

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 ตัวอย่างและสถานที่เก็บตัวอย่าง

การกำหนดบริเวณการเก็บตัวอย่างน้ำพริก คือ สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำพริกที่มีจำหน่ายทั่วไปในจังหวัดนครสวรรค์ จำนวน 5 แห่ง ดังนี้

1. น้ำพริกแม่บุญเรือง 112/3 ต. เกษไชย อ. ชุมแสง จ. นครสวรรค์ 60120
  - น้ำพริกเผาปลา
  - น้ำพริกเผาปลา – แมงดา
2. กลุ่มแม่บ้านบึงหลวง 1/1 หมู่ที่ 6 ต. เกษไชย อ. ชุมแสง จ. นครสวรรค์ 60120
  - น้ำพริกเผาปลา
  - น้ำพริกเผาแมงดา
3. กลุ่มแม่บ้านเกษตรกรพนมรอก ต. พนมรอก อ. ท่าตะโก จ. นครสวรรค์ 60160
  - น้ำพริกปลาข้าง
  - น้ำพริกเผาผัด
  - น้ำพริกแมงดา
4. ร้านจันทร์สุวรรณ 314/4-7 ถนนสวรรค์วิถี ต. นครสวรรค์ตึก อ. เมือง จ. นครสวรรค์ 60000
  - น้ำพริกเผากุ้ง
  - น้ำพริกกากหมู
5. ตลาดบ่อนไก่ ถนนโกสีย์ ต. ปากน้ำโพ อ. เมือง จ. นครสวรรค์ 60000
  - น้ำพริกเผาผัด
  - น้ำพริกแมงดา

### 3.2 ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 20 กุมภาพันธ์ - 1 มีนาคม พ.ศ. 2551 โดยเก็บตัวอย่างน้ำพริกที่บรรจุภาชนะแบบปิดและไม่ได้บรรจุภาชนะแบบปิด

### 3.3 การเก็บรักษาตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำพริกที่สุ่มได้เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

### 3.4 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

#### 3.4.1 เครื่องมือ

1. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ( High performance liquid chromatography,HPLC ) บริษัท SHIMADSU รุ่น LC-10AD
  - คอลัมน์ชนิด  $C_{18}$  ขนาด  $4.6 \times 250$  mm packing  $5 \mu\text{m}$  บริษัท GL Sciences Inc.
  - ดีเทกเตอร์ชนิด UV
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท METTLER TOLEDO รุ่น AG204
3. เครื่องวัดพีเอช บริษัท METTLER TOLEDO รุ่น PG 203-S
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง บริษัท HETTICH รุ่น UNIVERSAL 32

#### 3.4.2 อุปกรณ์

1. ขวดวัดปริมาตร
2. ขวดรูปชมพู่
3. กระจกตวง
4. ปิเปต
5. บีกเกอร์
6. หลอดหยด
7. แท่งแก้ว
8. ซ้อนตักสาร
9. อะลูมิเนียมฟอยล์
10. ขวดรีเอเจนต์
11. กรวยแยก
12. แผ่นกรองเซลลูโลสอะซิเตต

### 3.4.3 สารเคมี

#### 1. สารละลายมาตรฐาน

- กรดซอร์บิก, Lab grade ผลิตโดยบริษัท APS Ajax Finechem
- กรดเบนโซอิก, AR grade ผลิตโดยบริษัท APS Ajax Finechem

#### 2. สารที่ใช้สกัด

- เมทานอล, HPLC grade ผลิตโดยบริษัท J. T. Baker Solusorb
- เฮกเซน, HPLC grade ผลิตโดยบริษัท J. T. Baker Solusorb
- แอมโมเนียมอะซิเตต, AR grade ผลิตโดยบริษัท APS Ajax Finechem
- กรดอะซิติก, AR grade ผลิตโดยบริษัท VWR International Ltd.

### 3.5 วิธีการทดลอง

#### 3.5.1 การวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

##### 3.5.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- เตรียม Stock standard solution โดยชั่งกรดเบนโซอิกหนัก 1.0 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร เติมเมทานอลปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

- เตรียม Working standard solution โดยปีเปิด stock standard solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

1.) สำหรับการหาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของกรดเบนโซอิกให้มีความเข้มข้นเป็น 1, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ppm

2.) สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ให้เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่มีความเข้มข้นเป็น 1, 5, 10, 50 และ 100 ppm

##### 3.5.1.2 การสกัดกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกออกจากตัวอย่างน้ำพริก

- ชั่งตัวอย่างน้ำพริกหนัก 5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่

- เติม n-hexane ปริมาตร 15 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้ว

- เติม acetate buffer เข้มข้น 0.005 M (pH 4.4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้า

กันนาน 10 นาที

- เติลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 60 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

- นำตัวอย่างส่วนที่เป็นของเหลวใส่ในกรวยแยกเพื่อแยกชั้นไขมันออก
- นำสารละลายที่ได้เติม n-hexane ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่านาน 10 นาที
- ตั้งทิ้งไว้ นาน 5 นาที แยกชั้นไขมันออกไป
- นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1
- นำสารละลายที่ได้เข้มข้นแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย
- นำไปกรองด้วยแผ่นกรองเซลลูโลสอะซิเตดขนาด 0.45 ไมโครเมตร
- นำสารตัวอย่างที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อทำการวิเคราะห์

หมายเหตุ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ สำหรับแต่ละตัวอย่าง

### 3.5.1.3 การวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

1) การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก

- ทดลองหาสภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง โดยใช้ mobile phase ต่าง ๆ กัน ปรับอัตราส่วนของ mobile phase เครื่องตรวจวัด และอัตราการไหลของ mobile phase เพื่อให้เกิดการแยกของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่ดีที่สุด

2) หาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องมือ

- ศึกษาโดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่มีความเข้มข้น 100 ppm และเจือจางลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งสังเกตจากโครมาโทแกรมพบว่า สัญญาณความสูงของพีคของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกเป็น 3 เท่าของสัญญาณความสูงของพีครบกวน ที่ความเข้มข้นดังกล่าว คือขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด

3) การหาช่วงความเป็นเส้นตรง

- ศึกษาโดยเตรียมสารมาตรฐานผสมของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ppm

- ฉีดสารละลายผสมที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

- สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคที่ได้หาช่วงความเป็นเส้นตรง

4) การสร้างกราฟมาตรฐาน

- เตรียมสารละลายผสมของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 5, 10, 50 และ 100 ppm

- นิตสารละลายผสมแต่ละความเข้มข้นเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

- สร้างกราฟมาตรฐาน โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค

5) การหาค่าความเข้มข้นของการกลับคืน

- ชั่งตัวอย่างน้ำพริก 100 กรัม เติมนิตสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกอย่างละ 0.05 กรัม บดให้ละเอียด

- นำไปสกัดตามวิธีข้อ 3.5.2

หมายเหตุ : ทำการทดลองเป็นจำนวน 5 ซ้ำ

6) การหาค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ของการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ

- โดยเตรียมนิตสารละลายมาตรฐานผสมของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่มีความเข้มข้น 100 ppm

- นิตสารละลายมาตรฐานเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จำนวน 8 ซ้ำ

- นำผลพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

### 3.6 แผนภาพการทดลอง

การสกัดกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในน้ำพริกเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



