บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การวางแผนการทดลอง

3.1.1 สำรวจตัวอย่างพืชที่ทดลองตามแหล่งที่มาของตลาดจากแหล่งปลูก (ตลาดไท ห้างสรรพสินค้า ตลาดนัด ตลาดหนองมน ตลาดเมืองชลบุรี)

3.1.1.1 สอบถามเกษตรกรเกี่ยวกับวิธีปลูก ดินบริเวณปลูก การใช้สารเคมี (ชนิด อัตราการใช้และเวลาการในใช้)

3.1.1.2 สอบถามแหล่งจำหน่ายเกี่ยวกับการได้มาของผักที่ทดลองแต่ละชนิดวัน และเวลา

3.1.1.3 สอบถามแหล่งขนส่ง จำนวนวัน เวลาการขนส่ง

3.1.2 เก็บตัวอย่างครั้งละ 1 ชนิด จำนวน 4 แหล่ง คือ

3.1.2.1 พืชอินทรีย์ (โดยมีฉลาก) โดยทำการเก็บตัวอย่างพืชจากสินค้าที่ห้างสรรพสินค้า จำนวน 3 ยี่ห้อ (ดอยคำโครงการหลวง ผักด็อกเตอร์ ดอยหลวง)

3.1.2.2 เก็บตัวอย่างพืชที่ห้างสรรพสินค้า จำนวน 3 ห้างสรรพสินค้า (โลตัส บิ๊กซี คาร์ฟูร์) สาขาชลบุรี

3.1.2.3 เก็บตัวอย่างที่ตลาดขายส่ง จำนวน 3 ร้าน (ตลาดไท)

3.1.2.4 เก็บตัวอย่างที่ตลาดขายปลีก จำนวน 3 ร้าน (ตลาดหนองมน ตลาดนัด ตลาดเมืองชลบุรี)

ปริมาณร้านละ 100 กรัม นำมาสกัด และวิเคราะห์ตามขั้นตอนดังจะกล่าวดังต่อไปนี้ และตัวอย่างชนิดอื่นก็ทำเช่นเดียวกัน

3.1.3 วิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มออร์แกนโนฟอสเฟต กลุ่มออร์แกนโนคลอรีน และไพรีทรอยด์สังเคราะห์ในตัวอย่างพืชกะหล่ำปลี ถั่วฝักยาว และแตงกวา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แผนการดำเนินการทดลอง

	เดือน/ปี2551			
	กุมภาพันธ์	มีนาคม	เมษายน	พฤษภาคม
สอบถามแหล่งที่มาของผัก	←→			
หาสภาวะเครื่อง		←→		
เก็บและทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง			←→	

3.2 สารมาตรฐาน สารเคมีและการเตรียม

3.2.1 สารมาตรฐาน ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer

3.2.1.1 สารมาตรฐานกลุ่ม organophosphate (dichlorvos methamidophos mevinphos acephate omethoate diazinon dicrotophos monocrotophos dimethoate pirimiphos-methyl Chlorpyrifos parathion-methyl pirimiphos-ethyl malathion fenitrothion parathion-ethyl prothiofos methidathion profenofos ethion triazophos EPN phosalone azinphos และ azinphos-ethyl)

3.2.1.2 สารมาตรฐานกลุ่ม organochlorine (alpha-BHC beta-BHC lindane heptachlor aldrin dicofol heptachlor-epoxide o,p'-DDE alpha-Endosulfan o,p'-DDD dieldrin o,p'-DDT endrin p,p'-DDD beta-endosulfan endosulfan-sulfate p,p'-DDT)

3.2.1.3 สารมาตรฐานกลุ่ม pyrethroid (bifenthrin lamda-cyhalothrin permethrin cfluthrin cypermethrin fenvalerate และ deltamethrin)

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 acetone ชนิด AR grade

3.2.2.2 dichloromethane ชนิด AR grade และ PR grade

3.2.2.3 ethyl acetateชนิด PR grade

3.2.2.4 hexane ชนิด PR grade

3.2.2.5 methanol ชนิด gradient grade

3.2.2.6 sodium sulfate ชนิด granular ขนาด 12-60 mesh

3.2.2.7 sodium chloride ชนิด AR grade

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2.2.8 silica gel ชนิด column chromatograph ขนาด 60-200 mesh หรือ SPE silica gel

3.2.2.9 RO water (Reverse Osmosis, Resistance value 18.2 มิลลิโอห์ม/เซนติเมตร

3.2.2.10 น้ำกลั่น

3.2.3 การเตรียมสารเคมี

3.2.3.1 sodium sulfate

3.2.3.1.1 ตัก sodium sulfate ตามปริมาณที่ต้องการใส่ลงในชามระเหย แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ ประมาณ 600 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 5 ชั่วโมง

3.2.3.1.2 เมื่อครบ 5 ชั่วโมง ให้ปิดเตาเผารออุณหภูมิลดลง ถ่าย sodium sulfate ที่เผาแล้วลงในบีกเกอร์ขนาดที่เหมาะสม ปิดด้วย aluminium foil และเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 130 องศาเซลเซียส

3.2.3.1.3 ก่อนใช้งานให้นำออกมาใส่ไว้ใน auto desiccators จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงเท่าอุณหภูมิห้องและส่วนที่เหลือจากการใช้งานต้องนำเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส

3.2.3.2 Silica gel

3.2.3.2.1 ตัก Silica gel ใส่ลงในชามระเหยแล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิประมาณ 450 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 4 ชั่วโมง

2.3.2.2.2 เมื่อครบ 4 ชั่วโมง ให้ปิดเตาเผารออุณหภูมิลดลง ถ่าย Silica gel ที่เผาแล้วลงในบีกเกอร์ขนาดที่เหมาะสม ปิดด้วย aluminium foil และเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 130 องศาเซลเซียส

<u>หมายเหตุ</u> Silica gel ที่เผาแล้วสามารถใช้งานได้นาน 3 เดือน

3.2.3.3 การ pack column ด้วย Silica gel

3.2.3.3.1 ใช้ syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร เป็น column โดยติดตั้ง column ที่ packed แล้วในแนวตั้งและต่อกับ stop cock เพื่อใช้สำหรับปรับระดับการไหล

3.2.3.3.2 pack column ด้วยสำลีเล็กน้อย

3.2.3.3.3 เติม hexane สูง 5 เซนติเมตร

3.2.3.3.4 เติม sodium sulfate สูง 1 เซนติเมตร

3.2.3.3.5 ชั่ง silica gel จาก 3.2.3.2.2 ปริมาณ 1 กรัม ใน weighing boat เติม hexane ให้ท่วม silica gel แล้วในลงใน column เคาะ column เบา ๆ เพื่อให้ผิว silica gel เรียบขนานกับพื้น

3.2.3.3.6 เติม sodium sulfate สูง 1 เซนติเมตร เปิด stop cock ให้ hexane ไหลออกจนเตะผิวบนของ sodium sulfate ปิด stop cock

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3 ตัวอย่าง

3.3.1 กะหล่ำปลี (White Cabbage)

3.3.2 ถั่วฝักยาว (Yard – long bean)

3.3.3 แตงกวา (Cucumber)

3.4 วัสดุ อุปกรณ์

3.4.1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) บริษัท Agilent Technologies รุ่น 6890N ซึ่งติดตั้ง Flame Photometric Detector (FPD)

3.4.2 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) บริษัท Agilent Technologies รุ่น 6890N ซึ่งติดตั้ง Electron Capture Detector (ECD)

3.4.3 homogenizer

3.4.4 rotary evaporator

3.4.5 nitrogen evaporator

3.4.6 ขวดเตรียมตัวอย่างขนาด 25 50 250 มิลลิลิตร ชนิดฝาเกลียว

3.4.7 tube แก้วมีฝา

3.4.8 cylinder ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.4.9 flat bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.4.10 auto pipetteขนาด 2-20 ไมโครลิตร 20-200 ไมโครลิตร 100-1000 ไมโครลิตร 500-5000 ไมโครลิตร

3.4.11 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixture)

3.4.12 vial สีชาขนาด 2 มิลลิลิตร

3.4.13 syringe filter 13 มิลลิเมตร 0.2 micron PTFE

3.4.14 column chromatograph ชนิด silica gel ขนาด 60-200 mesh หรือ SPE silica gel

3.4.15 glass wool ชนิด silan treated

3.4.16 สำลีที่ผ่านการล้างด้วย dichloromethane

3.4.17 เครื่อง sonicator

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.5 วิธีการทดลองทำตามห้องปฏิบัติการกลาง จังหวัดฉะเชิงเทรา

3.5.1 การสำรวจ

ได้มีการสอบถามเกษตรกรซึ่งนำสินค้ามาจำหน่ายที่ตลาดไทและตลาดสี่มุมเมือง กรุงเทพฯ ซึ่งเป็นตลาดค้าส่งขนาดใหญ่ที่นำสินค้าการเกษตรในกลุ่มตัวอย่าง (กะหล่ำปลี ถั่วฝักยาว และแตงกวา) เรื่องวิธีการปลูก การใช้ยากำจัดศัตรูพืช (ชนิด อัตราการใช้ และเวลาในการใช้) รวมถึงการขนส่งพืชและมีการสอบถามกลุ่มเกษตรกร

3.5.2 การเก็บตัวอย่าง

3.5.2.1 เก็บตัวอย่างกะหล่ำปลีในตลาดขายส่ง 3 ตัวอย่าง ตลาดขายปลีก (ตลาดหนองมน ตลาดจังหวัดชลบุรี และตลาดนัด) ห้างสรรพสินค้า (3 ห้างคือ โลตัส บิ๊กซี คาร์ฟูร์ สาขาชลบุรี) และพืชปลอดสารเคมี (3 ยี่ห้อคือ ดอยคำโครงการหลวง ผักด็อกเตอร์ ดอยหลวง)ในห้างสรรพสินค้า

3.5.2.2 เก็บตัวอย่างถั่วฝักยาวในตลาดขายส่ง 3 ตัวอย่าง ตลาดค้าปลีก (ตลาดหนองมน ตลาดจังหวัดชลบุรี ตลาดนัด) ห้างสรรพสินค้า (3 ห้างคือ โลตัส บิ๊กซี คาร์ฟูร์สาขาชลบุรี) และพืชปลอดสารเคมี (3 ยี่ห้อคือ ดอยคำโครงการหลวง ผักด็อกเตอร์ ดอยหลวง)ในห้างสรรพสินค้า

3.5.2.3 เก็บตัวอย่างแตงกวาในตลาดขายส่ง 3 ตัวอย่าง ตลาดขายปลีก (ตลาดหนองมน ตลาดจังหวัดชลบุรี ตลาดนัด) ห้างสรรพสินค้า (3 ห้างคือ โลตัส บิ๊กซี คาร์ฟูร์สาขาชลบุรี) และพืชปลอดสารเคมี (3 ยี่ห้อคือ ดอยคำโครงการหลวง ผักด็อกเตอร์ ดอยหลวง)ในห้างสรรพสินค้า

3.5.3 การสกัดตามวิธีของ Steinwandter

3.5.3.1 ชั่งตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง 25±2 กรัม ลงในขวดเตรียมตัวอย่างขนาด 250 มิลลิลิตร

3.5.3.2 เติม acetone AR 50 มิลลิลิตร dichloromethane AR 40 มิลลิลิตร และ sodium chloride 10 กรัม แล้วสกัดตัวอย่างโดยใช้ homogenizer ที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที

3.5.3.3 รินสารละลายใสใส่ลงในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เติม sodium sulfate ประมาณ 15 กรัม ปิดฝาตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และเขย่าเป็นครั้งคราว เพื่อให้ sodium sulfate ดูดน้ำในตัวอย่าง

3.5.3.4 กรองสารละลายผ่าน sodium sulfate ประมาณ 15 กรัม ซึ่งบรรจุอยู่ในกรวยแก้วที่มีสำลีรองก้นอยู่ใช้ cylinder ขนาด 50 มิลลิลิตร รองรับ ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.5.3.5 เทสารละลายที่ได้ลงใน round bottom flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และล้าง cylinder ด้วย acetone โดยการฉีดล้างรอบ cylinder ด้านใน ครั้งละ 5 มิลลิลิตร 2ครั้ง แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ตั้งอุณหภูมิ water bath 40±2 องศาเซลเซียส

3.5.3.6 สารละลายตกค้าง โดยใช้ auto pipette ดูด ethyl acetate PR 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

flat bottom flask ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixture) แบ่งสารละลายเป็น 2 ส่วนสำหรับวิเคราะห์ 3 กลุ่ม

3.5.4 วิธีการทดลอง

3.5.4.1 กลุ่ม Organophosphate

ใช้ auto pipette ดูดสารละลายจากข้อ 3.5.3.6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) ซึ่งติดตั้ง Flame Photometric Detector (FPD) (Katan et al., 2004)

3.5.4.2 กลุ่ม Organochlorine และ Pyrethroid

3.5.4.2.1 ใช้ auto pipette ดูดสารละลายจากข้อ 3.5.3.6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ tube แก้วมีฝา

3.5.4.2.2 นำไปทำให้แห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่ตั้งอุณหภูมิของ water bath ไว้ที่ 40±2 องศาเซลเซียส

3.5.4.2.3 ใช้ auto pipette ดูด hexane ใน dichloromethane (4:1) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ tube แก้วมีฝา ผสมให้เข้ากัน

3.4.4.2.4 นำสารละลายข้อ 3.5.4.2.3 ไป clean up ผ่าน silica gel pack column ที่รองรับด้วย tube แก้วมีฝาอันใหม่โดยปฏิบัติตามนี้

1) ใช้ Pasteur pipette ดูดสารละลายจากข้อ 3.5.4.2.3 ลงในคอลัมน์ ปรับอัตราการไหล 1-2 หยด/วินาที ล้าง tube แก้วมีฝาด้วย hexane ใน dichloromethane (4:1) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร รอจนสารละลายในคอลัมน์มีระดับถึงผิว sodium sulfate จึงใช้ Pasteur pipette ดูดสารละลายลงในคอลัมน์

2) ล้าง tube แก้วมีฝาด้วย hexane ใน dichloromethane (1:1) ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายในคอลัมน์มีระดับถึงผิว sodium sulfate จึงใช้ Pasteur pipette ดูดสารละลายลงในคอลัมน์ ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

3.5.4.2.5 นำสารละลายที่ผ่านการ clean upแล้ว ไปให้แห้งด้วย Nitrogen evaporator ที่ตั้งอุณหภูมิของ water bath ไว้ที่ 40±2 องศาเซลเซียส

3.5.4.2.6 ใช้ auto pipette ดูด hexane ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดจากข้อ 4.3.5 ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixture

3.5.4.2.7 นำสารละลายที่ได้ใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) ซึ่งติดตั้ง Electron Capture Detector (ECD) (Zawiyah et al., 2006)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.5.5 บันทึกผลการทดลอง

3.5.5.1 บันทึกชนิดและปริมาณสารกลุ่มออร์แกนโนฟอสเฟต ออร์แกนโนคลอรีน ไพรีทรอยด์สังเคราะห์ที่ได้จากเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.5.5.2 นำมาเปรียบเทียบปริมาณโดยวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติโดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) และ Least Significant Different Method โดยใช้โปรแกรม SPSS

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University