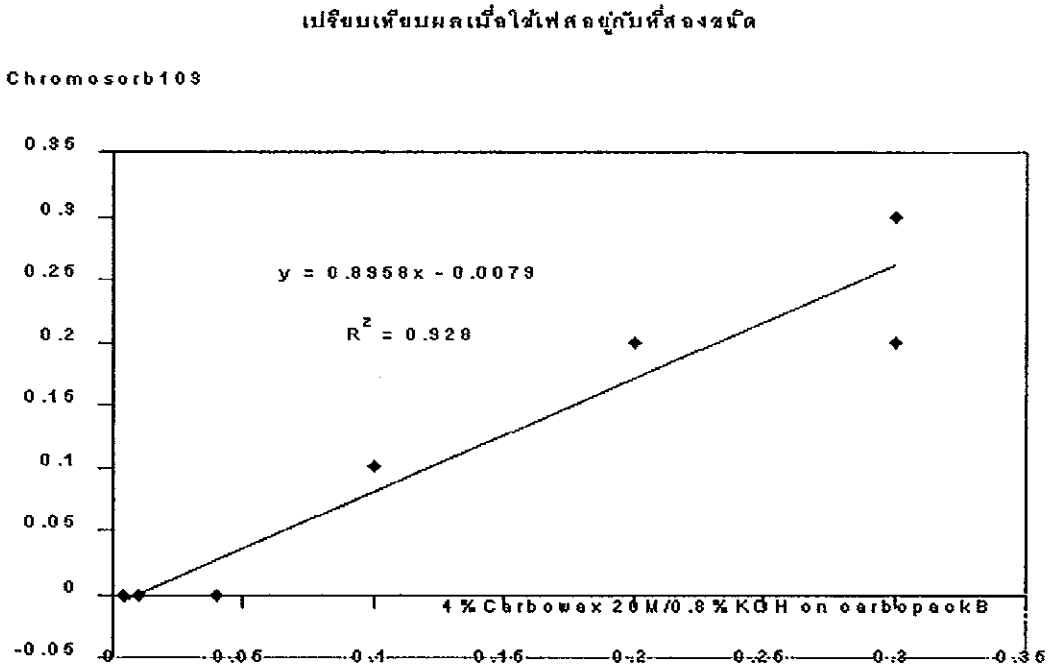
ภาพประกอบที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไตรเมธิลเอมีนกับระยะเวลาการเก็บที่สองสภาวะแตกต่างกัน

3.6 ผลการศึกษาปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างอาหารทะเลสดและแช่เยือกแข็ง เมื่อใช้เฟสอยู่กับที่สองชนิดต่างกัน

จากการทดลองที่ 2.3.6 ตรวจพบปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนและปริมาณเบสทั้งหมดที่ระเหยได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงผลการศึกษาปริมาณไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและปริมาณเบสทั้งหมดที่ระเหยได้

ตัวอย่าง	ปริมาณไดเมธิลเอมีน (ไมโครกรัม-ไนโตรเจนต่อกรัม)		ปริมาณไตรเมธิลเอมีน (ไมโครกรัม-ไนโตรเจนต่อกรัม)		ปริมาณเบสทั้งหมดที่ระเหยได้ (มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อ100 กรัม)
	4%Carbowax 20M /0.8KOH บน Carbopack B	Chromosorb103	4%Carbowax 20M /0.8KOH บน Carbopack B	Chromosorb103	
ปลาทู (สด)	3.9	9.9	0.3	0.2	36
ปลาทู (สด)	ไม่พบ	ไม่พบ	0.1	0.1	36
ปลาตาโต(แช่เยือกแข็ง)	0.6	ไม่พบ	0.01	ไม่พบ	26
ปลาตาโต(แช่เยือกแข็ง)	0.7	ไม่พบ	0.01	ไม่พบ	24
ปลาตาโต (สด)	ไม่พบ	ไม่พบ	0.2	0.2	34
ปลาตาโต (สด)	ไม่พบ	ไม่พบ	0.04	ไม่พบ	36
กุ้ง (สด)	ไม่พบ	ไม่พบ	0.004	ไม่พบ	29
ปลาหมึก (สด)	ไม่พบ	ไม่พบ	0.3	0.3	37

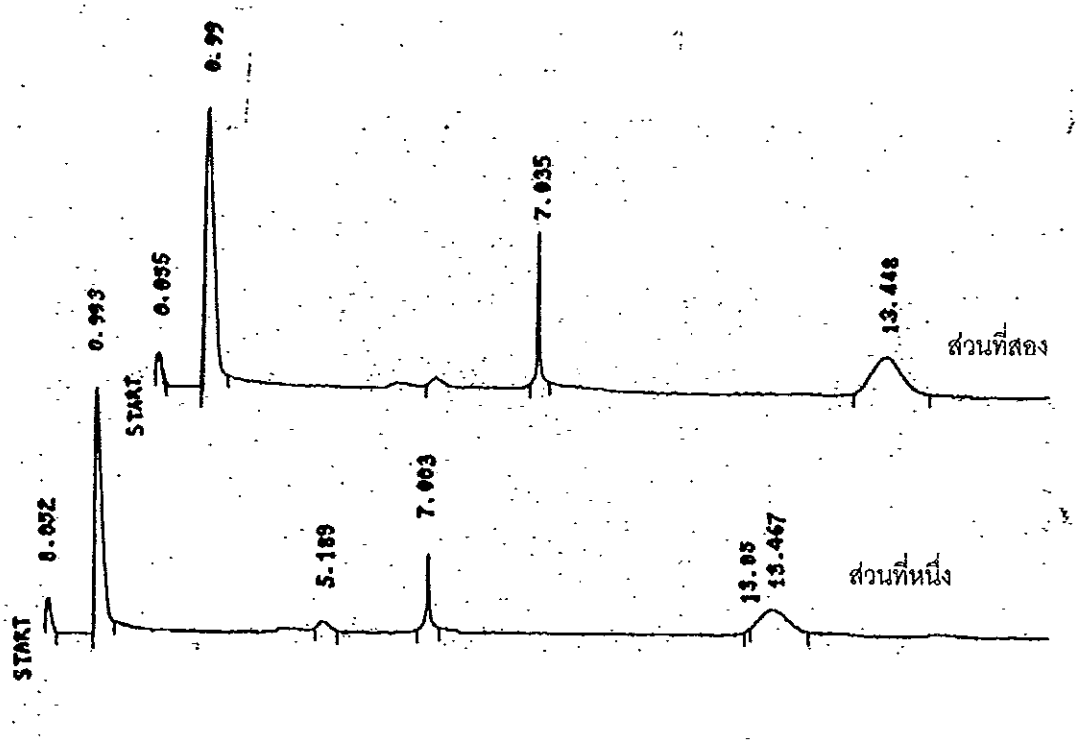


ภาพประกอบที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนวิเคราะห์ด้วยเฟสอยู่กับที่ 4% Carbowax 20M/ 0.8% KOH บน Carbopak B ขนาด 60/80 เมช และ Chromosorb 103 ขนาด 80 /100 เมช

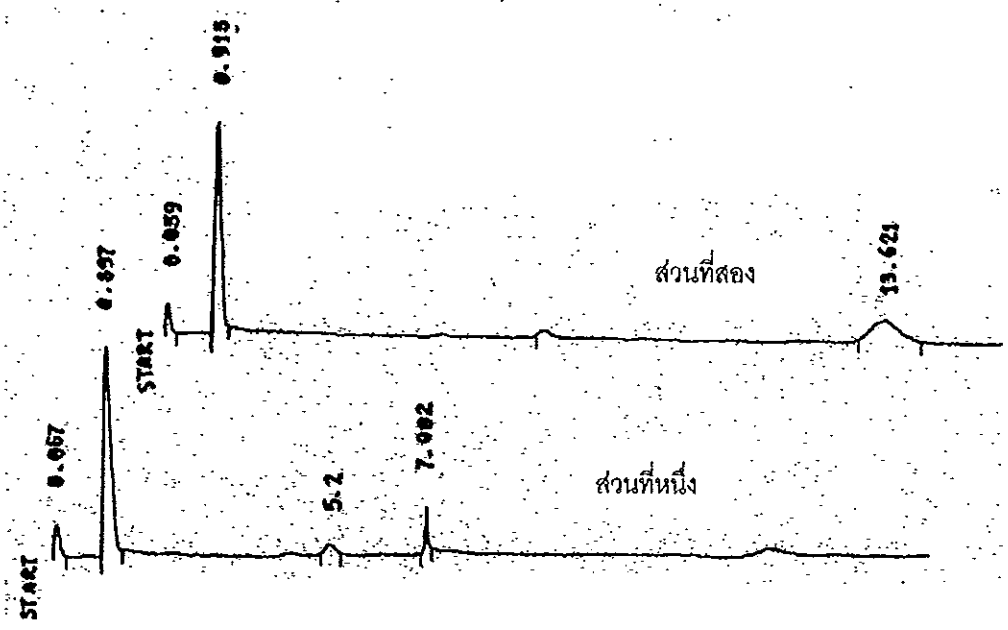
3.7 การศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมตัวอย่างให้เข้มข้นขึ้นด้วยหลอดบรรจุตัวดูดซับ

จากการทดลองในข้อ 2.3.7 วิเคราะห์ปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน พบว่า ที่สภาวะดังกล่าวไม่เหมาะกับการเพิ่มความเข้มข้นของไดเมธิลเอมีน แต่สามารถดูดซับไตรเมธิลเอมีนและคายการดูดซับด้วยโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำเฮดสเปซไปวิเคราะห์ได้ แสดงโครมาโทแกรมในภาพประกอบที่ 19

เมื่อทดลองนำตัวอย่างปลาสดมาแล่เนื้อ ดูดซับด้วยหลอดบรรจุตัวดูดซับที่สภาวะที่กำหนด พบว่าสามารถตรวจวัดไตรเมธิลเอมีนได้เช่นกัน แสดงโครมาโทแกรมในภาพประกอบที่ 20



ภาพประกอบที่ 19 โครมาโทแกรมไตรเมธิลเอมีน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นด้วยหลอดบรรจุตัวดูดซับ



ภาพประกอบที่ 20 โครมาโทแกรมไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่าง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นด้วยหลอดบรรจุตัวดูดซับ

บทที่ 4

บทวิจารณ์

4.1 การศึกษาสภาวะการทดลองเมื่อใช้ 4% Carbowax20M / 0.8%KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมชเป็นเฟสอยู่กับที่

4% Carbowax 20M / 0.8% KOH on Carbopack B ขนาด 60/80 เมชเป็นเฟสอยู่กับที่ ชนิดแก๊ส - ลิควิดโครมาโทกราฟี มีแกรไฟท์คาร์บอน (Graphitized carbon) ชนิดมีรูพรุน ชื่อการค้า คาร์โบแพค บี เป็นซัพพอร์ท (solid support) เคลือบด้วย Carbowax 20 M และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ แกรไฟท์คาร์บอนจัดเป็นซัพพอร์ทที่เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ชนิดไม่มีหมู่ฟังก์ชั่นหรือไอออนบนผิว มีความเปราะมาก จึงต้องเคลือบด้วยลิควิดเฟสก่อนการใช้งาน มีพื้นที่ผิว 100 – 110 ตารางเมตรต่อกรัม (Green, 1995: 1775) สำหรับคาร์โบแพค บีที่เคลือบด้วย 4% Carbowax 20M และ 0.8 %โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์อะลิฟาติกเอมีนที่มีจำนวนคาร์บอนน้อย ๆ ที่ระดับส่วนในล้านส่วน (ppm) ในตัวอย่างน้ำ เพราะโดยทั่วไปการวิเคราะห์อะลิฟาติกเอมีนส์สายสั้นด้วยแก๊สโครมาโทกราฟมักมีปัญหาวิเคราะห์ยาก เนื่องจากมีความเป็นขั้วสูง และ มีแนวโน้มจะเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ง่าย พีกที่ได้จึงมักจะไม่สมมาตร และมีเทลลิ่ง รวมทั้งมักจะมีพีกแปลกปลอม (ghost peak) ปรากฏอยู่ด้วย นอกจากนี้ยังอาจเกิดการดูดซับอย่างถาวร ทำให้ตรวจไม่พบ ผลที่ได้มักจะมีค่าการแยก (Resolution) ต่ำ ให้สัญญาณตอบสนองน้อย หรือทำให้ได้กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ที่มีลักษณะไม่เป็นเชิงเส้นที่ปริมาณต่ำ ๆ (Audunsson, 1988 : 2-3) การแยกที่เกิดขึ้นบนเฟสอยู่กับที่ชนิดนี้เป็นผลจากคุณสมบัติของแกรไฟท์คาร์บอนที่เติม Carbowax 20M ลงไปบนพื้นผิวของคาร์บอน ในขณะที่โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เติมลงไปเป็นเบส จะเป็นตัวช่วยลดการเกิดเทลลิ่ง (Supelco, 1995) ทั้งนี้เพราะทำให้เฟสอยู่กับที่มีความเป็นขั้วเพิ่มขึ้น จึงสามารถแยกเอมีนส์ได้ดีกว่าเฟสอยู่กับที่ที่ไม่เติมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์

จากการศึกษาอัตราการไหลของแก๊สพาที่เหมาะสม จากการเขียนกราฟแวนดีมเตอร์ คำนวณความสูงของเพลทตามทฤษฎีได้ 0.7 มิลลิเมตร จำนวนเพลท 2857 เพลท ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพคอลัมน์เป็นที่ยอมรับได้สำหรับวิธีวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีที่ใช้คอลัมน์เป็นแพคคอลัมน์ (packed column)

เมื่อพิจารณาอุณหภูมิการแยก พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ไม่สูงมาก กล่าวคือ ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของเฟสอยู่กับที่ชนิดแก๊ส- ลิควิดโครมาโทกราฟี (Karger, Synder and Horvath, 1973: 414) ประกอบกับสารประกอบเอมีนส์ที่ต้องการวิเคราะห์คือไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนต่างก็มีจุดเดือดต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส (Windholz, 1976: 429, 1246) และจุดเดือด 46-48 องศาเซลเซียสสำหรับอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (โพรพิลเอมีน) (Windholz, 1976 : 1016)

โครมาโทแกรมที่ได้แสดงถึงลำดับการแยก โดยเริ่มจากไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนและโพรพิลเอมีน ตามลำดับ เนื่องจากไดเมธิลเอมีนเป็นสารประกอบที่มีความเป็นขั้วสูงกว่าไตรเมธิลเอมีน ดังนั้นลำดับการแยกจึงเป็นไปตามความเป็นขั้วที่ลดหลั่นกัน สำหรับโพรพิลเอมีนซึ่งเป็นเอมีนปฐมภูมิ ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นเส้นตรง ไม่เกะกะและจุดเดือดสูงกว่าเอมีนสองตัวแรกอย่างชัดเจน จึงถูกชะออกหลังสุดเนื่องจาก แกรไฟท์คาร์บอนชอบโมเลกุลที่เป็นเส้นตรงไม่เกะกะ (planar molecule) (Karger, Synder and Horvath, 1973 : 174) มีรีเทนชั่นไทม์ค่อนข้างมาก เนื่องจากเป็นการแยกแบบไอโซเทอร์มัล (isothermal) การลดค่ารีเทนชั่นไทม์ สามารถทำได้โดยการใช้โปรแกรมอุณหภูมิการแยก ลักษณะพีกที่ได้มีลักษณะสมมาตร แต่เมื่อใช้งานไประยะหนึ่งจะเห็นว่าสัญญาณตอบสนองที่ได้จะลดลง และพีกเริ่มมีเทลลิ่ง ทั้งนี้เพราะมีการสูญเสียปริมาณของเบส (โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์) ในเฟสอยู่กับที่ ทำให้ความเป็นขั้วของเฟสอยู่กับที่ลดลง เพื่อเป็นการกระตุ้นและเพิ่มปริมาณเบสในเฟสอยู่กับที่จึงต้องกระตุ้นด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 1% ตามคู่มือการใช้งานของเฟสอยู่กับที่ชนิดนี้

ผลการใช้เฟสอยู่กับที่ชนิดนี้สอดคล้องกับงานของเปเรซ มาร์ตินและคณะ (Martin et al.,1987) ที่รายงานไว้ว่าเฟสอยู่กับที่ชนิด 4% Carbowax 20M และ 0.8 %โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์บนคาร์โบแพค บี ว่าเป็นเฟสอยู่กับที่ที่ใช้งานได้ดี แต่อายุการใช้งานสั้น

ใช้ได้เพียง 150 ครั้ง (injection) ก็จะทำให้ส่วนต้น ๆของคอลัมน์เกาะแข็ง ฟิดเลอร์ และคณะ (Fiddler, Doerr and Gates, 1991) กล่าวว่าไม่สามารถใช้วิเคราะห์เอมีนที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 5 ส่วนในล้านส่วน และเห็นว่าไม่เหมาะสำหรับใช้วิเคราะห์เอมีนส์โดยตรง

ในความเห็นของผู้วิจัย 4% Carbowax 20M และ 0.8 %โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์บนคาร์โบแพค บี เป็นเฟสอยู่กับที่ที่มีลักษณะเฉพาะตัว มีข้อดีคือ สามารถใช้วิเคราะห์เอมีนส์ที่เป็นอะลิฟาติกสายสั้นได้ดี ให้ค่าการแยกดีและสามารถปรับสภาวะการใช้งานให้เหมาะสมได้ แต่มีข้อเสียคือหลังจากใช้งานไปประมาณ 400 ครั้ง (injections) ประสิทธิภาพคอลัมน์ลดลงกว่าครึ่ง เมื่อใช้งานไปประมาณ 1000 ครั้ง คอลัมน์จะเสื่อมสภาพจนไม่สามารถใช้งานได้ในที่สุด สังเกตได้จากเบสไลน์ไม่เรียบ มีสัญญาณรบกวน (noise) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สัญญาณของสารมาตรฐานที่ตรวจพบลดลง ลักษณะพีกที่ได้เปลี่ยนไปจากเดิม แม้จะกระตุ้นด้วย 1% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ตามวิธีที่แนะนำในคู่มือก็ไม่สามารถช่วยให้มีประสิทธิภาพเหมือนเดิมได้

จากการทดลองต้องบรรจุคอลัมน์ใหม่ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งแรกใช้เฟสอยู่กับที่ใหม่ ๆ (เปิดขวดใหม่) หลังจากเตรียมเฟสอยู่กับที่ให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน (Aging) ทำการวิเคราะห์พบว่าไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีนมีรีเทนชั่นไทม์ ที่2.4 และ 3.8 นาที หลังจากใช้งานได้ประมาณ 1000 ครั้ง คอลัมน์มีลักษณะดังบรรยายข้างต้น จนในที่สุดไม่สามารถใช้งานได้ จึงบรรจุคอลัมน์ด้วยเฟสอยู่กับที่ใหม่ (จากขวดเดิม) ในครั้งนี้ต้องกระตุ้นคอลัมน์ด้วย 1% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ถึง 6 ครั้งจึงจะอยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน ประสิทธิภาพคอลัมน์เมื่อพิจารณาจากจำนวนเพลท คำนวณได้ 2498 เพลท รีเทนชั่นไทม์ของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนเท่ากับ 4.6 และ 7.4 นาทีตามลำดับ หลังจากใช้งานประมาณ 400 ครั้งจำนวนเพลทลดลงเหลือเพียง 821 เพลท และเมื่อใช้งานเกือบครบ 1000 ครั้งคอลัมน์ก็ไม่สามารถใช้งานได้เหมือนเดิม และต้องบรรจุคอลัมน์เป็นครั้งที่สามในที่สุด

จากการศึกษาเฟสที่อยู่กับที่ชนิดนี้ทั้งสามครั้ง จึงกล่าวได้ว่า เฟสอยู่กับที่ชนิดนี้มีทั้งข้อดี ข้อเสีย กล่าวคือ พิจารณาถึงประสิทธิภาพการใช้งานพบว่ามีประสิทธิภาพในการแยกดีดังกล่าวมาข้างต้น แต่เนื่องจากมีข้อเสียซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัว ดังนั้นถ้าจำเป็นต้อง

เลือกใช้งานด้วยเฟสอยู่กับที่ชนิดนี้ จึงควรจะมีวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม ไม่ให้สัมผัสกับอากาศ เพราะคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศจะถูกดูดซับไว้บนเฟสอยู่กับที่ ทำให้โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เปลี่ยนไปเป็นโปตัสเซียมคาร์บอเนต ความเป็นเบสบนเฟสอยู่กับที่จึงลดลง หรือสูญเสียไป จึงทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์สั้นลง (Supelco, 1995)

จากการศึกษาการตอบสนองเชิงเส้น พบว่าให้การตอบสนองเชิงเส้น สำหรับไตรเมธิลเอมีน อยู่ระหว่าง 10^{-2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรถึง 10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร และสำหรับไดเมธิลเอมีนที่ 10^{-1} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรถึง 10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีนเท่ากับ 1.0000 และ 0.9984 ตามลำดับ ซึ่งช่วงความเป็นเส้นตรงที่ดีมากนี้ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณไตรเมธิลเอมีนได้ดีทั้งโดยวิธีฉีดของเหลวเข้าทำการแยกโดยกตรงและวิธีเฮดสเปซ แต่เนื่องจากคอลัมน์ค่อย ๆเสื่อมสภาพไปเรื่อย ๆ ระหว่างการใช้งาน จึงทำให้ในทางปฏิบัติ ตรวจพบเอมีนส์ทั้งสองชนิดได้ยากขึ้น

เมื่อนำความเข้มข้นและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่แต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟตามวิธีของเทเลอร์ (Taylor, 1987 : 79) เพื่อหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีน คำนวณได้ 0.16 และ 0.17 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่า เมื่อตรวจพบไตรเมธิลเอมีนกับไดเมธิลเอมีนที่ปริมาณต่ำกว่า 0.16 กับ 0.17 มิลลิกรัม- ไนโตรเจนต่อลิตร นับเป็นปริมาณที่ไม่เหมาะสำหรับการรายงานผลในเชิงปริมาณ แต่สามารถรายงานในเชิงคุณภาพได้ กล่าวคือรายงานผลว่าพบ หรือไม่พบเท่านั้น

เตรียมกราฟมาตรฐานของเอมีนส์ทั้งสองโดยวิธีอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด พบว่ากราฟเส้นตรงที่ได้ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกเป็นเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9992 และ 0.9975 สำหรับไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีนตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าความชันของกราฟเส้นตรงของไตรเมธิลเอมีนมีมากกว่า ความชันกราฟเส้นตรงของไดเมธิลเอมีน ซึ่งสัมพันธ์กันกับพฤติกรรมของไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีน ที่มีค่าคงที่การแผ่กระจาย (Partition coefficient) จากน้อยไปหามากเรียงตามลำดับกัน จึงเป็นผลให้ปริมาณโมเลกุลในเฮดสเปซของไดเมธิลเอมีนน้อยกว่าไตรเมธิลเอมีน

4.2 การศึกษาสภาวะการทดลองเมื่อใช้ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่

Chromosorb103 ขนาด 80/100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่ชนิดของแข็ง-แก๊ส สำหรับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี เป็นโพลีเมอร์สังเคราะห์ที่เกิดจากการ cross linked ของสไตรีน (styrene) พื้นผิวเป็นรูพรุน พื้นที่ผิวประมาณ 15 – 25 ตารางเมตรต่อกรัม ขนาดของรูโดยประมาณเท่ากับ 300 – 400 นาโนเมตร (Green, 1995 : 1776) เมื่อนำมาใช้เป็นเฟสอยู่กับที่พบว่าให้กราฟแวนดีมเตอร์ดังแสดงในภาพประกอบที่ 10 ซึ่งมีลักษณะที่แสดงให้เห็นว่าเทอม C มีอิทธิพลต่อสภาวะการทดลอง เพราะมีค่ามากจากสมการแวนดีมเตอร์

$$H = A + B/u + Cu$$

เทอมที่สามที่กล่าวถึงคือ Cu เป็นเทอมที่แสดงถึงกระบวนการต้านการเคลื่อนที่ของมวล (Gouw, 1972 : 64) ตามทฤษฎีกล่าวว่าในกรณีที่มีการต้านการเคลื่อนที่ของมวลควรเลือกใช้อัตราเร็วของแก๊สพาที่ 2 เท่าของความเร็วที่เหมาะสมที่ได้จากกราฟแวนดีมเตอร์ จึงจะทำให้การแยกมีประสิทธิภาพ (Karger, Synder and Horvath, 1973 : 277) แต่จากการทดลองเลือกใช้ที่ความเร็วที่ได้จากกราฟ จึงทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์อยู่ที่ 500 เพลท (สำหรับไตรเมธิลเอมีน) ซึ่งมีค่าน้อย ไม่เหมาะในการใช้งาน (Gouw, 1972 : 22)

การแยกเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิด Chromosorb103 จะต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่าเฟสอยู่กับที่ 4% Carbowax 20M บน CarbopackB ของเทคนิคแก๊ส –ลิควิดโครมาโทกราฟี เนื่องจากเทคนิคแก๊ส-โซลิดโครมาโทกราฟีมีการสูญเสียเอนโทรปีเพราะการดูดซับที่เกิดขึ้นเป็นแบบเอกโซเทอร์มิก ประกอบกับค่าคงที่การดูดซับ (adsorption coefficient) มีค่าต่ำที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นการแยกที่ใช้อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียสจึงเหมาะสมกว่า (Karger, Synder and Horvath, 1973 : 413-414) แต่ที่อุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้ตัวอย่างสลายตัวได้ จากการทดลองจึงเลือกใช้อุณหภูมิการแยก 120 องศาเซลเซียส

กลไกการแยกบนเฟสอยู่กับที่แบบแก๊ส-โซลิดโครมาโทกราฟีมีลักษณะซับซ้อน ประกอบด้วยกระบวนการการดูดซับ และขณะเดียวกันก็เกิดการพาร์ทิชั่น (Partition) ด้วย รวมถึงแรงผลักที่แตกต่างกันระหว่างตัวถูกละลาย (solute) เอมีนส์ กับโพลิเมอร์ที่เป็น

เฟสอยู่กับที่ (Karger, Synder and Horvath, 1973 : 414, 421) อย่างไรก็ตามกลไกการแยกของโพลีเมอร์ที่มีรูพรุนยังไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงไม่มีอะไรที่แน่นอน

ลำดับการแยกของสารมาตรฐานมีลักษณะเหมือนกับการแยกบน4% Carbowax 20M/ 0.8% KOH บน Carbopack B กล่าวคือไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีน และโพรพิลเอมีน ตามลำดับ พีกที่ได้มีลักษณะค่อนข้างกว้าง (broad peak) เนื่องจากมีจำนวนเพลทตามทฤษฎีน้อย และรีเทนชั่นไทม์ยาว การปรับปรุงสามารถทำได้โดยการเลือกใช้ขนาดของเม็ดเฟสอยู่กับที่ ที่มีขนาดเล็กลง ใช้อัตราการไหลของแก๊สพาเป็น 2 เท่าของค่าที่คำนวณได้ เลือกใช้อุณหภูมิการแยกสูงหรือเลือกใช้วิธีโปรแกรมอุณหภูมิแทนการแยกแบบไอโซเทอร์มัล เพราะที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการแพร่ของตัวถูกละลาย (สารที่ต้องการวิเคราะห์)เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามในขณะเดียวกันขนาดของเม็ดเฟสอยู่กับที่ที่เล็กลงจะทำให้เกิดความดันลด (pressure drop) มากขึ้น ดังนั้นในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจึงต้องตั้งอยู่บนการพิจารณาระหว่างตัวแปรที่เปลี่ยนแปลงกับประสิทธิภาพการแยกที่ต้องการอย่างถูกต้อง ดังนั้นในงานศึกษานี้จึงได้ใช้สภาวะการทดลองดังกล่าว

ในการศึกษานี้จะต้องเตรียมคอลัมน์ให้พร้อมก่อนใช้งาน (Aging)โดยการให้มีแก๊สพา (ไนโตรเจน) ไหลผ่านไปก่อน 15 นาที เมื่อครบ 15 นาที จะค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิคอลัมน์จนถึง 220 องศาเซลเซียส 1 คืน และรักษาอุณหภูมิไว้โดยให้มีแก๊สพาไหลอยู่ตลอดเวลาด้วยอัตราเร็วที่คงที่ เมื่อนำมาทดลองแยกสารมาตรฐาน พบว่าได้พีกของสารมาตรฐานที่มีลักษณะกว้าง ดังนั้นจึงปรับปรุงสภาวะการทดลองโดยให้ความร้อนต่อที่ 200 องศาเซลเซียสอีก 40 – 48 ชั่วโมง เพิ่มจากเดิม แล้วถอดคอลัมน์ออกมาเคาะให้แน่นขึ้นแล้วนำไปติดในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ทำการวิเคราะห์ใหม่ที่สภาวะการทดลองเดิมพบว่าพีกของสารมาตรฐานจะมีลักษณะคมดีกว่าเดิม ซึ่งสอดคล้องกับงานของแอนเดอร์ และโมซิแอร์ (Andre and Mosier, 1971) อย่างไรก็ตามการเตรียมความพร้อมคอลัมน์ โดยเลือกใช้อุณหภูมิสูงนาน ๆ จากการศึกษาพบว่า มีผลเสียคืออาจทำให้เฟสอยู่กับที่เสียหรือมีอายุการใช้งานสั้นลง การเคาะเฟสอยู่กับที่ให้แน่นก่อนการใช้งานเป็นสิ่งจำเป็น เพราะ Chromosorb 103 เป็นโพลีเมอร์ที่มีความยืดหยุ่นคล้ายเม็ดพลาสติก เมื่อได้รับความร้อนจะเกิดการขยายตัวและหดตัวเมื่ออุณหภูมิลดลง จึงทำให้เกิดช่องว่าง (gap) ระหว่างขนาดของเฟสอยู่กับที่ (Andre and Mosier, 1973) ทำให้คอลัมน์มีรอยแยก(cracking) เกิดขึ้นซึ่งจะ

ทำให้ประสิทธิภาพของการแยกไม่ดี เนื่องจากการแพร่กระจายของสารที่ต้องการวิเคราะห์มีการแพร่กระจายในคอลัมน์ไม่เป็นไปตามอัตราเร็วที่ให้ประสิทธิภาพการแยกดีที่สุดตามแวน ดีมเตอร์ ดูนและคณะ (Dunn, Simonhoff and Wesson, 1976) รายงานวิธีบรรจุและเตรียมความพร้อมคอลัมน์ โดยการเคลือบคอลัมน์ด้วย 1 นอร์มัลโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ก่อนการบรรจุ เพื่อปิดบริเวณที่ว่องไวภายในผิวสัมผัส จากนั้นกลั้วด้วยน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized water) อบให้แห้งที่ 100 องศาเซลเซียสในบรรยากาศของไนโตรเจนแล้วจึงบรรจุคอลัมน์ จะได้คอลัมน์ที่มีอายุการใช้งานประมาณ 1 ปี ในขณะที่แอนเดอร์และโมซิแอร์ใช้งานได้นาน 2000 ครั้ง (Andre and Mosier, 1971) หลังจากนั้นสัญญาณของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนจะเริ่มลดลง จากผลการรวบรวมความก้าวหน้าการวิเคราะห์เอมีนส์ที่ระเหยได้ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีที่ใช้ Chromosorb 103 เป็นเฟสอยู่กับที่ โดยคณะกรรมการ AOAC (Hungerfrd, 1992) พบว่ามีผู้ทำการทดลองโดยวิธีดังกล่าว 6 ราย ได้ผลเป็นที่ยอมรับเพียง 2 ราย เวแคล (Wekell, 1990) รายงานว่า โดยวิธีเดียวกันนี้ปัญหาเกิดจากคอลัมน์วิเคราะห์ คือ ใช้ Chromosorb 103 เป็นเฟสอยู่กับที่ พบว่า Chromosorb 103 ที่ผลิตคนละรุ่นการผลิต จะมีคุณภาพไม่คงที่ให้ผลการแยกไดเมธิลเอมีน และไตรเมธิลเอมีนต่างกัน โดยมีผู้ใช้เฟสอยู่กับที่ชนิดนี้ 3 รายแจ้งให้ทราบ

การตอบสนองเชิงเส้น เมื่อใช้ Chromosorb103 เป็นเฟสอยู่กับที่ พบว่าให้สัญญาณตอบสนองของไตรเมธิลเอมีนอยู่ระหว่าง 10^{-2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรถึง 10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9996 และให้สัญญาณตอบสนองเชิงเส้นของไดเมธิลเอมีนที่ 10^{-1}มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรถึง 10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9999 จากข้อมูลการศึกษาการตอบสนองเชิงเส้น นำมาคำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีนได้ที่ 2.4 และ1.5 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ

จากกราฟมาตรฐานของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนพบว่า เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐาน จะได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตามสมการ $y = mx + b$ ที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9977 และ0.9901 สำหรับไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน ความชันเท่ากับ 0.1092 และ

1.5266 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าความชันที่ได้มีค่าทำนองเดียวกับเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่เป็น 4% Carbowax20M / 0.8% KOH บน Carbopack B แสดงว่าการแผ่กระจายของโมเลกุลของไดเมธิลเอมีนกับไตรเมธิลเอมีนบนเฟสอยู่กับที่ทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของไตรเมธิลเอมีนจะเห็นว่ามีค่าน้อย เพียง 0.9901 เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากสภาวะที่เลือกมาใช้ยังไม่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรวจวัดไตรเมธิลเอมีน แต่ก็ยังถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถใช้งานได้ ทั้งนี้เพราะต้องพิจารณาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน โดยต้องให้ประสิทธิภาพที่ดีพอสำหรับสารประกอบทั้งสอง ซึ่งสอดคล้องกับค่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่คำนวณได้คือมีค่าสูงถึง 2.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร

4.3 การศึกษาการแยกสารมาตรฐานด้วยเฟสอยู่กับที่ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ

เฟสอยู่กับที่ที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการมี 4 ชนิดคือ 5%KOH on Chromosorb W ขนาด 80 /100 เมช, 10% Carbowax20M / 5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช, 5% Carbowax 20M /5% KOH บน Chromosorb W ขนาด 80 /100 เมช และ 2%Carbowax 20M / 5%KOH บน Chromosorb W ขนาด 80 /100 เมช

Chromosorb W เป็นซัพพอร์ทที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ได้จากไดอะตอมไมท์ มีสีขาว พื้นที่ผิว 1 ตารางเมตรต่อกรัม มีข้อเสียอย่างหนึ่งคือแตกหักง่าย มีคุณสมบัติการเกิดการดูดซับมากกว่าคาร์โบแพคบี เนื่องจากเป็นซัพพอร์ทที่มีหมู่ ไซลานอล และออกไซด์ของโลหะบนผิว จึงทำให้มีแนวโน้มที่จะเกิดการดูดซับกับสารที่ต้องการแยกได้ (Ottenstein, 1973) เมื่อฉีดสารมาตรฐานไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีน และโพรพิลเอมีนซึ่งเป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด จะเกิดการแยก ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในภาพประกอบที่ 13 ให้พีกไตรเมธิลเอมีนเป็นลำดับแรกเวลา 3.3 นาที ตามมาด้วยไดเมธิลเอมีนที่ 5 นาที แต่ไม่ปรากฏพีกของโพรพิลเอมีน ลักษณะของพีกที่ได้จะเห็นว่า พีกของไตรเมธิลเอมีนค่อนข้างคมชัดและสมมาตร แต่ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณสารที่ฉีดด้วย พีกของไดเมธิลเอมีนจะเป็นแถบกว้าง (broad peak) ไม่คมชัดและไม่สมมาตร ในขณะที่ไม่พบพีกของโพรพิลเอมีน สามารถอธิบายได้ว่า Chromosorb W ทำให้เกิดการแยกได้ด้วยกลไกการดูดซับที่แตกต่างกันระหว่างเฟสอยู่กับที่กับสารที่ต้องการแยก โดยมีโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เป็น

ตัวช่วยลดการดูดซับระหว่างเอมีนกับเฟสอยู่กับที่ โดยทั่วไปใช้เบสปริมาณ 0.3 – 10% โดยน้ำหนัก จากการทดลองของ Olsson และJonsson (1981) ได้ทดลองเติมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ปริมาณต่าง ๆ ลงบนเฟสอยู่กับที่เพื่อแยกเอมีนส์ พบว่าจะทำให้การดูดซับลดลงได้เมื่อเพิ่มปริมาณโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ และจะให้ผลชัดเจนมากเมื่อใช้เบสปริมาณเน้อย ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณแบสที่ใช้จะทำให้เกิดการหน่วงน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายเอาไว้ในคอลัมน์ด้วย สำหรับในการทดลองนี้ระหว่างไดเมธิลเอมีนกับเฟสอยู่กับที่ โครงสร้างของไดเมธิลเอมีนมีความเป็นขั้วมากกว่าไตรเมธิลเอมีน ถึงแม้ว่าเฟสอยู่กับที่จะถูกฉาบไว้ด้วยเบส (โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์) 5% แล้วก็ตาม ก็ยังไม่สามารถเอาชนะแรงดูดซับระหว่างไดเมธิลเอมีนกับ Chromosorb W ขนาด 80 /100 เมช ซึ่งเป็นซัพพอร์ทได้ จึงทำให้พีกที่ได้เป็นแถบกว้างและมีเทลลิ่ง ส่วนโพรพิลเอมีนจะถูกดูดซับไว้อย่างถาวร จึงไม่ปรากฏพีกให้เห็น

เมื่อทดลองเตรียมเฟสอยู่กับที่ใหม่ โดยการเคลือบ Carbowax20M อัตราส่วน 2% (โดยน้ำหนัก) บน 5% KOH Chromosorb W ขนาด80 /100 เมช ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ตัวใหม่ด้วยวิธีระเหย หลังจากรอจนตัวทำละลายแห้งดีแล้ว นำมามาบรรจุในคอลัมน์แก้วขนาด 2.0 ม. ×2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) แล้วเตรียมความพร้อมคอลัมน์ เมื่อฉีดไอของ 3.25%โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นแบลงค์ จะได้โครมาโทแกรมที่มีพีกรบกวนน้อยกว่าเมื่อเคลือบลิควิดเฟสในอัตราส่วน 5% รีเทนชั่นไทม์ของไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีนเท่ากับ 0.6 และ 0.7 นาที ที่อุณหภูมิการแยก60 องศาเซลเซียสซึ่งบริเวณนั้นมีพีกรบกวนปรากฏอยู่ด้วย ซึ่งอาจเกิดจากการเตรียมความพร้อมคอลัมน์ (Aging) ไม่นานพอ

ใช้เฟสอยู่กับที่ที่เคลือบด้วย ลิควิดเฟสชนิด Carbowax20M 5% และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 5% จากการศึกษาได้โครมาโทแกรมของแบลงค์ที่มีพีกรบกวนมากกว่าเฟสที่เคลือบด้วยลิควิดเฟส 2% สำหรับการแยกสารมาตรฐานของเอมีนที่ 85 องศาเซลเซียส ค่ารีเทนชั่นไทม์ของไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีนปรากฏที่ 0.6 และ 0.8 นาที และเมื่อใช้ 10%Carbowax20M/ 5% โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ บน Chromosorb W ขนาด 80/ 100 เมช แยกสารมาตรฐานเอมีนที่ 60 องศาเซลเซียส ให้พีกของไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีนที่เวลาใกล้เคียงกันมาก จนไม่สามารถตรวจวัดได้

จะเห็นได้ว่าการเติมเบส เพื่อลดการดูดซับบนเฟสอยู่กับที่เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง แต่ควรศึกษาว่าปริมาณเท่าใดเป็นปริมาณที่เหมาะสม จากผลการทดลองพบว่าการใช้ เฟสอยู่กับที่ ซึ่งมี Chromosorb W ขนาด 80 /100 เมช เป็นซัพพอร์ท โดย Carbowax 20M เคลือบเป็นลิควิดเฟส เป็นเฟสอยู่กับที่ ไม่เหมาะสำหรับการแยกอะลิฟาติกเอมีนที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมน้อย ๆ ถ้าจะเลือกใช้ Chromosorb W เป็นซัพพอร์ท ควรจะเลือกลิควิดเฟสที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่า Carbowax20M เพื่อช่วยให้เวลาในการแยกนานขึ้น หรือถ้าจะเลือกใช้ Carbowax20M เป็นลิควิดเฟส ก็ควรเลือกใช้ที่อัตราส่วนเหมาะสมบนซัพพอร์ทที่เฉื่อยกว่า Chromosorb W เนื่องจาก Carbowax 20M มีอิทธิพลต่อการแยกอย่างชัดเจนซึ่งเห็นได้จากผลการทดลองนี้

4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเฮดสเปซ

จากกฎของเฮนรี่ (Henry's Law) ซึ่งอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารในเฟสต่างกันกับค่าคงที่การแผ่กระจายดังสมการ

$$k = C_L / C_G$$

กล่าวว่าค่าคงที่การแผ่กระจาย ซึ่งเป็นค่าคงที่ ที่อุณหภูมิใด ๆ คำนวณได้จากความสามารถในการละลาย ณ อุณหภูมินั้น มีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในเฟสที่เป็นของเหลว (C_L) หารด้วยความเข้มข้นในเฟสที่เป็นแก๊ส (C_G) (Seto, 1994 : 28) นั่นคือถ้าสารนั้นเป็นสารที่ละลายได้ เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไปก็จะทำให้ความสามารถในการละลายเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Seto, 1994 : 31) ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิของเฮดสเปซจึงเป็นวิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมเมื่อต้องการเพิ่มความดันไอและเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ในสารที่ระเหยได้ การเพิ่มอุณหภูมิเป็นเทคนิคหนึ่งที่จำเป็นสำหรับการทำเฮดสเปซ แก๊สโครมาโทกราฟ ที่เหมาะกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีคุณสมบัติ "เข้าสู่สภาวะสมดุลอย่างช้า ๆ" เนื่องจากมีการแพร่อย่างช้า ๆ เกิดขึ้นในตัวอย่างที่เป็นชีววัตถุ ซึ่งจากการทดลองในช่วงต้นที่ยังไม่ทราบสภาวะของเฮดสเปซที่เหมาะสม พบว่าหลังจากเตรียมสารละลายมาตรฐานในขวดระบบปิดแล้ว ติดตามสัญญาณจากเฮดสเปซทุกชั่วโมง จะต้องใช้เวลานานถึง 4 ชั่วโมงจึงจะได้สัญญาณตอบสนองที่แตกต่างจากชั่วโมงที่0, 1 , 2 และ3 ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการทดลองข้อ 3.2.3 ได้ศึกษาโดยการปรับอุณหภูมิอ่างน้ำที่อุณหภูมิต่าง ๆกัน คือ 40-80 องศาเซลเซียส นำขวด(vial) ขนาด 60 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลายมาตรฐานเอมีนส์ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียม นำมาแช่ในอ่างน้ำดังกล่าว ใช้เวลานานต่าง ๆกัน แล้วนำไอของเฮดสเปซไปวิเคราะห์พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มเวลาให้นานขึ้น สัญญาณที่ได้ จะเพิ่มขึ้นแสดงว่าระบบยังไม่เข้าสู่สมดุลย์ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลาเพิ่มขึ้นสัญญาณจะเพิ่มขึ้น แล้วสัญญาณจะเริ่มลดลงอีกครั้งหลัง 40 นาที สำหรับไตรเมธิลเอมีน ในขณะที่ไดเมธิลเอมีนจะให้สัญญาณเพิ่มขันจนถึง 50 นาทีจึงลดลง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สัญญาณของไตรเมธิลเอมีนจะลดลงหลังจาก 20 นาที ในขณะที่สัญญาณของไดเมธิลเอมีนยังคงเพิ่มขึ้น จนถึง 40 นาทีจึงลดลง ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส สัญญาณของไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีนต่างเพิ่มขึ้น ที่ 80 องศาเซลเซียส สัญญาณที่ได้เปลี่ยนแปลงมากจนไม่อาจสังเกตแนวโน้มของสัญญาณได้ จากผลดังกล่าวเห็นว่า ระบบของไตรเมธิลเอมีนเข้าสู่สมดุลเร็วกว่าไดเมธิลเอมีนทุกอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นการให้ความร้อนสูงขึ้นอีกระดับหนึ่งจะเห็นว่าสัญญาณที่วิเคราะห์ได้จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ถึงแม้ใช้เวลานานถึง 60 นาทีแล้วก็ยังไม่ถึงสมดุล แต่ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่สูงมากสำหรับการเตรียมโดยวิธีนี้ยากต่อการควบคุม เนื่องจากอ่างน้ำเป็นระบบเปิด จึงทำให้สัญญาณที่ได้เบี่ยงเบนมาก ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน20นาทีเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เพราะนอกจากจะให้สัญญาณเป็นที่น่าพอใจระดับหนึ่งแล้ว ที่สภาวะนี้ยังสามารถควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ได้ง่ายและสัญญาณที่ได้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ดีที่สุดจากการทดลองนี้

แม้ว่าอุณหภูมิจะเป็นตัวแปรสำคัญ แต่ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ อุณหภูมิใด ๆที่ทำให้เกิดเสถียรภาพมากที่สุดย่อมเป็นสิ่งสำคัญกว่าความถูกต้องที่แท้จริงของอุณหภูมิ เพราะในทางปฏิบัติ การเบี่ยงเบนของอุณหภูมิย่อมส่งผลถึงตัวอย่างโดยตรงอยู่แล้วและในการทดลองก็ต้องทำเทียบกับสารมาตรฐาน (Kolb and Ettre, 1997: 60) ถ้าเลือกใช้เครื่องมือที่ทันสมัย ในปัจจุบันการควบคุมอุณหภูมิสามารถควบคุมให้มีความแม่นยำสูงได้ถึง $\pm$ 0.1 องศาเซลเซียส เพราะว่าอุณหภูมิส่งอิทธิพลถึงการระเหยและความไวของเฮดสเปซ กล่าวคือ มีผลต่อค่าคงที่การแผ่กระจาย ดังนั้นถ้ามีการเบี่ยงเบนของอุณหภูมิเพียงเล็กน้อยในการวิเคราะห์สารประกอบที่มีความเป็นขั้วเช่นเอมีน ซึ่งละลายน้ำได้ดี มีค่าคงที่การแผ่

กระจายสูง ก็จะมีผลถึงความเข้มข้นในเฮดสเปซได้เช่นกัน (Kolb and Ettre, 1997 : 61) ซึ่งในทางปฏิบัติความถูกต้องของอุณหภูมิที่ต้องการควรอยู่ที่ ± 1องศาเซลเซียส (Kolb and Ettre, 1997: 62)

4.5 การศึกษาปริมาตรที่เหมาะสม

จากกฎของเฮนรี่ และการพิจารณากฎทรงมวลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ระเหยได้ระหว่าง 2 เฟส ที่วิเคราะห์โดยเทคนิคเฮดสเปซ จะแสดงความสัมพันธ์ได้ดังสมการ

$$C^0_L V_L = C_L V_L + C_G V_G \quad \text{.....4.1 (Seto, 1994: 28)}$$

เมื่อ C^0_L แทนความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเตราะห์ในเฟสของเหลวก่อนถึงสภาวะสมดุลของเฮดสเปซ

C_L และ C_G แทนความเข้มข้นในเฟสของเหลวและแก๊ส ที่สภาวะหลังสมดุล ตามลำดับ

V_L และ V_G แทนปริมาตรของเฟสของเหลวและแก๊ส ตามลำดับ

จากสมการความสัมพันธ์ ค่าคงที่การแผ่กระจาย (k) และ อัตราส่วนเฟส (β)

$$k = C_L / C_G \quad \text{.....} \quad 4.2$$

$$\beta = V_G / V_L \quad \text{.....} \quad 4.3$$

แทนค่า 4.2 และ4.3 ลงใน 4.1 จะได้

$$C_G = C^0_L / (k + \beta) \quad \text{.....} \quad 4.4$$

ถ้ากำหนดให้ความไวของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเฮดสเปซแทนด้วย S จะแสดงความไวของการวิเคราะห์ได้ตามสมการ

$$S = f(V_G,inj / ((k + \beta) \text{.....} 4.5$$

เมื่อ f แทน แฟกเตอร์ที่แสดงความไวของการตรวจวัด

V_G,inj แทน ปริมาตรของแก๊สที่ฉีด

จากสมการนี้แสดงให้เห็นว่า ความไวของการวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคเฮดสเปซเมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดของเหลวเข้าสู่แก๊สโครมาโทกราฟโดยตรง ความไวที่วัดได้จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นในเฟสที่เป็นแก๊สที่สภาวะหลังสมดุล และขึ้นกับค่าคงที่การแผ่กระจาย อัตราส่วนเฟส และความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในเฟส

ก่อนถึงสภาวะสมดุลของเฮดสเปซ ดังนั้นพื้นที่ใต้พีกจะแปรตามสมการที่ 4.4 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกที่สภาวะสมดุล กับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในเฮดสเปซ ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในเฟสของเหลว ค่าคงที่การแผ่กระจายและอัตราส่วนเฟส ต่างสัมพันธ์กันทั้งหมด (Kolb and Ettre, 1997: 16) และค่า $(k+\beta)$ เป็นค่าคงที่ที่สภาวะใด ๆ สำหรับสารที่สนใจวิเคราะห์เมื่ออยู่ในสภาวะเจือจาง จะเป็นค่าคงที่ค่าหนึ่งที่อุณหภูมิและในเมตริกซ์หนึ่ง ค่า k จะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะของเมตริกซ์ และสำหรับอัตราส่วนเฟสเกี่ยวข้องกับความไวของเทคนิคเฮดสเปซ จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาตรของของเหลวเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องศึกษาปริมาตรที่เหมาะสม เพื่อให้ได้พื้นที่ใต้พีกดีที่สุด ซึ่งสัมพันธ์ กับความไวของการตรวจวัด ดังแสดงในสมการที่ 4.5 ข้างต้น

4.6 การศึกษาปริมาณโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม

ในการศึกษาข้อนี้ต้องใช้โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อเปลี่ยนเกลือเอมีนไฮโดรคลอไรด์ให้กลายเป็นเอมีนอิสระ (Seto, 1994: 32) และระเหยอยู่ในเฮดสเปซได้ จากการศึกษาเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ 3.25% วัด pHได้ 13.7 จะให้สัญญาณตอบสนองดีที่สุด (ในขณะที่บางความเข้มข้นให้สัญญาณดีกว่านี้แต่ไม่เลือกใช้เพราะมีความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สูงกว่า) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่าให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของผู้วิจัยอื่นดังนี้

จากการศึกษาของมาริสและคณะ (Maris et al.,1999) กล่าวว่า การสกัดเอมีนออกจากสารละลายที่ pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ pH 13.7 (Tsukioka, Osawaและ Murakami, 1993 อ้างถึงใน Maris, et al. 1999) ได้แสดงให้เห็นว่าสัญญาณของเอมีนตติยภูมิ จะค่อย ๆลดลงเมื่อใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นกว่า 3.4 โมลาร์ วัด pH ได้ 13.7 จากการศึกษาของอันเดอร์สัน (Andunsson, 1988 : 303) เติมโซเดียมฮดรอกไซด์ลงในสารละลายกรดของเอมีนในปริมาณแตกต่างกัน พบว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณเบสมีผลให้พื้นที่พีกเพิ่มขึ้น จนกระทั่งคงที่ในที่สุด ซึ่งต้องใช้สารละลายที่มี pH มากกว่า 12.5 จึงจะเพียงพอ

4.7 การศึกษาปริมาณเอมีนของตัวอย่างจริงในสองสภาวะที่ต่างกัน

จากข้อเท็จจริงว่า หลังปลาตายจะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเกิดขึ้น ซึ่งจะทำให้มีสารเคมีที่ให้กลิ่นจนสามารถรับรู้ด้วยประสาทสัมผัสได้ แต่เพื่อให้สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการและเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์จึงได้มีการพัฒนาวิธีโดยใช้การตรวจวัดทางเคมีเกิดขึ้น

ในการทดลองนี้ จะศึกษาปริมาณเอมีนส์ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างปลาสด จากสภาพสดจนเสื่อมสภาพไปในขณะที่มีสารประกอบเอมีนเกิดขึ้น เอมีนที่สนใจคือ ไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน โดยเลือกศึกษาในตัวอย่างปลาทะเล (ปลาสำลี) ที่ซื้อมาจากตลาด เนื่องจากไม่อาจทราบได้ว่า ตัวอย่างที่ซื้อมานี้ถูกจับมานานกี่วัน ดังนั้นในการทดลองจึงกำหนดให้วันแรกที่ซื้อมาเป็นวันที่ศูนย์ วันถัดไปเป็นวันที่หนึ่งของการเก็บรักษา

จากการศึกษาปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนทุก ๆวันเว้นวัน พบว่าไม่พบไดเมธิลเอมีน สำหรับไตรเมธิลเอมีนในวันที่ศูนย์ตรวจพบน้อยมาก การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่2 ถึงวันที่4 และวันที่4 ถึงวันที่ 6 ปริมาณไตรเมธิลเอมีนเพิ่มขึ้น2 เท่าและ 4 เท่าตามลำดับ วันที่8 และ 10 ปริมาณลดลงเล็กน้อย จากนั้นค่อยๆ เพิ่มขึ้นอีกครั้ง ในวันที่ 12 ระหว่างวันที่ 8 ถึง วันที่ 12 มีค่าความเบี่ยงเบนสูงมาก อาจเกิดเนื่องจากความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าปริมาณไตรเมธิลเอมีนเพิ่มขึ้นในลักษณะเดียวกันในระหว่างวันที่ 2 ถึง 4 ในวันที่ 6 ปริมาณลดลง วันที่ 8 ถึงวันที่ 12 จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น และลดลงอีกครั้งในวันที่ 14 ถึง 16 เมื่อเปรียบเทียบผลที่สองสภาวะจะเห็นว่า ในช่วงวันที่ศูนย์ ถึงวันที่ 6 ปริมาณไตรเมธิลเอมีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทั้งสองสภาวะ จากนั้นจะเพิ่มขึ้นช้าๆ และปริมาณลดลงหลังวันที่ 12 ทั้งสองสภาวะ เมื่อพิจารณาอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณไตรเมธิลเอมีนจะเห็นว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเร็วกว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (microorganisms) ที่มีผลต่อเอนไซม์ ทำให้เกิดเอมีนที่ระเหยได้เหล่านี้ สัมพันธ์ขึ้นกับอุณหภูมิและสิ่งแวดล้อมด้วย (Miller et al., 1973) จากการทดลองของ Kryzemien และ Elias (Kryzemien and Elias, 1990) พบว่าหลังจากปริมาณไตรเมธิลเอมีนเพิ่มขึ้น เมื่อถึงวันที่ 8 และ 9 ปริมาณจะคงตัว จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยถึงวันที่ 11 แล้วหลังจากนั้นปริมาณจะคงอยู่ ในขณะที่ปริมาณ

เอมีนส์ที่วิเคราะห์โดยการฉีดของเหลวโดยตรงจะมีปริมาณลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณในเฮดสเปซยังคงอยู่ในสภาวะสมดุล ต้องเก็บไว้นานกว่านี้จึงจะเห็นว่า ปริมาณเริ่มลดลง

จากผลการทดลองจะเห็นว่าบางช่วงมีความเบี่ยงเบนของข้อมูลสูงมาก อาจเนื่องมาจากหลายสาเหตุด้วยกัน คือ ความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง เพราะถ้าบดตัวอย่างให้ละเอียด จะมีปัญหาในช่วงการเตรียมเฮดสเปซเพราะตัวอย่างจะเกาะกันเป็นก้อน ทำให้แทนที่จะทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสมากพอกลับได้ผลไม่ดีตามที่คาดไว้ แม้ว่าจะเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนการเพิ่มอุณหภูมิก็ตาม การเตรียมตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆจะช่วยลดปัญหานี้ได้ แต่กลับเกิดปัญหาใหม่คือทำให้ตัวอย่างไม่เป็นเนื้อเดียวกัน เพราะเนื้อปลาบริเวณที่เคยสัมผัสกับอวัยวะที่เป็นระบบทางเดินอาหารซึ่งมีสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆที่ทำให้มีโอกาสผลิตเอมีนที่ระเหยได้มากกว่าเนื้อปลาบริเวณอื่น ซึ่งส่งผลให้ข้อมูลมีความเบี่ยงเบนดังกล่าว

4.8 ปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเฟสอยู่กับที่ต่างกัน และการวิเคราะห์ปริมาณเบสที่ระเหยได้ (Total Volatile Bases: TVB-N)

ปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในเฮดสเปซ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณเบสที่ระเหยได้พบว่า มีปริมาณต่างกันมาก คนละระดับขนาด ไม่อาจนำมาเปรียบเทียบกันได้ เนื่องจากไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนเป็นเพียงสารประกอบบางส่วนของเบสทั้งหมดที่ระเหยได้เท่านั้น (Bolta, Lauder and Jewer, 1984)

ปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างอาหารทะเลสดเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิคเฮดสเปซ ใช้เฟสอยู่กับที่ต่างกันคือ 4% Carbowax 20M บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช และ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมช บรรจุในคอลัมน์แก้วขนาดเท่ากันคือ 2.0 ม. × 2.6 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) พบว่า ไดเมธิลเอมีนอยู่ระหว่าง ไม่พบ ถึง 9.9 ไมโครกรัม – ไนโตรเจนต่อกรัม และตรวจพบไตรเมธิลเอมีนปริมาณน้อยมาก (ไม่เกิน 0.3 ไมโครกรัม – ไนโตรเจนต่อกรัม) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเฟสอยู่กับที่ทั้งสองชนิด จากผลการทดลองของ มิลเลอร์และคณะ (Miller et al., 1973) ที่ศึกษาสารประกอบที่ระเหยได้ในเนื้อปลาที่ผ่านการสเตอร์ไลส์ มาแล้ว นำไปบ่มที่ 15 องศาเซลเซียส แม้ว่าจะตรวจพบจำนวนแบคทีเรียในวันที่ศูนย์เท่ากับ 7.1×10^6 เซลล์ ต่อกรัม เพิ่มขึ้นเป็น 1.4×10^8 เซลล์ ต่อกรัม

เป็นตัวเลข) ทำนองเดียวกับผลการวิเคราะห์ของ เซโตและคณะ (Seto, Ito and Matsumoto, 1963 อ้างถึงใน Gruger, 1972) ซึ่งกล่าวว่าในปลาที่เสื่อมสภาพตรวจไม่พบไดเมธิลเอมีน สำหรับปริมาณไตรเมธิลเอมีนตรวจพบน้อยมาก เนื่องจากอาหารทะเลที่นำมาวิเคราะห์ ซื้อมาจากตลาดที่ชาวประมงใช้เรือขนาดเล็กเป็นพาหนะ ไม่สามารถอยู่ในทะเลได้เป็นเวลานาน ๆ ส่วนใหญ่จะไป-กลับภายใน1 คืน จึงทำให้มีความสด ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่า

ในอาหารทะเลแช่แข็ง ซึ่งคาดว่าน่าจะพบไดเมธิลเอมีนบ้างเนื่องจากถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ แต่กลับตรวจไม่พบ เนื่องจากเมื่อตัวอย่างผ่านกระบวนการต่าง ๆในโรงงานอาหารซึ่งถูกรับซื้อจากพ่อค้าคนกลางส่วนใหญ่ จะถูกทำความสะอาดอย่างพิถีพิถัน ด้วยน้ำเติมคลอรีน ซึ่งน้ำเติมคลอรีนที่มีคุณภาพเดียวกันกับน้ำประปา จะมีปริมาณคลอรีน 1 กรัมต่อน้ำลูกบาศก์เซนติเมตร (ดารณี หมู่ขจรพันธ์, ม.ป.ป.) ก่อนจะนำไปเก็บในห้องเย็น ซึ่งเท่ากับเป็นการลดปริมาณแบคทีเรียให้มีน้อยที่สุดก่อน ทำนองเดียวกันทำให้ตรวจไม่พบไตรเมธิลเอมีนเช่นกัน

4.9 ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้หลอดบรรจุตัวดูดซับ

เมื่อทำการศึกษาโดยดูดไอระเหยผ่านขวดสารมาตรฐานที่ต่อไปยังหลอดบรรจุตัวดูดซับที่อัตราเร็วและ เวลาต่าง ๆกัน คืออัตราเร็ว 100 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 5, 10 และ 20 นาที อัตราเร็ว 50 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 6, 8, 10, 12 และ13 นาที และอัตราเร็ว 25 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 4, 8, 12, 14, 15 และ 16นาที พบว่าที่อัตราเร็วของการดูดอากาศ 25 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็นเวลานาน 12 –16 นาที ตรวจพบไตรเมธิลเอมีน แต่ไม่พบไดเมธิลเอมีนกับโพรพิลเอมีน นั่นคือต้องเก็บแก๊สปริมาตร 300 –500 มิลลิลิตร เป็นอย่างน้อยจึงจะตรวจพบไตรเมธิลเอมีน แต่เมื่อทดลองใช้อัตราเร็วสูงกว่า 25 มิลลิลิตรต่อนาที กลับพบว่า ตรวจพบไตรเมธิลเอมีนน้อยกว่าที่ 25 มิลลิลิตรต่อนาที

จากการศึกษาที่อัตราเร็ว 25 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่า

- ถ้าเก็บอากาศนาน 12 นาทีคิดเป็นปริมาตรอากาศ 300 มิลลิลิตร ตรวจพบไตรเมธิลเอมีนในซิลิกาเจลส่วนที่หนึ่ง ไม่พบในส่วนที่สอง คิดเป็นพื้นที่รวม 190 หน่วย
- เก็บอากาศนาน 14 นาที คิดเป็นปริมาตรอากาศ 350 มิลลิลิตร ตรวจพบไตรเมธิล

เอมีนในซิลิกาเจล ทั้งสองส่วน คิดเป็นพื้นที่รวม 513 หน่วย

- เก็บอากาศนาน 16 นาที คิดเป็นปริมาตรอากาศ 400 มิลลิลิตร ตรวจพบไตรเมธิลเอมีนในซิลิกาเจลทั้งสองส่วน คิดเป็นพื้นที่รวม 900 หน่วย (พบในส่วนที่สองมากกว่าส่วนที่หนึ่ง)

จากผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่าในการเก็บไอระเหยเพื่อวิเคราะห์ไตรเมธิลเอมีน ไม่ควรเก็บไอระเหยเกิน 400 มิลลิลิตร โดยเลือกใช้อัตราเร็วของการดูดไอระเหยที่ไม่สูงนัก แต่เป็นเวลานานจะได้ผลดีกว่าการใช้อัตราเร็วสูงเวลาสั้น เมื่อคิดเป็นปริมาตรของไอระเหยเท่ากัน ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมต้องปรับตัวแปรต่าง ๆ ให้เก็บไอระเหยของไตรเมธิลเอมีนไว้ในซิลิกาเจลส่วนที่หนึ่งมากกว่าส่วนที่สอง เพราะจริง ๆแล้ว ตัวดูดซับในส่วนที่สอง ถูกบรรจุไว้เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่า ปริมาตรไอระเหยที่เก็บนั้นเป็นปริมาณที่ไม่ปลอดภัยแล้ว เพราะถ้าเก็บไอระเหยมากกว่านี้ก็จะทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้เนื่องจากเกินความสามารถที่ตัวดูดซับจะรองรับได้ หลังจากนั้นได้ศึกษานำตัวอย่างปลามาวิเคราะห์ที่สภาวะนี้ เทียบกับเทคนิคเฮดสเปซพบว่า ตรวจพบไตรเมธิลเอมีนในตัวอย่างเมื่อใช้หลอดบรรจุตัวดูดซับ แต่ตรวจไม่พบโดยเทคนิคเฮดสเปซ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นไปอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำหลอดบรรจุตัวดูดซับมาใช้เก็บกลิ่นจากตัวอย่างปลาแล้วนำมาวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ หลังจากที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมก่อน

ถ้าเลือกใช้วิธีเดียวกันนี้เพื่อวิเคราะห์ไดเมธิลเอมีนจะตรวจไม่พบ เนื่องจากปริมาตรที่เหมาะสมในการเก็บอากาศให้เกิดการดูดซับบนซิลิกาเจลสำหรับวิเคราะห์ไดเมธิลเอมีนจะต้องใช้ปริมาตร 3 ลิตร –30 ลิตร ที่อัตราเร็ว 0.01 – 1.0 ลิตรต่อนาที (NIOSH Method 2010) (Eller , 1994 : 62) แต่จากการทดลองนี้ใช้ปริมาตรอากาศเพียงไม่เกิน 500 มิลลิลิตร จึงตรวจไม่พบไดเมธิลเอมีนดังกล่าว

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถวิเคราะห์ไตรเมธิลเอมีน โดยใช้หลอดบรรจุตัวดูดซับช่วยเพิ่มปริมาณให้เข้มข้นขึ้นได้ และสามารถตรวจไดเมธิลเอมีนได้ตามวิธีของ NIOSH แต่ไม่อาจทำได้ในคราวเดียวกัน เนื่องจากความสามารถในการดูดซับของซิลิกาเจลต่อสารประกอบเอมีนส์ทั้งสองแตกต่างกัน ดังนั้นถ้าต้องการใช้หลอดดูดซับให้สามารถดูดซับเอมีนส์ได้ทั้งสองตัวในคราวเดียวกัน อาจต้องเลือกใช้ตัวดูดซับชนิดอื่นแทน

บทที่ 5

บทสรุป

การศึกษาการตรวจวัดและหาปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน โดยเทคนิคเฮดสเปซแก๊สโครมาโทกราฟี เมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ชนิดแก๊ส-ลิควิด และแก๊ส-โซลิดโครมาโทกราฟี ชื่อการค้า 4% Carbowax 20M/ 0.8% KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมช และ Chromosorb 103 ขนาด 80/100 เมชตามลำดับ ได้ผลเป็นที่น่าพอใจระดับหนึ่งกล่าวคือ

เมื่อใช้ 4% Carbowax 20M/ 0.8% KOH บน Carbopack B ขนาด 60/ 80 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่ บรรจุในคอลัมน์แก้วยาว 2 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.6 มิลลิเมตร ตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออนไนเซชั่น มีสภาวะการแยกที่เหมาะสมคืออุณหภูมิการแยก 75 องศาเซลเซียส แบบไอโซเทอร์มัล อุณหภูมิหัวฉีดและตัวตรวจวัด 110 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 20 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราเร็วของแก๊สไฮโดรเจนต่ออากาศ 1 ต่อ 10 เตรียมเฮดสเปซของสารละลายมาตรฐานไดเมธิลเอมีน ไตรเมธิลเอมีน และโพรพิลเอมีนในสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3.25 % อัตราส่วนเฟส 0.5 ในขวดแก้วขนาด 60 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ให้การตอบสนองเชิงเส้นสำหรับไดเมธิลเอมีน ตั้งแต่ 10^{-1} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรถึง 10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร โดยมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกเท่ากับ 1.0000 และให้การตอบสนองเชิงเส้นของไตรเมธิลเอมีน ตั้งแต่ 10^{-2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร ถึง 10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9984 กราฟมาตรฐานแบบอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดของไดเมธิลเอมีน และไตรเมธิลเอมีนมีสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก $y = 0.1192x - 0.141$ และ $y = 1.8725x - 0.8167$ สัมประสิทธิ์สห

สัมพันธ์ 0.9992 และ 0.9975 ตามลำดับ ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน เท่ากับ 0.17 และ 0.16 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร

เมื่อใช้ Chromosorb 103 ขนาด 80/ 100 เมช เป็นเฟสอยู่กับที่ บรรจุในคอลัมน์แก้ว ยาว 2 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.6 มิลลิเมตร ตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออนไนเซชั่น มีสภาวะการแยกที่เหมาะสมคืออุณหภูมิการแยกแบบไอโซเทอร์มัลที่ 120 องศาเซลเซียส อุณหภูมิหัวฉีดและตัวตรวจวัด 170 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 20 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราเร็วของแก๊สไฮโดรเจนต่อ อากาศ 1 ต่อ 10 เตรียมเฮดสเปซ ใช้อัตราส่วนเฟส และเตรียมสารละลายมาตรฐานในสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ทำนองเดียวกับสภาวะของเฟสอยู่กับที่ชนิด 4% Carbowax 20M /0.8% KOH บน Carbopack B ให้ผลการตอบสนองเชิงเส้นสำหรับไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน ตั้งแต่ 10^{-1} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรถึง 10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร และตั้งแต่ 10^{-2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร ถึง 10^{2} มิลลิกรัม-ไนโตรเจน ต่อลิตร ตามลำดับ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 และ 0.9996 ตามลำดับ กราฟมาตรฐานแบบอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนให้สมการแสดงความสัมพันธ์ $y = 0.1092x - 0.1326$ และ $y = 1.5266x - 1.178$ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9901 และ0.9977 ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนเท่ากับ 1.5 และ 2.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร

การใช้เฟสอยู่กับที่ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการพบว่า Carbowax 20M อัตราส่วนต่าง ๆ คือ 10%, 5% และ 2%บน ChromosorbW ขนาด 80/ 100 เมช ซึ่งบรรจุในคอลัมน์แก้วยาว 2 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.6 มิลลิเมตร ไม่เหมาะสำหรับใช้แยกไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีน เนื่องจากสารมาตรฐานมีรีเทนชั่นไทม์สั้นเกินไป และมีค่าการแยกน้อยกว่า 1 ถ้าต้องการใช้ Carbowax 20m เป็นลิควิดเฟส ควรเลือกใช้ซัพพอร์ทที่เฉื่อยกว่า ChromosorbW หรือถ้าจะเลือกใช้ ChromosorbW เป็นซัพพอร์ท ต้องใช้ลิควิดเฟสที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่า Carbowax 20M

การวิเคราะห์ปริมาณไตรเมธิลเอมีนและไดเมธิลเอมีนด้วยเฟสอยู่กับที่ ชนิด 4% Carbowax 20M /0.8% KOH บน Carbopack B และ Chromosorb 103 ในตัวอย่างอาหารทะเลบางชนิดพบว่า ตรวจพบไดเมธิลเอมีนตั้งแต่ไม่พบถึง 9.9 ไมโครกรัม-ไนโตรเจน

ต่อกรัม พบไตรเมธิลเอมีนตั้งแต่ ไม่พบถึง 0.3 ไมโครกรัม-ไนโตรเจนต่อกรัม นอกจากนี้ยังสามารถใช้ 4% Carbowax 20M /0.8% KOH บน Carbopack B ขนาด 60/80 เมชเป็นเฟสอยู่กับที่ในการศึกษาปริมาณเอมีนทั้งสองชนิดในตัวอย่างปลาทะเลที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกันได้

นอกจากการศึกษาปริมาณไดเมธิลเอมีนและไตรเมธิลเอมีนโดยเทคนิคดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังสามารถเตรียมสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น ด้วยหลอดบรรจุตัวดูดซับ เพื่อดูดซับไอระเหยของไตรเมธิลเอมีนไว้ จากนั้นคายการดูดซับด้วยสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ นำไปวิเคราะห์โดยเทคนิคเฮดสเปซแก๊สโครมาโทกราฟีได้อีกด้วย

บรรณานุกรม

กฤษณา โสภณพงษ์. 2539. "ส่วนที่ 3 : การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสสำหรับผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ", ใน การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำโดยประสาทสัมผัส. หน้า1. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ร่วมกับสถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำและกองควบคุมตรวจสอบผลิตภัณฑ์และการแปรรูปสัตว์น้ำ.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 1997. www.oae.go.th/newsinfo/yearbook/1996-1997/part125.html.

ดารณี หมู่ขจรพันธ์. มปป. "คุณภาพน้ำสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร". กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (สำเนา)

นงลักษณ์ สุทธิวนิช. 2531. คุณภาพสัตว์น้ำ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล. 2539. "ความสดของสัตว์น้ำและกระบวนการเสื่อมคุณภาพ", ในการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำโดยประสาทสัมผัส วันที่ 4-5 มิถุนายน 2539. หน้า 4. กรุงเทพฯ : กรมประมง.

_____. ม.ป.ป. "ดัชนีความเสื่อมสภาพคุณภาพของอาหารทะเล". ม.ป.ท. : กองวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (สำเนา)

Andre, C. E. and Mosier, A. R. 1973. "Precolumn Inlet System for the Gas Chromatographic Analysis of Trace Quantities of Short-chain Aliphatic Amines", Anal. Chem. 45, 1971-1973.

Audunsson, Gudjon Atli. 1988. " Trace Analysis of Amines by GLC with Special Emphasis on Sample Pretreatment, Particularly Supported Liquid Membrane", Doctoral Dissertation Department of Analytical Chemistry University of Lund.

Bolta, J. R.; Lauder, J. T. and Jewer, M. A. 1984. "Effect of Methodology on Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) Determination as an Index of Quality of Fresh Atlantic Cod (*Gadus morhua*)", J. of Food Science. 49, 734-736, 750.

Chang, G. W. ; Chang, W. L. and Lew, K. B. 1976. "Trimethylamine Specific Electrode for Fish Quality Control", J. Food Sci. 41, 723-724.

Dicorcia, A. and Sampari, R. 1964. "Gas Chromatographic Determination at the Parts-Per-Million Level of Aliphatic Amines in Aqueous Solution", Anal. Chem. 36, 2097-2099.

Dunn Stephen R., et al. 1976. "Gas Chromatographic Determination of Free Mono-, Di-, and Trimethylamine in Biological Fluids", Anal. Chem. 48, 41-44.

Dyer, W. J. 1945. "Amines in Fish Muscle Colorimetric Determination of Trimethylamine as the Picrate Salt", J. Fish Res. Bd. Can. 6, 351-358.

Eller, Peter M. 1994. NIOSH Manual of Analytical Methods. 4th ed. Ohio : National Institute for Occupational safety and Health Division of Physical Sciences and Engineering.

Ellis, P. Christopher; Silva, Mary L. and Lee, Chong M. 1997. "Statistical Classification of Seafood Quality", J. of AOAC International. 80, 1347-1359.

FAO. 1986. Manual of Food Quality Control 8. Food Analysis : Quality, Adulteration, and Tests of Identity. Rome : FAO.

Fiddler, W., et al. 1972. "Formation of N-Nitrosodimethylamine From Naturally Occurring Quaternary Ammonium Compounds and Tertiary Amine", Nature. 236, 307.

Fiddler, W. ; Doerr, R. C. and Gates, R. A. 1991. "Gas Chromatographic Method for Determination of Dimethylamine, Trimethylamine, and Trimethylamine Oxide in Fish-Meat Frankfurters" , J. ASSOC. OFF. Anal.

Chem. 74, 400-403.

Green, J. D. 1995. "Column Types : Gas Chromatography – Theory and Instrumentation", Encyclopedia of Analytical Science. 9, 1775– 1776.

Gruger, Edward H., Jr. 1972. "Chromatographic Analyses of Volatile Amines In Marine Fish", J. AGR. Food and Chem. 20, 781-785.

Hughes, R. B. 1959. "Chemical Studies on the Herring (*Clupea harengus*). I Trimethylamine Oxide and Volatile Amine in Fresh, Spoiling and Cooked Herring Flesh", J. of the Science of Food and Agriculture. 10, 431-436.

Hungerford, J. M. 1992. "General Referee Reports : Seafood Products", J. of AOAC International. 75: 104.

_____ 1998. "Fish and Other Marine Products", in Official Methods of Analysis of AOAC International, 7. Cunniff P. 16th ed. 4th.Revision. 1998 Vol II. Maryland : AOAC International.

Johnson, J. F. 1972. "Gas Chromatography", in Guide to Modern Methods of Instrumental Analysis, 1- . Gouw, T. H. ed. New- York : John Wiley & Sons, Inc.

Karger, B. L. ; Synder, L. R.. and Horvath, C. 1973. An Introduction of Separation Science. Canada : John Wiley & Sons, Inc.

Keay, J. N. and Hardy, R. 1972. "The Separation of Aliphatic Amines in Dilute Aqueous Solution by Gas Chromatography and Application of the Technique to the Quantitative Analysis of Tri and Dimethylamine in Fish", J. Sci. Food Agric. 23, 9-19.

Kolb, Bruno and Ettre, Leslie S. 1997. Static Headspace – Gas Chromatography. USA : Wiley – VCH, Inc.

Krzymien, M. E. and Elias, L. 1990. "Feasibility Study on the Determination of Fish Freshness by Trimethylamine Headspace Analysis", J. Food Sci. 55, 1228-1232.

Krzymien, M. E. ; Elias, L. and Sim, P. G. 1992. "Development of an Instrumental Approach to assessing Fish Freshness by Headspace Analysis for Trimethylamine", in Seafood Science and Technology, 216- 224. Bligh, E. G.,et al., eds. Cornwall : Fishing News Books.

Kuwata, K., et al. 1983. "Trace Determination of Low Molecular Weight Aliphatic Amines in Air by Gas Chromatography", Anal. Chem. 55, 2199-2201.

Lijinsky, W. and Epstein, Samuel S. 1970. "Nitrosamine as Environmental Carcinogens", Nature. 325, 21-23.

Lindsay, R. C. 1996. "Flavors", in Food Chemistry, 754- 755. Fennema, O. R., ed. 3d ed. New york : Marcel Dekker.

Lundstorm, R. C. and Racicot, L. D. 1983. "Gas Chromatographic Determination of Dimethylamine and Trimethylamine in Seafoods" , J. ASSOC. OFF. Anal. Chem. 66, 1158-1163.

Maris, C. et al. 1999. "Static Headspace Analysis of Aliphatic Amines in Aqueous Samples", J. of Chromatography A. 846, 331-339.

Miller A. et al. 1972. "Quantitative and Selective Gas Chromatographic Analysis of Dimethylamine and trimethylamine in Fish" J. Agric. Food Chem. 20: 709.

_____. et al. 1973. "Volatile Compounds Produced in Sterile Fish Muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*", J. Appl. Microbiology. 25, 257-261.

Nonaka, J.; Mitani, H. and Koizumi, C. 1967. "Determination of Volatile Amines in Fish Muscle by Gas-Liquid Chromatography. 1. Trimethylamine", Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 33, 753-757.

Olsson, Anne – Marie. 1981. "Chemical and Physical Properties of the Column Packing in Gas Liquid Partition Chromatography", Doctoral Dissertation Department of Analytical Chemistry University of Lund.

Olsson, Anne-Marie, and Jonsson, Jan A. 1981. "V. Studies of Alkali-Treated

Carbowax Columns for Amine Analysis", in Chemical and Chemical Properties of the Column Packing in Gas Liquid Partition Chromatography, Doctoral Dissertation Department of Analytical Chemistry University of Lund.

Ottenstein, Daniel M. 1973. "The Chromatographic Support in Gas Chromatography", J. of Chromatographic Science. 11, 136-144.

Pedrosa-Menabrito, A. and Regenstein, J. M. 1990. "Shelf-Life Extension of Fresh Fish- A Review Part II- Fish Quality and Methods of Assessment", J. of Food Quality. 13, 209-223.

Perez Martin, R. I., et al. 1987. "Gas Chromatographic Method for the Determination of Volatile Amines in Seafood", Intl. J. Food Sci. & Tech. 22, 509-514.

Ritskes, T. M. 1975. "The Gas Chromatographic Determination of Trimethylamine and Dimethylamine in Fish, Fish Products and Other Foodstuff', J. Food Tech. 10, 221-228.

Ruiter, A. and Wessman, J. M. 1976. "The Automated Determination of Volatile Bases (trimethylamine, dimethylamine and ammonia) in fish and Shrimp", J..Food Technol. 11, 59.

Sato, Y.; Ito, K. and Matsumoto, F. 1963. J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ. 5, 193, quoted in Gruger, Edward H., Jr. 1972. "Chromatographic Analyses of Volatile Amines in Marine Fish", J. AGR. Food and Chem. 20, 781-785.

Seto, Yasuo. 1994. "Review : Determination of Volatile Substances in Biological Samples by Headspace Gas Chromatography", J. of Chromatography A. 674, 25-62.

Smith, E. D. and Radford, R. D. 1961. "Modification of Gas Chromatographic Substrates for the Separation of Aliphatic Amines", Anal. Chem. 33, 1160-1162.

Supelco. 1995. "Amines Analysis by Packed Column GC", Bulletin 737F. Supelco, Inc.

Supelco. 1997. "Mornitoring Airbone Contaminants in Workplace Atmosphere, Using Sampling Devices and GC or HPLC", Bulletin 769G. Supelco, Inc.

Supina, W. R. 1974. The Packed Column in Gas Chromatography. Pennsylvania : Supelco, Inc.

Taylor, J. K. 1987. Quality Assurance of Chemical Measurement. Michigan : Lewis Publishers, Inc.

Tokunaga, T. ; Iida, H. and Miwa, K. 1977. The Gas Chromatographic Analysis of Amines in Fish", Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 43, 219-227.

Tsukioka, T. ; Osawa, H. and Murakami, T. 1993. J. Chromatogr. 642, 395, quoted in Maris, C. et al. 1999. "Static Headspace Analysis of Aliphatic Amines in Aqueous Samples", J. of Chromatography A. 846, 331-339.

Veciana-Nogues, M. T., et al. 1996. "Validation of Gas-chromatographic Method For Volatile Amine Determination in Fish Samples", Food Chem. 57, 569-573.

Wekell, Marleen M. 1990. "General Referee Reports : Seafood Products", J. ASSOC . Anal. Chem. 73 : 112.

Windholz, M., et al. 1976. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals And Drugs, 9th ed. New Jersey : Merck & Co., Inc.

Yancy, Joel A. 1977. Guide to stationary Phases for Gas Chromatography. 11th ed. Connecticut : ANALAB, Inc.

Zhang, A. Q.; Mitchell, S. C. and Smith, R. L. 1999. "Dietary Precausers of Trimethylamine in Man : A Pilot study", Food and Chemical Toxicology. 37, 515-520.

ภาคผนวก

การเตรียมเฟสอยู่กับที่ในห้องปฏิบัติการและการบรรจุคอลัมน์

การเตรียมเฟสอยู่กับที่ 10%, 5%, 2% Carbowax 20M /5% KOH on ChromosorbW ขนาด 80/100 เมช และ5% KOH on ChromosorbW เป็นวิธีการเตรียมเฟสอยู่กับที่ตามวิธีของ Olsson และ Jonsson(1981: 150) และ Supina (1974: 91-94) ดังนี้ ชั่งโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 5 กรัม ละลายในเมธานอลจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันในขวดชมพู่ขนาดใหญ่ ชั่ง Chromosorb W ขนาด 80/100 เมช หนัก 100 กรัม ค่อย ๆ เติมลงในสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่เตรียมไว้ทีละน้อยจนหมด ขณะเดียวกันแกว่งขวดเบา ๆ ตลอดเวลา เพื่อให้เม็ดซัพพอร์ทสัมผัสกับสารละลายทั่วถึง ปิดด้วยจุกยาง ซึ่งมีหลอดแก้ว 2 ทางต่ออยู่ โดยให้ทางหนึ่งต่อกับท่อนำแก๊สไนโตรเจน อีกท่อหนึ่งใช้เป็นทางระบายอากาศ ผ่านแก๊สไนโตรเจนลงในสารละลายที่มีซัพพอร์ท เหตุที่ใช้แก๊สไนโตรเจนแทนอากาศเพราะต้องการทำให้ซัพอร์ทแห้งในบรรยากาศของแก๊สเฉื่อย เพื่อป้องกันไม่ให้ไฮดรอกไซด์ถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอเนต เมื่อเม็ดซัพอร์ทแห้งดีแล้ว จะได้ 5% KOH บน ChromosorbW ขนาด 80/100 เมช เก็บในขวดพลาสติกที่มีฝาเกลียวปิดสนิท

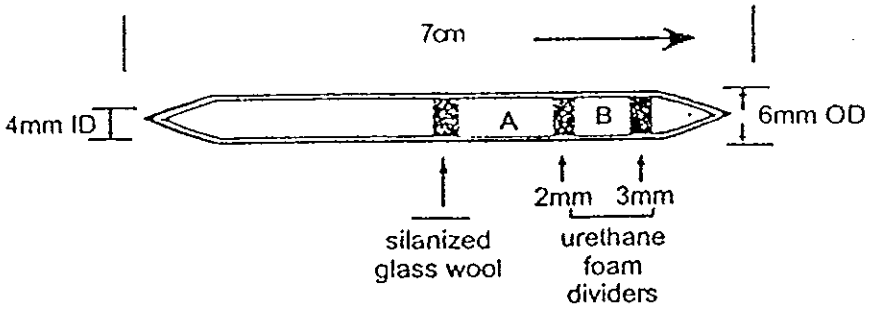
เตรียมเฟสอยู่กับที่ชนิดของเหลวโดย ชั่ง Carbowax 20M 2.5 กรัม ละลายในเมธานอลจนเป็นเนื้อเดียวกัน เทสารละลายที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ใบเดิม ชั่ง 5% KOH บน ChromosorbW ขนาด 80/100 เมช 25 กรัม ค่อย ๆเทลงในสารละลายที่เตรียมไว้ ปิดจุกยางทำให้แห้งด้วยวิธีเดิม คือผ่านแก๊สไนโตรเจนจนตัวทำละลายแห้งดี จะได้เฟสอยู่กับที่ชนิด 10% Carbowax 20M / 5% KOH บน ChromosorbW ขนาด 80/100 เมช หนัก 25 กรัม เก็บไว้ในขวดพลาสติกที่มีฝาเกลียวปิดสนิท ป้องกันให้สัมผัสกับอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์น้อยที่สุด สามารถเตรียมเฟสอยู่กับที่ได้โดยวิธีทำนองเดียวกัน หาความหนาแน่นของเฟสอยู่กับที่แต่ละชนิด โดยการชั่งน้ำหนักของเฟสอยู่กับที่ต่อ 10 ลบ.ซม. แล้วคำนวณน้ำหนักต่อ 1 ลบ.ซม.

การบรรจุเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์วิเคราะห์ (Supina, 1974: 113 - 115)

ชั่งน้ำหนักเฟสอยู่กับที่ที่ต้องใช้เมื่อต้องการบรรจุลงในคอลัมน์วิเคราะห์ยาว 2ม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.6 มิลลิเมตร ต่อคอลัมน์โดยให้ปลายด้านหนึ่งต่อกับปั๊มสุญญากาศ อีกด้านหนึ่งต่อกับกรวยสำหรับถ่ายเฟสอยู่กับที่ลงไปในคอลัมน์ บรรจุใยแก้วในคอลัมน์ด้านที่ต่อกับปั๊ม ให้ใยแก้วอยู่ห่างจากปลายคอลัมน์ 2 – 3 นิ้ว (Yancy, 1977: 143) ค่อย ๆ เทเฟสอยู่กับที่ลงในคอลัมน์ผ่านกรวย เปิดปั๊ม เคาะคอลัมน์เบา ๆเพื่อช่วยให้เม็ดเฟสอยู่กับที่แน่นและสม่ำเสมอ หรือใช้เครื่องสั่นสะเทือนช่วย เทเฟสอยู่กับที่ลงในคอลัมน์เรื่อย ๆอย่างสม่ำเสมอ จนหมด ควรเว้นที่ว่างที่ปลายด้านที่ต่อกับกรวยเอาไว้ประมาณ 2 – 3นิ้ว เช่นกัน เวลาที่ใช้ในการเทเฟสอยู่กับที่ลงในคอลัมน์ไม่ควรนานเกิน 15 นาที (Supina, 1974: 113) เพราะถ้าใช้เวลานานเกินไปจะทำให้เฟสอยู่กับที่ถูกออกซิไดซ์เนื่องจากการสัมผัสกับอากาศได้ นอกจากนี้ถ้าได้รับความชื้นจากบรรยากาศจะทำให้การบรรจุเฟสอยู่กับที่ลงในคอลัมน์ไม่มีความสม่ำเสมอ

การเตรียมหลอดบรรจุตัวดูดซับ (adsorbent tube) (Supelco, 1997)

เตรียมหลอดแก้วขนาด 7 ซม. × 4 มม. (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน) ให้ปลายเปิดด้านหนึ่ง ปลายปิดอีกด้านหนึ่ง เตรียมตัวดูดซับคือ ซิลิกาเจล 40 โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 150 – 180 องศาเซลเซียสนาน 3 – 4 ชั่วโมง เก็บในเดสิเคเตอร์ บรรจุใยแก้วจนถึงปลายด้านที่ปิด ถัดมาเป็นซิลิกาเจล 40 หนัก 50 มิลลิกรัม ใยแก้ว ซิลิกาเจล 40 หนัก 100 มิลลิกรัมและใยแก้วตามลำดับ ปิดปลายหลอดแก้วด้วยเปลวไฟ จะได้หลอดบรรจุตัวดูดซับตามต้องการ ซิลิกาเจลหนัก100 มิลลิกรัมเป็นตัวดูดซับส่วนที่หนึ่ง ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับไอระเหยสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซิลิกาเจลหนัก 50 มิลลิกรัมเป็นตัวดูดซับส่วนที่สองซึ่งบรรจุไว้เพื่อเป็นตัวตรวจเช็คว่ามีการเก็บไอระเหยของสารที่ต้องการวิเคราะห์มากเกินไปหรือไม่



ภาพประกอบที่ 21 แสดงหลอดบรรจุตัวดูดซับ (Supelco, 1997)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางปาริฉัตร สุขเพ็ง

วัน เดือน ปีเกิด วันที่ 27 พฤษภาคม พ.ศ. 2506

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2528

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 7ว. กลุ่มงานอาหาร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลา

616/1 หมู่2 ต.พะวง อ.เมือง จ.สงขลา