

การใช้สีธรรมชาติจากดอกกล้วยไม้เป็นอินดิเคเตอร์
สำหรับการไทเทรตแบบกรด-เบส

Application of Natural Reagent from Orchid Flower as
Indicator for Volumetric Acid-base Titration

ธนิกานต์ สุขอร่าม, กนกวรรณ สกุนรุ่งฤทธิ, จิดาภา จวนเจนการ, จุติมา ศิริบุญ,
เพชรรัตน์ สิริศักดิ์วิสุทธิ, โยชิตา เย็นสำราญ และสุมนมมาลย์ จันทร์เอี่ยม*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ถนนราชมรรคาใน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

Thanikan Sukaram, Kanokwan Sakunrungrit, Jidapa Juanjankarn, Jutima Siriboon,
Petcharat Sirisakwisut, Yosita Yensamran and Sumonmarn Chaneam*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University,

Rajamankha Nai Road, Muang, Nakhon Pathom 73000

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมโดยใช้สารสกัดธรรมชาติจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เอียสกุล (*Dendrobium Sonia* 'Earsakul') ที่มีสมบัติการเป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์ สำหรับระบุจุดยุติของการไทเทรตแบบกรด-เบส โดยสารสกัดจากดอกกล้วยไม้มีรงควัตถุหลัก คือ สารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งให้สีแดงในสารละลายกรด สีม่วงในสารละลายกลาง และสีเขียวเหลืองในสารละลายเบส ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากดอกกล้วยไม้มีช่วงการเปลี่ยนสีที่ค่าพีเอชใกล้เคียงกับจุดสมมูลของการไทเทรต ทั้งการไทเทรตระหว่างกรดแก่และเบสแก่ และการไทเทรตระหว่างกรดอ่อนและเบสแก่ สุดท้ายได้ประยุกต์วิธีนี้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูตัวอย่าง พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ANOVA test) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้กับวิธีมาตรฐาน AOAC และวิธีการไทเทรตแบบโพเทนซีโอเมตรี ดังนั้นสารสกัดจากดอกกล้วยไม้สามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกทดแทนการใช้กรด-เบสอินดิเคเตอร์จากสารสังเคราะห์ และยังเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีต้นทุนต่ำ สะดวก มีความถูกต้อง และเชื่อถือได้

คำสำคัญ : สารสกัดจากธรรมชาติ; ดอกกล้วยไม้; แอนโทไซยานิน; กรด-เบสอินดิเคเตอร์; การไทเทรต; ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก

Abstract

A green analytical chemistry method employing crude aqueous extracted from the orchid flower *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' as an acid-base indicator for acid-base titration was reported. In the orchid extract, there are many anthocyanin compounds which are red in acidic solution, purple in neutral solution and greenish-yellow in alkaline solution. When the orchid extract was utilized as indicators in acid-base titrations, sharp color changes at the equivalence point were observed. Titration curves of a strong acid, and weak acid to strong base were demonstrated. Moreover, the equivalence points obtained by the orchid extract were coincided with those of standard indicators and potentiometric titration. Additionally, this method was successfully applied for the determination of the total acidity in cooking vinegar samples and the measured values were reported as the percentage of acetic acid content. Our results were not significantly different from the standard AOAC method as well as potentiometric titration at a 95 % confidence level (ANOVA test). This indicated that orchid extract was acceptable to be used as a natural acid - base indicator, which was also economical, simple, accurate and reliable.

Keywords: natural extract; orchid flower; anthocyanin; acid-base indicator; titration; acetic acid content

1. บทนำ

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางเคมีอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้วิธีที่ถูกต้อง แม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และลดค่าใช้จ่าย อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์โดยอาศัยวิธีดั้งเดิม (classical method) เช่น การวิเคราะห์เชิงน้ำหนัก (gravimetric method) และการวิเคราะห์เชิงปริมาตร (volumetric method) ยังคงใช้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะใช้เป็นวิธีมาตรฐาน (standard method) การไทเทรต (titration) เป็นอีกหนึ่งวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาตร ซึ่งทำได้ง่ายและสะดวก สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยอาศัยจุดสมมูลของการไทเทรต (equivalence point) ทั้งนี้การหาจุดสมมูลของการไทเทรตอาจต้องใช้เวลาเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์บอกจุดยุติของการไทเทรตนั้น ๆ เช่น การใช้กรด-เบสอินดิเคเตอร์บอกจุดยุติของการไทเทรต

แบบกรด-เบส ซึ่งอินดิเคเตอร์สำหรับการไทเทรตแบบกรด-เบสที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น โบโรโมไทมอลบลู ฟีนอล์ฟทาลิน และเมทิลออเรนจ์ เป็นต้น สารเหล่านี้ล้วนเป็นสารเคมีจากการสังเคราะห์ทั้งสิ้น อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ทดลอง และหากกำจัดทิ้งโดยไม่มีการบำบัดที่ถูกต้องก็จะเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้ อีกทั้งยังมีราคาสูงอีกด้วย เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวจึงมีงานวิจัยที่หันมาใช้สารจากธรรมชาติแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกของวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม [1] เช่น การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เป็น กรด-เบสอินดิเคเตอร์ Chigurupati และคณะ [2] นำสีที่สกัดจากกะหล่ำม่วงมาใช้เป็นเซนเซอร์วัดค่าความเป็นกรด-เบส ในกระบวนการสลายตัวของ chlorbutol พบว่าสีที่สกัดได้มีประสิทธิภาพดีแม้จะใช้เวลาเข้มข้นเพียงแค่ 0.015 %

w/v เท่านั้น Bhagat และคณะ [3] ใช้ น้ำสกัดสีจากดอกกุหลาบ (*Rosa indica* L.) มาทดสอบการเป็นอินดิเคเตอร์สำหรับกรด-เบส Sukaram และคณะ [4] ใช้ สารสกัดจากดอกกล้วยไม้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนด้วยระบบการไหลแบบโพลินเจกชันและสมบัติการเป็นกรด-เบส อินดิเคเตอร์ของสารจากธรรมชาตินี้สามารถนำมาใช้บอกจุดยุติของการไทเทรต ได้แก่ ดอกชบา ดอกเฟื่องฟ้า และดอกกุหลาบ [5] ดอกยี่โถ และดอกโพทะเล [5] หรือสารสกัดจากหม่อน [7] เป็นต้น แม้ว่าสารสกัดจากธรรมชาติเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์ อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น พืชบางชนิดที่ใช้ อาจมีราคาแพง หาได้ยาก เป็นพืชเฉพาะท้องถิ่น หรือมีเฉพาะบางฤดูกาล

ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจใช้สารสกัดจากดอกกล้วยไม้มาเป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์สำหรับการไทเทรต โดยเลือกใช้กล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เอียสกุล (*Dendrobium Sonia* 'Earsakul') เนื่องจากเป็นพันธุ์กล้วยไม้ที่ปลูกในประเทศไทยได้ง่าย โดยปลูกเพื่อตัดดอกและมีจำหน่ายทั่วไป ทั้งยังราคาถูกอีกด้วย [10] การสำรวจแหล่งปลูกกล้วยไม้ในจังหวัดนครปฐมพบว่า มีบางช่วงที่ผลผลิตดอกกล้วยไม้มีมากกว่าความต้องการของตลาด นอกจากนี้ในการตัดดอกกล้วยไม้เพื่อส่งจำหน่ายนั้นต้องมีการคัดดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้มาตรฐานทั้งก่อนส่งขายตามท้องตลาด ผู้วิจัยจึงสนใจนำดอกกล้วยไม้เหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยดอกกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุลมีกลีบดอกมีสีม่วง เมื่อนำมาสกัดด้วยน้ำจะได้สารละลายสีสีม่วงสด มีรงควัตถุที่สำคัญคือ สารประกอบในกลุ่มแอนโทไซยานิน (anthocyanin) [8-10] แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภท (glycoside) มีโครงสร้างหลัก คือ อะไกลโคน (aglycone) หรือแอนโทไซยานิน โดยโครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินประกอบด้วย

คาร์บอน 6 อะตอม คาร์บอน 3 อะตอม คาร์บอน 6 อะตอม (C6-C3-C6) เชื่อมต่อกันดังรูปที่ 1 ซึ่งแอนโทไซยานินแต่ละชนิดต่างที่หมู่แทนที่แต่ละตำแหน่ง [11] โดยโครงสร้างของแอนโทไซยานินอยู่ในรูปของออกโซเนียมไอออน (oxonium ion) หรือเรียกว่า flavylium cation ในสภาวะกรด และเปลี่ยนโครงสร้างเป็น quinoidal base ในสภาวะเบส จึงทำให้สารละลายมีสีต่างกันตามพีเอชที่เปลี่ยนแปลง [12] โดยส่วนใหญ่รงควัตถุแอนโทไซยานินให้สีแดงในสารละลายกรด สีม่วงในสารละลายกลาง และสีเขียวเหลืองในสารละลายเบส [13]

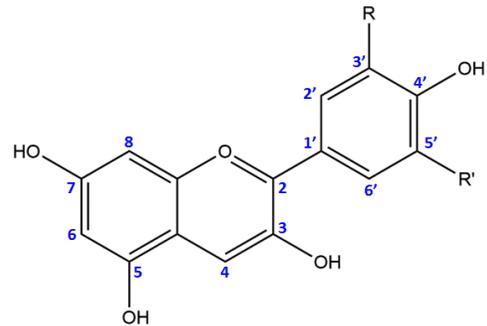


Figure 1 General chemical structure of anthocyanin aglycone core (adapted from reference 11)

กรด-เบสของสารละลายในชีวิตประจำวันเป็นเรื่องใกล้ตัวที่สำคัญมาก มีทั้งประโยชน์และโทษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ซึ่งทางอุตสาหกรรมอาหารมีการนำกรดอะซิติกมาใช้ในการควบคุมระดับพีเอชเพื่อปรับรสชาติของอาหาร ประเทศไทยมีการกำหนดระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูจากกระทรวงสาธารณสุข พบว่าเกณฑ์ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูหมักหรือ น้ำส้มสายชูกลั่นควรมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกไม่น้อยกว่า 4 % w/v ขณะที่น้ำส้มสายชูเทียมควรมีความ

เข้มข้นของกรดอะซิติก 4-7 % w/v [14] การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC คือการไทเทรตโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์และใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งวิธีมาตรฐานนี้เป็นวิธีที่สะดวก วิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว และมีความน่าเชื่อถือ [15] อย่างไรก็ตาม หากสามารถหลีกเลี่ยงการใช้อินดิเคเตอร์ที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์มาใช้สารสกัดจากธรรมชาติ จะทำให้การวิเคราะห์มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์จะถูกลงมาก

งานวิจัยนี้จึงนำสารสกัดจากดอกกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุลมาเป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์สำหรับการไทเทรต โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้เตรียมสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ จากนั้นแสดงการไทเทรตระหว่างกรดแก่และเบสแก่ และการไทเทรตระหว่างกรดอ่อนและเบสแก่ สุดท้ายประยุกต์วิธีการไทเทรตนี้วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูตัวอย่างที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับวิธีมาตรฐาน AOAC และวิธีการไทเทรตแบบ โฟเทนซิโอเมตรี

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สารเคมีและการเตรียมสารละลาย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (analytical grade) และสารละลายทุกชนิดเตรียมในน้ำกลั่นจากระบบ reversed osmosis ตลอดการศึกษา 0.15 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เตรียมโดยการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Carlo Erba, France) 0.60 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100.00 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเทียบมาตรฐานกับสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตเข้มข้น 0.1500 โมลาร์ เพื่อคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอน สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.15

โมลาร์ เตรียมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100.00 มิลลิลิตร และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.15 โมลาร์ เตรียมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100.00 มิลลิลิตร เช่นกัน

2.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

งานวิจัยนี้มีตัวอย่าง 2 ประเภท ประเภทที่ 1 คือ น้ำส้มสายชูตัวอย่างบรรจุขวดซื้อจากร้านค้าทั่วไปในจังหวัดนครปฐม เตรียมโดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูด้วยการไทเทรต และประเภท 2 คือ น้ำส้มสายชูตัวอย่างสุ่มจากร้านกล้วยเดี่ยว มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม เตรียมโดยนำสารละลายตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษกรองก่อนปิเปตสารละลายตัวอย่าง 10.00 มิลลิลิตร เพื่อนำไปไทเทรตวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก

2.3 การเตรียมอินดิเคเตอร์สารสกัดจากดอกกล้วยไม้

เตรียมโดยใช้วิธีเดียวกับงานวิจัยที่เคยรายงานก่อนหน้านี้ [4] โดยชั่งดอกกล้วยไม้ที่ตากแห้งด้วยโรงอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ [16,17] แล้วฉีกกลีบดอกส่วนสีม่วงเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมา 10.00 g ต้มกับน้ำกลั่น ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร ให้เดือด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น ด้วยกระดาษกรอง (No.1, Wintech, Japan) จะได้สารละลายสีม่วงพร้อมใช้งาน

2.4 ศึกษาพันธุ์ของดอกกล้วยไม้

การทดลองนี้ทำเพื่อคัดเลือกพันธุ์กล้วยไม้ที่สามารถให้สารละลายสีม่วงที่เข้มที่สุด และควบคุมประสิทธิภาพของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ สกัดสารจากดอกกล้วยไม้ 5 พันธุ์ ที่มีสีกลีบดอกต่างกัน โดยนำกล้วยไม้แต่ละสายพันธุ์ไปตากให้แห้งด้วยโรงอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ ชั่งน้ำหนักพืชแต่ละชนิดอย่างละ

10.00 กรัม ต้มด้วยน้ำเดือด 15 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น และกระดาษกรอง จากนั้นเจือจาง 10 เท่า แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer, Lambda 35, Perkin Elmer, USA)

2.5 pK_a ของอินดิเคเตอร์

งานวิจัยนี้ ทดลองหาค่า pK_a ของสารละลายอินดิเคเตอร์ตาม Hendersen-Hasselbalch equation ดังสมการที่ 1 โดยเตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์ในสภาวะกรด และละลายอินดิเคเตอร์ในสภาวะเบสให้มีค่าพีเอชต่าง ๆ จากนั้นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอินดิเคเตอร์แต่ละพีเอชที่เตรียมไว้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 612 นาโนเมตร (Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer, Agilent Technologies, Inc., United States) [2]

$$pK_a = pH + \log \frac{[A - A_{In-}]}{[A_{HIn} - A]} \quad (1)$$

2.6 ศึกษาปริมาตรสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ที่เหมาะสมในการใช้เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับไทเทรต

ทดลองโดยไทเทรตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ โดยใช้สารที่สกัดได้จากดอกกล้วยไม้เป็นอินดิเคเตอร์เพื่อบอกจุดยุติปริมาตร 0.50, 1.00 และ 1.50 มิลลิลิตร บันทึกปริมาตรไทเทรนต์ (NaOH) ที่ใช้ และ pH ของสารละลายที่จุดยุติ เนื่องจากที่จุดยุติของการไทเทรตพบว่าสารละลายมีสีม่วงจึงบันทึกค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่จุดยุติที่มีความยาวคลื่น 591 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer with Fiber Optic Dip Probe Coupler (G6866A) , Agilent Technologies, Inc., United States)

2.7 การไทเทรตกรด-เบสโดยใช้สารสกัดจากดอกกล้วยไม้เป็นอินดิเคเตอร์

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้สำหรับใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการบอกจุดยุติของการไทเทรตและเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน AOAC และวิธีการไทเทรตแบบโพเทนซีโอเมตรี โดยศึกษาการไทเทรตสองระบบ คือ การไทเทรตระหว่างกรดแก่และเบสแก่ และการไทเทรตระหว่างกรดอ่อนและเบสแก่ ซึ่งทดลองโดยจัดอุปกรณ์ดังรูปที่ 2

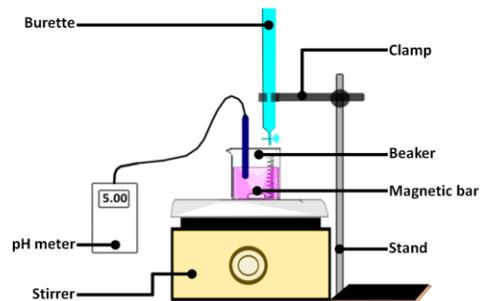


Figure 2 Experimental set up for acid-base titration

2.7.1 การไทเทรตระหว่างกรดแก่และเบสแก่

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของกรด-เบสอินดิเคเตอร์ซึ่งเป็นสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ ทดลองโดยจัดเครื่องมือการไทเทรตดังรูปที่ 2 เปิดสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.15x โมลาร์ ปริมาตร 25.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 100 มิลลิลิตร เป็นไทเทรนต์ (titrand) เติมสารสกัดจากกล้วยไม้ 1.00 มิลลิลิตร ผสมสารละลายในบีกเกอร์ให้เข้ากันด้วยแท่งแม่เหล็กและเครื่องกวนสาร จากนั้นนำมาไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.15x โมลาร์ ที่บรรจุอยู่ในบิวเรตเป็นไทเทรนต์ (titrant) จนกระทั่งสารละลายในบีกเกอร์เปลี่ยนจาก

สารละลายสีแดงเป็นสารละลายสีเขียวถาวร และ ทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นไทเทรตในทำนองเดียวกัน แต่ใช้ 0.15x โมลาร์ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเป็น ไทเทรนต์ และ 0.15x โมลาร์ สารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์เป็นไทเทรนต์ ทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

2.7.2 การไทเทรตกรดอ่อนด้วยเบสแก่

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 แต่ เปลี่ยนจากสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.15x โมลาร์ เป็นสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.15x โมลาร์

2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดใน รูปของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูตัวอย่างโดยใช้สาร สกัดจากดอกกล้วยไม้เป็นกรด-เบส อินดิเคเตอร์

นำสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ด้วยวิธีสกัดที่ พัฒนาขึ้นในงานนี้มาประยุกต์เป็นอินดิเคเตอร์เพื่อระบุ จุดยุติของการไทเทรตในการวิเคราะห์หาความเข้มข้น ของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชู โดยจัดเครื่องมือการ ไทเทรตตั้งรูปที่ 2 ปีเปิดน้ำส้มสายชูตัวอย่างปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ทรงสูง เติมสารสกัดจาก ดอกกล้วยไม้ 1.00 มิลลิลิตร ผสมสารละลายในบีก เกอร์ให้เข้ากัน จากนั้นนำมาไทเทรตด้วย 1.0x โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่บรรจุอยู่ในบิวเรต จนกระทั่งสารละลายในบีกเกอร์เปลี่ยนจากสารละลาย สีแดงเป็นสารละลายสีเขียวถาวร ทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง และเปรียบเทียบความเข้มข้นที่คำนวณได้กับวิธี AOAC และการไทเทรตแบบโพเทนซิโอเมตรี

2.9 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูป ของกรดอะซิติกในตัวอย่างน้ำส้มสายชูด้วยวิธี มาตรฐาน AOAC

วิธีมาตรฐาน AOAC [18] สำหรับการ วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกจะ อาศัยปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกกับสารละลาย มาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์และใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็น

อินดิเคเตอร์ จัดอุปกรณ์การไทเทรตตั้งรูปที่ 2 ทดลอง โดยการปีเปิดน้ำส้มสายชูตัวอย่างปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ทรงสูงหยดฟีนอล์ฟทาลีนลงใน สารละลาย 2 หยด ผสมสารละลายในบีกเกอร์ให้เข้า กัน จากนั้นไทเทรตด้วย 1.00x โมลาร์ สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่บรรจุอยู่ในบิวเรตจนกระทั่ง สารละลายในบีกเกอร์เปลี่ยนจากสารละลายสีไม่มีสี เป็นสารละลายสีชมพูอ่อนอย่างถาวร ทดลองซ้ำ ตัวอย่างละ 3 ครั้ง

2.10 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูป ของกรดอะซิติกในตัวอย่างน้ำส้มสายชูด้วยวิธีการ ไทเทรตแบบโพเทนซิโอเมตรี

จัดอุปกรณ์การไทเทรตตั้งรูปที่ 2 ขณะที่ ไทเทรตให้บันทึกค่าความต่างศักย์ที่อ่านได้จากพีเอช มิเตอร์เมื่อใช้ combined glass electrode (320 pH meter, Mettler Toledo, Switzerland) สร้างกราฟ การไทเทรต (titration curve) หาจุดสมมูลของการ ไทเทรต และคำนวณความเข้มข้นของกรดอะซิติกใน ตัวอย่าง ทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 ผลของพันธุ์ดอกกล้วยไม้

พบว่าดอกกล้วยไม้หวาย specimen 4 และ 5 ให้สารละลายที่มีสีชัดเจนมากที่สุดเมื่อพิจารณา สเปกตรัมการดูดกลืนแสงในรูปที่ 3 พบว่ามีค่าการ ดูดกลืนแสงสูง สอดคล้องกับสีของดอกกล้วยไม้ที่มี สีเข้มชัดเจนมากที่สุดด้วย

จากนั้นผู้วิจัยจึงวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินรวม (total anthocyanin content) [19] พบว่า สารสกัดจากดอกกล้วยไม้ ตัวอย่าง 4 ซึ่งคือพันธุ์เอีย สกุล มีปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุดเมื่อเปรียบ เทียบกับดอกกล้วยไม้พันธุ์อื่น ๆ ดังตารางที่ 1 ซึ่ง สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี [4] ดังนั้นงานวิจัยนี้

Table 1 Total anthocyanin content of extract solutions obtained from various orchid specimens

Orchid specimens	Flower colors	Total anthocyanin content
Specimen 1		n.d.
Specimen 2		0.1
Specimen 3		1.1
Specimen 4		10.5
Specimen 5		n.d.

n.d. = not detectable

นี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ดอกกล้วยไม้สายพันธุ์เอียสกุลเป็นอินดิเคเตอร์เนื่องจากมีสีเข้มง่ายต่อการสังเกตจุดยุติ และมีปริมาณแอนโทไซยานินรวมมากที่สุด แสดงให้

เห็นว่าสีของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้นี้จะเปลี่ยนตามความเป็นกรด-เบสของสารละลายขณะไทเทรตนั่นเอง

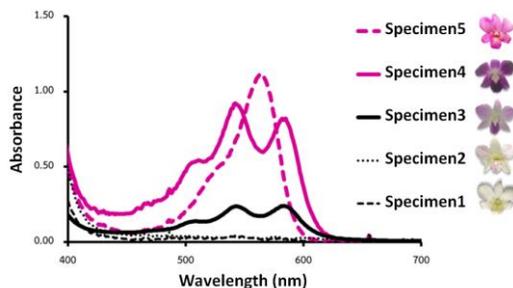


Figure 3 Absorption spectra of diluted extract (1 : 10) obtained from various orchid specimens

3.2 pK_a ของอินดิเคเตอร์

pK_a ของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุลที่คำนวณได้แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าสารละลายอินดิเคเตอร์ที่สกัดได้นี้มีค่า pK_a เฉลี่ย 6.12±0.12 (n = 6) และมีค่าใกล้เคียงกับ pK_a ของสารสกัดจากกะหล่ำม่วงซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานินเช่นกัน [2] และอินดิเคเตอร์นี้มีช่วงการเปลี่ยนสีที่ pH ประมาณ 5-8

Table 2 Calculation of pK_a for orchid extract

Solutions	pH	Abs at 612 nm	log[A-A _{in}]/[A _{HIn} -A]	Calculated pK _a
A ₁	5.65	0.0359	0.34	5.99
A ₂	5.97	0.0493	0.02	5.99
A ₃	6.09	0.0486	0.04	6.13
A ₄	6.27	0.0548	-0.10	6.17
A ₅	6.44	0.0623	-0.27	6.17
A ₆	6.73	0.0684	-0.43	6.30

A = Absorbance of indicator at various pH (A₁-A₆); A_{HIn} = Absorbance of indicator in molecular form at pH 2.23 which is 0.0112; A_{In} = Absorbance of indicator in ionized form at pH 11.62 which is 0.0895

3.3 ศึกษาปริมาณสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ที่เหมาะสมในการใช้เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับไทเทรต

พบว่าไม่ว่าจะใช้ปริมาณอินดิเคเตอร์เท่าไรก็ตาม ปริมาตรไทเทรนต์ที่ใช้และค่า pH ที่จุดยุติไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงถึงความแม่นยำในการวิเคราะห์ดี เมื่อพิจารณาการสังเกตสีของสารละลายที่จุดยุติพบว่าเมื่อใช้อินดิเคเตอร์ปริมาณ 0.50 มิลลิลิตร สังเกตสีสารละลายด้วยตาเปล่าที่จุดยุติไม่ชัด ($A_{519} = 0.027 \pm 0.016$) และมีความเที่ยงต่ำ (%RSD = 59.7 %) เมื่อใช้ปริมาณ 1.00 มิลลิลิตร สังเกตสีของสารละลายด้วยตาเปล่าที่จุดยุติได้อย่างชัดเจน ($A_{519} = 0.108 \pm 0.003$) และมีความเที่ยงสูง (%RSD = 2.3 %) เช่นเดียวกับเมื่อใช้อินดิเคเตอร์ปริมาณ 1.50 มิลลิลิตร สังเกตสีของสารละลายที่จุดยุติได้ชัดเจนเช่นกัน ($A_{519} = 0.200 \pm 0.002$, %RSD = 1.0 %) แต่เพื่อลดปริมาณการใช้อินดิเคเตอร์และให้มีความกระทบกับความเข้มข้นของสารละลายไทเทรนต์และไทเทรนต์ให้น้อยที่สุด งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อินดิ

เคเตอร์ปริมาณ 1.00 มิลลิลิตร ก็เพียงพอต่อการใช้งานเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ

3.4 การไทเทรตระหว่างกรดแก่และเบสแก่โดยใช้สารสกัดจากดอกกล้วยไม้เป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์

การไทเทรตกรดแก่ด้วยเบสแก่โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเป็นไทเทรนต์ จัดระบบการไทเทรตดังรูปที่ 2 พบว่าสารสกัดจากดอกกล้วยไม้นำมาใช้ในการบอกยุติของการไทเทรตได้จริง และในช่วงการเปลี่ยนสีที่ค่าพีเอชใกล้เคียงกับจุดสมมูลของการไทเทรต สีของสารละลายที่จุดยุติเปลี่ยนจากสีแดง (acid form: flavylium ion) ไปเป็นสีเขียว (base form: quinoidal base) ดังโครงสร้างในรูปที่ 4A และ 4B ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวงควัตถุแอนโทไซยานินเมื่อพีเอชของสารละลายเปลี่ยนไป ที่จุดสมมูลของการไทเทรตมีค่าพีเอช 7.00 สอดคล้องกับกราฟการไทเทรตที่ได้จากการไทเทรตแบบโพเทนชิโอเมตรีดังรูปที่ 5A

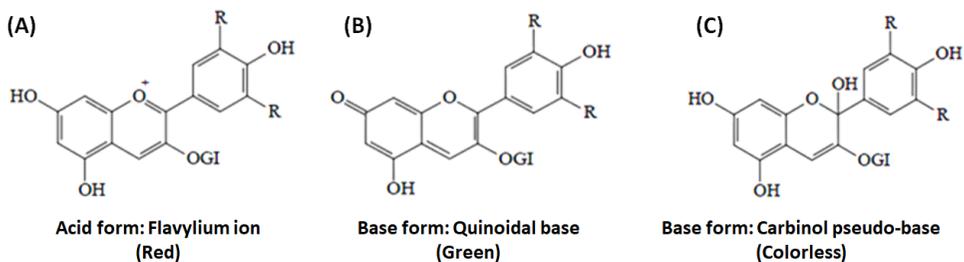


Figure 4 Chemical structures of anthocyanin under different acid-base conditions. R = H, OH, or OCH₃, OGI = glycosyl or H [adapted from reference 20]

การไทเทรตเบสแก่ด้วยกรดแก่โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นไทเทรนต์ จัดระบบการไทเทรตดังรูปที่ 2 ที่จุดยุติของการไทเทรตพบว่าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีชมพูอ่อน ทั้งนี้เนื่องจากเริ่มต้นการไทเทรตในสภาวะเบสที่แรง

มาก (pH 13.1) ส่งผลต่อระบบคอนจูเกชันของโครงสร้างแอนโทไซยานิน จึงอาจมีทั้ง quinoidal base ซึ่งมีสีเขียว และ carbinol pseudo-base ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสี แสดงโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 4C ทำให้เริ่มต้นสารละลายมีสีเขียวอ่อน และเมื่อ

ไทเทรตจนถึงจุดยุติ แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูป flavylum ion จึงทำให้สารละลายที่จุดยุติเห็นเป็นสีชมพูอ่อน [20] อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากดอกกล้วยไม้ยังคงสามารถใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการบอกจุดยุติของ

การไทเทรตเบสแก่ด้วยกรดแก่ได้ และที่จุดสมมูลของการไทเทรตมีค่าพีเอช 7.00 สอดคล้องกับกราฟการไทเทรตที่ได้จากการไทเทรตแบบโพเทนซีโอเมตรีในรูปที่ 5B

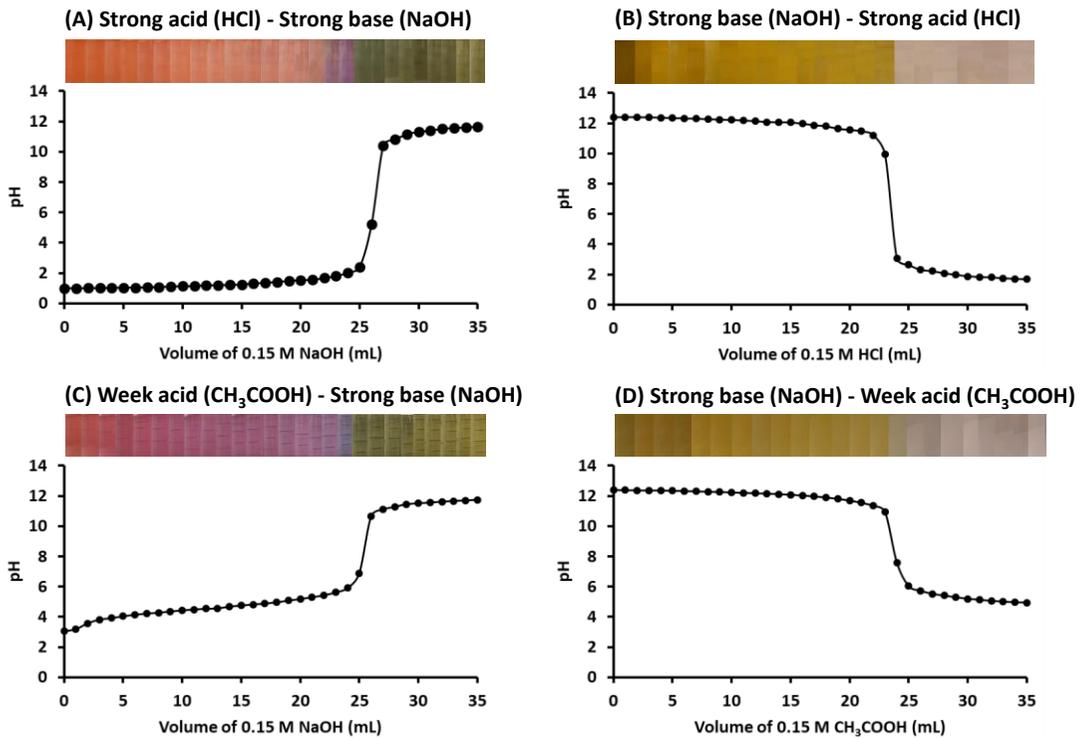


Figure 5 Color changes and titration curves between strong acid and strong base using HCl (A) and NaOH (B) as titrands. Color changes and titration curves between weak acid and strong base using CH₃COOH (C) and NaOH (D) as titrands.

3.5 การไทเทรตระหว่างกรดอ่อนและเบสแก่ โดยใช้สารสกัดจากกล้วยไม้เป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์

การไทเทรตกรดอ่อนด้วยเบสแก่โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกเป็นไทแทรนด์ จักรระบบการไทเทรตดังรูปที่ 2 พบว่าการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่จุดยุติเป็นเช่นเดียวกับการไทเทรตกรดแก่ด้วยเบสแก่ นั่นคือ เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเขียว จุดสมมูลของการไทเทรตมีค่าพีเอช 8.81 ซึ่งให้ผลการทดลองที่

สอดคล้องกับการไทเทรตแบบโพเทนซีโอเมตรีดังรูปที่ 5C

การไทเทรตเบสแก่ด้วยกรดอ่อนโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นไทแทรนด์ พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงสีในทำนองเดียวกับการไทเทรตเบสแก่ด้วยกรดแก่ นั่นคือ เปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีชมพูอ่อนเมื่อถึงจุดยุติของการไทเทรต และมีจุดสมมูลของการไทเทรตอยู่ที่ ค่าพีเอช 8.80 ซึ่งให้ผลการ

ทดลองสอดคล้องกับการไทเทรตแบบโพเทนซิโอเมตรี ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5D

ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากดอกกล้วยไม้พันธุ์สกุลเอียสามารถนำมาใช้เป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์สำหรับบอกจุดยุติของการไทเทรต และมีช่วงการเปลี่ยนสีที่ค่าพีเอชใกล้เคียงกับ

จุดสมมูลของการไทเทรต ตารางที่ 3 แสดงปริมาณไทเทรนต์ที่จุดยุติของการไทเทรตเมื่อใช้สารสกัดจากดอกกล้วยไม้เป็นอินดิเคเตอร์เปรียบเทียบกับการใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ และเปรียบเทียบกับปริมาณไทเทรนต์ที่จุดสมมูลจากการไทเทรตแบบโพเทนซิโอเมตรี

Table 3 Color of titrands and volume of titrants at the end point titration using orchid extract indicator, phenolphthalein indicator and potentiometric titration

Titration	Titrand (mL)	Initial color	End point color	Titrant (mL) ^a		
				Acid-base titration using orchid extract indicator	Acid-base titration using phenolphthalein indicator	Potentiometric titration
1 (Fig. 5A)	25.00 mL (0.1502 M HCl)	Red	Green	25.00±0.25 (0.1517 M NaOH)	25.00±0.05 (0.1517 M NaOH)	25.00±0.01 (0.1517 M NaOH)
2 (Fig. 5B)	25.00 mL (0.1517 M NaOH)	Pale green	Pale pink	25.18±0.03 (0.1502 M HCl)	25.05±0.05 (0.1502 M HCl)	25.00±0.01 (0.1502 M HCl)
3 (Fig. 5C)	25.00 mL (0.1512 M CH ₃ COOH)	Red	Green	25.50±0.70 (0.1517 M NaOH)	25.80±0.70 (0.1517 M NaOH)	25.75±0.25 (0.1517 M NaOH)
4 (Fig. 5D)	25.00 mL (0.1517 M NaOH)	Pale green	Pale pink	24.93±0.18 (0.1512 M CH ₃ COOH)	25.13±0.08 (0.1512 M CH ₃ COOH)	25.05±0.05 (0.1512 M CH ₃ COOH)

^amean±SD from triplicate titrations

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณของกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูโดยใช้สารสกัดจากดอกกล้วยไม้เป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์

การทดลองนี้ทำขึ้นเพื่อแสดงให้เห็นว่าสารสกัดธรรมชาติจากดอกกล้วยไม้พันธุ์สกุลเอียนำไปประยุกต์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูได้จริง ผลการวิเคราะห์รายงานเป็นร้อยละโดยมวลต่อปริมาตรของกรดอะซิติก (% w/v acetic acid) แสดงดังตารางที่ 4 เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่างน้ำส้มสายชูบรรจุขวด (ตัวอย่าง 1-3) พบว่าเป็นไปตามค่ามาตรฐานที่กำหนด ขณะที่น้ำส้มสายชูเครื่องปรุงรสุมเก็บตัวอย่างจากร้านกล้วยเดี่ยวตัวอย่างที่ 5 มีปริมาณกรดอะซิติกต่ำกว่า

เกณฑ์ที่กำหนด อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน AOAC และการไทเทรตแบบโพเทนซิโอเมตรี พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ ANOVA (single factor) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยค่า F_{stat} มีค่า 0.002 ซึ่งน้อยกว่า $F_{critical}$ ที่มีค่า 3.89 ดังนั้นผลการวิเคราะห์จากทั้งสามวิธีนี้จึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ [21]

4. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้นำเสนอการใช้สารสกัดจากดอกกล้วยไม้พันธุ์สกุลเอียที่สกัดด้วยน้ำต้มให้เดือด เป็นเวลา 15 นาที และใช้เป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์ เนื่องจากมีรงควัตถุที่สำคัญ คือ แอนโทไซยานินสูงกว่า

พันธุ์อื่นที่นำมาศึกษา ซึ่งแอนโทไซยานินนี้ให้สีแดงในสภาวะกรดและเขียวในสภาวะเบส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากดอกกล้วยไม้สามารถนำมาใช้เป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์เพื่อบอกจุดยุติของการไทเทรต โดยใช้ปริมาณสารสกัดจากดอกกล้วยไม้เพียง 1.0 มิลลิลิตร ก็สามารถมองเห็นการเปลี่ยนสีที่จุดยุติได้อย่างชัดเจน และมีช่วงการเปลี่ยนสีที่ค่าพีเอชใกล้เคียงกับจุดสมมูลของการไทเทรต ให้ผลสอดคล้องกับการใช้อินดิเคเตอร์ที่เป็นสารสังเคราะห์ คือ ฟีนอล์ฟทาลีน และการไทเทรตแบบโพเทนซิโอเมตรี และสุดท้ายประยุกต์สารสกัดจากดอกกล้วยไม้เป็นกรด-เบสอินดิเคเตอร์เพื่อไทเทรตหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูตัวอย่าง โดยเปรียบ

เทียบผลที่วิเคราะห์ได้กับวิธีมาตรฐาน AOAC และวิธีการไทเทรตแบบโพเทนซิโอเมตรี พบว่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ANOVA test) ดังนั้นสารสกัดจากดอกกล้วยไม้สามารถใช้เป็นทางเลือกทดแทนการใช้กรด-เบสอินดิเคเตอร์จากสารสังเคราะห์ และยังเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีต้นทุนต่ำ สะดวก มีความถูกต้อง และเชื่อถือได้ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี AOAC ที่ใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งทำให้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถูกลง (วิธี AOAC ใช้ 1 % w/v ฟีนอล์ฟทาลีนในเอทานอล คิดเป็นค่าใช้จ่ายประมาณ 500 บาทต่อการเตรียมอินดิเคเตอร์ 100 มิลลิลิตร)

Table 4 Comparison of total titratable acidity (%w acetic acid/ v) obtained from acid-base titration using orchid extract indicator, standard AOAC and potentiometric titration.

Samples	Acetic acid content (%w/v) ^a		
	Acid-base titration using orchid extract indicator	AOAC	Potentiometric titration
1	5.29±0.15	5.38±0.04	5.26±0.12
2	5.32±0.12	5.38±0.05	5.43±0.02
3	5.32±0.06	5.34±0.12	5.48±0.03
4	4.59±0.05	4.30±0.03	4.39±0.15
5	3.00±0.06	3.04±0.04	2.81±0.09

^amean±SD from triplicate measurements

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับอาจารย์ หลังสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาเอกจากกองทุนวิจัย และสร้างสรรค์คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 (SRF-PRG-2560-09) ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุลนารถ อบสุวรรณ สำหรับคำแนะนำเรื่องดอกกล้วยไม้ ขอขอบคุณ คุณพันทิพา ลิ้มสงวน จากวัชระ

ออร์คิดฟาร์ม อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม ที่อนุเคราะห์ดอกกล้วยไม้ตลอดงานวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดลฤดี ฉิมพาลี สำหรับคำแนะนำเพิ่มเติมเพื่อให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์

6. References

- [1] Armenta, S. , Garrigues, S. and de la Guardia, M. , 2008, Green analytical chemistry, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 27: 497-511.
- [2] Chigurupati, N., Saiki, L., Gayser, C.Jr. and Dash, A. K. , 2002, Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use, *Int. J. Pharm.* 241: 293-299.
- [3] Bhagat, V.C. , Patil, R.D. , Channekar, P.R. , Shetty, S.C. and Akarte Bhagat, A.S., 2008, Herbal indicators as a substituent to synthetic indicators, *Int. J. Green Pharm.* 2: 162-163.
- [4] Sukaram, T. , Sirisakwisut, P. , Sirirak J. , Nacapricha D. and Chaneam, S. , 2018, Environmentally friendly method for determination of ammonia nitrogen in fertilisers and wastewaters based on flow injection spectrophotometric detection using natural reagent from orchid flower, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 98: 907-920.
- [5] Nwosu, F. , Adekola, F. and Ihedioha, K. , 2004, Simple titrimetric colour indicators from some natural flower petals, *Centre point (Sci. Ed.)* 12: 74-89.
- [6] Patil, S.B. , Kondawar, M.S. , Ghodke, D.S. , Naikwade, N.S. and Magdum, C.S. , 2009, Use of flower extracts as an indicator in acid- base titrations, *Res. J. Pharm. Technol.* 2: 421-422.
- [7] Pathade, K.S., Patil, S.B., Kondawar, M.S., Naikwade, N.S. and Magdum, C.S. , 2009, *Morus alba* fruit- herbal alternative to synthetic acid base indicators, *Int. J. ChemTech Res.* 1: 549-551.
- [8] Fossen, T. and Øvstedal, D. O. , 2003, Anthocyanins from flowers of the orchids *Dracula chimaera* and *D. cordobae*, *Phytochemistry* 63: 783-787.
- [9] Duangmal, K., Saicheua, B. and Sueeprasan, S., 2004, Roselle anthocyanins as a natural food colorant and improvement of its colour stability, pp. 155-158, in *Proceedings of AIC 2004 Color and Paints, Interim Meeting of the International Color Association, Chulalongkorn University, Bangkok.*
- [10] Ersus, S. and Yurdagel, U. , 2007, Micro encapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier, *J. Food Eng.* 80: 805-812.
- [11] Markwell, J., Curtright, R. and Rynearson, J. A. , 1996, Anthocyanins: Model compounds for learning about more than pH, *J. Chemical Edu.* 73: 306-309.
- [12] Li, J. and Jiang, Y., 2007, Litchi flavonoids: Isolation, identification and biological activity, *Molecules* 12: 745-758.
- [13] Castaneda- Ovando, A. , Pacheco-Hernández, M. , Páez- Hernández, M. E. , Rodríguez, J.A. and Galán-Vidal, C.A., 2009, Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chem.* 113: 859-871.
- [14] Health, M.O.P., 2000, Notification of the Ministry of Public Health: Vinegar,

- Prachachon, Bangkok.
- [15] Horwitz, W. , 2000, Official methods of analysis of the Association of Official analytical Chemists (AOAC) International, AOAC International, Maryland.
- [16] Kaewkiew, J., Nabnean, S. and Janjai, S., 2012, Experimental investigation of the performance of a large-scale greenhouse type solar dryer for drying chilli in Thailand, Proc. Eng. 32: 433-439.
- [17] Janjai, S., Intawee, P., Kaewkiew, J., Sritus, C. and Khamvongsa, V., 2011, A large-scale solar greenhouse dryer using poly carbonate cover: Modeling and testing in a tropical environment of Lao People's Democratic Republic, Renew. Energy 36: 1053-1062.
- [18] Horwitz, W., 2000, Official methods of analysis of the Association of Official analytical Chemists (AOAC) International, AOAC International, Maryland.
- [19] Lee, J. , Durst, R.W. and Wrolstad, R.E. , 2005, Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study, J. AOAC Int. 88: 1269-1278.
- [20] Jiangrong, L. and Yueming, J., 2007, Litchi flavonoids: Isolation, identification and biological activity, Molecules 12: 745-758.
- [21] Miller., J. and Miller, J.C., 2018, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Pearson Education, Ltd. , London.