การวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ด้วยระบบโฟลอินเจคชันคัลเลอริเมตริกโดยใช้รีเอเจนต์จากธรรมชาติ

Flow Injection Colorimetric Determination of Sulfite with Natural Reagent Extract

ธีรารัตน์ ปันอ่วม และสุภาดา คนยัง*

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

จรูญ จักร์มุณี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตำบลสุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

Teerarat Pun-uam and Supada Khonyoung*

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Jaroon Jakmunee

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

บทคัดย่อ

ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน ส่วนหนึ่งมีผลมาจากของเสียจากสารเคมีในห้องปฏิบัติการ จึงส่งผลให้งานวิจัยด้านเคมีวิเคราะห์ในปัจจุบัน ได้ให้ความสำคัญกับการพัฒนาขั้นตอนของกระบวนการวิเคราะห์ ให้เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น โดยการลดหรือหลีกเลี่ยงการใช้สารที่ก่อให้เกิดอันตรายและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงได้ประยุกต์ใช้เทคนิคโฟลอินเจคชันที่ใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เป็นรีเอเจนต์จากธรรมชาติในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ ซึ่งเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมีที่อันตราย ทดลองโดยสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช 3 ได้สารสกัดสีแดง เมื่อเกิดปฏิกิริยากับซัลไฟต์จะเกิดการจางลงของสีของสารสกัด และตรวจวัดสีที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยเครื่องตรวจวัดสีแบบคัลลอริมิเตอร์ที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ สามารถสร้างกราฟมาตรฐานได้ในช่วง 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่างเครื่องดื่มได้

คำสำคัญ : ซัลไฟต์; โฟลอินเจคชัน; รีเอเจนต์จากสารสกัดธรรมชาติ

Abstract

The use of chemicals and waste generation from laboratory is one way to cause environmental pollution. As a result, the research in analytical chemistry is concerns to make

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** skhonyoung@gmail.com

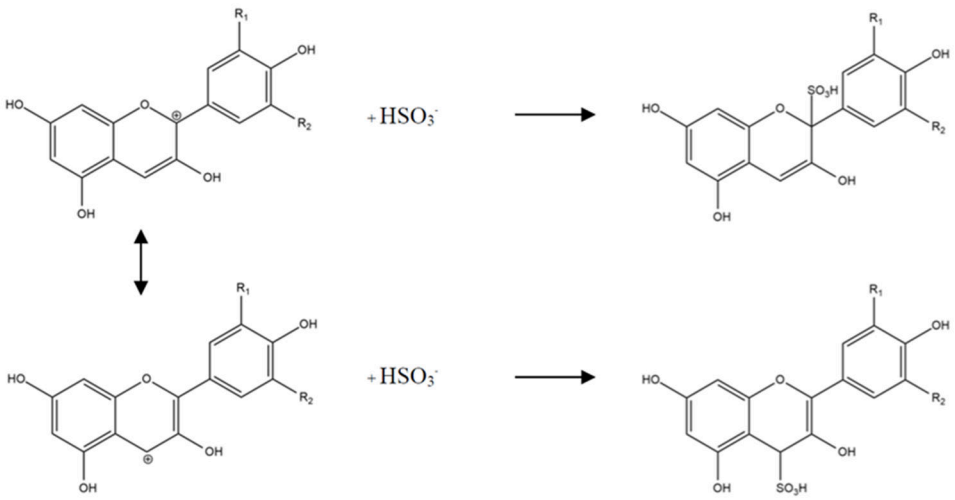
laboratory practices to be more environmentally friendly, such as reduction or elimination of the use of hazardous chemicals, which are toxic to the environment. This work applied the flow injection analysis using roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract as a natural reagent for determination of sulfite. This method reduced the use of synthetic reagent. The dried roselle extract was prepared in acetate buffer (pH 3) and the red color was obtained. When reacted with sulfite, the color of the extract was decreased. The decreasing of color intensity could be measured by a laboratory made colorimeter. The calibration graph obtained was linear over the range of 5-100 mg/L. The method can be applied to determine the sulfite content in beverages samples.

Keywords: sulfite; flow injection; natural reagent

1. บทนำ

สารในกลุ่มซัลไฟต์ ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โซเดียมซัลไฟต์ โซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟต์ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ แคลเซียมซัลไฟต์ เป็นต้น ได้รับอนุญาตให้เจือปนในอาหารได้ โดยการใช้สารกลุ่มซัลไฟต์ในอาหารมีประโยชน์ คือ ใช้เป็นสารกันเสีย ช่วยยับยั้งการเจริญของยีสต์ รา และแบคทีเรีย เช่น ใช้ฆ่าจุลินทรีย์ในการทำไวน์และเบียร์ ช่วยในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสีและรสชาติของอาหารในผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน เช่น อาหารกระป๋อง และอาหารแช่แข็ง [1] ถึงแม้ว่าสารกลุ่มซัลไฟต์จะได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ในผลิตภัณฑ์อาหาร แต่ก็สามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ เช่น ทำให้เกิดอาการหายใจติดขัด หอบหืด ลมพิษ และเกิดความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร [2] ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้กำหนดปริมาณซัลไฟต์ที่ได้รับต่อคนต่อวันต้องไม่เกิน 0.7 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ซึ่งปริมาณของซัลไฟต์ที่อนุญาตให้มีได้ในอาหารแต่ละชนิดมีปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น กุ้งและปลาหมึก 50-300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เนื้อสัตว์ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขนมปังอบกรอบ 30-50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พืชผัก 50-2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลิตภัณฑ์กลุ่มเครื่องดื่ม 20-2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร [3] ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงปริมาณของซัลไฟต์ที่มีในอาหารและเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ ว่าเป็นไปตามข้อกำหนดที่ระบุไว้หรือไม่ จึงมีการกำหนดวิธีมาตรฐานที่เป็นสากลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ไว้หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ Monier-Williams method, ion exclusion chromatography, ripper method และโฟลอินเจคชัน ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงรายละเอียดของการวิเคราะห์แต่ละวิธี พบว่ายังมีข้อจำกัดในหลายด้าน เช่น วิธี Monier-Williams มีขั้นตอนการรีฟลักซ์เพื่อสกัดซัลไฟต์ออกจากตัวอย่างเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างนานจึงไม่เหมาะกับงานวิเคราะห์ประจำวันที่มีจำนวนตัวอย่างมาก [4] ส่วนเทคนิค ion exclusion chromatography เป็นเทคนิคที่มีความไวในการตรวจวัดสูงสามารถตรวจวัดสารในปริมาณต่ำได้ แต่เนื่องจากเครื่องมือนั้นมีราคาสูง จึงทำให้ห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปอาจไม่มีเครื่องมือชนิดนี้อยู่ [5] วิธี ripper เป็นวิธีการไทเทรตโดยใช้สารมาตรฐานไอโอดีน ซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ง่ายและรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดในเรื่องของความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ เนื่องจากความเสถียรของไอโอดีนและการรบกวนของกรดแอสคอร์บิกที่เป็นองค์ประกอบของตัวอย่างบางชนิด อีกทั้งการสังเกตสีของจุดยุตินั้นทำได้ยาก หากตัวอย่างที่วิเคราะห์นั้นมีสี [6]

จากข้อจำกัดในข้างต้น จึงมีการนำเทคนิคโฟลอินเจค-ชันซึ่งเป็นเทคนิคที่มีข้อดีในด้านความเป็นอัตโนมัติ ช่วยทำให้สามารถลดขั้นตอน ระยะเวลาในการวิเคราะห์ และใช้สารเคมีในปริมาณที่น้อยลงมาพัฒนาขึ้น เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ และกำหนดให้เป็นหนึ่งในวิธีมาตรฐานที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน [7,8] แต่ในวิธีนี้ยังคงใช้ malachite green เป็นรีเอเจนต์ซึ่งเป็นสารเคมีที่เป็นอันตรายและเป็นสารก่อมะเร็ง [9] จากข้อดีของเทคนิคโฟลอินเจคชันจึงทำให้ในงานวิจัยนี้เกิดความสนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโฟลอินเจคชันร่วมกับการใช้รีเอเจนต์ชนิดอื่นที่ไม่เป็นอันตราย ในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ต่อไป เพื่อให้สอดคล้องตามแนวคิดที่เรียกว่า green analytical chemistry (GAC) ที่เสนอแนะแนวทางในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้ลดขั้นตอนและระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ลง ลดปริมาณการใช้สารเคมี และของเสียที่เกิดขึ้น เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ค่าใช้จ่ายในการจัดการและกำจัดของเสีย เพื่อลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม [10] ซึ่งจากแนวคิดเรื่อง GAC นี้ ผู้วิจัยได้มีแนวคิดที่จะนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้เป็นรีเอเจนต์แทนสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูลในเบื้องต้นพบว่าซัลไฟต์มีความสามารถในการฟอกจางสีของแอน-โทไซยานินได้ โดยเมื่อแอนโทไซนานินอยู่ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3 โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่มีการคอนจูเกตกันของพันธะคู่ ทำให้อิเล็กตรอนสามารถเกิดการเคลื่อนที่ได้ (delocalized electron) จึงมีสมบัติในการดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิลและทำให้เห็นสารนั้นเป็นสีแดง เมื่อมีซัลไฟต์เข้ามาทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง C-2 และ C-4 จะทำให้อิเล็กตรอนไม่สามารถเกิดการเคลื่อนที่ได้ ส่งผลให้การดูดกลืนแสงนั้นลดลง จึงทำให้เกิดการจางลงของสี (ดังแสดงในรูปที่ 1) [11,12] โดยได้มีรายงานของ Soares และคณะ ในการใช้แอนโทไซยานินที่สกัดจาก *Tibouchina granulosa* และ *Rhododendron simsii* เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ ซัลไฟต์ในตัวอย่างไวน์ขาวด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี [13] อย่างไรก็ตามในงานวิจัยดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ได้ในช่วงความเข้มข้นที่ค่อนข้างแคบ กล่าวคือ 2-10 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น อีกทั้งยังเป็นการวิเคราะห์ที่ทำในระบบทีละครั้ง (batch system) ซึ่งถ้านำระบบโฟลอินเจคชันมาใช้ในการทดลองจะทำให้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างเร็วขึ้น



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาระหว่างแอนโทไซยานินกับซัลไฟต์ [11,12]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงได้นำเสนอการใช้แอนโทไซยานินที่สกัดจากกระเจี๊ยบแดงสำหรับเป็นรีเอเจนต์จากธรรมชาติในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ ซึ่งกระเจี๊ยบแดงเป็นพืชที่มีปริมาณของแอนโทไซยานินอยู่สูง (1,700-2,500 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) [14] อีกทั้งยังเป็นพืชที่หาได้ง่ายในท้องตลาดทั่วไปในประเทศไทย เมื่อนำมาใช้ร่วมกับระบบโฟลอินเจคชันซึ่งเป็นระบบที่มีความเป็นอัตโนมัติ ช่วยลดขั้นตอนในการวิเคราะห์ และใช้ปริมาณสารเคมีที่น้อยกว่าการวิเคราะห์ในระบบทีละครั้ง นอกจากนี้การตรวจวัดจะใช้เครื่องตรวจวัดสีแบบคัลลอริมิเตอร์ที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ จึงจะทำให้ระบบที่พัฒนาขึ้นนั้นใช้ต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ ลดปริมาณการใช้สารเคมีที่อันตราย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมสารละลาย

2.1.1การเตรียมสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ (SO_3^{2-})

เตรียมสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งโซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟต์ ($NaHSO_3$) 0.1301 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.50, 1.00, 3.00, 5.00, 7.00 และ 10.00 มิลลิลิตร ลงไปในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ ความเข้มข้น 5, 10, 30, 50, 70 และ 100มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับซึ่งสารละลายมาตรฐานนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกวัน

2.1.2 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 3 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เตรียมโดยการผสมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 982.3 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 17.7 มิลลิลิตร

2.1.2.1 สารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ตวงสารละลาย glacial acetic acid (CH_3COOH) ปริมาตร 5.7 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับเป็นปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2.1.2.2 สารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ชั่งโซเดียมอะซิเตต ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) หนัก 1.36 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนและปรับเป็นปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

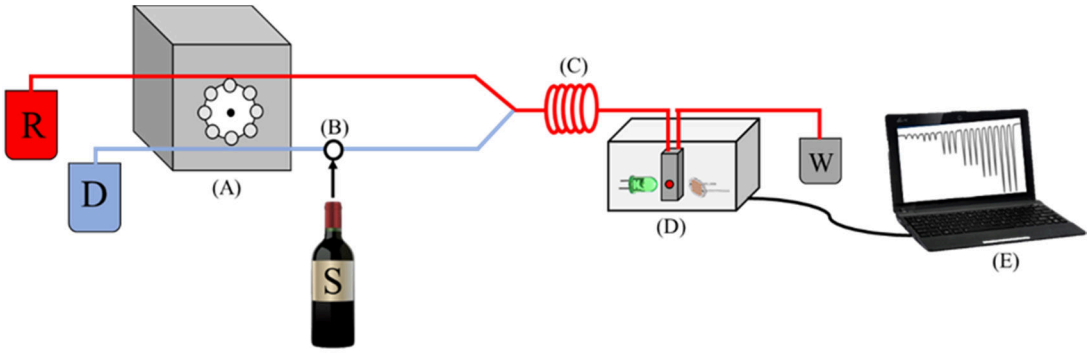
2.1.3 การเตรียมรีเอเจนต์ธรรมชาติจากกระเจี๊ยบแดงแห้ง ความเข้มข้น 5.0 %w/v

ชั่งดอกกระเจี๊ยบแดงแห้งหนัก 5 กรัม ใส่ลงในเครื่องปั่น เติมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 3 ลงไป 100 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียด นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง และนำไป centrifuge ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายส่วนที่ใสไปใช้ในการทดลอง ซึ่งรีเอเจนต์นี้ต้องเตรียมใหม่ทุกวัน

2.2 การทำงานของระบบโฟลอินเจคชัน

ระบบโฟลอินเจคชันที่ใช้ทดลองได้แสดงไว้ดังรูปที่ 2 ซึ่งระบบจะประกอบไปด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังนี้ ปั๊มเพอร์ริสตาลติก (peristatic pump) ทำหน้าที่ในการดูดผลักสารละลายเข้าสู่ระบบ วาล์วแบบ six-port สำหรับฉีดสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่างเข้าสู่

ระบบ เครื่องตรวจวัดสีแบบคัลลอริมิเตอร์ที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งใช้หลอดไฟ LED (light emitting diode) สีเขียวเป็นแหล่งกำเนิดแสง และมี LDR (light dependent resistor) เป็นเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดแสง และภายในเครื่องจะมี flow through cell (path length1 เซนติเมตร) สำหรับบรรจุสารละลายที่จะถูกตรวจวัด พร้อมทั้ง คอมพิวเตอร์สำหรับประมวลผลและแสดงผลของการวิเคราะห์



รูปที่ 2 ระบบโฟลอินเจคชัน [(A) = peristaltic pump, (B) = six-port valve, (C) = mixing coil, (D) = laboratory-made LED-LDR colorimeter, (E) = computer, R = dried roselle extract, D = deionized water, S = standard/sample, W = waste]

การทำงานของระบบจะเริ่มจากสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่างถูกดูดเข้าไปในระบบผ่านกระแสของตัวพา คือ น้ำปราศจากไอออน จากนั้นสารมาตรฐานจะทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ ได้แก่ สารสกัดกระเจี๊ยบแดงภายในขดท่อ (mixing coil) และไหลเข้าสู่ flow through cell เพื่อตรวจวัดการเปลี่ยน แปลงสีของสารละลาย โดยสัญญาณที่ได้จะแสดงออกมาในรูปของ FI-gram ผ่านคอมพิวเตอร์ ซึ่งจะพบว่าค่าความสูงของสัญญาณที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของปริมาณซัลไฟต์ สร้างกราฟมาตรฐานโดยการพล็อตระหว่างความสูงของพีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานซัลไฟต์

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การศึกษาชนิดของกระเจี๊ยบแดง

เบื้องต้น ได้ทดลองศึกษาชนิดของกระเจี๊ยบแดงสำหรับนำมาเตรียมเป็นรีเอเจนต์ โดยใช้ดอกกระเจี๊ยบแดงแบบสดและแบบแห้งที่สกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน นำสารสกัดที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร พบว่าสเปกตรัมที่ได้ไม่แตกต่างกัน และความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน คือ 518 นาโนเมตร จากผลการทดลองที่ได้ พบว่ารีเอเจนต์ที่เตรียมจากกระเจี๊ยบแดงแบบสดและแบบแห้งให้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงแบบแห้งเป็นรีเอเจนต์ เนื่องจากกระเจี๊ยบแดงแบบแห้งมีอายุในการเก็บรักษาที่ยาวนานกว่า จึงสะดวกแก่การนำมาใช้สำหรับทดลอง โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาฟอกจางสีของแอนโทไซยานินด้วยซัลไฟต์คือ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 3 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3 ในการเตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งแทนการสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับค่าพีเอชด้วยกรดให้เท่ากับ 3 เนื่องจากสารละลาย

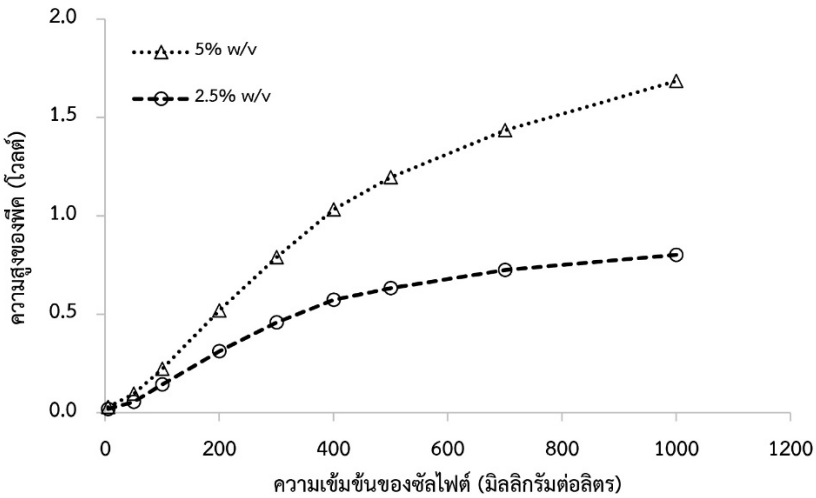
บัฟเฟอร์มีความสามารถในการต้านทานการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชได้ ดังนั้นจึงทำให้การเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดเกิดจากปฏิกิริยาการฟอกจางสีด้วยซัลไฟต์เท่านั้น ไม่ได้เกิดจากการเจือจางลงของสารสกัดเมื่อผสมกับสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง อีกทั้งเมื่อนำไปใช้วิเคราะห์กับตัวอย่างจริง ซึ่งมีค่าพีเอชต่าง ๆ กันก็จะสามารถช่วยควบคุมค่าพีเอชของสารสกัดไม่ให้เปลี่ยนแปลงไปและส่งผลต่อความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองได้

3.2 การศึกษาพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยระบบโฟลอินเจคชัน

การศึกษาอิทธิพลของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในระบบโฟลอินเจคชันนั้น เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบให้ดียิ่งขึ้น เช่น การเพิ่มความไวในการตรวจวัด (sensitivity) การลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ และลดปริมาณการใช้สารเคมี โดยพารามิเตอร์ที่ได้ศึกษามีดังต่อไปนี้

3.2.1 ความเข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง

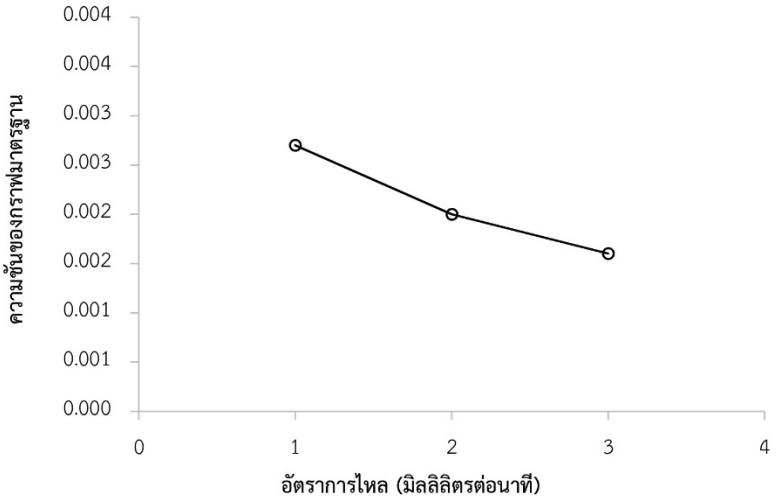
ความเข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงจะสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในสารสกัด ซึ่งในการทดลองนี้จะเตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงดังวิธีการในข้อ 2.1.3 ให้มีความเข้มข้น 2.5 และ 5.0 %w/v แล้วจึงนำมาใช้เป็นรีเอเจนต์ โดยจะใช้สารมาตรฐานซัลไฟต์ในช่วงความเข้มข้น 5-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพิจารณาจากค่าความชันของกราฟมาตรฐาน ซึ่งบอกถึงความไวในการตรวจวัด ซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5 %w/v ให้ค่าความไวในการตรวจวัดที่ต่ำกว่าความเข้มข้นของสารสกัด 5.0 %w/v เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดต่ำจะมีปริมาณของแอนโทไซยานินน้อย จึงไม่เพียงพอในการทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นสูง ๆ ทำให้กราฟมาตรฐานมีการเบี่ยงเบนจากความเป็นเส้นตรง และจากกราฟมาตรฐานจะเห็นได้ว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถใช้เป็นช่วงความเข้มข้นสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ได้ ดังนั้นจึงทดลองศึกษาพารามิเตอร์ต่อไปโดยใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 5.0 %w/v และสารมาตรฐานซัลไฟต์ในช่วงความเข้มข้น 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร



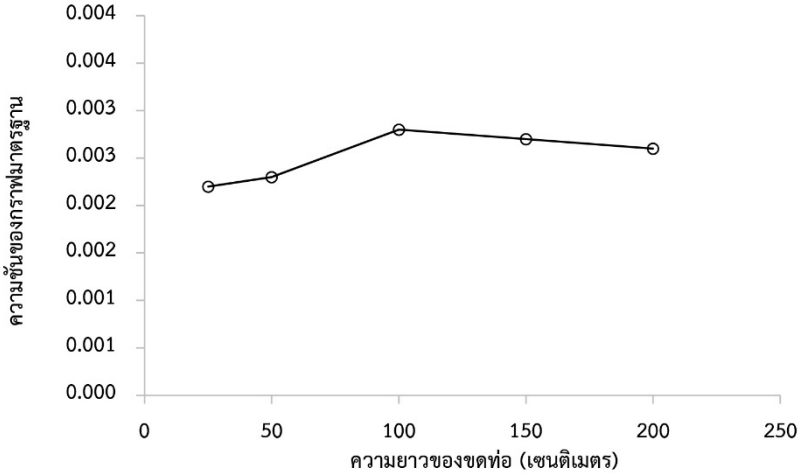
รูปที่ 3 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา

3.2.2 อัตราการไหลของสารละลายในระบบ

อัตราการไหลของสารละลายในระบบมีผลต่อระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา และปริมาณการใช้สารเคมี ในการทดลองจึงได้ศึกษาอัตราการไหลที่ 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้นจะทำให้สัญญาณความสูงของพีคและค่าความไวในการตรวจวัดลดลง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4 เนื่องจากเมื่อสารละลายในระบบมีอัตราการไหลเร็วขึ้นทำให้สารมาตรฐานกับรีเอเจนต์ ยังเกิดปฏิกิริยากันได้ไม่ดี นอกจากนี้อัตราการไหลที่เร็วยังทำให้เกิดพีคสัญญาณเล็ก ๆ ขณะสับตำแหน่งวาล์วเพื่อฉีดสารมาตรฐานเข้าสู่ระบบ เพราะเกิดแรงดันขึ้นในระบบ ดังนั้นจึงเลือกอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากเป็นสภาวะที่ให้ค่าความไวในการตรวจวัดที่สูงที่สุด และการเลือกใช้อัตราการไหลที่ช้ายังเป็นการลดการใช้สารเคมี และลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นอีกด้วย



รูปที่ 4 การศึกษาอัตราการไหลของสารละลายในระบบที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา



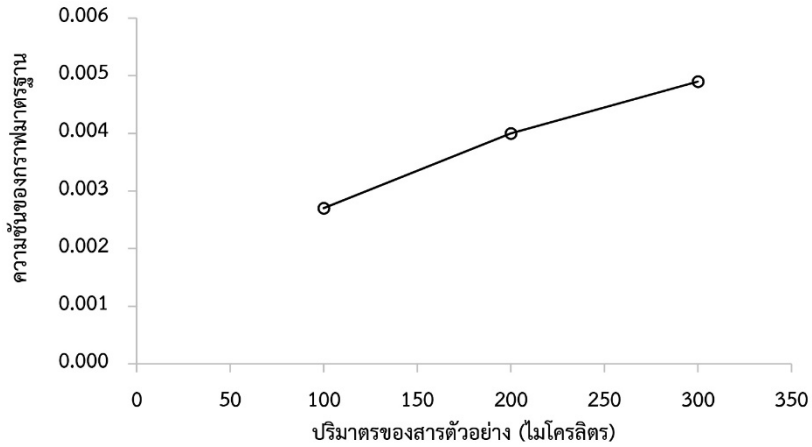
รูปที่ 5 การศึกษาความยาวของขดท่อที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา

3.2.3 ความยาวของขดท่อ

ขดท่อทำหน้าที่ช่วยในการผสมระหว่างสารมาตรฐานกับรีเอเจนต์ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ดี ในการทดลองได้ศึกษาการใช้ขดท่อความยาว 25-200 เซนติเมตร ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5 จากผลการทดลอง พบว่าค่าความไวในการตรวจวัดเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ขดท่อที่ยาวขึ้น และจะเริ่มลดลงเมื่อความยาวของขดท่อมากกว่า 100 เซนติเมตร การเพิ่มความยาวของขดท่อจะช่วยให้เกิดการผสมได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ความยาวของขดท่อที่ยาวเกินไปก็จะทำให้เกิดการแพร่ (dispersion) ของท่อนสารส่งผลให้ความสูงของพีคต่ำและฐานพีคกว้าง นอกจากนี้การใช้ขดท่อที่ยาวยังทำให้ระยะเวลาในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจึงเลือกใช้ขดท่อที่ความยาว 100 เซนติเมตร เนื่องจากให้ค่าความไวในการตรวจวัดที่สูงที่สุด

3.2.4 ปริมาตรของสารตัวอย่าง

ศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบที่ปริมาตร 100, 200, 300 ไมโครลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 6 จากผลการการทดลอง พบว่าเมื่อปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบมากขึ้นจะทำให้ความสูงของพีคเพิ่มขึ้น และให้ค่าความไวในการตรวจวัดเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีปริมาณตัวอย่างที่เข้าไปเกิดปฏิกิริยาในระบบมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรของสารตัวอย่างเป็น 300 ไมโครลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐานซัลไฟต์สูง ๆ จะเกิดการเบี่ยงเบนจากการเป็นเส้นตรง ซึ่งการใช้ปริมาตรของสารตัวอย่างที่มากเกินไปจะทำให้ท่อนของสารตัวอย่างนั้นมีความยาวเกิดการผสมกับรีเอเจนต์ไม่ค่อยดี นอกจากนี้การใช้ปริมาตรตัวอย่างที่มากจะทำให้ได้จำนวนตัวอย่างในการวิเคราะห์ต่อชั่วโมงที่น้อยลง อีกทั้งยังต้องใช้ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่มากขึ้น ดังนั้นจึงเลือกที่จะใช้ปริมาตรสารตัวอย่างที่ 200 ไมโครลิตร เนื่องจากให้ค่าความไวในการตรวจวัดที่สูง และมีค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี



รูปที่ 6 การศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่างที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา

3.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน

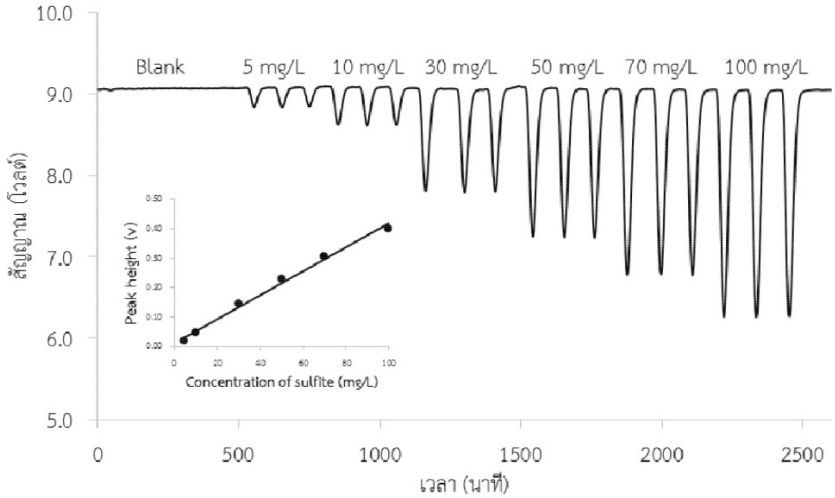
การศึกษาพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในหัวข้อ 3.2.1-3.2.4 เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ด้วยระบบโฟลอินเจคชัน สรุปได้ดังในตารางที่ 1 ค่าสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงในรูปของ FI-gram และการสร้างกราฟมาตรฐานทำได้โดยพล็อตระหว่างความสูงของพีค (แกน Y) และความเข้มข้นของสารมาตรฐานซัลไฟต์

(แกน X) ดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่าได้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 5-100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีสมการเส้นตรงของกราฟ คือ $Y = 0.004X + 0.013$; $R^2 = 0.9924$ และได้ขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) จากการคำนวณสัญญาณที่มีค่าเป็น 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของสัญญาณแบลงค์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.95 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษาความเที่ยง (precision) โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 11 ครั้ง พบว่าได้ %RSD เท่ากับ 1.81 นอกจากนี้มีความถี่ในการวิเคราะห์เท่ากับ 18 ครั้งต่อชั่วโมง หรือสามารถวิเคราะห์ได้ 6 ตัวอย่างต่อชั่วโมง โดยใช้ปริมาณสารเคมี 9.5 มิลลิลิตรต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ซัลไฟต์ด้วยระบบโฟลอินเจคชันในงานวิจัยนี้

ตัวแปร	สภาวะที่เหมาะสม
ความเข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง	5.0 %w/v
อัตราการไหลของสารละลายในระบบ	1 มิลลิลิตรต่อนาที
ความยาวของขดท่อ	100 เซนติเมตร
ปริมาตรของสารตัวอย่าง	200 ไมโครลิตร



รูปที่ 7 FI-gram ของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม

ระบบโฟลอินเจคชันที่พัฒนาขึ้นถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่างเครื่องดื่ม โดยซื้อตัวอย่างประเภทเครื่องดื่มได้แก่ น้ำผลไม้ สปาร์คกลิ้งไวน์ และไวน์ขาวที่มีขายในห้างสรรพสินค้าทั่วไปในจังหวัดปทุมธานี จำนวน 5 ยี่ห้อ นำเครื่องดื่มแต่ละตัวอย่างเทใส่บีกเกอร์ประมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปไล่ฟองอากาศ (degas) โดยใช้ sonicator นานประมาณ 30 นาที แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยระบบโฟลอินเจคชันเพื่อเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น ได้เทียบผลกับวิธีที่เป็นที่ยอมรับ คือ การไทเทรตด้วยวิธี Ripper ได้ผลดังตารางที่ 2 พบว่าความเข้มข้นของซัลไฟต์ในตัวอย่างน้ำผลไม้และสปาร์คกลิ้งไวน์มีปริมาณที่ต่ำทำให้ไม่สามารถตรวจวัดด้วยเทคนิคโฟลอินเจคชันได้ มีเพียงตัวอย่างไวน์ขาวจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่สามารถ

วิเคราะห์ได้ จึงนำผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองวิธีนี้ไปประเมินทางสถิติแบบ paired t-test พบว่าค่าที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (t_{stat}3.75 < t_{crit} 12.71)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ในเครื่องดื่มไวน์โดยวิธีโฟลอินเจคชันและวิธี Ripper

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของซัลไฟต์ (mg/L)	
	วิธีโฟลอินเจคชัน	วิธี Ripper
น้ำผลไม้ 1	N.D.	1.32±0.16
น้ำผลไม้ 2	N.D.	1.18±0.28
สปาร์คกลิ้งไวน์ 1	N.D.	2.18±0.00
ไวน์ขาว1	15.71±0.80	16.09±1.07
ไวน์ขาว2	25.53±0.66	25.75±0.27

N.D. หมายถึง ไม่สามารถตรวจวัดได้

4. สรุป

สารสกัดกระเจี๊ยบแดงเป็นรีเอเจนต์จากธรรมชาติ สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ได้ ซึ่งเป็นการใช้สารธรรมชาติเพื่อทดแทนสารเคมีที่อันตราย เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ร่วมกับระบบโฟลอินเจคชัน ซึ่งเป็นระบบที่มีความเป็นอัตโนมัติ ช่วยทำให้สามารถลดขั้นตอน และระยะเวลาในการวิเคราะห์ นอกจากนี้เครื่องตรวจวัดสีแบบคัลลอริมิเตอร์ที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ สามารถใช้ในการตรวจวัดปริมาณซัลไฟต์ได้และให้ความไวในการตรวจวัดที่ดี ระบบที่พัฒนาขึ้นนั้นใช้งานง่าย ใช้ต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ ช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีที่อันตราย รวมถึงของเสียที่จะเกิดขึ้น และสามารถนำไปใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่างเครื่องดื่มได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ ทน 35/2558 และการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. รายการอ้างอิง

[1] World Health Organization, 2009, Sulfites: Assessment of dietary exposure, Safety evaluation of certain food additives: Sixty-ninth meeting of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), pp. 221-259, WHO Food Additives Series 60.

[2] Vally, H., Misso, N. L. A. and Madan, V., 2009, Clinical effects of sulphite additives, Clin. Exp. Allergy 39: 1643-1651.

[3] Claudia, R. C. and Francisco, J. C, 2009, Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: A review, Food Chem. 112: 487-493.

[4] Hillery, B. R., Elkins, E. R., Warner, C. R., Daniels, D., Fazio, T. and Balazs, P., 1989, Optimized Monier- Williams method for determination of sulfites in foods: Collaborative study, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72: 470-475.

[5] Kim, H.J., 1990, Determination of sulfite in foods and beverages by ion exclusion chromatography with electrochemical

detection, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73: 216-222.

[6] Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S., 1999, Sulfur Dioxide and Ascorbic Acid, pp. 178- 191, In Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S. (Eds.), Wine Analysis and Production, Springer, Boston.

[7] Sullivan, J.J., Hollingworth, T.A., Wekell, M.M., Newton, R.T. and Larose, J.E., 1986, Determination of sulfite in food by flow injection analysis, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69: 542-546.

[8] Sullivan, J.J., Hollingworth, T.A., Wekell, M.M., Meo, V.A., Etemad, M.A., Phillips, J.G. and Gump, B.H., 1990, Determination of free (pH 2.2) sulfite in wines by flow injection analysis: Collaborative study, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73: 223-226.

[9] Srivastava, S., Sinha, R. and Roy, D., 2004, Toxicological effects of malachite green, Aquat. Toxicol. 66: 319-329.

[10] Gałuszka, A., Migaszewski, Z. And Namiešnik, J., 2013, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, Trends Anal. Chem. 50: 78-84.

[11] Li, H. and Deng, Z.Y., 2014, Structure, Composition and Bioactivities of Anthocyanins in Vegetables and Fruits, pp. 295-317, In Warner, L.M. (Ed.), Handbook of Anthocyanins: Food Sources, Chemical Applications and Health Benefits, Nova Science Publishers, New York.

[12] Velisek, J., 2013, Pigments and other Colorants, pp. 656-740, In Velisek, J. (Ed.) The Chemistry of Food, Wiley, Oxford.

[13] Soares, M. H. F. B., Ramos, L. A. and Cavalheiro, É. T. G., 2002, Spectrophotometric determination of total sulfite in white wine samples using crude extracts from flowers, J. Chem. Educ. 79: 1111-1113.

[14] Rocha, I.D.C., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I. and Heinrich, M., 2014, *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review, Food Chem. 165: 424-443.