

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างผักพื้นบ้านโดยสุ่มเก็บจากบริเวณที่ชาวบ้านชอบนิยมนำไปขาย ๑ ผักที่อยู่บนบก และในน้ำในเขตจังหวัดสกลนคร จะใช้วิธีตัดแล้วล้างผักที่เก็บมาให้สะอาดล้างให้สะอาดแล้วล้างด้วยน้ำ แล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติกขนาดตามความเหมาะสมของผักแต่ละชนิด ปริมาณที่เก็บ 300 กรัมใช้ยางรัดปากถุงให้แน่นแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นหมุดำ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. เครื่องอะตอมมิกแอพซอร์พชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Atomic Absorption Spectrophotometer)
Shimadzu รุ่น AA 6200
2. เครื่องชั่งดิจิทัลทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
3. เตาให้ความร้อน (Hot plate)
4. ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100, 250, 500, 1000 ml.
5. ขวดน้ำกลั่น (Wash Bottle)
6. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 150, 500 ml.
7. ขวดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ml.
8. ปิเปต (Pipette) ขนาด 2, 5, 10, 25 ml.
9. ลูกยาง (Bubble)
10. กระบอกตวง ขนาด 500, 1000 ml.
11. กระดาษกรองเบอร์ 40 (Filter paper NO.40)
12. แท่งคนสาร (Steering rod)
13. หลอดหยดสาร (Dropper)
14. ช้อนตักสาร (Spatula)
15. อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil)
16. พาราฟิล์ม (Para film)

สารเคมี

1. แคลเซียมไนเตรด (Calcium nitrate AAS standard , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) บริษัท Ajax Fine chem. เกรด Spectrosol
2. แลนทานัมออกไซด์ (Lanthanum oxide , La_2O_3) บริษัท Asia pacific specialty chemical limited เกรด Analytical
3. ซีเซียมคลอไรด์ (Cesium chloride, CsCl) บริษัท Fluka. เกรด Analyzed

4. กรดไนตริก (Nitric acid , HNO_3) บริษัท Ajax Fine chem. เกรด Analyzed
5. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) บริษัท J.T. Baker เกรด Analyzed
6. กรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid , HClO_4) บริษัท Ajax Finechem เกรด Analyzed
7. น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน (Deionize water; DI)
8. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride, CaCl_2) บริษัท Ajax Finechem เกรด Analyzed
9. กรดแอซติก (Acetic acid, HOAc) บริษัท Ajax Finechem เกรด Analyzed
10. โซเดียมแอซิเตด (Sodium acetate, NaOAc) บริษัท Ajax Finechem เกรด Analyzed
11. โซเดียมทังสเตด (Sodium tungstate , $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) บริษัท Fluka. เกรด Analyzed
12. กรดออร์โธฟอสฟอริก (Orthophosphoric acid, H_3PO_4) บริษัท Fluka. เกรด Analyzed
13. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide , NH_4OH) บริษัท Ajax Finechem เกรด Analyzed

วิธีการทดลอง (วิเคราะห์โดยประยุกต์ใช้ AOAC Official Method 1984)

1. การหาสถานะที่เหมาะสมในการทดลอง

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานแคลเซียมโดยการเจือจางสารละลายมาตรฐานแคลเซียมจาก 1000 ppm. ให้เป็น 500 ppm. และ 100 ppm. ตามลำดับจำนวน 500 ml

1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานแคลเซียมเข้มข้น 0.00, 0.50, 2.00, 6.00, 10.00, 12.00, 16.00 และ 20.00 ppm โดย ปิ่ดสารละลายมาตรฐานแคลเซียมในข้อ 1.1 มาจำนวน 0.00 , 0.50 , 2.00 , 6.00 , 10.00 , 12.00 , 16.00 และ 20.00 ml. ตามลำดับ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml.

1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานแคลเซียมในข้อ 1.2 โดยเตรียมเป็น 5 ชุดนี้

ชุดที่ 1 นำสารละลายมาตรฐานแคลเซียมมาเติมแลนทานัมออกไซด์ (La_2O_3) 0.5% w/v

ชุดที่ 2 นำสารละลายมาตรฐานแคลเซียมมาเติมแลนทานัมออกไซด์ (La_2O_3) 1% w/v

ชุดที่ 3 นำสารละลายมาตรฐานแคลเซียมมาเติมซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) 0.5% w/v

ชุดที่ 4 นำสารละลายมาตรฐานแคลเซียมมาเติมซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) 1% w/v

ชุดที่ 5 เติมเฉพาะสารละลายมาตรฐานแคลเซียมที่ ปิ่ดมาตามข้อ 1.2

แล้วปรับปริมาตร สารละลายทั้ง 5 ชุด ด้วยกรดไนตริก (HNO_3) 0.5% w/v จนครบ 100 ml.

1.4 นำสารละลายมาตรฐานแคลเซียมไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer , AAS ที่ความยาวคลื่น 422.8 nm

2. การเตรียมตัวอย่างในการหาปริมาณแคลเซียมในผักพื้นบ้านจากผัก 31 ชนิด

- 2.1 นำพืชตัวอย่างมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งมา 1 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 150 ml.
- 2.2 เติมกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น ปริมาตร 10 ml และกรดเปอร์คลอริก (HClO_4) เข้มข้น 60%w/w ปริมาตร 3 ml. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน
- 2.3 นำตัวอย่างไปย่อยโดยให้ความร้อนบนเตาให้ความร้อน (Hot plate) จนได้สารละลายใส แล้วยกออกตั้งทิ้งไว้ปล่อยให้เย็น
- 2.4 นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 (Filter paper NO.42) ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 ml.
- 2.5 เติมสารละลายแลนทานัมออกไซด์ (La_2O_3) 5% w/v ปริมาตร 10 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก (HNO_3) 0.5% w/v จนครบ 50 ml. ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้งแยกใส่ขวดรูปชมพู่ 3 ใบ
- 2.6 นำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค **Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)**ต่อไป

3. การวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมโดยใช้เทคนิค Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) (AOAC 1984,p40)

- 3.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 100 ppm. มาจำนวน 0.00, 0.50, 2.00, 6.00, 10.00, 12.00, 16.00 และ 20.00 ml. ตามลำดับ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml. เติมสารละลายแลนทานัมออกไซด์ (La_2O_3) 5% w/v ปริมาตร 20 ml. ปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก (HNO_3) 0.5% w/v จนครบ 100 ml.
- 3.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ที่ความยาวคลื่น 422.8 nm.
- 3.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคลเซียม
- 3.4 นำตัวอย่างที่เตรียมไว้จากข้อ 3 (การเตรียมตัวอย่าง) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ที่ความยาวคลื่น 422.8 nm.
- 3.5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแคลเซียม
- 3.6 นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแคลเซียม เป็นมิลลิกรัมต่อร้อยกรัม (mg / 100 g) ต่อไป

4. การวิเคราะห์หาปริมาณออกซาเลตโดยใช้เทคนิค Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) (AOAC 1984,p 611)

- 4.1 นำผักสดมาชั่ง 20 กรัม นำมาล้างให้สะอาดเติมน้ำกลั่น 100 ml แล้วนำไปปั่นให้ละเอียด
- 4.2 ชั่งสารตัวอย่างที่ปั่นละเอียดจำนวน 35 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 ml เติมกรด HCl เข้มข้น 6 M จำนวน 55 ml และเติมน้ำกลั่น 300 ml นำไปต้ม 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 4.3 เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน
- 4.4 นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 25 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่แล้วเติมสารละลาย tungstophosphoric จำนวน 5 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 20 ml ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ ขนาด 50 ml

4.5 นำสารละลายมาปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 4 – 4.5 ด้วย NH_4OH แล้วเติมสารละลายแคลเซียม แอซีเตด บัฟเฟอร์ pH 4.5 จำนวน 5 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ค้างคืน

4.6 นำไปเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 1700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 นาที รินสารละลายส่วนบนออกให้เหลือ แต่ตะกอนที่ส่วนล่าง และนำสารละลายส่วนที่รินออกไปเซนติฟิวส์อีกครั้งและเอาตะกอนที่ได้มารวมกัน

4.7 นำตะกอนที่ได้ทั้งหมดมาละลายด้วยกรด H_2SO_4 เข้มข้น 1: 9 จำนวน 5 ml

4.8 นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ml แล้วเติมสารละลายแลนทานัมออกไซด์ (La_2O_3) 5% w/v ปริมาตร 10 ml และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก (HNO_3) 0.5% w/v จนครบ 50 ml

4.9 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ที่ความยาวคลื่น 422.8 nm. พร้อมกับสารมาตรฐานของธาตุแคลเซียมที่ระดับความเข้มข้น 0,0.5,2.0,6.0,12.0,16.0,20.0 ppm

4.10 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแคลเซียมและคำนวณหาปริมาณของ ออกซาเลต

5. การหาล้อยละการกลับคืนของ การวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมโดยใช้เทคนิค Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)

5.1 นำพืชตัวอย่าง 10 ชนิดมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำมาชั่งชนิดละ 1 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 ml ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้งแยกใส่ขวดรูปชมพู่ 3 ใบ

5.2 เติมสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 30 , 40 และ 50 ppm ตามลำดับลงในขวดรูปชมพู่ใบที่ 2, 3, 4 ตามลำดับ โดยปิเปตจากสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 100 ppm จำนวน 15, 20 และ 25 ml. ตามลำดับ

5.3 เติมกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น ปริมาตร 10 ml และกรดเปอร์คลอริก (HClO_4) เข้มข้น 60% w/v ปริมาตร 3 ml ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน

5.4 นำตัวอย่างไปย่อยโดยให้ความร้อนบนเตาให้ความร้อน (Hot plate) จนได้สารละลายใส แล้วยกออกมาปล่อยให้เย็น

5.5 นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 (Whatman Filter paper No.42) ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 ml

5.6 เติมสารละลายแลนทานัมออกไซด์ (La_2O_3) 5% w/v ปริมาตร 10 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก (HNO_3) 0.5% w/v จนครบ 50 ml.

5.7 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ที่ความยาวคลื่น 422.8 nm พร้อมกับสารมาตรฐานของธาตุแคลเซียมที่ระดับความเข้มข้น 0,0.5,2.0,6.0,12.0,16.0,20.0 ppm

5.8 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแคลเซียม และนำไปคำนวณหาปริมาณของ แคลเซียม

6. การหาล้อยละการกลับคืนของ การวิเคราะห์หาออกซาเลตโดยใช้เทคนิค Atomic Absorption

Spectroscopy (AAS)

6.1 นำผักสดพืชตัวอย่างมาชั่ง 20 กรัม นำมาล้างให้สะอาด เติมน้ำกลั่น 100 ml แล้วนำไปปั่นให้ละเอียด ทำซ้ำตัวอย่างละ 4 ครั้ง แยกใส่ในบีกเกอร์จำนวน 4 ใบ แล้วนำไปทดลองต่อไป

6.2 ชั่งสารตัวอย่างที่ปั่นละเอียดจากข้อ 6.1 จำนวน 35 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 ml 4 ใบ นำไปเติมน้ำกลั่นมาละลายมาตรฐานกรดออกซาลิกเข้มข้น 30, 40, 50 ppm จากสารละลายมาตรฐานกรดออกซาลิก 100 ppm ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ไม่เติม 1 ใบ แล้วเติมกรด HCl เข้มข้น 6 M จำนวน 55 ml และเติมน้ำกลั่น 300 ml นำไปต้ม 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปทดลองแยกเป็นแต่ละบีกเกอร์ นำไปทดลองต่อไป

6.3 เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน

6.4 นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 ปีบ เติมน้ำกลั่นตัวอย่างมา 25 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่แล้วเติมน้ำกลั่น tungstophosphoric จำนวน 5 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วปีบ เติมน้ำกลั่นตัวอย่างมา 20 ml ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ ขนาด 50 ml

6.5 นำสารละลายมาปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 4 – 4.5 ด้วย NH_4OH แล้วเติมน้ำกลั่นแคลเซียม แอซีเตต บัฟเฟอร์ pH 4.5 จำนวน 5 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ค้างคืน

6.6 นำไปเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 1700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 นาที รินสารละลายส่วนบนออกให้เหลือแต่ตะกอนที่ด้านล่าง และนำสารละลายส่วนที่รินออกไปเซนติฟิวส์อีกครั้งและเอาตะกอนที่ได้มารวมกัน

6.7 นำตะกอนที่ได้ทั้งหมดมาละลายด้วยกรด H_2SO_4 เข้มข้น 1:9 จำนวน 5 ml

6.8 นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ml แล้วเติมน้ำกลั่นแลนทานัมออกไซด์ (La_2O_3) 5% w/v ปริมาตร 10 ml และปรับปริมาตรด้วยกรดไนตริก (HNO_3) 0.5% w/v จนครบ 50 ml

6.9 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ที่ความยาวคลื่น 422.8 nm. พร้อมกับสารมาตรฐานของธาตุแคลเซียมที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 2.0, 6.0, 12.0, 16.0, 20.0 ppm

6.10 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแคลเซียมและคำนวณหาปริมาณของออกซาเลต

7. การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (Detection Limit)

7.1 เตรียมสารละลาย sample blank นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นของแคลเซียมวัดซ้ำจำนวน 10 ครั้ง นำผลค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของแคลเซียม คำนวณหาความเข้มข้น และหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้น และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

7.2 นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า LOD

7.3 นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า LOQ

8. วิเคราะห์ข้อมูล

8.1 ค่าเฉลี่ย (mean)

ค่าเฉลี่ย คือ ค่าที่เกิดจากการนำเอาค่าของหน่วยข้อมูลทุกๆหน่วยที่เก็บไว้รวบรวมมาได้มาบวกเข้าด้วยกัน แล้วหารด้วยจำนวนหน่วยข้อมูลทั้งหมด โดยเขียนสมการได้ดังนี้

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ย

X_i คือ จำนวนครั้งของการทดลองทั้งหมด

n คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

8.2 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน คือรากที่สองของค่าเฉลี่ยของผลรวมระหว่าง ผลต่างกำลังสองของค่าตัวเลขแต่ละตัวในข้อมูลชุดหนึ่งๆ กับค่าเฉลี่ยของข้อมูลชุดนั้น โดยเขียนสมการได้ดังนี้

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

S.D. คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ย

X_i คือ จำนวนครั้งของการทดลองทั้งหมด

n คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

8.3 การหาร้อยละกลับคืน (% Recovery)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_{RS} - C_S}{C_R} \times 100$$

C_{SR} คือ ปริมาณสารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C_S คือ ปริมาณสารในตัวอย่าง

C_R คือ ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

8.4 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (Detection limit)

$$LOD = \bar{X} + 3 S.D$$

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ sample blank

S.D คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่วัดได้

$$LOQ = \bar{X} + 10 S.D$$

(กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ,2549. หน้า 72 , 75)

8.5 การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคลเซียมกับออกซาเลตในผักพื้นบ้าน
โดยใช้สถิติหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r)

r = สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของตัวอย่างระหว่าง X และ Y

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - (\sum X_i)(\sum Y_i) / n}{\sqrt{[\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2 / n][\sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2 / n]}}$$

(กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2549. หน้า 116)