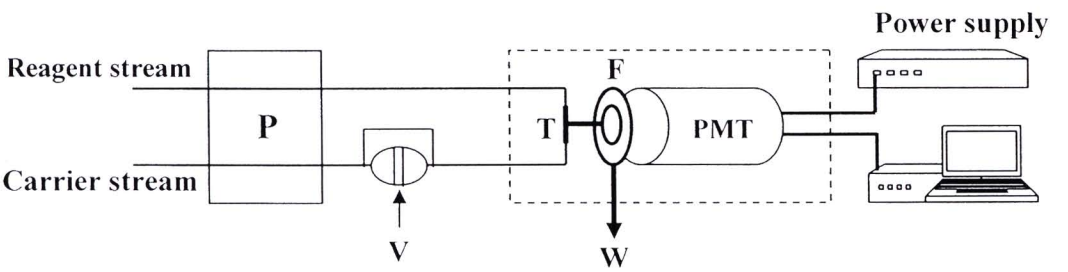
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการวิจัยฉบับนี้ได้ทำการสร้างและทดสอบวิธีเคมิลูมิเนสเซนต์โฟลอินเจคชันอะนาลิซิส (CL-FI) ร่วมกับเทคนิคการแยกสารด้วยระบบออนไลน์ ซึ่งอาศัยเทคนิคเพอร์วาพอเรชัน โฟลอินเจคชัน (PFI) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ในอาหารประเภทหมักดอง โดยนำเครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการมาประยุกต์ใช้ เพื่อให้ได้วิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ใช้ปริมาณสารตัวอย่างและสารรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาน้อย ซึ่งจะช่วยทำให้เกิดของเสียที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อย นอกจากนั้นระบบที่ใช้วิเคราะห์เป็นระบบปิด ทำให้มีผลดีให้ผู้ปฏิบัติการทดลองที่ไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีโดยตรง และวิธีการแยกสารแบบออนไลน์ ยังช่วยลดขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างให้น้อยลง ทำให้การวิเคราะห์ทำได้อย่างรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

3.1 การออกแบบ Flow diagram สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์โดยเทคนิคเคมิลูมิเนสเซนซ์โฟลอินเจคชัน (CL-FI)



รูป 3.1 ระบบเคมิลูมิเนสเซนซ์โฟลอินเจคชัน (CL-FI)

Reagent stream (8×10^{-5} M $KMnO_4$ ใน sodium hexametaphosphate ใน 0.02 M H_3PO_4); Carrier stream (0.75% (m/v) sodium hexametaphosphate ใน 0.02 M H_3PO_4); V, valve (300 µl sample loop); T, T-shaped connector; F, flat spiral coil flow cell; PMT, photomultiplier tube; W, waste

โดยในการทดลองขั้นต้นได้ทำการศึกษาและออกแบบการตรวจวัดแบบเคมิลูมิเนสเซนต์โฟลอินเจคชันโดยใช้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตเป็นรีเอเจนต์ สำหรับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์โดยเทคนิค CL-FI ที่ได้ทำการศึกษานี้มีการใช้สารตัวพาคือสารละลาย 1% โดยน้ำหนัก โซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตที่อยู่ในสภาวะกรดและมีรีเอเจนต์โพแทสเซียมเปอร์แมงกา

เนตที่อยู่ในสภาพกรดในสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตเข้มข้น 1%โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นตัวออกซิไดส์ในการทำปฏิกิริยากับซัลไฟต์

ทฤษฎีของการวิเคราะห์คือเมื่อฉีดสารตัวอย่างซัลไฟต์เข้าไปในกระแสตัวพา สารละลายตัวพาจะถูก ปั๊มนำเอาสารละลายผสมของตัวพาและสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ FI-CL โดยซัลไฟต์ในสารผสมจะเข้าเกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนต์โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตทันทีบริเวณ ที่ตัวต่อรูปตัวทีโดยปฏิกิริยารีดักชันของซัลไฟต์กับโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่อยู่ในสภาพกรดในตัวกลางสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต 1% โดยน้ำหนัก ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกลางช่วยทำให้กระบวนการการคายแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ของไอออน Mn^{2+} ที่สภาวะกระตุ้นสามารถตรวจวัดได้ในเวลาที่เหมาะสมดังสมการ

$$MnO_4^- + 5e^- + 8H^+ \longrightarrow Mn^{2+} + 4H_2O \quad (1)$$

$$SO_3^{2-} + 5H_2O \longrightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e^- \quad (2)$$

ปฏิกิริยารวม

$$2MnO_4^- + 5SO_3^{2} + 6H^+ \longrightarrow 2Mn^{2+*} + 5SO_4^{2-} + 3H_2O \quad (3)$$

$$2Mn^{2+*} \longrightarrow 2Mn^{2+} + h\nu\ (595\ nm) \quad (4)$$

เมื่อ * คือ สภาวะกระตุ้น

แสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ของไอออน Mn^{2+} ที่คายออกมามีความยาวคลื่นประมาณ 595 นาโนเมตร[47] ซึ่งมีความเข้มแสงในช่วงความยาวคลื่น ดังกล่าวตรงกับช่วงคลื่นของแสงสีแดงโดยแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ที่ถูกผลิตขึ้นจะถูกตรวจวัดโดยหลอดวัดแสงโฟโตมัลติพลายเออร์ (PMT) และส่งสัญญาณไปยังเครื่องบันทึกผลเพื่อบันทึกผลที่ได้ออกมาในรูปของพีคสัญญาณ

3.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยระบบเคมิลูมิเนสเซนต์โฟลอินเจคชัน

ในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ด้วยระบบ CL-FI จาก แผนภาพในรูป 3.1 มีสภาวะเริ่มต้นก่อนที่จะทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมแสดงดังตาราง 3.1 ซึ่งใช้สภาวะเริ่มต้นนี้ได้เลียนแบบขึ้นจากงานวิจัยการหาสารหนู[48] ในระบบโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่รายงานไว้

ตาราง 3.1 สภาวะเริ่มต้นในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ด้วยระบบ CL-FI

พารามิเตอร์	สภาวะเริ่มต้น
ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอด PMT	950 โวลต์
กระแสตัวพา	
ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริก	0.02 โมลาร์
ความเข้มข้นของโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต	1% (m/v)
กระแสรีเอเจนต์	
ความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต	5.0×10^{-5} โมลาร์
อัตราการไหลของกระแสรีเอเจนต์และกระแสตัวพา	2.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรสารตัวอย่าง	300 ไมโครลิตร

3.1.1.1 **การศึกษาชนิดของกรดที่เหมาะสม**

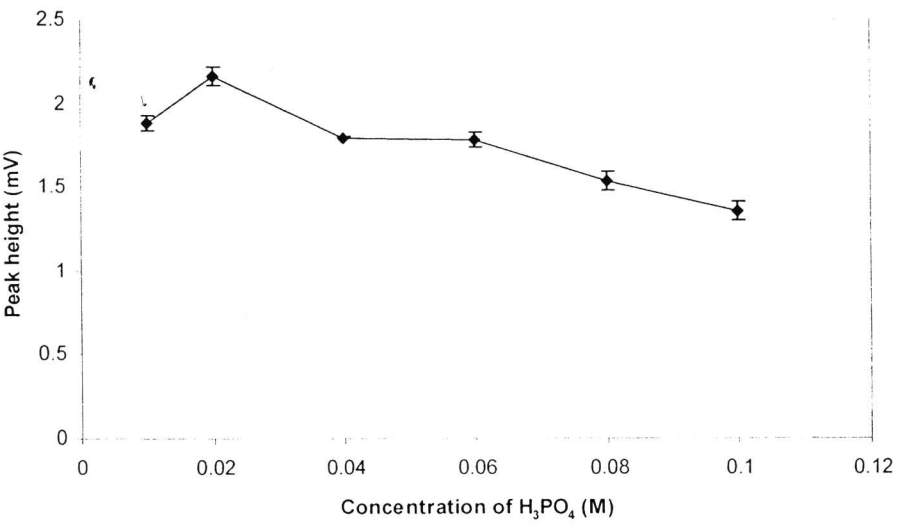
การศึกษาชนิดของกรดที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวกลางในกระแสตัวพาและกระแสรีเอเจนต์ ได้ใช้กรด 4 ชนิด คือกรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก กรดฟอสฟอริก และกรดซัลฟิวริก ที่มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ มาทดสอบการคายแสงของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรกับระบบ CL-FI ที่สร้างขึ้น พบว่าได้ผลดังตาราง 3.2 โดยพบว่ากรดที่เหมาะสมที่ใช้เป็นตัวกลางในกระแสตัวพาและกระแสรีเอเจนต์คือกรดฟอสฟอริก ซึ่งให้ค่าสัญญาณ CL intensity สูงกว่ากรดชนิดอื่น ซึ่งกรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก ให้สัญญาณเคมิลูมิเนสเซนซ์ที่ต่ำ เนื่องจากกรดไนตริก และกรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวออกซิไดส์ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตแทนสารตัวอย่างซึ่งจะทำให้สัญญาณการคายแสงเคมิลูมิเนสเซนต์ลดลง[49-50]

ตาราง 3.2 การเปรียบเทียบชนิดของกรดที่ใช้เป็นตัวกลางในกระแสตัวพาและกระแสรีเอเจนต์

ชนิดของกรด	ความสูงของพีค (mV)
HCl	0.116 ± 0.02
HNO_3	0.183 ± 0.02
H_3PO_4	2.017 ± 0.02
H_2SO_4	1.717 ± 0.02

3.1.1.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดฟอสฟอริก

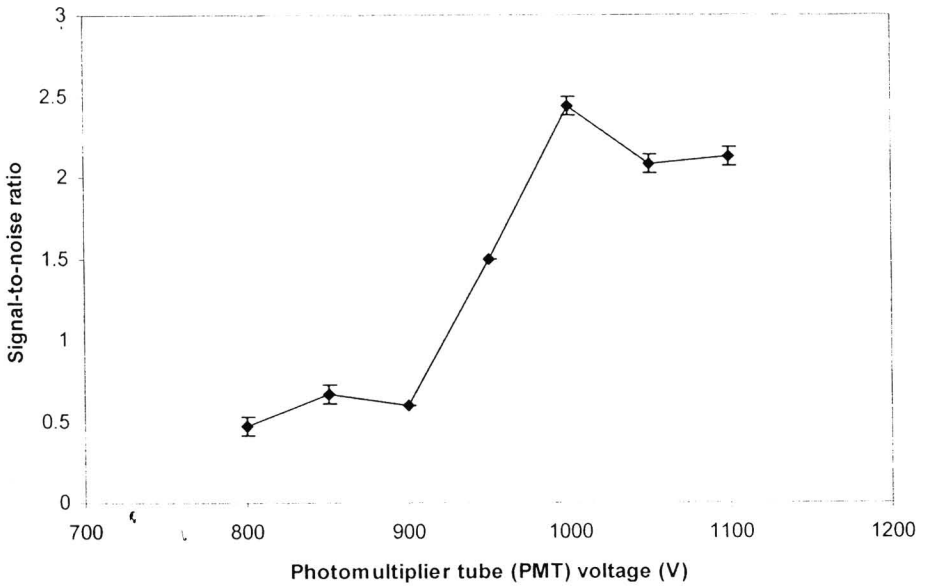
การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดฟอสฟอริก จะใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากตาราง 3.1 โดยศึกษาความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่มีผลต่อการคายแสงเคมิลูมิเนสเซนต์ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.01-0.10 โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในรูป3.2 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดฟอสฟอริกที่ใช้จะมีค่าเท่ากับ 0.02 โมลาร์ (pH=2.72) ซึ่งจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกและการคายแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์จะพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกเพิ่มมากกว่า 0.02 โมลาร์ กลับจะทำให้ค่าสัญญาณการคายแสงของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ยิ่งมีค่าลดลง



รูป 3.2 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดฟอสฟอริก

4.1.1.3 การศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่จ่ายแก่หลอดวัดแสงโฟโตมัลติพลายเออร์

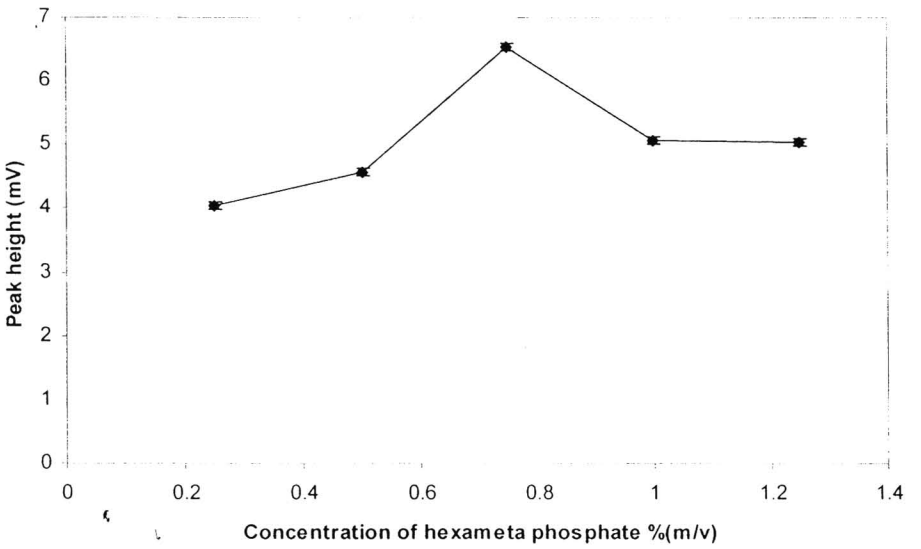
เมื่อทำการทดลองหาศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอด PMT ในช่วงความต่างศักย์ 800-1100 โวลต์ โดยใช้สภาวะที่ใช้ในการทดลองดังตาราง 3.1 พบว่าได้ผลดังแสดงในรูป 3.3 โดยค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการจ่ายให้แก่หลอด PMT เท่ากับ 1000 โวลต์ ซึ่งที่ค่าศักย์ไฟฟ้านี้พบว่ามีค่าสัญญาณการคายแสงของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีต่อสัญญาณพื้นหลัง (signal-to-noise ratio) มีค่าสูงสุด โดยที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่สูงกว่านี้พบว่า จะทำให้ค่าสัญญาณพื้นหลังมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก ทำให้การวัดสัญญาณที่ได้ไม่ดีนัก และนอกจากนั้นแล้วค่าศักย์ไฟฟ้าที่สูงเกินไปก็ไม่เป็นที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิต เนื่องจากจะทำให้ หลอด PMT เสื่อมสภาพได้เร็วกว่าที่ควร



รูป 3.3 ผลการศึกษาหาศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่จ่ายแก่หลอด PMT

3.1.1.4 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต

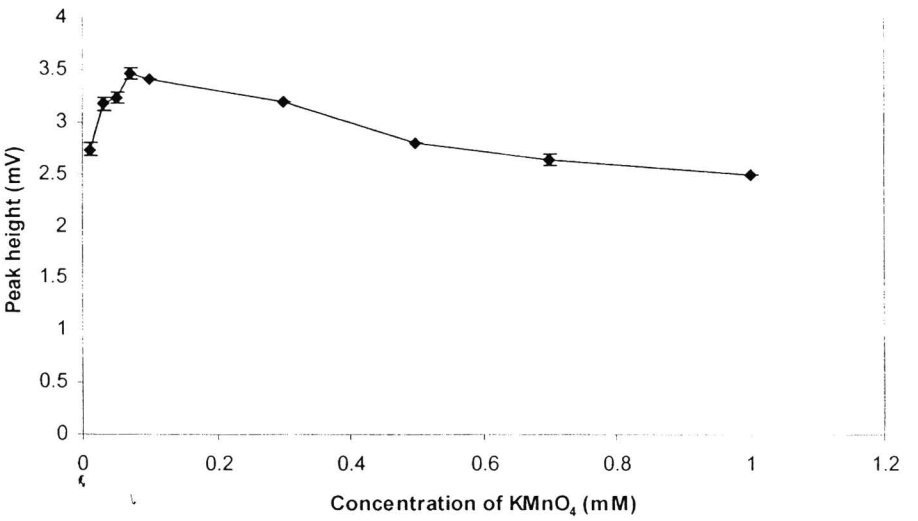
การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตที่ใช้เป็นสารตัวกลางที่เติมลงในกระแสตัวพา จะใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.1.1.1-3.1.1.3 โดยได้ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตในช่วงความเข้มข้น 0.25-1.25 % โดยน้ำหนัก ซึ่งพบว่าได้ผลดังแสดงในรูป 3.4 โดยที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตที่หาได้จากกราฟมีค่าเท่ากับ 0.75%โดยน้ำหนัก ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้จะทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตให้มากขึ้นมากกว่า 0.75% ก็ไม่ทำให้สัญญาณการคายแสงเพิ่มขึ้นแต่ประการใด โดยในการเติมสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตเนื่องจากต้องการให้การเกิดปฏิกิริยาการคายแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ของสารตัวอย่างเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายรีเอเจนต์ มีระยะเวลาในการคายแสงที่นานขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุลรูปทรงแบบมงกุฎของเฮกซะเมตาฟอสเฟต จะช่วยจับไอออน Mn^{2+} ที่อยู่ในสภาวะกระตุ้นมีช่วงชีวิตที่ยาวนานยิ่งขึ้น[51]



รูป 3.4 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต

3.1.1.5 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตในกระแสรีเอเจนต์

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ ข้อ 3.1.1.1-3.1.1.4 มาใช้ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตในกระแสรีเอเจนต์ที่มีสภาพเป็นกรดในสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต ในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-5} - 1.0×10^{-3} โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในรูป 3.5 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคายแสงเคมิลูมิเนสเซนต์ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 7.0×10^{-5} โมลาร์ ซึ่งถ้าเพิ่มความเข้มข้นมากกว่า 7.0×10^{-5} โมลาร์ ไม่ทำให้สัญญาณการคายแสงเพิ่มขึ้นแต่กลับทำให้สัญญาณลดต่ำลง ซึ่งอาจเกิดจากการที่สารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่มีความเข้มข้นมากเกินไปทำให้เกิดการดูดกลืนแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ที่คายออกมาในบางส่วน (self absorption) ทำให้โฟตอนที่ถูกผลิตขึ้นมีจำนวนลดน้อยลงเนื่องจากผลของ inner filter effect



รูป 3.5 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ในกระแสตัวพา

3.1.1.6 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซัลไฟต์ด้วยระบบเคมิลูมิเนสเซนต์โฟลอินเจคชัน

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการวิเคราะห์ด้วยระบบเคมิลูมิเนสเซนต์โฟลอินเจคชัน สามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นสามารถทำให้ระบบ CL-FI มีประสิทธิภาพสูงสุดจากปัจจัยต่าง ๆ ทั้งทางกายภาพและทางเคมีได้ดังแสดงในตาราง 3.3

ตาราง 3.3 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ด้วยระบบ CL-FI

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายหลอด PMT	1000 โวลต์
ชนิดของกรด	H_3PO_4
ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริก	0.02 โมลาร์
ความเข้มข้นของโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต	0.75% โดยน้ำหนัก
ความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต	7.0×10^{-5} โมลาร์

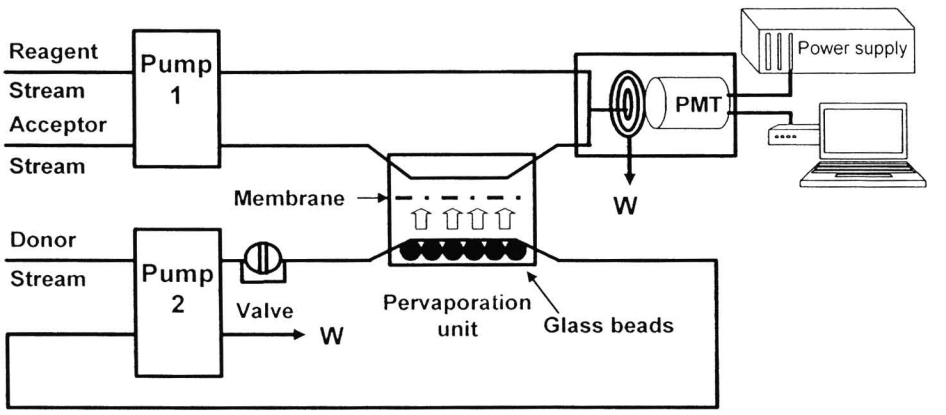
3.2 การออกแบบ Flow diagram สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์โดยเทคนิคเพอร์วาพอเรชันโฟลอินเจคชัน

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในอาหาร ที่แนะนำโดย AOAC [22] ที่อาศัยการกลั่นด้วยกรด (acid distillation) ของสารประกอบซัลไฟต์ที่มีอยู่ให้ออกมาในรูปก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์เพื่อเป็นการแยกสารประกอบซัลไฟต์ออกมาจากอาหารและสิ่งปนเจือปนอื่น ดังสมการ (1)

$$SO_3^{2-}{}_{(aq)} + 2H^+{}_{(aq)} \longrightarrow SO_{2\,(g)} + H_2O_{(l)} \qquad (5)$$

จากความรู้พื้นฐานดังกล่าว จึงนำไปสู่การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีการโฟลอินเจคชันแบบใหม่ ที่มีการแยกสารแบบออนไลน์ โดยใช้เทคนิคเพอร์วาพอเรชันมาช่วยแยกซัลไฟต์ออกจากเมทริกซ์อื่นๆ โดยการฉีดสารละลายซัลไฟต์ลงไปผสมกับสารละลายกรดซัลฟิวริกในกระแสตัวพา ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับซัลไฟต์ที่ฉีดลงไป ได้เป็นก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งเมื่อนำมาใช้กับระบบการแยกสารแบบออนไลน์ที่มีการใช้เยื่อเลือกผ่าน (semi-permeable membrane) เพื่อแยกก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ออกจากสารผสม ก็จะสามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการแยกสารตัวอย่างออกจากสารตัวอย่างที่สกปรกและมีการปนเปื้อนสูงได้เป็นอย่างดี

โดยขั้นแรกของงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้หน่วยเพอร์วาพอเรชัน (pervaporation unit) มาช่วยในการแยกโดยอาศัยการระเหยของก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์บริเวณด้านบนของกระแสตัวพาเหนือ glass beads ของหน่วยแยกสารเพอร์วาพอเรชันก่อนที่ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะแพร่ผ่านเยื่อเลือกผ่านแล้วเข้าทำไปทำปฏิกิริยากับสารเคมีบางอย่างในตัวพา (โซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต) แล้วผ่านเข้าสู่ตัวผสมรูปตัวทีเพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์โพเทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่อยู่ในกระแสรีเอเจนต์ โดยมีสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตในสภาวะที่เป็นกรดเป็นตัวกลางช่วยทำให้การคายแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ของไอออน Mn^{2+} ที่สภาวะกระตุ้น ให้สามารถเกิดได้ในระยะเวลาที่เหมาะสมและสามารถตรวจวัดแสงเคมิลูมิเนสเซนต์ได้ การวัดแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์เมื่อไอออน Mn^{2+} กลับลงมายังสถานะพื้น จะถูกตรวจวัดโดยหลอดวัดแสง PMT และส่งสัญญาณไปยังเครื่องบันทึกผลเพื่อบันทึกผลที่ได้ออกมาในรูปของพีคสัญญาณ



รูป 3.6 ระบบเพอร์วาพอเรชันโฟลอินเจคชัน เคมิลูมิเนสเซนซ์ (PFI-CL)

Reagent stream (8.0×10^{-5} M $KMnO_4$ in 0.75% sodium hexametaphosphate in 0.02 phosphoric acid); Acceptor stream (0.75 % sodium hexametaphosphate in 0.02 M H_3PO_4, pH = 2.70); Donor stream (0.20 M H_2SO_4); Injection valve (500 µl sample loop); PMT, photomultiplier tube; W, waste

3.2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ด้วยระบบ PFI-CL จากแผนภาพเครื่องมือในรูป 3.6 ได้มีการกำหนดให้มีสภาวะเริ่มต้นก่อนที่จะทำการหาสภาวะที่เหมาะสมดังตาราง 3.4 โดยในการพัฒนาระบบ PFI-CL ภายในหน่วยเพอร์วาพอเรชันจะมี glass beads ทำหน้าที่ผสมสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานซัลไฟต์กับสารตัวพา ทำให้เกิดก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ขึ้นภายในช่องกระแสตัวพาของหน่วยเพอร์วาพอเรชันจากนั้น ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะระเหยขึ้นสู่ช่องอากาศที่อยู่เหนือผิวหน้าของสารละลายกระแสตัวพา ก่อนที่จะแพร่สู่เยื่อเลือกผ่านไปยังกระแสของสารตัวรับ

โดยในการนำสารตัวพา ไปยังหน่วยเพอร์วาพอเรชัน และการนำเอาสารตัวพาออกจากหน่วยเพอร์วาพอเรชันจะอาศัยปั๊ม ในการควบคุมให้สารละลายอยู่เหนือระดับผิวหน้าของ glass beads พอดี โดยต้องควบคุมอัตราการไหลของสารละลายก่อนเข้าสู่และหลังออกจากหน่วยเพอร์วาพอเรชันให้มีอัตราการไหลที่เท่ากัน เพื่อต้องการให้สารละลายอยู่ในระดับผิวหน้าของ glass beads พอดี และเหลือพื้นที่ว่างของช่องอากาศ (air gap) ระหว่าง glass beads และเยื่อเลือกผ่านให้มีปริมาตรคงที่ ซึ่งจะมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการวิเคราะห์ที่จะทำให้ผลการทดลองมีความถูกต้อง และแม่นยำสม่ำเสมอตลอดการทดลอง[52]

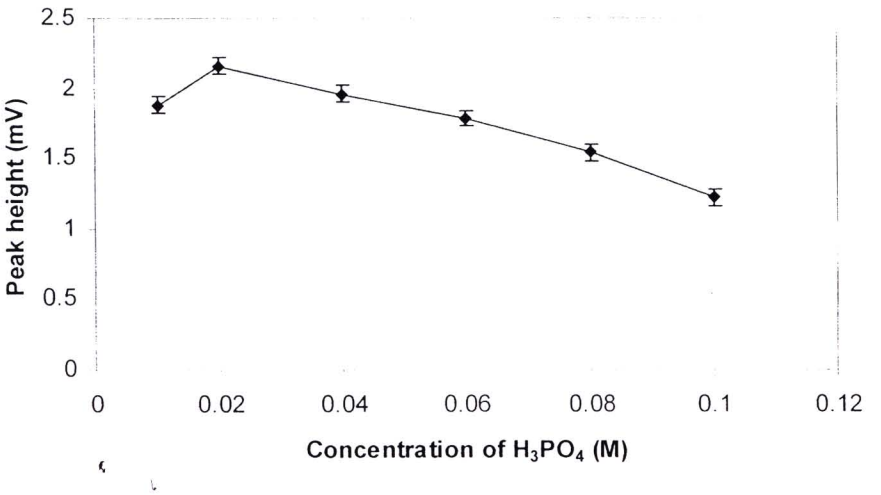
ตาราง 3.4 สภาวะเริ่มต้นในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ด้วยระบบเพอร์วาพอเรชันเคมิลูมิเนสเซนซ์ (PFI-CL)

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอด PMT	1000 โวลต์
Acceptor stream	
ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริก	0.02 โมลาร์
ความเข้มข้นของโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต	0.75% โดยน้ำหนัก
อัตราการไหลกระแสรีเอเจนต์และกระแสตัวรับ	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรสารตัวอย่าง	300 ไมโครลิตร
Reagent stream	
ความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตในกระแสรีเอเจนต์	7.0×10^{-5} โมลาร์
Donor stream	
ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก	0.1 โมลาร์
อัตราการไหล	2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

3.2.1.1 **การศึกษาผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดฟอสฟอริก**

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดฟอสฟอริกที่ใช้เป็นตัวกลางในกระแสตัวรับและกระแสรีเอเจนต์ จะใช้สภาวะเริ่มต้นของระบบ PFI-CL จากตาราง 3.4 โดยทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.01-0.10 โมลาร์ ที่ทำให้เกิดสัญญาณเคมิลูมิเนสเซนซ์ของสารละลายซัลไฟต์ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีค่าสูงสุด ซึ่งจากการทดลองได้ผลดังแสดงในรูป 3.7 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดฟอสฟอริก ที่หาได้มีค่าเท่ากับ 0.02 โมลาร์ (pH=2.72) โดยได้ผลคล้ายคลึงกับระบบ FI-CL จากข้อ 3.1.1.2 โดยความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ (0.01-0.02 โมลาร์) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้นจะให้สัญญาณของแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ที่สูงขึ้น แต่ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่สูงกว่า 0.02 โมลาร์ กลับจะพบว่าทำให้ค่าสัญญาณการคายแสงของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าลดต่ำลง ดังนั้นจึงจะใช้ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่ 0.2 โมลาร์ในการทดลองที่เหลือต่อไป

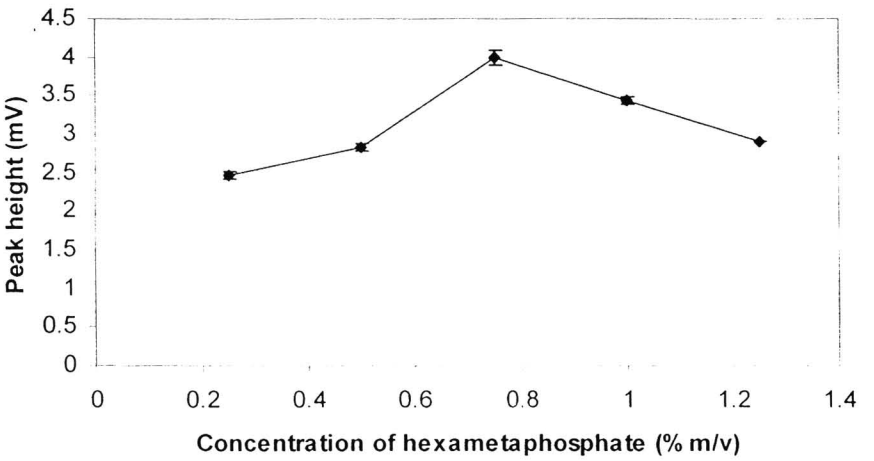
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูป 3.7 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดฟอสฟอริก

3.2.1.2 **การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต**

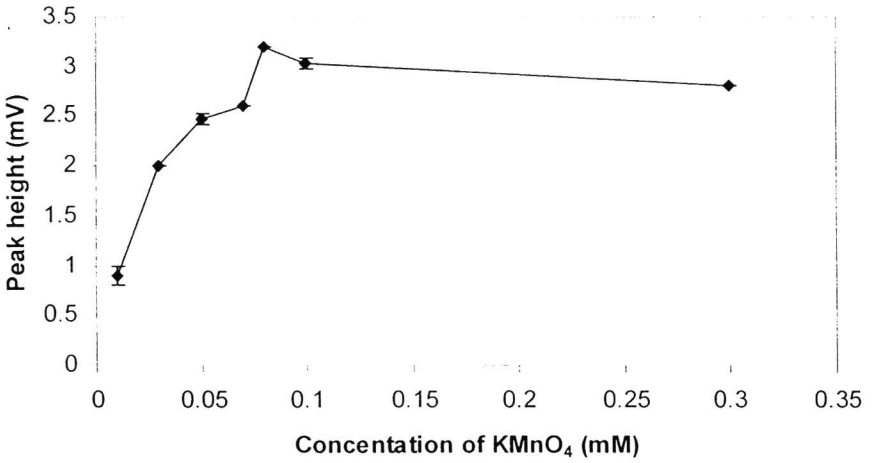
ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตที่เติมลงไปในกระแสตัวรับและกระแสรีเอเจนต์ จะทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.25-1.25 %โดยน้ำหนัก ซึ่งพบว่าได้ผลดังแสดงในรูป 3.8 โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตที่จะทำให้สัญญาณแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ของสารมาตรฐานซัลไฟต์ เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรมีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ 0.75% โดยน้ำหนักโดยจะสังเกตได้ว่าในช่วงความเข้มข้นต่ำ ๆ จะพบว่าสัญญาณการคายแสงที่ตรวจวัดได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุด เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตมีค่าเท่ากับ 0.75 % และหลังจากจุดนี้ แม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นขึ้นไปอีก สัญญาณเคมิลูมิเนสเซนต์จะไม่เพิ่มขึ้นแต่กลับมีแนวโน้มที่ค่อย ๆ ลดลง ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต ที่ใช้เติมในกระแสตัวรับและกระแสรีเอเจนต์ ในการศึกษาขั้นต่อไปจะกำหนดไว้ที่ 0.75 % โดยน้ำหนัก



รูป 3.8 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต

3.2.1.3 การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตในกระแสรีเอเจนต์

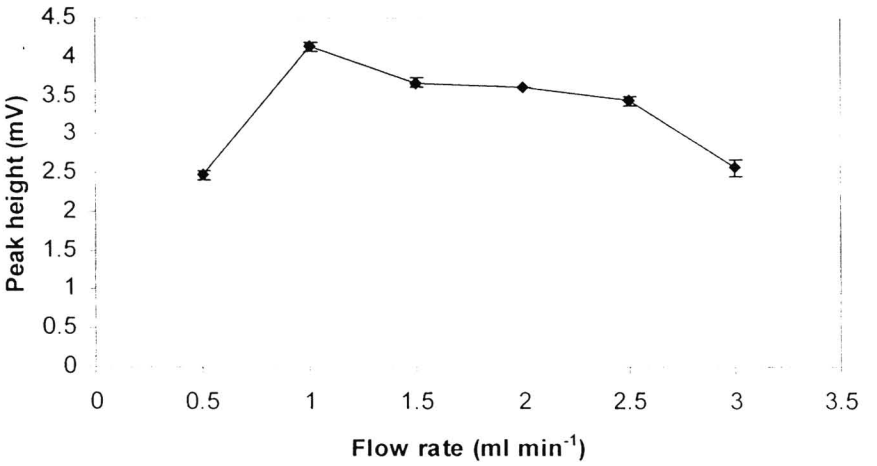
การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่อยู่ในกระแสรีเอเจนต์ที่มีสภาพกรดในสารละลายโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต ในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-5} - 3.0×10^{-4} โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในรูป 3.9 โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตในช่วงความเข้มข้นต่ำๆ จะพบว่าสัญญาณการคายแสงที่ตรวจวัดได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้น 8.0×10^{-5} โมลาร์ และหลังจากจุดนี้แม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นขึ้นไปอีก สัญญาณเคมิลูมิเนสเซนต์กลับมีค่าคงที่โดยมีแนวโน้มที่จะค่อย ๆ ลดลงอันเป็นผลมาจากการเกิด self absorption ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ใช้ในกระแสรีเอเจนต์ ในการศึกษานี้ต่อไปจะกำหนดไว้ที่ 8.0×10^{-5} โมลาร์



รูป 3.9 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ในกระแสรีเอเจนต์

3.2.1.5 การศึกษาอัตราการไหลของกระแสตัวรับและกระแสรีเอเจนต์ที่มีต่อการตรวจวัด

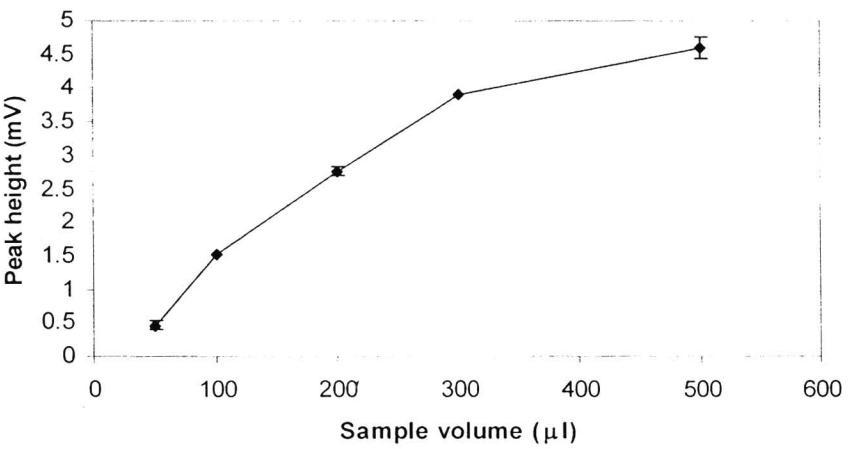
อัตราการไหลที่เหมาะสมของกระแสตัวรับและกระแสรีเอเจนต์ที่ไหลเข้าสู่เครื่องตรวจวัดแสงเคมิลูมิโนมิเตอร์ จะทำการศึกษาโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่หาได้จากข้อ 3.2.1.1- 3.2.1.4 โดยจะควบคุมให้อัตราการไหลของแต่ละกระแสมีค่าเท่ากันโดยทำการศึกษาอัตราการไหลในช่วง 0.5-3.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งจะพบว่าได้ผลดังแสดงในรูป 3.10 ซึ่งจะเห็นว่าที่อัตราการไหลของแต่ละกระแสที่สูงกว่า 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีทั้งของกระแสตัวรับ และกระแสรีเอเจนต์ (อัตราการไหลรวม 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที) ไม่พบว่าสัญญาณแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้เพิ่มสูงขึ้นแต่ประการใด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อ ๆ ไป จึงจะเลือกอัตราการไหลรวมที่มีค่าเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งนอกจากนี้เป็นการประหยัดสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารตัวพาและรีเอเจนต์แล้วยังจะช่วยป้องกันให้เยื่อเลือกผ่านที่กั้นอยู่ระหว่าง กระแสตัวรับและช่องอากาศในหน่วยเพอร์-วาพอเรชันไม่ให้รับแรงดันจากอัตราการไหลที่มากเกินไป ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการโป่งพองของเยื่อเลือกผ่าน และทำให้ปริมาตรของสารตัวรับที่อยู่ในช่องรับสารในหน่วยเพอร์วาพอเรชัน มีค่าที่ผิดเพี้ยนไปจากเดิม



รูป 3.10 ผลการศึกษาอัตราการไหลของกระแสตัวรับและกระแสรีเอเจนต์

3.2.1.6 **การศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดลงไปในระบบเพอร์วาพอเรชันโฟลอินเจคชัน**

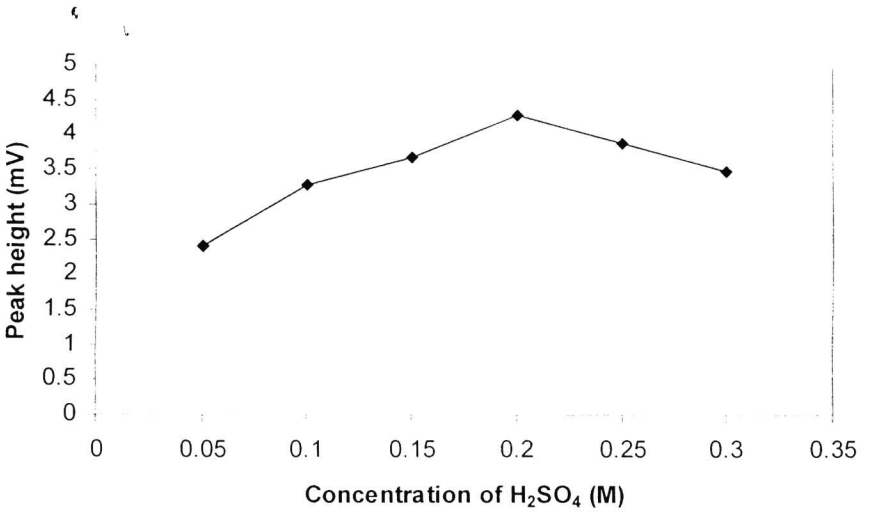
การศึกษาผลของปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดลงไปในระบบเพื่อให้สารประกอบซัลไฟต์ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกที่อยู่ในกระแสตัวพา เพื่อทำให้เกิดเป็นก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่มีปริมาณเหมาะสมเพียงพอที่จะทำให้สามารถตรวจวัดได้ด้วยระบบเคมิลูมิเนสเซนซ์ที่สร้างนั้น ได้ทำการศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างซัลไฟต์ที่ฉีดลงไปในระบบในช่วง 50-500 ไมโครลิตร พบว่าได้ผลดังแสดงในรูป 3.11 ปริมาตรของสารมาตรฐานซัลไฟต์เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ฉีดเพิ่มขึ้นทำให้สัญญาณเคมิลูมิเนสเซนต์ที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มที่จะให้สัญญาณคงที่เมื่อปริมาตรที่ใช้เพิ่มขึ้นมากกว่า 500 ไมโครลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาตรสารตัวอย่างที่จะฉีดเข้าไปในระบบเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ในการศึกษาสำหรับการทดลองขั้นต่อๆ ไป



รูป 3.11 ผลการศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ฉีดลงไปในระบบ

3.2.1.7 การศึกษาผลจากความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในกระแสตัวให้

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดซัลฟิวริกที่ใช้เป็นกระแสตัวให้ จะใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1.1-3.2.1.6 โดยศึกษาความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในช่วง 0.05-0.3 โมลาร์ พบว่าได้ผลดังแสดงในรูป 3.12 ซึ่งจะเห็นว่าที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ จะพบว่าสัญญาณการคายแสงที่ตรวจวัดได้จะมีค่าค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และหลังจากจุดนี้ สัญญาณเคมิลูมิเนสเซนซ์ค่อย ๆ ลดลง ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายซัลฟิวริก ที่ใช้เป็นกระแสตัวพา ในการศึกษานี้ต่อไปจะกำหนดไว้ที่ 0.2 โมลาร์ โดยอัตราการไหลของกรดซัลฟิวริกที่เป็นกระแสตัวพาจะกำหนดให้เท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเท่ากับอัตราการไหลรวมของส่วนตรวจวัดแบบเคมิลูมิเนสเซนต์ที่อยู่ด้านบน (acceptor chamber) ที่ศึกษาไปก่อนหน้านี้



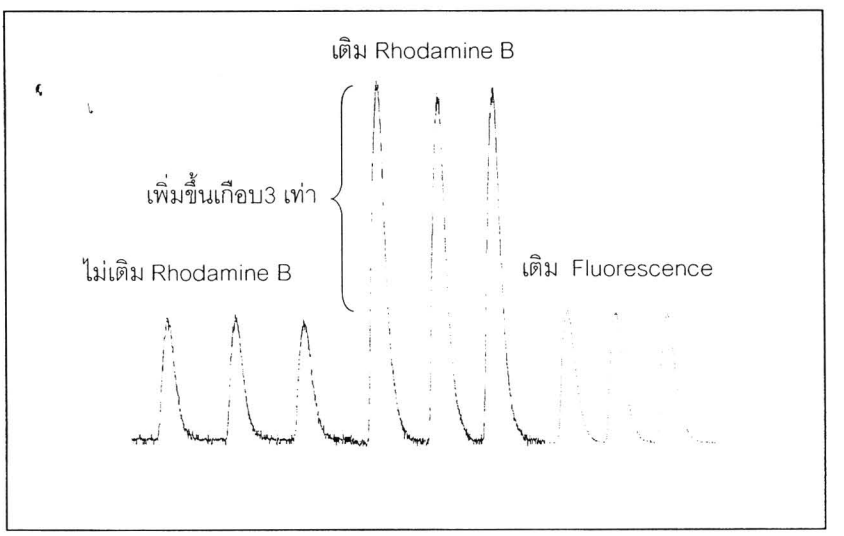
รูป 3.12 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดซัลฟิวริกที่ใช้เป็นกระแสตัวให้

3.2.1.8 ผลของฟลูออโรฟอร์ต่อการเพิ่มสภาพไวของการวิเคราะห์

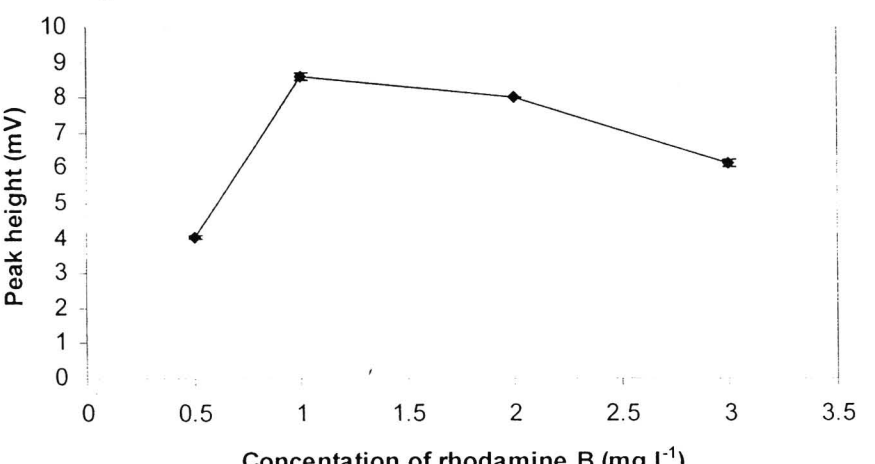
ในรายงานการวิจัยหลาย ๆ ฉบับ ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดแบบเคมิลูมิเนสเซนต์ที่ใช้โพแทสเซียมเปอร์แมงการเนตเป็นรีเอเจนต์ เช่น งานวิจัยในการศึกษาหาปริมาณกรดแอสคอร์บิคในยาวิตามินซี และดีเอ็นเอ มีการใช้โรดามีน บี (Rhodamine B) ทำปฏิกิริยากับซีเรียม (cerium (IV)) ในกรดซัลฟิวริกที่ใช้เป็นตัวกลาง[53-54] พบว่าสารประกอบฟลูออโรฟอร์บางชนิด เช่น โรดามีน บี ควินิน และฟลูออเรสซีน สามารถช่วยเพิ่มสภาพไวของการวิเคราะห์ได้ 2 ถึง 10 เท่า ดังนั้น ในการวิจัยนี้ จึงได้ทำการเติมสารฟลูออโรฟอร์ 2 ชนิด (ฟลูออเรสซีน และโรดามีน บี) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรลงไปในกระแสตัวรับ โพแทสเซียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต เพื่อศึกษาผลการเพิ่ม

สภาพไวของการตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบ PFI-CL ที่สร้างขึ้น โดยพบว่ามีเพียง โรดามีน บี เท่านั้นที่ช่วยเพิ่มสัญญาณ การตรวจวัดเคมิลูมิเนสเซนต์ขึ้นประมาณ 3 เท่า (รูป 3.13) ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าเกิดจากช่วยขยายสัญญาณการเรืองแสงที่เกิดขึ้นจาก Mn^{2+} ดังนั้นในการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโรดามีน บี ที่เติมลงไปเพื่อเพิ่มสัญญาณการคายแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ให้สูงขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ให้สูงขึ้น

จึงได้ทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1.1-3.2.1.7 โดยศึกษาความเข้มข้นของโรดามีน บี ในช่วง 0.5-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของโรดามีน บี ในกระแสตัวรับที่มีค่าเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้สัญญาณเคมิลูมิเนสเซนต์เพิ่มขึ้นได้สูงที่สุด ดังแสดงในรูป 3.14



รูป 3.13 ตัวอย่าง PFI-CL gram ของสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมฟลูออโรฟอร์บางชนิด



รูป 3.14 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Rhodamine B

3.2.1.9 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยระบบเพอร์วาพอเรชันโฟลอินเจคชัน เคมิลูมิเนสเซนต์

จากการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยระบบ PFI-CL สามารถสรุปสภาวะการทดลองที่สามารถทำให้ระบบ PFI มีประสิทธิภาพสูงสุดจากปัจจัยต่าง ๆ ดังแสดงในตาราง 3.5

ตาราง 3.5 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ด้วยระบบ PFI-CL

พารามิเตอร์	ช่วงที่ศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
ศักย์ไฟฟ้าที่จ่ายแก่หลอด PMT	800-1,100 โวลต์	1,000 โวลต์
Acceptor stream		
ความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริก	0.01-0.1โมลาร์	0.02 โมลาร์
ความเข้มข้นของโซเดียมเฮกซะเมตา-ฟอสเฟต	0.25-1.25% โดยน้ำหนัก	0.75% โดยน้ำหนัก
อัตราการไหลของกระแสตัวรับและกระแสรีเอเจนต์	0.5-3.0 มิลลิลิตรต่อนาที	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรสารตัวอย่าง	50-500 ไมโครลิตร	500 ไมโครลิตร
ความเข้มข้นของ Rhodamine B	0.5-3 มิลลิกรัมต่อลิตร	1 มิลลิกรัมต่อลิตร
Reagent stream		
ความเข้มข้นของโพแทสเซียมเปอร์แมง-กาเนตในกระแสรีเอเจนต์	1.0×10^{-5}- 3.0×10^{-4}โมลาร์	8.0×10^{-5} โมลาร์
Donor stream		
ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก	0.05-0.3 โมลาร์	0.2 โมลาร์
อัตราการไหล	-	2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

3.2.2 คุณลักษณะเฉพาะของระบบเพอร์วาพอเรชัน เคมิลูมิเนสเซนซ์โฟลอินเจคชัน

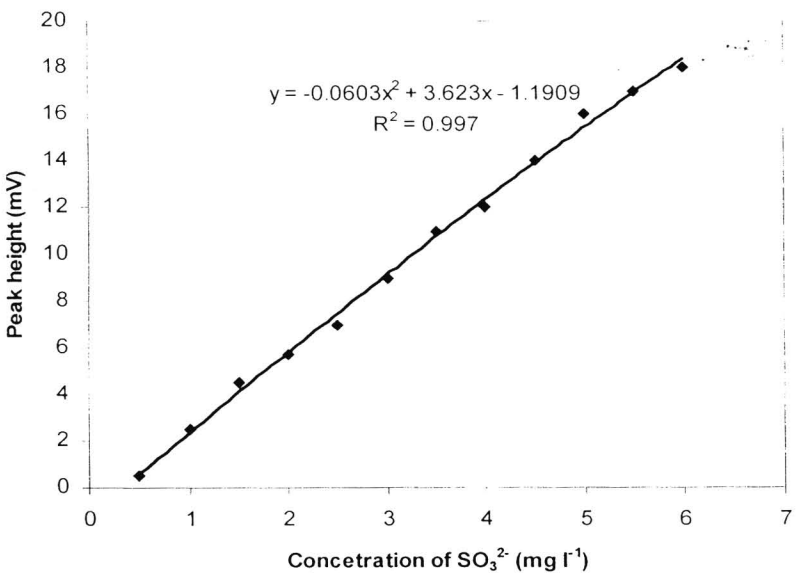
3.2.2.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง

ในการหาช่วงความเป็นเส้นตรงที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยระบบ PFI-CL ได้ทำการศึกษาโดยการนำสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่าง 0.5-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาฉีดเข้าไปในระบบ PFI-CL ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามตาราง 3.5 พบว่าได้ผลดังตาราง 3.6 และเมื่อพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคสัญญาณกับความเข้มข้นของซัลไฟต์ พบว่าได้กราฟความสัมพันธ์ดังรูป 3.15

ตาราง 3.6 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ด้วยระบบ PFI-CL

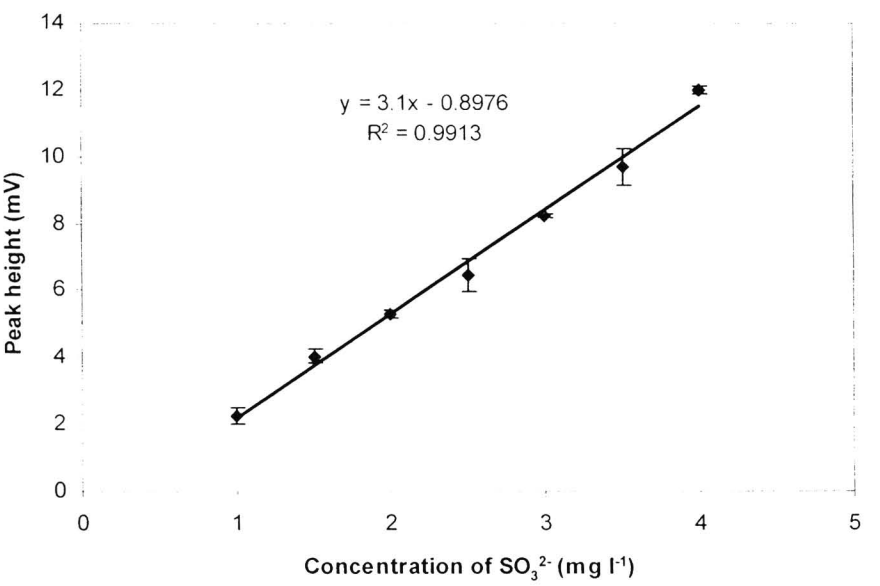
ความเข้มข้นซัลไฟต์ (mg l^{-1})	**ความสูงของพีค** (mV)*
0.5	0.60±0.0
1.0	2.26±0.2
1.5	4.03±0.2
2.0	5.30±0.1
2.5	6.46±0.4
3.0	8.23±0.0
3.5	9.66±0.5
4.0	12.00±0.1
4.5	15.36±0.4
5.0	16.40±0.0
5.5	17.76±0.2
6.0	18.96±0.1

*n = 3



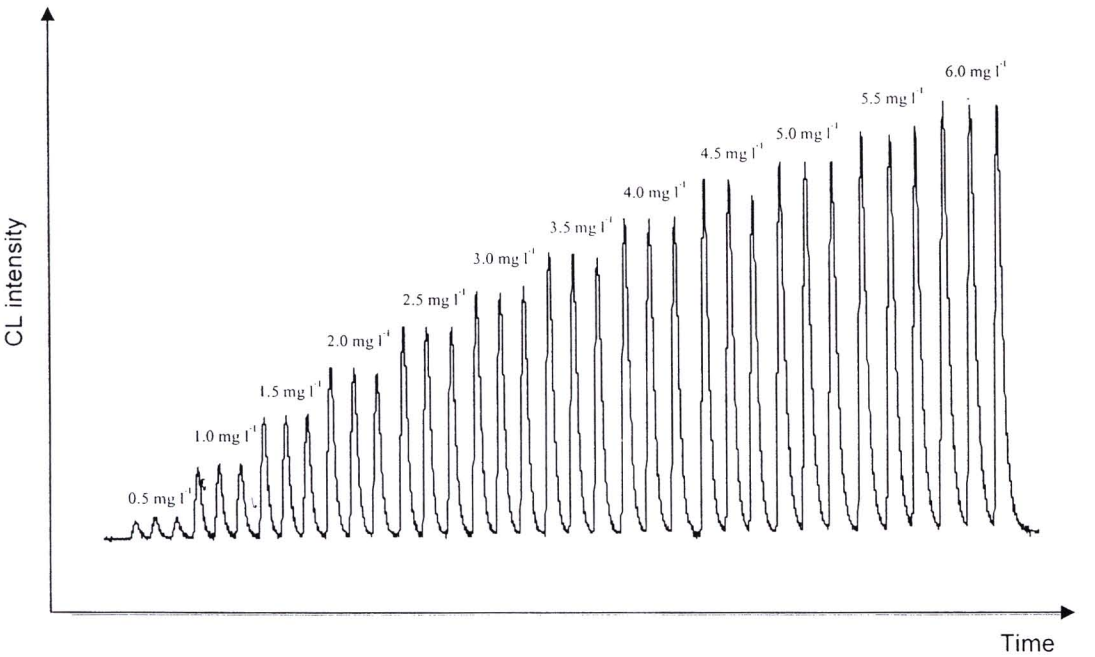
รูป 4.15 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ด้วยเทคนิค PFI-CL

จะสังเกตได้ว่ากราฟความสัมพันธ์ของความสูงของพีคสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนต์ไม่เป็นเส้นตรง แต่มีแนวโน้มเป็นเส้นโค้งที่มีความสัมพันธ์ตามสมการโพลีโนเมียลอันดับ 2 (polynomial second order) โดยมีสมการความสัมพันธ์คือ $y = -0.0603x^2+3.623x-1.1909$ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัย[55] ที่กล่าวว่ากราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์มักจะเป็นเส้นโค้ง แต่อย่างไรก็ตามจากรูป 3.15 อาจพอกล่าวได้ว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ด้วยเทคนิค PFI-CL อยู่ในช่วงความเข้มข้น 1.0-4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อสร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ระหว่างสัญญาณเคมิลูมิเนสเซนซ์ (mV) กับความเข้มข้นของซัลไฟต์ในหน่วยมิลลิโวลต์ พบว่ากราฟมาตรฐานมีความสัมพันธ์ดังสมการ y = 3.10x -0.897 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์เท่ากับ 0.9913 ดังแสดงในรูป 3.16 โดยลักษณะตัวอย่าง PFI-CL gram ที่ได้แสดงดังรูป 3.17



รูป 3.16 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ด้วยระบบ PFI-CL

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูป 3.17 ตัวอย่าง PFI-CL แกรมของซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.2.2.2 การศึกษาอิทธิพลของไอออนรบกวน

การหาอิทธิพลจากไอออนรบกวนที่สำคัญและพบได้ในตัวอย่างอาหารหมักดอง อาทิ เช่น ไอออนรวมของเกลือ โลหะหนัก สารอินทรีย์บางชนิด ที่ใช้ในกระบวนการหมักดอง สามารถทำได้โดยการนำสารละลายซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มาฉีดเข้าเครื่อง PFI-CL เพื่อให้เป็นพีคมาตรฐานเปรียบเทียบ จากนั้นนำสารละลายอีก 1 ขวดที่ประกอบไปด้วยสารละลายซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรผสมกับสารละลายมาตรฐานของไอออนรบกวนที่จะศึกษา 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (อัตราส่วน 1:1) มาฉีดเข้าไปในระบบ PFI-CL เพื่อเปรียบเทียบพีคสัญญาณที่ได้กับพีคมาตรฐานเปรียบเทียบ หากพบว่าพีคสัญญาณจากสารละลายผสมมีความสูงหรือต่ำกว่า 50 % จะถือว่าเกิดการรบกวน โดยจะเพิ่มความเข้มข้นของไอออนรบกวนขึ้น โดยจะทำการทดลองเช่นเดิมแต่เปลี่ยนอัตราส่วนไอออนรบกวนเป็น 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 ตามลำดับ ซึ่งผลของไอออนรบกวนที่มีอัตราส่วนที่ทำให้เกิดการรบกวนต่อพีคสัญญาณของการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 3.7

ตาราง 3.7 ผลการศึกษาไอออนรบกวน

Tolerance (mg l^{-1})	Coexistent substance
20,000	Cl^-, Glucose, Sucose, Ethanol, Ascorbic acid
2,000	CH_3COO^-, HPO_4^{2-} Na^+, Mg^{2+}, K^+
200	Ni^{2+}
20	SO_4^{2-}, Fe^{2+}, Co^{2+} ,PO_4^{3-}, Ca^{2+}
2	I^-, S^{2-}, Mn^{2+}, Fe^{3+}

จากผลการศึกษาอิทธิพลของไอออนรบกวนที่สามัญซึ่งมีผลต่อความเข้มแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ในการวิเคราะห์ซัลไฟต์ ด้วยเทคนิค PFI-CL เช่น I^-, S^{2-}, Mn^{2+}, Fe^{3+}จะมีผลทำให้ความเข้มของแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ลดลง เนื่องจากไอออนเหล่านี้เป็นตัวออกซิไดส์หรือตัวรีดิวส์ที่แรง จึงมีสมบัติในการเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง โดยเข้าไปแย่งทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างหรือเปอร์แมงกาเนตไอออน ทำให้สัญญาณเคมิลูมิเนสเซนซ์ลดลง ส่วนไอออน Cl^- , กลูโคส, ซูโครส, เอทานอล และกรดแอสคอร์บิค แม้ว่าจะมีอยู่ปะปนที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ ก็ไม่มีผลต่อการวัดความเข้มแสงเคมิลูมิเนสเซนซ์ของซัลไฟต์ด้วยเทคนิค PFI-CL ที่ได้พัฒนาขึ้น

3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่างอาหารหมักดอง

3.2.3.1 วิธีการหาปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่าง

ในการหาปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่าง ได้ทำการศึกษาโดย วิธีการเติมสารมาตรฐาน (standard addition) และวิธีกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

โดยขั้นตอนการเก็บตัวอย่างอาหารประเภทหมักดอง เช่น หน่อไม้ดอง หัวผักกาดดอง และขิงหั่นฝอย ซึ่งคาดว่าจะพบปริมาณซัลไฟต์ที่เป็นสารปนเปื้อนในอาหาร จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยระบบเพอร์วาพอเรชันโฟลอินเจคชัน (PFI-CL) โดยในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างอาหารหมักดองจากตลาดแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

วิธีการเก็บรักษา โดยนำอาหารประเภทหมักดองเก็บไปไว้ที่อุณหภูมิที่ประมาณ 4 องศา โดยตัวอย่างต้องทำการวิเคราะห์ทันทีเพื่อป้องกันการสูญเสียซัลไฟต์หรือทดลองอย่างรวดเร็วที่สุด โดยทำการวิเคราะห์เฉพาะส่วนที่เป็นน้ำเท่านั้น

3.2.3.2 การหาปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่าง

การทดลองโดยหาปริมาณซัลไฟต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารประเภทหมักดอง ในส่วนที่เป็นน้ำหน่อไม้ดอง ผักกาดดองและขิงหั่นฝอย โดยใช้ปริมาตรน้ำตัวอย่าง 0.025 0.125 และ 2.5 มิลลิลิตรตามลำดับ เติมลงในขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร และปรับด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยระบบเพอร์วาพอเรชันโฟลอินเจคชัน (PFI-CL) ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งได้ผลการศึกษาได้ผลดังตาราง 3.8

ตาราง 3.8 ผลการหาปริมาณซัลไฟต์จากวิธีกราฟมาตรฐานและ การเติมสารมาตรฐาน

ตัวอย่าง	Dilution factor	**ความเข้มข้นของซัลไฟต์** (mg l^{-1})	
		วิธีกราฟมาตรฐาน	**วิธีการเติมสารมาตรฐาน**
น้ำหน่อไม้ดอง	1000	1317.6±5.8	1300.0±0.1
ผักกาดดอง	200	466.5±1.8	406.0±0.4
ขิงหั่นฝอย	10	22.7±0.3	20.7±0.2

3.2.3.3 การหาร้อยละการกลับคืน

การหาร้อยละการกลับคืนของการวิเคราะห์สามารถหาได้จากการเปรียบเทียบผลที่จากวิธีการเติมสารมาตรฐานกับวิธีกราฟมาตรฐาน(ภาคผนวก ข) พบว่าในตัวอย่างน้ำหน่อไม้ดอง น้ำผักกาดดอง และ ขิงหั่นฝอย มีค่าร้อยละการกลับคืน ดังตาราง 3.9

ตาราง3.9 ร้อยละการกลับคืนของซัลไฟต์ในตัวอย่างอาหารหมักดอง

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง (mg l^{-1})		**ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้**	**ความเข้มข้นที่กลับคืน**	**ร้อยละการกลับคืน**
น้ำหน่อไม้ดอง	0	1.54	-	-
	1	2.45	0.91	91.4
	1.5	2.98	1.45	96.7
	2	3.36	1.82	91.3
	2.5	3.82	2.29	91.6
	3	4.44	2.9	96.7
	3.5	4.92	3.38	96.7
	4	5.62	4.08	102.1
น้ำผักกาดดอง	0	2.03	-	-

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

น้ำผักกาดดอง	0	2.03	-	
	1	2.95	0.92	92.4
	1.5	3.49	1.46	97.5
	2	3.97	1.94	97.3
	2.5	4.47	2.44	97.6
	3	4.77	2.74	91.3
	3.5	5.46	3.43	98.0
	4	5.91	3.88	97.0
ขิงหั่นฝอย	0	2.07	-	-
	1	2.98	0.91	91.3
	1.5	3.64	1.56	104.6
	2	4.17	2.09	104.8
	2.5	4.52	2.45	98.1
	3	4.93	2.86	95.3
	3.5	5.21	3.13	89.7
	4	5.71	3.64	91.1

โดยร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยของ น้ำหน่อไม้ดอง น้ำผักกาดดอง ขิงหั่นฝอย มีค่าเท่ากับ 95.2, 95.8 และ 96.4 ตามลำดับ

3.2.3.4 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือ PFI-CL

การหาขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือ เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำได้โดยการนำสารมาตรฐานซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ในช่วง 0.1- 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มาฉีดเข้าไปในระบบ PFI-CL เพื่อสังเกตความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบพีคสัญญาณได้โดยเทคนิค PFI-CL ที่พัฒนาขึ้น โดยพิจารณาจากความสูงของพีคสัญญาณ เทียบกับพื้นหลังพบว่าได้ผลดังตาราง 3.10

ซึ่งแม้น อมรสิทธ์และอมร เพชรสม[60] ได้กล่าวว่า ขีดจำกัดของการตรวจหา หมายถึงความเข้มข้นของสารที่ทำการวิเคราะห์ซึ่งสามารถให้สัญญาณเป็น 2 หรือ 3 เท่าของพื้นหลังหรือสัญญาณรบกวน ซึ่งจากตาราง 3.10 ผลของขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือในระบบออนไลน์ พบว่าใน PFI-CL ความเข้มข้นของซัลไฟต์ที่ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้สัญญาณที่สูงกว่าพื้นหลัง (back ground) เท่ากับ 2 เท่า ดังนั้นความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเป็นขีดจำกัดต่ำสุดของการ

วิเคราะห์ และทำให้สามารถกล่าวได้ว่าวิธี PFI-CL ที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของซัลไฟต์ที่ต่ำกว่า 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรได้

ตาราง 3.10 ผลการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือของกระบวนการวิเคราะห์ด้วยวิธี PFI-CL

ความเข้มข้นของซัลไฟต์	Signal-to-noise ratio
(mg l^{-1})	**วิธี** PFI-CL
0.1	1.50
0.2	2.00
0.3	3.00
0.4	6.00
0.5	8.20

3.2.4 **การทดลองเพิ่มสภาพไวของการวิเคราะห์โดยวิธีหยุดการไหลชั่วคราว** (Stop flow mode)

การศึกษาวิธี stop flow เป็นการศึกษาทางจนล์ศาสตร์ที่ต้องการศึกษาอัตราการเก็บกักสารตัวอย่างที่สนใจดังมีรายงานการวิจัย ที่ศึกษาปริมาณสารหนู[56] ฟลูออไรด์[57] ฟีนอล[58-59] โดยทำเพื่อจะนำไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ โดยคาดหวังว่าจะลดขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ได้ โดยการนำมาใช้กับการศึกษาประเภทระบบเพอร์วาพอเรชันจะต้องมีการเก็บกักสารที่ระเหยไว้ให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายตัวรับโดยให้ทำปฏิกิริยากันอยู่ไว้บริเวณ accerptor chamber ดังนั้นจึงมีความสนใจที่ต้องการทดลองกักเก็บก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไว้เพื่อเพิ่มสภาพไวของการวิเคราะห์

แต่จากผลการทำ stop flow นั้นพบว่าไม่สามารถทำการกักเก็บก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ โดยพบว่าเมื่อให้ระยะเวลาผ่านไป พบว่าสัญญาณเคมิลูมิเนสเซนซ์มีค่าลดลง เนื่องจากสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์เกิดการสลายตัวไปเมื่อปล่อยไว้ระยะเวลานานๆ โดยเกิดจากการที่ซัลไฟต์เป็นตัวออกซิไดส์ทำให้เกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนทำให้เปลี่ยนเป็นซัลเฟตแทน ดังนั้นต้องทำการฉีดสารละลายมาตรฐานซัลไฟต์ทันทีเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นในการทดลองการเก็บกับสารซัลไฟต์จึงไม่สามารถที่จะเก็บก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ตามที่คาดหวังไว้ได้

3.3 การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ในอาหารหมักดองโดยวิธีดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โพลาโรกราฟี (DPP)

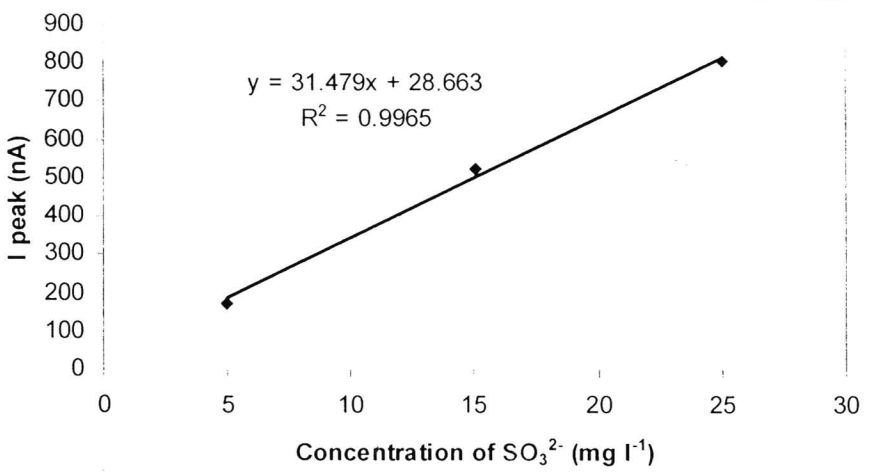
การทดลองเพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์แบบออนไลน์ ชนิดเพอร์วาพอเรชันโฟลอินเจคชันที่ได้พัฒนาขึ้นทำได้โดยใช้วิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ซัลไฟต์ในอาหารของ AOAC โดยเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียล พัลส์ โพลาโรกราฟี เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับผลการทดลองจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PFI-CL โดยในการทดลองได้ใช้สภาวะที่กล่าวไว้ข้างต้น

3.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของวิธีดิฟเฟอเรนเชียล พัลส์โพลาโรกราฟี (DPP)

เมื่อนำสารละลายซัลไฟต์ ความเข้มข้น 5.0, 15.0 และ 25.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาวัดค่ากระแสจากการแพร่ด้วยเครื่องดิฟเฟอเรนเชียล พัลส์ โพลาโรกราฟี ได้กระแสดังตาราง 3.11 และสามารถนำมาสร้าง กราฟมาตรฐานได้ ดังรูป 3.18 โดยมีสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง คือ $y = 31.479x - 28.663$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9965

ตาราง 3.11 ผลการศึกษาการสร้างกราฟมาตรฐานโดยวิธีดิฟเฟอเรนเชียล พัลส์ โพลาโรกราฟี (DPP)

ความเข้มข้นของซัลไฟต์ (mg l^{-1})	กระแส (-nA)
5	175.31
15	522.33
25	807.88



รูป 3.18 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ซัลไฟต์ด้วยวิธีเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียล พัลส์โพลาโรกราฟี

3.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณซัลไฟต์ในอาหารหมักดอง

นำตัวอย่างน้ำหน่อไม้ดอง น้ำผักกาดดอง และขิงหั่นฝอยที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการกลั่นด้วยกรด (acid distilation) มาเจือจางด้วยสารละลายอิเล็คโทรไลต์ มาวัดค่ากระแสการแพร่ของสารละลายตัวอย่างทั้งสาม จากนั้นนำค่ากระแสของสารตัวอย่างที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน พบว่าได้ผลดังตาราง 3.12

ตาราง 3.12 ผลการวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟต์ในอาหารด้วยวิธีดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โพลาโรกราฟี

ตัวอย่าง	I peak (nA)	ปริมาณซัลไฟต์ (mg l^{-1})	Dilution factor	ความเข้มข้นซัลไฟต์ (mg l^{-1})
หน่อไม้ดอง	442.83	13.156	100	1315.6±2.1
หัวผักกาดดอง	175.70	4.671	100	467.1±2.0
ขิงหั่นฝอย	109.41	2.565	10	25.65±2.5

ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ ผลที่ได้จากวิธี PFI-CL ที่ได้พัฒนาขึ้น พบว่าได้ผลดังตาราง 3.13 แสดงผลการทดลองที่ได้จากสองวิธี โดยจากวิธีเพอร์วาพอเรชัน (PFI-CL) และวิธีดิฟเฟอเรนเชียล พัลส์โพลาโรกราฟี (DPP) ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเทคนิคนี้มีความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อพิจารณาจากค่า t-value

ตาราง 3.13 ผลการเปรียบเทียบปริมาณซัลไฟต์ในอาหารหมักดองโดยวิธี PFI-CL และ DPP

ตัวอย่าง	วิธี PFI-CL ความเข้มข้นซัลไฟต์ (mg l^{-1})	วิธี DPP ความเข้มข้นซัลไฟต์ (mg l^{-1})	t-value (95%)
หน่อไม้ดอง	1317.6±5.8	1315.6±2.1	0.572
หัวผักกาดดอง	466.5±1.8	467.1±2.0	0.364
ขิงหั่นฝอย	22.7±0.3	25.6±2.6	1.921