

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างในการวิจัยครั้งนี้ โดยทำการสุ่มตัวอย่างเครื่องดื่มชาปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม จำนวน 5 เครื่องหมายการค้า ได้แก่ A1, A2, A3, A4, A5 ที่จำหน่ายในเขตตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

สถานที่ทำการทดลอง

อาคารสิรินธร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
2. ปีกเกอร์ (Beaker)
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
4. ปิเปต (Pipette)
5. ช้อนตักสาร
6. แท่งแก้ว
7. ขวดฉีดยากลับ
8. คิวเวทท์ (Cuvette)
9. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า (Analytical balance) ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204 – S บริษัท เมทเลอร์ โทเลโด (Mettler Toledo) จำกัด
10. ตู้ควัน (Hood)
11. เครื่อง Spectronic 20 ยี่ห้อ MILTON ROY

สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) บริษัท แกมมาโก้ จำกัด
2. โพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide, $K_3Fe(CN)_6$)

บริษัท แกมมาโก้ จำกัด

3. ไอร์ออน(III)คลอไรด์ (Iron(III)chloride, $FeCl_3$) บริษัท แกมมาโก้ จำกัด
4. คาทีชิน ((+) – Catechin hydrate, $C_{15}H_{12}O_7$) บริษัท เอส.อาร์.แอล จำกัด
5. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการดำเนินงาน

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.10 โมลาร์
ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ที่มี
น้ำกลั่น ปริมาตร 98.3 มิลลิลิตร
2. สารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์
ชั่งโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ 0.0500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ใส่ในขวดวัด
ปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกระดับ
3. สารละลายไอร์ออน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรด
ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลาร์
ชั่งไอร์ออน (III) คลอไรด์ 0.5000 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก
เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรด
ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนถึงขีดบอกระดับ
4. สารละลายมาตรฐานคาทีชิน เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
4.1 ชั่งคาทีชิน 0.0100 กรัม ละลายกับน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด
100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกระดับ จะได้สารละลายคาทีชินเข้มข้น
100 มิลลิกรัมต่อลิตร
4.2 ปิเปตสารละลายคาทีชิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร
ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกระดับ
ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน

5. สารละลายมาตรฐานคาทิซิน เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปีเปตสารละลายคาทิซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานในการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานและการสร้างกราฟมาตรฐานคาทิซิน

1. ปีเปตสารละลายมาตรฐานคาทิซิน เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ไอซยาไนต์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แกว่งสารละลายผสมให้เข้ากัน
3. เติมสารละลายไอโอรอน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แกว่งสารละลายผสมให้เข้ากัน
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงซ้ำอีก 6 ครั้ง บันทึกผล
6. ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 1-5 โดยใช้สารละลายมาตรฐานคาทิซินเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.00, 3.00, 4.00 และ 5.00 มิลลิลิตร
7. ทำการทดลองตามข้อ 1-5 เพื่อเตรียมสารละลายแบบตงค์ โดยใช้ น้ำกลั่น ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แทนสารละลายมาตรฐานคาทิซิน
8. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคาทิซิน

การเตรียมสารตัวอย่าง

1. ปีเปตตัวอย่างเครื่องคั้นชาปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม เครื่องหมายการค้า A1 ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร ใช้เป็นสารละลายตัวอย่าง
2. เตรียมสารละลายตัวอย่างซ้ำตามข้อ 1 โดยใช้ตัวอย่างเครื่องคั้นชาปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม เครื่องหมายการค้า A2, A3, A4 และ A5 ตามลำดับ

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินในสารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มชาปรุงสำเร็จ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างเครื่องหมายการค้า A1 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ไรไซยาไนด์ 0.003 โมลาร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แก้วสารละลายผสมให้เข้ากัน
3. เติมสารละลายไอโอรอน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แก้วสารละลายผสมให้เข้ากัน
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงซ้ำอีก 6 ครั้ง บันทึกผล
6. ทำการทดลองตามข้อ 1-5 โดยใช้สารละลายตัวอย่าง เครื่องหมายการค้า A2, A3, A4 และ A5 ตามลำดับ
7. ทำการทดลองตามข้อ 1-5 เพื่อเตรียมสารละลายเบลงค์โดยใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง
8. คำนวณค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและคำนวณหาความเข้มข้นของแทนนินในตัวอย่างเครื่องดื่มชาปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม จำนวน 5 เครื่องหมายการค้า โดยใช้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

การหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (%Recovery)

1. สารตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานคาทิกิน (Unspiked sample)
 - 1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างเครื่องหมายการค้า A1 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร
 - 1.2 เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ไรไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แก้วสารละลายผสมให้เข้ากัน
 - 1.3 เติมสารละลายไอโอรอน (III) คลอไรด์ เข้มข้น 0.03 โมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แก้วสารละลายผสมให้เข้ากัน
 - 1.4 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร
 - 1.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงซ้ำอีก 2 ครั้ง บันทึกผล

1.6 ทำการทดลองตามข้อ 1.1- 1.5 โดยใช้สารละลายตัวอย่าง เครื่องหมายการค้า A2, A3, A4 และ A5 ตามลำดับ

1.7 ทำการทดลองตามข้อ 1.1- 1.5 เพื่อเตรียมสารละลายเบงค์ โดยใช้ น้ำกลั่น ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

1.8 คำนวณค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและคำนวณหาความเข้มข้นของแทนนินใน ตัวอย่างเครื่องดื่มชาปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม จำนวน 5 เครื่องหมายการค้า โดยใช้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืน แสงและสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

2. สารตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานคาทิซิน (Spiked sample)

2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างเครื่องหมายการค้า A1 ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

2.2 เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ไรไซยาไนด์ เข้มข้น 0.003 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แก้วสารละลายผสมให้เข้ากัน

2.3 เติมสารละลายไอโรออน(III)คลอไรด์ เข้มข้น 0.06 โมลาร์ ในสารละลายกรด ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แก้วสารละลายผสมให้เข้ากัน

2.4 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

2.5 ปิเปตสารละลายมาตรฐานคาทิซิน เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรในข้อ 2.4

2.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Spectronic 20 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร บันทึกผล วัดการดูดกลืนแสงซ้ำอีก 2 ครั้ง บันทึกผล

2.7 ทำการทดลองตามข้อ 2.1- 2.6 โดยใช้สารละลายตัวอย่าง เครื่องหมายการค้า A2, A3, A4 และ A5 ตามลำดับ

2.8 ทำการทดลองตามข้อ 1- 5 เพื่อเตรียมสารละลายเบงค์ โดยใช้ น้ำกลั่น ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง

2.9 คำนวณค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและคำนวณหาความเข้มข้นของแทนนินใน ตัวอย่างเครื่องดื่มชาปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม จำนวน 5 เครื่องหมายการค้า โดยใช้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืน แสงและสมการเส้นตรงในกราฟมาตรฐาน

3. นำความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานคาทิซิน และความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานคาทิซิน ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานมา คำนวณเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

การคำนวณเชิงสถิติ (ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์, 2552)

1. ค่าเฉลี่ย (Mean, $\bar{x}$)

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

เมื่อ $\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จำนวน n ครั้ง
 x_i = ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดครั้งที่ i
 n = จำนวนครั้งของการวัด

2. ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

เมื่อ SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)
 $\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จำนวน n ครั้ง
 x_i = ค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดครั้งที่ i
 n = จำนวนครั้งของการวัด

3. ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, RSD)

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

เมื่อ RSD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation)
SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)
 $\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จำนวน n ครั้ง

4. เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

$$\% \text{Recovery} = \frac{C_s - C_u}{C} \times 100$$

เมื่อ C_s = ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างหลังเติมสารละลายมาตรฐาน (Spiked sample)

C_u = ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างก่อนเติมสารละลายมาตรฐาน (Unspiked sample)

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป