



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference

ระบบซีเควนเชียลอินเจกชันสำหรับการวิเคราะห์กรดซิตริกในน้ำผลไม้

Sequential Injection System for Analysis of Citric Acid in Fruit Juices

ศจิกา กมลพัฒนานันท์ (Sajika Kamonpattananun)¹กาญจนา อุไรสินธุ์ (Kanchana Uraisin)²ดวงใจ นาคะปรีชา (Duangjai Nacapricha)³ จิตติรัตน์ แม้นทิม (Thitirat Mantim)⁴

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์แบบซีเควนเชียลอินเจกชัน (Sequential Injection Analysis, SIA) พัฒนขึ้นเพื่อการวิเคราะห์ กรดซิตริก ในตัวอย่างน้ำผลไม้ 3 ชนิด คือ น้ำมะขาม น้ำสับปะรด และน้ำส้ม โดยใช้ปฏิกิริยาทางแสงที่เกิดขึ้นระหว่างเพอร์ริกไอออนและ กรดซิตริก ภายใต้แสงยูวีที่ก่้างไฟ 108 วัตต์ เป็นเวลา 30 วินาทีโดยเพอร์ริกไอออนภายใต้ปฏิกิริยาทางแสงนั้นจะถูกรีดิวซ์กลายเป็นเพอร์รัสไอออนด้วยกรดซิตริก และจะทำปฏิกิริยากับออร์โทโทปีแนโนโทรลีนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดง ซึ่งตรวจวัดโดย 'แพร์อิมิตเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอด' (paired emitter-detector diode) หรือ 'พีอีดีดี' (PEDD) ที่ความยาวคลื่น 525 ± 35 นาโนเมตร โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ ได้แก่ พีเอชของบัฟเฟอร์อะซิเตต ความเข้มข้นของออร์โทโทปีแนโนโทรลีน และความเข้มข้นของเพอร์ริกไอออนโดยวิธีการนี้แสดงความเป็นเส้นตรงในช่วง 5 – 40 ppm โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) คือ 0.9967 และสามารถวัดตัวอย่างได้ 13 ตัวอย่างในหนึ่งชั่วโมงระบบดังกล่าวได้ถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดซิตริกในน้ำผลไม้โดยมีค่าร้อยละการวิเคราะห์ที่กลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 106 - 117

คำสำคัญ กรดซิตริก การวิเคราะห์แบบซีเควนเชียลอินเจกชัน แพร์อิมิตเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอด

¹ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดลsajika.kam@gmail.com

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล u_kanchana@hotmail.com

³ รองศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล Dnacapricha@gmail.com

⁴ อาจารย์ ดร. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒmantim_r@hotmail.com



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference

Abstract

Sequential injection analysis (SIA) was developed for analysis of citric acid in fruit juices (tamarind juice, pineapple juice and orange juice) by using spectrophotometric detection. The detection principle is based on photochemical reaction between Fe(III) and citric acid under irradiation with UV light (108 watt) for 30 second. Fe(III) is photochemically reduced to Fe(II) by citric acid and then reacts with orthophenanthroline for forming the reddish orange complex which can be monitored using a home-made paired emitter-detector diode (PEDD) at 525 ± 35 nanometer. The parameters of pH of acetate buffer, concentration of orthophenanthroline and concentration of Fe(III) were optimized. Under optimum condition, the method shows a linear range between 5 and 40 parts per million and provides coefficient of determination is 0.9967 with a sample throughput of 13 samples per hour. The system was applied to determine citric acid in fruit juice samples and recovery was found in range of 106 - 117%.

Keywords: Citric acid, Sequential injection analysis, Paired emitter-detector diode



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

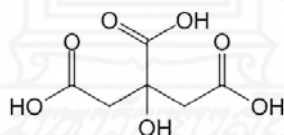
The 7th STOU National Research Conference

บทนำ

น้ำผลไม้ คือของเหลวที่อยู่ในเนื้อเยื่อของผลไม้ตามธรรมชาติ อาจรวมถึงของเหลวจากผลของผักบางชนิดด้วย เช่น มะเขือเทศน้ำผลไม้โดยทั่วไปที่วางขายตามร้านค้าหรือซูเปอร์มาร์เก็ตสามารถแบ่งได้ 3 ประเภท คือ น้ำผลไม้พร้อมดื่ม น้ำผลไม้เข้มข้น และน้ำผลไม้ปรุงแต่งกลิ่น น้ำผลไม้พร้อมดื่ม คือน้ำผลไม้ที่สามารถดื่มได้ทันทีโดยไม่มีการปรุงแต่งกลิ่นเพิ่ม ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ (1) น้ำผลไม้พร้อมดื่มประเภท 100% ซึ่งสามารถดื่มได้ทันที (เช่น น้ำส้ม น้ำมะนาว และน้ำสับปะรด) (2) น้ำผลไม้พร้อมดื่มประเภท 25 – 50% ซึ่งต้องเจือจางก่อนบริโภค (เช่น น้ำมะม่วง และน้ำองุ่น) น้ำผลไม้เข้มข้น คือน้ำผลไม้ที่นำจากการนำผลไม้ทั้งจากธรรมชาติไประเหยน้ำบางส่วนออกไปเพื่อเพิ่มความเข้มข้น โดยต้องนำมาเจือจางก่อนจึงจะสามารถบริโภคได้ มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม และประเภทสุดท้าย น้ำผลไม้ปรุงแต่งกลิ่น ผลิตจากการใช้น้ำผลไม้ประมาณ 25% ขึ้นไป นำมาปรุงแต่งกลิ่น เจือสีสังเคราะห์และเพิ่มรสชาติด้วยน้ำตาล

การควบคุมคุณภาพในการผลิตน้ำผลไม้จึงเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับผู้บริโภค โดยพารามิเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่ ความเป็นกรด (ปริมาณกรดซิตริก) ซึ่งต้องมีการควบคุมปริมาณไม่ให้มากเกินไปจนทำให้เกิดโทษกับผู้บริโภคเพราะหากเราบริโภคกรดซิตริกมากเกินไปอาจทำให้เกิดอันตรายกับร่างกายได้ซึ่งกรดซิตริกมักพบในผลไม้ เช่น พืชตระกูลส้มซึ่งบางครั้งกรดซิตริกก็สามารถพบจากการปรุงแต่งรสชาติในเครื่องดื่มเช่นกัน โดยผลไม้จำพวกส้มและมะนาวประเภทน้ำผลไม้คั้นสดจะมีปริมาณของกรดซิตริกอยู่ประมาณ 46- 48 กรัมต่อลิตร สำหรับน้ำผลไม้เข้มข้น 34 – 39 กรัมต่อลิตร และน้ำผลไม้พร้อมดื่ม 17 – 25 กรัมต่อลิตร (Monga, 2008)

กรดซิตริก (citric acid) เป็นกรดอ่อนที่สามารถพบได้ในพืช สัตว์ แบคทีเรีย และเกิดขึ้นตามธรรมชาติจากพืชตระกูลส้ม (citrus fruit) กรดซิตริกจะพบมากในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่น ส้ม หรือมะนาวอีกทั้งยังใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง โดยใช้เป็นตัวช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และควบคุมความเป็นกรดต่างในเลือด กรดซิตริกให้รสเปรี้ยว ดังนั้นจึงมักนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารและเครื่องดื่ม (Luque-Pérez, Ríos, & Valcárcel, 1998)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดซิตริก

โดยปกติแล้วการบริโภคอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีรสเปรี้ยวจะมีอันตรายน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับรสหวานหรือรสเค็ม อย่างไรก็ตามการบริโภคกรดซิตริกในปริมาณที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดอันตรายกับร่างกายได้ เช่น ปวดท้องหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูก เป็นต้นและเมื่อพบว่ากรดซิตริกนั้นเป็นสิ่งที่สามารถพบได้ในผลไม้ตามธรรมชาติและเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมคุณภาพในเครื่องดื่ม ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีวิธีการสำหรับการตรวจวิเคราะห์กรดซิตริกสำหรับการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยในน้ำผลไม้สำหรับผู้บริโภคโดยเพื่อป้องกันการบริโภคกรดซิตริกที่มากเกินไปจนทำให้เกิดอันตรายและเป็นวิธีที่สามารถตรวจวัดปริมาณซิตริกได้โดยง่าย ไม่ซับซ้อน และรวดเร็ว



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference

วัตถุประสงค์

เพื่อออกแบบระบบซีควเอนเชียลอินเจกชันโดยใช้เครื่องมือตรวจวัด คือ ‘แพร์อีมิตเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอด’ หรือ ‘พีอีดีดี’ และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณกรดซิตริกในตัวอย่างน้ำผลไม้

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

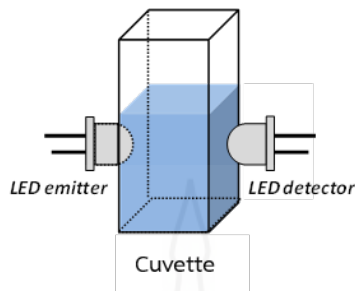
ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีที่หลากหลายสำหรับการตรวจวัดกรดซิตริกในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม เช่น เทคนิคทางไทเทรชัน (titration) ซึ่งเป็นการไทเทรตระหว่างกรดซิตริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยใช้ฟีนอล์ฟทาไลน์เป็นอินดิเคเตอร์ โดยสามารถรู้ปริมาณของกรดซิตริกในน้ำผลไม้ได้จากการคำนวณปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ง่ายแต่จะมีการรบกวนของสีระหว่างสีของตัวอย่างและสีที่เปลี่ยนไปของอินดิเคเตอร์ได้ง่าย (Sinclair, Bartholomew, & Ramsey, 1945) เทคนิคทางแคปิลลารี อิเล็กโทรโฟเรซิส (capillary electrophoresis) เป็นเทคนิคการแยกชนิดกรดในน้ำผลไม้โดยใช้เครื่องมือตรวจวัดแสงในช่วงยูวี ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตรโดยการแยกกรดแต่ละชนิดจะทำได้โดยใช้สภาวะบัฟเฟอร์ฟอสเฟส พีเอช 7.5 ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และศักย์ไฟฟ้าในการแยกคือ -14 กิโลโวลต์ เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำแต่อย่างไรก็ตามก็ต้องการผู้ที่มีทักษะสูงเพื่อทำการทดลอง (Saavedra, Garcia, & Barbas, 2000) เทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์ (fluorometric method) ซึ่งเป็นเทคนิคที่วิเคราะห์สารเคมีที่มีคุณสมบัติสามารถเปล่งแสงได้ แต่กรดซิตริกนั้นไม่สามารถเปล่งแสงได้ด้วยตัวเองจึงต้องมีการทำเดริเวอไรท์เดชัน (derivatization) เพื่อเพิ่มคุณสมบัติการเปล่งแสงให้กับกรดซิตริก ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีการเตรียมสารตัวอย่างที่ยุ่งยาก (Leininger & Katz, 1949) และเทคนิคทางสเปกโทรโฟโตเมทรี (spectrophotometry) ในปี ค.ศ. 1998 กลุ่มวิจัยของ Valcarcel ได้เสนอระบบการไหลสำหรับการตรวจวัดกรดซิตริกในเครื่องดื่มโดยใช้ปฏิกิริยาทางแสง (Luque-Pérez et al., 1998) ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือปฏิกิริยาทางแสงระหว่างไอเออร์น (III) และกรดซิตริก โดยใช้แสงยูวี และหลังจากนั้นสารละลายผสมกับบอร์โทพีแนนโทรีนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดงตรวจวัดโดยสเปกโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 512 นาโนเมตร โดยในงานวิจัยของเราได้สนใจนำปฏิกิริยานี้มาใช้และนำไปประยุกต์ใช้กับระบบการไหลแบบต่อเนื่องแบบซีควเอนเชียลอินเจกชัน (Sequential Injection Analysis, SIA) ซึ่งเป็นเทคนิคการไหลชนิดหนึ่งที่สามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพเพราะเป็นระบบอัตโนมัติที่สามารถออกแบบการใช้งานได้อย่างหลากหลาย โดยจะใช้ปริมาณสารเคมีน้อย ซึ่งปริมาณสารเคมี ระยะเวลา รวมถึงลำดับกระบวนการวิเคราะห์จะถูกควบคุมโดยคอมพิวเตอร์ทั้งหมด

โดยในงานวิจัยนี้สนใจการนำเทคนิคทางด้านสเปกโทรโฟโตเมทรีมาใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความง่ายและรวดเร็วอย่างไรก็ดีเครื่องสเปกโตรมิเตอร์มักมีขนาดใหญ่และราคาสูง ซึ่งเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการนั้นมีความลักษณะที่ดีมากสามารถใช้กับงานไม่จำกัดรูปแบบเพราะผู้ใช้สามารถเลือกเปลี่ยนช่วงคลื่นสำหรับการวัดในแต่ละงานวิเคราะห์ได้ แต่ในบางกรณีที่มีการวัดสารตัวเดิมซ้ำๆ หรือในงานภาคสนามที่ไม่สามารถใช้เครื่องมือใหญ่ๆ ได้ จึงได้มีการพัฒนาตัวตรวจวัดที่สะดวกในการใช้งานมากขึ้น โดยมีการประยุกต์ใช้ไดโอดเปล่งแสง หรือ แอลอีดี (LED) ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดแสงที่มีประสิทธิภาพในปี ค.ศ.2004 กลุ่มวิจัยของ Diamond เป็นกลุ่มแรกที่น่าเสนอโดยใช้ไดโอดแบบคู่ควบ (Lau et al., 2004) และตั้งชื่อว่า ‘แพร์อีมิตเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอด’ (Paired Emitter-detector Diode) หรือ ‘พีอีดีดี’ (PEDD) โดยมีการใช้ไดโอดตัวแรกใช้เป็นตัวเปล่งแสง (LED emitter) และไดโอดตัวตรงข้ามใช้เป็นตัวรับแสง (LED detector) ดังแสดงในภาพที่ 2



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference



ภาพที่ 2 รูปจำลองของตัวตรวจวัดความเข้มแสงโดยใช้ไดโอดคู่แบบเป็นตัวให้และรับแสง (PEDD) ที่มีคิวเวท (cuvette) ใส่สารตัวอย่างคั่นระหว่างกลาง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานนี้เป็นสารเคมีเกรดสำหรับการวิเคราะห์ (analytical grade) และใช้น้ำปราศจากไอออน (deionized water) ในการเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

เตรียมสารละลายกรดซิตริกที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ppm ด้วยการละลายกรดซิตริก ($C_6H_8O_7$, Fluka-Garantie, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) 0.0100 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรสารละลายมาตรฐานกรดซิตริกสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานสามารถเตรียมได้โดยเจือจางสารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 100 ppm ด้วยสัดส่วนที่เหมาะสม

สารละลายเฟอร์ริกไอออนเข้มข้น 250 ppm ใน 0.01 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก เตรียมได้โดยละลายเฟอร์ริกไนเตรต ($Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, Ajax, ประเทศนิวซีแลนด์) 0.45 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน และเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.21 มิลลิลิตรลงในสารละลาย หลังจากนั้นทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนโดยใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตตพีเอช 4 เข้มข้น 0.1 โมลาร์เตรียมได้โดยละลายโซเดียมอะซิเตต ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$, Merch, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน) 1.1825 กรัม ในกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์และทำการปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร และทำการปรับพีเอชให้ได้พีเอช 4 ด้วย 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยทำการตรวจวัดด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

สารละลายออร์โทฟอสเฟตเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์เตรียมได้โดยละลายออร์โทฟอสเฟต ($C_{12}H_{18}N_2 \cdot H_2O$, Merch, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน) 0.1982 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ตัวอย่างน้ำผลไม้ 3 ชนิดคือ น้ำมะขาม น้ำสับปะรด และน้ำส้ม เตรียมได้โดยชั่ง 0.1000 กรัม เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนและทำการปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรอง แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ต่อไป



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference

2. แพร่อิมิตเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอด หรือ พีโอดีดี

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างกรดซิตริกและเฟอร์ริกไอออนที่ใช้ปฏิกิริยาทางแสงช่วยในการเปลี่ยนเฟอร์ริกไอออนเป็นเฟอร์รัสไอออนและทำปฏิกิริยากับออร์โทฟิแนทโทรลีนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดงซึ่งมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 525 นาโนเมตร ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้หลอดแอลอีดีที่มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 490 – 560 นาโนเมตร โดยใช้แอลอีดีชนิดอินเดียม แกลเลียม ไนไตรด์ (indium gallium nitride, InGaN) 2 ตัว ที่เปล่งแสงที่เขียวที่ความยาวคลื่น 525 ± 35 นาโนเมตร (Kingbright, ประเทศไต้หวัน) โดยแอลอีดีตัวแรกทำหน้าที่เป็นตัวเปล่งแสง (Light emitter) จะถูกต่อเข้ากับตัวต้านทางขนาด 100 โอห์มและต่อเข้ากับแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้ากระแสตรงที่ให้กระแสไฟฟ้า 8 โวลต์ (GW Instek, รุ่น GPC-3030D, ประเทศไต้หวัน) และแอลอีดีตัวที่สองทำหน้าที่เป็นตัวรับแสง (Light detector) ที่เปล่งออกมาจากแอลอีดีตัวเปล่งแสง โดยจะเชื่อมต่อกับดิจิตอลมัลติมิเตอร์ที่มีความต้านทาน 10^{14} โอห์ม (Fluke, รุ่น 8845A ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อทำการวัดสัญญาณศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีหน่วยเป็นโวลต์บันทึกสัญญาณโดยซอฟต์แวร์ LabView 8.2 ถ้าแสงที่ตกกระทบลงบนแอลอีดีตัวรับแสงมีค่ามาก สัญญาณไฟฟ้าที่อ่านได้ก็จะมีค่ามาก แต่ถ้าหากความเข้มของแสงที่ตกกระทบลงบนแอลอีดีตัวรับแสงน้อย สัญญาณไฟฟ้าที่อ่านได้ก็จะมีค่าลดลง ซึ่งสัญญาณไฟฟ้าที่ได้จะแปรผกผันกับค่าการดูดกลืนแสง

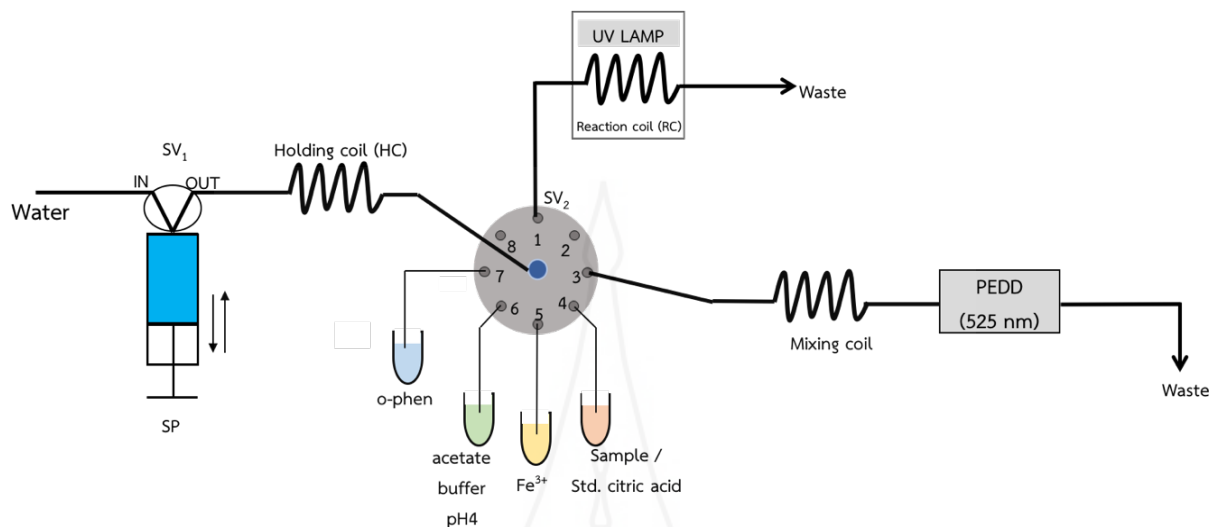
3. ระบบการวิเคราะห์แบบไหล

ในงานวิจัยนี้ ใช้ระบบซีเคิวนเซียลอินเจกชันควบคู่กับ ‘แพร่อิมิตเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอด’ หรือ ‘พีโอดีดี’ สำหรับการวิเคราะห์กรดซิตริกดังแสดงในภาพที่ 3 ส่วนแรกเป็นระบบซีเคิวนเซียลอินเจกชัน(HAMITON MVP) ซึ่งประกอบด้วยวาล์วและปั๊มสุบลอดชนิดยา (syringe pump) ขนาด 5.0 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถควบคุมการทำงานด้วยระบบคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม SIA MPV Ver. 5.0 (MGC, ประเทศญี่ปุ่น) โดย Selection valve 1 (SV₁) ทำหน้าที่ควบคุมทิศทางการไหลของสารและ Selection valve 2 (SV₂) ทำหน้าที่เลือกสารที่ต้องการเข้าสู่ระบบและพักสารไว้ใน holding coil (HC) หรือส่งสารเพื่อไปทำปฏิกิริยาใน reaction coil (RC) ภายใต้หลอด UV(Philips TL-D 18W, ประเทศฮอลแลนด์) 6 หลอดหรือ SV₂ ยังใช้เพื่อควบคุมทิศทางการให้ส่งสารไปยังส่วนตรวจวัด โดยเคลื่อนผ่านท่อผสม (mixing coil) และหน่วยตรวจวัดโดยจะใช้แพร่อิมิตเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอด ณ ความยาวคลื่น 525 ± 35 นาโนเมตร



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference



ภาพที่ 3 ระบบการไหลแบบต่อเนื่องโดยใช้การวิเคราะห์แบบซีควเอนเชียลอินเจกชัน (SIA) ควบคู่กับ ‘แฟร์อิมิตเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอด’ หรือ ‘ฟิอิตตี’

4. การทำงานของระบบเพื่อการวิเคราะห์กรดซิตริก

รายละเอียดลำดับการควบคุมระบบซีควเอนเชียลอินเจกชัน แสดงดังตารางที่ 1 โดยเริ่มจากการใช้น้ำปราศจากไอออน (deionized water) เป็นตัวพา (carrier) ในระบบ ระบบจะทำการดูดสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ปริมาตร 60 ไมโครลิตร สารละลายเฟอร์ริกไอออนปริมาตร 60 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่างน้ำผลไม้ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เข้าสู่ท่อขัดพักสาร (holding coil, HC) ตามลำดับ (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นสารละลายจากท่อขัดพักสารจะถูกผลักไปยังท่อทำปฏิกิริยา (reaction coil, RC) และทำการหยุดการทำงานของปั๊มเป็นเวลา 30 วินาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทางแสงขึ้นระหว่างเฟอร์ริกไอออนและกรดซิตริก หลังจากนั้นสารละลายทั้งหมดจะผสมกับบอร์โทไฟน์บนไทเทเนียมในท่อผสมเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดงตรวจวัดโดยเครื่องแฟร์อิมิตเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอด หรือ ฟิอิตตี ที่ความยาวคลื่น 525 ± 35 นาโนเมตร



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference

ตารางที่ 1 ลำดับการควบคุมระบบซีเควนเชียลอินเจกชันดังภาพที่3

ลำดับ	การทำงานของปั๊ม	ปริมาตร (μL)	อัตราการไหล (mL/min)	ตำแหน่งของวาล์ว		รายละเอียด
				SV ₁	SV ₂	
1	ดูด	5000	18	เข้า	1	ดูดน้ำปราศจากไอออนเข้าสู่ปั๊ม
2	ผลัก	5000	18	ออก	1	ไล่น้ำปราศจากไอออนเข้าสู่ HC และ RC
3	ดูด	5000	18	เข้า	1	ดูดน้ำปราศจากไอออนเข้าสู่ปั๊ม
4	ผลัก	2000	18	ออก	2-8	ไล่น้ำปราศจากไอออนเข้าสู่ท่อทั้งหมด
5	ดูด	60	4.2	ออก	6	ดูดสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตดพีเอช 4 เข้าสู่ HC
6	ดูด	60	4.2	ออก	5	ดูดสารละลายเฟอร์ริกไอออนความเข้มข้น 250 ppm เข้าสู่ HC
7	ดูด	60	4.2	ออก	4	ดูดสารตัวอย่างน้ำผลไม้เข้าสู่ HC
8	ดูด	60	4.2	ออก	6	ดูดสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตดพีเอช 4 เข้าสู่ HC
9	ดูด	60	4.2	ออก	5	ดูดสารละลายเฟอร์ริกไอออนความเข้มข้น 250 ppm เข้าสู่ HC
10	ดูด	60	4.2	ออก	4	ดูดสารตัวอย่างน้ำผลไม้เข้าสู่ HC
11	ดูด	60	4.2	ออก	6	ดูดสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตดพีเอช 4 เข้าสู่ HC
12	ดูด	60	4.2	ออก	5	ดูดสารละลายเฟอร์ริกไอออนความเข้มข้น 250 ppm เข้าสู่ HC
13	ดูด	60	4.2	ออก	4	ดูดสารตัวอย่างน้ำผลไม้เข้าสู่ HC
14	ดูด	60	4.2	ออก	6	ดูดสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตดพีเอช 4 เข้าสู่ HC
15	ผลัก	1350	4.2	ออก	1	ผลักสารละลายทั้งหมดจาก HC เข้าสู่ RC และหยุดเป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
16	ดูด	100	4.2	ออก	7	ดูดสารละลายออร์โทฟิแนนโทรลีนความเข้มข้น 0.01 โมลาร์
17	ดูด	950	4.2	ออก	1	ดูดสารละลายจาก RC เข้าสู่ HC
18	ดูด	100	4.2	ออก	7	ดูดสารละลายออร์โทฟิแนนโทรลีนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
19	ดูด	950	4.2	ออก	1	ดูดสารละลายจาก RC เข้าสู่ HC
20	ดูด	100	4.2	ออก	7	ดูดสารละลายออร์โทฟิแนนโทรลีนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
21	ผลัก	4450	4.2	ออก	3	ผลักสารละลายผ่านท่อผสมเข้าสู่หน่วยตรวจวัด

หมายเหตุ ปริมาตรสารแต่ละชนิดจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออนออร์โทฟิแนนโทรลีน และกรดซิตริกที่ศึกษา



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference

ผลการวิจัย

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ

ในงานวิจัยนี้ใช้ปฏิกิริยาทางแสงระหว่างกรดซิตริกและเฟอร์ริกไอออนโดยหลักการวิเคราะห์จำเป็นต้องหาเงื่อนไขที่ดีที่สุดและเหมาะสมที่สุดดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้เลือกศึกษา 3 ปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ พีเอชของบัฟเฟอร์อะซิเตต ความเข้มข้นของออร์โทไฟฟิแนทโรลีน และความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออนทดลองโดยใช้สารมาตรฐาน 5 – 40 ppm โดยสัญญาณที่ได้ประเมินจากความไว (sensitivity) ของการตรวจวัดซึ่งหมายถึง ความสามารถในการวัดความเข้มข้นที่แตกต่างกันน้อยๆ ได้ โดยการวิเคราะห์ที่มีความไวสูงจะสามารถตรวจวิเคราะห์สารในปริมาณน้อยมากๆ ได้อย่างถูกต้อง โดยสามารถดูได้จากความชัน (slope) ของกราฟนั่นเอง

1.1 ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์อะซิเตต

ในงานวิจัยได้เลือกศึกษาผลกระทบของพีเอชในช่วงระหว่างพีเอช 4 – 8 โดยใช้ความเข้มข้นของกรดซิตริก คือ 15, 30 และ 40 ppm ความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออนคือ 250 ppm และความเข้มข้นของออร์โทไฟฟิแนทโรลีน คือ 10 มิลลิโมลาร์ และใช้เวลา 60 วินาทีในการดูดสารละลายก่อนเข้าทำปฏิกิริยาทางแสงเป็นเวลา 30 วินาที ซึ่งพบว่าในช่วงความเป็นกรดมาก (พีเอช 4 – 5) จะทำให้เกิดการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออนเป็นเฟอร์รัสไอออนได้ดีกว่าในช่วงที่สารละลายมีสภาวะเป็นเบส เนื่องจากความสามารถในการละลายของเฟอร์ริกไอออนภายใต้พีเอชต่ำดีกว่าพีเอชสูง ซึ่งในช่วงพีเอชต่ำนั้นทำให้เกิดความเสถียรของเฟอร์ริกไอออนและไม่ก่อให้เกิดตะกอนของเฟอร์ริกไฮดรอกไซด์ ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) ที่สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะเป็นเบส นอกจากนี้ในช่วงพีเอชสูงนั้นจะแสดงความเป็นเบสมากและมีเกลือปนอยู่มากกว่าทำให้ความเสถียรในการทำปฏิกิริยาของเฟอร์ริกไอออนลดลง จากการทดลองพบว่าที่พีเอช 4 ให้ค่าสัญญาณที่ดีที่สุด เราจึงเลือกใช้พีเอช 4 เป็นสภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง



ภาพที่ 4 ความไวในการวิเคราะห์เทียบกับพีเอชของบัฟเฟอร์อะซิเตตในช่วง 4 - 8

1.2 ผลของความเข้มข้นของออร์โทไฟฟิแนทโรลีน

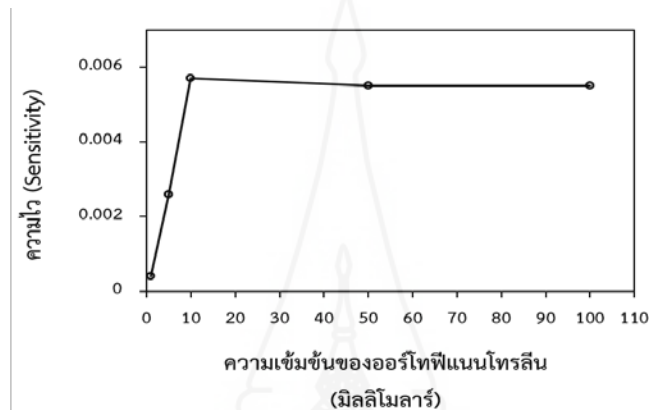
จากนั้นได้ทำการศึกษถึงผลกระทบของความเข้มข้นของออร์โทไฟฟิแนทโรลีนที่มีผลต่อการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน โดยได้เลือกศึกษาที่ความเข้มข้นในช่วง 1 – 100 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ความเข้มข้นของกรดซิตริก คือ 15, 30 และ 40 ppm พีเอชของบัฟเฟอร์อะซิเตตคือ พีเอช 4 และความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออนคือ 250 ppm และใช้เวลา



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference

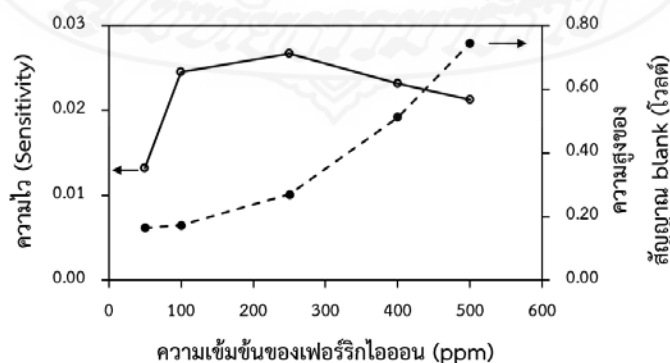
60 วินาทีในการดูดสารละลายก่อนเข้าทำปฏิกิริยาทางแสงเป็นเวลา 30 วินาที จากผลการทดลองพบว่าในช่วง 1 – 5 มิลลิโมลาร์ การวิเคราะห์ให้ผลที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำมากๆ รวมถึงความไว (sensitivity) ก็มีค่าน้อยด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามในช่วงความเข้มข้นที่มากขึ้น คือในช่วง 10 – 100 มิลลิโมลาร์พบว่าค่าการดูดกลืนแสงและค่าความไวมีค่าที่คงที่ดังนั้นจึงได้เลือกค่าความเข้มข้นที่ให้ประสิทธิภาพมากที่สุดและไม่เปลืองสารเคมี คือที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 5 ความไวในการวิเคราะห์เทียบกับความเข้มข้นของออร์โทฟอสเฟตในช่วง 1 – 100 มิลลิโมลาร์

1.3 ผลของความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออน

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออนในช่วงความเข้มข้น 50 – 500 ppm โดยใช้ความเข้มข้นของกรดซิตริก คือ 15, 30 และ 40 ppm พีเอชของบัฟเฟอร์อะซิเตตคือ พีเอช 4, และความเข้มข้นของออร์โทฟอสเฟต คือ 10 มิลลิโมลาร์และใช้เวลา 60 วินาทีในการดูดสารละลายก่อนเข้าทำปฏิกิริยาทางแสงเป็นเวลา 30 วินาทีโดยจากภาพที่ 6 เนื่องจากความสูงของสัญญาณ blank จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความไวในการตรวจวัดของระบบมีค่าลดลง ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออนที่ 250 ppm เพราะให้ค่าความไวมากที่สุด



ภาพที่ 6 ความไวในการวิเคราะห์เทียบกับความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออนในช่วง 50 – 500 ppm

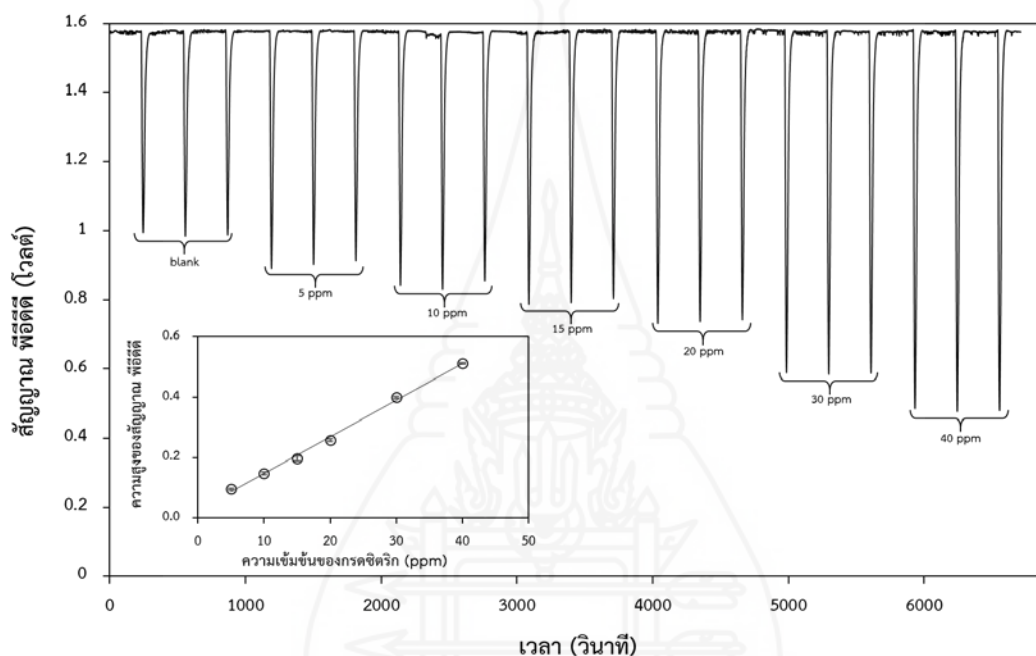


การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference

2. สัญญาณและกราฟมาตรฐาน

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ระบบการวิเคราะห์นี้ให้ความเป็นเส้นตรงจากการวิเคราะห์กรดซิตริก ในช่วง 0 – 40 ppm โดยให้สมการเส้นตรง คือ $\text{Signal}_{(\text{volt})} = (1.22 \pm 0.04) \times 10^{-2} C_{\text{citric}} + (2.42 \pm 0.82) \times 10^{-2}$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) คือ 0.9967 และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 13 ตัวอย่างในหนึ่งชั่วโมง โดยกราฟมาตรฐานและสัญญาณที่ตรวจวัดได้ แสดงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 สัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์กรดซิตริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ($n=3$) และกราฟมาตรฐาน

3. การประยุกต์ใช้ระบบเพื่อการวิเคราะห์กรดซิตริกในน้ำผลไม้เข้มข้น

ตัวอย่างน้ำผลไม้เข้มข้นจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยระบบการไหลแบบต่อเนื่องเพื่อใช้ในการหาปริมาณกรดซิตริก โดยใช้ความเข้มข้นของเฟอร์ริกไอออนคือ 250 ppm, พีเอชของบัฟเฟอร์อะซิเตตคือ พีเอช 4 และความเข้มข้นของออร์โทไฟฟเฟนโทโรลีน คือ 10 มิลลิโมลาร์ในการทำปฏิกิริยาและได้ทำการศึกษาค่าการวิเคราะห์กลับคืนของกรดซิตริกโดยการเติมกรดซิตริกเข้มข้น 10 ppm ลงในแต่ละตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 2 พบว่าค่าร้อยละการได้กลับคืนจากการเติมกรดซิตริกอยู่ในช่วงร้อยละ 106– 108 สำหรับน้ำมะขามและน้ำสับปะรด แสดงให้เห็นว่าสารรบกวนต่างๆ ที่อาจมีในตัวอย่างน้ำมะขามและน้ำสับปะรดไม่รบกวนการวิเคราะห์ สำหรับในตัวอย่างน้ำส้มร้อยละการได้กลับคืนของกรดซิตริกมีค่าเท่ากับ 117 และเนื่องจากเกณฑ์การยอมรับได้ของการคิดร้อยละการวิเคราะห์กลับคืนจะอยู่ในช่วงร้อยละ 85 - 115 จึงพบว่าสารรบกวนที่มีอยู่ในน้ำส้มมีผลต่อการวิเคราะห์กรดซิตริกอาจเกิดจากกรดแอสคอร์บิกที่อยู่ในน้ำส้ม เพราะกรดแอสคอร์บิกสามารถทำปฏิกิริยาทางแสงกับเฟอร์ริกไอออนได้เช่นเดียวกับกรดซิตริก จึงทำให้มีแนวโน้มการเกิดเฟอร์รัสไอออนและไปทำปฏิกิริยากับออร์โทไฟฟเฟนโทโรลีนมากขึ้นนั่นเอง



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์กรดซिटริกในตัวอย่างน้ำผลไม้โดยใช้ระบบซีเคิวนเซียลอินเจกชัน

ตัวอย่าง	กรดซิทริกที่เดิม (ppm)	กรดซิทริกที่พบ (ppm)	การได้กลับคืนของกรดซิทริก (%)
น้ำมะขาม	0	18.94 ± 0.004	-
	10	29.58 ± 0.002	106
น้ำสับปะรด	0	11.92 ± 0.001	-
	10	22.81 ± 0.004	108
น้ำส้ม	0	12.83 ± 0.005	-
	10	24.56 ± 0.002	117

หมายเหตุ ความเข้มข้นของกรดซิทริกที่ตรวจวัดได้ต้องคูณค่าการเจือจาง (dilution factor) จากการละลายในการเตรียมตัวอย่างก่อน จึงจะเป็นค่าความเข้มข้นที่แท้จริง

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ระบบซีเคิวนเซียลอินเจกชันควบคู่กับแฟร็กเม้นเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอด หรือ ฟลูออโรส สำหรับการตรวจวัดกรดซิทริกในน้ำผลไม้ได้ถูกพัฒนาขึ้น โดยระบบซีเคิวนเซียลอินเจกชันสามารถควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ทั้งหมด นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรีโดยใช้แฟร็กเม้นเตอร์ดีเทคเตอร์ไดโอดเป็นหน่วยตรวจวัดยังเป็นหน่วยตรวจวัดที่มีราคาถูกและสามารถนำไปใช้งานนอกสถานที่ได้ง่าย รวมถึงปฏิกิริยาที่ใช้เป็นปฏิกิริยาที่ไม่ก่อให้เกิดสารพิษหรือเป็นอันตรายในระหว่างกระบวนการวิเคราะห์ ซึ่งวิธีนี้ให้ความสามารถในการวิเคราะห์ที่ดีและเพียงพอต่อการวิเคราะห์กรดซิทริกในตัวอย่างน้ำผลไม้

ข้อเสนอแนะ

ระบบการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณของกรดซิทริกในตัวอย่างน้ำผลไม้ได้ และในอนาคตสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์กรดซิทริกในตัวอย่างเครื่องดื่มอื่นๆได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยทางเคมีของศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล (PERCH-CIC) และโครงการวิจัยได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากทุนสนับสนุนการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ของหน่วยเครื่องมือกลางจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล



การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 7

The 7th STOU National Research Conference

เอกสารอ้างอิง

- Lau, K. T., Baldwin, S., Shepherd, R. L., Dietz, P. H., Yezunis, W. S., & Diamond, D. (2004). Novel fused-LEDs devices as optical sensors for colorimetric analysis. *Talanta*, 63(1), 167-173.
- Leininger, E., & Katz, S. (1949). Fluorometric Method for Determination of Citric Acid. *Analytical Chemistry*, 21(7), 810-813.
- Luque-Pérez, E., Rios, A., & Valcárcel, M. (1998). Flow-injection spectrophotometric determination of citric acid in beverages based on a photochemical reaction. *Analytica Chimica Acta*, 366(1-3), 231-240.
- Monga, M. (2008). Quantitative assessment of citric acid in lemon juice, lime juice, and commercially-available fruit juice products. *International Braz J Urol*, 34(2), 235.
- Saavedra, L., García, A., & Barbas, C. (2000). Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 395-401.
- Sinclair, W. B., Bartholomew, E. T., & Ramsey, R. C. (1945). ANALYSIS OF THE ORGANIC ACIDS OF ORANGE JUICE. *Plant Physiology*, 20(1), 3-18.

