บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

ในขั้นตอนการดำเนินการวิจัยผู้วิจัยได้แบ่งงานออกเป็น 4 ส่วนใหญ่ คือ ส่วนแรกจะเป็นการเก็บตัวอย่างลูกพลับจากสวน ส่วนที่สองจะเป็นการนำเอาตัวอย่างลูกพลับมาทำการบ่มเพื่อลดความฝาดของลูกพลับ ส่วนที่สามเป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธี และส่วนสุดท้ายคือการวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินในลูกพลับที่ได้จากวิธีการบ่มต่าง ๆ ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตมิทรี ในวิธีมาตรฐาน AOAC 952.03 มีขั้นตอนการดำเนินงานดังต่อไปนี้

1. การเก็บตัวอย่าง

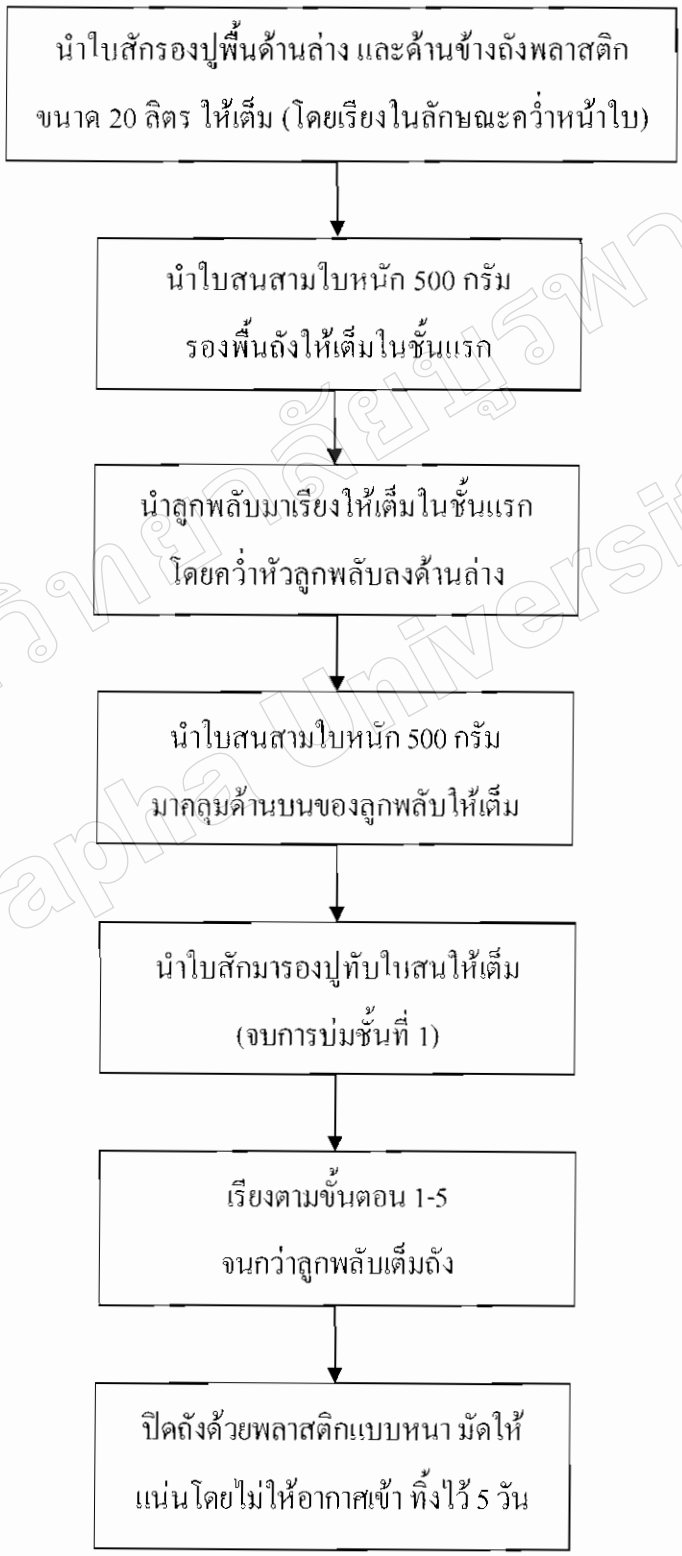
พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 1 ไร่ มีต้นพลับทั้งหมด 6 ต้น ทำการเก็บตัวอย่างลูกพลับต้นละ 15 กิโลกรัม โดยเลือกเก็บลูกพลับที่มีลักษณะสีเหลืองปนเขียว และมีความสุกใกล้เคียงกัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 เซนติเมตร

2. การบ่มลูกพลับ

การบ่มเพื่อลดความฝาดของลูกพลับที่ใช้ในงานวิจัยมีทั้งหมด 4 วิธี ที่ใช้ในอำเภอเวียงแหง จังหวัดเชียงใหม่ คือ การบ่มด้วยสนสามใบ. การแต้มจุกลูกพลับด้วยเอทานอล. การบ่มด้วยแก๊สอะเซทิลีน และการแช่ด้วยน้ำปูนใส โดยนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่ละวิธีใช้ลูกพลับ 10 กิโลกรัม ระยะเวลาในการบ่ม 5 วัน มีวิธีการดำเนินงานดังนี้

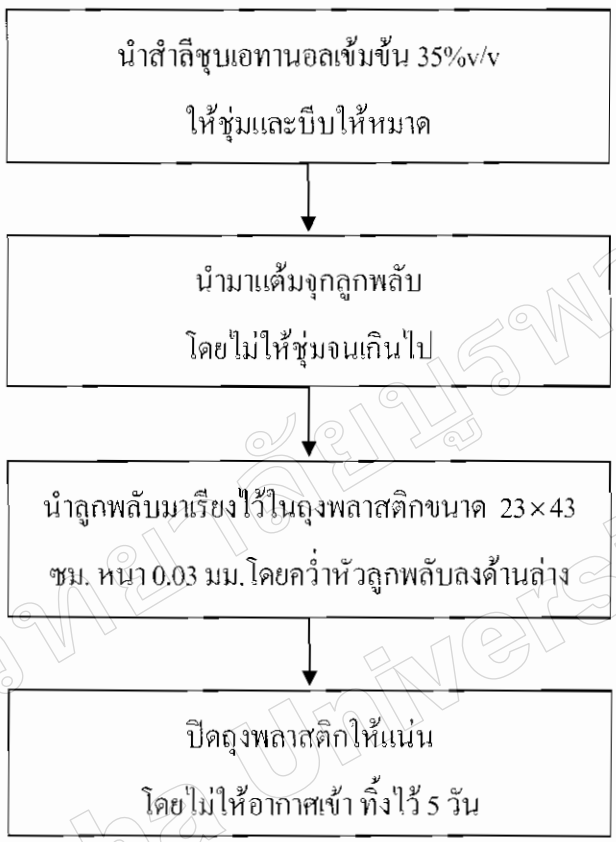
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1 การบ่มด้วยสนสามใบ

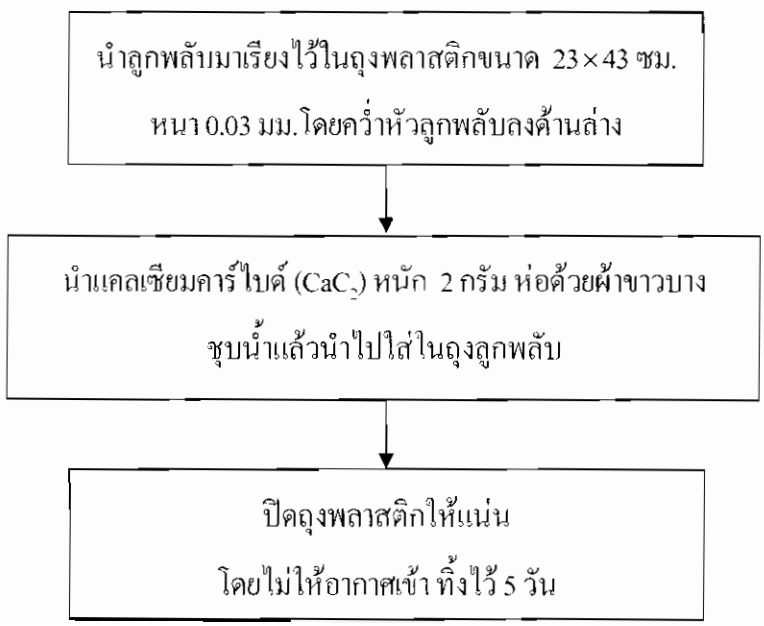


มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 การบ่มลูกพลับโดยการแต้มจุกด้วยเอทานอล



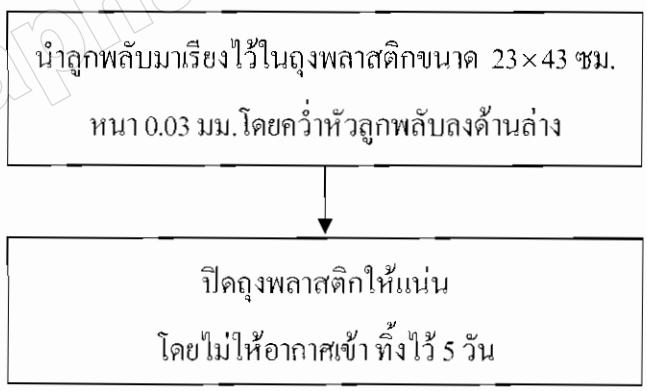
2.3 การบ่มลูกพลับด้วยแก๊สอะเซทิลีน



มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.4 การบ่มลูกพลับด้วยน้ำปูนใส

2.5 ชุดควบคุม



มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

3.1.2.1 โซเดียมทังสเตด (Sodium tungstate: $Na_2WO_4 \bullet 2H_2O$) เกรด AR ยี่ห้อ BDH

3.1.2.2 ฟอสโฟโมลิบดิกแอซิด (Phosphomolybdic acid) เกรด AR ยี่ห้อ Fluka

3.1.2.3 โซเดียมคาร์บอเนต (Anhydrous sodiumcarbonate: Na_2CO_3) เกรด AR ยี่ห้อ Merck

3.1.2.4 สารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก (Standard tannic acid) เกรด AR ยี่ห้อ Sigma

3.1.2.5 กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid: H_3PO_4) เกรด AR ยี่ห้อ Fisher

3.1.2 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1.1 เครื่อง Spectrophotometer Agilent 8453, U.S.A

3.1.1.2 เครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น ML 204

3.1.1.3 เครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น ML 204

3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 สารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 ppm

ชั่งกรดแทนนิกมา 50.00 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ ในขวดวัดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3.2.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 35%w/v

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 140.00 กรัม เติมน้ำให้ครบ 400 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70-80°C คนให้ละลาย ทิ้งไว้หนึ่งคืนกรองส่วนที่ใสเก็บไว้

3.2.3 สารละลายโฟลิน-เดนิส รีเอเจนต์

ชั่งโซเดียมทังสเตต 100.00 กรัม ละลายในน้ำ 750 มิลลิลิตร เติมฟอสโฟโมลิบดิกแอซิด 20 กรัม เติมกรดฟอสฟอริก 50 มิลลิลิตร อุ่นใน water bath อุณหภูมิ 90°C เวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เทลงในขวดวัดปริมาตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสม ในการวิเคราะห์หาปริมาณแทนนิน

3.3.1 การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด

3.3.1.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.06, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 10.0, 20.0 และ 30.0 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.3.1.2 เติมสารละลายโฟลิน-เดนิสรีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร

3.3.1.3 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 45 นาที (ได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก 0.03, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.3.1.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 400 – 900 นาโนเมตร

3.3.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

3.3.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 2.0 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.3.2.2 เติมสารละลายโฟลิน-เดนิสรีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร

3.3.2.3 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ได้ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.3.2.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เวลา 0-120 นาที

3.3.3 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

3.3.3.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.06, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 10.0, 20.0 และ 30.0 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.3.3.2 เติมสารละลายโฟลิน-เดนิสรีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร

3.3.3.3 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที (ได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก 0.03, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.3.3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3.3.4 การสร้างกราฟมาตรฐาน

3.3.4.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 1.0 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

3.3.4.2 เติมสารละลายเติมสารละลายโฟลิน-เดนิสรีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.3.4.3 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที (ได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.3.4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ตามลำดับ นำข้อมูลไปสร้างกราฟมาตรฐาน

3.4 การวิเคราะห์หาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of Detection , LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์หาปริมาณ (Limit of Quantitation,LOQ)

ใช้ผลจากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มาคำนวณหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ และขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์หาปริมาณ

3.5 การหาความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์

3.3.6.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.2 และ 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.3.6.2 เติมสารละลายเติมสารละลายโฟลิน-เดนิสรีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร

3.3.6.3 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที (ได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.3.6.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ตามลำดับ วิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง นำค่าที่ได้มาคำนวณและรายงานผลในรูปเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percentage Relative Standard Deviation, %RSD)

3.6 การหาค่าร้อยละการได้กลับคืน (%Recovery)

3.6.1 สารตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก (Unspiked sample)

3.6.1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างลูกพลับที่ได้จากวิธีการบ่มต่างๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.6.1.2 เติมสารละลายโฟลิน-เดนิสรีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร

3.6.1.3 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ 30 นาที

3.6.1.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

337483

3.6.1.5 นำมาคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืน

3.6.2 สารตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก (Spiked sample)

3.6.2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างลูกพลับที่ได้จากวิธีการบ่มต่างๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.6.2.2 เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (ได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.6.2.3 เติมสารละลายโฟลิน-เดนิสรีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร

3.6.2.4 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที

3.6.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3.6.2.6 นำมาคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืน

3.6.2.7 ทำการทดลองตามข้อ 3.6.2.1- 3.6.2.6 โดยการเติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินในตัวอย่างลูกพลับที่ได้จากวิธีการบ่มต่าง ๆ ด้วยวิธีมาตรฐาน (AOAC 952.03)

4.1 การเตรียมตัวอย่าง

4.1.1 หั่นลูกพลับแยกส่วนเปลือก เนื้อ เปลือกและเนื้อรวมกัน อย่างละ 500.00 กรัม

3.4.2 ชั่งตัวอย่างลูกพลับ (แยกส่วนเปลือก เนื้อ เปลือกและเนื้อรวมกัน) 5.00 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.3 เติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา นำไปต้มเดือด 1 ชั่วโมง

3.4.4 กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินในตัวอย่างลูกพลับ

4.2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

4.2.2 เติมสารละลายโฟลิน-เดนิสรีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร

4.2.3 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที

4.2.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

4.2.5 นำมาคำนวณหาปริมาณแทนนินโดยใช้สมการจากกราฟมาตรฐาน

5. การคำนวณเชิงสถิติ (ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์, 2552)

5.1 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

5.2 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

5.3 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, %RSD)

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อ %RSD – ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation)

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

$\bar{x}$ – ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จำนวน n ครั้ง

5.4 ร้อยละการได้กลับคืน

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

เมื่อ C_s = ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างหลังเติมสารละลายมาตรฐาน (Spiked sample)

C_u = ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างก่อนเติมสารละลายมาตรฐาน (Unspiked sample)

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

5.5 ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of Detection : LOD)

$$\text{Limit of Detection} = y_b - 3S_B$$

$$S_{y/x} = S_{b_1} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

เมื่อ y_b คือ จุดตัดแกน

$S_{y/x}$ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์

y คือ ค่าที่ได้จากการวัด

$\hat{y}_i$ คือ ค่าที่ได้จากการคำนวณ

5.6 ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์หาปริมาณ (Limit of Quantification : LOQ)

$$\text{Limit of Quantification} = y_b + 10S_B$$

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University