

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

ตารางที่ 3.1 รายการสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	เกรด	บริษัท/ประเทศ
สารมาตรฐาน			
เมทิลคาร์บาเมต (methyl carbamate)	$\text{NH}_2\text{COOCH}_3$	analytical grade	Sigma Aldrich/U.S.A.
เอทิลคาร์บาเมต (ethyl carbamate)	$\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	analytical grade	Sigma Aldrich/U.S.A.
สารเคมีอื่นๆ			
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	NaCl	analytical grade	Prung Thip/Thailand
โซเดียมซัลเฟต (sodium sulphate)	Na_2SO_4	analytical grade	Carlo Erba/Italy
ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)	CH_2Cl_2	analytical grade	Carlo Erba/Italy
ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether)	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$	analytical grade	Carlo Erba/Italy
เทอร์เชียรีบิวทานอล (t-butanol)	$(\text{CH}_3)_3\text{COH}$	analytical grade	Carlo Erba/Italy
น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water)	DI water	analytical grade	Waters /U.S.A.
เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol)	CH_3OH	analytical grade	Carlo Erba/Italy
เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate)	$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	analytical grade	Lab Scan /Thailand
เฮกเซน (hexane)	C_6H_{14}	analytical grade	Lab Scan /Thailand

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ ได้แก่

(1) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (gas chromatograph) Thermo Finnigan

Trace GC 2000, U.S.A. ชนิดคอลัมน์ DB-5 ของบริษัท Vertical, Thailand ความยาวคอลัมน์ 30 เมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความหนา 0.25 ไมครอน

(2) เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (balance) Sartorius AC 211S, Germany

- (3) เครื่องระเหยสาร (rotary evaporator) Büchi rotary R-200, Germany
- (4) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Hermle Z 300, Germany
- (5) เตาอบ (oven) Fisher Scientific, Australia
- (6) พีเอชมิเตอร์ (pH meter) Denver Instrument Model 251, U.S.A.
- (7) เฟสของแข็ง (solid-phase extraction cartridge) Vertical C-18, 500 mg,

Thailand

3.2 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

ตัวอย่างไวน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นไวน์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์พื้นบ้าน (OTOP) จากแหล่งต่างๆ ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย จำนวน 10 ตัวอย่าง ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก หน้า 68 ได้แก่

ไวน์แดง ที่ผลิตจากองุ่นแดง กระเจี๊ยบ กระชายดำ หมากเม่า และสตอเบอรี่
ไวน์ขาว ที่ผลิตจากองุ่นเขียว สับปะรด ลิ้นจี่ ใเบเตย และข้าว

3.2.2 การสกัดตัวอย่างไวน์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์

ตัวอย่างไวน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องอยู่ในภาชนะที่ปิดสนิท และไม่เปิดทิ้งไว้นานกว่า 24 ชั่วโมง เพราะจะทำให้ผลการวิเคราะห์สารกลุ่มต่างๆ เกิดความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากเมื่อไวน์สัมผัสอากาศจะทำให้สารกลุ่มที่ระเหยง่ายเกิดการระเหยออกสู่สภาพแวดล้อมได้ หรืออาจมีเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งยีสต์ที่อยู่ในอากาศเกิดการปนเปื้อนในไวน์ได้เช่นกัน ซึ่งเมื่อเปิดภาชนะที่บรรจุแล้วมีขั้นตอนกระบวนการสกัดตัวอย่างไวน์เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แสดงดังภาพที่ 3.1 การสกัดตัวอย่างด้วยของเหลว และภาพที่ 3.2 การสกัดตัวอย่างด้วยเฟสของแข็ง

3.2.2.1 เทคนิคการสกัดด้วยของเหลว (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

เจือจางสารตัวอย่างไวน์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5 (v/v)



นำไวน์ตัวอย่างที่เจือจาง 5 เท่ามา 5, 10, 15, 20 หรือ 25 mL ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 cm³ เติมเกลือ NaCl ที่เข้มข้น 1, 5, 10, 15 หรือ 20 % (w/v) เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของสารละลาย



เติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างเช่น เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ ไคคลอโรมีเทน หรือ เอทิลอะซิเตต ปริมาตร 5, 10, 20, 25 หรือ 50 mL

นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 5, 10, 15, 30 หรือ 60 นาที



แยกชั้นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดออกด้วยกรวยแยก



เติม Na₂SO₄ ปริมาณ 1 กรัม เพื่อกำจัดความชื้นในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์



กรองแยก Na₂SO₄ ด้วยกระดาษกรอง



ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแห้ง



ปรับปริมาตรสารละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 30 mL

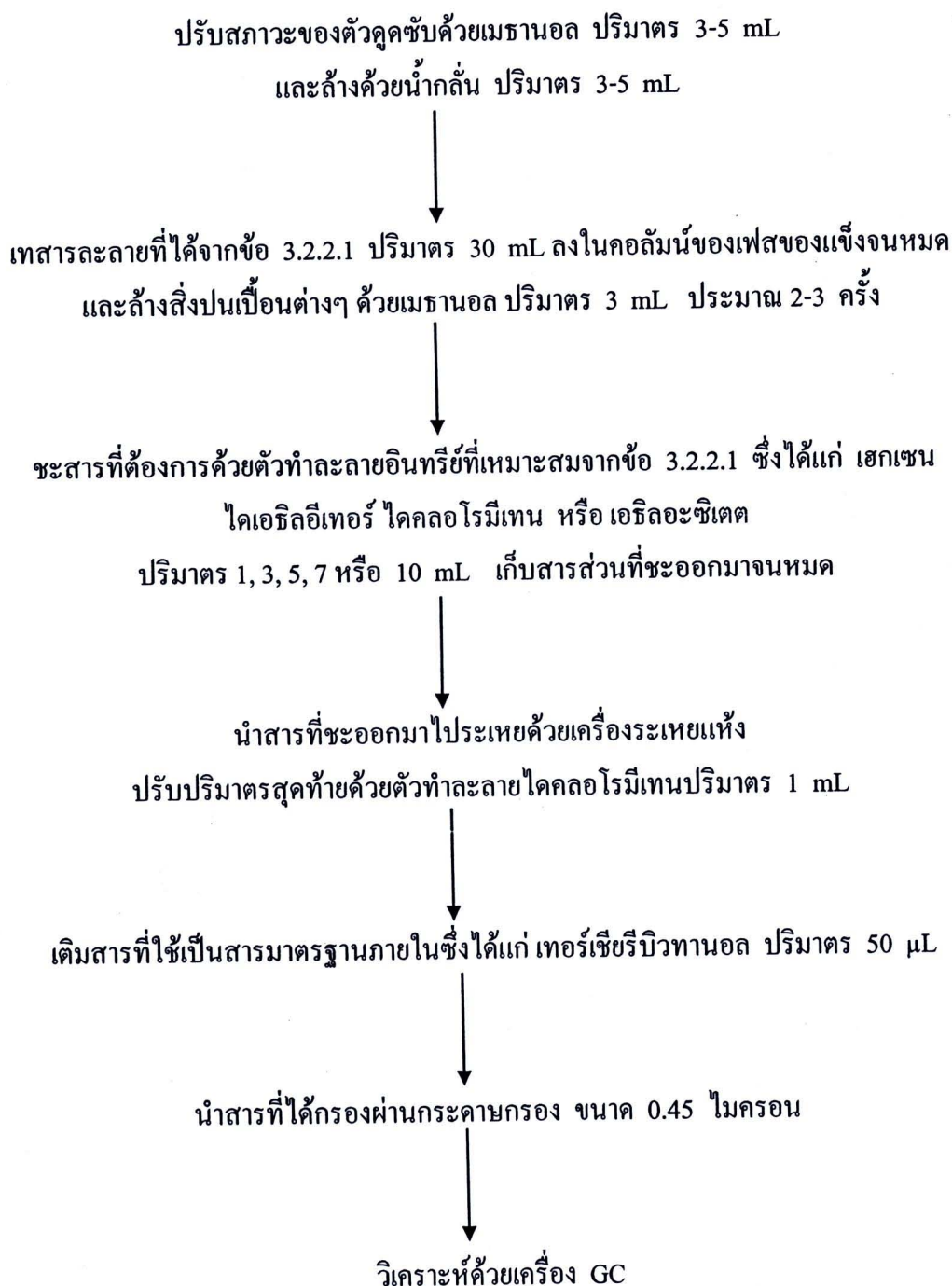
และเติมสารละลายเอทิลอะซิเตตปริมาตร 0.5 mL เพื่อรักษาเสถียรภาพของตัวทำละลาย



นำไปสกัดเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนและเพิ่มความเข้มข้นต่อไป

ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดสารตัวอย่างด้วยของเหลว

3.2.2.2 เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid-Phase Extraction, SPE)



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการกำจัดสิ่งปนเปื้อนและเพิ่มความเข้มข้นสารตัวอย่างด้วยเฟสของแข็ง

3.2.3 การหาสถานะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟที่มีตัวตรวจวัดชนิด เฟลมไอออไนเซชัน ในการวิเคราะห์สารกลุ่มคาร์บาเมต โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (GC) ยี่ห้อ Thermo Finnigan รุ่น Trace GC 2000 (USA)

3.2.3.1 การศึกษาอุณหภูมิของคอลัมน์ที่เหมาะสมในการแยกสารกลุ่มคาร์บาเมต โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของสารเมธิลคาร์บาเมตและเอธิลคาร์บาเมต แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และเทอร์เชียรีบิวทานอลเป็นสารมาตรฐานภายในความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร เข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟที่ตั้งอุณหภูมิของส่วนฉีดสารที่ 150 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน 250 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิของคอลัมน์ ทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 100, 150, 200, และ 220 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบลักษณะของโครมาโทแกรมที่ได้

3.2.3.2 การศึกษาอัตราส่วนของ split/splitless ratio ของสารกลุ่มคาร์บาเมต โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของสารเมธิลคาร์บาเมตและเอธิลคาร์บาเมต แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และเทอร์เชียรีบิวทานอลเป็นสารมาตรฐานภายในความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร เข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟที่ตั้งอุณหภูมิของส่วนฉีดสารที่ 150 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชันที่ 250 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมของคอลัมน์ โดยศึกษา split ratio ที่อัตราส่วน 10:1, 30:1 และ 60:1 เปรียบเทียบลักษณะของโครมาโทแกรมและสัญญาณที่ได้จากเครื่องตรวจวัด

3.2.3.3 การศึกษาเวลาที่คงอยู่ (retention time) ของสารกลุ่มคาร์บาเมต โดยฉีดสารละลายมาตรฐานเมธิลคาร์บาเมตและเอธิลคาร์บาเมต รวมทั้งเทอร์เชียรีบิวทานอลเป็นสารมาตรฐานภายในเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟในสถานะที่เหมาะสม แล้วเปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้

3.2.4 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่มคาร์บาเมตในตัวอย่างไวน้ำพื้นบ้านไทยโดยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟี

3.2.4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยตัวทำละลาย

1) การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างไวน้ำที่มีการเติมสารมาตรฐานผสมเมธิลคาร์บาเมต และเอธิลคาร์บาเมตที่ความเข้มข้นอย่างละ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน ได้แก่ เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตต ดังวิธีการสกัดสารตัวอย่างในข้อ 3.2.2 นำสารที่สกัดได้ไประเหยให้เหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานภายในเทอร์เชียรีบิวทานอลเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.3 และคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ของสารมาตรฐานแต่ละตัวต่อพื้นที่ของสารมาตรฐานภายใน เปรียบเทียบค่าอัตราส่วนดังกล่าวในตัวทำละลายแต่ละชนิด และเลือกตัวทำละลายที่ให้ค่าสัญญาณสูงสุด เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารตัวอย่างต่อไป

2) การศึกษาปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างไวน้ำที่มีการเติมสารมาตรฐานผสมเมธิลคาร์บาเมตและเอธิลคาร์บาเมตที่ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมในข้อ 1) ในปริมาตรที่แตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 20, 25 และ 50 มิลลิลิตร นำสารที่สกัดได้ไประเหยให้เหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานภายในเทอร์เชียรีบิวทานอลเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เลือกปริมาณตัวทำละลายที่ให้ค่าสัญญาณสูงสุด เพื่อใช้เป็นปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารตัวอย่างต่อไป

3) การศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

เตรียมสารตัวอย่างไวน้ำที่จะทำการวิเคราะห์มาในปริมาตรที่แตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานผสมเมธิลคาร์บาเมตและเอธิลคาร์บาเมตที่ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมในข้อ 1) ในปริมาตรที่ได้ในข้อ 2) นำไประเหยและเติมสารมาตรฐานภายในเทอร์เชียรีบิวทานอลและวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แล้วเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้เพื่อหาปริมาตรที่เหมาะสมของสารตัวอย่างที่จะใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4) การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารตัวอย่าง

นำสารตัวอย่างไวน์ที่จะใช้ในการสกัดมาในปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ

3) เติมน้ำมาตรฐานผสมเมธิลคาร์บาเมตและเอธิลคาร์บาเมตที่ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมในข้อ 1) ในปริมาณที่ได้ในข้อ 2) โดยศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัดต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที นำไประเหยและเติมน้ำมาตรฐานภายในเทอร์เชียรีบิวทานอลและวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เปรียบเทียบสัญญาณที่ได้เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารตัวอย่างต่อไป

5) การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ในการแยกชั้นของสารตัวอย่าง

เตรียมสารตัวอย่างไวน์ที่จะใช้ในการสกัดในปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ

3) เติมน้ำมาตรฐานผสมเมธิลคาร์บาเมตและเอธิลคาร์บาเมตที่ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมในข้อ 1) ในปริมาณที่ได้ในข้อ 2) เติมเกลือ NaCl เพื่อช่วยในการแยกชั้นของสารละลาย ในความเข้มข้นที่ต่างกัน ดังนี้ 1, 5, 10, 15 และ 20 (ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร) โดยใช้เวลาในการสกัดที่เหมาะสมตามข้อ 4) นำไประเหยและเติมน้ำมาตรฐานภายในเทอร์เชียรีบิวทานอลและวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เปรียบเทียบสัญญาณที่ได้เพื่อหาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมในการแยกชั้นของสารตัวอย่างต่อไป

6) การศึกษาปริมาตรตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการชะสารตัวอย่างในส่วนเฟสของแข็ง

เตรียมสารตัวอย่างไวน์ที่จะใช้ในการสกัดในปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ

3) เติมน้ำมาตรฐานผสมเมธิลคาร์บาเมตและเอธิลคาร์บาเมตที่ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมในข้อ 1) ในปริมาณที่ได้ในข้อ 2) เติมเกลือ NaCl เพื่อช่วยในการแยกชั้นของสารละลาย ในความเข้มข้นที่เหมาะสมตามข้อ 5) โดยใช้เวลาในการสกัดที่เหมาะสมตามข้อ 4) นำสารที่สกัดได้มาผ่านการเพิ่มความเข้มข้นด้วยเฟสของแข็ง โดยศึกษาปริมาตรตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการชะสารตัวอย่างออกจากส่วนเฟสของแข็ง ดังนี้ 1, 3, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตร นำสารที่ชะออกมาไประเหยและเติมน้ำมาตรฐานภายในเทอร์เชียรีบิวทานอลและวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แล้วเปรียบเทียบข้อมูลจากพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานที่ได้จากปริมาตรตัวทำละลายที่ต่างกันต่อพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน เพื่อหาปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมในการชะสารตัวอย่างออกจากส่วนเฟสของแข็งต่อไป

3.2.4.2 การศึกษาช่วงความเข้มข้นสารมาตรฐานที่ให้กราฟเส้นตรง

เตรียมสารมาตรฐานผสมเมธิลคาร์บาเมตและเอธิลคาร์บาเมตให้มีความเข้มข้นชนิดละ 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และในแต่ละความเข้มข้นมีสารมาตรฐานภายในเทอร์เซียร์บิวทานอลเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำสารละลายที่เตรียมได้ไปสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่หาได้จากข้อ 3.2.4.1 แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

3.2.4.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดสัญญาณได้และความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ

นำข้อมูลกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารเมธิลคาร์บาเมต และเอธิลคาร์บาเมตในตัวอย่างไวน้ำพืชน้ำบ้านไทยมาหาค่าเบี่ยงเบนของเบลงค์ จากนั้นนำผลที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาสัญญาณได้ และความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์

3.2.4.4 การศึกษาความแม่นยำของวิธี

เตรียมสารละลายตัวอย่างไวน้ำที่มีสารละลายมาตรฐานผสม เมธิลคาร์บาเมต และเอธิลคาร์บาเมตที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อลิตร มาสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสม ที่หาได้จากข้อ 3.2.4.1 นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี นำปริมาณสารที่ตรวจพบไปคำนวณร้อยละการได้กลับคืน

3.2.4.5 การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธี

เตรียมสารละลายตัวอย่างไวน้ำที่มีสารละลายมาตรฐานผสม เมธิลคาร์บาเมต และเอธิลคาร์บาเมตที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อลิตร ไปสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสม ที่หาได้จากข้อ 3.2.4.1 นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ ทั้งในวันเดียวกัน (interday) และต่างวันกัน (intraday) เพื่อศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ นำปริมาณสารที่ตรวจพบไปคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์