

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การหาปริมาณคาเฟอีนในน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

Determination of Caffeine in Cola Soft Drinks by Spectrophotometer

โดย

นางสาวนินนาท โชติบริบูรณ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยทักษิณ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากงบประมาณรายได้
ของมหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ 2541

หนังสือนี้เป็นสมบัติของสำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยทักษิณ

หากถูกฉีกไปโดยไม่ขออนุญาต

ผู้พบเห็น กรุณาแจ้งเจ้าหน้าที่หอสมุดด้วย จักรพันธ์กุลสุระ

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี ดิฉันขอขอบคุณมหาวิทยาลัยทักษิณที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2541 ขอขอบคุณภาควิชาเคมีที่กรุณาให้ความสะดวกเกี่ยวกับสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ และขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นางสาวนินนาท์ โชติบริบูรณ์

เมษายน 2542

บทคัดย่อ

งานวิจัยฉบับนี้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคลฟเฟอีนในน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่าที่ง่าย สะดวก และแม่นยำ โดยนำสารตัวอย่างมาการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และวิเคราะห์โดยใช้ เครื่องยูวีวิทีเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าปริมาณแคลฟเฟอีนในน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่าที่นำมาวิเคราะห์มีปริมาณ 30.91-32.17 มิลลิกรัม / 325 มิลลิลิตร และ 39.52 มิลลิกรัม / 330 มิลลิลิตร

งานวิจัยฉบับนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.0475 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 0.43 %

นางสาวนินนาท์ โชติบริบูรณ์

Abstract

The aim of this research is to analyse the amount of caffeine in cola soft drinks. Samples were extracted with Chloroform and the caffeine in Cola Soft Drink were quantitated by Ultraviolet Spectrophotometer at 272 nanometre. The caffeine contained in Cola Soft Drink were found to be in the range 30.91-32.17 mg / 325 ml and 39.52 mg / 330 ml

This paper presents a simple, rapid and precise method. The standard deviation is 0.0475 and relative standard deviation 0.43 % respectively

Ninna Chotiboriboon

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญภาพประกอบ	6
สารบัญตาราง	7
บทที่ 1 บทนำ	8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	14
บทที่ 3 ผล และอภิปรายผล	17
บทที่ 4 สรุปผล	25
บรรณานุกรม	26

สารบัญภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	แสดงสูตร โครงสร้างของแคลเฟเฟอีน	8
2	แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น และแอมพลิจูดเบนซ์	19
3	แสดงกราฟมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแคลเฟเฟอีน ในช่วงความเข้มข้น 0 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร	21

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ปริมาณแคลฟเฟอีนและอนุพันธ์ของเมธิลแซนธินในเครื่องดื่ม	10
ตาราง 2 การเปรียบเทียบปริมาณแคลฟเฟอีนในช่วงปี 2534-2536 ในเครื่องดื่มผสมแคลฟเฟอีน	11
ตาราง 3 ปริมาณแคลฟเฟอีนที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ต่างๆ	11
ตาราง 4 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ	18
ตาราง 5 ค่าการดูดกลืนแสงของแคลฟเฟอีนที่ความเข้มข้นต่างๆ	20
ตาราง 6 ค่าการดูดกลืนแสงของแคลฟเฟอีนในตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า	22
ตาราง 7 ความเข้มข้นของแคลฟเฟอีน	22
ตาราง 8 ปริมาณแคลฟเฟอีนในตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า (มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร๑)	23
ตาราง 9 ปริมาณแคลฟเฟอีนที่วิเคราะห์พบในตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า	24

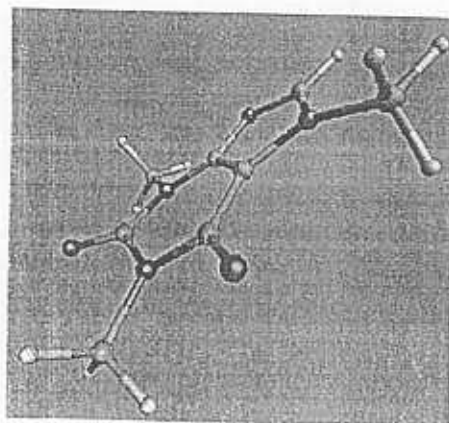
บทที่ 1

บทนำ

แคฟเฟอีน (caffeine) เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทอัลคาลอยด์ (alkaloid) ในกลุ่มเมทิลแซนทีน (methylxanthine) มีสูตรเคมี $C_8H_{10}N_4O_2$ (1,3,7-Trimethylxanthine) น้ำหนักโมเลกุล 194.19 ประกอบด้วยคาร์บอน 49.89% ไนโตรเจน 28.85 % ออกซิเจน 16.48 % และไฮโดรเจน 5.19 %

ข้อมูลทางเคมี และกายภาพของแคฟเฟอีน

1. สูตรโครงสร้าง



ภาพประกอบ 1 แสดงสูตรโครงสร้าง ของแคฟเฟอีน

2. ชื่อสามัญ : 3,7 Dihydro-1,3,7-trimethyl-1 H-purine-2,6-dione
3. ชื่อพ้อง ; anhydrous caffeine, coffeine, coffeinum, guaranine, methyltheobromine , methyltheophylline, theine, 1,3,7-trimethyl-2,6-dioxopurine- 1,3,7-trimethylxanthine
4. ลักษณะ เป็นผงสีขาวบริสุทธิ์ หรือผลึกสีขาวรูปเข็ม รวมกันเป็นปุยนุ่ม ไม่มีกลิ่นคั่ว

รสขม

5. จุดระเหิด ระเหิดโดยไม่สลายที่อุณหภูมิ 176 องศาเซลเซียส ภายใต้อากาศดันปกติ

6. จุดหลอมเหลว แคลเฟนีนที่ไม่มีน้ำผลึก มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 235-237.5 องศาเซลเซียส

7. Spectroscopy data

Ultraviolet spectra : aqueous acid, 273 nm. (λ = 504a, no alkaline shift)

Infrared spectra : principle peaks at wave number 1658

8. การละลาย ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิสูง และในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่นเอทานอล คลอโรฟอร์ม ไดเอทิลอีเทอร์ เบนซีน เมทิลอะซิเตด

ประวัติการค้นพบแคลเฟนีน

ในแถบกลุ่มประเทศอาหรับ มีคนเลี้ยงแกะสังเกตเห็นแกะของเขามีอาการกระโดดโลดเต้นคึกคะนองทั้งคืนโดยไม่ยอมหลับ หลังจากที่ถูกเมล็ดกาแฟเข้าไป

ต่อมาได้มีการศึกษาและค้นพบว่าแคลเฟนีนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง และกล้ามเนื้อหัวใจทำให้เกิดการตื่นตัว ช่วยการคลายตัวของกล้ามเนื้อ เพิ่มการขับถ่ายปัสสาวะ เป็นต้น ดังนั้นผู้ที่ดื่มเครื่องดื่มที่มีแคลเฟนีนจึงรู้สึกกระปี้กระเป่า หายอ่อนเพลีย แต่บางคนก็แพ้แคลเฟนีนเมื่อดื่มแล้วรู้สึกคลื่นไส้ ปวดศีรษะ ซึ่พจรเต้นเร็ว อาจก่อให้เกิดอันตรายถ้ารับประทานในปริมาณเกินกว่าขีดจำกัด

มีการผลิตเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของแคลเฟนีนเช่น ในประเทศอารเบียมีการผลิตกาแฟจากเมล็ดกาแฟ (*Coffe arabica*) ในประเทศจีนมีการผลิตชาจากใบชา (*Theosinensis*) ในทวีปแอฟริกาตะวันตกมีการผลิตเครื่องดื่มโคล่าจากเมล็ดโคล่า (*Cola acuminata*) ในประเทศเขตร้อนมีการผลิตช็อกโกแลตจากเมล็ดโกโก้ (*Theobroma*)

ปริมาณแคลเฟนีนในพืช และเครื่องดื่ม

ในใบชา เมล็ดกาแฟ เมล็ดโกโก้ และเมล็ดโคล่า มีปริมาณแคลเฟนีนแตกต่างกัน นอกจากแคลเฟนีน ยังพบว่ามีอนุพันธ์อื่นๆของเมทิลแซนธิน ได้แก่ ทีโอฟีลลีน (*theophylline*) เป็นต้น ปริมาณแคลเฟนีนที่พบในพืชต่างๆมีดังนี้

ใบชา	มีปริมาณแคลเฟนีน	2.4 - 4.1 %	โดยน้ำหนัก
เมล็ดกาแฟคั่ว	„	0.8 - 1.8 %	„
เมล็ดโคล่า	„	1.0 - 2.2 %	„
เมล็ดโกโก้	„	0.07 - 1.7 %	„

ปริมาณแคลเฟอีนที่ร่างกายได้รับขึ้นอยู่กับปริมาณ และความเข้มข้นที่ผู้ดื่มแต่ละคน บริโภค ได้มีผู้ทดลองวัดปริมาณแคลเฟอีน และอนุพันธ์ของเมทิลแซนธินอื่นๆ ในเครื่องดื่มด้วย ดังตาราง

ประเภทเครื่องดื่ม	มิลลิกรัม ต่อ ถ้วย (170 ลบ.ซม.)		
	แคลเฟอีน	ธีโอโบรมีน	ธีโอฟีลลีน
กาแฟชนิดเมล็ดกาแฟคั่วบด	85-150	-	-
กาแฟสำเร็จรูป	60	-	-
กาแฟที่สกัดเอาแคลเฟอีนสำเร็จรูป	3	-	-
ชาสำเร็จรูป	30	2	1
โกโก้	6-42	230-270	-
โคลา-โคล่า	17-20	-	-

ตาราง 1 ปริมาณแคลเฟอีนและอนุพันธ์ของเมทิลแซนธินในเครื่องดื่ม

คณะกรรมการอาหาร และยา ได้มีการประชุมมีความเห็นว่า การบริโภคแคลเฟอีนมากเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ จึงมีมติให้กำหนดมาตรการในการควบคุมเครื่องดื่มผสมแคลเฟอีนที่จำหน่ายภายในประเทศ คือมีแคลเฟอีนเป็นส่วนผสมได้ในปริมาณไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ และไม่ควรบริโภคเกินกว่า 100 มิลลิกรัมต่อวัน

จากมาตรการนี้เอง ผู้ผลิตเครื่องดื่มผสมแคลเฟอีน จึงต้องเติมแคลเฟอีนในปริมาณไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณแคลเฟอีนในปี 2535-2536 โดยสำนักคณะกรรมการอาหาร และยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เขตต่างๆ และบริษัทผู้ผลิตเป็นผู้ส่งวิเคราะห์ จำนวน 114 ตัวอย่าง พบว่า มีการเติมแคลเฟอีนเกิน 50 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิตร จำนวน 2 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 1.7 และมีการเติมเกิน 50 มิลลิกรัมต่อ 150 มิลลิกรัม จำนวน 20 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 17 หลังจากที่ออกมาตรการกำหนดแล้วพบว่า ปริมาณแคลเฟอีนเฉลี่ยอยู่ในมาตรฐานที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 3

ปี	ตัวอย่างทั้งหมด	ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย	ตัวอย่างทั้งหมด	ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย
พ.ศ.2534	20	46.20	85.82	66.70	25	40.00	99.51	71.68
พ.ศ.2535	33	36.30	82.66	52.39	36	48.45	93.00	59.79
พ.ศ.2536	39	45.00	54.00	48.17	54	42.60	62.72	49.80

ตาราง 2 การเปรียบเทียบปริมาณแคลเฟเฟอิน ในช่วงปี 2534-2536 ในเครื่องคั้บผสมแคลเฟเฟอิน

ในแต่ละวันนอกจากได้รับแคลเฟเฟอินจากเครื่องคั้บพวกรา กาแฟ โกโก้ และโคล่า แล้ว ยังอาจจะได้รับแคลเฟเฟอินจากอาหารที่ผสมด้วยกาแฟ หรือโกโก้ เป็นต้น ดังนั้นจึงมีผู้ศึกษาวิจัยปริมาณแคลเฟเฟอินในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังตาราง 3

ชนิดเครื่องคั้บ	ภาชนะบรรจุ	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณแคลเฟเฟอิน (มิลลิกรัมต่อ100มิลลิกรัม)		ปริมาณแคลเฟเฟอิน ที่ผู้บริโภครได้รับ/ หน่วยบรรจุ	หน่วยบรรจุ
			ต่ำสุด-สูงสุด	ค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.D)		
น้ำอัดลม -น้ำอัดลมโคล่า	ขวดแก้ว	10	6.46-10.60	7.44 $\pm$ 1.44	18.73-30.74	290
	กระป๋อง	6	7.40-10.54	8.85 $\pm$ 1.46	24.05-34.26	325
	อลูมิเนียม					
น้ำอัดลมโคล่าไอเอส	กระป๋อง	9	7.66-14.33	10.51 $\pm$ 2.07	24.90-47.29	330
	อลูมิเนียม					
เครื่องคั้บปรุงแต่ง	กล่อง UHT	2	3.20- 4.07	3.65	8.00-10.18	250
รสช็อกโกแลต						
นมถั่วเหลือง	กล่อง UHT	2	1.52-8.90	5.21	3.80-22.25	250
รสช็อกโกแลต						
นมปรุงแต่ง						
-รสช็อกโกแลต	กล่อง UHT	3	1.86- 3.20	2.94	4.65-8.00	250
-รสกาแฟ	กล่อง UHT		10.90-14.00	12.45	27.25-35.00	250

ตาราง 3 ปริมาณแคลเฟเฟอินที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารโดยเทคนิคสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
2. เพื่อศึกษาการหาปริมาณแคลเฟอีนในน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
3. เพื่อต้องการทราบว่าในท้องตลาด อ.เมือง จ.สงขลา ปริมาณแคลเฟอีนในน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่าอยู่ในมาตรฐานหรือไม่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ในการศึกษานี้ใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ดังนั้น

1. สามารถหาปริมาณแคลเฟอีนในน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
2. ทราบว่าในท้องตลาด อ.เมือง จ.สงขลา มีปริมาณแคลเฟอีนในน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่าอยู่ในมาตรฐานหรือไม่

การสังเคราะห์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

Power-Chestnut Method (AOAC, 1965) ได้ทำการสกัดสารแคลเฟอีนออกจากชา โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย หลังจากนั้นระเหยเอทานอล และละลายสารจากการสกัดโดยใช้ น้ำ หลังจากนั้นนำไปสกัดอีกครั้งโดยใช้คลอโรฟอร์ม และระเหยน้ำคลอโรฟอร์มให้แห้ง และละลายสารที่ได้จากการสกัดโดยใช้ น้ำ นำส่วนที่สกัดได้ทั้งสองครั้ง และหาปริมาณโดยเครื่องในตัวอย่าง น้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของเมลลิลโคลโดยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ไปคำนวณหาปริมาณแคลเฟอีนจากผลการ

$$\% \text{ แคลเฟอีนในตัวอย่าง} = \text{น้ำหนักของแคลเฟอีนที่ชั่งได้} \times (100/10)$$

Ron Lewis ได้ทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบของ Dietetic Soft Drinks โดยใช้การแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟี โดยมีสภาวะในการทดลองคือ

Column	MCH-5 N-Cap 150 x 4.6 mm Thermostatted to 30°C
Mobile Phase	90% 0.01M KH_2PO_4 pH 2.5 ; 10% Methanol to 60%
	Buffer : 40% Methanol

Flow Rate 1.3 ml/min

Detector UV-Vis Detector at 256 nm

จากการทดลองได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

Analytes in mg/354 ml	Diet Cola X	Diet Cola Y	Caffeine Free Diet Cola
Saccharin	69.1	62.2	69.9
Aspartame	30.4	28.5	32.0
Caffeine	43.2	33.8	0.0
Benzoic Acid	56.0	30.5	59.0

John J. Manura วิเคราะห์ปริมาณแอฟเฟอีนโดยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ใช้เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟีรุ่น HP 5973 MSD ซึ่งพบว่ามีความเร็วในการวิเคราะห์ เนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 1.5 นาที และสามารถตรวจพบแอฟเฟอีนในระดับ 5-10 นาโนกรัม

Edward G. Neeland สกัดสารแอฟเฟอีนออกจากใบชา โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เมื่อนำสารละลายไดคลอโรมีเทนไประเหยให้แห้งจะได้ผลึกสีขาวบริสุทธิ์ของแอฟเฟอีน

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

หาปริมาณแคลฟเฟอีนในน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในท้องตลาดเขตอำเภอเมือง จังหวัดสงขลา มีขั้นตอนการศึกษาค้นคว้าต่อไปนี้

1. สารเคมี อุปกรณ์ และ เครื่องมือในการวิจัย
2. การเก็บตัวอย่าง
3. วิธีการวิเคราะห์
4. วิธีคำนวณ

สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิจัย

สารเคมี

1. สารมาตรฐานแคลฟเฟอีน
2. แอมโมเนีย
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์
4. คลอโรฟอร์ม
5. กรดไฮโดรคลอริก

อุปกรณ์

1. ปิเปต
2. กรวยแยก
3. บีกเกอร์
4. ขวดวัดปริมาตร
5. ไมโครปิเปต

เครื่องมือ

1. เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
2. เครื่องมือหมุนระเหยแบบลดความดัน

3. เครื่องชั่ง
4. อ่างน้ำร้อน

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคลา ในเขตอำเภอเมืองจังหวัดสงขลา ได้ตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง

วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแคลเฟอีนความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร
 1. อบสารมาตรฐานแคลเฟอีนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
 2. ชั่งแคลเฟอีนที่อบแล้ว 0.1 กรัม โดยใช้เครื่องชั่งละเอียด ละลายในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
2. การศึกษาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุด
 1. นำสารละลายมาตรฐานแคลเฟอีนความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 2 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น สารละลายที่เตรียมได้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
 2. หาคความยาวคลื่นของสารละลายที่มีการดูดกลืนของสารแคลเฟอีนสูงสุด เมื่อใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยศึกษาความยาวคลื่นระหว่าง 270 -280 นาโนเมตร
 3. เลือกความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนสูงสุดเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์
3. การสร้างกราฟมาตรฐานแคลเฟอีน
 1. ปิเปิดสารละลายมาตรฐานแคลเฟอีนความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0 , 200 , 400 , 600 , 800 และ 1000 ไมโครลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่น
 2. นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลนค์
 3. นำค่าการวัดการดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาสร้างกราฟมาตรฐาน

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ปั่นตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร (V) ลงในกรวยแยก เติมสารละลายแอมโมเนีย 2 มิลลิลิตร ปรับสารละลายให้เป็นเบส ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์
2. สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้งๆ ละ 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำชั้นคลอโรฟอร์มที่ได้ไประเหยโดยใช้เครื่องมือหมุนระเหยแบบลดความดัน
3. ละลายสารที่ได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร นำสารละลายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
4. นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นแบล็ก
5. ทำการทดลอง 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

วิธีคำนวณ

นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้ อ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน (C) และคำนวณปริมาณแคลเฟอีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณแคลเฟอีน (mg / 100 ml)} = \frac{C \times 100}{V}$$

โดยที่ C = ค่าความเข้มข้นของแคลเฟอีนจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
 V = ปริมาณตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

บทที่ 3

ผล และการอภิปรายผล

การเตรียมสารละลายมาตรฐานแคลเฟอินความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการทดลองซึ่งสารมาตรฐานแคลเฟอิน 0.1 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารละลายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ดังนั้นสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานแคลเฟอินได้ดังนี้

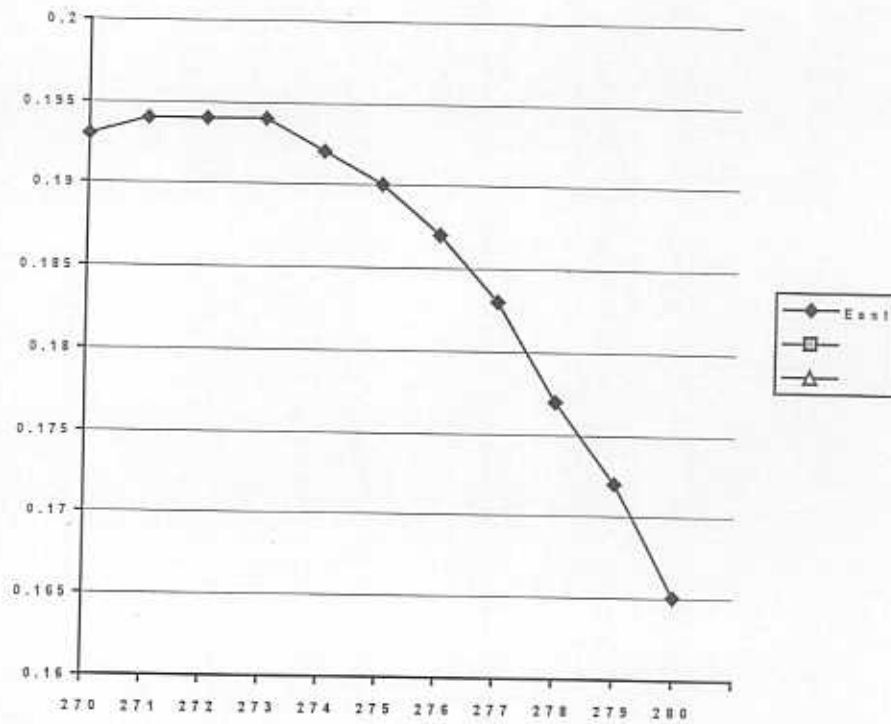
น้ำหนักแคลเฟอิน	0.1	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
∴ ความเข้มข้นแคลเฟอิน	0.1	กรัม/100 มิลลิลิตร
	100	มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร
	1000	มิลลิกรัม/ลิตร

การศึกษาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุด

การศึกษาการดูดกลืนแสงยูวีของแคลเฟอีนที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสัมพันธ์กับความยาวคลื่น แสดงดังตาราง 4 และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น และค่าการดูดกลืนแสงดังภาพประกอบ 2

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
270	0.193
271	0.194
272	0.194
273	0.194
274	0.192
275	0.190
276	0.187
277	0.183
278	0.177
279	0.172
280	0.165

ตาราง 4 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ



ภาพประกอบ 2 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น และค่าการดูดกลืนแสง

จากผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ พบว่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารแคปเฟอีนอยู่ในช่วง 271 - 273 นาโนเมตร แต่ในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

การสร้างกราฟมาตรฐานแคล์เฟอีน

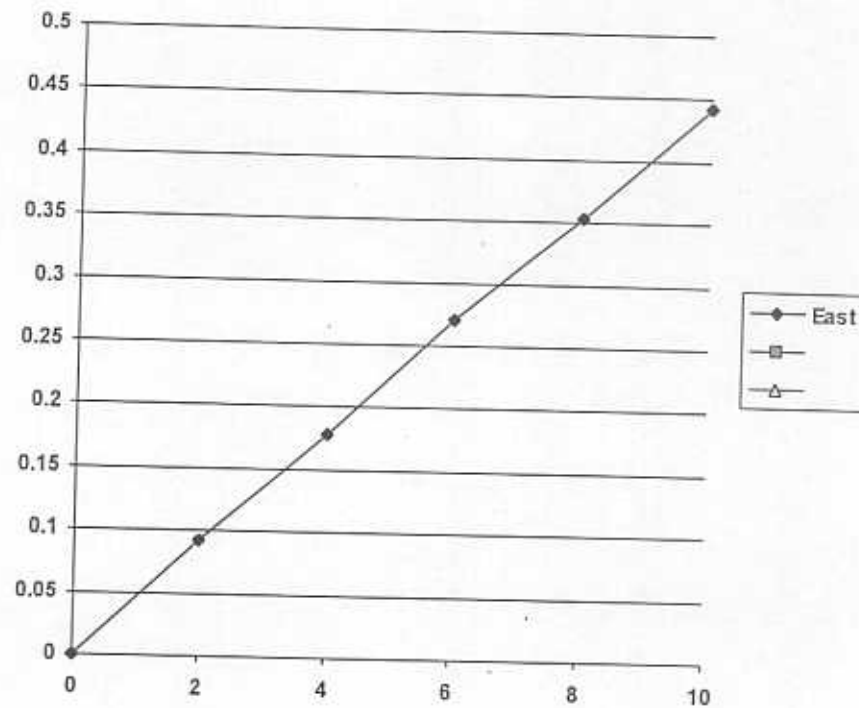
เตรียมกราฟมาตรฐานของแคล์เฟอีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ในช่วงความเข้มข้น 0 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แสดงดังตาราง 5 นำค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของแคล์เฟอีนมาสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ 3

ความเข้มข้นของแคล์เฟอีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง*
0	0.000
2	0.093
4	0.179
6	0.271
8	0.353
10	0.443

* วัดที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

ตาราง 5 ค่าการดูดกลืนแสงของแคล์เฟอีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

613.84
86593
2541
ถ.๒



ภาพประกอบ 3 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแคลเฟอินในช่วงความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากภาพประกอบ 3 พบว่าสามารถวิเคราะห์หาปริมาณแคลเฟอินได้กราฟเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1-10 ไมโครกรัมต่อลิตร

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า ในการทดลองแต่ละตัวอย่างทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยกำหนดตัวอย่าง คือ

ตัวอย่าง 1 กำหนดเป็น S_1

ตัวอย่าง 2 กำหนดเป็น S_2

ตัวอย่าง 3 กำหนดเป็น S_3

เมื่อนำตัวอย่างแต่ละชนิดมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ได้ค่าการดูดกลืนแสง ดังตาราง 6

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
S_1	0.214	0.215	0.214
S_2	0.233	0.231	0.231
S_3	0.271	0.272	0.268

* วัดที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

ตาราง 6 ค่าการดูดกลืนแสงของแคลเฟอีนในตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า

จากค่าการดูดกลืนแสงในตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า จากตาราง 6 สามารถหาความเข้มข้นของแคลเฟอีนโดยใช้ข้อมูลจากกราฟมาตรฐานจากภาพประกอบ 3 ได้ความเข้มข้นมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร ได้ข้อมูลดังตาราง 7

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ppm)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
S_1	4.7526	4.7605	4.7526
S_2	4.9750	4.9375	4.9375
S_3	6.0000	6.0250	5.9375

* วัดที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

ตาราง 7 ความเข้มข้นของแคลเฟอีน

จากตาราง 7 สามารถหาปริมาณแคลเฟอีนในตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า (มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร) โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณแคลเฟอีน (มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร)} = \frac{C \times 100}{V}$$

โดยที่ C = ค่าความเข้มข้นของแคลเฟอีนจากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อลิตร)

V = ปริมาณตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

จากสูตรสามารถหาปริมาณแคลเฟอีนในตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า ดัง

ตาราง 8

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น(มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
S ₁	9.5052	9.5210	9.5052
S ₂	9.9500	9.8750	9.8750
S ₃	12.0000	12.0500	11.8750

* วัดที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

ตาราง 8 ความเข้มข้นของแคลเฟอีนในตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า (มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร)

เมื่อนำผลตามตาราง 8 มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ได้ผลดังนี้

ตัวอย่างที่ 1

ค่าเฉลี่ย (x) = 9.5105 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) = 0.0091

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ = 0.09 %

ตัวอย่างที่ 2

ค่าเฉลี่ย (x) = 9.9000 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) = 0.0433

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ = 0.44 %

ตัวอย่างที่ 3

ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) = 11.9750 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) = 0.0901

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ = 0.75 %

จากข้อมูล ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของตัวอย่าง S_1 , S_2 และ S_3 สามารถสรุปได้ดังตาราง 9

ตัวอย่าง	ปริมาณแคลเฟเฟอิน ค่าเฉลี่ย (มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร)	ปริมาณแคลเฟเฟอินที่ผู้ บริโภคได้รับต่อหน่วย บรรจุ (มิลลิกรัม)	หน่วยบรรจุ (มิลลิลิตร)
1	9.5105	30.9091	325
2	9.9000	32.1750	325
3	11.9750	39.5175	330

ตาราง 9 ปริมาณแคลเฟเฟอินที่วิเคราะห์พบในตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่า

บทที่ 4

สรุปผล

จากการวิเคราะห์แคลเฟอีนในตัวอย่างน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่าในท้องตลาดอ.เมือง จ.สงขลา นำตัวอย่างแต่ละชนิดมา 100 มิลลิลิตร สกัดโดยใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตรจำนวน 3 ครั้ง และนำแคลเฟอีนที่สกัดมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร วิธีนี้สามารถศึกษาได้ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่ามีปริมาณแคลเฟอีนอยู่ในช่วง 9.51-11.97 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร แต่ถ้าพิจารณาปริมาณแคลเฟอีนต่อหนึ่งหน่วยบรรจุพบอยู่ในช่วง 30.91 - 32.17 มิลลิกรัมต่อ 325 มิลลิลิตร 39.52 มิลลิกรัมต่อ 330 มิลลิลิตร โดยที่ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีปริมาณแคลเฟอีนไม่เกินขีดจำกัดที่กำหนดไว้เป็นมาตรฐานที่เกิดอันตรายแก่ร่างกาย

จากการศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณแคลเฟอีนในน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของเมล็ดโคล่าโดยวิธีการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และวิเคราะห์หาปริมาณด้วย เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าทำได้สะดวกรวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.0475 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.43 %

การวิจัยครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลหนึ่งสำหรับเป็นแนวทางการควบคุมการคั้นน้ำอัดลมที่มีส่วนผสมของโคล่าเพื่อมิให้เกิดอันตราย ซึ่งมีการกำหนดปริมาณแคลเฟอีนที่รับประทานไม่ควรเกิน 200 มิลลิกรัม หรือคั้นเครื่องดื่มผสมแคลเฟอีนประมาณ 4 ขวด

บรรณานุกรม

- นิธิยา รัตนปนนท์, “วารสารวิทยาศาสตร์”, 34(11), 355-358 (2523).
- บุพา คันทปัญญารัตน์. “หนังสือคู่มือการอบรมเชิงปฏิบัติการ”. กองวิเคราะห์อาหาร ศูนย์
วิทยาศาสตร์การแพทย์, 109-117 (2537)
- วนิดา ศรีเดชะ, “วารสารวิทยาศาสตร์”, 34(10), 829-831 (2523).
- วิชัย ดันไพจิตร, “วารสารไอส์หมอ”, 3(11), 76-77 (2523).
- สุนัย พรหมศิริวานิช, “วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต”, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่, 2517.
- A.O.A.C. Power-Chestnut method, 10 th. Ed 1965. 14.019.
- Edward G Neeland. wysiwyg://6/http://oksw01.oganagan.bc.ca/chem/faculty/neeland2.html
- John J. Manura. <http://www.sisweb.com/reference/appnote/app-48.htm>
- Ron Lewis. <http://www.verien.com/chrma/hplc/appnotes/c23.html>