โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

Determination of ethanol content in alcohol-based hand sanitizers by gas chromatography

ชื่อนิสิต นางสาวทักษิณา มาลี **เลขประจำตัว** 6033031623

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

Determination of ethanol content in alcohol- based hand sanitizers by gas chromatography

โดย

นางสาวทักษิณา มาลี

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการ การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

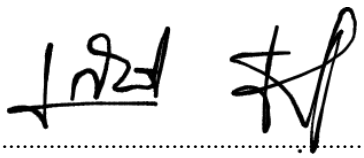
โดย นางสาวทักษิณา มาลี

ได้รับการอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลักษณา ดูบาส ประธานโครงการ
2. ศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา พุดหอม กรรมการ
3. รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวรักษ์ เฟื่องสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี



....

รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวรักษ์ เฟื่องสวัสดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวีร์ โฮเว่น)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 15 เดือน ธันวาคม พ.ศ.2563

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวทักษิณา มาลี เลขประจำตัว 6033031623
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวรักษ์ เฟื่องสวัสดิ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ที่มีการตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการแยกเมทานอล เอทานอล โพรพาน-2-ออล และอะซิโตไนไตรล์ คือ การใช้แคปิลารีคอลัมน์ชนิด DB -624UI ที่มีเฟสคงที่เป็น 6% cyanopropyl-phenyl และ 94% dimethyl polysiloxane ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์มเฟสคงที่ 1.8 ไมโครเมตร ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมร้อยละ 1 โดยปริมาตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยใช้ split ratio เท่ากับ 20:1 inlet temperature 250 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สพาเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 50 องศาเซลเซียส (คงที่นาน 5 นาที) จนถึง 230 องศาเซลเซียส (คงที่นาน 4 นาที) ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที และอุณหภูมิของตัวตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 280 องศาเซลเซียส พบว่าพีกของเมทานอล เอทานอล โพรพาน-2-ออล และอะซิโตรไนไตรล์ แยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ มีค่า resolution (R_s) ไม่น้อยกว่า 1.5 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าค่า correlation coefficient, r มากกว่า 0.99 และการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์มีทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยพบว่า ความแม่นและความเที่ยงตาม AOAC อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยร้อยละการกลับคืนมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 95-105 และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ≤ 3.7% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ เหมาะสมกับการสร้างคู่มือมาตรฐานการปฏิบัติงานเพื่อทดสอบชนิดและหาปริมาณของแอลกอฮอล์ที่พบทั่วไปในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยได้

คำสำคัญ: การตรวจสอบความใช้ไดของวิธีทดสอบ, ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย, เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

Project Title Determination of ethanol content in alcohol- based hand sanitizers by gas chromatography
Student Name Miss Taksina Malee Student ID 6033031623
Advisor Name Associate Professor Dr. Saowarux Fuangswasdi
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2020

Abstract

This research aims to determine the content of ethanol in alcohol- based hand sanitizers by gas chromatography with flame ionization detection. The optimal conditions that gave the best separation of methanol, ethanol, propan-2-ol and acetonitrile from a mixture of 1%v/v each were as follows: DB -624UI capillary column using 6% cyanopropyl-phenyl and 94% dimethyl polysiloxane as stationary phase with 30 m length x 0.32 mm ID × 1.8 µm film thickness, injection volume of 1 µL, split ratio of 20 : 1, inlet temperature 250 °C, column flow at 1.5 mL/min, oven temperature 50 °C (hold 5 min) to 230 °C (hold 4 min) with increasing rate at 25°C/min, and detector temperature of 280 °C. A complete separation of the compounds of interest was obtained with resolution (R_s) of at least 1.5. Method validations using external standard solution, matrix standard solution, and internal standard were satisfactory with correlation coefficient, $r > 0.99$. Application of the analysis method on real samples was successful with %recovery of 95-105% and relative standard deviation (%RSD) ≤ 3%, corresponding to accuracy and precision within the acceptable range according to AOAC. This proved that the developed method, leading to a standard operation procedure (SOP), could be used to identify the type and determine the amount of alcohols commonly found in alcohol-based hand sanitizers.

Keywords: validation method, alcohol-based hand sanitizers, gas chromatography

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความอนุเคราะห์ของคณาอาจารย์ และเจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์ของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร. ปวีณา เอกพรรณ เป็นอย่างสูงที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ที่เป็นประโยชน์ทั้งในด้านการเรียน การทำงาน และการทำงานวิจัย ตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี อีกทั้งให้คำปรึกษาและวิธีแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลอง

ขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวรักษ์ เฟื่องสวัสดิ์ เป็นอย่างสูงที่ได้ดูแลให้คำแนะนำต่างๆในการทำงานวิจัย รวมทั้งให้คำปรึกษาในการเขียนงาน และช่วยตรวจทาน ปรับปรุงงานวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ อิ่มยิ้ม ผู้อำนวยการศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำเกี่ยวกับเนื้อหาที่เกี่ยวข้องในงานวิจัยฉบับนี้

อีกทั้งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การดูแล ให้คำแนะนำต่างๆ ให้การช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ และสถานที่ ตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

ทักษิณา มาลี

ผู้วิจัย

สารบัญ

บทคัดย่อ ..... ง
Abstract ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญรูป ..... ฌ
สารบัญตาราง ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ 1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2
1.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 3
1.3.1 เทคนิค gas chromatography (GC) 3
1.3.2 ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่อง gas chromatograph 4
1.3.3 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Validation method) 7
1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย 8
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 8
บทที่ 2 การทดลอง 9
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 9
2.2 สารเคมี 9
2.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี 10
2.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 10
2.3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ 10
2.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) 12
2.4.1 ความจำเพาะ (selectivity) ของภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี 12
2.4.2 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) 12
2.4.3 การทดสอบความแม่น (accuracy) 14
2.4.4 การทดสอบความเที่ยง (precision) 15
2.5 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง 16
2.5.1 การหาปริมาณ ethanol และ propan-2-ol ในสารตัวอย่างจาก external calibration curve 16
2.5.2 การหาปริมาณ ethanol และ propan-2-ol ในสารตัวอย่างจากการคำนวน response factor 16
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 17
3.1 การหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี 17

3.1.1 ชนิดของคอลัมน์ 17
3.1.2 อุณหภูมิของ oven 19
3.1.3 อัตราการไหลของแก๊สพา (flow rate of carrier gas) 20
3.1.4 อัตราส่วนการ split 21
3.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) 22
3.2.1 ผลการศึกษา Selectivity ของภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี 22
3.2.2 ผลการศึกษา linearity และ working range 23
3.2.3 การศึกษาผลของเมทริกซ์ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) 24
3.2.4 การศึกษาความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ 25
3.2.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ ethanol และ propan-2-ol ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือที่สุ่มมาจากท้องตลาด จำนวน 7 ตัวอย่าง 26
3.2.6 ข้อเสนอแนะ 27
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 28
เอกสารอ้างอิง 30
ภาคผนวก 32
ประวัติผู้วิจัย 34

สารบัญรูป

รูปที่ 1.1 ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ 4
รูปที่ 1.2 ตำแหน่งอะตอมของคาร์บอน ที่มี sensitivity ต่อ flame ionization detector (FID) 6
รูปที่ 1.3 การเกิดปฏิกิริออกซิไดซ์ของคาร์บอนด้วยเปลวไฟไฮโดรเจน 6
รูปที่ 1.4 ส่วนประกอบที่สำคัญของ Flame Ionization Detector 6
รูปที่ 3.1 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-WAX (split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min, T: 50 – 230 °C) 18
รูปที่ 3.2 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min, T: 50 – 230 °C) 19
รูปที่ 3.3 กราฟมาตรฐาน external standard calibration curve ของ สารละลาย ethanol 24

รูปที่ A1 กราฟมาตรฐาน external standard calibration curve ของ สารละลาย propan-2-ol 32
รูปที่ A2 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min, T: 40 – 230 °C) 32
รูปที่ A3 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min, T: 60 – 230 °C) 32
รูปที่ A4 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 20:1, flow 3 mL/min, T: 50 – 230 °C) 33
รูปที่ A5 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 20:1, flow 5 mL/min, T: 50 – 230 °C) 33
รูปที่ A6 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 10:1, flow 1.5 mL/min, T: 50 – 230 °C) 33

สารบัญตาราง

ตาราง 2.1 อุณหภูมิของ oven ในการแยกสาร (Temperature programming)..... 11
ตาราง 2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solutions) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ..... 12
ตาราง 2.3 สารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard solutions)..... 13
ตาราง 2.4 การเตรียม matrix spiked sample ที่ 3 ระดับความเข้มข้น..... 15
ตาราง 3.1 ค่า resolution ของสารผสม (1% v/v) จากการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ชนิด DB-WAX และ DB -624UI (split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min, T: 50 – 230 °C ที่ 25 °C/min)..... 19
ตาราง 3.2 ค่า resolution ของสารผสม (1% v/v) จากการวิเคราะห์ด้วยอุณหภูมิเริ่มต้นต่างๆ (คอลัมน์ DB-624UI, split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min)..... 20
ตาราง 3.3 ค่า resolution ของสารผสม (1% v/v) จากการวิเคราะห์ด้วยอัตราการไหลของแก๊สพาต่างๆ (คอลัมน์ DB-624UI, split ratio 20:1, T: 50 – 230 °C ที่ 25 °C/min)..... 21
ตาราง 3.4 ค่า resolution ของสารผสม (1% v/v) จากการวิเคราะห์ด้วยอัตราส่วนการ split ต่างๆ การไหลของแก๊สพาต่างๆ (คอลัมน์ DB-624UI, flow 1.5 mL/min, T: 50 – 230 °C ที่ 25 °C/min)..... 21
ตาราง 3.5 ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี..... 22
ตาราง 3.6 ค่า Retention time, resolution และ tailing factor ของสารผสม (1% v/v) (คอลัมน์ DB-624UI, flow 1.5 mL/min, split ratio 20:1, T: 50 – 230 °C ที่ 25 °C/min)..... 23
ตาราง 3.7 สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานวิธีต่างๆ ของ ethanol และ propan-2-ol (0.1-1.0% v/v) แสดงค่า R2 ในวงเล็บ..... 24
ตาราง 3.8 ค่า t-value ของกราฟมาตรฐานของ external standard solution กับ matrix solution curve ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (n = 7)..... 25
ตาราง 3.9 %recovery และ %RSD ของ matrix spiked sample..... 26
ตาราง 3.10 ความเข้มข้น (% v/v) ของ ethanol และ propan-2-ol ที่คำนวณจากสมการเส้นตรงของ external standard calibration curve และ ค่า response factor ของ internal standard..... 27

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

นับตั้งแต่ปลายปีพ.ศ. 2562 (ค.ศ. 2019) มีการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) เกิดขึ้น ส่งผลให้ผู้ติดเชื้อมีไข้ ไอ หายใจเหนื่อยหอบ จนอาจถึงสูญเสียชีวิต และกลางเดือนมีนาคม 2563 องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ประกาศให้ COVID-19 เป็นภาวะการระบาดใหญ่ทั่วโลก (pandemic) การแพร่ระบาดของโรคเกิดผ่านการไอ จาม และสัมผัสสารคัดหลั่งจากผู้ติดเชื้อ และยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ ด้วยเหตุนี้ทุกภาคส่วนรวมถึงประชาชนทั่วไปจึงตระหนักถึงความสะอาดและสุขอนามัยส่วนบุคคลในชีวิตประจำวันมากขึ้น ด้วยการสวมหน้ากากอนามัย เว้นระยะห่างระหว่างกัน (physical distance) หมั่นล้างมือด้วยน้ำสบู่ หรือใช้ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบแบบไม่ใช้น้ำในรูปแบบต่างๆ เช่น สารละลาย (solution) สเปรย์ (spray) และเจล (gel) เป็นต้น ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างมากในประเทศไทย เนื่องจากสะดวกในการใช้งานในทุกสถานการณ์ เช่น ขณะเดินทางด้วยรถสาธารณะ แอลกอฮอล์เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial agent) ชนิดหนึ่ง ที่สามารถฆ่าและหยุดยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา รวมทั้งไวรัสบางชนิด จึงนิยมใช้ในการฆ่าเชื้อบนผิวหนังและพื้นผิวทั่วไป กลไกการออกฤทธิ์เริ่มจากแอลกอฮอล์แพร่เข้าสู่เซลล์ จะไปละลายไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ ทำให้โปรตีนตกตะกอน เยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนสภาพ และน้ำแพร่ออกจากเซลล์ เป็นผลต่อเนื่องไปรบกวนเมตาบอลิซึมและทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อของสารละลายแอลกอฮอล์ในน้ำควรมีค่าร้อยละ 70-80 โดยปริมาตร เนื่องจากมีอัตราการระเหยไม่รวดเร็วเกินไป ทำให้แพร่เข้าสู่เซลล์ได้เพียงพอ ในขณะที่แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 95 โดยปริมาตรจะระเหยอย่างรวดเร็วทำให้เซลล์ดูดซึมไม่เพียงพอ อีกทั้งแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 50 โดยปริมาตร ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจะลดลงมาก[1] ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54 ง พ.ศ. 2563 กำหนดให้ “ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย (Alcohol-based hand sanitizer)” มีวัตถุประสงค์เพื่อทำความสะอาดมือโดยไม่ใช้น้ำ เป็นเครื่องสำอาง ประกอบด้วยเอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล (ethyl alcohol หรือ ethanol) ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์หรือไอโซโพรพานอล (isopropyl alcohol หรือ isopropanol) หรือเอ็น-โพรพิวแอลกอฮอล์หรือเอ็น-โพรพานอล (n-propyl alcohol หรือ n-propanol) เพียงสารเดียวหรือผสมรวมกันอยู่ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 70 โดยปริมาตร (volume by volume) และอาจมีสารประกอบอื่น เช่น สารแต่งกลิ่น สารกันเสีย[2] ปกติผลิตภัณฑ์นี้นิยมใช้กันในบุคคลากรทางการแพทย์ แต่ด้วยภาวะการระบาดของโรค COVID-19 ทำให้ประชาชนทั่วไปนิยมใช้ ซึ่งมีการจำหน่ายในท้องตลาดอย่างแพร่หลาย ประชาชนสามารถเข้าถึงได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบที่วางขายในท้องตลาดนั้น มีทั้งที่ได้มาตรฐานและต่ำกว่ามาตรฐานทั้งแง่ชนิดและปริมาณของแอลกอฮอล์ที่เป็นส่วนประกอบ ในช่วงแรกของการระบาดพบว่าเอทานอลไม่เพียงพอต่อการผลิต บางกรณีมีการเจือปนเมทานอลซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ที่มีพิษลงไปในผลิตภัณฑ์แทนการใช้เอทานอล โดยเมทานอลถูกดูดซึมได้ทาง

ผิวหนัง หากสูดดมเข้าไปในปริมาณมาก จะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ หลอดลมอักเสบ และถึงแก่ชีวิตได้[3] ดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือให้ได้มาตรฐานจึงเป็นสิ่งสำคัญ เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์มีหลายเทคนิค ได้แก่ infrared spectroscopy โดยใช้เครื่อง fourier transform infrared spectrometer ในการหาพื้นที่พีกของ C-O stretch ที่ความยาวคลื่น 1045 cm^{-1} สำหรับเอทานอล และ 1131 cm^{-1} สำหรับโพรพาน-2-ออล แต่เนื่องจากผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยมักมีกลีเซอรอลผสมอยู่ ทำให้มีสัญญาณของ C-O stretch ไปรวมกับสัญญาณของแอลกอฮอล์ จึงส่งผลต่อการวิเคราะห์[4] นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคการวัดความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) โดยใช้ alcohol meter หรือ hydrometer ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกง่าย รวดเร็ว เหมาะกับการหาปริมาณเอทานอลในผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารละลายเอทานอลในน้ำ แต่ค่าที่วัดได้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิขณะทำการทดสอบ ดังนั้นผลการทดสอบอาจมีความคลาดเคลื่อนได้ง่าย[5] และอีกวิธีหนึ่งคือเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ (gas chromatograph, GC) ที่มีตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน (flame ionization detector, FID) หรือที่เรียกสั้นๆ ว่าเครื่อง GC-FID เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจวัดสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย มีช่วงความเส้นตรงของการตรวจวัด (linearity) กว้าง และเป็นวิธีที่ใช้บอกทั้งชนิดและปริมาณของแอลกอฮอล์ที่เป็นองค์ประกอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำสูง[6] ในงานวิจัยนี้อ้างอิงวิธีวิเคราะห์ที่ได้มาตรฐานจากวิธีมาตรฐานสากล USP 611 และ ASTM D3695-9 ซึ่งใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ สำหรับการหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างประเภทสารละลายน้ำเท่านั้น[7,8] ดังนั้นงานวิจัยในโครงการสหกิจศึกษาที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบด้วยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟี และนำวิธีวิเคราะห์มาปรับใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือที่มีในท้องตลาดเพื่อจัดทำมาตรฐานการวิเคราะห์ (standard operation procedure, SOP) ประจำห้องปฏิบัติการต่อไป

คำสำคัญ: validation method, alcohol-based hand sanitizers, gas chromatography

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

องค์การอนามัยโลกได้แนะนำวิธีการเตรียมผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ ประกอบด้วย เอทานอล 80% v/v หรือ โพรพาน-2-นอล 75% v/v ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.125% v/v ทำหน้าที่สำหรับการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย จุลินทรีย์ต่างๆ และ กลีเซอรอล 1.45% v/v เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น นอกจากนี้ประกาศกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ ต้องมีความเข้มข้นของเอทานอล หรือ โพรพาน-2-นอล มากกว่าหรือเท่ากับ 70% v/v เนื่องจากมีปริมาณน้ำเพียงพอ ทำให้แอลกอฮอล์ไม่ระเหยง่ายเกินไป ซึ่งจุลินทรีย์สามารถดูดซึม และออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ได้[2,5]

USP 611 และ ASTM D3695-9 ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสากลสำหรับการหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างประเภทสารละลายน้ำด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบเฟรมไอออไนเซชัน แนะนำว่าควรใช้คอลัมน์ที่มีเฟสคงที่มีขั้วปานกลางและมีขั้วสูงในการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ เช่น DB-624 และ Carbowax 20 M ตามลำดับ เพื่อประสิทธิภาพในการแยกแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารที่ค่อนข้างมีขั้วเช่นกัน อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ใช้ในการฉีดสารละลายตัวอย่างเจือจางได้โดยตรง และไม่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ซับซ้อน ทำให้สะดวกและประหยัดเวลาในการทดสอบตัวอย่าง[7,8]

จากงานวิจัยของ Jie บริษัท Agilent Teachnologies ได้ทำการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ล้างมือ (hand sanitizer) ด้วยเครื่อง GC-FID โดยใช้คอลัมน์ที่มีเฟสคงที่มีขั้วสูงเป็น 100% polyethylene glycol บรรจุในแคปิลารีคอลัมน์ชนิด DB-WAX และหาปริมาณด้วยวิธี internal calibration curve พบว่าสามารถแยกองค์ประกอบและหาปริมาณของแอลกอฮอล์ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือแบบเจลและสเปรย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในระยะเวลาที่รวดเร็ว[9]

Vanessa Abercrombie, Gustavo Serrano และ Phil Stremple ได้ทำการวิเคราะห์เอทานอล และโพรพาน-2-นอล ในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ โดยวิธี direct injection โดยใช้แคปิลารีคอลัมน์ชนิด DB-WAX column และ DB-624UI ตัวตรวจวัด คือ flame ionization detection (FID) จากการทดลองพบว่าสามารถแยกพีกของเอทานอล และโพรพาน-2-นอล ได้อย่างสมบูรณ์ และพีกมีความสมมาตร[10]

จากข้อมูลงานวิจัยดังกล่าว เห็นได้ว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้คอลัมน์ชนิด DB-WAX ที่มีขั้วสูง และ DB-624 ที่มีขั้วปานกลาง ในการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นสารมีขั้วเช่นกัน ด้วยการฉีดสารละลายตัวอย่างเจือจางได้โดยตรง ทำให้ประหยัดเวลาในการเตรียมตัวอย่าง และมีตัวตรวจวัดแบบ flame ionization detector โดยภาวะการทดลองที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชนิดของคอลัมน์, oven temperature, split ratio และ flow rate ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ ศึกษาหาภาวะที่เหมาะในการวิเคราะห์ และนำภาวะที่เหมาะสมมาทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ด้วยเครื่อง GC-FID

1.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

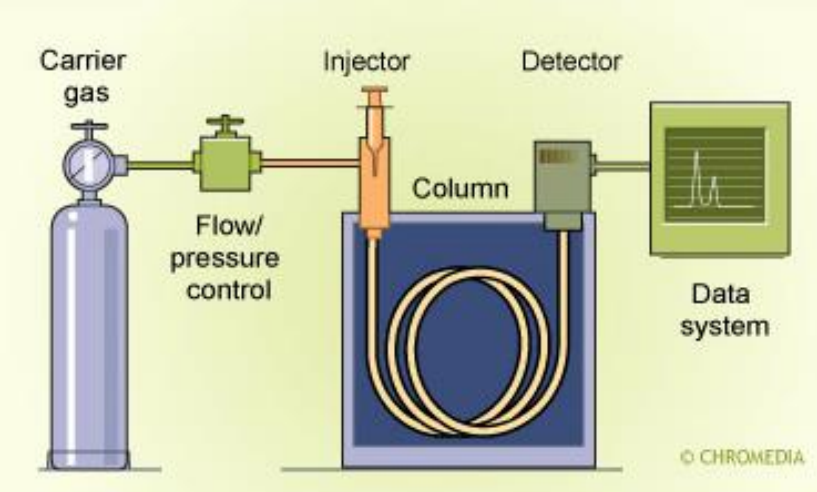
1.3.1 เทคนิค gas chromatography (GC)[6]

เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ เมื่อสารตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปเครื่อง GC ที่มีความร้อน สารตัวอย่างจะเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นแก๊สทั้งหมด จากนั้นโมเลกุลของแก๊สตัวอย่างจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ที่บรรจุด้วยสารที่จะทำหน้าที่แยกเรียกว่า เฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาเข้าคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ แก๊สพา (carrier gas) ที่มีคุณสมบัติเป็นแก๊สเฉื่อย โมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ฮีเลียม ไฮโดรเจน และไนโตรเจน มีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีไอน้ำและออกซิเจนเจือปน หลักในการแยกสาร คือ สารที่มีสมบัติโครงสร้างทางเคมี น้ำหนักโมเลกุล จุดเดือดที่ต่างกัน ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ในเฟสแตกต่างกันด้วย สารที่เกิดอันตรกิริยาแบบ partition ได้ดีกับเฟสคงที่ก็จะอยู่ในคอลัมน์ได้นาน

จะออกมาช้า ในขณะเดียวกันสารที่เกิดอันตรกิริยาแบบ partition ได้ไม่ดีจะออกจากคอลัมน์ก่อน จากนั้นจะถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัด (detector) และสัญญาณที่ได้จะได้รับการประมวลผลและแสดงผลในรูปของ chromatogram

1.3.2 ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่อง gas chromatograph[6,11–14]

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญในการวิเคราะห์ ได้แก่ carrier gas, injection system, column, detector และ data system ดังรูปที่ 1.1 และมีหลักการทำงานดังนี้



รูปที่ 1.1 ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

1.3.2.1 Carrier gases หรือแก๊สพา

แก๊สพาทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ พาตัวอย่างที่อยู่ในสถานะแก๊สเข้าสู่คอลัมน์ เพื่อไปตรวจวัดที่ตัวตรวจวัด แก๊สที่เป็นตัวพามีสมบัติเป็นแก๊สเฉื่อย ไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารตัวอย่าง เช่น ฮีเลียม ไฮโดรเจน และไนโตรเจน นอกจากนี้แก๊สพาที่ดีต้องมีความบริสุทธิ์มาก ไม่มีความชื้นและปราศจากแก๊สออกซิเจน เนื่องจากออกซิเจนสามารถทำให้เฟสคงที่ เกิดขบวนการออกซิเดชัน เกิดสัญญาณรบกวนที่ตัวตรวจวัดได้

1.3.2.2 Injection system

เป็นส่วนที่สารจะถูกฉีดเข้าไปใน injection port ที่มีตัวให้ความร้อน การเลือกใช้งาน inlet จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง คือ

- กรณีสารตัวอย่างเป็นแก๊ส สามารถฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องได้โดยตรงด้วย gas sampling valve
- กรณีสารตัวอย่างเป็นของเหลว จะฉีดสารตัวอย่างโดยใช้ micro syringe ผ่านแผ่นยาง
- กรณีสารตัวอย่างเป็นของแข็ง จะต้องนำมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนฉีด ถ้าเป็นของแข็งที่ไม่สามารถระเหยได้ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง จะต้องเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ (derivatization) ก่อน หากของแข็งละลายได้ยาก เช่น สารพวก polymer จะต้องสลาย (decompose) โดยวิธี pyrolysis ให้สารมีจุดเดือดต่ำ หรือใช้วิธีให้ความร้อนแบบเฮดสเปซ (headspace)

สำหรับการฉีดสารตัวอย่างเป็นของเหลวโดยตรงเข้าเครื่อง สามารถจำแนกชนิดของการฉีดสารตัวอย่างได้ 3 แบบ คือ

1. Split injection เป็นการฉีดสารตัวอย่าง เมื่อสารกลายเป็นไอจะมีการทิ้งสารบางส่วนออกทาง split vent และปริมาณไอส่วนน้อยเข้าสู่คอลัมน์ เหมาะสำหรับสารตัวอย่างที่มีสารที่สนใจในความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดพีก overload และแยกออกจากกันได้ไม่ดี เหมาะกับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เช่น การหาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย หรือสารสกัดจากธรรมชาติ เป็นต้น
2. Splitless injection เป็นการฉีดสารตัวอย่างทั้งหมด โดยไม่มีการ split สารทิ้ง เหมาะสำหรับวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นต่ำ (trace analysis) เหมาะในการทำปริมาณวิเคราะห์ เนื่องจากไม่มีการสูญเสียตัวอย่าง เช่น การหาปริมาณยาฆ่าแมลง สารกำจัดวัชพืช ในดินและน้ำเสีย การหาปริมาณยาเสพติดในเลือด เป็นต้น
3. On–column injection คือ การฉีดสารโดยทำให้สารกลายเป็นไอในส่วนต้นของคอลัมน์เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ประกอบด้วยองค์ประกอบหลากหลาย มีจุดเดือดในช่วงกว้าง เช่น น้ำมันปิโตรเลียม ข้อดีคือ มีความแม่นยำและความถูกต้องสูง ลดปัญหาการสูญเสียตัวอย่าง และลดปัญหาการรั่วของ septum แต่ข้อเสียคือ จะทำให้คอลัมน์มีประสิทธิภาพลดลงเนื่องจากสารตัวอย่างไปจับกับคอลัมน์

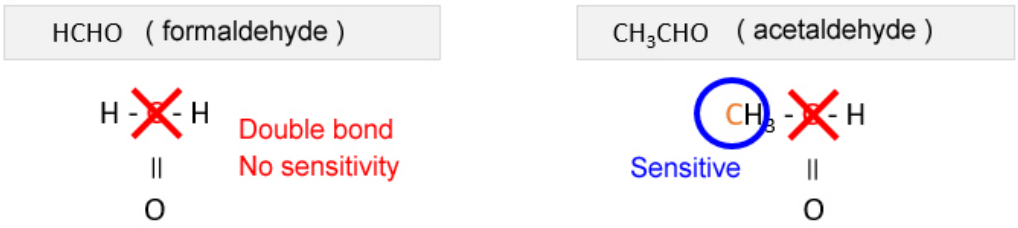
1.3.2.3 Column

เป็นส่วนที่ใช้ในการแยกสารตัวอย่าง จะบรรจุอยู่ใน Oven ที่ควบคุมอุณหภูมิ มี 2 ชนิด (packed column vs capillary column) ภายในคอลัมน์บรรจุสารไว้ 2 ชนิดคือ 1) solid support เพื่อให้ส่วนที่เฟสคงที่มาเกาะ และ 2) stationary phase เป็นส่วนที่สารจะมาเกิดอันตรกิริยา และเกิดการแยกสารในส่วนนี้ การเลือกเฟสคงที่ใช้หลักการ like dissolve like คือ การเลือกเฟสคงที่ที่มีความมีขั้ว (polarity) ใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง คอลัมน์ที่ใช้ใน GC นั้นมีอยู่ 2 ประเภท คือ 1) packed column เป็นคอลัมน์แบบท่อปิด ภายในคอลัมน์ประกอบด้วย อนุภาคของเฟสคงที่ที่อัดกันแนน เต็มพื้นที่หนตัดของคอลัมน์ และ 2) capillary column เป็นคอลัมน์แบบท่อเปิด เฟสคงที่จะถูกเคลือบที่ผิวของคอลัมน์

1.3.2.4 Detector หรือตัวตรวจวัด

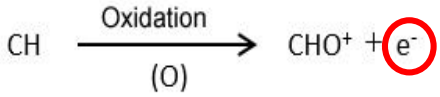
เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารอินทรีย์ที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับ แล้วส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังระบบประมวลผล ประเภทของตัวตรวจวัดของเครื่อง GC มีหลายประเภทขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการตรวจวัด เช่น TCD เหมาะกับวิเคราะห์สารทุกชนิดที่ให้การนำความร้อนแตกต่างจากแก๊สพา ECD มีความจำเพาะกับ Gas-phase eletrophores แต่ที่นี้จะขอกล่าวถึง FID โดยละเอียดดังนี้

Flame ionization detector (FID) เป็น detector สำหรับวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน (สารประกอบที่มี C-C, C-H bonds) ข้อดี คือ มีความไว (sensitivity) และความสามารถในการตรวจวัดที่ดี จึงนิยมใช้ในเทคนิค gas chromatography ข้อเสีย คือ ไม่ sensitive กับอะตอมของคาร์บอนที่เกิดพันธะคู่กับออกซิเจน เช่น หมู่คาร์บอนิล และ หมู่คาร์บอกซิล (CO, CO_2, HCHO, HCOOH, CS_2, CCl_4) ดังรูปที่ 1.2

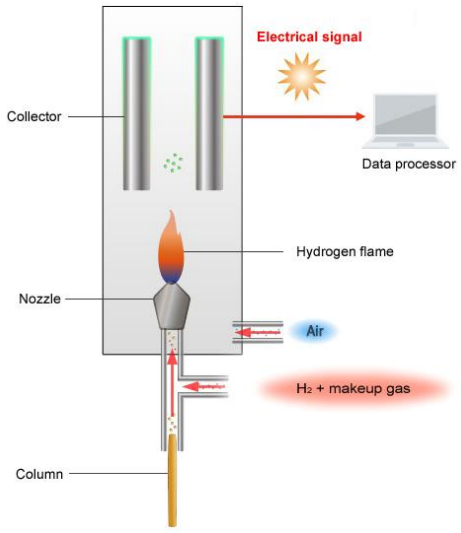


รูปที่ 1.2 ตำแหน่งอะตอมของคาร์บอน ที่มี sensitivity ต่อ flame ionization detector (FID)

คาร์บอนในสารตัวอย่างจะถูกแก๊สพาพาไปที่ตัวตรวจวัด ถูกออกซิไดซ์โดยเปลวไฟไฮโดรเจน เกิดปฏิกิริยาไอออไนเซชัน ได้เป็นไอออนของอิเล็กตรอน ปฏิกิริยาเกิดดังรูปที่ 1.3 จากนั้นอิเล็กตรอนถูกดึงดูดด้วยอิเล็กโทรดสะสมไปยังสนามไฟฟ้าสถิต เพื่อตรวจวัดและประมวลผลข้อมูลออกมา ดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.3 การเกิดปฏิกิริออกซิไดซ์ของคาร์บอนด้วยเปลวไฟไฮโดรเจน



รูปที่ 1.4 ส่วนประกอบที่สำคัญของ Flame Ionization Detector

1.3.2.5 Data system หรือระบบประมวลผล

ทำหน้าที่ประมวลผลและข้อมูลต่างๆ ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ แสดงสัญญาณเป็นพีกที่ปรากฏในรูปของโครมาโทแกรม (Chromatogram) ซึ่งเป็นกราฟระหว่าง แกน x คือ เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ ความเข้มของสัญญาณจากเครื่องตรวจวัด เวลาที่ยอดพีก หรือ เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ เรียกว่า retention time ใช้เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน และใช้ข้อมูลจากพื้นที่ใต้พีก (peak area) และ ความสูงของพีก (peak height) ในการหาปริมาณ

1.3.3 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Validation method)

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ การทดสอบวิธีวิเคราะห์ว่ามีความเหมาะสม สามารถนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างได้ถูกต้องและแม่นยำ ในการนำวิธีวิเคราะห์ใดๆมาใชวิเคราะหตัวอย่างจำเปนจะตองทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทุกครั้ง เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงห้องปฏิบัติการ เครื่องมือในการวิเคราะห์ และผู้ทดลอง โดยในที่นี้จะอ้างอิงวิธีการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตาม AOAC ในการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักในตัวอย่าง ได้แก่ ปัจจัยดังต่อไปนี้

1.3.3.1 ความจำเพาะ (Selectivity)

เป็นการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการวัดสิ่งที่ต้องการศึกษา และดูประสิทธิการแยกของพีกสารที่สนใจ โดยพิจารณาจากค่า retention time, resolution และ tailing factor โดยค่า retention time จะบอกระยะเวลาของสารแต่ละชนิดที่เคลื่อนที่ภายในคอลัมน์ ขึ้นอยู่กับจุดเดือดและความมีขั้วของสาร เมื่อสารแยกจากกัน พีกของสารจะแยกออกมากกันได้อย่างสมบูรณ์ในการหาปริมาณ พิจาณาจากค่า resolution (R_s) ควรมีค่ามากกว่า 1.5 ซึ่งคำนวณค่า R_s จากสมการดังนี้

$$R_s = 1.177 \times \left(\frac{t_{r,2} - t_{r,1}}{W_{h,2} + W_{h,1}} \right)$$

เมื่อ t_{R1} = retention time สารที่ 1 ของคู่พีก

t_{R2} = retention time สารที่ 2 ของคู่พีก

$W_{h,1}$ = width at half-height สารที่ 1 ของคู่พีก

$W_{h,2}$ = width at half-height สารที่ 2 ของคู่พีก

ประกอบกับการดูลักษณะของพีก ต้องมีความสมมาตรแบบ Gaussian ซึ่งพิจารณาจากค่า tailing factor (T) ต้องมีค่าใกล้เคียง 1 สามารถคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$T = \frac{W_{0.05}}{2t}$$

เมื่อ $W_{0.05}$ คือ ความกวางของพีกที่ตำแหน่งพีคสูง 5%

t คือ เวลาของสารจาก peak front ถึง peak maximum

1.3.3.2 กราฟมาตรฐาน และช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity and working range)

เป็นการศึกษาความเป็นเส้นตรงของสารกราฟมาตรฐาน เพื่อดูช่วงที่ครอบคลุมความเข้มข้นของสารในการทดลอง โดยพิจารณาจาก ค่า R^2 ของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง พื้นที่ใต้พีก (แกน y) และ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ค่า R^2 ควรมากกว่า 0.99 ในการทดลองจะทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานทั้งหมด 7 ความเข้มข้น ทำการฉีดสารละลายมาตรฐาน ในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เพื่อดูแนวโน้มความเป็นเส้นตรง

1.3.3.3 ความแม่น (Accuracy)

การศึกษาความแม่นหรือความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ จะพิจารณาจากค่าที่ได้จากการวัดว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงมากน้อยเพียงใด ในการทดลองจะทำการ spiked สารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงในสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 3 ระดับความเข้มข้น แล้วทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ จากนั้นพิจารณา %recovery ต้องอยู่ในช่วง 95-105% ตามมาตรฐาน AOAC[15–17] สามารถคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\%\text{recovery} = \frac{(C_S - C_U) \times 100}{C_A}$$

C_S = ความเข้มข้นของ spiked sample

C_U = ความเข้มข้นของสารตัวอย่างเริ่มต้น

C_A = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

1.3.3.4 ความเที่ยง (Precision)

การศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ จะพิจารณาความใกล้เคียงกันของการทดลองที่เกิดจากการวัดซ้ำหลายๆ ครั้ง จากนั้นพิจารณา %RSD ที่ยอมรับต้องน้อยกว่าน้อยกว่า 3.7% ตามมาตรฐาน AOAC[15–17] แบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ

- Repeatability หรือ intraday แสดงความแม่นของการวิเคราะห์ซ้ำ ที่ทำในสภาวะ เดียวกัน ในระยะเวลาที่ห่างกันไม่นาน
- Intermediate precision หรือ interday แสดงความแม่นของการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำ โดยมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เช่น เปลี่ยนเครื่องมือ นักวิเคราะห์ วัน
- Reproducibility แสดงความแม่นของการวิเคราะห์ที่ทำโดยห้องปฏิบัติการหลายห้อง

1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

1. วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี
2. พัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. หาปริมาณเอทานอลและระบุองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี
2. ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและเป็นมาตรฐาน
3. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยทำความสะอาดมือที่วางขายตามท้องตลาด

บทที่ 2
การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC) รุ่น GC-2010 ยี่ห้อ Shimadzu, Japan ประกอบด้วยระบบฉีดสารอัตโนมัติแบบ spilt/spiltless injector และ เครื่องตรวจวัดชนิด flame ionization detector (FID)
2) แคปิลารีคอลัมน์ (Capillary column) ชนิด DB-624UI ซึ่งเคลือบด้วยเฟสคงที่ผสม cyanopropyl-phenyl 6% และdimethyl polysiloxane 94% ขนาด 30 m x 0.32 mm I.D.× 1.8 µm ยี่ห้อ Agilent ® J&W Ultra Inert GC Column, USA
3) Filter membrane ชนิด PTFE ขนาดรูพรุน 0.22 µm
4) Syringe ขนาด 3 mL
5) ขวดบรรจุสารขนาดเล็ก (vial) ขนาด 2 mL
6) เทอร์โมมิเตอร์
7) ปิเปตชนิด Volumetric และ graduate ขนาด 5 mL
8) ขวดกำหนดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 50, 250 และ 1,000 mL
9) เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น CPA224 ยี่ห้อ Sartorius
10) เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ระบบ II.I 30 ยี่ห้อ Cascada บริษัท PALL

2.2 สารเคมี

สารเคมี (IUPAC)	grade	หมายเลข CAS	ยี่ห้อ	บริษัทที่ผลิต
1. แก๊ส helium บริสุทธิ์ 99.999%	UHP	7440-59-7	Linde	Linde, Bangkok, Thailand
2. แก๊ส hydrogen บริสุทธิ์ 99.999%	UHP	1333 - 74 - 0	Praxair	Praxair, Bangkok, Thailand
3. แก๊ส nitrogen บริสุทธิ์ 99.999% v/v	UHP	7727-37-9	Linde	Linde, Bangkok, Thailand
4. acetonitrile (ACN) 99.9% v/v	HPLC	75-05-8	ACL Labscan	RCI Labscan, Bangkok, Thailand
5. ethanol 99.9% v/v	AR	64-17-5	ACL Labscan	RCI Labscan, Bangkok, Thailand
6. hydrogen peroxide 30% v/v	ISO	67-56-1	Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Germany

สารเคมี (IUPAC)	grade	หมายเลข CAS	ยี่ห้อ	บริษัทที่ผลิต
7. methanol 99.9% v/v	AR	67-56-1	ACL Labscan	RCI Labscan, Bangkok, Thailand
8. propan-2-ol 99.8% v/v	HPLC	67-63-0	VWR	VWR International, Darmstadt, Germany
9. propane-1,2,3-triol 99.5% v/v	AR	67-63-0	KemAus	New South Wales, Australia

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

2.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.3.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock standard solutions)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock standard solutions) 10%v/v ของ acetonitrile, ethanol, methanol และ propan-2-ol ทำได้โดยปิเปตสารละลายบริสุทธิ์ 99.9% v/v (99.8% v/v กรณีของ propan-2-ol) ปริมาตร 5.0 mL ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

2.3.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม ความเข้มข้นละ 1% เพื่อใช้ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ทำได้โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น(stock standard solution) ในข้อ 2.3.1.1 ปริมาตร 5.0 mL ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

2.3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

การหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้สารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้นละ 1% v/v มีปัจจัยที่จะศึกษาดังนี้

2.3.2.1 ชนิดของคอลัมน์

ทำการวิเคราะห์สารละลายผสม โดยเลือกใช้ capillary column 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด DB-WAX ที่เคลือบด้วย stationary phase 100% polyethylene glycol และ ชนิด DB-624UI ที่เคลือบด้วย 6% cyanopropyl-phenyl และ 94% dimethyl polysiloxane ในสภาวะการวิเคราะห์ คือ ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม ปริมาตร 1 µL split ratio เท่ากับ 20:1 inlet temperature 250°C column flow เท่ากับ 1.5 mL/min oven temperature เท่ากับ 50°C (hold 5 min) จนถึง 230°C (hold 5 min) ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25°C/min และ detector temperature 280°C

2.3.2.2 Oven temperature

ทำการวิเคราะห์สารละลายผสม โดยกำหนด temperature programming ในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 2.2 ในภาวะที่ใช้ capillary column ชนิด DB-624UI ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม ปริมาตร 1 µL split ratio เท่ากับ 20:1 inlet temperature 250°C column flow เท่ากับ 1.5 mL/min และ detector temperature 280°C

ตาราง 2.1 อุณหภูมิของ oven ในการแยกสาร (Temperature programming)

ชุดที่	initial temperature (°C)	ramp rate (°C/min)	final temperature (°C)	เวลาทั้งหมด (min)
1	40 (hold 5 min)	25	230 (hold 2.3 min)	14.9
2	50 (hold 5 min)	25	230 (hold 2.3 min)	14.5
3	60 (hold 5 min)	25	230 (hold 2.3 min)	14.1

2.3.2.3 อัตราการไหลของ mobile phase

ทำการวิเคราะห์สารละลายผสม โดยกำหนด อัตราการไหลของ mobile phase ได้แก่ 1.5, 3 และ 5 mL/min ในภาวะที่ใช้ capillary column ชนิด DB-624UI ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม ปริมาตร 1 µL split ratio เท่ากับ 20:1 inlet temperature 250 °C oven temperature เท่ากับ 50 °C (hold 5 min) จนถึง 230 °C (hold 5 min) ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25 °C/min และ detector temperature 280 °C

2.3.2.4 Split ratio

ทำการวิเคราะห์สารละลายผสม โดยกำหนด split ratio ได้แก่ 10:1, 20:1 และ 50:1 ในภาวะที่ใช้ capillary column ชนิด DB-624UI ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม ปริมาตร 1 µL inlet temperature 250°C column flow 1.5 mL/min oven temperature เท่ากับ 50°C (hold 5 min) จนถึง 230°C (hold 2.3 min) ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25°C/min และ detector temperature 280°C

โดยภาวะที่เหมาะสมจะพิจารณาจากความสมบูรณ์ของการแยก (resolution, Rs) ของพีกสารแต่ละชนิดที่อยู่ในสารละลายมาตรฐานผสม โดยคำนวณจากคู่พีกของสารที่ต้องการพิจารณา ตามสมการที่ (1)

$$\text{resolution (Rs)} = 1.177 \times \left(\frac{t_{r,2}-t_{r,1}}{W_{h,2}+W_{h,1}}\right) \qquad \text{สมการที่ (1)}$$

t_{R1} = retention time สารที่ 1 ของคู่พีก

t_{R2} = retention time สารที่ 2 ของคู่พีก

$W_{h,1}$ = width at half-height สารที่ 1 ของคู่พีก

$W_{h,2}$ = width at half-height สารที่ 2 ของคู่พีก

2.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)[18–20]

2.4.1 ความจำเพาะ (Selectivity) ของภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

1) ทำการวิเคราะห์การแยกของสารละลายผสมความเข้มข้นละ 1%v/v ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี จากขั้นตอนก่อนหน้า ข้อ 2.3.2
2) ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณค่า resolution ตามสมการที่ (1) โดยค่า resolution ที่ยอมรับ คือ มากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 ตามเกณฑ์ของ AOAC

2.4.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

2.4.2.1 External standard calibration curve

1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solutions) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำได้โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock standard solution) ของ ethanol และ propan-2-ol ในข้อ 2.3.1.1 ปริมาตรต่างๆ ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ดังตารางที่ 2.2

ตาราง 2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solutions) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายมาตรฐาน	ความเข้มข้นของสารละลายผสม ethanol และ propan-2-ol (% v/v)	ปริมาตร stock solution (mL)	ปริมาตรรวม (mL)
1	0.1	0.5	50
2	0.2	1.5	50
3	0.3	2.0	50
4	0.5	2.5	50
5	0.7	3.5	50
6	0.8	4.0	50
7	1.0	5.0	50

2) ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน (standard solutions) แต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ดังตารางที่ 3.1 โดย
3) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นร้อยละโดยปริมาตร (แกน x) กับพื้นที่ใต้พีก (แกน y) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) โดยค่าที่ยอมรับต้องมากกว่า 0.99 ตามเกณฑ์ของ AOAC[15–17]

2.4.2.2 Internal standard calibration curve

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard solutions) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำได้โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock standard solution) ของ ethanol และ propan-2-ol ในข้อ 2.3.1.1 ปริมาตร 5.0 mL ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 mL โดยมี acetronitile เป็น internal standard โดยเติมลงในสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock standard solution) ปริมาตร 2.5 mL เท่ากันของแต่ละความเข้มข้น และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ดังตารางที่ 2.3

ตาราง 2.3 สารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard solutions)

สารละลายมาตรฐาน	ความเข้มข้นของ ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile (%v/v)			ปริมาตร stock solution (mL)			ปริมาตรรวม (mL)
	ethanol	propan-2-ol	ACN	ethanol	propan-2-ol	ACN	
1	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5	2.5	50
2	0.2	0.2	0.5	1.5	1.5	2.5	50
3	0.3	0.3	0.5	2.0	2.0	2.5	50
4	0.5	0.5	0.5	2.5	2.5	2.5	50
5	0.7	0.7	0.5	3.5	3.5	2.5	50
6	0.8	0.8	0.5	4.0	4.0	2.5	50
7	1.0	1.0	0.5	5.0	5.0	2.5	50

2) ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน (standard solutions) ที่เติมสารมาตรฐานภายใน (internal standard) แต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี โดยใช้ capillary column ชนิด DB-624UI ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม ปริมาตร 1 µL inlet temperature 250°C column flow 1.5 mL/min split ratio 20:1 oven temperature เท่ากับ 50°C (hold 5 min) จนถึง 230°C (hold 2.3 min) ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25°C/min และ detector temperature 280°C

3) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (standard solutions) ที่เติมสารมาตรฐานภายใน (internal standard) แต่ละความเข้มข้น (แกน x) กับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของ ethanol และ propan-2-ol กับ acetronitile (แกน y) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) โดยค่าที่ยอมรับต้องมากกว่า 0.99 ตามเกณฑ์ของ AOAC

2.4.2.3 matrix standard calibration curve

1) เตรียมสารละลายเมทริกซ์ (matrix solution) โดยชั่ง glycerol ความเข้มข้น 99.5% v/v จำนวน 18.3180 g ความหนาแน่น 1.26 g/cm^3 ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) จากนั้นเติม hydrogen peroxide ความเข้มข้น 30% v/v ปริมาตร 4.2 mL ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 1,000 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) จะได้ความเข้มข้นของ glycerol 1.45% v/v และ hydrogen peroxide 0.125% v/v อ้างอิงตามองค์กรอนามัยโลก WHO[5]
2) เตรียมสารละลายมาตรฐานของเมทริกซ์ (matrix standard solutions) แต่ละความเข้มข้น ทำได้โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock standard solution) ของ ethanol และ propan-2-ol ดังตารางที่ 2.2 แต่ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเมทริกซ์ (matrix solution) ที่เตรียมในข้อ 1)
3) ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของเมทริกซ์ (matrix standard solutions) แต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ดังตารางที่ 3.1
4) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับพื้นที่ใต้พีก (แกน y) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) โดยค่าที่ยอมรับต้องมากกว่า 0.99 ตามเกณฑ์ของ AOAC[15–17]
5) ศึกษาผลของเมทริกซ์โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของกราฟมาตรฐานของ external standard solution (ข้อ 2.4.2.1) เปรียบเทียบกับ matrix standard solution curve ด้วยวิธี two tailed paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.4.3 การทดสอบความแม่น (accuracy)

ความแม่นของของวิธีวิเคราะห์ คือ ความใกล้เคียงของค่าความเข้มข้นที่วัดได้กับค่าความเข้มข้นจริงในสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยที่สุ่มจากท้องตลาด ซึ่งวิเคราะห์จาก matrix spiked sample ที่เตรียมขึ้น 3 ระดับความเข้มข้น ดังนี้

1) เตรียมสารละลายเมทริกซ์ของสารตัวอย่าง โดยการปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 1 mL ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 250 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water)
2) เติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock standard solution) ความเข้มข้น 10% v/v ของ ethanol และ propan-2-ol 3 ระดับความเข้มข้น ในสารละลายเมทริกซ์ของตัวอย่าง (spiked sample) ดังตารางที่ 2.4

ตาราง 2.4 การเตรียม matrix spiked sample ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

สารละลายมาตรฐาน	ความเข้มข้นของ ethanol และ propan-2-ol (% v/v)	ปริมาตร stock solution (mL)		ปริมาตรรวม (mL)
		ethanol	propan-2-ol	
1	0.2	1.0	1.0	50
2	0.4	2.0	2.0	50
3	0.5	2.5	2.5	50

3) ทำการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่ spiked สารละลายมาตรฐาน ethanol และ propan-2-ol แต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี โดยใช้ capillary column ชนิด DB-624UI ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม ปริมาตร 1 µL inlet temperature 250°C column flow 1.5 mL/min split ratio 20:1 oven temperature เท่ากับ 50°C (hold 5 min) จนถึง 230°C (hold 2.3 min) ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25°C/min และ detector temperature 280°C

4) รายงานค่าความเที่ยงจากค่า recovery (%) คำนวณจากสมการที่ (2) โดยค่าที่ยอมรับตามเกณฑ์ของ AOAC ต้องอยู่ในช่วง 95-105%[15–17]

$$\%\text{recovery} = (C_f - C_u) \times 100/C_A \qquad \text{สมการที่ (2)}$$

C_f = ความเข้มข้นของ spiked sample

Cu = ความเข้มข้นของสารตัวอย่างเริ่มต้น

CA = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

2.4.4 การทดสอบความเที่ยง (precision)

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ คือ ความใกล้เคียงกันของค่าความเข้มข้นที่วัดได้จากการวัดหลายครั้ง โดยในที่นี้จะศึกษาความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำ หลายๆครั้ง ในสารตัวอย่างอย่างเดียวกัน สภาวะเดียวกัน แบ่งการศึกษาเป็นสองช่วงเวลา คือ ภายในวันเดียวกัน (intraday) และต่างวันกัน (interday) จากนั้นพิจารณาจากค่าเฉลี่ยความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ขั้นตอนการทดลองเป็นดังนี้

1) การวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intraday) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ใช้สารละลายในการทดสอบชุดเดียวกับการทดสอบ accuracy ดังตารางที่ 2.4
2) การวิเคราะห์ในระหว่างวัน (interday) โดยการเตรียมตัวอย่างใหม่ เช่นเดียวกับการทดสอบ accuracy เป็นเวลา 3 วัน และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ในทุกวัน
3) รายงานค่าความเที่ยงจากค่า %RSD โดยค่าที่ยอมรับต้องน้อยกว่า 3.7% ตามเกณฑ์ของ AOAC

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ทั้ง ethanol และ propan-2-ol จากผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยที่สุ่มมาจากท้องตลาด จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ 2 วิธี ได้แก่

2.5.1 การหาปริมาณ ethanol และ propan-2-ol ในสารตัวอย่างจาก external calibration curve

1) เตรียมสารละลายตัวอย่าง ทำได้โดยการปิเปตสารตัวอย่างมาปริมาตร 0.5 mL ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water)
2) คำนวณความเข้มข้นจากสมการเส้นตรงของ external calibration curve ในข้อ 2.4.2.1

2.5.2 การหาปริมาณ ethanol และ propan-2-ol ในสารตัวอย่างจากการคำนวน response factor

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของ ethanol และpropan-2-ol ความเข้มข้น 0.7% v/v โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution) ของ ethanol และ propan-2-ol อย่างละ 3.5 mL จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution) ของ acetronitile ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วย (deionized water)
2) ทำการวัดซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อคำนวณค่า response factor ของสารละลายมาตรฐาน (standard solution) กับ สารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard solution) ดังสมการที่ 3

$$\text{response factor} = \left(\frac{\text{พื้นที่ใต้พีกของ standard solution}}{\text{ความเข้มข้นของ standard solution}} \times \frac{\text{ความเข้มข้นของ internal solution}}{\text{พื้นที่ใต้พีกของ internal solution}}\right) \qquad \text{สมการที่ (3)}$$

3) คำนวณความเข้มข้นของปริมาณ ethanol และpropan-2-ol ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย โดยเทียบจากค่า response factor ในข้อ 2)

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

การวิเคราะห์หาปริมาณ ethanol ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ได้ทำการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

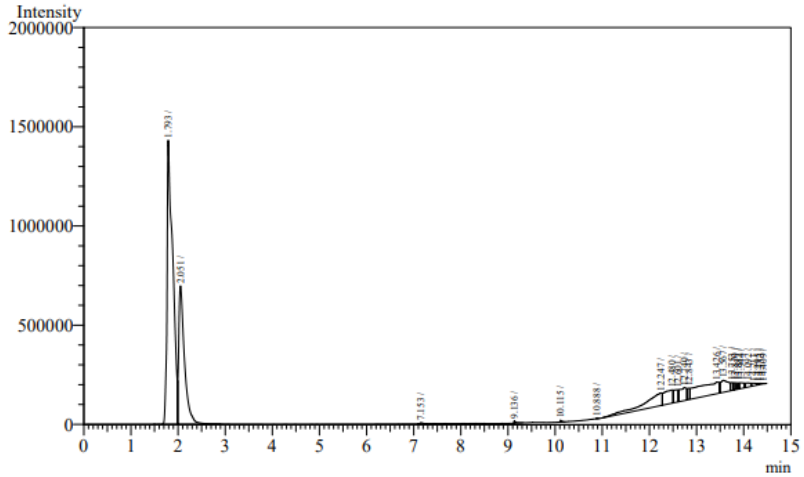
3.1 การหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี

ข้อกำหนดขององค์กรอนามัยโลก WHO[5] และ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข[2] กล่าวว่าผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย ต้องมีองค์ประกอบหลัก คือ ethanol หรือ propan-2-ol ปริมาณ 70-80% v/v เพื่อตรวจสอบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์ว่าตามที่มาตรฐานกำหนด และไม่มีการเจือปนของ methanol ซึ่งเป็นพิษ งานวิจัยนี้จึงศึกษาหาชนิดและปริมาณแอลกอฮอล์ที่เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ล้างมือด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี เบื้องต้นจำเป็นต้องหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกแอลกอฮอล์ในสารผสมก่อน โดยทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ซึ่งเป็น internal standard ความเข้มข้นสารชนิดละ 1% v/v ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสาร ได้แก่ ชนิดของคอลัมน์ อัตราส่วนการ split อัตราการไหลของแก๊สพา (flow rate) และ อุณหภูมิของ oven ซึ่งมีผลการทดลองในรายละเอียดดังแสดงต่อไป ทั้งนี้ เพื่อให้ชื่อรูปและตารางกระชับ จะแสดงรายละเอียดเฉพาะปัจจัยที่ศึกษาการเปรียบเทียบเท่านั้น

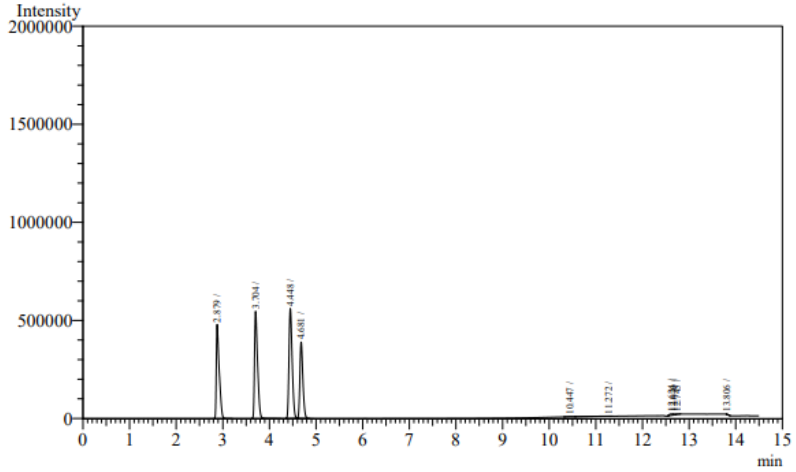
3.1.1 ชนิดของคอลัมน์

การเลือกชนิดของคอลัมน์ให้เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พิจารณาจากความมีขั้วของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analytes) ตามสมบัติการเหมือนกัน (like dissolves like) ของสารกับเฟสคงที่ที่บรรจุในคอลัมน์ กล่าวคือ หากสารที่ต้องการวิเคราะห์มีขั้ว ควรใช้คอลัมน์ที่บรรจุเฟสคงที่ที่มีขั้ว ในทำนองเดียวกันหากสารที่ต้องการวิเคราะห์ไม่มีขั้ว ควรใช้คอลัมน์ที่บรรจุเฟสคงที่ที่ไม่มีขั้ว งานวิจัยนี้ต้องการหาปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย ซึ่งแอลกอฮอล์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็นสารมีขั้ว ดังนั้นคอลัมน์ที่เลือกใช้ควรบรรจุเฟสคงที่ที่มีขั้ว ในที่นี้เลือกศึกษาประสิทธิภาพการแยกสาร โดยเลือกใช้ capillary column 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด DB-WAX ที่เคลือบด้วย เฟสคงที่ 100% polyethylene glycol จัดว่าเป็นคอลัมน์ที่มีขั้วสูง และ ชนิด DB-624UI ที่เคลือบด้วย 6% cyanopropyl-phenyl และ 94% dimethyl polysiloxane จัดเป็นคอลัมน์ที่มีขั้วปานกลาง โดยปัจจัยควบคุมอื่นๆ นอกจากชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ใช้ในการวิเคราะห์ คือ การฉีดสารละลายมาตรฐานผสมปริมาตร 1 µL ใช้ split ratio เท่ากับ 20:1 inlet temperature 250 °C อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม 1.5 mL/min และ oven temperature เท่ากับ 50 °C (hold 5 min) จนถึง 230 °C (hold 2.3 min) ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25 °C/min และdetector

temperature 280 °C โครมาโทแกรมที่ได้จากการแยกสารละลายมาตรฐานผสมจากคอลัมน์ชนิด DB-WAX และ DB-624UI แสดงดังรูปภาพที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ จากลำดับของสาร (หรือพีก) ที่แยกออกมา เห็นได้ว่าไม่สามารถใช้คอลัมน์ชนิด DB-WAX แยกสารออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ แต่คอลัมน์ชนิด DB-624UI แยกพีกของสารออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ สอดคล้องกับหลักการแยกของเทคนิค GC ซึ่งแยกสารที่มีจุดเดือดต่ำ กลายเป็นไอออกมาก่อนเป็นอันดับแรก คือ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetronitile ตามลำดับ โดยจุดเดือดของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetronitile คือ 64.6, 78.5, 82.4 และ 81.6 °C ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากจุดเดือดของ propan-2-ol และ acetronitile ใกล้เคียงกัน ทำให้ลำดับการแยกอยู่ใกล้กัน เมื่อพิจารณาความมีขั้วของสาร propan-2-ol มีค่าความมีขั้ว 0.546 ส่วน acetronitrile มีค่าความมีขั้ว 0.460 เห็นได้ว่า acetronitrile ซึ่งมีขั้วน้อยกว่า เกิดอันตรกิริยากับเฟสคงที่ในคอลัมน์ชนิด DB-624UI ที่มีขั้วปานกลางได้นานกว่า จึงแยกออกมาเป็นลำดับสุดท้าย เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการแยกของสารแต่ละชนิดจากค่า resolution (Rs) โดยค่า Rs ของสารแต่ละคู่ควรมีค่ามากกว่า 1.5 จึงสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ จากการทดลองค่า resolution (Rs) ของสารที่แสดงดังตารางที่ 3.1 พบว่าคอลัมน์ชนิด DB-624UI มีค่า Rs ในการแยกพีกสารมากกว่า 1.5 แสดงว่าคอลัมน์ชนิด DB-624UI มีประสิทธิภาพการแยกได้ดีกว่าทำให้การหาปริมาณของสารมีความ selectivity มากกว่า ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ capillary column ชนิด DB-624UI ขนาดความยาว 30 m x เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 mm × ความหนาของฟิล์ม 1.8 µm เพื่อใช้ในการหาปริมาณ ethanol ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี



รูปที่ 3.1 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-WAX (split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min, T: 50 – 230 °C)



รูปที่ 3.2 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min, T: 50 – 230 °C)

ตาราง 3.1 ค่า resolution ของสารผสม (1% v/v) จากการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ชนิด DB-WAX และ DB -624UI (split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min, T: 50 – 230 °C ที่ 25 °C/min)

สาร	คอลัมน์	
	DB-WAX	DB-624UI
Methanol	0.000	0.000
Ethanol	0.000	7.176
propan-2-ol	1.162	6.106
acetonitrile	0.000	1.935

3.1.2 อุณหภูมิของ oven

ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย ที่สุ่มจากท้องตลาดมีองค์ประกอบหลากหลาย จุดเดือดของสารมีช่วงกว้าง การใช้ temperature program จึงช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ และลดการปนเปื้อนขององค์ประกอบที่ระเหยยาก (carry over) ในสารตัวอย่างที่ฉีดในครั้งต่อไป ในการทดลองนี้เลือก temperature program ในการวิเคราะห์ ซึ่งมีการเปลี่ยนค่าอุณหภูมิเริ่มต้นดังนี้

1.1 อุณหภูมิเริ่มต้น 40 °C (hold 5 min) จนถึง 230 °C (hold 2.3 min) ด้วยอัตราการการเพิ่มอุณหภูมิ 25 °C/min

1.2 อุณหภูมิเริ่มต้น 50 °C (hold 5 min) จนถึง 230 °C (hold 2.3 min) ด้วยอัตราการการเพิ่มอุณหภูมิ 25 °C/min

1.3 อุณหภูมิเริ่มต้น 60 °C (hold 5 min) จนถึง 230 °C (hold 2.3 min) ด้วยอัตราการการเพิ่มอุณหภูมิ 25 °C/min

ปัจจัยควบคุมอื่นๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือการใช้คอลัมน์ชนิด DB-624UI จากผลการทดลองในขั้นตอนก่อนหน้านี้ ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมชนิดละ 1% v/v ปริมาตร 1 µL ใช้ split ratio เท่ากับ 20:1 inlet temperature 250 °C column flow 1.5 mL/min และ detector temperature 280 °C เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการแยกของสารแต่ละพีกจากค่า resolution (Rs) ซึ่งแสดงในตารางที่ 3.2 เห็นได้ว่าค่า Rs ในการแยกพีกของ ethanol และ propan-2-ol มากกว่า 1.5 แต่ในการแยกพีกของ propan-2-ol และ acetonitile เมื่ออุณหภูมิเริ่มต้น 50 °C มีค่า resolution สูงสุด (1.935) แยกพีกของ propan-2-ol และ acetonitrile ได้ดีที่สุด เนื่องจากสารเกิดอันตรกิริยากับเฟสคงที่ได้ในระยะเวลาที่พอดี แยกสารได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 °C มีค่า resolution น้อยกว่า (1.601) เนื่องจากสารใช้เวลาในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์นาน สารมีแรงกระทำกับเฟสคงที่มาก พีกของสารจึงแยกออกมาช้า ในขณะที่อุณหภูมิเริ่มต้น 60 °C มีค่า resolution น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 50 °C เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น สารแยกออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น ประสิทธิภาพจึงลดลง ดังนั้นอุณหภูมิของ oven ที่เหมาะสมคือ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 50 °C (hold 5 min) จนถึง 230 °C (hold 4 min)

ตาราง 3.2 ค่า resolution ของสารผสม (1% v/v) จากการวิเคราะห์ด้วยอุณหภูมิเริ่มต้นต่างๆ (คอลัมน์ DB-624UI, split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min)

สาร	อุณหภูมิเริ่มต้น		
	40 °C	50 °C	60 °C
methanol	0.000	0.000	0.000
ethanol	8.644	7.176	5.206
propan-2-ol	8.074	6.106	4.457
acetonitrile	1.606	1.935	1.850

3.1.3 อัตราการไหลของแก๊สพา (flow rate of carrier gas)

งานวิจัยนี้เลือกใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพา เนื่องจากเป็นแก๊สที่มีช่วงอัตราการไหลสูงทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสารได้ดี ในระยะเวลาสั้น และปลอดภัย นอกจากนี้กราฟ Van Deemter Plot ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง velocity กับ height equivalent to a theoretical plate (HETP) แสดงช่วง optimum velocity ของแก๊สฮีเลียมในช่วง 22 - 35 cm/s หรือ 0.8-2 mL/min ในการทดลองนี้จึงศึกษาอัตราการไหลของก๊าซฮีเลียมที่มีผลต่อการแยกที่อัตราการไหลต่างๆ ได้แก่ 1.5, 3.0 และ 5.0 mL/min โดยปัจจัยควบคุมอื่นๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ คอลัมน์ DB-624UI ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมชนิดละ 1% v/v ปริมาตร 1 µL ใช้ split ratio เท่ากับ 20:1 inlet temperature 250 °C oven temperature 50 °C (hold 2.3 min) จนถึง 230 °C (hold 2.3 min) อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25°C/min และ detector temperature 280°C จากนั้นพิจารณาประสิทธิภาพการแยกของสารแต่ละพีกจากค่า resolution (Rs) ซึ่งแสดงในตารางที่ 3.3 พบว่าอัตราการไหลของแก๊สพาทุกอัตรามีค่า resolution (Rs) ของพีก ethanol และ propan-2-ol มากกว่า 1.5 แต่พีก propan-2-ol และ acetonitrile แยกออกจากกันได้ดีที่สุดเมื่อใช้อัตราการไหลของแก๊สพา 1.5 mL/min โดยมีค่า R สูงสุดเท่ากับ 1.935 ซึ่งสามารถแยกพีกของสาร

มาตรฐานผสมได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่อัตราการไหลที่สูงเกินไปไม่สามารถแยกสารที่มีจุดเดือดใกล้กันอย่าง propan-2-ol และ acetonitrile ได้ดีพอ เพราะสารออกจากคอลัมน์เร็วเกิดไป การเกิด interaction กับเฟสคงที่ได้ไม่ดี

ตาราง 3.3 ค่า resolution ของสารผสม (1% v/v) จากการวิเคราะห์ด้วยอัตราการไหลของแก๊สพาต่างๆ (คอลัมน์ DB-624UI, split ratio 20:1, T: 50 – 230 °C ที่ 25 °C/min)

สาร	อัตราการไหลของแก๊สพา		
	1.5 mL/min	3.0 mL/min	5.0 mL/min
methanol	0.000	0.000	0.000
ethanol	7.176	5.242	3.879
propan-2-ol	6.106	4.497	3.368
acetonitrile	1.935	1.459	1.073

3.1.4 อัตราส่วนการ split

เนื่องจากความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือมีค่าสูง งานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์สารโดยฉีดสารด้วยระบบ split โดยศึกษาการใช้ split ratio 3 ค่า คือ 10:1, 20:1 และ 50:1 และควบคุมปัจจัยอื่นๆ คือ ใช้คอลัมน์ชนิด DB-624UI การฉีดสารละลายมาตรฐานผสม 1% v/v ปริมาตร 1 µL inlet temperature 250 °C อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม 1.5 mL/min และ oven temperature เท่ากับ 50 °C (hold 5 min) จนถึง 230 °C (hold 2.3 min) ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25 °C/min และใช้ detector temperature 280°C เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการแยกของสารแต่ละพีกจากค่า resolution (Rs) ซึ่งแสดงในตารางที่ 3.4 พบว่า split ratio เท่ากับ 10:1, 20:1 และ 50:1 มีค่า resolution ของแต่ละคู่พีกมากกว่า 1.5 แต่ split ratio เท่ากับ 20:1 มีค่า resolution ที่ดีกว่าอัตราส่วน 10:1 เนื่องจากที่อัตราส่วนต่ำ ทำให้มีปริมาณสารเข้าคอลัมน์มากเกินไป แยกไม่สมบูรณ์ พีกที่ได้มีความกว้าง ส่วนการ split ที่อัตราส่วน 50:1 ทำให้สารที่เข้าคอลัมน์มีปริมาณน้อยเกินไป ต่ำกว่าประสิทธิภาพที่เครื่องจะตรวจวัดได้ ทำให้การวัดในแต่ละครั้งค่าไม่คงที่ ความเที่ยงของการวัดลดลง ดังนั้น อัตราส่วนการ split ที่เหมาะสม คือ 20:1

ตาราง 3.4 ค่า resolution ของสารผสม (1% v/v) จากการวิเคราะห์ด้วยอัตราส่วนการ split ต่างๆ การไหลของแก๊สพาต่างๆ (คอลัมน์ DB-624UI, flow 1.5 mL/min, T: 50 – 230 °C ที่ 25 °C/min)

สาร	อัตราส่วนการ split		
	10:1	20:1	50:1
methanol	0.000	0.000	0.000
ethanol	6.459	7.176	7.393
propan-2-ol	4.466	6.106	6.383
acetonitrile	1.574	1.935	2.087

ผลการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมทั้งหมดในการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3.5

ตาราง 3.5 ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี

GC parameter	GC condition
analytical column	capillary column ชนิด DB-624UI (6% cyanopropyl-phenyl & 94% dimethyl polysiloxane) (30 m × 0.25 mm ID × 1.4 µm film) ยี่ห้อ Agilent® J&W Ultra Inert GC Column, USA
carrier gas	Helium, velocity 30 cm/s, flow rate 1.5 mL/min
oven temperature	temperature program: 50 °C (5min) – 230 (4 min) rate 25 °C/min total analysis time 16.5 min
Injector temperature	250 °C
split injector	split ratio 20:1
detector	flame ionization detector (FID)
detector temperature	280 °C
- hydrogen	40.0 mL/min
- air	40.0 mL/min
- make up nitrogen	30.0 mL/min

3.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)[18–20]

เนื่องด้วยยังไม่มีวิธีมาตรฐานสากลในการวิเคราะห์หาปริมาณ ethanol และ propan-2-ol ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟฟี มีเฉพาะรายงานวิธีวิเคราะห์ใน ASTM[21] และ USP 611[22] ที่วิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในของเหลวด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ในการทำสหกิจศึกษานี้จึงต้องการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ และทดสอบความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อจัดทำมาตรฐานการวิเคราะห์ (standard operation procedure, SOP) ประจำห้องปฏิบัติการต่อไป โดยปัจจัยที่ใช้ในทำ method validation มีรายละเอียดดังนี้

3.2.1 ผลการศึกษา Selectivity ของภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

การศึกษา selectivity จะพิจารณาจากค่า retention time , resolution (Rs) และ tailing factor ของสาร โดยค่า retention time คือ เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ ซึ่งขึ้นอยู่กับจุดเดือดของสาร โดยสารที่มีจุดเดือดต่ำจะใช้เวลาเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็วกว่า ทำให้ค่า retention time น้อย ส่วนค่า resolution (Rs) คือ ค่าที่บอกประสิทธิภาพในการแยกสารออกจากกัน ซึ่งควรมากกว่า 1.5 และ ค่า tailing factor บอกความสมมาตรของพีก ซึ่ง

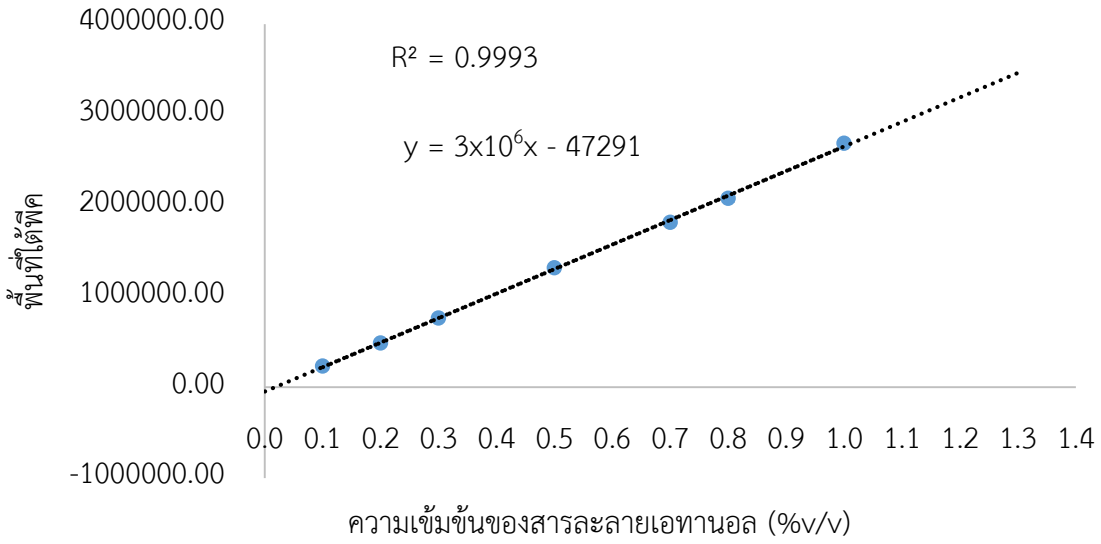
ควรมีค่าน้อยกว่า 2 ซึ่งจากการหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารละลายผสมชนิดละ 1% v/v ในขั้นตอนก่อนหน้านี้ กล่าวคือใช้แคปิลารีคอลัมน์ชนิด DB -624UI ฉีดสารละลายมาตรฐานผสม 1 µL ด้วย split ratio 20:1 ใช้ inlet temperature 250°C อัตราการไหล 1.5 mL/min และ detector temperature 280 °C ได้โครมาโตแกรมตามตารางที่ 3.6 (เนื่องจากขณะศึกษาชนิดของคอลัมน์ พบว่าปัจจัยควบคุมอื่นๆ เป็นค่าที่ดีที่สุดแล้ว) ซึ่งแสดงลำดับการแยกสารที่ออกจากคอลัมน์เป็น methanol, ethanol, propa-2-nol และ acetonitrile ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์สามารถแสดงค่า retention time , resolution (Rs) และ tailing factor ดังแสดงในตารางที่ 3.6 ซึ่งมีค่า resolution มากกว่า 1.5 ทุกพีก แสดงว่าสารผสมสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ และค่า tailing factor ที่คำนวณได้มีค่าใกล้เคียง 1 ทุกพีก แสดงว่าพีกมีความสมมาตรอย่างสมบูรณ์ กล่าวได้ว่าภาวะการวิเคราะห์ที่หาได้นั้น ให้ค่า selectivity ที่เหมาะสม

ตาราง 3.6 ค่า Retention time, resolution และ tailing factor ของสารผสม (1% v/v) (คอลัมน์ DB-624UI, flow 1.5 mL/min, split ratio 20:1, T: 50 – 230 °C ที่ 25 °C/min)

peak	ชนิดสาร	retention time (min)	resolution	tailing factor
1	methanol	2.879	0.000	1.862
2	ethanol	3.704	8.683	1.371
3	propan-2-ol	4.448	7.183	1.271
4	acetonitrile	4.681	2.183	1.344

3.2.2 ผลการศึกษา linearity และ working range

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือที่สุ่มจากท้องตลาดส่วนใหญ่มีความเข้มข้น 70-80% v/v และการเตรียมสารละลายมาตรฐานควรมี working range ในช่วง ± 25-50% ของความเข้มข้นที่คาดว่าจะพบ งานวิจัยนี้จึงเตรียมตัวอย่างในช่วงความเข้มข้น 0.1-1.0% v/v เนื่องจากครอบคลุมการวิเคราะห์ในสารตัวอย่างจริงหลังจากเจือจางสารตัวอย่าง 100 เท่า โดยผลการศึกษาเมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า 1% v/v พบว่าพีกมีความกว้าง ประสิทธิภาพการแยกไม่สมบูรณ์ ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ external standard ของ ethanol แสดงได้ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 กราฟมาตรฐาน external standard calibration curve ของ สารละลาย ethanol

สมการเส้นตรงของและค่าความเป็นเส้นตรง coefficient of determination (R^2) ของกราฟมาตรฐาน โดยใช้ external standard, matrix standard และ internal standard ของ ethanol และ propan-2-ol แสดงได้ดังตารางที่ 3.7 โดยทั่วไป ค่า coefficient of determination (R^2) ต้องมากกว่า 0.99 ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ เห็นได้ว่าค่า R^2 ของสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานทั้ง 3 แบบของสารทั้ง 2 ชนิดมีค่ามากกว่า 0.99 แสดงว่าวิธีนี้มีความเส้นตรงสูง เหมาะกับการนำไปใช้ต่อไป

ตาราง 3.7 สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานวิธีต่างๆ ของ ethanol และ propan-2-ol (0.1-1.0% v/v) แสดงค่า R^2 ในวงเล็บ

กราฟมาตรฐานวิธี	ethanol		propan-2-ol	
	สมการเส้นตรง	R^2	สมการเส้นตรง	R^2
external standard	$y = 3\times10^6x - 47291$	0.9993	$y = 3\times10^6x - 35877$	0.9999
matrix standard	$y = 3\times10^6x - 62771$	0.9994	$y = 3\times10^6x - 72384$	0.9993
internal standard	$y = 2.2352x - 0.0393$	0.9996	$y = 2.3051x - 0.03$	0.9993

3.2.3 การศึกษาผลของเมทริกซ์ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte)

ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบที่สุ่มมาจากท้องตลาด มีองค์ประกอบอยู่ 2 ส่วน ได้แก่ 1) analyte หรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ คือ ethanol และ propan-2-ol และ 2) matrix ซึ่งแตกต่างกันไปขึ้นกับตัวอย่างแต่ละชนิด เช่น สูตรของอนามัยโลก (WHO) แนะนำให้เติม glycerol เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น และเติม hydrogen peroxide เพื่อช่วยในการฆ่าเชื้อ ซึ่งเมทริกซ์ดังกล่าวอาจส่งผลรบกวนสัญญาณของ analyte ได้ ในงานวิจัยเล่มนี้ได้ทำการคำนวณค่า t-value ของ external standard solution และ matrix standard solution ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยถือว่าเมทริกซ์ไม่ส่งผลต่อ analyte หากค่า paired

t-test มากกว่า 0.05 และค่า t-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.45 ซึ่งจากผลการคำนวณดังแสดงในตารางที่ 3.8 พบว่าค่า paired t-test ที่ได้เท่ากับ 0.23 ซึ่งมากกว่า 0.05 และ t- value ที่ได้เท่ากับ 2.45 ซึ่งน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.45 ดังนั้นเมทริกซ์ไม่ส่งผลต่อ analyte อย่างมีนัยสำคัญ

ตาราง 3.8 ค่า t-value ของกราฟมาตรฐานของ external standard solution กับ matrix solution curve ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (n = 7)

ความเข้มข้น (% v/v)	พื้นที่ใต้พีก (เฉลี่ย)		paired t-test	t- value
	standard solution	standard solution ใน matrix sample		
0.1	234714.77	243052.97		
0.2	486735.93	491050.27		
0.3	763590.20	752541.10		
0.5	1317458.17	1288257.50	0.23	2.45
0.7	1816713.90	1858031.03		
0.8	2082866.10	2136184.47		
1.0	2687721.00	2726696.03		

3.2.4 การศึกษาความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

ความแม่นของวิธีวิเคราะห์ คือ ความใกล้เคียงของค่าความเข้มข้นที่วัดได้กับค่าความเข้มข้นจริงในสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยที่สุ่มจากท้องตลาด โดยงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์จาก matrix spiked sample ที่เตรียมขึ้น โดยทำการเติม (spiked) สารละลายมาตรฐาน ethanol และ propan-2-nol ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง รวม 3 ระดับ คือ 0.2, 0.4 และ 0.6% v/v ลงในสารละลายตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง ภายในวันเดียวกัน (intra-day) ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ จากนั้นพิจารณา %recovery จากสูตร

$$\%recovery = (C_f - C_u) \times 100/C_A$$

เมื่อ C_f = ความเข้มข้นของ spiked sample

C_u = ความเข้มข้นของตัวอย่างเริ่มต้น

C_A = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

โดย %recovery ที่ยอมรับต้องอยู่ในช่วง 95-105 %

ความเที่ยงของของวิธีวิเคราะห์ คือ ความใกล้เคียงกันของค่าความเข้มข้นที่วัดได้จากการวัดสารตัวอย่างเดียวกันหลายครั้งใน โดยพิจารณาจากค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ซึ่งต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ น้อยกว่า 3.7% งานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ matrix spiked sample ที่เตรียมขึ้น

ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ทำโดยการ spiked สารละลายมาตรฐาน ethanol และ propan-2-nol ลงในสารละลายตัวอย่าง การวิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมใหม่ทุกวันเป็นเวลา 3 วัน (interday) แต่ละวันทำการวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้

เมื่อพิจารณาค่า %recovery จากการ spiked สารละลายมาตรฐาน ethanol และ propan-2-nol ลงในสารละลายเมทริกซ์ของตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นระดับ ต่ำ กลาง สูง จากการวัดภายในวันเดียวกัน 7 ครั้ง (intra-day) และ พิจารณา %RSD ของแต่ละวัน และในเวลา 3 วัน (interday) ดังแสดงในตารางที่ 3.9 พบว่าค่า %recovery และ %RSD ที่ได้อยู่ในช่วงที่กำหนด

ตาราง 3.9 %recovery และ %RSD ของ matrix spiked sample

		mean recovery (%±SD) ที่ความเข้มข้น			RSD (%) ที่ความเข้มข้น		
		low	middle	high	low	middle	high
Intraday	วันที่ 1	95.27±0.00	95.59 ± 0.01	102.79 ± 0.01	0.89	0.83	1.08
	วันที่ 2	95.15±0.01	95.30 ± 0.01	96.71 ± 0.04	0.56	1.31	0.51
	วันที่ 3	95.87±0.03	96.71 ± 0.02	99.23 ± 0.01	0.75	0.70	0.93
Interday		95.43±0.39	95.87±0.74	99.58±3.05	0.40	0.78	3.07

3.2.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ ethanol และ propan-2-ol ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือที่สุ่มมาจากท้องตลาด จำนวน 7 ตัวอย่าง

จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย ที่สุ่มมาจากท้องตลาด มีจำนวน 7 ตัวอย่าง แสดงด้วยยี่ห้อ A, B, C, D, E, F และ G ได้ทำการหาปริมาณ ethanol และ propan-2-ol ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดยคำนวณค่าความเข้มข้นจากวิธีวิเคราะห์ 2 วิธี คือ 1) การใช้สมการเส้นตรงของ external standard calibration curve จากการเตรียม standard solution หลายความเข้มข้นซึ่งมีความแม่นยำสูง และ 2) การใช้ค่า response factor ที่มี acetronitile เป็น internal standard ซึ่งคำนวณแบบ one-point เท่านั้น ทำให้ประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ แต่ความแม่นยำอาจจะต่ำ ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้วิธีทั้งสอง แสดงในตารางที่ 3.10 เห็นได้ว่าความเข้มข้นที่คำนวณจาก external standard calibration curve อยู่ในช่วง 71-88% v/v ซึ่งอยู่สอดคล้องกับปริมาณประกาศกระทรวงสาธารณสุขกำหนด (อย่างน้อย 70%) และไม่มีการปนเปื้อนของเมทานอล ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้สมการเส้นตรงของ external standard calibration curve ในการคำนวณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือ

ตาราง 3.10 ความเข้มข้น (% v/v) ของ ethanol และ propan-2-ol ที่คำนวณจากสมการเส้นตรงของ external standard calibration curve และ ค่า response factor ของ internal standard

สารตัวอย่าง	external standard calibration curve		response factor		criteria total alcohol %v/v
	ethanol	propan-2-ol	ethanol	propan-2-ol	
A	80.82	1.890	89.44	0.890	70
B	77.78	1.850	86.47	0.850	75
C	79.56	1.070	87.90	0.000	>75
D	69.46	1.880	75.72	0.870	>70
E	3.720	77.74	4.660	84.24	70 (IPA)
F	73.86	1.510	80.79	0.470	75
G	87.35	1.070	97.21	0.000	>70

3.2.6 ข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่ออนามัยสำหรับมือในรายงานฉบับนี้ เป็นผลการทดลองจากผู้ทดลองเพียงคนเดียว เพื่อให้เกิดความแม่นยำและถูกต้องของวิธีวิเคราะห์มากขึ้น ควรทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีดังที่กล่าวมาโดยใช้ผู้ทดลองอื่น และทำในห้องปฏิบัติการอื่นด้วย

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัย ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ทำการวิเคราะแอลกอฮอล์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 2 ชนิด ได้แก่ ethanol และ propan-2-ol โดยศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ และ ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของคอลัมน์ อุณหภูมิของ oven อัตราการไหลของแก๊สพา และ อัตราส่วนการ split จากการวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ชนิด DB-WAX ที่เคลือบด้วย stationary phase 100% polyethylene glycol เปรียบเทียบกับคอลัมน์ DB-624UI ที่เคลือบด้วย 6% cyanopropyl-phenyl และ 94% dimethyl polysiloxane พบว่าคอลัมน์ชนิด DB-624UI ให้ค่า resolutionที่ดีกว่า ดังนั้นคอลัมน์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ คือ ชนิด DB-624UI เมื่อทดสอบอุณหภูมิของ oven แบบ temperature program ที่ต่างกัน โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ต่างกัน 3 ค่า คือ 40 50 และ 60 ℃ (hold 5 min) จนถึง 230℃ (hold 2.3 min) ด้วยอัตราการการเพิ่มอุณหภูมิ 25 ℃/min ผลพบว่าอุณหภูมิเริ่มต้น 50 ℃ ให้ค่า resolution ที่ดีที่สุด การศึกษาอัตราการไหลของแก๊สพา ที่อัตรา 1.5 3.0 และ 5.0 mL/min พบว่าพีกของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile แยกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อใช้อัตราการไหลของแก๊สพาเท่ากับ 1.5 mL/min ส่วนการวิเคราะห์อัตราส่วนการ split ที่ 10:1, 20:1 และ 50:1 พบกว่าพีกของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile แยกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อใช้ที่อัตราส่วนการ split เท่ากับ 20:1

จากการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์จึงสรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี คือ ใช้แคปิลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด DB-624UI (30 m x 0.32 mm I.D. × 1.8 µm film) โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสม 1% v/v ปริมาตร 1 µL อุณหภูมิเริ่มต้น 50 ℃ ใช้ split ratio เท่ากับ 20:1 inlet temperature 250 ℃ อัตราการไหลของตัวพา 1.5 mL/min และ detector temperature 280℃ เมื่อได้ภาวะที่เหมาะแล้ว จำเป็นต้องทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

ผลการทดสอบ selectivity ในการแยกพีกของสารละลายมาตรฐานผสม ด้วยภาวะที่เหมาะสมข้างต้น โดยพิจารณาค่า retention time, resolution และ tailing factor พบว่าลำดับของสารที่ออกมาจากคอลัมน์ เรียงตามค่า retention time คือ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ซึ่งสอดคล้องกับลำดับจุดเดือดของสาร แต่ propan-2-ol มีจุดเดือดใกล้กับ acetonitrile จึงพิจารณาสภาพขั้ว acetonitrile มีขั้วน้อยกว่า

จึงแยกออกมาลำดับสุดท้าย เมื่อพิจารณาการแยกของพีกจากค่า resolution พบว่ามีค่ามากกว่า 1.5 แสดงว่าพีกของสารผสมแยกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยค่า tailing factor มีค่าใกล้เคียง 1 แสดงถึงความมีสมมาตรของพีก สรุปได้ว่าการวิเคราะห์แอลกอฮอล์มี selectivity สำหรับการทดสอบความเป็นเส้นตรง ทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ เพื่อสร้างกราฟ external calibration curve, Internal calibration curve และ matrix calibration curve และพิจารณาค่า R^2 มากกว่า 0.99 ดังนั้นกราฟจึงมีความเป็นเส้นตรง และการทดสอบความเที่ยงความแม่นของวิธีวิเคราะห์ ค่า %recovery อยู่ในช่วง 95-105% ค่า RSD < 3% เป็นค่าที่ยอมรับได้ และจากการนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ไปหาปริมาณ ethanol และ isopropanol ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด

มือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ จากท้องตลาด โดยเทียบกับ external standard calibration curve จะมีความแม่นยำสูง มีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่ประกาศกระทรวงสาธารณะสุขกำหนด และไม่มีการปนเปื้อนของเมทานอล ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการวิเคราะห์มีความถูกต้องและใช้ได้ภายใต้ภาวะการทดลองที่เหมาะสมดังกล่าว สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐาน (SOP) ในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ เพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ ประจำศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

(1) ภญ.วรรณพร ศรีสุคนธรัตน์, สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ ที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณะสุข. Retrieved from. https://n9.cl/slqn. (accessed 20.06.20).

(2) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ พ.ศ. 2563 ประกาศ ณ วันที่ 9 มีนาคม 2563. คัดจากราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54 ง วันที่ 9 มีนาคม 2563.

(3) Chemical Knowledge Platform, ข้อมูลสารเคมีของเมทานอล. Retrieved from. http://www.chemtrack.org/chem-detail.asp?ID=01306&CAS=&Name. (accessed 25.06.20).

(4) Kieran Evans, Ariel Bohman, Quantification of Ethanol and Isopropanol in Alcohol-Based Hand Sanitizers. Retrieved from. https://www.perkinelmer.com/libraries/ABR_ HandSanitizerAnalysis?leadId=1 (accessed 22.07.20).

(5) World Health Organization (WHO), WHO-recommended handrub formulations. Retrieved from. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-IER-PSP-2010.5 (accessed 27.07.20).

(6) หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ, สำนักพิมพ์ บริษัท ชวนพิมพ์ 50 จำกัด, กรุงเทพมหานครฯ, 2555, หน้า 243-318.

(7) Pharmacoperia online, USP611 alcohol determination. Retrieved from. http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0_c611.html. (accessed 29.07.20).

(8) Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Michigan, 1970.

(9) Jie Zhang Agilent Technologies, Inc., Hand Sanitizer Analysis Using the Agilent 8860 GC Configured with a Flame Ionization Detector. Retrieved from.https://www.agilent.com/cs/ library/applications/application-hand-sanitizer-analysis-8860-fid-5994-2089en-agilent.pdf. (accessed 10.08.20).

(10) Vanessa Abercrombie Gustavo Serrano and Phil Stremple. Analysis of Ethanol and Isopropanol in Alcoholbased hand sanitizers by direct injection GC/FID. Retrieved from. https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/poster-ethanol-isopropanol-hand-sanitizers-gc-fid-5994-1923en-agilent.pdf. (accessed 10.08.20).

(11) MO Memoir, Flame Ionisation Detector MO Memoir. Retrieved from. http://tamagozzilla.blogspot.com/2009/08/mo-memoir-flame-ionisation-detector.html. (accessed 15.08.20).

(12) STREC, Gas Chromatograph. Retrieved from. http://www.strec.chula.ac.th/base/equipments-rates/gas-chromatograph-gc-gc-2010. (accessed 15.08.20).

(13) Bara Scientific Co., Ltd., Gas chromatography detector. Retrieved from. https://www.barascientific.com/article/App/Gas%20chromatography%20detector.php. (accessed 03.09.20).

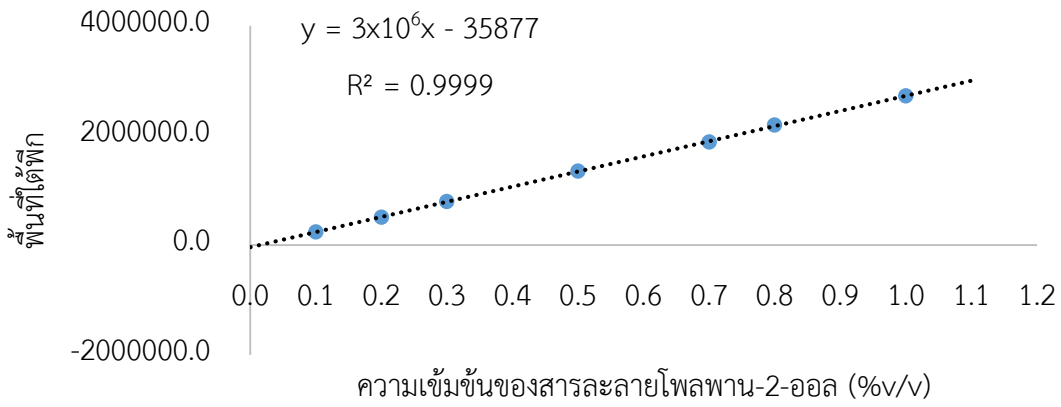
(14) Shimadsu, Detector. Retrieved from. https://www.shimadzu.com/an/gc/support/fundamentals/detector.html. (accessed 03.09.20).

(15) Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Retrieved from. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf. (accessed 15.09.20).

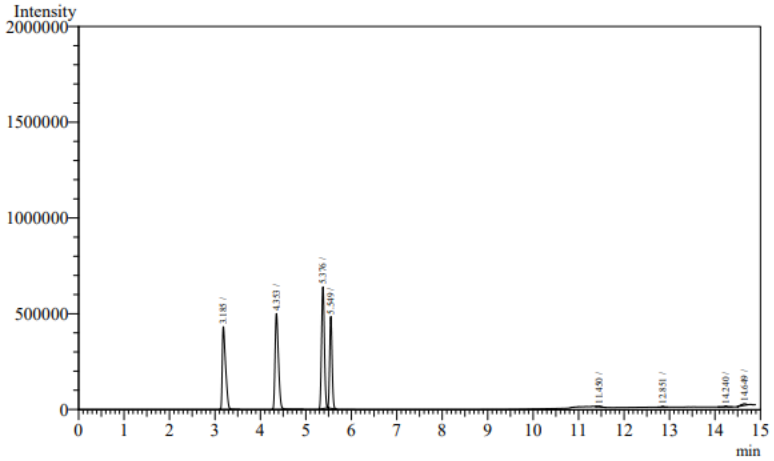
(16) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Retrieved from. https://members.aoac.org/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf. (accessed 15.09.20).

(17) Guidance for standard Method Performance Requirements. Retrieved from. http://stakeholder.aoac.org/vmeth/SMPR_Guidelines.pdf (accessed 15.09.20).

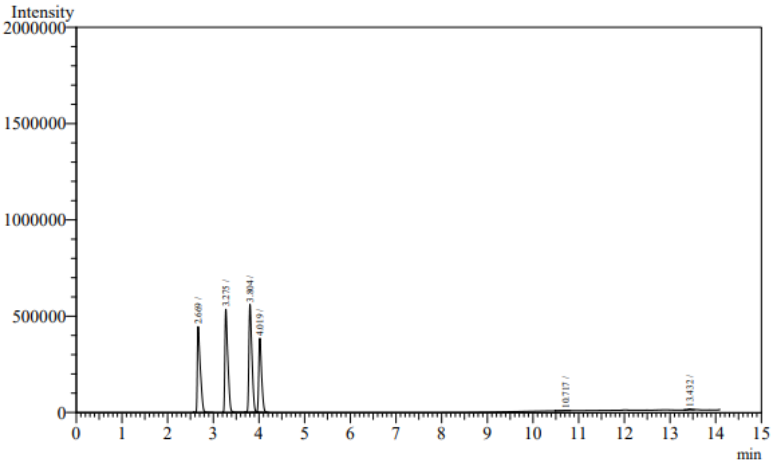
ภาคผนวก



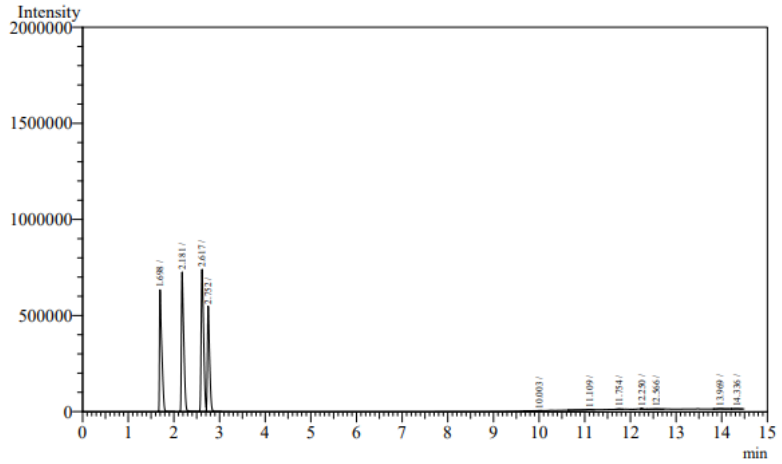
รูปที่ A1 กราฟมาตรฐาน external standard calibration curve ของ สารละลาย propan-2-ol



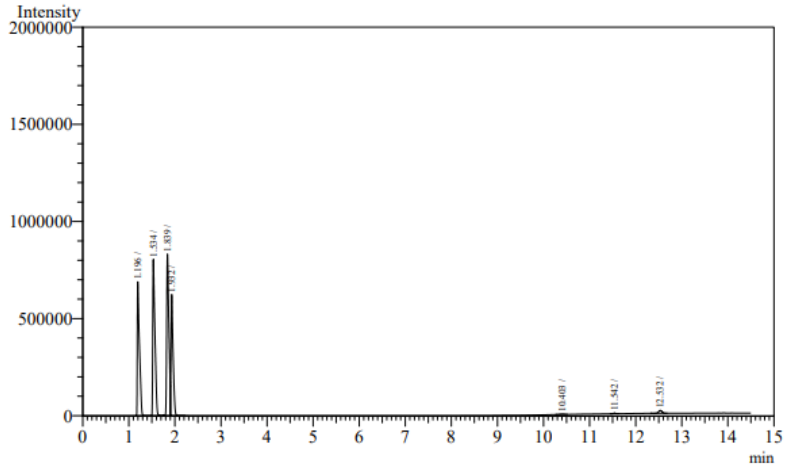
รูปที่ A2 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min, T: 40 – 230 °C)



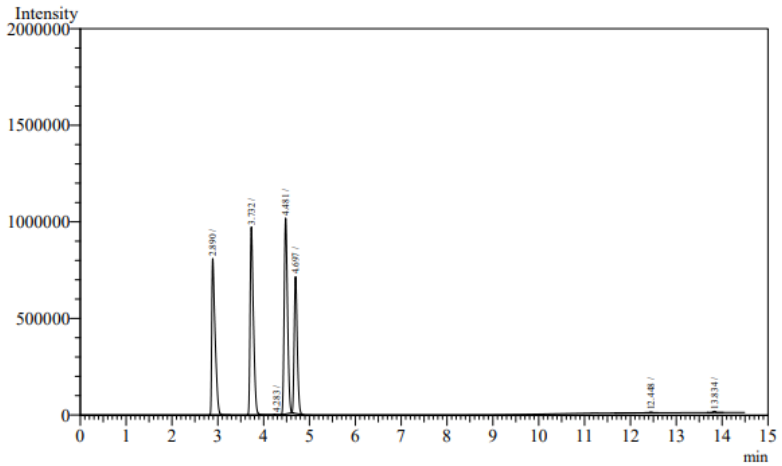
รูปที่ A3 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 20:1, flow 1.5 mL/min, T: 60 – 230 °C)



รูปที่ A4 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 20:1, flow 3 mL/min, T: 50 – 230 °C)



รูปที่ A5 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 20:1, flow 5 mL/min, T: 50 – 230 °C)



รูปที่ A6 โครมาโทแกรมการแยกสารละลายผสม 1% v/v ของ methanol, ethanol, propan-2-ol และ acetonitrile ด้วยคอลัมน์ DB-624UI (split ratio 10:1, flow 1.5 mL/min, T: 50 – 230 °C)

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวทักษิณา มาลี เกิดเมื่อวันที่ 15 เดือนกันยายน พ.ศ.2541 ที่จังหวัดลำพูน สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนจักรคำคณาทรจังหวัดลำพูน จังหวัดลำพูน เมื่อปีการศึกษา 2559 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 302/1 ตำบลอุโมงค์ อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน รหัสไปรษณีย์ 51150 อีเมล 6033031623@student.chula.ac.th