

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

- 1.1 สารมาตรฐานกรดเฟอร์ูลิก (Ferulic acid)
- 1.2 ตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง
 - 1.2.1 ข้าวกล้องงอก ดอกมะลิ 105 (Jasmine Germinated Brown Rice) บริษัทหริพเปลทุ มาร์เก็ตติ้ง จำกัด วันที่ผลิต 18-01-2010
 - 1.2.2 ข้าวกล้องงอก หอมมะลิแดง (Red Jasmine Germinated Brown Rice) บริษัทหริพเปลทุ มาร์เก็ตติ้ง จำกัด วันที่ผลิต 20-03-2010
 - 1.2.3 ข้าวกล้องงอก เส้าไห้ (Germinated Brown Rice) บริษัทเจียเม้งมาร์เก็ตติ้ง จำกัด วันที่ผลิต 16-10-2010
 - 1.2.4 ข้าวกล้องดอกมะลิ 105 (Jasmine Brown Rice) บริษัทนครหลวงค้าข้าว จำกัด
 - 1.2.5 ข้าวกล้องหอมมะลิแดง (Red Jasmine Brown Rice) บริษัทชัยทิพย์ จำกัด
 - 1.2.6 ข้าวกล้องเส้าไห้ (Brown Rice) ตามร้านจำหน่ายในตลาด
- 1.3 น้ำปราศจากไอออน
- 1.4 กรดแอซติก (Acetic acid, CH_3COOH) เกรด AR
- 1.5 อะซิโตนไทรล์ (Acetonitril, CH_3CN) เกรด HPLC
- 1.6 เฮกเซน (Hexane, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) เกรด AR
- 1.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) เข้มข้น 2 mol/L
- 1.8 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) เข้มข้น 6 mol/L
- 1.9 เมทานอล (Methanol, CH_3OH) เกรด AR
- 1.10 เอทิล แอซิเตท (Ethyl acetate)

3.1.2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC ของบริษัท Waters
2. บั้มของระบบลิควิดโครมาโทกราฟี (รุ่น Waters 515) ของบริษัท Waters
3. คอลัมน์ HiQSil C18 HS ขนาด 4.6 x 150 mm ของบริษัท KYA TECH Corporation
4. Guard column Nova-Pack C18 ของบริษัท Millipore
5. ชุดกรองแบบลดความดัน
6. เครื่องไล่ฟองอากาศ (ultrasonic bath)
7. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. เครื่องวัด pH
9. แท่งแม่เหล็ก
10. กรวยสกัด (Separatory funnel)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1.1 การเตรียมสต็อกสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติก 100 mg/L

ชั่งกรดเพอร์รูติก 0.01 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายในเมทานอลเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตรเก็บในภาชนะทึบแสงไว้ในตู้เย็น

3.2.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติก 10, 20, 30, 40 และ 50 mg/L

ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติก 100 mg/L มา 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตรเก็บในภาชนะทึบแสงไว้ในตู้เย็น

3.2.2 การสกัดกรดเพอร์รูติกจากตัวอย่างข้าวกล้องงอก

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของข้าวกล้องงอกประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในปิ๊กเกอร์ นำไปปั่นกวนด้วยสารละลายเฮกเซน ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นาน 2 ชั่วโมง กรองสารละลายออก นำข้าวมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 mol/L ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปั่นกวนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำส่วนที่ได้ปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 mol/L นำมาสกัดด้วยเอทิล แอซิเตท ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ซ้ำ 3 ครั้ง เก็บส่วนบนที่สกัดได้มาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน เมื่อตัวทำละลายที่ใช้สกัดระเหยหมดนำมาละลายด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Nylon ขนาด 0.45 μm ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ดัดแปลงจากวิธี Ohtsubo, Suzuki, Yasui & Kasumi, 2005)

3.2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติก ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์

เตรียมสารละลายอะซิโตนไทรล์และสารละลายกรดแอซิดิกเข้มข้น 2% ที่อัตราส่วน 10 : 90 และ 15 : 85 และ 20 : 80 ปริมาตรโดยปริมาตร เพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ แล้วนำสารละลายที่เตรียมได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นนำไปใส่ภาชนะที่ละลายอยู่ด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนที่อาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ จึงจะนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติกโดยใช้ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

3.2.3.1 ศึกษาหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

ทดสอบหาสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายอะซิโตนไทรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% ที่อัตราส่วน 10 : 90 และ 15 : 85 และ 20 : 80 ปริมาตรโดยปริมาตร ด้วยคอลัมน์ C-18 5.0 ไมโครเมตร 4.6×150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

3.2.3.2 ศึกษาหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

นำสารละลายอะซิโตนไทรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% ที่ได้จากการทดสอบขั้นต้นข้อ 3.2.3.1 มาทดสอบหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยทดสอบอัตราการไหลที่ 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร จากนั้นเลือกสภาวะที่ทำให้การแยกที่ดีที่สุดมาใช้ในการวิเคราะห์กรดเพอร์รูติก

3.2.4 ประเมินผลทดสอบทางความใช้ได้ของวิธี

3.2.4.1 การทำกราฟมาตรฐาน

ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริกที่มีความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้คือ ช่วง 10-50 mg/L ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเข้าสู่ระบบ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไทรล์ : สารละลายกรดแอสติกเข้มข้น 2% ทำการตรวจวัดที่สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.2.3 ซึ่งตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของกรดเฟอร์ริก ดูช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟ หาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) และขีดจำกัดการตรวจวัดของกรดเฟอร์ริกจากกราฟมาตรฐาน

3.2.4.2 การศึกษาความเที่ยง (Precision)

การนำสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริกที่มีความเข้มข้น 100 mg/L นำมาตรวจวัดซ้ำ 6 ครั้ง ในช่วงเวลาต่างกัน ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไทรล์ : สารละลายกรดแอสติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร แล้วคำนวณหา % Relative Standard Deviation (% RSD)

3.2.4.3 การศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาโดยการตรวจวัดปริมาณกรดเฟอร์ริกด้วยวิธี spiked sample เตรียมตัวอย่างสองชุด การทดลองโดยชุดการทดลองแรกเติมสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริกความเข้มข้น 100 mg/L ชุดการทดลองที่สองไม่ต้องเติมสารละลายมาตรฐาน ทำการสกัดตามข้อ 3.2.2 คำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) =
$$\frac{\text{ความเข้มข้นของ spiked sample} - \text{ความเข้มข้นของตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}}$$

3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง

ตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้องนำมาศึกษา 3 พันธุ์ คือ ข้าวดอกมะลิ 105 ข้าวหอมมะลิแดง และข้าวเสาไห้ ใช้วิธีการสกัด การเตรียมเป็นสารละลาย และการวิเคราะห์เช่นเดียวกันในทุกพันธุ์ตามข้อ 3.2.2

3.2.5.1 การวิเคราะห์โดยเทคนิค External standard

นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ที่สภาวะเหมาะสมจากการศึกษาข้อ 3.2.3 ใช้ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร วิเคราะห์ผลที่ได้และเทียบหาปริมาณกรดเฟอร์ริกของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่ได้จาก 3.2.4.1

3.2.5.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิค Standard addition

3.2.5.2.1 ปิเปตสารตัวอย่างจากข้อ 3.2.2 มา 4 จำนวนๆ ละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตรจำนวน 4 ขวดวัดปริมาตร

3.2.5.2.2 เติมสารละลายมาตรฐาน 100 mg/L ลงไป 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรใบที่ 2-4 ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของกรดเฟอร์ริกที่เติมลงในขวดใบที่ 2-4 เท่ากับ 2 4 และ 6 mg/L ตามลำดับ

3.2.5.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตามสภาวะที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.2.3 ฉีดวิเคราะห์ด้วยปริมาตร 10 ไมโครลิตรและตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดเฟอร์ริก

3.2.5.2.4 คำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง