บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืช

1) อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืช
2) ถุงสำหรับเก็บตัวอย่างพืช

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกพืช

1) ภาชนะที่ใช้ปลูกพืช ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว
2) กระดาษ label
3) สารละลายธาตุอาหารพืชสูตร Hoagland' No.2
4) สารกำจัดแมลง คลอร์ไพริฟอส 40% EC
5) เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
6) เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance) 4 ตำแหน่ง denver instrument company รุ่น TR-203
7) เครื่องวัดpH (pH meter): HANNA instruments รุ่น pH 211

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.1.3.1 **เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย** เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร หลอดทดลอง หลอดหยด ปิเปต บิวเรตต์ แท่งแก้ว ขวดแก้วใส (vial) พร้อมฝาเกลียว เป็นต้น

3.1.3.2 **วัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในงานวิจัย** เช่น กระดาษกรอง พาราฟิลม์ กระดาษ label ปากกา label ถุงซิป ถุงมือ หน้ากากปิดจมูก กระดาษฟอยด์ เป็นต้น

3.1.3.3 **เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ**

1) สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

1.1) Hoagland' No.2 basal mixture บริษัท SIGMA

1.2) methanol (analytical reagent grade) บริษัท RCI Labscan

1.3) n-hexane 99% PR บริษัท RCI Labscan

1.4) ethylacetate (analytical reagent grade) บริษัท RCI Labscan

1.5) potassium hydroxide (analytical reagent grade) บริษัท RCI Labscan

2) เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ

2.1) vacuum Manifolds

2.2) vertipak^{TM}HCP tubes

2.3) เครื่องวัดpH (pH meter): HANNA instruments รุ่น pH 211

2.4) เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

3.1.3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพืช

1) สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพืช

1.1) methanol (analytical reagent grade) บริษัท RCI Labscan

1.2) dichloromethane (analytical reagent grade) บริษัท RCI Labscan

1.3) sodium chloride (analytical reagent grade) บริษัท RCI Labscan

1.4) n-hexane 99% PR บริษัท RCI Labscan

1.5) ether บริษัท J.T. Baker.

2) เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพืช

2.1) ตู้อบ (isotemp oven; Fisher Scientific)

2.2) โถแก้วดูดความชื้น (dessicator)

2.3) vacuum manifolds

2.4) vortex; Scientific Industries; Model G-560E

2.5) high speed refrigerated centrifuge; Model: 4293R

2.6) rotavapor vacuum controller R205

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.2 สถานที่ดำเนินงานวิจัย

3.2.1 สถานที่เก็บตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย

พืชที่ใช้ในงานวิจัยเก็บมาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

3.2.1.1 สถานที่ในการใช้ปลูกพืชของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการปลูกพืชในเรือนทดลองที่สร้างขึ้น ณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.1.2 สถานที่ในการวิเคราะห์ตัวอย่างของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการวิเคราะห์สกัดตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการ ตึกวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอร์ไพริฟอสในพืชและน้ำ ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี อาคารสถาบัน 3 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 ขั้นตอนงานวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารละลายธาตุอาหาร

น้ำที่ใช้ในการปลูกพืชเตรียมน้ำสารละลายธาตุอาหารพืชสูตร Hoagland'No.2 (Sigma, USA) ประกอบด้วย :NH_4PO_4 115.03 มิลลิกรัมต่อลิตร H_3BO_3 2.86 มิลลิกรัมต่อลิตร $Ca(NO_3)_2$ 656.4 มิลลิกรัมต่อลิตร $CuSO_4.5H_2O$ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร $FeC_4H_4O_6.2H_2O$ 5.32 มิลลิกรัมต่อลิตร $MgSO_4$ 240.76 มิลลิกรัมต่อลิตร H_2MoO_4 0.016 มิลลิกรัมต่อลิตร KNO_3 606.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $ZnSO_4.7H_2O$ 0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร ในถังน้ำขนาด 50 ลิตร

3.3.2 การเตรียมสารละลายคลอร์ไพริฟอส

เตรียมสารละลายคลอร์ไพริฟอส (lorsban 40% W/V) ในรูปสารละลายเบื้องต้น (stock solution) ในตัวทำละลายอะซิโตน โดยให้มีความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ในขวดสีชาไม่ให้ถูกแสง นำสารละลายเบื้องต้นมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจือจางด้วยน้ำที่เตรียมไว้เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังสมการการเตรียมสารละลายดังนี้

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

เมื่อ M_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายเบื้องต้น

M_2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายสารทดสอบที่ต้องการ

V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายเบื้องต้น

V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายสารทดสอบที่ต้องการ

3.3.3 การเตรียมพืช

ทำการเก็บตัวอย่างพืช โดยคัดเลือกพืชที่มีลักษณะลำต้นแข็งแรง และอยู่ในสภาพสมบูรณ์ นำพืชมาทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นแช่ในสารละลาย clorox 0.01 % (v/v) เป็นเวลา 2 นาที นำขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่นเบาๆ อีก 2 ครั้ง (Olette *et al.*, 2007) และนำไปเลี้ยงไว้ในถังขนาดใหญ่ที่มีสารละลายธาตุอาหารพืช Hoagland'No.2 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายในเรือนทดลองเพื่อทำการขยายพันธุ์ก่อนนำพืชไปทำการทดลอง

3.3.4 การเตรียมภาชนะสำหรับปลูกพืช

ภาชนะสำหรับปลูกพืชที่ใช้ในการทดลองมีความจุ 1.5 ลิตร พื้นที่หน้าตัด 176.79 ตารางเซนติเมตร สูง 10.5 เซนติเมตร นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้วผึ่งให้แห้งและทำการติดฉลากไว้ทุกภาชนะ

3.3.5 การเตรียมการทดลอง

งานวิจัยนี้วางแผนการทดลองแบบ Incomplete Randommize Block Design โดยใช้พืชในงานวิจัยทั้งหมด 2 ชนิด มีตำรับการทดลอง 5 ตำรับการทดลอง ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวพืชมี 1 ช่วงระยะเวลาเก็บเกี่ยว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รวมแล้วพืช 1 ชนิด มีหน่วยทดลอง 54 หน่วย ดังนั้นเมื่อคิดรวมพืชทั้ง 2 ชนิดแล้ว มีหน่วยทดลองทั้งหมด 108 หน่วย รวมหน่วยทดลองที่ไม่ได้ปลูกพืชอีก 24 หน่วย ดังนั้นจะมีหน่วยทดลองในการวิจัยทั้งหมด 132 หน่วย โดยที่ 1 หน่วยทดลอง คือ 1 กระถาง

สำหรับตำรับการทดลองทั้ง 5 ตำรับจะมีการปลูกพืชที่แตกต่างกันดังนี้

1) ชุดการทดลอง สารละลายธาตุอาหารพืชเติมคลอร์ไพริฟอส (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปลูกจอก (น้ำหนักสด 5 กรัม) (อย่างละ 3 ซ้ำ สำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอร์ไพริฟอสที่สกัดได้ในน้ำ ในพืชที่สกัดโดยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง และศึกษาการเจริญเติบโต)

2) ชุดการทดลอง สารละลายธาตุอาหารพืชเติมคลอร์ไพริฟอส (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปลูกแหนเป็ด (น้ำหนักสด 5 กรัม) (อย่างละ 3 ซ้ำ สำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอร์ไพริฟอสที่สกัดได้ในน้ำ ในพืชที่สกัดโดยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง และศึกษาการเจริญเติบโต)

3) ชุดควบคุม สารละลายธาตุอาหารพืชมีการเติมคลอร์ไพริฟอส (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไม่มีการปลูกพืช

4) ชุดควบคุม สารละลายธาตุอาหารพืชไม่มีการเติมคลอร์ไพริฟอสปลูกจอก (น้ำหนักสด 5 กรัม) (อย่างละ 3 ซ้ำ สำหรับศึกษาการเจริญเติบโต)

5) ชุดควบคุม สารละลายธาตุอาหารพืชไม่มีการเติมคลอร์ไพริฟอสปลูกแหนเป็ด (น้ำหนักสด 5 กรัม) (อย่างละ 3 ซ้ำ สำหรับศึกษาการเจริญเติบโต)

ตารางที่ 3.1 ตำรับการปลูกพืชทดลอง สำหรับศึกษาการดูดดึงคลอร์ไพริฟอสของจอกและแหนเป็ด

วันที่	จอก (คลอร์ไพริฟอส 1 มก./ลิตร)		แหนเป็ด (คลอร์ไพริฟอส 1 มก./ลิตร)		ชุดควบคุม(ไม่มีพืช) (คลอร์ไพริฟอส 1 มก./ลิตร)
	สกัดโดยน้ำหนักสด	สกัดโดยน้ำหนักแห้ง	สกัดโดยน้ำหนักสด	สกัดโดยน้ำหนักแห้ง	
0	OOO	OOO	OOO	OOO	OOO
1	OOO	OOO	OOO	OOO	OOO
2	OOO	OOO	OOO	OOO	OOO
3	OOO	OOO	OOO	OOO	OOO
4	OOO	OOO	OOO	OOO	OOO
5	OOO	OOO	OOO	OOO	OOO
6	OOO	OOO	OOO	OOO	OOO
7	OOO	OOO	OOO	OOO	OOO

ตารางที่ 3.2 ตำรับการปลูกพืชทดลอง สำหรับศึกษาการเจริญเติบโตของจอกและแหนเป็ด

วันที่	ชุดควบคุม จอก		ชุดควบคุม แหนเป็ด	
	คลอร์ไพริฟอส 1 มก./ลิตร	ไม่คลอร์ไพริฟอส	คลอร์ไพริฟอส 1 มก./ลิตร	ไม่มีคลอร์ไพริฟอส
0				
1				
2				
3	ooo	ooo	ooo	ooo
4				
5				
6				
7				

3.3.6 ดำเนินการเพาะปลูกพืช

ทำการปลูกพืชในกระถางที่จัดเตรียมไว้ทั้ง 108 กระถาง โดยที่แต่ละกระถางจะทำการชั่งน้ำหนักพืชใส่ลงไป 5 กรัม ทำการขีดวัดระดับน้ำเพื่อรักษาระดับน้ำให้เท่าเดิมทุกวันโดยการเติมน้ำกลั่นเมื่อระดับน้ำลดต่ำลงกว่าขีด

3.3.7 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการเก็บเกี่ยว

1) ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของจอก และแหนเป็ดในวันที่เริ่มปลูกและทุกๆวันเป็นระยะเวลา 7 วันดังนี้ ชั่งน้ำหนักสด (โดยในตัวอย่างจะชั่งก่อนนำไปวิเคราะห์ และในชุดควบคุมจะเก็บขึ้นมาชั่งทุกวันแล้วใส่กลับไปตามเดิม) วัดความยาวราก นับจำนวนต้น (โดยการตีตารางสุ่มนับ 5 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย และหาจำนวนต้นที่เพิ่มขึ้นโดยการคำนวณด้วยสูตรการหาพื้นที่ ¶r^2)

2) เก็บตัวอย่างจอกและแหนเป็ดทุกๆ 1 วัน เป็นระยะเวลา 7 วัน

3) นำตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละชนิดพืชมาแยกเป็น 2 ส่วน ชั่งน้ำหนักสด ทั้ง 2 ชุด และแยกนำอีกชุดหนึ่งไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง

3.3.8 การวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสในพืชและน้ำ

นำตัวอย่างพืชที่ได้มาแบ่งเป็น 2 ส่วนคือส่วนแรกจะเก็บพืชสด นำไปสะเด็ดน้ำ ชั่งน้ำหนักสดของพืช ไปบดให้ละเอียดสกัดด้วยสารละลายผสม (เมธานอล, ไดคลอโรมีเทน และ โซเดียมคลอไรด์ (2%); 10:10:3 มิลลิลิตร) และนำสารละลายที่ได้ไปสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE) จากนั้นจึงนำสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอร์ไพริฟอสในพืชต่อน้ำหนักสดโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี (Gas Chromatography, GC Electron Capture Detector, ECD) ส่วนที่สองจะนำพืชมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาบดให้ละเอียด ก่อนทำการสกัดและวิเคราะห์คลอร์ไพริฟอสในพืชต่อน้ำหนักแห้ง

3.3.8.1 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างพืช

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืชนำใส่หลอดเหวี่ยง บดให้ละเอียด จากนั้นเติม เมธานอล 10 มิลลิลิตร ไดคลอโรมีเทน 10 มิลลิลิตร และ โซเดียมคลอไรด์ (2%) 3 มิลลิลิตร นำไป เขย่าด้วยเครื่องเขย่า และเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อตัวอย่างแยกชั้นแล้วนำชั้นอินทรีย์ใส่หลอดทดลอง และเติมไดคลอโรมีเทน 10 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างเดิม นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า และเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อีกครั้งหนึ่ง แยกชั้นอินทรีย์ที่ได้ใส่หลอดทดลองรวมกับครั้งแรก จากนั้นนำไปลดปริมาตรลงโดยการเป่าไนโตรเจนจนใกล้แห้ง แล้วนำไปเติมด้วยเฮกเซน 2 มิลลิลิตร ก่อนนำไปสกัดผ่านคอลัมน์ ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วย florisil 200 มิลลิกรัม โดยการกระตุ้นคอลัมน์ก่อนด้วยเฮกเซน 5 มิลลิลิตร พาสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ด้วยเอทิลอีเทอร์ (5%) ต่อเฮกเซนจำนวน 15 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยสารจนใกล้แห้งเติมเฮกเซนลงไป 2 มิลลิลิตร แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ได้ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วใสขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อเก็บตัวอย่างไปวัดปริมาณคลอร์ไพริฟอสด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี (Karen, *et al.*, 1998)

3.3.8.2 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างน้ำ

สำหรับการเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจะทำทุกวัน โดยจะวัดความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และการนำไฟฟ้าของน้ำ จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำและนำไปสกัดด้วยวิธีวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอร์ไพริฟอสในน้ำโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี

ตวงน้ำตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร เติมเมธานอล 1 มิลลิลิตร สกัดผ่านคอลัมน์ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วย hydrophilic polymer 200 มิลลิกรัม ก่อนสกัดตัวอย่างผ่านคอลัมน์ต้องทำการกระตุ้น คอลัมน์ ด้วยเอทิลอะซิเตท 1 คอลัมน์ และตามด้วยน้ำกลั่นอีก 1 คอลัมน์ เมื่อเทตัวอย่างผ่านคอลัมน์แล้วจากนั้นนำคอลัมน์ไปเป่าด้วยไนโตรเจน 10-15 นาที จนแห้ง ทำการพาสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ด้วยเอทิลอะซิเตท 2 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วใสขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปเป่าด้วยแก๊ส

ไนโตรเจนจนแห้ง และ ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัดปริมาณคลอร์ไพริฟอสด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี (Mauriz *et al.*, 2005)

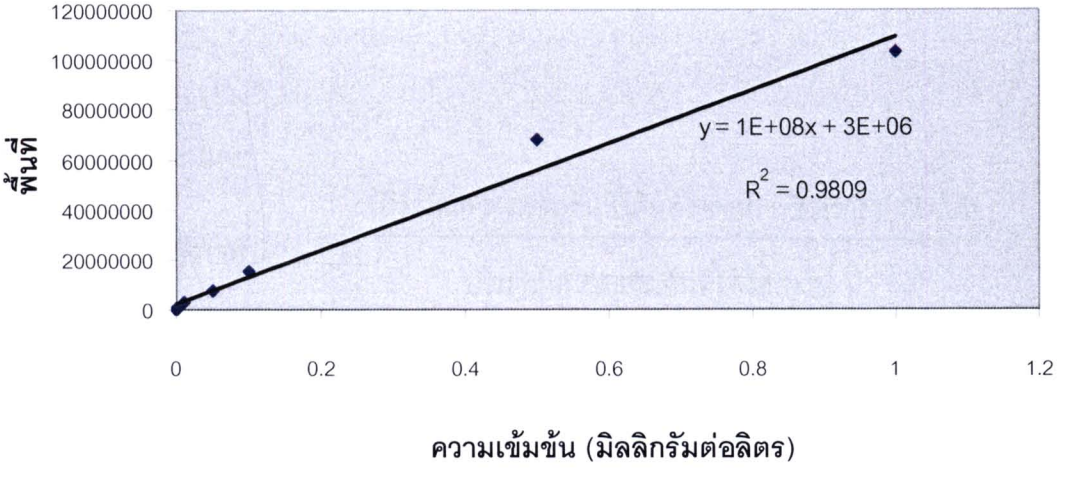
3.4 การเตรียม calibration curve ของคลอร์ไพริฟอส

1) นำคลอไพริฟอสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี

2) เขียนกราฟระหว่างปริมาณความเข้มข้นของสาร (ppm) กับ response (พื้นที่ใต้กราฟดังภาพที่ 3.1) (curve) ที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี

3) เขียนกราฟโดยใช้สมการ linear regression

4) ค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ควรจะมีค่ามากกว่า 0.90



ภาพที่ 3.1 calibration curve ของสารมาตรฐานคลอร์ไพริฟอส

3.5 การตรวจสอบและควบคุมคุณภาพ

เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าสารที่ต้องการตรวจไม่สูญหายเนื่องมาจากขั้นตอนวิธีการเก็บตัวอย่าง การสกัด และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ โดยการหาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ซึ่งรวมถึง การสกัด และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ โดยการหาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ซึ่งรวมถึงการสกัดและการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี ดังนี้

1) เติมคลอร์ไพริฟอสในปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมาสกัดและฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ซึ่งรวมถึงการสกัดและการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี (ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างถึงห้องปฏิบัติการไม่เกิน 2 วัน)

2) เติมคลอร์ไพริฟอสในปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในพืชสดหนัก 5 กรัม นำมาสกัดและฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี แล้วคำนวณหาเปอร์เซนต์ของประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ซึ่งรวมถึงการสกัดและการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี (ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างถึงห้องปฏิบัติการไม่เกิน 2 วัน)

$$\text{การคำนวณหาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณความเข้มข้นที่ได้หลังจากการวิเคราะห์ (วัดได้)}}{\text{ปริมาณความเข้มข้นที่ได้ใส่ลงไป}} \times 100$$

สำหรับการศึกษาครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพในการสกัดและวัดด้วยเครื่องด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟีของคลอร์ไพริฟอสที่สกัดในพืชและในน้ำ มีค่าร้อยละ 98 และ 97 ตามลำดับ

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี

การเลือกใช้เครื่องตรวจวัด (detector) ให้เหมาะสมกับชนิดหรือประเภทของตัวอย่างเป็นสิ่งสำคัญอีกสิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง เพื่อให้การตรวจวัดได้ผลดีที่สุดโดยทั่วไปเครื่องตรวจวัด ที่นิยมใช้มีอยู่ 3 ชนิดคือ FID, TCD และ ECD เครื่องตรวจวัด ทั้ง 3 ชนิด มีความไว (sensitivity) ที่ต่างกันไป ECD จะมี ความไวดีกว่า FID และ TCD ตามลำดับ เครื่องตรวจวัด Flame Ionization Detector (FID) ไวต่อสารอินทรีย์ที่ oxidized ได้ง่าย เช่น alcohol, hydrocarbon เป็นต้น โดยสรุป FID สามารถตรวจวัดสารตัวอย่างที่สามารถระเหยเป็นก๊าซผ่านคอลัมน์ได้แทบทุกชนิด โดยเหมาะสำหรับตรวจวัดสารที่มี C-H bons ในโมเลกุลหรือที่เรียกว่าเป็นสารอินทรีย์ (organic compounds) ที่สามารถเกิด ionization ได้ด้วยเปลวไฟ ยกเว้นสารบางชนิด เช่น carbonyls, carboxylic acid หรือพวก cyclohexanols ในขณะที่ประสิทธิภาพในการตรวจวัดสารตัวอย่างของ Election Capture Detector (ECD) ซึ่งเป็นเครื่องตรวจวัดเฉพาะที่ใช้วัด electrophilic compounds เหมาะสำหรับตรวจวัดสารประกอบที่ระเหยง่ายได้ที่มีธาตุกลุ่มฮาโรเจน ซัลเฟอร์ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ เช่น สารกำจัดแมลง จากการที่ ECD มีความไวต่อสารพวก alkyl halides carbonyls, nitrils, organometals halides ทำให้เครื่องตรวจวัดชนิดนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์พวกสารกำจัดแมลงได้ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้แก๊สโครมาโตรกราฟฟี (GC) ดีเทคเตอร์ชนิด Election Capture Detector (ECD) ในการวิเคราะห์ปริมาณคลอร์ไพริฟอสที่สกัดได้

ทำการทดลองหาสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารคลอร์ไพริฟอส โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี (GC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-2010 คอลัมน์ DB-5 ความยาว 30 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของตัวดูดซับ 0.25 ไมโครเมตร ดีเทคเตอร์ชนิด Election Capture Detector (ECD) ปรับการใช้งานที่อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส ใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็น mark up ที่อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อนาที และก๊าซฮีเลียมเป็น carrier gas อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งอุณหภูมิของ injector ที่ 250 องศาเซลเซียส ระบบฉีดอัตโนมัติ (auto sampler) ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด (injection volume) 1.00 ไมโครลิตร จำนวนตัวอย่างที่เข้าคอลัมน์ (injection mode) ใช้ split ratio 1:10

3.7 รวบรวมและประมวลผลของข้อมูลที่ได้จากงานวิจัย

3.7.1 วิเคราะห์ค่าคงที่อัตราการหายไปของคลอร์ไพริฟอสในสารละลาย โดยสมการ first-order kinetics curve คือ ปฏิกิริยาที่อัตราการเกิดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตั้งต้นยกกำลังหนึ่ง ในกรณีเฉพาะของปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง เมื่ออัตราเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [C] สำหรับปฏิกิริยาอันดับหนึ่งซึ่งเกิดขึ้นดังสมการ (สมการที่ 3.1)

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad \text{.....3.1}$$

$[C_0]$ กับ $[C_t]$ เป็นความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอส [C] และ C_0 คือ ค่าของ C_t ที่จุดเริ่มต้นการทดลองที่เวลา t เริ่มต้นเท่ากับ 0 กับเวลา t เท่ากับ t (ชั่วโมง) ตามลำดับ (t=0 ไม่จำเป็นต้องเป็นเวลาที่เริ่มต้นการทดลองเสมอไป อาจเป็นเวลาใดๆ ที่เริ่มติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ C ก็ได้) k คืออัตราคงที่ (ชั่วโมง$^{-1}$) ของคลอร์ไพริฟอสในสารละลาย

นำสมการ 3.1 มาจัดใหม่ได้ดังนี้

$$\ln[C_0] = -\ln[C] = kt$$

หรือ $$\ln[C] = -kt + \ln[C_0] \quad \text{.....3.2}$$

สมการ 3.2 ที่ได้ใหม่นี้อยู่ในรูปของสมการเส้นตรง y=mx+b เมื่อ m เป็นความชันของเส้นตรงที่ได้จากการเขียนกราฟระหว่าง y กับ x เปรียบเทียบสมการทั้งสองได้ดังนี้

$$\ln[C] = (-k)\ t + \ln[C_0]$$

$$\updownarrow = \updownarrow\ \updownarrow + \updownarrow$$

$$y = -m\ x + b$$

ดังนั้น เมื่อเขียนกราฟระหว่าง ln[C] กับ t จะได้เส้นตรงที่มีความชันเท่ากับ –k จึงคำนวณค่าคงที่อัตราการหายไปของคลอร์ไพริฟอสในสารละลายได้ด้วยวิธีนี้ ดังสมการต่อไปนี้

$$k = - \frac{\ln \frac{[C]}{[C_0]}}{t} \qquad \text{.....3.3}$$

ครึ่งชีวิต (half life,$t_{1/2}$) ของปฏิกิริยา หมายถึงเวลาที่ใช้ในการทำให้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นลดลงเหลือครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเริ่มต้นสำหรับปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง เราหาครึ่งชีวิตได้ดังนี้ จากสมการ 3.4

$$t = \frac{1}{k} \ln \frac{[C]_0}{[C]} \qquad \text{.....3.4}$$

ความหมายของครึ่งชีวิต คือ เมื่อ $t=t_{1/2}[C]=[C]_{0/2}$ ดังนั้นจึงได้

$$t_{1/2} = \frac{1}{k} \ln \frac{[C]_0}{[C]_{0/2}}$$

หรือ

$$t_{1/2} = \frac{1}{k} \ln 2 = \frac{0.693}{k} \qquad \text{.....3.5}$$

3.7.2 ทำการรวบรวมผลการทดลอง และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของพืชทั้งสองชนิดในชุดที่เติมและไม่เติมคลอร์ไพริฟอสด้วยสถิติ T-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของประสิทธิภาพสะสมคลอร์ไพริฟอสในพืชทั้งสองชนิด และค่าคงที่อัตราการหายไปของคลอร์ไพริฟอสในสารละลาย ตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) (SPSS for Windows) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test และturkey's HSD test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%