



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการอุปกรณ์ตรวจจับอนุภาคและเซลล์แบบวัดค่าการนำไฟฟ้าชนิดไม่สัมผัส และการประยุกต์เพื่อตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์

(Contactless Conductivity-based Device for Particles and Cells Sensing  
and Its Application in Point of Care Analysis)

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา

กรกฎาคม 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการอุปกรณ์ตรวจจับอนุภาคและเซลล์แบบวัดค่าการนำไฟฟ้าชนิดไม่สัมผัส  
และการประยุกต์เพื่อตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์

Contactless Conductivity-based Device for Particles and Cells Sensing  
and Its Application in Point of Care Analysis)

รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา

สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

และมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## รายละเอียดโครงการ

สัญญาเลขที่ RSA5580021

ชื่อโครงการ (ไทย) อุปกรณ์ตรวจจับอนุภาคและเซลล์แบบวัดค่าการนำไฟฟ้าชนิดไม่สัมผัส  
และการประยุกต์เพื่อตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์

ชื่อโครงการ (อังกฤษ) Contactless Conductivity-based Device for Particles and Cells Sensing  
and Its Application in Point of Care Analysis

หัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา สังกัด ภาควิชาเคมี คณะ  
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้ประกอบการผู้ร่วมทุน -

งบประมาณ 1,200,000 บาท ระยะเวลา 3 ปี

## กิตติกรรมประกาศ

คณะนักวิจัยโครงการอุปกรณ์ตรวจจับอนุภาคและเซลล์แบบวัดค่าการนำไฟฟ้าชนิดไม่สัมผัสและการประยุกต์เพื่อตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ ขอขอบคุณ ฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่เล็งเห็นศักยภาพของโครงการวิจัย และได้ให้โอกาสคณะนักวิจัยได้แสดงความสามารถเชิงวิชาการที่มีอยู่ ในการสร้างผลงานจากโครงการวิจัยนี้ คณะนักวิจัยฯ ขอขอบคุณทุนวิจัยสนับสนุนเบื้องต้นจาก ศูนย์นวัตกรรมทางเคมี: โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยทางเคมี (PERCH-CIC) สำหรับทุนค่าวัสดุและครุภัณฑ์บางส่วน ใคร่ขอขอบคุณทุนวิจัยสนับสนุนจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) สำหรับทุนสนับสนุนค่าวัสดุและให้นักศึกษาไปทำวิจัยระยะสั้นในต่างประเทศ

คณะนักวิจัยฯ ขอขอบคุณต้นสังกัดต่าง ๆ ของคณะนักวิจัย อันได้แก่ มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ที่ได้ให้การสนับสนุนแก่นักวิจัยในโครงการนี้ไม่ว่าจะเป็นทางตรงและทางอ้อม ทำให้มีงานวิจัยออกมาได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะนักวิจัยฯ ขอขอบคุณ นักศึกษาที่ได้มีส่วนร่วมในการผลิตผลงานวิจัยของโครงการทุกคน ตลอดจนขอขอบคุณแหล่งทุนการศึกษาต่างของนักศึกษา เช่น ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ทุนการศึกษาจาก PERCH-CIC ทุนเรียนดีระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ ทุน พสวท.

## **Abstract**

Attempt was made in this work to develop a device for blood cell counting. The concept of capacitively coupled contactless conductivity detection (C4D) first presented as detector for capillary electrophoresis was employed. It has been proved in this work that the concept of C4D can really be used for counting particles in micron sizes. It was clearly observed that C4D signal varies accordingly to the size of particle. However the developed sensor was not successful when tested with blood cells. It may be explained that the conductivity of the liquid carrier and the liquid inside blood cells are not significantly different unlike polystyrene particles. A paired emitter-detector diode sensor (PEDD) was also made and tested with particle and cell counting and was found not suitable for this purposes.

Some microfluidic platforms including cross injection analysis (CIA) and a flow system consisted of syringe pumps (sequential injection analysis or SIA) have also been designed and made for focusing and the transport of particles and cells one by one through the tubular C4D detector. However since the developed C4D and PEDD sensors are not suitable for blood cell counting, we therefore employed these microfluidic platforms and the sensors for development of flow analysis systems for chemical analysis. All together there are four international publications produced from the use of developed microfluidic platforms and the syringe-based flow system.

**Keyword:** contactless conductivity, paired emitter-detector diode sensor, microfluidics, cross injection analysis, sequential injection analysis, particle, cell, counting

## บทคัดย่อ

งานนี้ได้พยายามพัฒนาอุปกรณ์สำหรับตรวจจับและนับเม็ดเลือด ซึ่งได้พัฒนาอุปกรณ์อาศัยหลักการแคพาซิทิฟเพื่อตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบขั้วไฟฟ้าไม่สัมผัสสารละลาย หรือ‘ซีโพรดี’ ซึ่งเดิม ซีโพรดี ได้ถูกพัฒนาเป็นครั้งแรกสำหรับการใช้งานทางอิเล็กทรอนิกส์ ในงานนี้ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าหลักการซีโพรดี สามารถตรวจจับอนุภาคได้จริงและให้ขนาดสัญญาณที่แปรตามขนาดอนุภาคเมื่อทดสอบด้วยอนุภาคโพลิสไตรีนสังเคราะห์ระดับไมครอน อย่างไรก็ตามเมื่อนำอุปกรณ์ซีโพรดีที่พัฒนาขึ้นแล้วนี้ไปทดสอบตรวจจับอนุภาคเซลล์เม็ดเลือดแดง ไม่พบสัญญาณใดๆ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะค่าการนำไฟฟ้าของของเหลวที่ใช้เป็นของเหลวตัวพาและของเหลวภายในเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ต่อมาได้ทดลองสร้างเซนเซอร์แบบไดโอดคู่ หรือ เพด แต่เมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์ก็ไม่เหมาะสมในการใช้งานเช่นกัน

ในงานนี้นอกจากได้พยายามออกแบบและสร้างตัวตรวจจับและนับอนุภาค ยังได้พัฒนาอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ทั้งแบบ icrostinjection และแบบ ซีเควนเชียลอินเจกชันด้วย เพื่อใช้สำหรับบีบให้การนำส่งอนุภาคไหลเป็นลำเส้นตรงเรียงเดียวเข้าตัวตรวจวัด อย่างไรก็ตามเมื่อได้พัฒนาขึ้นแล้ว แต่ตัวตรวจวัดไม่เหมาะสมและไม่สามารถจับสัญญาณอนุภาคเซลล์ได้ จึงได้นำทั้งอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์และอุปกรณ์ตรวจวัดทั้งหมดมาพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์แบบใหม่ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติจำนวน 4 เรื่อง

คำสำคัญ: วัดค่าการนำไฟฟ้าแบบขั้วไฟฟ้าไม่สัมผัส ไดโอดคู่ ไมโครฟลูอิดิกส์ icrostinjection อะนาไลซิส ซีเควนเชียลอินเจกชัน อนุภาค เซลล์ การนับ

# สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	7
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	8
บทที่ 2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	18
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	19
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	34
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	68
บทที่ 6 Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	70
เอกสารอ้างอิง	

## บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

### 1.1 ความสำคัญของการนับเซลล์สำหรับงานวิจัยทางชีววิทยาและการวินิจฉัยโรค

การนับจำนวนและการจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดมีความสำคัญมากสำหรับงานวิจัยทางชีววิทยาและการวินิจฉัยโรค จำนวนและขนาดของเซลล์เม็ดเลือดเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญมากสำหรับการวินิจฉัยโรคต่างๆ ในผู้ป่วย ตัวอย่างเช่น จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytes) ที่น้อยสามารถชี้บ่งบอกถึงโรคโลหิตจาง (anemia) ได้ และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocytes) ที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าปกติสามารถชี้บ่งชี้ถึงการติดเชื้อและมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง, เม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดและการวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวข้องสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของโรคบางชนิดในผู้ป่วยที่มีปริมาณเม็ดเลือดผิดปกติ

Type of cell	Normal cell count ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	Cell size	Disease occurring from abnormal cell count	
			count	
			Lower than normal	Higher than normal
1. Red Blood Cell (Erythrocyte)	4.5x10 <sup>6</sup> (female) 5.6x10 <sup>6</sup> (male)	6-8 $\mu\text{m}$	1. Anemia 2. Acute leukemia 3. Hemorrhage 4. Hemolysis	1. Polycythemia 2. Myeloproliferative disorder 3. Dehydration
2. White Blood Cell (Leukocyte)	3,000-10,000	12-15 $\mu\text{m}$	Leukopenia (decreased leukocyte) found in viral disorder, HIV, some anemia	Leukocytosis (increased leukocyte) found in infection, inflammation, leukemia
3. Platelet	150,000 – 400,000	2-3 $\mu\text{m}$	Thrombocytopenia (decreased platelet)	Thrombocytosis (increased platelet)

วิธีดั้งเดิมที่ใช้นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดในโรงพยาบาลทั่วไปคือ วิธีเฮโมไซโตมิเตอร์ วิธีนี้ใช้การนับจำนวนเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและต้องการคนที่มี

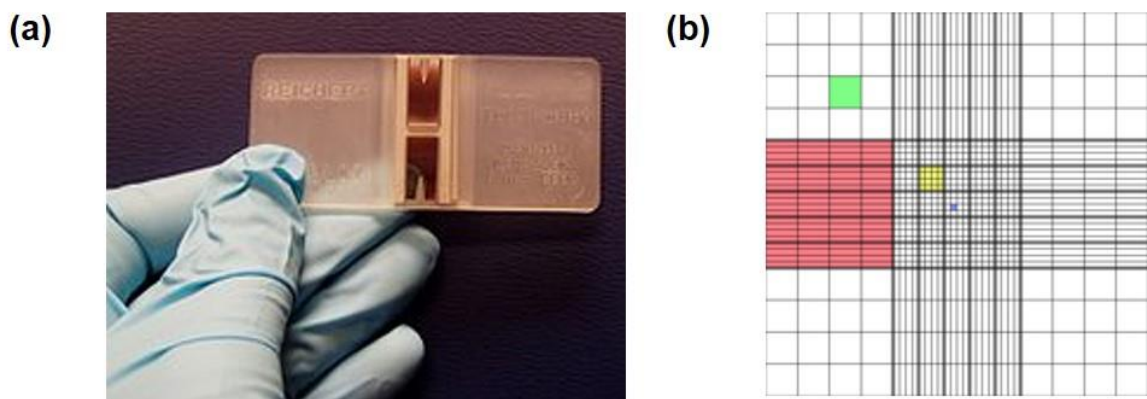


ความเชี่ยวชาญในการใช้งาน สำหรับโรงพยาบาลใหญ่จะมีเครื่องมือที่สามารถดำเนินการได้อย่างอัตโนมัติ อย่างไรก็ตามเครื่องมือเหล่านี้มีราคาแพง ดังนั้นการพัฒนาเครื่องมือสำหรับการนับเซลล์ที่มีราคาถูกและพกพาได้จึงมีความสำคัญมาก [1-3]

## 1.2 เครื่องมือสำหรับการนับเซลล์ที่มีขายในเชิงพาณิชย์

### 1.2.1 Hemocytometer

เครื่อง Hemocytometer เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้สำหรับการนับจำนวนเซลล์ Hemocytometer มีลักษณะเป็นกระจกสไลด์ที่ออกแบบมาอย่างพิเศษใช้ควบคู่กับกล้องจุลทรรศน์ รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างของ Hemocytometer [4] จากรูป Hemocytometer เจ้าหน้าที่จะนับจำนวนเซลล์ที่บรรจุอยู่ในช่องที่มีเส้นตาราง วิธีนี้อาศัยแรงงานและผู้เชี่ยวชาญในการดำเนินงาน

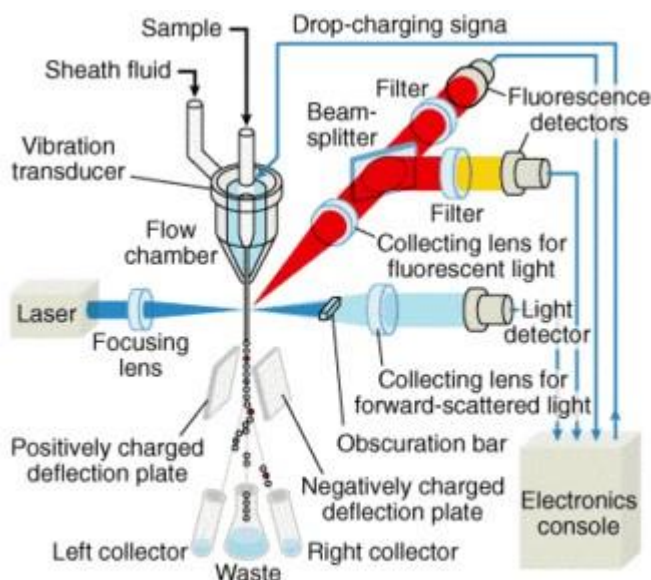


รูปที่ 1 (a) Hemocytometer และ (b) ช่องตารางสำหรับการนับจำนวนเซลล์

### 1.2.2 Flow cytometry

เครื่อง Flow cytometer เป็นเครื่องมือที่มีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนที่เป็นที่รู้จักเป็นอย่างดีสำหรับการนับจำนวนเซลล์โดยอาศัยหลักการทางแสง [5] สารแขวนลอยของเซลล์จะถูกฉีดเข้าไปในเครื่อง เซลล์จะไหลไปตามส่วนต่างๆ ของเครื่องเพื่อบันทึกจำนวน เครื่อง Flow cytometer อาศัยแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นต่างๆ กัน แสงเลเซอร์เหล่านั้นจะตกกระทบลงบนเซลล์ที่ไหลผ่านตำแหน่งตรวจวัดที่ละเซลล์ จากนั้นเครื่องจะวัดสัญญาณ fluorescence, scattered light และ transmitted light ที่เกิดขึ้นเพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับจำนวน, ขนาดและรูปร่างของเซลล์ หลักการทำงานของเครื่องแสดงดังรูปที่ 2 เครื่อง Flow cytometer สามารถนับจำนวน

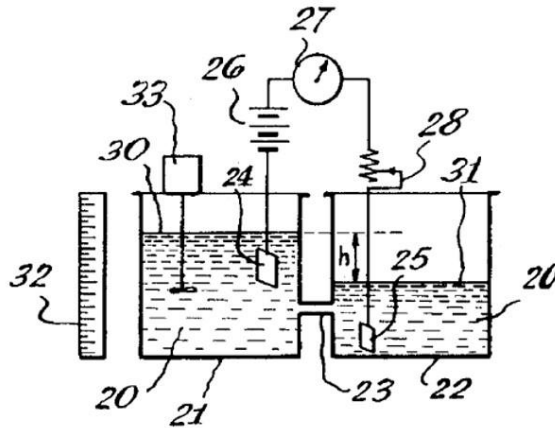
และจำแนกชนิดของเซลล์ต่าง ๆ ได้ในคราวเดียวกัน เนื่องจากอาศัยหลักการการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีสารเรืองแสง fluorescence ติดอยู่ ราคาและค่าการบำรุงรักษาเครื่อง Flow cytometer มีราคาที่สูงมาก ๆ และยังต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการใช้เครื่อง ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว ในพื้นที่ชนบทจึงไม่สามารถมีเครื่อง Flow cytometer ใช้ได้ การทำให้เครื่องมีขนาดเล็กเป็นไปได้ยากเนื่องจากระบบแสงที่ใช้มีความซับซ้อน



รูปที่ 2 หลักการทำงานของเครื่อง Flow cytometer

### 1.2.3 Coulter counter

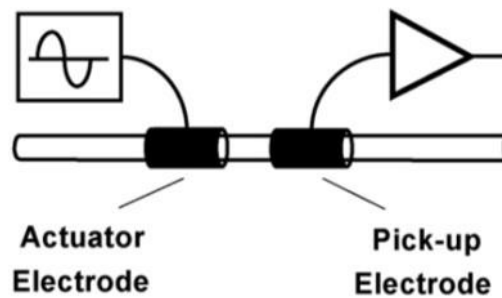
นอกจากเครื่อง Flow cytometer ที่ได้กล่าวมาแล้ว เครื่อง Coulter counter เป็นเครื่องมือที่เป็นที่นิยมใช้สำหรับการนับเซลล์อีกวิธีหนึ่งที่แพร่หลายในท้องตลาด เครื่อง Coulter counter อาศัยหลักการการผ่านสนามไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรด 2 อัน ที่วางตรงกันข้ามกัน ดังแสดงในรูปที่ 3 เซลล์แต่ละเซลล์จะไหลผ่านช่องว่างระหว่างอิเล็กโทรด 2 อัน จากด้านหนึ่งของภาชนะไปสู่อีกด้านหนึ่ง การไหลของเซลล์ผ่านสนามไฟฟ้าที่เกิดขึ้นระหว่างอิเล็กโทรด 2 อันนี้ จะทำให้สัญญาณทางไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรดเปลี่ยนแปลงไป [6-7] จากหลักการดังกล่าวจึงสามารถใช้นับจำนวนเซลล์ได้ ถึงแม้ว่าเครื่อง Coulter counter นี้จะให้ข้อมูลที่น้อยกว่าเครื่อง Flow cytometer แต่เครื่อง Coulter counter มีราคาที่ถูกกว่าและยังมีความเป็นไปได้ในการทำให้เครื่องมีขนาดเล็กลง



รูปที่ 3 หลักการทำงานของเครื่อง Coulter counter [7]

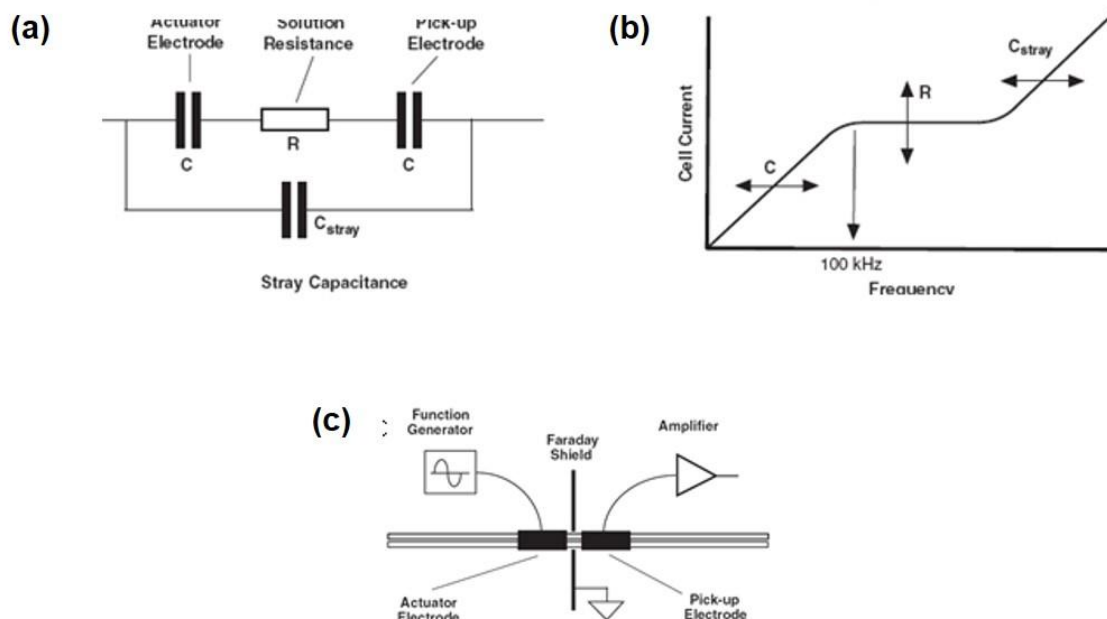
### 1.3 Capacitively coupled contactless conductivity detection (C<sup>4</sup>D)

Capacitively coupled contactless conductivity detection หรือ C<sup>4</sup>D เป็นที่รู้จักในงานทางด้านเคมีวิเคราะห์เป็นระยะเวลาหนึ่งซึ่งถูกใช้เป็นตัวตรวจวัดแบบ universal สำหรับเทคนิค Capillary electrophoresis (CE) C<sup>4</sup>D อาศัยหลักการการเชื่อมต่อกันระหว่างไฟฟ้ากระแสสลับและ detection cell [8] เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการนำไฟฟ้า หลักการวัดดังกล่าวส่งผลให้การสร้าง C<sup>4</sup>D detection cell ง่ายและอิเล็กโทรดมีความเสถียรสูงเนื่องจากอิเล็กโทรดจะติดตั้งอยู่บริเวณภายนอกแต่ยังสามารถวัดค่าการนำไฟฟ้าที่เปลี่ยนไปของสารละลายภายในท่อได้ รูปแบบของอิเล็กโทรดที่นิยมใช้คือเป็นแบบ axial arrangement ซึ่งถูกนำเสนอสำหรับเป็นตัวตรวจวัดใน CE โดย 2 กลุ่มวิจัย คือ Zemann's [9] และ de Silva's [10] การจัดเรียงอิเล็กโทรดแบบ axial arrangement นั้น ท่ออิเล็กโทรดที่ทำจากโลหะ 2 ท่อ จะถูกนำมาใช้ ดังแสดงในรูปที่ 4 [8, 11] ท่ออิเล็กโทรดสามารถทำได้จากเข็มฉีดยาหรือสามารถแต้ม silver ink ลงบนท่อ capillary ได้ตามความเหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 4 จะเห็นได้ว่ามีระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดทั้ง 2 อันอยู่ ซึ่งโดยทั่วไป ระยะห่างนี้มีค่าประมาณ 1 มิลลิเมตร จากการทดลองพบว่าเมื่อระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดเพิ่มขึ้น ความไวในการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการนำไฟฟ้าจะลดลง



รูปที่ 4 ลักษณะของ C<sup>4</sup>D แบบ axial arrangement ซึ่งใช้สำหรับเป็นตัวตรวจวัดในเทคนิค CE [8]

จากรูปของ C<sup>4</sup>D ในรูปที่ 4 ศักย์ไฟฟ้ากระแสสลับจะถูกจ่ายให้กับ actuator electrode ซึ่ง actuator electrode นี้ จะทำหน้าที่เป็นตัวเก็บประจุส่งผลให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลเข้าไปในสารละลายที่อยู่ภายในท่อด้านใน กระแสไฟฟ้าจะไหลและถูกตรวจวัดที่อิเล็กโทรดอีกอันหนึ่ง คือ pick-up electrode ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเก็บประจุเช่นเดียวกัน หลักการการวัดค่าการนำไฟฟ้าด้วย C<sup>4</sup>D และ การคิดว่าการนำไฟฟ้าแบบปกติไม่ต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตาม C<sup>4</sup>D ต้องการความถี่ที่สูงสำหรับการวัด รูปที่ 5a แสดงวงจรเสมือนของ C<sup>4</sup>D แบบ axial arrangement จากรูปจะเห็นได้ว่าในวงจรเสมือนจะมีตัวเก็บประจุเพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่งตัวซึ่งเกิดขึ้นจากอิเล็กโทรดทั้งสอง เราเรียกตัวเก็บประจุนี้ว่า stray capacitance stray capacitance ที่เกิดขึ้นนี้สามารถทำให้ลดลงได้โดยการทำ shielding ระหว่างอิเล็กโทรดทั้งสอง ดังแสดงในรูปที่ 5c จากรูปที่ 5b ช่วงความถี่ที่ดีที่สุดสำหรับการวัดความต้านทานของสารละลายคือ บริเวณ R



รูปที่ 5 (a) แสดงวงจรเสมือนของ C<sup>4</sup>D แบบ axial arrangement (b) ความสัมพันธ์ระหว่างกระแสไฟฟ้าและความถี่แบบคลื่นไซน์ที่จ่ายให้กับ C<sup>4</sup>D และ (c) การลด stray capacitance ด้วยการทำให้ shielding [11]

## 1.2 ระบบฉีดสารระดับไมโครลิตรราคาประหยัด “ครอสอินเจคชันอะนาไลซิส” หรือ ซีไอเอ (Cross Injection Analysis หรือ CIA) สำหรับการนำส่งอนุภาคขนาดเล็กเพื่อการตรวจจับและสำหรับการผสมสารภายในท่อขนาดเล็กเพื่อการวิเคราะห์

ในปี 1975 Ruzicka และ Hansen [12] ได้นำเสนอเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมี Flow injection analysis (FIA หรือ FI) เป็นครั้งแรก หลังจากนั้นเป็นต้นมา มีการตีพิมพ์ผลงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาเทคนิค FIA และเทคนิคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องออกมาเป็นจำนวนมาก [13-15] ระบบ FIA สามารถทำเป็นแบบระบบ reversed-FIA [16-17] ได้ โดยการฉีดรีเอเจนต์ลงในกระแสของสารตัวอย่าง การทำแบบนี้ส่งผลให้ความไวในการวิเคราะห์มากกว่าระบบ FIA แบบปกติ [18] ในปี 1990 Ruzicka และ Marshall ได้นำเสนอเทคนิค FIA รุ่นที่ 2 คือ Sequential injection analysis หรือ SIA [19] ซึ่งการดำเนินงานทั้งหมดเป็นแบบอัตโนมัติควบคุมโดยคอมพิวเตอร์ สำหรับเทคนิค SIA ท่อนของสารตัวอย่างและรีเอเจนต์จะถูกดูดด้วย syringe pump เป็นลำดับโดยการเลือกของ selection valve เข้าไปเก็บไว้ใน holding coil ลำดับถัดมาท่อนสารที่เกิดปฏิกิริยาจะถูกผลักสู่ตัวตรวจวัด Ruzicka ยังได้นำเสนอเทคนิค Lab-on-valve (LOV) อีก

ด้วย เพื่อขยายขีดความสามารถของ เทคนิค SIA ทำให้สามารถควบคุมการไหลของสารในระดับไมโครลิตรหรือน้อยกว่านั้นได้ โดยการสร้าง platform ที่ทำจาก acrylic และถูกติดตั้งที่ selection valve [20-22] Platform จะทำหน้าที่เชื่อมต่อกับช่องทางเดินของสารละลายต่างๆ และ flow cell สำหรับการตรวจวัด เทคนิค LOV บางครั้งเรียกว่า เทคนิค SI-LOV หรือ  $\mu$ SI-LOV [23] ในปี 2004 Grudpan ได้นำเสนอเทคนิคทางเลือกใหม่ คือ Lab-at-valve (LAV) [24] เทคนิค LAV มีลักษณะคล้ายกับเทคนิค LOV คือใช้ syringe pump ในการควบคุมการไหลของสารละลาย ต่างกันที่ เทคนิค LOV ไม่ได้ตัดแปลง selection valve ด้วย platform ซึ่งต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำสูงในการสร้าง แต่จะใช้ potentiometric flow cell ที่สร้างเอง [25] หรือ pipette tip สำหรับการแยกของเหลวที่ไม่ผสมกัน [26] ติดตั้งโดยตรงที่ช่องของ selection valve แทน

นอกจากนี้ ยังมีเทคนิค FIA และเทคนิคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้ถูกพัฒนาและนำเสนออย่างต่อเนื่อง ในปี 1999 Cerda และ คณะได้เสนอเทคนิค multi-syringe flow analysis หรือ MSFIA [27] Reis และคณะได้เสนอเทคนิคการไหลแบบ multicommutation flow analysis หรือ MCFIA [28] ในปลายปี 2002 Santos และคณะ ได้เสนอเทคนิค multi-pumping flow analysis (MPFIA) [29] เมื่อไม่นานมานี้ ในปี 2010 คณะวิจัยจากประเทศญี่ปุ่น ได้นำเสนอระบบลูกผสมระหว่าง FIA, SIA และ multicommutation คือ simultaneous injection effective mixing analysis หรือ SIEMA [30]

งานวิจัยในส่วนนี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์อาศัยหลักการไหลแบบใหม่ คือ คrossover injection analysis หรือ ซีไอเอ (Cross injection analysis หรือ CIA) สำหรับการนำส่งอนุภาคขนาดเล็กเพื่อการตรวจจับและสำหรับการผสมสารภายในท่อขนาดเล็กเพื่อการวิเคราะห์ CIA platform ทำมาจาก ชิ้นงาน acrylic ทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่ถูกเจาะให้เป็นช่องให้สารละลายไหลผ่าน CIA platform ประกอบไปด้วยช่องจำนวน 1 ช่อง ในแนวแกน x และช่องอีกจำนวน 4 ช่อง ตั้งฉากกับช่องแรกในแนวแกน y สารตัวอย่างและรีเอเจนต์จะถูกฉีดเข้าสู่ CIA platform พร้อมกันทั้งหมดผ่านทางช่องทั้ง 4 ในแนวแกน y ซึ่งต่างจากเทคนิค SIA และ multicommutation ที่สารทั้งหมดจะถูกฉีดเข้าสู่ระบบที่ละชนิด สารทั้งหมดจะมาผสมกันในช่องแนวแกน x อีกทั้งคณะผู้วิจัยได้ใช้รูปแบบการไหลแบบ cross-flow เพื่อเพิ่มความไวในการวิเคราะห์อีกด้วย

### 1.3 ตัวตรวจวัดแบบไดโอดคู่ (Paired emitter-detector diode หรือ PEDD) ในระบบท่อระบบซีเควินเชิลอินเจกชัน

โดยทั่วไป Light emitting diodes หรือ LEDs ได้ถูกใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบพกพาเนื่องจากใช้พลังงานไฟฟ้าน้อย อีกทั้งหลอด LEDs ยังมีช่วงสเปกตรัมการเปล่งแสงที่แคบ (ประมาณ  $\pm 40$  nm) ส่งผลให้สามารถเลือกค่าความยาวคลื่นได้อย่างจำเพาะเจาะจงโดยไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ monochromator หรือ filter ซึ่งมีราคาแพง [31] อย่างไรก็ตาม หลอด LEDs ยังสามารถใช้เป็นตัวตรวจวัดแสงได้อีกด้วย [32-33] Paired emitter-detector diode หรือ PEDD คือ เซนเซอร์ทางแสงราคาถูกระหว่างหลอด LEDs โดยหลอดหนึ่งถูกใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสง (LED emitter) และ อีกหลอดใช้เป็นตัวตรวจวัดแสง (LED detector) การใช้ PEDD เป็นเซนเซอร์ทางแสงน่าสนใจมากเนื่องจากมีราคาถูก, มีขนาดเล็กและมีช่วงความยาวคลื่นให้ใช้ในช่วงกว้างตั้งแต่ช่วง UV ถึง near-infrared (380-900 nm)

การใช้ PEDD สำหรับการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ได้ถูกนำเสนอเมื่อต้นปี 2004 โดย Diamond และคณะได้ใช้ PEDD เป็นเซนเซอร์ทางแสงสำหรับการวัดสี (Colorimetric analysis) ของสารที่มีสีเพื่อการวัดค่าพีเอช [34] ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา PEDD ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางทั้งงานทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การวัดปริมาณโลหะหนัก [35] และการวัดปริมาณฟอสเฟต [36] ในตัวอย่างน้ำ และงานทางด้านวิเคราะห์ทางชีวภาพ เช่น การวัดปริมาณฮีโมโกลบิน [37] และการวัด alkaline phosphatase activity [38-40] PEDD ยังถูกนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดใน post column HPLC [41] และ IC [42-43] ยิ่งไปกว่านั้น PEDD ที่ได้ดัดแปลงรูปแบบทางเดินแสงยังสามารถใช้เป็นตัวตรวจวัด fluorescence ได้อีกด้วย การใช้ PEDD สำหรับการวัด fluorescence ตีพิมพ์ครั้งแรกในปี 2010 สำหรับการวัดปริมาณควินินในเครื่องดื่ม [44] ตัวอย่างอื่นๆ ในการใช้ PEDD สำหรับการวัด fluorescence คือ การวัดปริมาณแคลเซียมโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนกับ calcein [45-46]

ปรากฏการณ์การหักเหแสงและการกระเจิงแสงเป็นวิธีทางเลือกที่มีประโยชน์ในทางเคมีวิเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวัดสารตัวอย่างที่มีสีเนื่องจากเราสามารถเลือกความยาวคลื่นที่สารมีสีไม่ดูดกลืนได้ หลักการการวัดการหักเหของแสงบริเวณรอยต่อของของเหลว หรือเรียกว่า ปรากฏการณ์ซีลีเรนท์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดในเทคนิค Liquid chromatography [47] และ Capillary electrophoresis [48] ยิ่งไปกว่านั้น หลักการดังกล่าวยังถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดในเทคนิค flow analysis อีกด้วย สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส [49-50], แอลกอฮอล์ [51] และไกลคอลล [52] อีกวิธีหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์สารที่มีสีคือการวัดการกระเจิงแสงของอนุภาคคอลลอยด์ หรือ วิธีการวัดความขุ่น (Turbidimetry) [53] วิธีนี้ได้ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายโดยอาศัยหลักการการสังเคราะห์อนุภาคคอลลอยด์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ที่เหมาะสม การประยุกต์ใช้วิธีดังกล่าวควบคู่กับเทคนิค flow

analysis จะทำให้วิธีวิเคราะห์เป็นแบบอัตโนมัติ เทคนิคดังกล่าวได้ถูกพัฒนาขึ้นและนำไปใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างทางด้านสิ่งแวดล้อม [54] ตัวอย่างทางชีวภาพ [55] และตัวอย่างอาหาร [56]

งานวิจัยชิ้นนี้ได้นำเสนอการใช้ PEDD สำหรับตรวจวัดอนุภาคและได้ทดลองต่อเพิ่มเติมสำหรับใช้ในการวัดปรากฏการณ์สีเรนท์และการวัดความขุ่นในระบบการไหลเป็นครั้งแรก คณะผู้วิจัยได้เลือกตัวอย่างสาริตศัยภาพการใช้ PEDD เพื่อการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วยหลักการสีเรนท์และฟอสเฟตด้วยหลักการวัดความขุ่นด้วยการนำฟอสเฟตไปสร้างตะกอนเพื่อแสดงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวสำหรับการควบคุมคุณภาพเครื่องดื่ม น้ำอัดลม

หมายเหตุ ต่อไปนี้บรรยายถึงความสำคัญในการวัดระดับน้ำตาลซูโครสและระดับฟอสเฟตในเครื่องดื่ม

ราคาของอ้อยที่เก็บเกี่ยวได้นั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่พบในน้ำอ้อยดิบ อ้อยจะมีราคาสูงขึ้น เมื่อพบน้ำตาลซูโครสในปริมาณมาก โดยปกติแล้ว น้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยดิบจะพบในปริมาณ 8-16 Brix [57] ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลจะมีการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสก่อนที่จะส่งเข้าโรงงาน วิธีทั่วไปที่ใช้วัดปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยคือ วิธี Polarimetry [57] ในการวัด ขั้นแรกน้ำอ้อยจะถูกเติม lead acetate เพื่อกำจัดเส้นใยและมลทินด้วยวิธีการตกตะกอน จากนั้นจะนำไปกรองด้วย cellulose membrane ก่อนนำไปวิเคราะห์ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังกล่าวใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 20 นาที

มีวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยหลายวิธีได้ถูกพัฒนาขึ้น วิธี Liquid chromatography ควบคู่กับการตรวจวัดแบบ differential refractometry ได้ถูกประยุกต์ใช้ในการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสโดยใช้คอลัมน์แบบ carbohydrate [58] และ ion-exchange [59] วิธีการวัดแบบ attenuated total reflectance fourier-transform infrared spectrometry ควบคู่กับการประมวลผลแบบ multivariate analysis ได้ถูกใช้วัดปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ absorption band ที่  $800-1250\text{ cm}^{-1}$  [60] การวัดน้ำตาลซูโครสโดยวิธี Thermometry อาศัยหลักการที่ว่า น้ำตาลซูโครสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ที่ตั้งอยู่บน sensing thermistor ความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกวัดเปรียบเทียบกับ reference [61] มีรายงานวิจัยการพัฒนาวิธีการวัดน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยด้วยเทคนิค flow analysis (FI) ตีพิมพ์ออกมาจำนวนหนึ่ง Zagatto และคณะพัฒนาวิธี flow analysis โดยใช้ spectrophotometer เป็นตัวตรวจวัด [62] วิธี FI-gravimetry ได้ถูกพัฒนาขึ้นมา โดยอาศัยการซึ่งน้ำหนักอย่างต่อเนื่องของตะกอน  $\text{Cu}_2\text{O}$  ที่สะสมอยู่บน filtration unit ที่วางอยู่บนเครื่องชั่ง ตะกอน  $\text{Cu}_2\text{O}$  เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลและ Fehling reagent [63] คณะวิจัยรายงานวิธี FI คู่กับ piezoelectric transducer น้ำตาลซูโครสจะเปลี่ยนความถี่ของ piezoelectric quartz crystal ที่ 10 MHz เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของความหนืดและความหนาแน่นของตัวอย่าง [64]



หลังจากการประเมินราคาอ้อยด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยดิบตั้งได้กล่าวมาแล้วนั้น อ้อยจะถูกส่งเข้าโรงงานเพื่อคั้นน้ำอ้อยดิบ น้ำอ้อยดิบที่ได้จะมีสีเหลืองขุ่นซึ่งต้องทำให้น้ำอ้อยนั้นใสก่อนที่จะส่งไปผลิตเป็นน้ำตาลต่อไป การทำให้น้ำอ้อยใสขึ้นทำได้โดยการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อตกตะกอนแคลเซียมฟอสเฟต [65] ตะกอนแคลเซียมฟอสเฟตที่เกิดขึ้นจะกำจัดอนุภาคแขวนลอยและสารมีสี ฟอสเฟตในน้ำอ้อยดิบจะอยู่ในรูปของ orthophosphate  $\text{PO}_4^{3-}$  การวัดปริมาณฟอสเฟตเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการทำให้น้ำอ้อยใส ในอุตสาหกรรมน้ำตาลจะรายงานปริมาณฟอสเฟตในรูปของปริมาณ  $\text{P}_2\text{O}_5$  เนื่องจากในวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ฟอสเฟตในน้ำอ้อยจะมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยการเผาซึ่งจะเปลี่ยน orthophosphate  $\text{PO}_4^{3-}$  ให้กลายเป็น  $\text{P}_2\text{O}_5$

ปริมาณฟอสเฟตที่แนะนำในน้ำอ้อยคือ  $300\text{--}400 \text{ mg P}_2\text{O}_5 \text{ L}^{-1}$  ปริมาณฟอสเฟตที่ต่ำเกินไปจะทำให้ทำให้น้ำอ้อยใสได้ยากซึ่งแก้ปัญหาโดยการเติมกรดฟอสฟอริกเพิ่มเติม ปริมาณฟอสเฟตที่มากเกินไปจะทำให้กำจัดออกยากและยังทำให้เกิดตะกอนในภาชนะด้วย [65] ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องวัดปริมาณฟอสเฟต วิธีปกติที่ใช้วัดคือวิธีการวัดสี molybdenum blue ในวิธีนี้มีการใช้สารรีดิวซ์ ซึ่งมีด้วยกันหลายชนิด เช่น ascorbic acid [66], stannous chloride [67], 1-amino-2-naphthol-4-sulfuric acid [68] และ sodium sulphide [69] วิธี Ion chromatography ได้ถูกใช้สำหรับการวิเคราะห์ฟอสเฟตเพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนของ silicate และสารมีสีในน้ำอ้อย [70]

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น ปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตเป็น 2 ตัวแปรที่สำคัญสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลที่จำเป็นต้องวิเคราะห์ปริมาณ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ายังไม่มีวิธีวัดสองตัวแปรดังกล่าวในคราวเดียวกัน คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธี Sequential injection analysis สำหรับการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในน้ำอ้อยในคราวเดียวกัน สำหรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล น้ำตาลซูโครสจะวัดด้วยวิธีสีเรนท์เฮิฟเฟกท์ และฟอสเฟตจะวัดด้วยวิธี molybdenum blue ในงานนี้ได้ใช้โจทย์นี้สาธิตการใช้ PEDD เป็นตัวตรวจวัดแบบใหม่สำหรับวัดสารเหล่านี้ก่อนนำไปทดสอบการนับอนุภาค

## บทที่ 2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ของโครงการเป็นดังต่อไปนี้

2.1 ออกแบบและสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าชนิดไม่สัมผัสสารละลาย (Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector) หรือ ซีโฟร์ดี (C<sup>4</sup>D) ควบคู่กับระบบการไหลแบบอัตโนมัติ อุปกรณ์ซีโฟร์ดีที่ออกแบบสามารถสร้างได้เองในห้องปฏิบัติการ ราคาถูก มีขนาดเล็ก พกพาง่าย สามารถนำไปใช้ได้ทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถแบ่งเป็นวัตถุประสงค์ย่อยได้ดังนี้

2.1.1 ออกแบบและสร้างหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี (C<sup>4</sup>D) อย่างง่าย เพื่อใช้ทดสอบความเป็นไปได้ของหลักการสำหรับการตรวจจับสนุภาคและนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจจับสนุภาคขนาดมิลลิเมตร

2.1.2 ออกแบบและสร้างหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี (C<sup>4</sup>D) ให้มีลักษณะพิเศษเพื่อให้เหมาะสมสำหรับเป็นเครื่องมือตรวจวัดอนุภาคขนาดไมครอนและนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการนับจำนวนเม็ดเลือดเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวินิจฉัยโรค

2.2 ออกแบบและสร้างระบบฉีดสารระดับไมโครลิตรราคาประหยัด ที่มีชื่อว่า ครอสอินเจกชันอะนาไลซิส หรือ ซีไอเอ (Cross Injection Analysis หรือ CIA) สำหรับการนำส่งอนุภาคขนาดเล็กเพื่อการตรวจนับและสำหรับการผสมสารภายในท่อขนาดเล็กเพื่อการวิเคราะห์

2.3 ออกแบบและสร้างตัวตรวจวัดแบบไดโอดคู่ (Paired emitter-detector diode หรือ PEDD) ควบคู่กับระบบซีเคเวนเซียลอินเจกชัน เพื่อทดสอบการตรวจจับสนุภาค และพัฒนาไปใช้สำหรับการวัดปริมาณทางเคมีแบบอื่นๆ

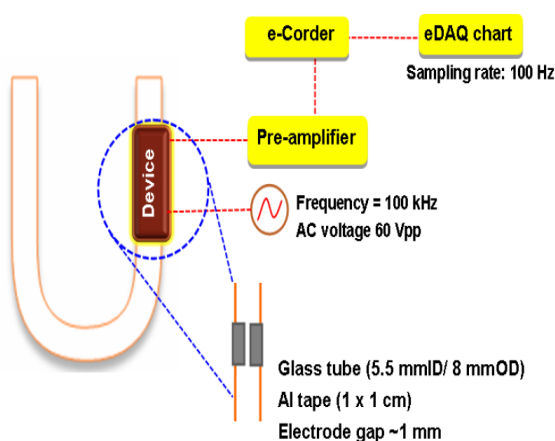
2.4 ออกแบบระบบซีเคเวนเซียลอินเจกชัน เพื่อควบคุมระบบไหลของท่อและนำส่งอนุภาคเข้าสู่ตัวตรวจวัดแบบที่ควบคุมได้อัตโนมัติด้วยคอมพิวเตอร์

2.5 เพื่อเป็นการพัฒนาและเตรียมกำลังคนให้มีความรู้ ความชำนาญในการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ๆ ให้กับภาคอุตสาหกรรม โครงการนี้มีการเตรียมการเพื่อรองรับได้ทุกระดับ คือ ระดับปริญญาตรี โท และเอก รวมถึงระดับนักวิจัยรุ่นใหม่ที่เป็นอาจารย์นักวิชาการทำงานด้านการเรียนการสอนและการวิจัยในมหาวิทยาลัย

## บทที่ 3 วิธีการทดลอง

### 3.1 ออกแบบและสร้างหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี (C<sup>4</sup>D) อย่างง่าย สำหรับการตรวจจับอนุภาคนิวตรอนขนาดมิลลิเมตร

หัวตรวจวัดซีโฟร์ดีเป็นตัวตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายชนิดอิเล็กโทรดไม่สัมผัสกับสารละลาย เมื่อองค์ประกอบของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลโดยตรงกับค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายนั้น เมื่อสารละลายในส่วนนั้นไหลผ่านซีโฟร์ดีก็จะมีสัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าเกิดขึ้น ผู้วิจัยจึงได้นำหลักการพื้นฐานนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจจับอนุภาคนิวตรอน งานวิจัยในส่วนนี้ได้ทดสอบความเป็นไปได้เบื้องต้นในการใช้หัวตรวจวัดซีโฟร์ดีตรวจจับอนุภาคนิวตรอน ซีโฟร์ดีที่ใช้ในงานนี้สร้างขึ้นมาจากท่อแก้วรูปตัวยูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน (inner diameter, id) เท่ากับ 5.5 มิลลิเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก (outer diameter, od) เท่ากับ 8.0 มิลลิเมตร อิเล็กโทรดทำมาจากเทปกาวยอะลูมิเนียมขนาด 1 x 1 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น แปะในทิศทางตรงกันข้ามซึ่งกันและกันรอบท่อแก้ว อิเล็กโทรดทั้งสองจะถูกเชื่อมต่อด้วยสายไฟสำหรับส่งสัญญาณไฟฟ้าเข้าและออก ท่อแก้วในส่วนที่มีอิเล็กโทรดนี้จะวางอยู่ในกล่องโลหะเพื่อป้องกันสัญญาณรบกวนจากภายนอก รูปของหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีอย่างง่ายสำหรับตรวจจับอนุภาคนิวตรอนแผนภาพแสดงเครื่องมือแสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีอย่างง่ายและแผนภาพเครื่องมือสำหรับการตรวจจับและจำแนกขนาดของอนุภาคนิวตรอนระดับมิลลิเมตร

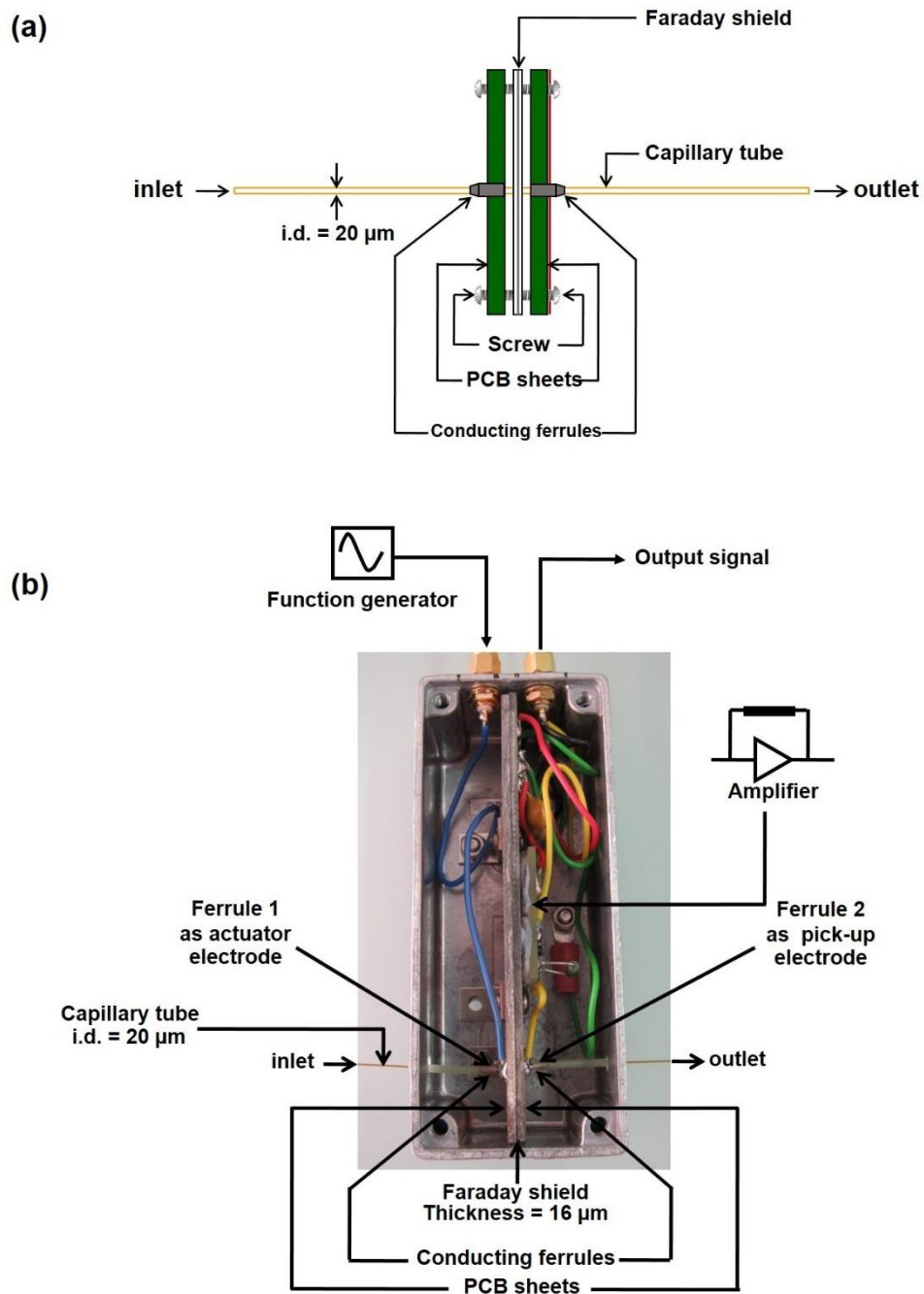
จากรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่า เครื่อง Function generator จะป้อนสัญญาณไฟฟ้า กระแสสลับความถี่ 100 kHz ความต่างศักย์ 60 V<sub>pp</sub> ให้กับ input electrode สัญญาณทางไฟฟ้าที่ได้จาก output electrode จะส่งผ่านไปยังเครื่อง amplifier เพื่อขยายขนาดและแปลงสัญญาณ จากนั้นสัญญาณทางไฟฟ้าที่ได้จะถูกบันทึกด้วยคอมพิวเตอร์

ในการทดสอบความสามารถของหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีในการตรวจจับอนุภาค เริ่มต้นจากการเติมน้ำมันซิลิโคนลงในหลอดแก้วรูปตัวยูจนเต็ม จากนั้นจึงค่อยๆ ปล่อยลูกเหล็ก ขนาดต่างๆ ที่ละลูกลงสู่ท่อแก้ว ลูกเหล็กจะค่อยๆ เคลื่อนที่ผ่านหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีตามแรงโน้มถ่วงของโลกโดยมีน้ำมันซิลิโคนเป็นตัวพาและช่วยชะลอความเร็วของการเคลื่อนที่ของลูกเหล็ก จากนั้นบันทึกสัญญาณที่เกิดขึ้น

### 3.2 ออกแบบและสร้างหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี (C<sup>4</sup>D) สำหรับตรวจวัดอนุภาคขนาดไมครอน

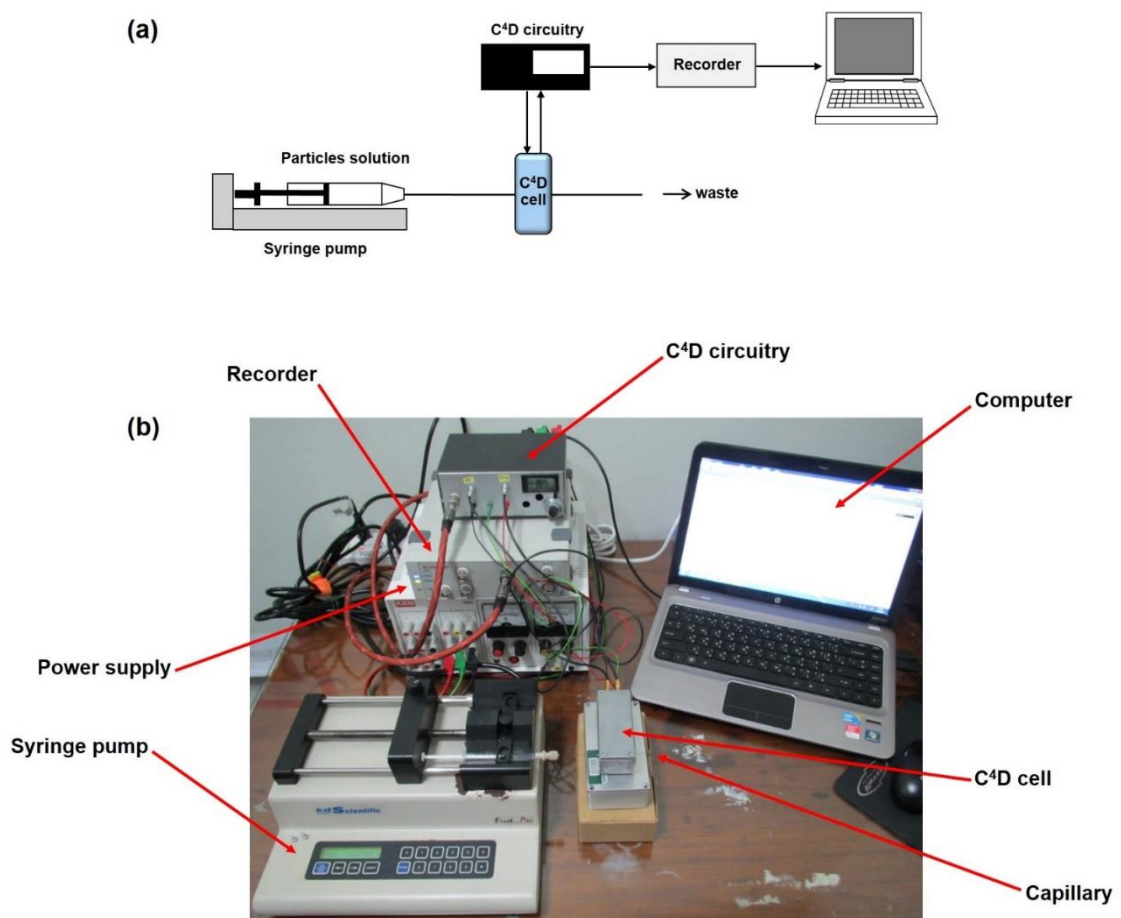
งานวิจัยชิ้นนี้มีจุดประสงค์ที่ต้องการจะวัดอนุภาคขนาดไมครอนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคอยู่ในช่วงตั้งแต่ 3-20 ไมครอน โดยทั่วไปหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีจะมีระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดทั้งสอง (Actuator และ Pick-up Electrode) อยู่ในช่วงมิลลิเมตร ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการวัดอนุภาคขนาดไมครอนที่เปลี่ยนค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไปเพียงเล็กน้อย เมื่ออนุภาคไหลผ่านหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี ดังนั้นขั้นต้นได้ทำการออกแบบและสร้างหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีให้มีลักษณะที่เหมาะสมสำหรับการวัดอนุภาค ความพิเศษของหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีที่ออกแบบและสร้างขึ้นนี้คือ ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดทั้งสอง มีความกว้างเท่ากับ 16 ไมครอน ซึ่งคาดว่าจะมีความไวมากพอที่จะสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงเมื่ออนุภาคไหลผ่านหัวตรวจวัดได้ หัวตรวจวัดซีโฟร์ดีที่สร้างขึ้น แสดงดังรูปที่ 7

ขั้นต้นได้ทำการออกแบบและสร้างหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีให้มีลักษณะที่เหมาะสมสำหรับการวัดอนุภาคขนาดไมครอน ดังแสดงในรูปที่ 7a จากรูป Ferrule 1 และ 2 ทำหน้าที่เป็น Actuator และ Pick-up Electrode ทำมาจากท่อโลหะขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 360 ไมครอน ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดทั้งสองมีค่าเท่ากับ 16 ไมครอน ซึ่งระยะห่างนี้ถูกกำหนดโดยแผ่นฟิล์มโพลีเอสเตอร์ที่ด้านหนึ่งถูกเคลือบด้วยอลูมิเนียมจำนวน 2 แผ่น (ความหนาแผ่นละ 8 ไมครอน) ที่หันด้านอลูมิเนียมเข้าหากัน อุปกรณ์ทั้งหมดถูกยึดไว้ด้วยแผ่นวงจร 2 แผ่นประกบกัน จากนั้นสอดท่อแคปิลลารีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 20 ไมครอนผ่านอิเล็กโทรดทั้งสองเพื่อเป็นทางเดินให้สารละลายอนุภาคไหลผ่านหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี อุปกรณ์ทั้งหมดบรรจุอยู่ใน Faraday case ดังแสดงในรูปที่ 7b



รูปที่ 7 หัวตรวจวัดซีโฟร์ดีที่ออกแบบขึ้นสำหรับการวัดอนุภาคขนาดไมครอน (a) ไดอะแกรมแสดงส่วนต่างๆ ของหัวตรวจวัด และ (b) ภาพหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี

ทำการทดสอบเบื้องต้นถึงความสามารถของหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีที่สร้างขึ้นในการวัดอนุภาค โดยทดสอบกับอนุภาคขนาด 8, 10 และ 15 ไมครอนที่ละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH เท่ากับ 7.4 สารละลายของอนุภาคขนาดต่างๆ จะถูกปั๊มเหวี่ยงให้เข้ากันเป็นอย่างดีและบรรจุอยู่ในกระบอกฉีดยาพลาสติก ไชรินจ์ปั๊มจะผลักสารละลายให้ไหลผ่านเข้าไปในท่อแคพิลลารีที่ต่ออยู่กับหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี ดังแสดงในรูปที่ 8

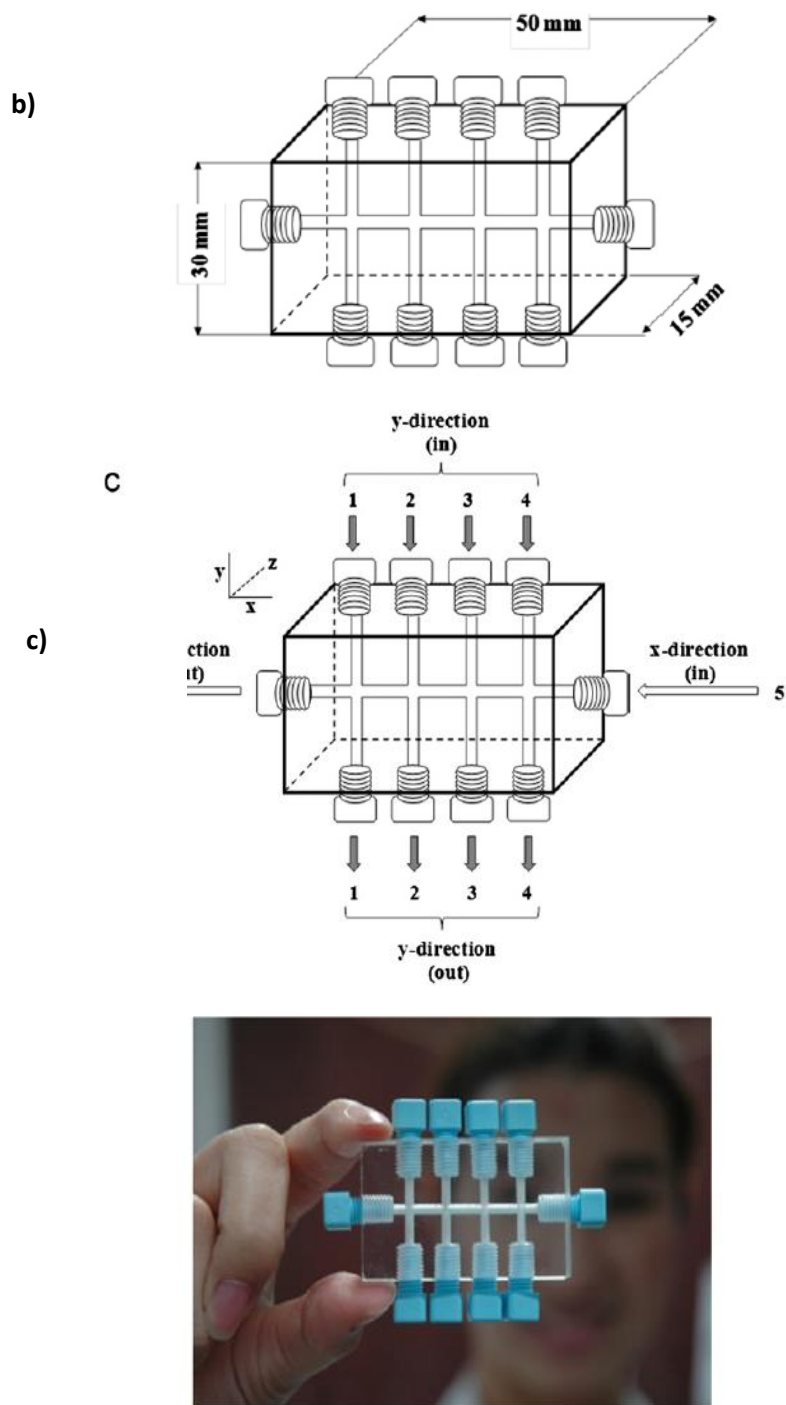


รูปที่ 8 แสดงชุดเครื่องมืออย่างง่ายสำหรับการตรวจวัดอนุภาคขนาดไมครอนด้วยหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี

### 3.3 ระบบฉีดสารระดับไมโครลิตรราคาประหยัด “ครอสอินเจคชันอะนาไลซิส” หรือ ซีไอเอ (Cross Injection Analysis หรือ CIA) สำหรับการนำส่งอนุภาคขนาดเล็กเพื่อการตรวจวัดและสำหรับการผสมสารภายในท่อขนาดเล็กเพื่อการวิเคราะห์

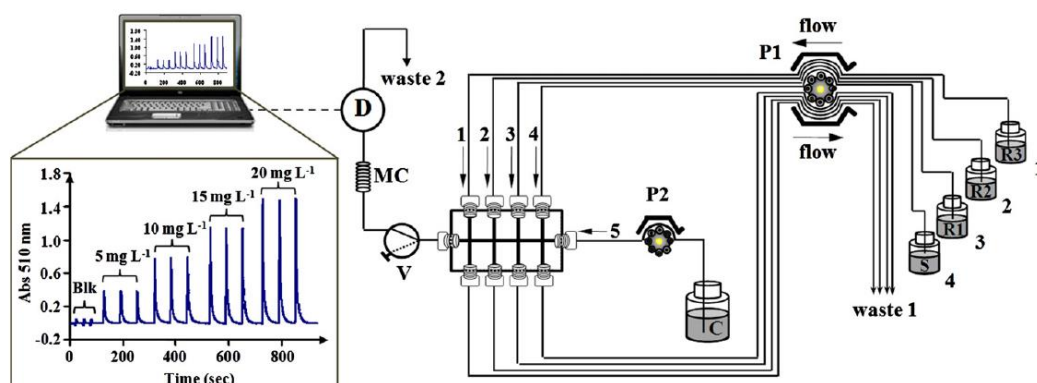
อุปกรณ์ซีไอเอ หรือ ซีไอเอแพลตฟอร์ม สร้างขึ้นมาจากแท่งพลาสติกอะคริลิกทรงสี่เหลี่ยมมุมฉาก ขนาด 1.5 x 5.0 x 3.0 เซนติเมตร (กว้าง x ยาว x สูง) ดังแสดงในรูปที่ 9a จากรูปที่ 9b จะเห็นได้ว่า ซีไอเอแพลตฟอร์มจะถูกเจาะให้เป็นท่อทรงกระบอก 2 ทิศทางตั้งฉากซึ่งกันและกัน คือ ทิศทางในแนวแกน x (แนวนอน) จำนวน 1 ท่อ (ท่อที่ 5) ซึ่งถือว่าเป็นท่อหลักสำหรับสารตัวพาเพื่อนำส่งสารทั้งหมดเข้าสู่ตัวตรวจวัด และทิศทางในแนวแกน y (แนวตั้ง) สำหรับฉีดสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ ท่อในแนวแกน y จะถูกเจาะทะลุผ่านท่อในแนวแกน x ทำให้เกิดจุดตัดของท่อทั้งสองแนวซึ่งบริเวณรอยต่อนี้จะเป็นตัวควบคุมปริมาตรของการฉีดสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ ซีไอเอแพลตฟอร์มสามารถเปลี่ยนแปลงปริมาตรของการฉีดสารตัวอย่างให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้โดยการเพิ่มหรือลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอกสว่านที่ใช้เจาะซีไอเอแพลตฟอร์ม ท่อในแนวแกน x สามารถเพิ่มหรือลดจำนวนได้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่น เจาะท่อในแนวแกน x จำนวน 1 ท่อ เพื่อใช้สำหรับการฉีดตัวอย่างเลือกหรือสารละลายของอนุภาคขนาดเล็กเพียงอย่างเดียวเพื่อการตรวจนับ อย่างไรก็ตามในงานนี้ได้ทดสอบสมรรถนะของเทคนิคซีไอเอ โดยใช้ท่อแนวแกน x จำนวน 4 ท่อ (ท่อที่ 1-4) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ Fe(II), Fe(III) และเหล็กทั้งหมด ซึ่งท่อทั้ง 4 ท่อใช้สำหรับฉีดสารมาตรฐานเหล็กความเข้มข้นต่าง ๆ หรือสารตัวอย่าง, สารละลายบัฟเฟอร์ (Acetate buffer pH 5.3), สารรีดิวซ์ (Hydroxylamine) และ สารรีเอเจนต์ (1,10-phenanthroline) รูปจริงของซีไอเอแพลตฟอร์มที่นำเสนอในงานนี้แสดงดังรูป 9c

ซีไอเอแพลตฟอร์มที่สร้างขึ้นดังรูป 9c ได้นำไปใช้ควบคู่กับเทคนิคโฟลอินเจคชันอะนาไลซิส หรือ เอฟไอเอ (Flow Injection Analysis หรือ FIA) ซึ่งเป็นระบบการไหลของของเหลวอย่างต่อเนื่องภายในท่อ ระบบการไหลที่ใช้ซีไอเอแพลตฟอร์มเป็นอุปกรณ์นำส่งสารสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กดังได้กล่าวมาแล้วนั้น แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 9 (a) แสดงขนาดของซีไอเอแพลตฟอร์ม (b) แสดงทิศทางการไหลของสารภายในซีไอเอแพลตฟอร์ม (c) ภาพจริงของซีไอเอ





รูปที่ 10 แสดงระบบการไหลควบคู่กับระบบการฉีดสารด้วยซีไอเอแพลตฟอร์ม

ระบบการไหลดังกล่าวประกอบด้วย เพอริสทอลติกปั๊ม (P) โดยปั๊ม P1 ใช้สำหรับดูดและผลักดันสารละลายมาตรฐานเหล็กหรือสารตัวอย่าง (S) และสารรีเอเจนต์ทั้ง 3 ชนิด (R1, R2 และ R3) ผ่านทางท่อ ที่ 1 – 4 ตามแนวแกน y ขณะที่ปั๊ม P2 ใช้สำหรับผลักดันตัวพาผ่านทางท่อที่ 5 ตามแนวแกน x ระบบการไหลดังกล่าวยังประกอบไปด้วยวาล์วเพื่อใช้สำหรับควบคุมทิศทางการไหลของสาร โดยเมื่อวาล์วอยู่ในตำแหน่ง “open” (เส้นทึบ) ท่อของระบบการไหลจะเชื่อมต่อกับตัวตรวจวัด สารตัวพาสามารถผลักดันผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไหลผ่านสู่ตัวตรวจวัดและไหลทิ้งออกทาง waste 2 และถ้าวาล์วอยู่ในตำแหน่ง “close” (เส้นประ) สารตัวพาจะไหลทิ้งออกทาง waste 1 ตัวตรวจวัดที่ใช้ในระบบการไหลนี้คือเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรถูกบันทึกโดยโปรแกรมที่เขียนขึ้นเองภายในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 2 แสดงรูปแบบการไหลของซีไอเอแพลตฟอร์ม 2 รูปแบบ

Step	Process (flow pattern in CIA platform)	Duration (s)	P1	P2	V
Procedure 1: Loading of sample and reagents using alternate flow					
1	Carrier loading (flow: x-direction only)	10	Off	On	Open
2	Sample+reagents loading (flow: y-direction only)	10	On	Off	Close
3	Zone flushing to detector (flow: x-direction only)	50	Off	On	Open
Repeat step 2–3 for next sample					
Calibration equation: $A_{510} = (0.050 \pm 0.005) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.090 \pm 0.074)$ ; $r^2 = 0.991$					
Procedure 2: Loading of sample and reagent using simultaneous flow					
1	Carrier loading (flow: x-direction only)	10	Off	On	Open
2	Carrier+sample and reagents loading (flow: x-direction and y-direction)	10	On	On	Close
3	Zone flushing to detector (flow: x-direction only)	50	Off	On	Open
Repeat step 2–3 for next sample					
Calibration equation: $A_{510} = (0.073 \pm 0.003) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.041 \pm 0.039)$ ; $r^2 = 0.995$					

ซีไอเอแพลตฟอร์มที่ออกแบบและสร้างขึ้นมานั้นประกอบไปด้วยท่อ 2 ทิศทางที่วางตัวขวางและตั้งฉากซึ่งกันและกันตามแนวแกน x และแกน y ซึ่งส่งผลให้ทิศทางการไหลของสารมี 2 ทิศทางตามแนวการวางตัวของท่อด้วย การฉีดสารตัวอย่างด้วยซีไอเอแพลตฟอร์มนั้นสามารถทำได้ 2 รูปแบบ ดังตารางที่ 2 รูปแบบที่ 1 คือ การไหลของสารตามแนวแกน x และแกน y แบบสลับกัน (Alternate flow) ในขั้นแรกวาล์วจะวางตัวอยู่ในตำแหน่ง 'open' ปัมป์ P2 จะผลักสารตัวพาผ่านทางท่อในแนวแกน x (ท่อที่ 5) เพื่อไหลผ่านสู่เครื่องตรวจวัดและไหลทิ้งออกสู่ทาง waste2 ในขณะที่ปัมป์ P1 หยุดทำงาน ในขั้นที่สอง วาล์วจะวางตัวอยู่ในตำแหน่ง 'close' ปัมป์ P1 จะผลักสารละลายมาตรฐานหลักและรีเอเจนต์ทั้ง 3 ชนิด เข้าสู่ซีไอเอแพลตฟอร์มผ่านทางท่อในแนวแกน y (ท่อที่ 1 – 4) ในขณะที่ ปัมป์ P2 หยุดทำงาน ปริมาตรของสารส่วนเกินจะไหลออกจากซีไอเอแพลตฟอร์มไปทาง waste1 ถ้าใช้อัตราการไหลของสาร 1 mL/min และเวลาในการฉีดสารเข้าสู่ซีไอเอแพลตฟอร์มดังตารางที่ 2 ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานหลักและรีเอเจนต์ที่ได้คือประมาณ 167 ไมโครลิตร จากนั้นในขั้นที่สาม วาล์วจะกลับมาอยู่ในตำแหน่ง 'open' อีกครั้ง ปัมป์ P1 ยังคงหยุดทำงาน ขณะที่ ปัมป์ P2 จะผลักท่อนของสารละลายมาตรฐานหลักและรีเอเจนต์บริเวณรอยต่อของซีไอเอแพลตฟอร์มให้ผสมกัน และผลักเข้าสู่เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเคมีต่อไป

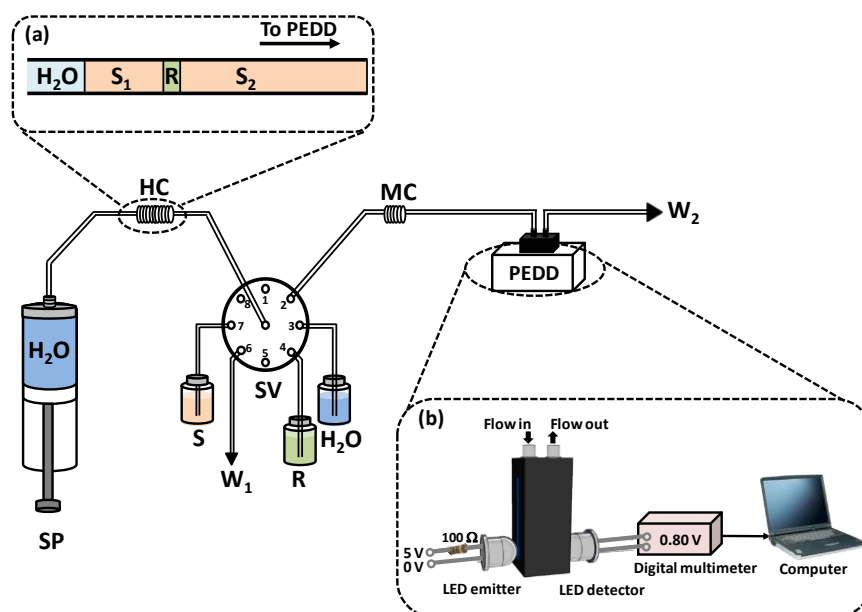
รูปแบบที่ 2 คือ การไหลของสารตามแนวแกน x และแกน y แบบพร้อมกัน (Simultaneous flow) กล่าวคือ ในขั้นตอนที่สอง ทั้งปัมป์ P1 และ P2 จะทำงานพร้อมกัน สารละลายมาตรฐานหลักและรีเอเจนต์จะไหลเข้าสู่ท่อของซีไอเอแพลตฟอร์มตามแนวแกน y ในเวลาเดียวกันกับการไหลของสารตัวพาในแนวแกน x สารส่วนเกินจะไหลออกทาง waste1 การควบคุมการทำงานของปัมป์ทั้งสองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ทำให้มั่นใจได้ว่าการฉีดสารผ่านทางซีไอเอแพลตฟอร์มด้วยรูปแบบการไหลทั้ง 2 แบบ จะได้ปริมาตรที่ถูกต้อง แม่นยำและได้ผลเหมือนกันทุกครั้งของการทดลอง

การศึกษาวิธีการฉีดสารด้วยซีไอเอแพลตฟอร์มนี้ ประกอบไปด้วย ลักษณะการไหลของสารภายในซีไอเอแพลตฟอร์มด้วยรูปแบบการไหลทั้งสองแบบพร้อมทั้งข้อดีและข้อเสีย, ลำดับของสารตัวอย่างและรีเอเจนต์, ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของซีไอเอแพลตฟอร์มและมีกึ่งคอยล์ (Mixing coil), ผลของความเข้มข้นของรีเอเจนต์, คุณลักษณะทางด้านการวิเคราะห์ (Analytical performance) ของซีไอเอแพลตฟอร์มและการประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณเหล็กในเม็ดวิตามินรวม ผลการศึกษาทั้งหมดจะได้กล่าวในหัวข้อถัดไป

### 3.4 ตัวตรวจวัดแบบไดโอดคู่ (Paired emitter-detector diode หรือ PEDD) ควบคู่กับระบบซีเควนเชียลอินเจกชัน และการทดสอบเบื้องต้นสำหรับตรวจวัดการหักเหแสงชลิเรนท์เอฟเฟกต์ และตรวจวัดความขุ่นของตะกอน

ในงานนี้ ได้พัฒนาระบบซีเควนเชียลอินเจกชันร่วมกับตัวตรวจวัดแบบไดโอดคู่ (SI-PEDD) เพื่อการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตได้ในคราวเดียวกันสำหรับงานควบคุมคุณภาพเครื่องดื่มโคล่า รูปที่ 11 แสดงระบบ SI-PEDD ที่พัฒนาขึ้น ระบบ SI-PEDD ประกอบด้วยไซรินจ์ ปั๊ม (Syringe pump, SP) ที่มีซีเลกชันวาล์วแบบ 8 ช่อง (Eight-port selection valve, SV) ประกอบอยู่ด้วยกัน ใช้งานคู่กับกระบอกฉีดยา (Syringe) ขนาด 10 มิลลิลิตร มีการใช้ระบบคอมพิวเตอร์ผ่านโปรแกรมที่เขียนขึ้นเองด้วยโปรแกรม LabView™ เพื่อควบคุมการทำงานของไซรินจ์ ปั๊ม และซีเลกชันวาล์ว ในขั้นตอนการวิเคราะห์จะมีการดูดสารตัวอย่างและรีเอเจนต์เข้ามาพักไว้ในท่อพักสาร (Holding coil, HC) ดังแสดงในรูปที่ 11a และเกิดการผสมอีกครั้งเมื่อท่อนสารเคลื่อนที่ผ่านท่อผสมสาร (Mixing coil, MC) ซึ่งท่อทั้งสอง (HC และ MC) สร้างขึ้นจากการนำท่อเทฟลอน (Teflon หรือ PTFE) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร มาขดพันให้มีลักษณะเป็นเกลียว

รูปที่ 11b แสดงตัวตรวจวัดแบบไดโอดคู่ (Paired emitter-detector diode) หรือ 'PEDD' สร้างขึ้นจากหลอดไดโอดเปล่งแสงคลื่นแสงอินฟราเรด (NIR-LED) จำนวน 2 ตัว โดยหลอดไดโอดหนึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเปล่งแสง (LED emitter) ซึ่งต่ออยู่กับตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม ส่วนอีกตัวหนึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับแสง (LED detector) หลอด NIR-LED ทั้ง 2 ตัวนี้จะวางประกบคนละด้านของเซลล์วัดแบบไหล (Flow-through cell) ที่มีช่องทางเดินแสง (Pathlength) ขนาด 1 เซนติเมตร ตัวตรวจวัด PEDD นี้จะใช้งานได้เมื่อมีการจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงขนาด 5 โวลต์ แก่ LED emitter และวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าด้วยดิจิตอล มัลติมิเตอร์ (Digital multimeter, ความต้านทานภายในขนาด  $10^{12}$  โอห์ม) ที่ LED detector โดยที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้นี้จะสัมพันธ์กับความเข้มแสงที่ตกกระทบบน LED detector นั้นเอง จากนั้นสัญญาณความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จะถูกบันทึกด้วยคอมพิวเตอร์ผ่านช่อง RS-232



รูปที่ 11 แสดงระบบ SI-PEDD สำหรับการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตไปในคราวเดียวกันในเครื่องตีมีโคล่า  $S_1$ : ท่อนตัวอย่างที่ 1; R:  $0.08 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$  ผสมกับ  $0.1\%(\text{w/v})$  PVA ในสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอมโมเนียมเข้มข้น  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  ที่ pH 10;  $S_2$ : ท่อนตัวอย่างที่ 2; W, ของเสีย (Waste); SP: syringe pump; SV: selection valve; HC: 4.6-mL holding coil (i.d. 1 mm, 588 cm long); MC: mixing coil (i.d. 1 mm, 144 cm long); ภาพแทรก (a) ลำดับท่อนสารภายในท่อพักสาร; ภาพแทรก (b) องค์ประกอบของตัวตรวจวัดแบบไอโอดีน (PEDD)

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยระบบ SI-PEDD โดยเริ่มจากระบบจะดูดน้ำปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นจะดูดท่อนสารตัวอย่าง (S) และรีเอเจนต์ (R) เข้ามาในท่อพักสาร ท่อนสารทั้งหมดจะถูกผลักไปยังตัวตรวจวัด PEDD เพื่อวัดสัญญาณของน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตตามลำดับ

สารละลายน้ำตาล 50 Brix (หน่วยความเข้มข้นของน้ำตาล เทียบเท่ากับ % (w/w)) เตรียมจากการชั่งน้ำตาลทรายมิตรผล (Commercial grade) 50.00 กรัม ละลายในน้ำ 50.00 กรัม คนให้เข้ากันโดยใช้แท่งแม่เหล็ก และเครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) จนกระทั่งของแข็งละลายหมด สารละลายนี้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  และสามารถใช้ได้ประมาณ 1 สัปดาห์ สารละลายฟอสเฟต  $5000 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$  เตรียมจากการชั่ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ที่ผ่านการอบที่  $60^\circ\text{C}$  เป็น

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยระบบ SI-PEDD เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตไปในคราวเดียวกันในเครื่องดื่มโคล่า

Step	Mode of syringe pump	Volume (mL)	Flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	Port no.	Action	Duration (s)
1	Aspirate	4.00	4.0	3	Aspiration of water carrier	60
2	Aspirate	0.50	4.0	7	Aspiration of 1 <sup>st</sup> sample zone (S <sub>1</sub> )	7.5
3	Aspirate	0.10	4.0	4	Aspiration of precipitating reagent (R)	1.5
4	Aspirate	1.75	4.0	7	Aspiration of 2 <sup>nd</sup> sample zone (S <sub>2</sub> )	26
5	Dispense	6.35	5.0	2	Dispense of all zones to detector and waste (W <sub>2</sub> )	76

Total analysis time is 171 s.

เวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 0.7157 กรัม ละลายในน้ำ และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร สารละลายใช้งาน (Working solution) เป็นสารละลายผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟต เตรียมได้จากการเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากสารละลายน้ำตาล 50 Brix และ สารละลายฟอสเฟต 5000 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup>

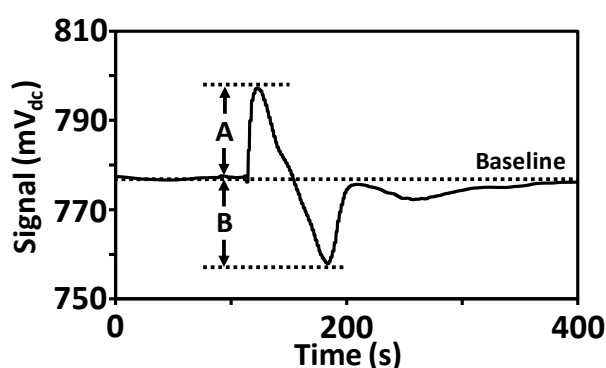
รีเอเจนต์ที่ใช้ในการตกตะกอน (R) คือ สารละลาย CaCl<sub>2</sub> เข้มข้น 0.08 mol L<sup>-1</sup> ผสมกับ 0.1% (w/v) PVA ในสารละลายบัฟเฟอร์ของแอมโมเนียมเข้มข้น 0.3 mol L<sup>-1</sup> pH 10 เตรียมจากการชั่ง CaCl<sub>2</sub> 0.888 กรัม ผสมกับ 0.10 กรัม PVA (Polyvinyl alcohol) ลงในสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมเข้มข้น 0.3 mol L<sup>-1</sup> pH 10 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นอุ่นจนของแข็งละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าว จนได้ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมเข้มข้น 0.3 mol L<sup>-1</sup> pH 10 เตรียมจากผสมแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1338 กรัม และแอมโมเนียเข้มข้น 0.9 มิลลิลิตร ละลายในน้ำจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตัวอย่างเครื่องดื่มที่ใช้ในงานนี้มีทั้งเครื่องดื่มโคล่าทั้งแบบปกติ (Regular cola) และแบบปราศจากน้ำตาล (Sugar-free cola) จำนวน 8 ตัวอย่าง จากร้านค้าในประเทศไทยถูกนำมาวิเคราะห์ ก่อนการวิเคราะห์ นำตัวอย่างโคล่าผ่านการไล่แก๊ส (Degassing) ใน Ultrasonic bath เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:1 ตัวอย่างสังเคราะห์ จำนวน

5 ตัวอย่าง เตรียมจากการผสมระหว่างสารละลายน้ำตาลซูโครส (Analytical grade) กับ สารละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

สำหรับตัวตรวจวัด PEDD นั้น ตัวแปลงแสง (LED detector) จะให้สัญญาณ ศักย์ไฟฟ้า ( $V_{dc}$ ) ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับฟังก์ชันลอการิทึม (Logarithm function) ของ ความเข้มแสงที่ตกกระทบที่ LED detector สำหรับในงานนี้ เมื่อมีการรบกวนความเข้มแสงจาก การหักเหของแสงที่บริเวณรอยต่อของสารละลาย (Schlieren effect) หรือ การกระเจิงแสง (light scattering effect) จะส่งผลทำให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้นั้นเปลี่ยนแปลงไปด้วย

เมื่อท่อนสารที่อยู่ในท่อพักสาร (รูปที่ 11a) ถูกผลักไปยังตัวตรวจวัด PEDD คอมพิวเตอร์จะบันทึกสัญญาณของความต่างศักย์ไฟฟ้าจาก LED detector (แกน y) กับเวลา (แกน x) ดังแสดงในรูปที่ 12 สัญญาณ baseline ที่บันทึกได้มาจากกระแสของน้ำที่ไหลตัว ตรวจวัด PEDD สัญญาณน้ำตาลซูโครส คือ ความแตกต่างของความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่าง สัญญาณ baseline และ จุดสูงสุดของสัญญาณแรก ('A' ในรูปที่ 11a) ส่วนสัญญาณฟอสเฟต คือ ความแตกต่างของความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างสัญญาณ baseline และ จุดต่ำสุดของสัญญาณที่ สอง ('B' ในรูปที่ 11b) เราสามารถสร้างกราฟมาตรฐานได้จากการพลอตค่าสัญญาณทั้งสอง คือ A และ B กับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และ ฟอสเฟต ตามลำดับ



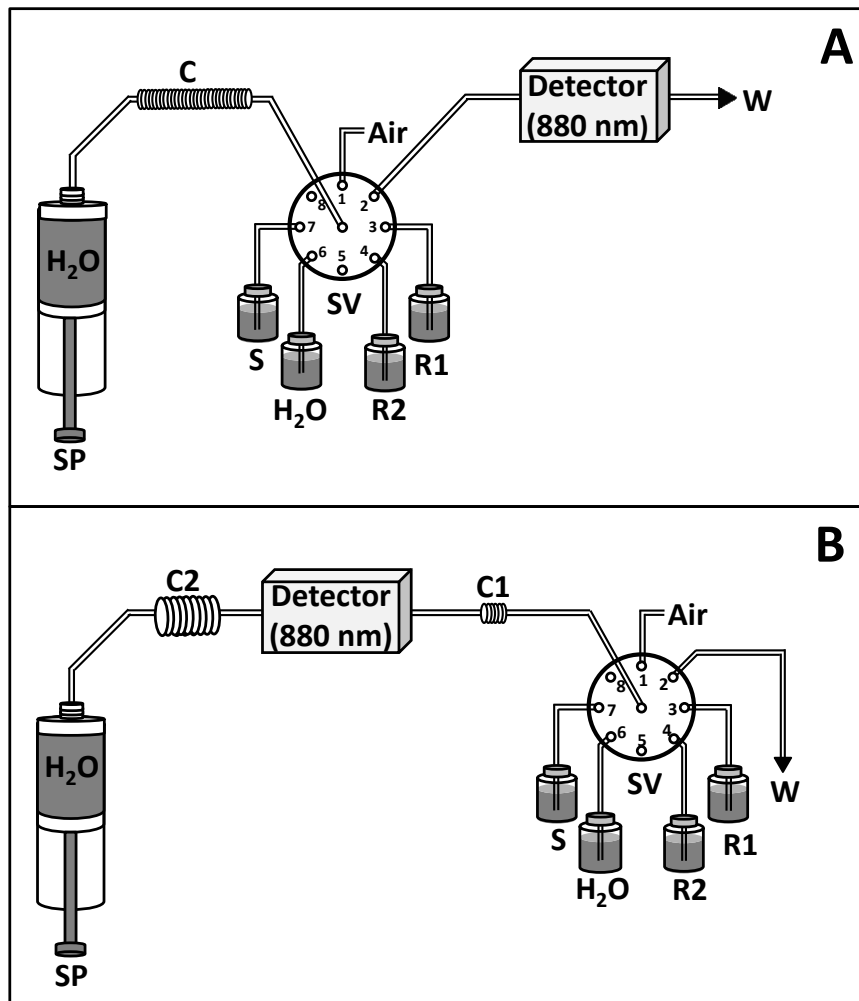
รูปที่ 12 แสดงลักษณะสัญญาณของน้ำตาลซูโครส (A) และ ฟอสเฟต (B) ที่ได้จากการวัดด้วยตัว ตรวจวัด PEDD

### 3.5 การทดสอบใช้ระบบซีเควนเชียลอินเจกชันเพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัดทางเคมีอื่น ๆ

3.5 การใช้ระบบซีเควนเชียลอินเจกชันเพื่อวัดน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในน้ำอ้อย โดยอาศัยหลักการวัดทางกายภาพทั้งแบบการหักเหแสงบริเวณรอยต่อสารละลายที่มีค่าดัชนีหักเหแตกต่างกัน (ชลิเรนซ์เอฟเฟกต์) และการวัดความขุ่นของตะกอนโดยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ระบบ Sequential injection (SI) 2 แบบ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงในรูปที่ 13a และ 13b ความแตกต่างของระบบทั้ง 2 แบบ คือ ตำแหน่งการวางของ selection valve โดยที่ระบบรูปแบบที่ 1 selection valve จะวางอยู่หน้าเครื่องตรวจวัด (รูปที่ 13a) และระบบรูปแบบที่ 2 selection valve จะวางอยู่หลังเครื่องตรวจวัด (รูปที่ 13b) ระบบทั้ง 2 รูปแบบประกอบไปด้วย syringe pump เชื่อมต่อกับ 8-port selection valve ทำ PTFE ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.0 mm และ 1.59 mm ใช้สำหรับการสร้างระบบการไหลและมิกซ์คอยล์ เครื่อง spectrophotometer ถูกใช้เป็นเครื่องตรวจวัดในระบบการไหลที่ความยาวคลื่น 880 nm

ตัวอย่างน้ำอ้อยที่ใช้ในการทดลองนี้ซื้อมาจากตลาด น้ำอ้อยจะถูกเจือจางด้วยน้ำ 4 เท่า จากนั้นจะเติมผง activated charcoal จำนวน 0.2 กรัม ลงใน 20 mL ของน้ำอ้อยที่เจือจางแล้วเพื่อกำจัดสารที่มีสีในตัวอย่าง จากนั้นนำสารตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มากรองผ่านตัวกรอง cellulose acetate membrane ขนาด 0.45 ไมครอน



รูปที่ 13 แสดงระบบ SI จำนวน 2 ระบบที่ใช้สำหรับพัฒนาวิธีการวัดน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในน้ำอ้อยในคราวเดียวกัน (a) ตำแหน่งของ selection valve วางอยู่หลังเครื่องตรวจวัด (b) ตำแหน่งของ selection valve วางอยู่หน้าเครื่องตรวจวัด

### 3.5.2 การใช้ระบบซีเควนเซียลอินเจกชันและ C4D เพื่อร่วมกับหลักการไอระเหยแบบไม่ใช้เยื่อเลือกผ่านเพื่อวัดปริมาณสารกันเชื้อราที่ควบคุมในไวน์

เมื่อมีการสร้างระบบซีเควนเซียลอินเจกชันขึ้นมาแล้ว และนอกจากนำระบบอัตโนมัติดังกล่าวทดสอบการขับเคลื่อนอนุภาค การทดสอบด้วยการพัฒนาระบบวัดน้ำตาลและฟอสเฟตแล้ว ยังได้นำระบบฯ มาพัฒนาวิธีการวัดสารควบคุมต้านเชื้อราที่ปนเปื้อนในการผลิตไวน์ด้วยคือ sulphite โดยนำมาใช้ควบคู่กับหลักการไอระเหยและใช้ตัวตรวจวัด C4D ที่พัฒนาขึ้น เพื่อเป็นตัวตรวจวัดได้ด้วย โดยระบบซีเควนเซียลอินเจกชันดังกล่าวเป็นดังรูปที่ 14



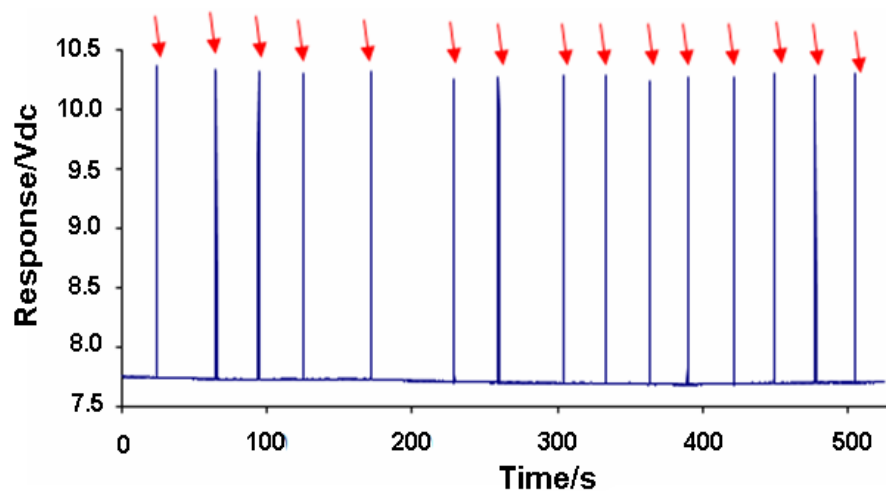


## บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 4.1 ออกแบบและสร้างหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี (C<sup>4</sup>D) อย่างง่าย สำหรับการตรวจจับอนุภาคนิวตริโนขนาดมิลลิเมตร

#### 4.1.1 การตรวจวัดอนุภาคนิวตริโนขนาดมิลลิเมตร

จากการทดสอบความเป็นไปได้เบื้องต้นในการใช้หัวตรวจวัดซีโฟร์ดีตรวจจับอนุภาคโดยการปล่อยลูกเหล็กให้ไหลผ่านในท่อแก้วที่มีซีโฟร์ดีติดตั้งอยู่ดังรูปที่ 6 ผลการทดลองการปล่อยลูกเหล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 มิลลิเมตร ที่ละลูก จำนวน 15 ลูกแสดงดังรูปที่ 16 เมื่อปล่อยลูกเหล็กลงในท่อแก้ว ลูกเหล็กจะเคลื่อนที่ไปตามแรงโน้มถ่วงของโลก น้ำมันซิลิโคนที่บรรจุอยู่ในท่อนั้นจะช่วยชะลอความเร็วของลูกเหล็กทำให้ลูกเหล็กเคลื่อนที่อย่างช้าๆ เมื่อลูกเหล็กเคลื่อนที่ผ่านหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีจะส่งผลให้ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำมันซิลิโคนเปลี่ยนแปลงไป ซีโฟร์ดีจึงสามารถให้สัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าได้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สัญญาณที่ได้มีทั้งหมด 15 สัญญาณซึ่งสอดคล้องกับจำนวนลูกเหล็กจำนวน 15 ลูกที่ปล่อยลงไป อีกทั้งสัญญาณทั้งหมดยังมีขนาดเท่ากันอีกด้วย แสดงถึงว่าลูกเหล็กที่เคลื่อนที่ผ่านซีโฟร์ดีนั้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากัน

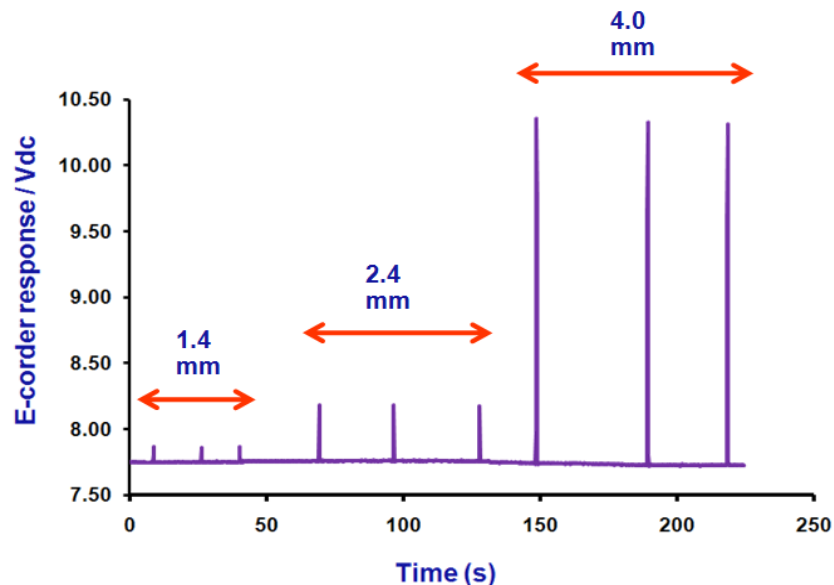


รูปที่ 16 แสดงสัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่ได้จากหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีเมื่อลูกเหล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร เคลื่อนที่ผ่าน

### 4.2 การจำแนกชนิดอนุภาคนิวตริโนขนาดมิลลิเมตร

การทดลองลำดับถัดไปคือการทดสอบความสามารถของหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีในการจำแนกขนาดของอนุภาค ทำการทดลองโดยปล่อยลูกเหล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างกัน 3 ขนาด คือ 1.4, 2.4 และ 4.0 มิลลิเมตร จำนวนขนาดละ 3 ลูก ลงสู่ท่อแก้ว จากผลการทดลองที่แสดงดังรูปที่ 17 แสดงให้เห็นว่าขนาดของสัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่ได้จากซีโฟร์ดีเมื่อลูกเหล็กเคลื่อนที่ผ่านมีความสัมพันธ์กับขนาดของลูกเหล็ก กล่าวคือ เมื่อลูกเหล็กขนาดเล็กเคลื่อนที่ผ่าน สัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่ได้จะมีค่าน้อย สัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อลูกเหล็กที่เคลื่อนที่ผ่านหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีมีขนาดใหญ่ขึ้น

จากผลการทดลองเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีสามารถตรวจจับอนุภาคและยังสามารถจำแนกขนาดของอนุภาคได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้เป็นขั้นเบื้องต้น อุปกรณ์ที่ใช้อยู่ในระดับสเกลขนาดใหญ่ ดังนั้นการประยุกต์ใช้หัวตรวจวัดซีโฟร์ดีในการนับและจำแนกขนาดของอนุภาคขนาดเล็กเช่น เซลล์เม็ดเลือด จำเป็นต้องออกแบบคุณลักษณะของซีโฟร์ดีและอุปกรณ์อื่นๆ ให้เหมาะสมกับขนาดอนุภาคต่อไป

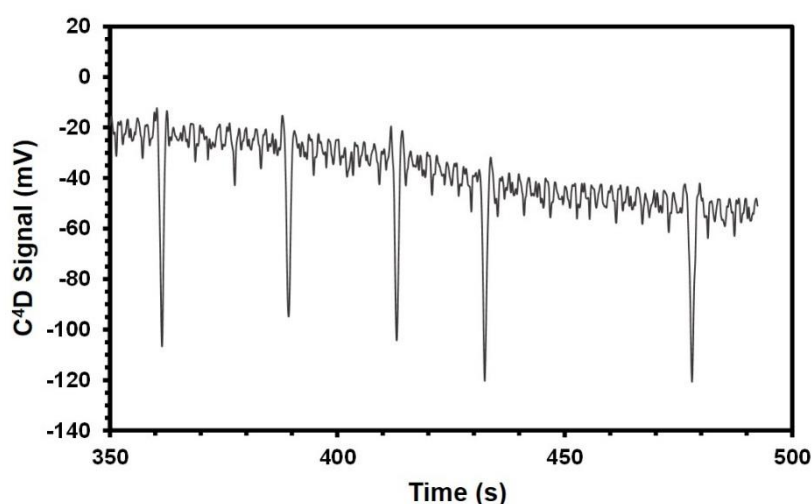


รูปที่ 17 แสดงสัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่ได้จากหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีเมื่ออนุภาคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.4, 2.4 และ 4.0 มิลลิเมตร ขนาดละ 3 ลูก เคลื่อนที่ผ่าน

### 4.3. ออกแบบและสร้างหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี ( $C^{4D}$ ) สำหรับตรวจวัดอนุภาคขนาดไมครอน และการทดสอบกับเลือด

#### 4.3.1 การตรวจวัดอนุภาคขนาดไมครอน

ทำการทดสอบเบื้องต้นถึงความสามารถของหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีที่สร้างขึ้นในการวัดอนุภาคขนาดไมครอน โดยทดสอบกับสารละลายอนุภาคพอลิสไตรีนขนาด 15 ไมครอน ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใช้ปั๊มผลักสารละลายอนุภาคให้ไหลไปในท่อแคพิลลารีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 20 ไมครอน ที่สอดอยู่ในหัวตรวจวัดซีโฟร์ดี บันทึกสัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเมื่ออนุภาคไหลผ่านหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีด้วยเครื่องบันทึกสัญญาณ สัญญาณการเปลี่ยนแปลงที่วัดได้ แสดงดังรูปที่ 18 จากสัญญาณที่ได้พบว่าหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีจะวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายตัวกลาง (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน เข้มข้น 0.1 โมลาร์) เมื่ออนุภาคไหลผ่านซีโฟร์ดี ปริมาตรของสารละลายตัวกลางจะถูกแทนที่ด้วยอนุภาคส่งผลให้ความต้านทานของสารละลายเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากอนุภาคไม่นำไฟฟ้า ดังนั้นค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายจะลดต่ำลง ดังเห็นได้จากสัญญาณหัวกลับที่บันทึกได้ จำนวนสัญญาณที่บันทึกได้มีจำนวนเท่ากับจำนวนอนุภาคที่ไหลผ่านหัวตรวจวัด ดังนั้นจากหลังการนี้สามารถใช้หัวตรวจวัดซีโฟร์ดีนับจำนวนอนุภาคขนาดเล็กได้ (ความถี่ของสัญญาณไฟฟ้าที่ใช้เท่ากับ 300 kHz และความต่างศักย์เท่ากับ 300 โวลต์)



รูปที่ 18 แสดงสัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่ได้จากซีโฟร์ดีเมื่ออนุภาคขนาด 15 ไมครอนเคลื่อนที่ผ่านในสารละลายตัวกลางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินเข้มข้น 0.1 โมลาร์

### 4.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณซีโฟร์ดีและขนาดของอนุภาค

ตามที่ได้กล่าวข้างต้น หัวตรวจวัดซีโฟร์ดีให้สัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าเมื่อมีอนุภาคพอลิสไตรีนขนาดไมครอนเคลื่อนที่ผ่านเนื่องจากอนุภาคพอลิสไตรีนซึ่งมีสมบัติเป็นฉนวนไฟฟ้าได้ไปแทนที่สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ซาลินซึ่งทำหน้าที่เป็นสารละลายตัวพาที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูง สัญญาณการเปลี่ยนแปลงที่ได้คือสัญญาณการลดลงของค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายตัวพา ดังแสดงในรูปที่ 18 จากผลการทดลองนี้พอคาดเดาได้ว่าเมื่อขนาดของอนุภาคพอลิสไตรีนเปลี่ยนไป ปริมาตรของสารละลายตัวพาที่ถูกแทนที่ก็จะเปลี่ยนตามไปด้วยส่งผลให้ขนาดของสัญญาณซีโฟร์ดีที่วัดได้เปลี่ยนแปลงตาม เพื่อทดสอบสมมติฐานนี้ ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาคและขนาดสัญญาณซีโฟร์ดีที่วัดได้ ทำการทดลองโดยใช้สารละลายอนุภาคพอลิสไตรีนขนาด 8, 10 และ 15 ไมครอนไหลผ่านซีโฟร์ดีตัวอย่างสัญญาณซีโฟร์ดีที่วัดได้ของอนุภาคที่ใช้ทดสอบดังกล่าวแสดงดังรูปที่ 19 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ทุกสัญญาณเป็นพีคหัวกลับที่เกิดจากการลดลงของค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายตัวพา สัญญาณที่วัดได้มีขนาดต่าง ๆ กัน ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดสัญญาณและขนาดของอนุภาคพอลิสไตรีนแสดงได้ดังรูปที่ 20 จากผลการทดลองพบว่าขนาดสัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของซีโฟร์ดีมีความสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของอนุภาค ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถอธิบายได้ด้วยสมการดังนี้

$$\Delta R = \frac{\rho}{A^2} V_p$$

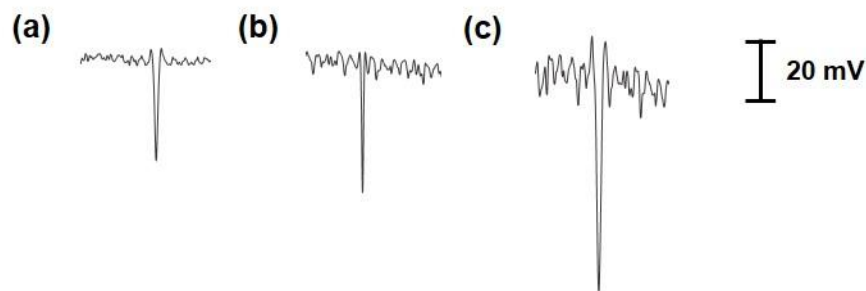
โดยที่

A	= พื้นที่หน้าตัดของช่อง
$\Delta R$	= ค่าการเปลี่ยนแปลงความต้านทานทางไฟฟ้า
$\rho$	= ค่า specific resistance ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์
$V_p$	= ปริมาตรของอนุภาคที่เคลื่อนที่ผ่าน

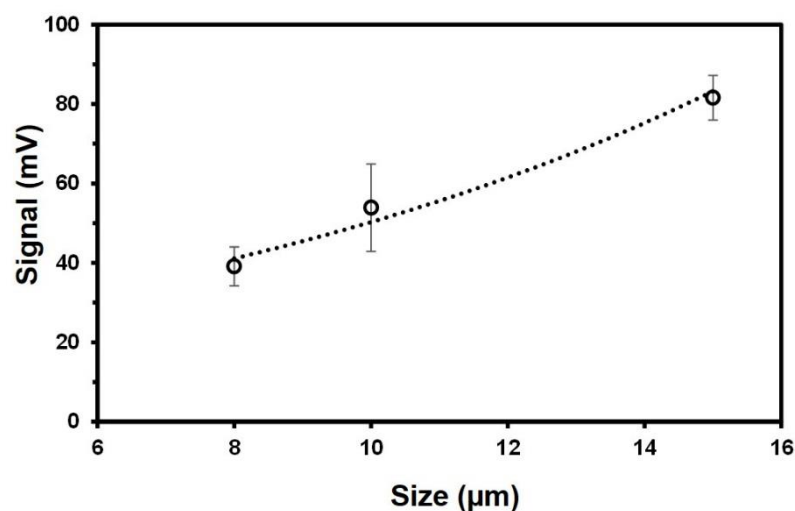
จากสมการข้างต้นจะเห็นได้ว่า ปริมาตรของอนุภาคที่เคลื่อนที่ผ่าน ( $V_p$ ) จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าการเปลี่ยนแปลงความต้านทานทางไฟฟ้าของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ( $\Delta R$ ) ความต้านทานไฟฟ้า ( $R$ ) เป็นส่วนกลับของค่าการนำไฟฟ้า ( $G$ ) แสดงดังสมการด้านล่าง

$$G = \frac{1}{R}$$

จากสมการทั้งสองที่ได้กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า เมื่ออนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น ค่าความต้านทานทางไฟฟ้าจะเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ลดลงเป็นสัดส่วนกัน ตามลำดับ ซึ่งแสดงได้จากผลการทดลองในรูปที่ 16 จากความสัมพันธ์ระหว่างขนาดสัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของซีโฟร์ดีและขนาดของอนุภาคที่ได้กล่าวมานี้ พอจะสรุปได้ว่า หัวตรวจวัดซีโฟร์ดีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้นับจำนวนอนุภาคและจำแนกขนาดต่างๆ ของอนุภาคได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 19 ตัวอย่างสัญญาณทางไฟฟ้าของซีโฟร์ดีที่วัดได้เมื่ออนุภาคพอลิสไตรีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (a) 8, (b) 10 และ (c) 15  $\mu\text{m}$  เคลื่อนที่ผ่าน



รูปที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาคพอลิสไตรีนและสัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่ได้จากซีโฟร์ดี

### 4.3.3 การทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดง

ขั้นตอนถัดมา ผู้วิจัยได้นำหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้สำหรับการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นเป็นข้อมูลขั้นต้นที่สำคัญที่สามารถใช้วินิจฉัยโรคได้ ก่อนการวิเคราะห์ สารละลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ถูกเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS) เข้มข้น 0.1 M pH 7.4 ด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสม สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS) เข้มข้น 0.1 M pH 7.4 ได้นำมาใช้สำหรับการเจือจางเลือดและเป็นสารละลายตัวพาในการวัดเนื่องจากสารละลายดังกล่าวเป็นสารละลายไอโซโทนิกกับสารละลายภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงไม่แตก จากนั้นสารละลายดังกล่าวจะไหลผ่านไปยังหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีเพื่อการตรวจวัด จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า หัวตรวจวัดซีโฟร์ดีที่พัฒนาขึ้นยังไม่สามารถตรวจวัดเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ผู้วิจัยคาดว่า สาเหตุอาจเป็นเพราะค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงและสารละลายตัวพาไม่มีความแตกต่างกันหรือค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดแดงไหลผ่านซีโฟร์ดีมีค่าน้อยมาก ๆ จึงไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยหัวตรวจวัดซีโฟร์ดีที่พัฒนาขึ้น

## 4.4 ระบบฉีดสารระดับไมโครลิตรราคาประหยัด “ครอสอินเจคชันอะนาไลซิส” หรือ ซีไอเอ (Cross Injection Analysis หรือ CIA) และทดสอบการนำส่งอนุภาคขนาดเล็ก

### 4.4.1 การศึกษารูปแบบการไหลของสารภายในซีไอเอแพลตฟอร์ม

#### 4.4.1.1 ความไวในการวิเคราะห์

รูปแบบการไหลของสารภายในซีไอเอแพลตฟอร์มทั้ง 2 แบบ ดังที่แสดงในตารางที่ 2 คือ การไหลของสารตามแนวแกน x และแกน y แบบสลับกัน หรือ Alternate flow และการไหลของสารตามแนวแกน x และแกน y แบบพร้อมกัน หรือ Simultaneous flow ได้ถูกนำมาใช้ในระบบการไหลสำหรับติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารละลาย Fe(II) และ 1,10-phenanthroline สารละลายมาตรฐาน Fe(II) ความเข้มข้นในช่วง 5 ถึง 20 มิลลิกรัมของ Fe(II)/ลิตร, สารละลาย hydroxylamine เข้มข้น 1 โมล/ลิตร, สารละลาย acetate buffer pH 5.3 และสารละลาย 1,10-phenanthroline เข้มข้น 0.015 โมล/ลิตร ถูกฉีดเข้าสู่ซีไอเอแพลตฟอร์มเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Fe(II) ด้วยรูปแบบการไหลทั้ง 2 แบบ จากผลการทดลองพบว่า รูปแบบการไหลทั้งสองแบบให้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Fe(II) ที่มีความเป็นเส้นตรงที่ดี มีค่า  $r^2$  โดยประมาณเท่ากับ 0.99 อย่างไรก็ตามการไหลรูปแบบที่ 2 ซึ่งก็คือ simultaneous flow มีความไวของการวิเคราะห์ (sensitivity) มากกว่าการไหลรูปแบบที่ 1 ดังนั้น การไหลรูปแบบที่ 2 จึงถูกเลือกเพื่อใช้สำหรับซีไอเอแพลตฟอร์มและการทดลองต่อไป

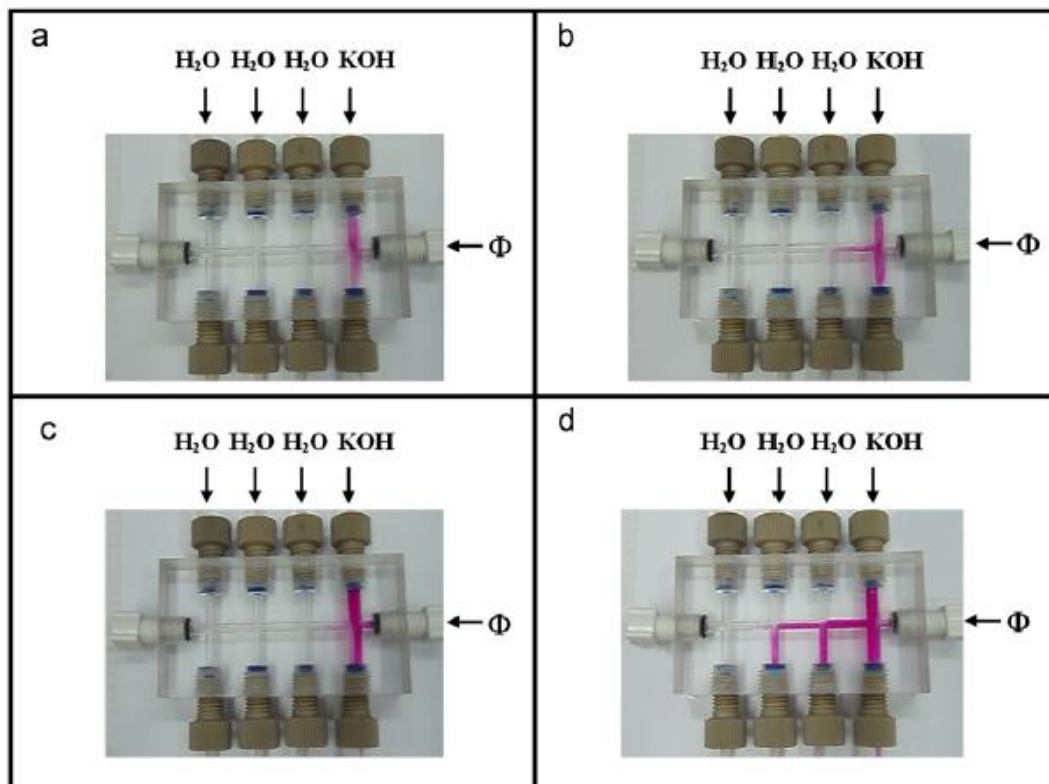
#### 4.4.1.2 ลักษณะการไหลของสารบริเวณรอยต่อของซีไอเอแพลตฟอร์มสำหรับการไหลแบบ alternate และ simultaneous flow

ปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่าง 1,10-phenolphthalein และสารละลายเบส KOH ได้ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาลักษณะและปรากฏการณ์การไหลบริเวณรอยต่อของซีไอเอแพลตฟอร์มด้วยวิธีการไหลของทั้งสองรูปแบบดังกล่าวข้างต้น ระบบการไหลในรูปที่ 10 และลำดับขั้นตอนการไหลดังแสดงในตารางที่ 2 ได้ถูกนำมาใช้ศึกษา สารละลายเบส KOH เข้มข้น 0.4 โมล/ลิตร จะไหลผ่านทางท่อที่ 4 ตามแนวแกน y ในขณะที่ สารละลาย 1,10-phenolphthalein เข้มข้น 0.003 โมล/ลิตร จะถูกใช้เป็นสารตัวพาไหลเข้าสู่ซีไอเอแพลตฟอร์มผ่านทางท่อที่ 5 ตามแนวแกน x ส่วนท่อที่ 1 ถึง 3 ในแนวแกน y จะใช้น้ำแทนรีเอเจนต์อื่นๆ

จากการศึกษาการไหลแบบ alternate flow ด้วยปฏิกิริยาดังกล่าว พบว่า จะพบสารสีชมพูซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,10-phenolphthalein และสารละลายเบส KOH บริเวณรอยต่อของท่อหมายเลข 4 และ 5 เมื่อสารละลายเบส KOH เดินทางมาถึง (รูปที่ 19a) สีชมพูของสารผลิตภัณฑ์จะเข้มข้นเมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 19b)

จากการศึกษาการไหลแบบ simultaneous flow พบว่า ในช่วงแรกในผลการทดลองคล้ายกับการไหลแบบ alternate flow คือ พบสารผลิตภัณฑ์สีชมพูบริเวณรอยต่อของท่อหมายเลข 4 และ 5 เมื่อสารละลายเบส KOH ไหลมาถึง (รูปที่ 19c) เมื่อเวลาผ่านไป สีชมพูของสารผลิตภัณฑ์จะเข้มข้น อีกทั้งยังพบว่าท่อนโซนของสารผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการไหลแบบ simultaneous flow นั้นยาวกว่า ท่อนโซนของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการไหลแบบ alternate flow มาก สังเกตได้จากท่อนสารสีชมพูในส่วนของท่อหมายเลข 5 ที่ยาวมาถึงท่อหมายเลข 2 เมื่อใช้การไหลแบบ simultaneous flow (รูปที่ 19d) ในขณะที่ท่อนสารสีชมพูจะอยู่แค่บริเวณรอยต่อของท่อหมายเลข 4 และ 5 เมื่อใช้การไหลแบบ alternate flow ทั้งนี้เป็นเพราะการไหลในแนวแกน x ของการไหลแบบ simultaneous flow ท่อนโซนของสารที่ถูกฉีดเข้าไปจะยืดยาวออกไปได้มากทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการผสมกันของสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ได้ดียิ่งขึ้น ปรากฏการณ์การไหลนี้สอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้นที่พบว่า รูปแบบการไหลแบบ simultaneous flow ในค่าความไวในการวิเคราะห์มากกว่า รูปแบบการไหลแบบ alternate flow ดังนั้น การไหลแบบ simultaneous flow จึงถูกเลือกเพื่อใช้สำหรับฉีดสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ในซีไอเอแพลตฟอร์มสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณหลักต่อไป





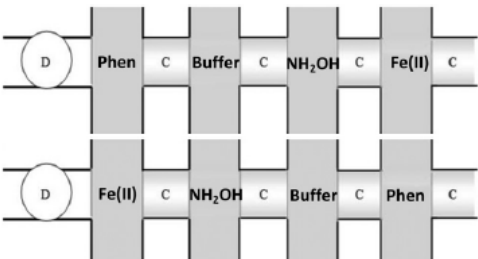
รูปที่ 21 แสดงรูปแบบการไหล 2 แบบ คือ alternate flow และ simultaneous flow โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่างสารละลายเบส KOH และ สารละลายอินดิเคเตอร์ phenolphthalein

#### 4.4.2 การศึกษาลำดับการผสมของสารในซีไอเอแพลตฟอร์ม

โดยปกติแล้วลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาของรีเอเจนต์ในปฏิกิริยาเคมีหนึ่งๆ จะมีผลโดยตรงต่อปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ถ้าลำดับการผสมของรีเอเจนต์เหมาะสม สารผลิตภัณฑ์จะเกิดมาก ส่งผลให้ความไวของการวิเคราะห์หรือ sensitivity มากตามไปด้วย ในทางตรงข้าม ถ้าลำดับการผสมของรีเอเจนต์ไม่เหมาะสม สารผลิตภัณฑ์จะเกิดน้อย ทำให้ความไวของการวิเคราะห์ต่ำ ในการทดลองนี้ได้ศึกษาลำดับการผสมของรีเอเจนต์ในท่อของซีไอเอแพลตฟอร์มจำนวน 2 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 4 คือ รูปแบบ a ลำดับของสารเรียงจากซ้ายไปขวา (ท่อที่ 1-4) คือ สารละลาย 1,10-phenanthroline, สารละลายบัพเฟอร์, สารละลาย hydroxylamine และสารละลายมาตรฐาน Fe(II) รูปแบบ b ลำดับของสารเรียงจากซ้ายไปขวา (ท่อที่ 1-4) เป็นดังนี้ สารละลายมาตรฐาน Fe(II), สารละลาย hydroxylamine, สารละลายบัพเฟอร์ และสารละลาย 1,10-phenanthroline ลำดับของสารทั้ง 2 รูปแบบ ท่อนโซนของรีเอเจนต์แต่ละชนิดจะคั่นด้วยสารละลายบัพเฟอร์ จากผลการทดลองพบว่า ความไวของการวิเคราะห์ซึ่งพิจารณาจากค่าความชันของกราฟมาตรฐานของลำดับการผสมสารทั้ง 2 รูปแบบ ไม่

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ได้เลือกใช้ลำดับการผสมของสารตามรูปแบบ a เนื่องจากเหมือนกับลำดับการผสมสารในวิธีแบบ Batch

ตารางที่ 4 แสดงลำดับการผสมของสารในซีไอเอ

Zone sequence		Calibration; correlation coefficient
		$A_{510} = (0.033 \pm 0.004) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.011 \pm 0.046); r^2 = 0.994$
		$A_{510} = (0.034 \pm 0.001) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.047 \pm 0.017); r^2 = 0.994$

#### 4.4.3 การศึกษาผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อในซีไอเอแพลตฟอร์มและมิกซิงคอยล์

การทดลองในส่วนนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อในซีไอเอแพลตฟอร์มที่มีผลต่อความไวของการวิเคราะห์ โดยได้สร้างซีไอเอแพลตฟอร์มขึ้นมา 3 ชนิด คือ ชนิด A, B และ C ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 5 ซีไอเอแพลตฟอร์ม A และ C มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อเท่ากันทุกท่อ (ท่อที่ 1-5) คือ ขนาด 2 และ 3 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขณะที่ซีไอเอแพลตฟอร์ม B มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อเท่ากันกับซีไอเอแพลตฟอร์ม A ต่างกันที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อที่ 4 ซึ่งใช้สำหรับฉีดสารตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 3 มิลลิเมตร

จากผลการทดลองสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Fe(II) โดยใช้ซีไอเอแพลตฟอร์มทั้ง 3 ชนิด พบว่า เมื่อเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อที่ 4 (เปรียบเทียบระหว่างซีไอเอแพลตฟอร์ม A และ B) ซึ่งใช้สำหรับฉีดสารมาตรฐานและสารตัวอย่างค่าความไวของการวิเคราะห์จะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้เพิ่มขึ้นนั่นเอง แต่ถ้าเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของทุกท่อ (เปรียบเทียบระหว่างซีไอเอแพลตฟอร์ม A และ C) ค่าความไวในการวิเคราะห์ที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกันทั้งนี้เนื่องจากอัตราส่วนของปริมาตรของสารละลายทั้งหมดที่ใช้มีค่าเท่าเดิม ดังนั้น ผู้ทำการทดลองจึงเลือกซีไอเอแพลตฟอร์ม B สำหรับการทดลองต่อไป

ในระบบการไหลอย่างต่อเนื่อง เป็นที่รู้จักโดยทั่วไปว่ามิกซิงคอยล์ (mixing coil) สามารถช่วยผสมสารที่ไหลอยู่ภายในท่อให้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะทำให้ค่าความไวในการวิเคราะห์ของระบบนั้นดีขึ้นตามไปด้วย ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงผลของความยาวของมิกซิงคอยล์ซึ่งวางอยู่

บริเวณด้านหน้าของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ความยาวของมิกซิงคอยล์ที่ใช้ศึกษาคือ ไม่มีมิกซิงคอยล์ จนถึงมิกซิงคอยล์ยาว 90 เซนติเมตร จากผลการทดลองพบว่าความไวของการวิเคราะห์เพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้มิกซิงคอยล์ยาวขึ้นจนถึง 45 เซนติเมตร ดังนั้น ผู้ทำการทดลองจึงเลือกความยาวของมิกซิงคอยล์ที่ 45 เซนติเมตร ใช้ในการทดลองต่อไป

**ตารางที่ 5** แสดงผลของเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อในซีไอเอ

CIA platform	Channel diameter (mm)					Calibration; correlation coefficient
	CH 1 (R3)	CH2 (R2)	CH3 (R1)	CH4 (S)	CH5 (C)	
A	2	2	2	2	2	$A_{510} = (0.033 \pm 0.004) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.011 \pm 0.046)$ ; $r^2 = 0.994$
B	2	2	2	3	2	$A_{510} = (0.074 \pm 0.001) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.040 \pm 0.002)$ ; $r^2 = 0.999$
C	3	3	3	3	3	$A_{510} = (0.029 \pm 0.002) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.068 \pm 0.017)$ ; $r^2 = 0.997$

#### 4.4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของรีเอเจนต์

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของรีเอเจนต์ทั้ง 2 ชนิด คือ สารละลาย 1,10-phenanthroline (R3) และ สารละลาย hydroxylamine (R1) ต่อค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ โดยสารละลาย 1,10-phenanthroline ศึกษาในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่  $5 \times 10^{-3}$  ถึง  $1.5 \times 10^{-2}$  โมล/ลิตร จากการทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน Fe(II) ที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ  $3.5 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร พบว่า สัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าคงที่เท่ากันทุกความเข้มข้นของสารละลาย 1,10-phenanthroline ที่ใช้ทดลอง แสดงให้เห็นว่า สารละลาย 1,10-phenanthroline ที่ใช้เป็นรีเอเจนต์นั้นในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีชมพูกับ Fe(II) นั้นมีค่ามากเกินไป ผู้ทำการทดลองได้เลือกใช้สารละลาย 1,10-phenanthroline เข้มข้นสูงสุดคือ  $1.5 \times 10^{-2}$  โมล/ลิตร เพื่อให้แน่ใจได้ว่ารีเอเจนต์ที่ใช้มีปริมาณมากเกินไปสำหรับการทำปฏิกิริยากับ Fe(II)

สารละลาย hydroxylamine ที่ใช้ในปฏิกิริยานี้มีหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์สำหรับ Fe(III) การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย hydroxylamine ในช่วง 0.5 – 1.5 โมล/ลิตร สำหรับการวัดสารละลายมาตรฐาน Fe(III) ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ลิตร จากผลการทดลองพบว่า ค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าคงที่และไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลาย hydroxylamine ผู้ทำการทดลองได้เลือกสารละลาย hydroxylamine ที่ความเข้มข้น 1.1 โมล/ลิตร สำหรับการทดลองต่อไป

#### 4.4.5 คุณสมบัติของวิธีไฮเอเพลตฟอรัมในการวิเคราะห์ปริมาณ Fe(II), Fe(III) และปริมาณเหล็กทั้งหมด

การทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น พบว่า เมื่อใช้วิธีไฮเอควบคู่กับระบบการไหลวิเคราะห์หารปริมาณ Fe(II) จะให้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงที่ดี ( $A_{510} = (0.0705 \pm 0.002) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.031 \pm 0.011)$ ;  $r^2 = 0.995$ ) ความเข้มข้นของเหล็กตั้งแต่ 5 ถึง 20 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of quantitation,  $10\sigma$  blank/slope) ปริมาณเหล็กด้วยวิธีไฮเอคือ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร วิธีไฮเอที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ปริมาณน้อย คือ 167 และ 501 ไมโครลิตร ตามลำดับ วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่างได้มากถึง 60 ตัวอย่างต่อชั่วโมง มีความเที่ยง (%RSD) น้อยกว่า 2.6% สำหรับการวิเคราะห์ Fe(II) เข้มข้น 15 มิลลิกรัม/ลิตร วิเคราะห์ซ้ำกันจำนวน 10 ครั้ง

วิธีไฮเอควบคู่กับระบบการไหลที่ได้พัฒนาขึ้นยังถูกนำไปใช้ในการจำแนกปริมาณ Fe(II) และ Fe(III) ในสารตัวอย่าง ในกรณีการวิเคราะห์ปริมาณ Fe(II) เพียงอย่างเดียวจะใช้น้ำแทนสารละลาย hydroxylamine (R1) ในขณะที่ปริมาณ Fe(III) สามารถหาได้จากผลต่างระหว่างปริมาณเหล็กทั้งหมดกับปริมาณเหล็ก Fe(II) เพียงอย่างเดียว ผลการทดลองในตารางที่ 6 แสดงถึงความสอดคล้องกันของปริมาณ Fe(II), Fe(III) และ เหล็กทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีไฮเอเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นที่ได้เติมลงไป ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของเหล็กทุกชนิดมีค่าที่ดี

เม็ดวิตามินรวมนอกจากจะมีธาตุเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบแล้ว ยังประกอบไปด้วยธาตุอื่นๆ อีก เช่น ไอโอดีน (I), คลอรีน (Cl), แคลเซียม (Ca), แมกนีเซียม (Mg), แมงกานีส (Mn), สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) ธาตุเหล่านี้มีความเป็นไปได้ที่จะรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณเหล็ก ในการทดลองนี้จึงทดสอบการรบกวนของธาตุดังกล่าว โดยเติมธาตุเหล่านั้นในรูปแบบของ KI, KCl,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  และ  $\text{CuSO}_4$  ลงในสารละลายมาตรฐาน Fe(II) เข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร การทดสอบทั้งหมดทำแยกกัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสัญญาณที่ได้จากการวัดสารละลาย Fe(II) ที่มีธาตุอื่นๆ แต่ละชนิดผสมอยู่ไม่มีความแตกต่างกับสัญญาณที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐาน Fe(II) ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ถึงแม้จะใช้ความเข้มข้นของธาตุอื่นๆ สูงถึง 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร ก็ตาม ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าธาตุอื่นๆ ที่พบในเม็ดวิตามินรวมไม่รบกวนการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กด้วยวิธีไฮเอ

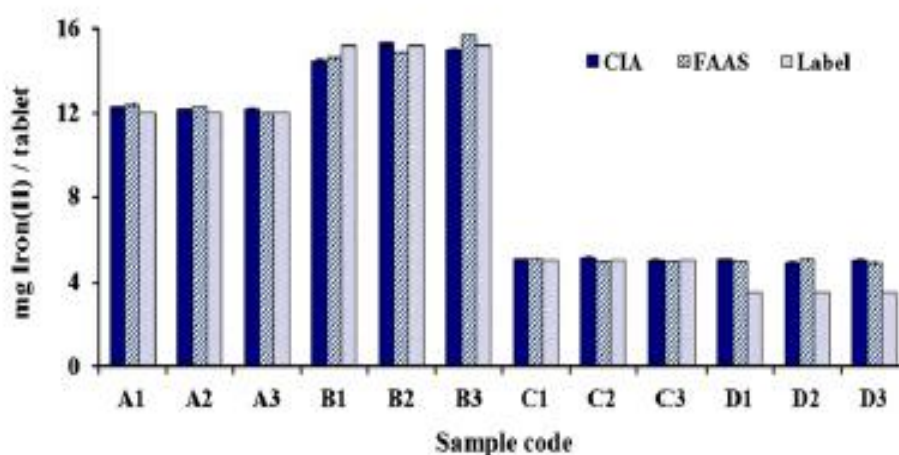
ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ Fe(II), Fe(III) และเหล็กทั้งหมด

Spiked solution	Added (mg L <sup>-1</sup> Fe)			Determined value (mg L <sup>-1</sup> Fe)			%Recovery		
	Fe(II)	Fe(III)	Total Fe	Fe(II)	Fe(III)	Total Fe	Fe(II)	Fe(III)	Total Fe
A	3.00	12.0	15.0	2.81 ± 0.06	12.8 ± 0.21	15.6 ± 0.24	93.7	107	104
B	5.00	10.0	15.0	5.48 ± 0.11	9.05 ± 0.19	14.5 ± 0.22	110	90.5	96.9
C	7.00	8.00	15.0	7.32 ± 0.15	8.70 ± 0.19	16.0 ± 0.29	104	109	106
D	9.00	6.00	15.0	8.54 ± 0.17	6.65 ± 0.13	15.2 ± 0.21	94.9	111	101

#### 4.4.6 การหาปริมาณเหล็กในเม็ดวิตามินรวม

วิธีเจือจางด้วยซีไอเอแพลตฟอร์มควบคุมกับระบบการไหลอย่างต่อเนื่องที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้หาปริมาณเหล็กในเม็ดวิตามินรวมจำนวน 4 ยี่ห้อแตกต่างกัน (A-D) แต่ละยี่ห้อจะวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ผลการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในเม็ดวิตามินรวมที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับปริมาณที่ระบุไว้ที่ฉลากและปริมาณที่หาด้วยวิธีเฟรมอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโตรเมทรี (Flame atomic absorption spectrometry, FAAS) แสดงดังรูปที่ 22 จากการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากวิธีซีไอเอและที่ได้จาก FAAS ด้วยวิธีทางสถิติ คือ paired t-test พบว่าข้อมูลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ( $t_{\text{stat}} = 0.16$ ,  $t_{\text{crit}} = 2.20$ ) ในขณะที่ข้อมูลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีซีไอเอเปรียบเทียบกับค่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก พบว่า ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันยกเว้นในตัวอย่าง D ทั้งนี้อาจเป็นเพราะคุณภาพของตัวอย่างยี่ห้อตนเอง

ยิ่งไปกว่านั้น ในการทดลองนี้ยังได้ศึกษาร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในเม็ดวิตามินรวมอีกด้วย จากการศึกษาพบว่าค่าที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 90.1-107% แสดงให้เห็นว่าวิธีซีไอเอที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่ดี



รูปที่ 22 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กของ 3 วิธี คือ วิธีซีไอเอ, ปริมาณที่ระบุข้างฉลากและวิธี Atomic absorption spectrometry

**4.5 ตัวตรวจวัดแบบไดโอดคู่ (Paired emitter-detector diode หรือ PEDD) ใช้ควบคู่กับระบบซีเคอนเซี่ยลอินเจกชัน สำหรับการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในเครื่องดื่มโคล่าโดยอาศัยหลักการวัดทางกายภาพทั้งแบบการหักเหแสงบริเวณรอยต่อสารละลายที่มีค่าดัชนีหักเหแตกต่างกัน (ซลึเรนทึเอ็ฟเฟกท์) และการวัดความขุ่นของตะกอน**

ในงานนี้ได้ทดสอบเบื้องต้นว่า PEDD เหมาะสมแก่การวัดกลุ่มอนุภาคหรือไม่ ด้วยการวัดสารแบบขุ่น (สร้างตะกอนด้วยปฏิกิริยาตกตะกอน) และเมื่อทดสอบเบื้องต้นพบว่าทำได้จริง แต่ยังหาความสัมพันธ์ไม่ได้ระหว่างสัญญาณกับจำนวนอนุภาค แต่เหมาะสำหรับวัดความขุ่น งานนี้จึงได้พัฒนาต่อยอด PEDD ใช้ร่วมกับระบบไหลแบบซีเคอนเซี่ยลเพื่อพัฒนาวิธีใหม่ ในการวัดน้ำตาลซูโครสร่วมกับฟอสเฟต ดังนี้

#### **4.5.1 การออกแบบระบบและลักษณะสัญญาณ**

ระบบ SI-PEDD ในรูปที่ 11 ใช้เพื่อศึกษาการใช้งานของตัวตรวจวัด PEDD เพื่อวัดปรากฏการณ์ Schlieren effect และ ความขุ่น ไปในคราวเดียวกัน ระบบวิเคราะห์เริ่มด้วยการดูดท่อนสารที่จะตรวจวัดเข้ามาพักในท่อพักสาร โดยมีท่อนรีเอเจนต์ (R) แทรกอยู่ตำแหน่งตรงกลางระหว่างท่อนสารตัวอย่าง ( $S_1$  และ  $S_2$ ) ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟต จากนั้นท่อนสารทั้งหมดถูกผลักไปยังตัวตรวจวัด PEDD สัญญาณของท่อนสารทั้งหมดเมื่อไหลผ่านตัวตรวจวัด PEDD แสดงในรูปที่ 12

การไหลแบบลามินาร์ (Laminar flow pattern) ทำให้เกิดรอยต่อระหว่างท่อนตัวอย่าง  $S_2$  กับน้ำ ส่งผลให้เห็นสัญญาณอันเนื่องมาจากปรากฏการณ์ Schlieren effect (สัญญาณ 'A' ในรูปที่ 12) เมื่อท่อนตัวอย่าง  $S_2$  ไหลผ่านตัวตรวจวัด PEDD แล้ว บริเวณตรงกลางของท่อนสารทั้งหมดซึ่งมีตะกอนของแคลเซียมฟอสเฟตอยู่นั้น จะไหลผ่านเข้ามา ตะกอนแคลเซียมฟอสเฟตเหล่านี้จะกระเจิงแสงจาก LED emitter ส่งผลให้สัญญาณลดลง (สัญญาณ 'B' ในรูปที่ 12) และเมื่อท้ายท่อนโซนของรอยต่อระหว่างท่อนตัวอย่าง  $S_1$  และน้ำ ไหลผ่านเข้ามาในตัวตรวจวัด PEDD จะพบว่าสัญญาณลดลงที่มีขนาดเล็กน้อย ซึ่งสัญญาณนี้จะพบเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงกว่า 5 Brix สัญญาณ

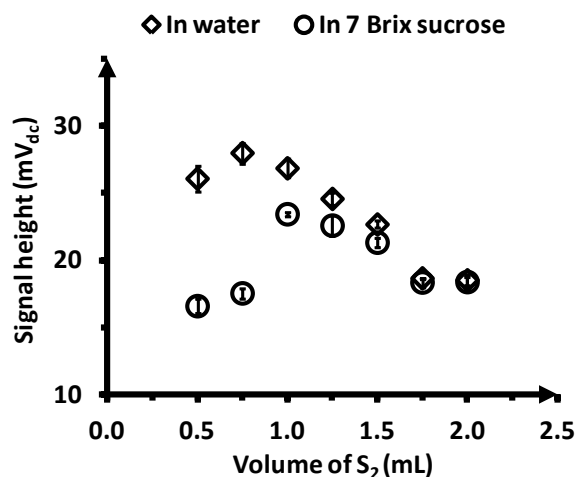
ปรากฏการณ์ Schlieren effect เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดจากการหักเหของแสงบริเวณผิวรอยต่อของสารละลาย ในที่นี้ คือ รอยต่อของสารละลายน้ำตาลกับน้ำ (สารละลายน้ำตาลมีค่าดัชนีหักเห (Refractive index, RI) ที่มากกว่าน้ำ) ดังนั้น แสงที่มาจาก LED emitter เมื่อเดินทางผ่านสารละลายน้ำตาลเข้าสู่ น้ำ จะหักเหเข้า LED detector มากขึ้น ส่งผลทำให้สัญญาณความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดสูงขึ้น (สัญญาณ 'A' ในรูปที่ 12) สำหรับการสัญญาณความขุ่นนั้น ตะกอนแขวนลอยของแคลเซียมฟอสเฟต จะกระเจิงแสงที่มาจาก LED emitter ทำให้มี

แสงที่ตกกระทบบนที่ LED detector น้อยลง สัญญาณความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดได้จึงลดลง (สัญญาณ 'B' ในรูปที่ 12)

#### 4.5.2 โอกาสของตัวรบกวนการวัด

ในการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรบกวนซึ่งกันและกันสำหรับการวัดน้ำตาลและการวัดฟอสเฟต ในส่วนแรก ศึกษาผลการรบกวนของฟอสเฟตที่มีต่อการวัดน้ำตาลซูโครส โดยผู้วิจัยได้เตรียมสารละลายฟอสเฟตความเข้มข้นตั้งแต่  $50 - 200 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$  ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 7 Brix ผลการทดลองพบว่า สัญญาณน้ำตาลที่วัดได้เมื่อมีฟอสเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ กันนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าฟอสเฟตไม่มีผลรบกวนต่อการวัดน้ำตาลซูโครส มั้งนี้เนื่องมาจากค่า RI ของสารละลายตัวอย่างขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลเพียงอย่างเดียว

ในส่วนที่สอง ศึกษาผลรบกวนของน้ำตาลที่มีต่อการวัดฟอสเฟต โดยผู้วิจัยได้เตรียมสารละลายฟอสเฟต  $200 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$  ในน้ำและในสารละลายน้ำตาลซูโครส 7 Brix ปริมาตรท่อนตัวอย่างที่ดูดเข้ามา คือ 0.5:0.1:0.5 มิลลิลิตร สำหรับท่อนสาร  $S_1$ :R: $S_2$  ตามลำดับ (รูปที่ 23 ที่  $S_2 = 0.5 \text{ mL}$ ) ผู้วิจัยพบว่า สัญญาณความขุ่น (แกน y ในรูปที่ 21) ที่ได้จากสารละลายฟอสเฟตที่เตรียมในตัวอย่างละลายต่างชนิดกัน มีค่าขนาดสัญญาณที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องมาจากความหนืดของสารละลายน้ำตาลซูโครสส่งผลต่อการผสมในการตกตะกอนของแคลเซียมฟอสเฟต โดยทั่วไป การเพิ่มความยาวของท่อผสมสาร (MC) จะช่วยในเรื่องการผสมได้ดีขึ้น แต่ในระบบนี้ ผู้วิจัยต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการผสมเฉพาะบริเวณตรงกลางของท่อนโซนเท่านั้นและไม่ต้องการให้การผสมเกิดดีขึ้นที่บริเวณหัวท่อนโซน ซึ่งจะเป็นบริเวณที่ใช้วัดน้ำตาลซูโครส ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเพิ่มประสิทธิภาพการผสมด้วยการเพิ่มความยาวของท่อนตัวอย่าง  $S_2$  ซึ่งจะเพิ่มการผสมระหว่างท่อนตัวอย่างและท่อนรีเอเจนต์ในแนวยาวตามท่อ (Longitudinal dispersion) ผลการทดลองในรูปที่ 21 แสดงว่า ขนาดความสูงของสัญญาณฟอสเฟตของสารละลายฟอสเฟตในน้ำเพิ่มขึ้น เมื่อใช้ปริมาตรท่อนตัวอย่าง  $S_2$  ตั้งแต่ 0.5 – 0.75 มิลลิลิตร เนื่องจากมีตะกอนแคลเซียมฟอสเฟตเกิดมากขึ้น อย่างไรก็ตาม พบว่า หากใช้ปริมาตรท่อนตัวอย่าง  $S_2$  มากกว่า 0.75 มิลลิลิตร สัญญาณฟอสเฟตจะลดต่ำลง เนื่องจากเกิดการเจือจางของท่อนโซนภายในท่อ ในทำนองเดียวกัน ผู้วิจัยพบว่าแนวโน้มของสัญญาณฟอสเฟตในน้ำตาล 7 Brix คล้ายกับสารละลายฟอสเฟตในน้ำ แต่ขนาดของสัญญาณมีค่าน้อยกว่าสำหรับการใช้ท่อนตัวอย่าง  $S_2$  ปริมาตร 0.5 -1.5 มิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม พบว่าปริมาตร  $S_2$  ที่ 1.75 มิลลิลิตรเป็นต้นไป ให้สัญญาณฟอสเฟตที่เท่ากันทั้งที่เตรียมจากในน้ำและในสารละลายน้ำตาล 7 Brix ดังนั้น ผู้วิจัยได้เลือกปริมาตรท่อนตัวอย่าง  $S_2$  ที่ 1.75 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดผลรบกวนของน้ำตาลที่มีต่อการวัดฟอสเฟต



รูปที่ 23 แสดงอิทธิพลของปริมาตรท่อนตัวอย่าง  $S_2$  ที่มีต่อขนาดสัญญาณฟอสเฟต  $200 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$  ที่เตรียมในตัวอย่างละลาย คือ น้ำ (◇) และ สารละลายน้ำตาลซูโครส 7 Brix (○). กำหนดปริมาตรท่อนสาร  $S_1$  และ R เท่ากับ 0.5 และ 0.1 มิลลิลิตร คงที่ตลอดการทดลอง

#### 4.5.3 ตัวตรวจวัด PEDD

ผู้วิจัยจำเป็นต้องเลือกความยาวคลื่นในการตรวจวัดให้เหมาะสม เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนจากการดูดกลืนแสงจากสีของตัวอย่าง (เครื่องต้มโคล้งมีสีน้ำตาลดำ) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโคล้งอยู่ที่ 350 – 700 นาโนเมตร ดังนั้น ในงานนี้จึงเลือกใช้หลอดไอโอดีนเปล่ง คลื่นแสงอินฟราเรด มีความยาวคลื่นที่ 890 นาโนเมตร เป็นทั้งตัวเปล่งแสงและตัวรับแสง

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้เลือก เซลล์วัดแบบไหล ที่มีปริมาตรภายในขนาด 18 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้รอยต่อที่คมชัดระหว่างสารละลายน้ำตาลกับน้ำ เซลล์วัดแบบไหลที่มีปริมาตรภายในขนาด 80 ไมโครลิตร ไม่เหมาะสมกับการวัด Schlieren effect เนื่องจากขนาดของท่อภายในเซลล์มีขนาดใหญ่ ส่งผลทำให้เกิดการกระจายตัวของท่อนโซนที่มาก และ ทำให้รอยต่อของสารละลายน้ำตาลกับน้ำไม่ชัดเจน

#### 4.5.4 การศึกษาอิทธิพลของอัตราการไหล

อัตราการไหลมีอิทธิพลต่อความไวในการวิเคราะห์ (Sensitivity) และจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ (Sample throughput) อัตราการไหลที่ศึกษานี้ คือ อัตราการไหลในขั้นตอนที่ 5 (ตารางที่ 3) เป็นขั้นตอนที่ผลึกท่อนสารทั้งหมดไปยังตัวตรวจวัด PEDD ทำการศึกษาตั้งแต่



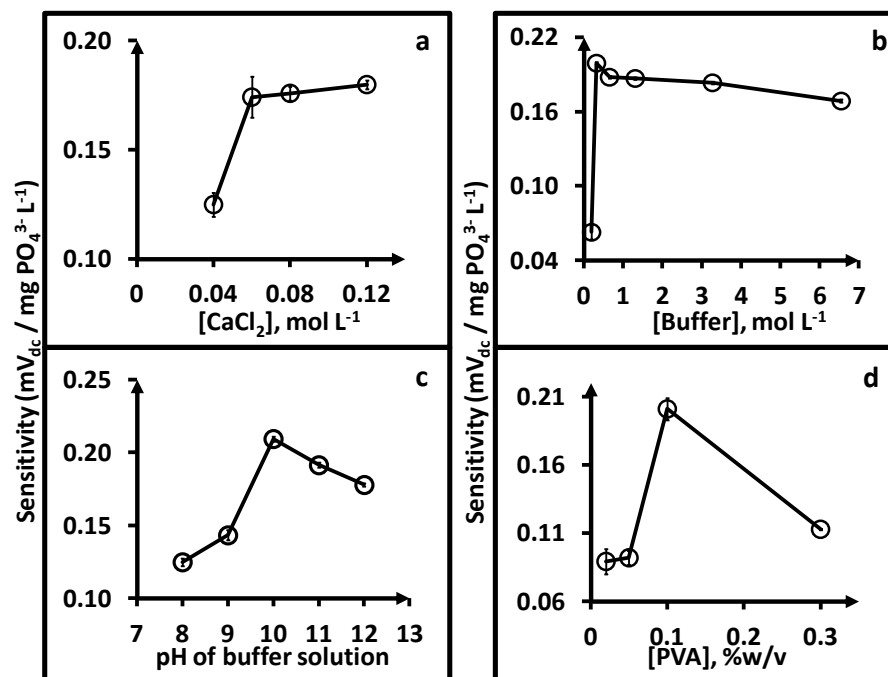
1 – 10 mL min<sup>-1</sup> พบว่า อัตราการไหลต่ำให้ค่าความไวในการวิเคราะห์ที่ดี สำหรับการวัดน้ำตาลและฟอสเฟต ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยเลือกอัตราการไหลที่ 5 mL min<sup>-1</sup> เนื่องจากได้ค่าความไวในการวิเคราะห์และจำนวนตัวอย่างในการวิเคราะห์ที่เหมาะสม

#### 4.5.5 ตัวแปรที่มีผลต่อการตกตะกอนของแคลเซียมฟอสเฟต

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{CaCl}_2$  โดยศึกษาในช่วง 0.04 – 0.12 mol L<sup>-1</sup> ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 24a พบว่า ที่ความเข้มข้นของ  $\text{CaCl}_2$  ตั้งแต่ 0.06 mol L<sup>-1</sup> เป็นต้นไป สัญญาณเริ่มคงที่ ในงานนี้ ผู้วิจัยเลือกความเข้มข้นของ  $\text{CaCl}_2$  ที่ 0.08 mol L<sup>-1</sup> ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไปที่จะใช้ในการตะกอนแคลเซียมฟอสเฟต

รูปที่ 24b แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียม ตั้งแต่ 0.2 – 6.5 mol L<sup>-1</sup> พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ 0.3 mol L<sup>-1</sup> ให้ค่าความไวในการวิเคราะห์สูงสุด สำหรับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 0.3 mol L<sup>-1</sup> นั้น ค่าความจุบัฟเฟอร์ (Buffer capacity) ไม่เพียงพอต่อการทำให้ตัวอย่างเป็นกลาง หากใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่สูงเกินไป จะส่งผลต่อการตกตะกอนแคลเซียมฟอสเฟต เนื่องจากมีอิทธิพลจาก Ionic strength ที่สูงขึ้น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้เลือกความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ 0.3 mol L<sup>-1</sup> รูปที่ 24c แสดงค่า pH ของสารละลายแอมโมเนียมบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการตกตะกอนแคลเซียมฟอสเฟต พบว่า ค่า pH ที่เหมาะสม คือ 10 เนื่องจากให้ค่าความไวในการวิเคราะห์สูงสุด

สารละลาย PVA เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ช่วยทำให้ตะกอนแคลเซียมฟอสเฟตแขวนลอยในของเหลวได้รูปที่ 24d แสดงการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นสารละลาย PVA ตั้งแต่ 0.02 – 0.30 % (w/v) ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นที่ 0.1 % (w/v) ให้ค่าความไวในการวิเคราะห์สูงสุด การใช้ความเข้มข้นของ PVA ที่มากเกินไป (ในที่นี้ คือ มากกว่า 0.1 % (w/v)) จะส่งผลทำให้จำนวนตะกอนที่เกิดขึ้นลดน้อยลงและส่งผลทำให้เกิดการกระเจิงแสงที่ลดน้อยลงตามไปด้วย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นของสารละลาย PVA ที่ 0.1 % (w/v)

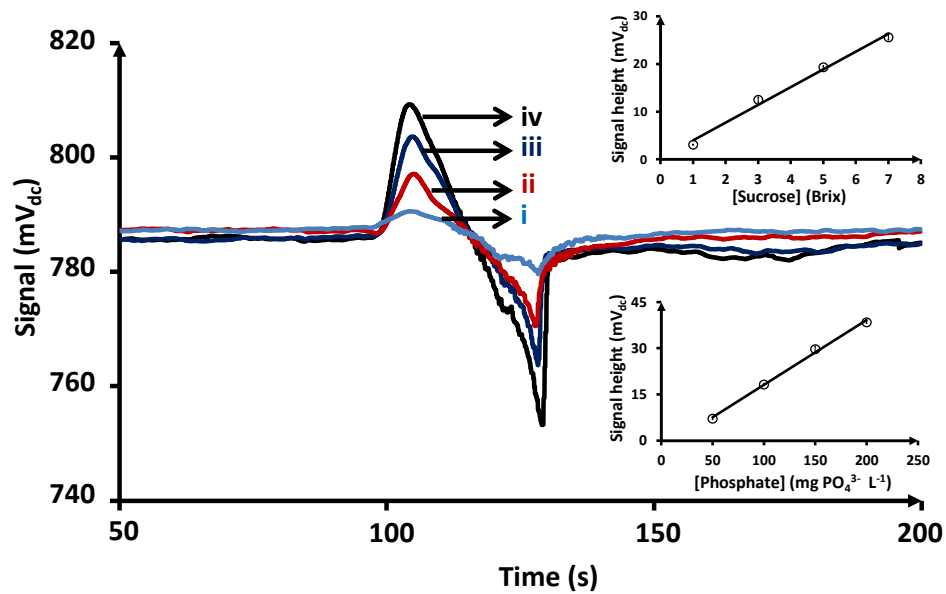


รูปที่ 24 อิทธิพลของรีเอเจนต์ในการตกตะกอนแคลเซียมฟอสเฟตต่อค่าความไวในการวิเคราะห์ (Sensitivity)

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาปริมาณของสารละลาย CaCl<sub>2</sub> ตั้งแต่ 50 – 200 ไมโครลิตร ผลการทดลอง แสดงว่า เมื่อเพิ่มปริมาณสูงขึ้น ค่าสัญญาณฟอสเฟตก็สูงขึ้นด้วย และคงที่ที่ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ดังนั้น ผู้วิจัยเลือกปริมาณของสารละลาย CaCl<sub>2</sub> ที่ 100 ไมโครลิตร

#### 4.6 คุณสมบัติของระบบ และการประยุกต์เพื่อวิเคราะห์ตัวอย่างโคล่า

รูปที่ 25 แสดงตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากสารละลายผสมมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟต ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของระบบ SI-PEDD ที่พัฒนาขึ้น กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลและฟอสเฟตครอบคลุมช่วงความเข้มข้นในตัวอย่าง ดังนี้ สารละลายน้ำตาลซูโครส ตั้งแต่ 1-7 Brix ((signal height, mV<sub>dc</sub>) = (3.14±0.03)[Brix] + (0.14±0.13), r<sup>2</sup> = 0.999) และสารละลายฟอสเฟต ตั้งแต่ 50 - 200 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup> ((signal height, mV<sub>dc</sub>) = ((1.85±0.04) × 10<sup>-1</sup>)[mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup>] - (1.96±0.51), r<sup>2</sup> = 0.999). ขีดจำกัดการวัดได้ (Detection limit, 3S/N) อยู่ที่ 0.5 Brix และ 20 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup> ค่าความเที่ยง (Precision) อยู่ที่ 0.9% and 1.7% (RSD) เมื่อทำการฉีดสารละลายผสมมาตรฐานของน้ำตาล 5 Brix กับ ฟอสเฟต 150 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup> จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ต่อชั่วโมง คือ 21 ตัวอย่าง



รูปที่ 25 แสดงตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากสารละลายผสมมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟต ณ ความเข้มข้น (i) 1 Brix + 50 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup> (ii) 3 Brix + 100 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup> (iii) 5 Brix + 150 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup> (iv) 7 Brix + 200 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup> ภาพแทรกแสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลซูโครส (บน) และสารละลายฟอสเฟต (ล่าง)

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในตัวอย่างสังเคราะห์ จำนวน 5 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าระบบ SI-PEDD ที่พัฒนาขึ้นให้ผลสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน จากนั้น ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างโคล่า (ตารางที่ 8) พบว่า ให้ผลในทำนองเดียวกับกับตัวอย่างที่เตรียมขึ้นเอง คือ สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ paired t-test ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ผลเปรียบเทียบจากระบบ SI-PEDD กับวิธีมาตรฐานนั้นให้ผลที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (น้ำตาลซูโครส:  $t_{\text{observed}} = 1.285$ ,  $t_{\text{critical}} = 2.306$  ณ  $P = 0.05$ ; ฟอสเฟต:  $t_{\text{observed}} = 0.005$ ,  $t_{\text{critical}} = 2.178$  ณ  $P = 0.05$ )

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบค่าความแม่นยำที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างสังเคราะห์ โดยใช้ระบบ SI-PEDD ที่พัฒนาขึ้น เทียบกับวิธีมาตรฐาน

Nominal values of synthetic sample	Sugar (Brix)		Phosphate (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup> )	
	Our method	Refractometric method <sup>a</sup>	Our method	Spectrophotometric method <sup>b</sup>
5 Brix+ 200 mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup>	5.16 ± 0.14 (2.7)	5.16 ± 0.05 (1.0)	197.7 ± 3.0 (1.5)	202.7 ± 2.1 (1.0)
7 Brix + 200 mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup>	6.42 ± 0.12 (1.9)	6.47 ± 0.07 (1.1)	200.0 ± 2.5 (1.3)	199.0 ± 2.1 (1.1)
10 Brix + 300 mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup>	9.79 ± 0.14 (1.4)	9.94 ± 0.10 (1.0)	300.7 ± 2.5 (0.8)	296.3 ± 2.6 (0.9)
10 Brix + 300 mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup>	10.44 ± 0.22 (2.1)	10.27 ± 0.10 (1.0)	299.9 ± 3.9 (1.3)	303.9 ± 3.0 (1.0)
12 Brix + 300 mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup>	11.95 ± 0.24 (2.0)	12.31 ± 0.14 (1.1)	300.7 ± 3.3 (1.1)	306.4 ± 4.3 (1.4)

<sup>a</sup>Refractometer 30PX/GS. Mettler Toledo, USA.

<sup>b</sup>E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, L. S. Clesceri, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twenty second ed., American Public Health Association, Washington, USA, 2012, p. 4-155-156.

ตัวเลขในวงเล็บแสดงค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD, n=6)

ตารางที่ 8 แสดงผลวิเคราะห์ปริมาณในเครื่องดื่มโคล่า โดยใช้ระบบ SI-PEDD ที่พัฒนาขึ้น  
เทียบกับวิธีมาตรฐาน ตัวเลขในวงเล็บแสดงค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD, n=6)

Sample	Sugar (Brix)		Phosphate (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup> )	
	Our method	Refractometric method <sup>a</sup>	Our method	Spectrophotometric method <sup>b</sup>
Cola 1	9.55 ± 0.11 (1.2)	9.75 ± 0.05 (0.5)	341.5 ± 6.1 (1.8)	342.4 ± 3.6 (1.1)
Cola 2	9.09 ± 0.09 (1.0)	9.14 ± 0.06 (0.7)	338.2 ± 1.7 (0.5)	347.6 ± 5.6 (1.6)
Cola 3	9.96 ± 0.13 (1.3)	9.82 ± 0.10 (1.0)	340.5 ± 7.0 (2.1)	330.0 ± 3.1 (0.9)
Cola 4	9.73 ± 0.14 (1.4)	9.84 ± 0.10 (1.0)	377.7 ± 1.8 (0.5)	375.8 ± 4.4 (1.2)
Sugar-free cola 1	nd	nd	348.0 ± 5.3 (1.5)	351.7 ± 1.4 (0.4)
Sugar-free cola 2	nd	nd	343.3 ± 9.3 (2.7)	332.7 ± 5.3 (1.6)
Sugar-free cola 3	nd	nd	356.0 ± 6.1 (1.7)	347.4 ± 6.0 (1.7)
Sugar-free cola 4	nd	nd	342.5 ± 7.3 (2.1)	351.3 ± 3.6 (1.0)

<sup>a</sup>Refractometer 30PX/GS. Mettler Toledo, USA.

<sup>b</sup>E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, L. S. Clesceri, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twenty second ed., American Public Health Association, Washington, USA, 2012, p. 4-155-156.

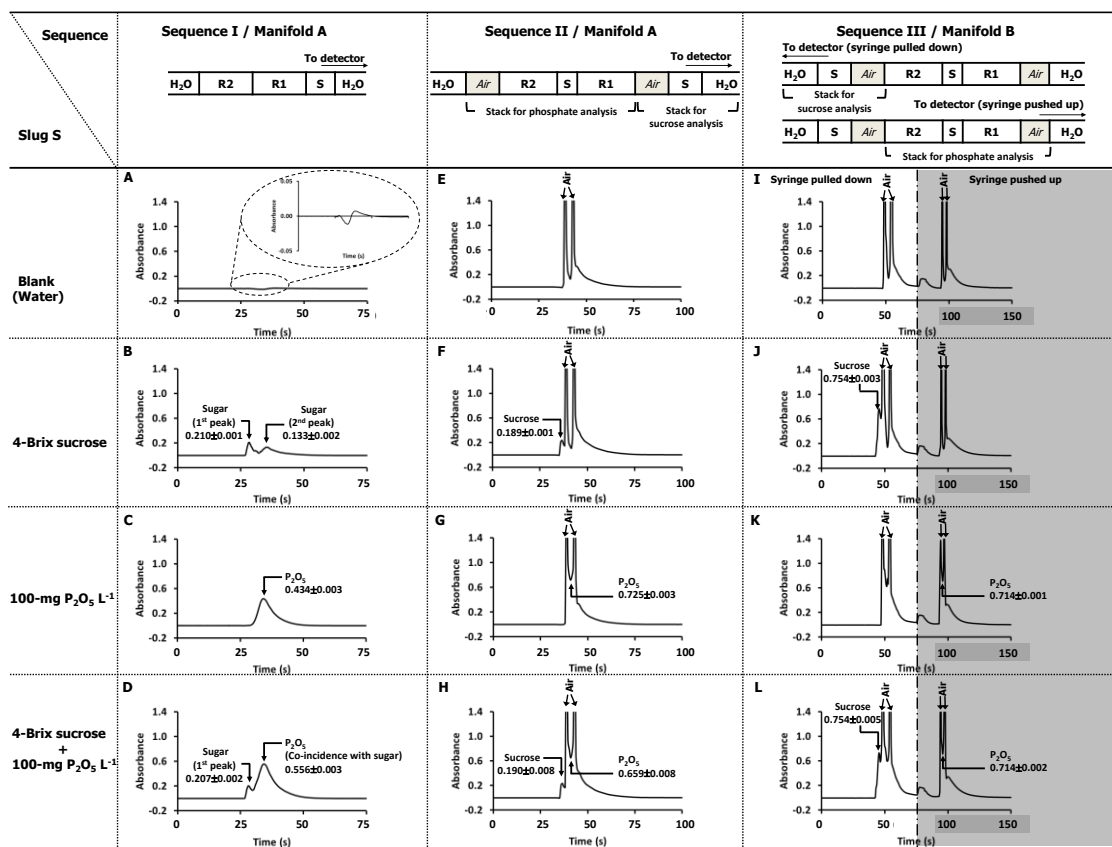
nd: not detected.

ตัวเลขในวงเล็บแสดงค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD, n=6)

**4.6 ระบบซีเควณเซียลอินเจกชัน สำหรับการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในน้ำอ้อยโดยอาศัยหลักการวัดทางกายภาพทั้งแบบการหักเหแสงบริเวณรอยต่อสารละลายที่มีค่าดัชนีหักเหแตกต่างกัน (ชลีเรนท์เอฟเฟกต์) และการวัดความขุ่นของตะกอนโดยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิเตอร์**

#### **4.6.1 การออกแบบระบบการไหลโดยประเมินจากรูปแบบลำดับของท่อโซนและสัญญาณที่วัดได้**

การทดลองนี้ได้ศึกษารูปแบบลำดับของท่อโซนทั้ง 3 แบบ (ดังแสดงในรูปที่ 26) เพื่อใช้วัดปริมาณของฟอสเฟตและซูโครสโดยที่การตรวจวัดสารทั้งสองชนิดนั้นจะไม่รบกวนซึ่งกันและกัน การทดลองนี้ศึกษาระบบซีเควณเซียลอินเจกชัน 2 แบบ ดังแสดงในรูปที่ 13 ระบบ A (ดังแสดงในรูปที่ 13A) ถูกใช้สำหรับการสร้างลำดับของท่อโซนรูปแบบที่ 1 และ 2 (ดังแสดงในรูปที่ 26) โดยใช้ขั้นตอนการสร้างลำดับท่อโซนดังแสดงในตารางที่ 9 และ 10 ระบบ B (ดังแสดงในรูปที่ 13B) ถูกใช้สำหรับการสร้างลำดับท่อโซนรูปแบบที่ 3 โดยใช้ขั้นตอนการสร้างลำดับท่อโซนดังแสดงในตารางที่ 11 การทดลองนี้ได้เลือกการตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุด คือ 880 นาโนเมตร สำหรับระบบซีเควณเซียลทั้ง 2 ระบบ เพื่อติดตามการเกิดสารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลูที่มีสีฟ้า ความยาวคลื่นที่เลือกนี้อยู่ในย่านสีแดงซึ่งเหมาะสมกับการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสโดยใช้ปรากฏการณ์ชลีเรนท์เอฟเฟกต์



รูปที่ 26 แสดงตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากระบบซีเคิลแบบ A และ B (รูปที่ 13) เมื่อใช้ลำดับท่อนโซลรูบบนที่ 1 (A ถึง D), ลำดับท่อนโซลรูบบนที่ 2 (E ถึง H) และ ลำดับท่อนโซลรูบบนที่ 3 (I ถึง L)

**ตารางที่ 9** ขั้นตอนการทำงานของระบบซีเควณเซียลอินเจคชันแบบ A (รูปที่ 13A) สำหรับการ  
สร้างลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 1 (รูปที่ 26)

Step	Action	SP (↑↓) <sup>a</sup> Flow rate <sup>b</sup>	Position of SV	Volume (μL)
1	Aspiration of water	↓ 6.25	C-SV-P6	2,500
2	Aspiration of R2	↓ 1.25	C-SV-P4	104
3	Aspiration of R1	↓ 1.25	C-SV-P3	104
4	Aspiration of sample plug	↓ 1.25	C-SV-P7	50
5	Dispense all liquid plugs to the detector and waste	↑ 5.00	C-SV-P2-D	2,758

Total analysis time is 70 s.

<sup>a</sup> (↓) forward flow direction; (↑) reverse flow direction

<sup>b</sup> Flow rate in mL min<sup>-1</sup>

C: 200-cm coil (1 mm i.d.). D: Detector. Pn: port position. SV: selection valve.

**ตารางที่ 10** ขั้นตอนการทำงานของระบบซีเควณเซียลอินเจคชันแบบ A (รูปที่ 13A) สำหรับการ  
สร้างลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 2 (รูปที่ 26)

Step	Action	SP (↑↓) <sup>a</sup> Flow rate <sup>b</sup>	Position of SV	Volume (μL)
1	Aspiration of water	↓ 6.25	C-SV-P6	2,500
2	Aspiration of air plug	↓ 1.25	C-SV-P1	55
3	Aspiration of R2	↓ 1.25	C-SV-P4	104
4	Aspiration of sample plug	↓ 1.25	C-SV-P7	20
5	Aspiration of R1	↓ 1.25	C-SV-P3	104
6	Aspiration of air plug	↓ 1.25	C-SV-P1	55
7	Aspiration of sample plug	↓ 1.25	C-SV-P7	50
8	Dispense all liquid zones to the detector and waste	↑ 5.00	C-SV-P2-D	2,888

Total analysis time is 100 s.

<sup>a</sup> (↓) forward flow direction; (↑) reverse flow direction

<sup>b</sup> Flow rate in mL min<sup>-1</sup>

C: 200-cm coil (1 mm i.d.). D: Detector. Pn: port position. SV: selection valve.



ตารางที่ 11 ขั้นตอนการทำงานของระบบซีเควินเซียลอินเจคชันแบบ B (รูปที่ 13B) สำหรับการสร้างลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 3 (รูปที่ 26)

Step	Action	SP (↑↓) <sup>a</sup> Flow rate <sup>b</sup>	Position of SV	Volume (μL)
1	Aspiration of water	↓ 6.25	C1-SV-P6	2,080
2	Aspiration of sample plug	↓ 1.25	C1-SV-P7	50
3	Aspiration of air plug	↓ 1.25	C1-SV-P1	55
4	Aspiration of R2.	↓ 1.25	C1-SV-P4	104
5	Aspiration of sample plug	↓ 1.25	C1-SV-P7	20
6	Aspiration of R1	↓ 1.25	C1-SV-P3	104
7	Aspiration of air plug	↓ 1.25	C1-SV-P1	55
8	Aspiration of water	↓ 3.00	C2-D-C1-SV-P6	1,700
9	Dispense all liquid plugs to the detector and waste	↑ 5.00	C2-D-C1-SV-P2	4,168

Total analysis time is 120 s.

<sup>a</sup> (↓) forward flow direction; (↑) reverse flow direction

<sup>b</sup> Flow rate in mL min<sup>-1</sup>

C1: 30-cm coil (1 mm i.d.). C2: 100-cm coil (1.59 mm i.d.). D: Detector. Pn: port position.

SV: selection valve.

#### 4.6.1.1 ลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 1

ลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 1 ระบบซีเควนเซียลแบบ A จะคัดท่อนรีเอเจนต์ (R1 และ R2) สำหรับการวิเคราะห์ฟอสเฟตผ่านทางซีเล็คชันวาร์ลเข้าไปเก็บไว้ในคอยล์เป็นลำดับแรก ติดตามด้วยการคัดท่อน S ซึ่งอาจเป็นน้ำ, สารละลายซูโครสความเข้มข้น 4 Brix, สารละลาย  $P_2O_5$  เข้มข้น  $100 \text{ mg L}^{-1}$  หรือ สารละลายผสมระหว่างสารละลายซูโครสเข้มข้น 4 Brix และ สารละลาย  $P_2O_5$  เข้มข้น  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ลำดับของท่อนโซ่รูปแบบที่ 1 เป็นดังนี้ คือ  $H_2O/R2/R1/S/H_2O$  ท่อนโซ่ทั้งหมดนี้จะถูกผลักในทิศทางตรงข้ามเพื่อให้ออกจากคอยล์และไหลเข้าสู่เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อตรวจวัด สัญญาณค่าการดูดกลืนแสงเมื่อใช้น้ำเป็นท่อน S แสดงดังรูปที่ 26A จากรูปจะเห็นได้ว่ามีสัญญาณการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสัญญาณเบสไลน์ รูปที่ 26B แสดงสัญญาณซลิเรนท์จำนวน 2 สัญญาณ เมื่อใช้สารละลายซูโครสเข้มข้น 4 Brix เป็นท่อน S สัญญาณซลิเรนท์ทั้งสองเกิดจากการเคลื่อนที่ผ่านของหัวและท้ายโซ่ของสารละลายซูโครสเมื่อเคลื่อนที่ผ่านตัวตรวจวัด รูปภาพที่ 26C แสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลูเมื่อสารละลาย  $P_2O_5$  เข้มข้น  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ถูกใช้เป็นท่อน S รูปภาพที่ 2D แสดงสัญญาณที่วัดได้เมื่อสารละลายผสมระหว่างซูโครสและฟอสเฟตถูกใช้เป็นท่อน S สัญญาณแรกในรูปที่ 2D คือสัญญาณซลิเรนท์ของซูโครส ( $0.207 \pm 0.002 \text{ abs unit}$ ) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสัญญาณซลิเรนท์อันแรกในรูปที่ 2B ( $0.210 \pm 0.001 \text{ abs unit}$ ) อย่างไรก็ตามสัญญาณที่สองในรูปที่ 2D เกิดจากการรวมกันของสัญญาณซลิเรนท์จากซูโครสและสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงจากสารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลู ซึ่งแสดงได้จากความต่างของสัญญาณในรูปที่ 2D และ 2C ( $\Delta h = 0.122 \text{ abs unit}$ ) มีค่าใกล้เคียงกับสัญญาณซลิเรนท์ที่สองในรูป 2B ( $0.133 \text{ abs unit}$ ) ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว สัญญาณค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลูที่วัดได้ ได้รวมสัญญาณที่ซลิเรนท์ที่เกิดจากซูโครสไว้ด้วย ดังนั้นลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 1 นี้ จึงไม่เหมาะสมสำหรับการวัดซูโครสและฟอสเฟตแบบพร้อมกัน เนื่องจากการวัดสารทั้ง 2 ชนิดรบกวนซึ่งกันและกัน

#### 4.6.1.2 ลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 2

ระบบซีเควนเซียล A ยังคงถูกใช้ในการทดลองลำดับถัดมาสำหรับการทดสอบเพื่อจัดลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 26 ลำดับท่อนโซ่รูปแบบนี้ใช้ท่อน S จำนวน 2 ท่อน ท่อนโซ่ S ท่อนแรกถูกจัดให้อยู่ระหว่างรีเอเจนต์ R1 และ R2 ท่อนอากาศถูกใช้คั่นระหว่างรีเอเจนต์ R1 และท่อน S ท่อนที่สอง ลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 2 คือ  $air/R2/S/R1/air/S/H_2O$  รูปที่ 2E แสดงสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงเมื่อใช้น้ำเป็นท่อน S จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เกิดสัญญาณขนาดใหญ่ 2 สัญญาณที่เกิดจากท่อนอากาศ นอกจากนั้นยังมีค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 โดยประมาณ สำหรับลำดับท่อนโซ่ของ  $air/R2/S/R1/air$  ค่าการดูดกลืนแสงเกิดขึ้นทั้ง ๆ ที่ใช้น้ำเป็นท่อน S เนื่องจากความไม่เป็นเนื้อ

เดียวกันของท่อนโชนของสารละลายทำให้แสงจากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เกิดการหักเหและเกิดค่าการดูดกลืนแสงขึ้น เหตุการณ์นี้เกิดขึ้นเหมือนกันเมื่อใช้สารละลายซูโครสเข้มข้น 4 Brix เป็นท่อน S ดังแสดงในรูป 26F รูปที่ 26H แสดงสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงเมื่อใช้สารละลายผสมระหว่างระหว่างซูโครสเข้มข้น 4 Brix และฟอสเฟตเข้มข้นเข้มข้น 100 mg  $P_2O_5$  L<sup>-1</sup> เป็นท่อน S จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลูไม่รบกวนค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากปรากฏการณ์ซีเรนท์ที่เกิดขึ้นบริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและสารละลายซูโครสของท่อน air/S/H<sub>2</sub>O ดังแสดงได้จากค่าสัญญาณซีเรนท์ที่วัดได้ในรูป 26H ( $0.190 \pm 0.008$  abs unit) มีค่าใกล้เคียงกับในรูปที่ 26F ( $0.189 \pm 0.001$  abs unit)

การจัดลำดับท่อนโชนในรูปแบบที่ 2 นี้ คือ air/R2/S/R1/air/S/H<sub>2</sub>O จะทำให้ค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลูที่เกิดขึ้นระหว่างสัญญาณขนาดใหญ่สองท่อนของท่อนโชนอากาศมีลักษณะแบน ดังแสดงด้วยลูกศรในรูปที่ 26G ยิ่งไปกว่านั้นผู้ทำการทดลองได้พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลูที่เกิดจากสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 26G:  $0.725 \pm 0.003$  abs unit) มีค่าสูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลูที่เกิดจากสารละลายผสมระหว่างฟอสเฟตและซูโครส (รูปที่ 26H:  $0.659 \pm 0.008$  abs unit) สาเหตุเป็นเพราะการผสมกันอย่างไม่มีประสิทธิภาพภายในท่อนโชนของ R2/S/R1 เนื่องจากความหนืดของสารละลายซูโครส อย่างไรก็ตามปัญหานี้อาจแก้ไขได้โดยการเพิ่มความยาวของมิกซิงคอยล์เพื่อเพิ่มการผสมกันภายในท่อนโชนให้ดียิ่งขึ้น แต่การแก้ปัญหาด้วยวิธีนี้อาจทำให้รอยต่อระหว่างสารละลายซูโครสและน้ำไม่ชัดเจนส่งผลต่อการวัดปริมาณซูโครสด้วยวิธีซีเรนท์ ดังนั้นลำดับโชนในรูปแบบที่ 2 จึงยังไม่เหมาะสมสำหรับการวัดซูโครสและฟอสเฟตพร้อมกัน

#### 4.6.1.3 ลำดับท่อนโชนรูปแบบที่ 3

สืบเนื่องจากข้อเสียของลำดับท่อนโชนรูปแบบที่ 2 ดังได้กล่าวข้างต้น ผู้ทำการทดลองได้ปรับเปลี่ยนระบบซีเควนเซียลที่แสดงในรูป 13A ที่ใช้สำหรับการสร้างรูปแบบลำดับโชนที่ 1 และ 2 เป็นระบบซีเควนเซียลที่แสดงในรูป 13B สำหรับใช้สร้างลำดับท่อนโชนรูปแบบที่ 3 ความแตกต่างของทั้งสองระบบ คือ ตำแหน่งของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยระบบใหม่ตำแหน่งของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์จะวางอยู่ระหว่างปั๊มและซีเล็กชันวาล์ว และมีมิกซิงคอยล์ C1 และ C2 ขนาบทั้งด้านหน้าและหลังเครื่อง ขั้นตอนการดำเนินงานในตารางที่ 11 ใช้สำหรับควบคุมระบบซีเควนเซียลแบบใหม่เพื่อสร้างลำดับของท่อนโชนในรูปแบบที่ 3 คือ H<sub>2</sub>O/S/air/R2/S/R1/air/H<sub>2</sub>O ดังแสดงในรูปที่ 26 ปั๊มจะดูดท่อนโชนของสารทั้งหมดผ่านซีเล็กชันวาล์ว ผ่านมิกซิงคอยล์ C1 เข้าสู่ตัวตรวจวัดและไหลผ่านสู่มิกซิงคอยล์ C2 การดูดสารผ่านตัวตรวจวัดในครั้งที่ 1 นี้สำหรับการวัดสัญญาณของซูโครสด้วยปรากฏการณ์ซีเรนท์ สัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่บันทึกได้จากการไหลของท่อนโชนผ่านเครื่องตรวจวัดครั้งที่ 1 นี้ แสดงในรูป

2I ถึง 2L ด้านซ้ายมือที่ไม่แรงจา จากนั้นปั๊มจะผลักท่อนโซนของสารทั้งหมดจากมิกซ์คอยล์ C2 สู่อัตตราจวัดอีกครั้ง ผ่านมิกซ์คอยล์ C1 ผ่านซีเล็กชันวาล์วและไหลทิ้ง การผลักท่อนสารผ่าน อัตตราจวัดในครั้งนี้ 2 นี้สำหรับการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากสารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลู สัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่บันทึกได้จากการไหลของท่อนโซนผ่านเครื่องตรวจวัดครั้งที่ 2 นี้ แสดงในรูป 2I ถึง 2L ด้านขวามือที่แรงจา การออกแบบระบบในลักษณะนี้ส่งผลให้การผสมกัน ระหว่างรีเอเจนต์และฟอสเฟตในท่อนโซน air/R2/S/R1air เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจาก ท่อนโซนของสารไหลผ่านมิกซ์คอยล์ถึง 2 ครั้ง คือ C1 และ C2

รูปที่ 26I และ 26K แสดงสัญญาณเมื่อใช้น้ำและสารละลายฟอสเฟต เป็นท่อน S จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าไม่มีสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจาก ปฏิกิริยาการเกิดซัลเฟตจากซัลไฟด์ รูปที่ 26K มีสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากสารเชิงซ้อน โมลิบดีนัมบลูที่เกิดขึ้นระหว่างสัญญาณขนาดใหญ่จำนวน 2 สัญญาณที่เกิดจากท่อนอากาศซึ่ง เกิดขึ้นทั้งขั้นตอนการดูดและผลัก ในรูปที่ 26I มีสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 abs unit ที่เกิดขึ้นระหว่าง สัญญาณ 2 สัญญาณจากท่อนอากาศเช่นกัน สัญญาณนี้เกิดขึ้นจากการ ผสมที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันของท่อนโซนเช่นเดียวกับสัญญาณที่เกิดขึ้นในรูปที่ 26E สัญญาณค่า การดูดกลืนแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาการเกิดซัลเฟตเมื่อใช้สารละลายซัลไฟด์และสารละลายซัลไฟด์ ผสมฟอสเฟตเป็นท่อน S แสดงด้วยลูกศรในรูปที่ 26J และ 26L ตามลำดับ สัญญาณซัลไฟด์ที่ได้ จากทั้งรูป 26J และ 26L ที่ค่าที่เท่ากัน แสดงให้เห็นว่าฟอสเฟตไม่รบกวนการวัดปริมาณซัลไฟด์ ด้วยปฏิกิริยาการเกิดซัลเฟต สัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการดูดท่อนโซนสารผ่านตัว ตรวจวัดในครั้งนี้ 1 นี้ ใช้สำหรับวัดปริมาณซัลไฟด์

รูปที่ 26K และ 26L ด้านขวามือที่แรงจาแสดงสัญญาณค่าการดูดกลืน แสงที่เกิดจากท่อนโซนของสารถูกผลักผ่านตัวตรวจวัดเป็นครั้งที่ 2 จากรูปจะเห็นได้ว่าค่าการ ดูดกลืนแสงที่เกิดจากสารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลูมีค่าเท่ากันทั้ง 2 รูป ซึ่งแตกต่างจากสัญญาณที่ ได้จากการดูดท่อนสารผ่านตัวตรวจวัดครั้งแรก (รูปเดียวกันด้านซ้ายมือไม่แรงจา) แสดงให้ เห็นว่าการดูดผลักท่อนสารผ่านมิกซ์คอยล์ถึง 2 ครั้งทำให้การผสมกันของสารมีประสิทธิภาพดี ขึ้น การผลักท่อนสารผ่านตัวตรวจวัดในครั้งนี้ 2 นี้ จึงใช้สำหรับการวัดสัญญาณของการวิเคราะห์ ฟอสเฟต

จากข้อดีของลำดับท่อนโซนในรูปแบบที่ 3 ดังที่ได้กล่าวมา ผู้ทำการทดลองได้เลือก ระบบซีเควนเซียในรูปแบบที่ 13B และลำดับท่อนโซนในรูปแบบที่ 3 สำหรับการทดลองอื่นๆ ต่อไป

#### 4.6.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ

##### 4.6.2.1 ปริมาตรตัวอย่างและอากาศ

ผลของปริมาตรของท่อน S ในลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 3 ได้ถูกศึกษาเพื่อให้ได้ค่าความไว (sensitivity) และ ช่วงของความเป็นเส้นตรง (linear range) ที่เหมาะสม ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรของสารตัวอย่างค่าความไวของการวิเคราะห์ (ความชันของสมการเส้นตรง) มีค่าเพิ่มมากขึ้นแต่ปริมาตรที่เพิ่มขึ้นนี้จะส่งผลให้ช่วงความเป็นเส้นตรงลดลง ผลการทดลองนี้เป็นเหมือนกันทั้งการวัดซูโครสและฟอสเฟต เพื่อให้ได้ความไวของการวิเคราะห์และช่วงความเป็นเส้นตรงที่เหมาะสม ผู้ทำการทดลองได้เลือกปริมาตรตัวอย่างที่ 50  $\mu\text{L}$  และ 20  $\mu\text{L}$  สำหรับการวัดซูโครสและฟอสเฟตตามลำดับ

ผลของปริมาตรของท่อนอากาศได้ถูกศึกษาในการทดลองนี้ด้วย ปริมาตรของท่อนอากาศที่ใช้ศึกษา คือ 8, 24, 40, 55 และ 104  $\mu\text{L}$  เมื่อใช้ปริมาตรท่อนอากาศน้อย คือ 8 และ 24  $\mu\text{L}$  พบว่า ท่อนอากาศจะแตกเป็นท่อนเล็กๆ ส่งผลให้ค่า %RSD สูง คือ มีค่ามากกว่า 10 ค่า %RSD จะลดลงเมื่อใช้ปริมาตรของท่อนอากาศมากขึ้น ในการทดลองนี้ ผู้ทำการทดลองเลือกปริมาตรของท่อนอากาศที่ 55  $\mu\text{L}$  เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับระบบซีเคิวน์ที่พัฒนาขึ้น

ตารางที่ 12 ผลของปริมาตรตัวอย่างต่อความไวของการวิเคราะห์และช่วงความเป็นเส้นตรง สำหรับการวัดซูโครสและฟอสเฟต ขั้นตอนการทำงานของระบบซีเควนเชียลอินเจกชันแบบ B (รูปที่ 13B) สำหรับการสร้างลำดับท่อนโซ่รูปแบบที่ 3 (รูปที่ 26)

Sample volume (μL)	Linear equation	Observed linearity range
S for sucrose determination <sup>a</sup>		
25	$y = (11.49 \pm 0.16) \times 10^{-2} x - (5.1 \pm 0.5) \times 10^{-2}, r^2 = 0.999$	0.5 - 5.0
50	$y = (19.34 \pm 0.18) \times 10^{-2} x - (4.8 \pm 0.5) \times 10^{-2}, r^2 = 0.999$	0.5 - 5.0
75	$y = (28.74 \pm 0.12) \times 10^{-2} x - (6.1 \pm 3.0) \times 10^{-2}, r^2 = 0.995$	0.5 - 4.0
100	$y = (28.46 \pm 0.14) \times 10^{-2} x - (1.8 \pm 3.3) \times 10^{-2}, r^2 = 0.993$	0.5 - 4.0
S for phosphate determination <sup>b</sup>		
10	$y = (3.04 \pm 0.06) \times 10^{-3} x - (3.4 \pm 0.7) \times 10^{-2}, r^2 = 0.999$	20 - 200
20	$y = (5.51 \pm 0.06) \times 10^{-3} x - (2.1 \pm 0.6) \times 10^{-2}, r^2 = 0.999$	20 - 200
50	$y = (12.3 \pm 0.2) \times 10^{-3} x - (2.4 \pm 1.9) \times 10^{-2}, r^2 = 0.999$	20 - 200
100	$y = (18.0 \pm 0.6) \times 10^{-3} x - (4.1 \pm 5.7) \times 10^{-2}, r^2 = 0.996$	20 - 150

<sup>a</sup> S: volume of plug S in stack H<sub>2</sub>O/S/Air of sequence III

<sup>b</sup> S: volume of plug S in stack R2/S/R1/Air of sequence III

#### 4.6.2.2 อัตราการไหล

ผู้ทำการทดลองได้ศึกษาผลของอัตราการไหลในขั้นตอนที่ 8 และ 9 (ตารางที่ 11) ในขณะที่กำหนดให้อัตราการไหลในขั้นตอนที่ 1 และ 2-7 มีค่าคงที่ คือ 6 และ 1.25 mL min<sup>-1</sup> ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่า %RSD (สารละลายซูโครสเข้มข้น 3 Brix, จำนวนตัวอย่าง = 10 ตัวอย่าง) เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย คือ จาก 2% เป็น 3% เมื่ออัตราการไหลในขั้นตอนที่ 8 เปลี่ยนจาก 1 เป็น 3 mL min<sup>-1</sup> เมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้นเป็น 5 และ 10 mL min<sup>-1</sup> พบว่า ค่า %RSD เพิ่มขึ้นโดยประมาณเป็น 6% เนื่องจากท่อนอากาศแตกเป็นท่อนเล็กๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออัตราการไหลมากกว่า 5 mL min<sup>-1</sup> จากผลการทดลองข้างต้น ผู้ทำการทดลองเลือกอัตราการไหลที่ 3 mL min<sup>-1</sup> สำหรับขั้นตอนที่ 8 และ 9

ลำดับถัดมา ผู้ทำการทดลองศึกษาอัตราการไหลของขั้นตอนที่ 9 ที่ 2.5 และ 5 mL min<sup>-1</sup> ผู้ทำการทดลองไม่พบการแตกของท่อนอากาศของทั้งสองอัตราการไหลที่ศึกษา ความไวของการวิเคราะห์เมื่อใช้อัตราการไหลที่ 5 mL min<sup>-1</sup> ( $Abs = (5.99 \pm 0.15) \times 10^{-3} \text{ mg P}_2\text{O}_5 \text{ L}^{-1} - (4.0 \pm 1.7) \times 10^{-2}$ ) มีค่าน้อยกว่าเล็กน้อยเมื่อใช้อัตราการไหลที่ 3 mL min<sup>-1</sup> ( $Abs$

$= (6.84 \pm 0.04) \times 10^{-3} \text{ mg P}_2\text{O}_5 \text{ L}^{-1} - (2.6 \pm 5.0) \times 10^{-3}$ ) อย่างไรก็ตาม ผู้ทำการทดลองเลือกอัตราการไหลที่  $5 \text{ mL min}^{-1}$  เนื่องจากเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์เร็วกว่า

#### 4.6.2.3 ความเข้มข้นรีเอเจนต์สำหรับการวัดฟอสเฟต

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่า อัตราส่วนระหว่าง  $[\text{H}^+]$  ต่อ  $[\text{MoO}_4^{2-}]$  ควรมีค่าตั้งแต่ 45 ถึง 80 (pH 0.36 - 1.06) เพื่อให้สารเชิงซ้อนโมลิบดินัมบลูเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และป้องกันการเกิด self-reduction ของสารเชิงซ้อนเองด้วย ผู้ทำการทดลองได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (R1) โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโมลิบเดตคงที่ คือ  $9.7 \text{ mmol L}^{-1}$  ผลการทดลองในรูปที่ 3A พบว่า ความไวในการวิเคราะห์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มมากขึ้น ผู้ทำการทดลองเลือกความเข้มข้นของกรดที่  $0.6 \text{ mol L}^{-1}$  โดยมีค่าอัตราส่วนดังกล่าวข้างต้น คือ 62

ผู้ทำการทดลองได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกที่ใช้เป็นสารรีดิวซ์ ใน R2 ตั้งแต่ 0.02 ถึง  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  ผลการทดลองในรูปที่ 3B แสดงให้เห็นว่าความไวของการวิเคราะห์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ 0.02 ถึง  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของกรดสูงกว่า  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  ความไวของการวิเคราะห์ค่อนข้างคงที่ ผู้ทำการทดลองเลือกค่าที่เหมาะสมของความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกที่  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$

#### 4.6.2.4 ผลการรบกวนของน้ำตาลชนิดอื่นๆ และซิลิเกต

นอกจากน้ำอ้อยมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซูโครสแล้ว ยังมีน้ำตาลชนิดอื่นๆ เป็นองค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกันอีก คือ น้ำตาลกลูโคส (ความเข้มข้น 0.28 – 0.98%(w/v)) และน้ำตาลฟรุคโตส (ความเข้มข้น 0.31 – 0.70%(w/v)) ตัวอย่างน้ำอ้อยที่ใช้ในการทดลองนี้จะถูกเจือจาง 4 เท่าด้วยน้ำก่อนการวิเคราะห์ ดังนั้นปริมาณมोनอแซคคาไรด์ในตัวอย่างที่ถูกเจือจางแล้วมีค่าโดยประมาณ 0.25%(w/v) ผู้ทำการทดลองพบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้สามารถทนต่อการรบกวนของน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสได้ถึงความเข้มข้น 0.3%(w/v) ในตัวอย่างที่เจือจาง และสามารถทนต่อการรบกวนของน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสได้ถึงความเข้มข้น 1.2%(w/v) ในตัวอย่างก่อนเจือจาง ผู้ทำการทดลองสามารถสรุปได้ว่ามोनอแซคคาไรด์ในระดับความเข้มข้นดังกล่าวไม่รบกวนการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำอ้อยด้วยวิธีซิลิเรนท์

ซิลิเกตเป็นสารรบกวนที่สำคัญสำหรับการวัดฟอสเฟตด้วยวิธีโมลิบดินัมบลู ปริมาณซิลิเกตที่พบในน้ำอ้อยโดยทั่วไปมีค่าโดยประมาณคือ  $600\text{-}800 \text{ mg SiO}_2 \text{ L}^{-1}$  ผู้ทำการทดลองได้ศึกษาความสามารถในการทนการรบกวนของซิลิเกตต่อการวัดฟอสเฟตโดยเติมและไม่เติมกรดทาทาริกซึ่งใช้เป็นสาร masking agent ที่ความเข้มข้น  $0.016 \text{ mol L}^{-1}$  ผลการทดลองพบว่า

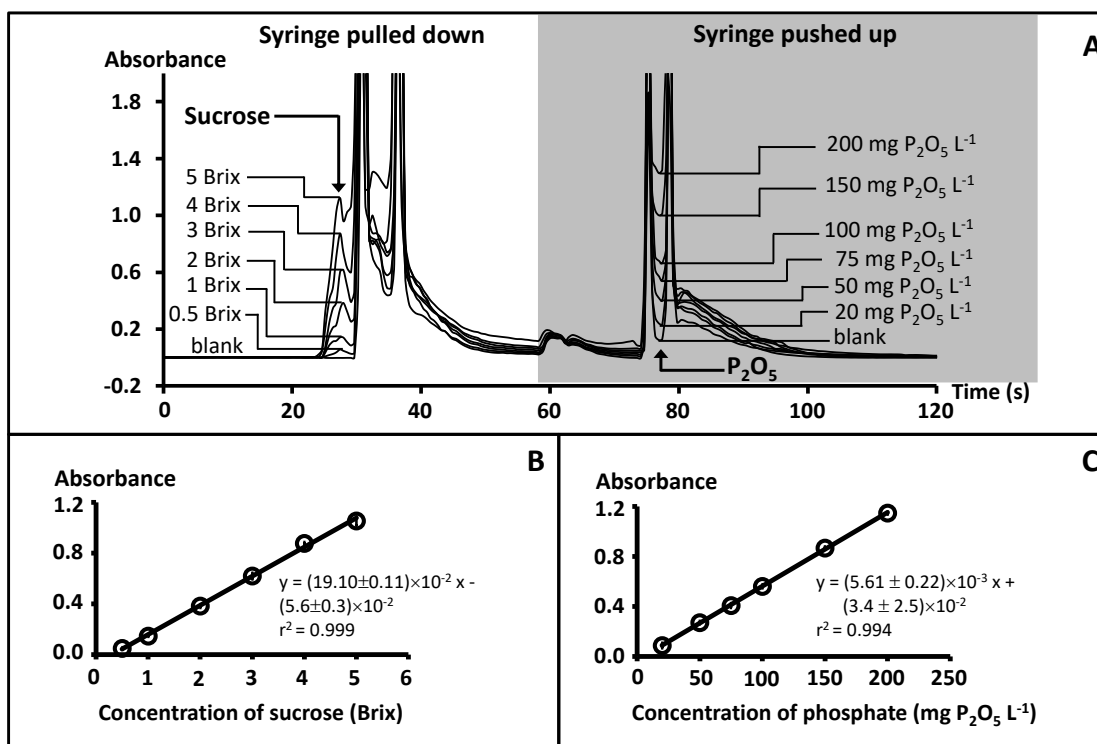
ความเข้มข้นซิลิกาสูงสุดที่ไม่รบกวนวิธีวิเคราะห์ฟอสเฟตเมื่อไม่เติมกรดทาร์ทาริกคือ 2,000 mg SiO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> ขณะที่ความเข้มข้นซิลิกาสูงสุดที่ไม่รบกวนวิธีวิเคราะห์ฟอสเฟตเมื่อเติมกรดทาร์ทาริกคือ 4,000 mg SiO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถทนการรบกวนจากซิลิกาได้ในความเข้มข้นของซิลิกาที่พบในน้ำอ้อยโดยทั่วไปโดยไม่จำเป็นต้องเติมสาร masking agent

#### 4.6.2.5 คุณลักษณะของระบบและการประยุกต์ใช้

ระบบการไหลแบบซีเควนเขียนดังแสดงในรูปที่ 13B ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้สามารถวัดปริมาณซูโครสและฟอสเฟตได้ในคราวเดียวกัน ตัวอย่างสัญญาณซูโครสและฟอสเฟตที่วัดได้แสดงในรูปที่ 27A การดำเนินงานภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของระบบการไหล สมการเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสและฟอสเฟตแสดงดังรูปที่ 27B และ 27C ตามลำดับ ช่วงความเป็นเส้นตรงของสมการทั้ง 2 เส้น เหมาะสมกับความเข้มข้นของซูโครสและฟอสเฟตที่พบในน้ำอ้อย ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ของซูโครสคือ 0.2 Brix (3S/N) และของฟอสเฟตคือ 5.4 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> L<sup>-1</sup> (3SD of blank/slope) ค่าความเที่ยงของระบบ(%RSD) มีค่า 3.2% เมื่อใช้สารละลายซูโครสเข้มข้น 3 Brix และมีค่า 2.7% เมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 100 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> L<sup>-1</sup>

ผู้ทำการทดลองได้วัดปริมาณซูโครสและฟอสเฟตในน้ำอ้อยจำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยวิธีใหม่ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีมาตรฐาน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 13 จากการเทียบข้อมูลของทั้งวิธีใหม่และวิธีมาตรฐานด้วยวิธีสถิติ paired t-test พบว่า ผลการวิเคราะห์ของทั้ง 2 วิธีให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ซูโครส  $t_{\text{observe}} = 0.38$ ,  $t_{\text{critical}} = 2.31$ ,  $P = 0.05$ ; ฟอสเฟต  $t_{\text{observe}} = 0.80$ ,  $t_{\text{critical}} = 2.31$ ,  $P = 0.05$ )





รูปที่ 27 แสดงตัวอย่างสัญญาณที่วัดได้และกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐานซูโครสและฟอสเฟต

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในน้ำอ้อยด้วยระบบซีเควนเซียลที่พัฒนาขึ้นและวิธีอ้างอิง

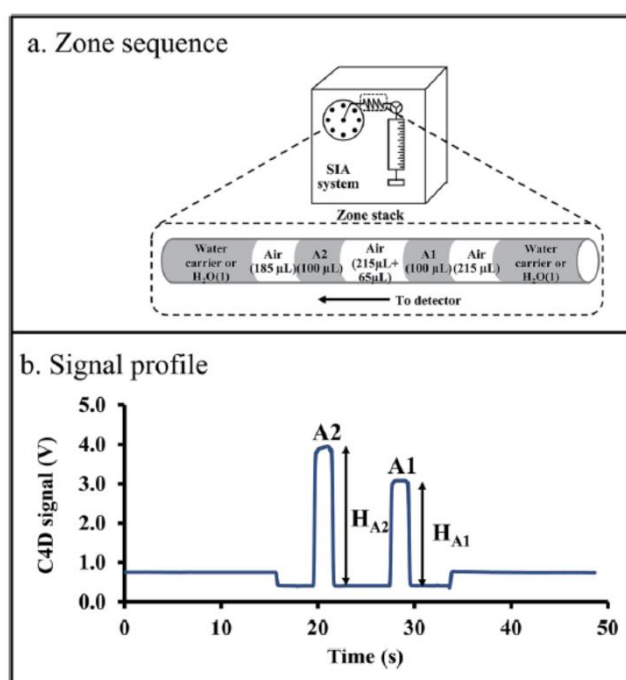
Sample	Sucrose (Brix)		Phosphate (mg $P_2O_5$ L <sup>-1</sup> )	
	Our method	Refractometry <sup>a</sup>	Our method	Spectrophotometry <sup>b</sup>
S1	14.4 ± 0.8	14.0 ± 0.3	311.7 ± 14.3	308.5 ± 11.4
S2	14.9 ± 0.8	15.2 ± 0.7	321.2 ± 14.9	317.7 ± 6.4
S3	14.0 ± 0.6	13.8 ± 0.3	309.3 ± 14.9	308.2 ± 10.3
S4	13.3 ± 0.1	13.8 ± 0.6	359.7 ± 18.9	358.8 ± 14.6
S5	13.7 ± 0.2	14.6 ± 0.7	366.9 ± 12.4	362.1 ± 11.9
S6	14.3 ± 0.1	13.9 ± 0.6	352.6 ± 14.3	347.8 ± 12.4
S7	14.3 ± 0.1	14.0 ± 0.3	357.3 ± 18.0	356.6 ± 18.3
S8	14.1 ± 0.2	13.7 ± 0.6	340.7 ± 10.9	341.6 ± 16.1
S9	15.4 ± 0.2	14.8 ± 0.1	359.7 ± 14.3	368.1 ± 8.4

<sup>a</sup> Refractometer 30PX/GS, Mettler Toledo, USA.

<sup>b</sup> Molybdenum-blue batchwise method [23]

#### 4.7 ผลศึกษาการใช้ระบบซีเควณเซียลอินเจกชันและ C4D เพื่อร่วมกับหลักการไอระเหยแบบไม่ใช้เยื่อเลือกผ่านเพื่อวัดปริมาณสารกันเชื้อราที่ควบคุมในไวน์

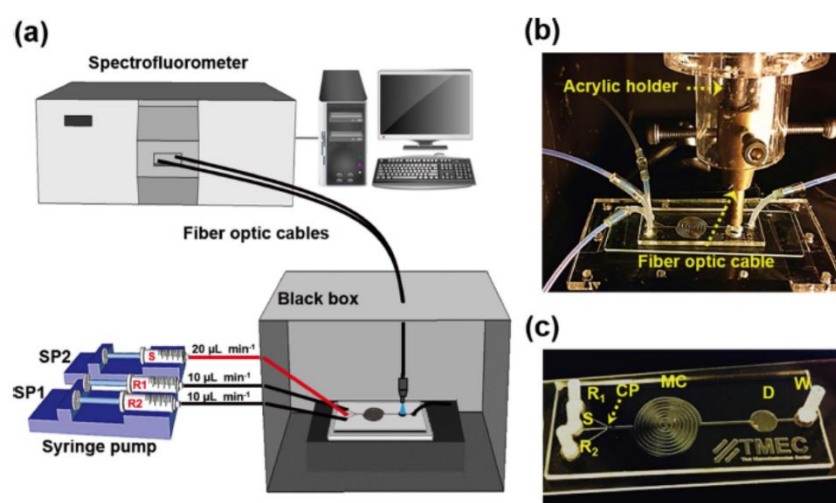
เมื่อได้นำระบบซีเควณเซียลอินเจกชันซึ่งติดตั้งอุปกรณ์ไอระเหยร่วมกับ C4D เป็นตัวตรวจวัดเพื่อมาพัฒนาวิธีการวัดสารควบคุมต้านเชื้อราที่ปนเปื้อนในการผลิตไวน์ด้วย คือ sulphite หลักการคือ นำซีเควณเซียลอินเจกชันมาขับเคลื่อนของเหลว ให้กรดเข้าทำปฏิกิริยากับ sulphite ที่อยู่ในไวน์ เกิดเป็น  $\text{SO}_2$  ซึ่งระเหยได้จากภาชนะทรงกรวยอันหนึ่งและละลายลงในน้ำซึ่งบรรจุอยู่ในอีกภาชนะทรงกรวยอีกสองภาชนะ จากนั้นใช้ระบบซีเควณเซียลอินเจกชันเพื่อดึงน้ำตัวรับแก๊สนี้ออกไปตรวจวัดที่ C4D นับเป็นวิธีการตรวจวัดแบบใหม่ที่แทบไม่ใช้สารเคมี ใช้ก็เพียงกรดซัลฟูริกในระดับไมโครลิตรเท่านั้น แล้วการตรวจวัดไม่ต้องใช้สารเคมีเป็นตัวรับไอระเหยเลย ใช้เพียงน้ำ ในงานนี้ได้แนะนำเสนอหลักการใช้การเพิ่มพื้นที่ผิวน้ำตัวรับโดยเพิ่มหลุมทรงกรวยเพิ่มอีก 1 หลุม เมื่อตรวจวัดที่ C4D จะได้สัญญาณจำนวน 2 ชุดด้วยกันจากตัวอย่างเดียว (รูปที่ 28) คณะผู้วิจัยเสนอการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้แกน y เป็นผลรวมของสัญญาณทั้งสองดังกล่าวพบว่า ความไว (sensitivity) เพิ่มขึ้นถึงกว่า 3 เท่าและได้นำหลักการนี้ประยุกต์กับไวน์ขาวพบว่าได้ผลที่สอดคล้องวิธีการวัดอ้างอิงแบบที่ใช้เยื่อเมมเบรน (สามารถอ่านเพิ่มเติมได้ในบทความ DOI: 10.1039/c7ay01879g)



รูปที่ 28 (a) ลำดับของท่อนของสารขณะพักในท่อขด holding coil ของซีเควณเซียลอินเจกชัน และ (b) ลักษณะของสัญญาณที่ได้จากการนำท่อนน้ำตัวรับผ่านเข้า C4D

#### 4.8 ศึกษาการใช้แผ่นไมโครชิปเพื่อการควบคุมทิศทางการไหลของอนุภาค

ในงานนี้ได้ออกแบบการทดลองเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาแผ่น microchip สำหรับทำการไหลสารของเหลวนำส่งอนุภาคในร่อง ด้วยตัวรูปที่ 15 และได้ทำการทดลองใช้เพื่อควบคุมทิศทางการไหลของอนุภาคพบว่าการควบคุมด้วยการใช้กระแสของของเหลวบีบอัดมาสองทางแล้วไหลออกเส้นทางเดียวกันนั้น ยังมีประสิทธิภาพทำให้อนุภาคเคลื่อนตัวเรียงเดี่ยวได้ไม่ดีเท่าการเจือจางอนุภาคแขวนลอยในของเหลว จึงเลือกใช้วิธีการเจือจางอนุภาคเพื่อการนับจะเหมาะสมกว่า อย่างไรก็ตามและนอกจากนี้ยังได้นำแผ่น microchip ดังกล่าวมาใช้ในการพัฒนาเทคนิคการวัดระดับไอโอดีนด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์ด้วย โดยได้ทำการติดตั้งตัวตรวจวัดไว้ดังรูปที่ 29 ซึ่งเป็นการใช้หัววัดใยแก้วนำแสง นำแสงกระตุ้นส่องลงไปด้านหน้าบริเวณที่จะตรวจวัดบน microchip แล้วใยแก้วนำแสงอีกเส้นหนึ่งจากหัววัดเดียวกัน ทำหน้าที่รับแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งไปวัด ซึ่งปฏิกิริยานี้ใช้ปฏิกิริยา Sandell and Kolthoff แล้ววัดฟลูออเรสเซนซ์ของ Ce (III) ซึ่งจะแปรผันตามปริมาณของ iodide ในตัวอย่าง ซึ่ง iodide ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยา Sandell and Kolthoff การวัดระดับของสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งจะทำให้ได้ความไว หรือ sensitivity ที่สูง และในการวัดครั้งนี้ได้เพิ่ม sensitivity ด้วยการเลือกวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ซึ่งจะมีความไวที่สูงยิ่งขึ้นไปอีก และดีกว่าการวัดแบบที่ใช้การดูดกลืนแสงของสารตั้งต้น (อ่านเพิ่มเติมได้ใน <https://doi.org/10.2116/analsci.34.161>).



รูปที่ 29 (a) การติดตั้งอุปกรณ์แผ่น microchip กับ syringe pump ที่จุสารเคมีและการใช้หัววัดฟลูออเรสเซนซ์แบบใยแก้วนำแสงทั่วไปแต่นำมาใช้กับ microchip (b) การติดตั้งอุปกรณ์ (c) แสดงแผ่น microchip ที่สร้างขึ้นพร้อมระบุตำแหน่ง MC และ D คือ mixing coil และ detection area

## บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบและสร้างเครื่องตรวจวัดสภาพการนำไฟฟ้าแบบขั้วไฟฟ้าไม่สัมผัสกับสารละลาย หรือ ซีโพรดี (Capacitively coupled contactless conductivity detector หรือ C<sup>4</sup>D) สำหรับการนับจำนวนและจำแนกชนิดเซลล์เม็ดเลือดสำหรับเป็นข้อมูลในการวินิจฉัยโรค ขั้นแรกผู้วิจัยได้ทดลองความเป็นไปได้ในการใช้ C<sup>4</sup>D สำหรับการวัดอนุภาคขนาดมิลลิเมตรด้วยเครื่อง C<sup>4</sup>D อย่างง่าย พบว่า C<sup>4</sup>D สามารถวัดการเคลื่อนผ่านของอนุภาคผ่านขั้วไฟฟ้าได้และสัญญาณทางไฟฟ้าของ C<sup>4</sup>D ที่วัดได้ยังสัมพันธ์กับขนาดของอนุภาคด้วย ขั้นตอนต่อมา ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบ C<sup>4</sup>D แบบใหม่เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการวัดอนุภาคขนาดไมครอน เช่น เซลล์เม็ดเลือด ความพิเศษของ C<sup>4</sup>D ที่ออกแบบใหม่นี้ คือ มีระยะห่างระหว่างขั้วไฟฟ้าเพียง 16 ไมครอน C<sup>4</sup>D ที่ออกแบบและสร้างขึ้นใหม่สามารถวัดและจำแนกขนาดของเม็ด polystyrene ขนาดต่างๆ ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ได้เป็นอย่างดี ถัดไป ผู้วิจัยได้นำ C<sup>4</sup>D ที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบกับสารละลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบไหลแบบ “ครอสอินเจกชันอะนาไลซิส” หรือ ซีไอเอ (Cross Injection Analysis หรือ CIA) ขึ้นเป็นครั้งแรก ซึ่งผลิตได้ง่ายกว่าการสร้างซีเควนเชียลอินเจกชันมาก CIA สร้างขึ้นเพื่อหวังพัฒนาสำหรับการนำส่งอนุภาคขนาดเล็กเพื่อการตรวจนับและสำหรับการผสมสารภายในท่อขนาดเล็กเพื่อการวิเคราะห์ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการพื้นฐานของเทคนิคโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส หรือ เอฟไอเอ (Flow injection analysis หรือ FIA) อย่างไรก็ดี ระบบ CIA ที่พัฒนาขึ้นมีข้อแตกต่างจากและ ระบบ Sequential injection analysis หรือ SIA ดังนี้ คือ ระบบ SIA จะดูดสารตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ละตัวอย่างเป็นลำดับให้เข้ามาอยู่ในท่อโดยผ่าน selection valve และ syringe pump การผสมของสารภายในท่อสามารถทำได้โดยการดูดผลึกท่อนของสารทั้งหมดกลับไปมาหลายๆ รอบ ก่อนที่จะผลึกสารทั้งหมดเข้าสู่เครื่องตรวจวัด อย่างไรก็ดี ระบบ CIA สารตัวอย่างและรีเอเจนต์จะถูกดูดเข้าสู่ท่อในคราวเดียวกันโดยใช้ peristaltic pump แบบหลายช่อง ยิ่งไปกว่านั้น ความดันที่เกิดจากการปิด peristaltic pump ในวิธีแบบ stopped-flow mode จะช่วยให้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์ไม่ไหลผสมกันเองและกับสารตัวพา ระบบ CIA ต้องการใช้เพียงแค่ peristaltic pump สำหรับการดูดสาร ดังนั้นเครื่องมือที่ใช้ในระบบจึงน้อยกว่าในระบบ multicommutation วิธีการนำส่งของเหลวใน CIA เข้าสู่ท่อนั้นแตกต่างจากวิธี SIA และ multicommutation ในระบบ CIA สารตัวอย่างและรีเอเจนต์จะถูกดูดเข้าไปทางท่อในแนวแกน y ในคราวเดียวกันซึ่งเป็นเวลาเดียวกับการผลึกสารตัวพาในท่อแนวแกน x วิธีการนำส่งสารในลักษณะนี้ หรือที่เรียกว่า cross-flow จะทำให้สารตัวอย่างและรีเอเจนต์บางส่วนไหลมาที่ท่อในแนวแกน x และเกิดการผสมกันทำให้ความไวในการวิเคราะห์เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งไม่จำเป็นต้องดูดผลึกท่อนสารหลายๆ รอบ เหมือนในระบบ SIA เมื่อเปรียบเทียบกับระบบ multicommutation และ multipumping technique ระบบ CIA ใช้คำสั่ง

สำหรับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่สั้นและง่ายกว่า ขนาดของท่อในระบบ CIA สามารถเปลี่ยนได้ง่ายโดยการเปลี่ยนขนาดของท่อและขนาดของ CIA platform สำหรับการใช้งานในระยะยาว ระบบ CIA จะเสียค่าใช้จ่ายในการซ่อมบำรุงน้อยกว่าเทคนิคอื่นๆ เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ในระบบประกอบไปด้วยอุปกรณ์จำพวก ท่อและ acrylic platform สำหรับทำอุปกรณ์ CIA ในงานวิจัยที่นำเสนอนี้ ได้นำ CIA แบบ 4 ท่อ ไปประยุกต์ใช้หาปริมาณ Fe(II) อุปกรณ์ CIA ที่พัฒนาขึ้นนี้มีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในลักษณะอื่นๆ ได้

นอกจาก CIA ยังได้พัฒนาการใช้กระแสของเหลวเพื่อบีบอนุภาคให้เป็นลำและวิ่งที่ละอนุภาคเข้า C4D โดยพัฒนาใช้ microchip แบบ glass-PDMS อย่างไรก็ดีพบว่าประสิทธิภาพยังไม่ดีพอ จึงได้นำ microchip ที่ได้ไปใช้พัฒนาเทคนิควิเคราะห์ไอโอดีนปริมาณน้อยในน้ำแทน และได้มีการทดลองเพื่อนำระบบ sequential injection หรือ ซีเควนเชียลอินเจกชัน มาพัฒนาและสร้างขึ้นสำหรับเพื่อนำส่งของเหลว หรืออนุภาคด้วย ซึ่งระบบดังกล่าวนี้ก็ได้นำมาใช้ในการนำส่งอนุภาคเข้าตัวตรวจวัด C4D เพื่อการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในช่วงต้นๆ ของการทดสอบ

สำหรับตัวตรวจติดตามค่าการนำไฟฟ้าของของเหลว C4D ที่สร้างขึ้นยังไม่สามารถวัดสัญญาณของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ อาจเป็นเพราะการนำไฟฟ้าของสารละลายภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่แตกต่างกันกับสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งใช้เป็นสารตัวพา การศึกษาระบบสารละลายตัวพาที่เหมาะสม นอกจากการพัฒนา C4D ซึ่งพบว่าให้การตอบสนองสามารถนำมาใช้ในการนับอนุภาคได้และตอบสนองให้ขนาดสัญญาณที่แปรผันตามขนาดอนุภาค อย่างไรก็ตาม C4D ที่พัฒนาขึ้นนี้ยังไม่เหมาะสมในการนำมานับและตรวจวัดปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดแดงอย่างที่ตั้งใจเอาไว้ จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมในการลองหาตัวตรวจวัดแบบไดโอดคู่ หรือ PEDD มาใช้ในการวัดกลุ่มของอนุภาค อย่างไรก็ตามผลทดสอบเบื้องต้นพบว่า การใช้ C4D ยังคงให้ประสิทธิภาพที่ตอบสนองได้ดีกว่า PEDD แต่โดยสรุปการใช้ C4D เหมาะสำหรับอนุภาคสังเคราะห์ที่มีขนาดไมครอน แต่ไม่เหมาะสมกับเม็ดเลือดแดง

อย่างไรก็ดีเนื่องจาก C4D และ PEDD ได้ถูกพัฒนาขึ้นใช้แล้ว ในเมื่อยังไม่สามารถนำมาใช้ในการนับเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ แต่ยังคงสามารถนำไปใช้เป็นตัวตรวจวัดทางเคมีอื่นๆ ได้ จึงได้ทำการพัฒนาระบบวิเคราะห์เพิ่มขึ้นเพื่อให้มี outputs เป็น publications ให้กับโครงการ จึงเป็นที่มาของการพัฒนาเทคนิคตรวจวัด เพิ่มขึ้น 2 เทคนิค และในการนี้ได้พัฒนาระบบไหลไว้ 2 แบบ คือ CIA และ microchip รวมทั้งได้พัฒนาสร้างระบบซีเควนเชียลอินเจกชัน SIA เอาไว้ด้วย จึงได้ผลิตผลงานตีพิมพ์ได้รับการตอบรับให้ลงวารสารที่มี impact factor จำนวน 4 เรื่องด้วยกัน

## บทที่ 6 Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ต่อไปนี้เป็น Output จากโครงการวิจัย

### 6.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 4 เรื่อง คือ

6.1.1 D. Nacapricha, P. Sastranurak, T. Mantim, N. Amornthammarong, K. Uraisin, C. Boonpanaid, C. Chuyprasartwattana, P. Wilairat, Cross injection analysis: concept and operation for simultaneous injection of sample and reagents in flow analysis, *Talanta*, 110(2013)89-95.

6.1.2 P. Saetear, K. Khamtau, N. Ratanawimarnwong, K. Sereenonchai, D. Nacapricha, Sequential injection system for simultaneous determination of sucrose and phosphate in cola drinks using paired emitter-detector diode sensor, *Talanta*, 115(2013)361-366.

6.1.3 N. Chantipmanee, W. Alahmad, T. Sonsa-ard, K. Uraisin, N. Ratanawimarnwong, T. Mantim, D. Nacapricha, Green analytical flow method for the determination of total sulphite in wine using membraneless gas-liquid separation with contactless conductivity detection, *Anal. Meth.*, 9(2017)6107-6116.

หมายเหตุ เรื่องนี้ได้รับเลือกขึ้นหน้าปกวารสาร

6.1.4 P. Inpota, K. Strazelak, R. Koncki, W. Sripumkhai, W. Jeamsaksiri, N. Ratanawimarnwong, P. Wilairat, N. Choengchan, R. Chantiwas, D. Nacapricha, Microfluidic analysis with front-face fluorometric detection for the determination of total inorganic iodine in drinking water, *Anal. Sci.*, 34(2018)161-166.

### 6.2 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ต่อไปนี้เป็น การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ในเชิงวิชาการ

6.2.1 มีการผลิตผลงานตีพิมพ์สำหรับนักศึกษาในหลักสูตรปริญญาเอก ของ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล จากโครงการจำนวน 4 คน

6.2.2 การผลิตผลงานตีพิมพ์สำหรับนักศึกษาในหลักสูตรปริญญาเอก ของ Polan จากโครงการจำนวน 1 คน (Mr. Kamil Strazelak, University of Warsaw, Poland ซึ่งได้มาขอฝึกวิจัยระยะสั้น)

6.2.3 มีการผลิตผลงานตีพิมพ์สำหรับนักศึกษาในหลักสูตรปริญญาโท ของภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล จากโครงการจำนวน 3 คน

6.2.4 มีการผลิตบัณฑิตปริญญาตรี ของโครงการจำนวน 1 คน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้า พระนครเหนือ

6.2.5 มีการสร้างนักวิจัยใหม่ ทั้งในประเทศไทยและสหรัฐอเมริกา (ซึ่งปัจจุบันบรรจุเป็นพนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่งอาจารย์หรือผู้ช่วยศาสตราจารย์ หรือนักวิจัยในต่างประเทศ) จำนวน 6 คน

## เอกสารอ้างอิง

- [1] D. Irimia, Lab Chip. 9 (2009) 2875-2876.
- [2] A. Osei-Bimpong, C. Jury, R. McLean, S. M. Lewis, Int J Lab Hematol 31 (2009) 657-64.
- [3] C. van Berkel, J. D. Gwyer, S. Deane, N. G. Green, J. Holloway, V. Hollis, H. Morgan, Lab Chip 11 (2011) 1249-55.
- [4] <http://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer>
- [5] [http://en.wikipedia.org/wiki/Flow\\_cytometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry)
- [6] J. H. Nieuwenhuis, F. Kohl, J. Bastemeijer, P. M. Sarro, M. J. Vellekoop, Sensors and Actuators B: Chemical 102 (2004) 44-50.
- [7] W. H. Coulter, High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. Proc Natl Electron Conf. 1956 (Vol. 12). Chicago: National Electronics Conference, Inc.; 1957; pp 1034–1040.
- [8] P. Kuban, P. C. Hauser, Anal. Chim. Acta 607 (2008) 15-29.
- [9] A. J. Zemmann, E. Schnell, D. Volgger, G. K. Bonn. Anal. Chem. 70 (1998) 563-567.
- [10] J. A. Fracassi Da Silva, C. L. Do Lago. Anal. Chem. 70 (1998) 4339-4343.
- [11] P. Kuban, P. C. Hauser. Electrophoresis 30 (2009) 176-88.
- [12] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Anal. Chim. Acta 78 (1975) 145–147.
- [13] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Trends Anal.Chem. 27 (2008) 390–393.
- [14] P. C. A. G. Pinto, M. Lu´cia, M. F. S. Saraiva, J. L. F. C. Lima, Anal.Lett. 44 (2011) 374–397.



- [15] W. R. Melchert, B. F. Reis, F. R. P. Rocha, *Anal.Chim.Acta* 714 (2012) 8–19.
- [16] F. R. Mansour, N. D. Danielson, *Trends Anal. Chem.* 40 (2012) 1–14.
- [17] H. BergaminF, E. A. G. Zagatto, F. J. Krug, B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta* 101 (1978) 17–23.
- [18] Z. Xie, J. Zhao, *Talanta* 63 (2004) 339–343.
- [19] J. Ruzicka, G. D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329–343.
- [20] J. Ruzicka, *Analyst* 125 (2000) 1053–1060.
- [21] M. Miro', E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 750 (2012) 3–15.
- [22] M. D. Luque de Castro, J. Ruiz-Jime' nez, J. A. Pe' rez-Serradilla, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 118–126.
- [23] J. Wang, E. H. Hansen, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 225–231.
- [24] K. Grudpan, *Talanta* 64 (2004) 1084–1090.
- [25] J. Jakmunee, L. Patimapornlert, S. Suteerapataranon, N. Lenghor, K. Grudpan, *Talanta* 65 (2005) 789–793.
- [26] R. Burakham, S. Lapanantnoppakhun, J. Jakmunee, K. Grudpan, *Talanta* 68 (2005) 416–421.
- [27] V. Cerda, J. M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, *Talanta* 50 (1999) 695–705.
- [28] B. F. Reis, M. F. Gine', E. A. G. Zagato, J. L. F. C. Lima, R. A. Lapa, *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 129–138.
- [29] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M Santos, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002) 125–132.

- [30] N. Teshima, D. Noguchi, Y. Joichi, N. Lenghor, N. Ohno, T. Sakai, S. Motomizu, *Anal. Sci.* 26 (2010) 143–144.
- [31] P. K. Dasgupta, I. Y. Eom, K. J. Morris, J. Li, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 337–364.
- [32] R. H. Lindsay, B. E. Paton, *Am. J. Phys* 44 (1976) 188–189.
- [33] F. M. MimsIII, *Appl. Opt.* 31 (1992) 6965–6967.
- [34] K. T. Lau, S. Baldwin, R. L. Shepherd, P. H. Dietz, W. S. Yezunis, D. Diamond, *Talanta* 63 (2004) 167–173.
- [35] K. T. Lau, E. McHugh, S. Baldwin, D. Diamond, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 221–226.
- [36] M. O' Toole, K. T. Lau, R. Shepherd, C. Slater, D. Diamond, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 290–294.
- [37] E. Mieczkowska, R. Koncki, L. Tymecki, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3293–3297.
- [38] L. Tymecki, L. Brodacka, B. Rozum, R. Koncki, *Analyst* 134 (2009) 1333–1337.
- [39] L. Tymecki, K. Strzelek, R. Koncki, *Talanta* 79 (2009) 205–210.
- [40] K. Strzelek, R. Koncki, L. Tymecki, *Talanta* 96 (2012) 127–131.
- [41] M. O' Toole, K. T. Lau, B. Shazmann, R. Shepherd, P. N. Nesterenko, B. Paull, D. Diamond, *Analyst* 131 (2006) 938–943.
- [42] L. Barron, P. N. Nesterenko, D. Diamond, M. O' Toole, K. T. Lau, B. Paull, *Anal. Chim. Acta* 577 (2006) 32–37.
- [43] M. O' Toole, L. Barron, R. Shepherd, B. Paull, P. Nesterenko, D. Diamond, *Analyst* 134 (2009) 124–130.

- [44] M. Pokrzywnicka, R. Koncki, L. Tymecki, *Talanta* 82 (2010) 422–425.
- [45] L. Tymecki, M. Pokrzywnicka, R. Koncki, *Analyst* 136 (2011) 73–76.
- [46] M. Pokrzywnicka, M. Fiedoruk, R. Koncki, *Talanta* 93 (2012) 106–110.
- [47] J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 58 (1986) 3207–3215.
- [48] J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2796–2801.
- [49] S. Teerasong, S. Chan-Eam, K. Sereenonchai, N. Amornthammarong, N. Ratanawimarnwong, D. Nacapricha, *Anal. Chim. Acta* 668 (2010) 47–53.
- [50] T. Mantim, P. Saetear, S. Teerasong, S. Chan-Eam, K. Sereenonchai, N. Amornthammarong, N. Ratanawimarnwong, P. Wilairat, W. Meesiri, K. Uraisin, D. Nacapricha, *Pure Appl. Chem.* 84 (2012) 2015–2025.
- [51] S. R. B. dos Santos, M. C. U. Araújo, R. A. Barbosa, *Analyst* 127 (2002) 324–327.
- [52] A. Wijk, B. Karlberg, *Talanta* 41 (1994) 395–400.
- [53] D. A. Skoog, D. M. West, *Principles of Instrumental Analysis*, second ed., Saunders College, West Washington Square, Philadelphia, PA, USA 294–299.
- [54] R. B. R. Mesquita, S. M. V. Fernandes, A. O. S. S. Rangel, *J. Environ. Monit.* 4 (2002) 458–461.
- [55] B. M. Simonet, F. Grases, J. G. March, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 96–102.
- [56] J. L. F. C. Lima, A. O. S. S. Rangel, M. R. S. Souto, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 356 (1997) 259–265.
- [57] Meade, G.P.; Chen, J.C.P., *Cane Sugar Handbook*, 10th ed.; John Wiley and Sons: New York, 1977.
- [58] J. Wong-Chong, F. A. Martin, *J. Agric. Food Chem.* 27 (1979) 927–929.

- [59] J. Wong-Chong, F. A. Martin, J. Agric. Food Chem. 27 (1979) 929-932.
- [60] F. Cadet, B. Offmann, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 166-171.
- [61] P. Thavarungkul, P. Suppapitnarm, P. Kanatharana, B. Mattiasson, Biosens. Bioelectron. 14 (1999) 19-25.
- [62] I. L. Mattos, E. A. G. Zagatto, A. O. Jacintho, Anal. Chim. Acta. 214 (1988) 247-257.
- [63] R. P. Sartini, C. C. Oliveira, E. A. G. Zagatto, H. Bergamin Filho, Anal. Chim. Acta. 366 (1998) 119-125.
- [64] A. Magna, A. F. de Oliveira, O. Fatibello-Filho, Anal. Lett. 29 (1996) 2411-2419.
- [65] W. O. S. Doherty, D. W. Rackemann, Int. Sugar J. 111 (2009) 448-454.
- [66] Method of Cane Analysis, Office of the Cane and Sugar Board, Thailand.  
([http://pikul.lib.ku.ac.th/Fulltext\\_SUGAR/SUG030050/SUG030050a.pdf](http://pikul.lib.ku.ac.th/Fulltext_SUGAR/SUG030050/SUG030050a.pdf),  
[http://pikul.lib.ku.ac.th/Fulltext\\_SUGAR/SUG030050/SUG030050b.pdf](http://pikul.lib.ku.ac.th/Fulltext_SUGAR/SUG030050/SUG030050b.pdf),  
[http://pikul.lib.ku.ac.th/Fulltext\\_SUGAR/SUG030050/SUG030050c.pdf](http://pikul.lib.ku.ac.th/Fulltext_SUGAR/SUG030050/SUG030050c.pdf)) (as available of May 7th, 2015).
- [67] Beater, B.E., Rapid determination of phosphate in cane juices.  
([http://www.sasta.co.za/wp-content/uploads/Proceedings/1930s/1937\\_Beater\\_Rapid%20Determination%20Of%20Phosphate.pdf](http://www.sasta.co.za/wp-content/uploads/Proceedings/1930s/1937_Beater_Rapid%20Determination%20Of%20Phosphate.pdf)) (as available of Mat 7th, 2015).
- [68] Pyne, J.H., Sugar Cane Factory Analytical Control: The Official Methods of the Hawaiian Sugar Technologists. Elsevier, 1968.
- [69] M. S. Y. Mahadevaiah; Kumar, M. S. A. Galil, M. S. Suresha, M. A. Sathish, G. Nagendrappa, E-J. Chem. 4 (2007) 467-473.
- [70] S. N. Walford, J. Chromatogr. A. 956 (2002) 187-199.

## ผลงานตีพิมพ์เรื่องที่ 1



## Cross injection analysis: Concept and operation for simultaneous injection of sample and reagents in flow analysis

Duangjai Nacapricha<sup>a,b,\*</sup>, Patidta Sastranurak<sup>a,b</sup>, Thitirat Mantim<sup>a,b</sup>, Natchanon Amornthammarong<sup>a,c</sup>, Kanchana Uraisin<sup>a,b</sup>, Chatchalida Boonpanaid<sup>a,d</sup>, Chatpong Chuyprasartwattana<sup>a,d</sup>, Prapin Wilairat<sup>a,b,e</sup>

<sup>a</sup> Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs), Thailand

<sup>b</sup> Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>c</sup> National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), Ocean Chemistry Division/AOML, Miami, FL 33149, USA

<sup>d</sup> Department of Industrial Chemistry, Faculty of Applied Science, King Mongkut's Institute of Technology North Bangkok, Bangkok 10800, Thailand

<sup>e</sup> National Doping Control Center, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 January 2013

Received in revised form

6 February 2013

Accepted 6 February 2013

Available online 13 February 2013

#### Keywords:

Cross injection analysis (CIA)

Simultaneous flow

Intersection zones

x-axis channel

y-axis channel

Iron

### ABSTRACT

This work presents a new flow injection strategy, called 'cross injection analysis' or CIA, an alternative cost-effective approach in flow analysis. The flow platform is made from a rectangular acrylic block, approximately  $5 \times 3 \times 1.5$  cm ( $x \times y \times z$ ), with crossing cylindrical channels drilled out along the x- and y-axis of the block. The outlet from the single x-axis channel is connected to a detector flow cell. This channel is filled with the carrier solution. The flow in the x-axis channel is driven by a computer controlled single-channel peristaltic pump. The multiple y-axis channels, running perpendicular to the x-channel, are connected to a multi-channel peristaltic pump. These channels contain the sample and reagent solutions that flow across the intersection zones of the channels. To mix the sample and reagent with subsequent detection of the reaction zone, flow is applied along the x-axis channel, while flow in the y-axis channels is stopped. We successfully demonstrated the validity of the CIA technique by the spectrometric determination of Fe(II) using 1,10-phenanthroline and the speciation of Fe(II) and Fe(III). To place the CIA technique within the context of flow analysis, a brief overview of the evolution of flow injection analysis and its later innovative development is included.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Following the first report of flow injection analysis (FIA or FI) in 1975 by Ruzicka and Hansen [1], there have been a tremendous number of research papers published on new developments in this area [2–4]. FI can also be operated using the so-called 'reversed-FI' (rFI) [5,6], in which the reagent is injected into a flowing stream of the sample to improve the sensitivity over normal FI mode [7]. In 1990, Ruzicka and Marshall introduced sequential injection analysis (SIA or SI), the second generation of FI, that is fully controlled by the computer [8]. In SI technique, metered amounts of sample and reagent(s) are sequentially aspirated, through precise control of selection valve and the syringe pump (plunger in filling mode), as stacked layers into a holding coil. Finally, the reaction zone is propelled (plunger in delivering mode) to the detector. Ruzicka also proposed the lab-

on-valve (LOV) technique that extends the feature of sequential injection to provide liquid handling in microliter and sub-microliter levels of sample and reagent(s) with a microfluidic platform made of acrylic or other polymeric material attached atop the selection valve [9–11]. The microfluidic platform accommodates connecting ports, working channels and flow through detection cell. The LOV technique is often called SI-LOV or  $\mu$ SI-LOV [12]. In 2004, Grudpan proposed an alternative cost-effective approach to SI called lab-at-valve (LAV) [13]. Liquid handling in LAV utilizes a syringe pump similar to the SI concept. However in LAV, there is no replacement of the stator plate of selection valve by the precisely machined microfluidic-platform. Instead devices such as in-house potentiometric flow cell [14] or pipette tip, as SI liquid-liquid separator [15], are attached or plugged directly onto the port(s) of the SI selection valve.

Cerdà et al. proposed 'multi-syringe' (also written as 'multi-syringe') flow analysis or MSFIA in 1999 [16]. The basic system of MSFIA comprises four syringes that are connected in a block to the same stepping motor. A three-way solenoid valve is fitted at the head of each syringe for selecting the flow path (reservoir or analytical flow path). These valves are commutation valves that can be separately controlled without having to stop the

\* Corresponding author at: Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand. Tel.: +66 2 2015122; fax: +66 2 2015127.

E-mail addresses: [duangjai.nac@mahidol.ac.th](mailto:duangjai.nac@mahidol.ac.th), [dnacapricha@gmail.com](mailto:dnacapricha@gmail.com) (D. Nacapricha).

movement of the syringe plungers. MSFIA is a versatile technique and the basic system can be modified to add on other components, such as solenoid valve(s) for sample introduction to eliminate carryover of sample in the syringe barrel [17].

Reis et al. introduced 'multicommutation' flow analysis (MCFA) [18]. MCFA is a continuous flow strategy that utilizes computerized control of three-way solenoid valves and a peristaltic pump to insert sample and reagent plugs into the liquid flow path. In the arrangement of the MCFA system, the pump is placed at the end of the flow line after the detection cell and only a single pumping channel is used. Later in 2002, Santos and others from the same laboratory presented another strategy called 'multi-pumping' (also written as multipumping) flow system (MPFA) [19]. In MPFA, a set of solenoid micropumps are individually controlled by a computer to propel sample and reagent(s) by time-based or a pulse counting approach. With suitable arrangement of micropumps, use of solenoid valves and peristaltic pump is thereby eliminated.

Recently in 2010, a group in Japan [20] presented a hybrid system of FI, SI and multicommutation called 'simultaneous injection-effective mixing analysis' (SIEMA). A SIEMA system consists of a syringe pump as the liquid delivery module. One part of the three-way solenoid valve fitted to the syringe head is connected to the analytical flow path by a four-way cross-connector. The system also has separately controlled three-way solenoid valves for introducing sample and reagents into the central flow line when the syringe plunger is pulled down (reverse flow). The reaction solution is later pushed into and out of the mixing coil for detection (forward flow).

In this work, we present a new flow analysis technique called 'cross injection analysis' or CIA. The CIA platform has one channel as the analytical flow path (the *x*-axis channel) and four channels (*y*-axis channels) perpendicular to this channel. These channels are drilled out of an acrylic rectangular block. Both ends of the *y*-axis channels are connected with tubings to the same set of rollers of a peristaltic pump to form four flow lines. In CIA, the sample and reagents are introduced into the analytical flow path of the platform (*x*-axis channel) via individual pump tube connected to the *y*-channels of the platform. Unlike the SI and the multicommutation techniques, liquid introduction in CIA is simultaneous. We employ the cross-flow mode to improve the mixing to achieve desired sensitivity. Although CIA may be similar to the SI and the multicommutation in the way that liquid zones are inserted into analytical flow path of the system, the pattern of liquid flow in CIA is different to these previous techniques due to the platform design and the employed cross-flow. We exploit the characteristic of the peristaltic pump in which rollers are in 'press' mode when the pump is stopped. Thus pressure is maintained during the stopped-flow period holding the liquid inside the tubing or connected channels without the need to use syringe pump or solenoid valve as in the SI or the multicommutation techniques, respectively. In this design, using a peristaltic pump, with eight pump tubes placed on the rollers, is equivalent to operating a set of eight solenoid valves.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and samples

All chemicals used in this work were AR grade. Deionized-distilled water was used throughout all the experiments. Standard stock solution of Fe(II) ( $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ ) was prepared by dissolving an accurate weight of 4.98 g iron (II) sulphate heptahydrate (Fluka, Switzerland) in 1.00 L of  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  sulfuric acid. Standard stock solution of Fe(III) ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) was prepared by dissolving an accurate weight of 4.71 g iron(III) sulfate heptahydrate (Sigma-Aldrich, USA) in 1.00 L of  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$

sulfuric acid. These stock solutions were calibrated against a certified atomic absorption standard ( $1002 \pm 2 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}$ ) as  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  in  $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$  (Merck, Germany) for accurate concentrations of iron. Working standard solutions of Fe(II) and Fe(III) were freshly prepared daily from the stock solutions by serial dilutions with  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  sulfuric acid. Acetate buffer pH 5.3, used as the carrier in the CIA system, was prepared by mixing 81.50 mL of  $2.00 \text{ mol L}^{-1}$  aqueous sodium acetate solution with 18.5 mL of  $2.00 \text{ mol L}^{-1}$  acetic acid in a one liter volumetric flask and making up to mark with water. The hydroxylamine solution was prepared by dissolving 19.8 g of hydroxylamine hydrochloride (Merck, Germany) in 250 mL of water. This solution was used to reduce iron (III) to iron (II) in the determination of total iron in the speciation analysis. The reagent for Fe(II) was 1,10-phenanthroline (Merck, Germany) in acetate buffer.

Five commercial products of multivitamin tablets were used in the validation study. Finely ground sample was weighed accurately (0.1 to 0.5 g) and dissolved in 100.0 mL of  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  sulfuric acid. After constant stirring for 30 min, the solution was centrifuged for 15 min at 3000 rpm. The supernatant was then filtered through a cellulose acetate membrane filter ( $0.45 \mu\text{m}$ ). The filtrate was directly aspirated into the CIA system.

### 2.2. CIA platform

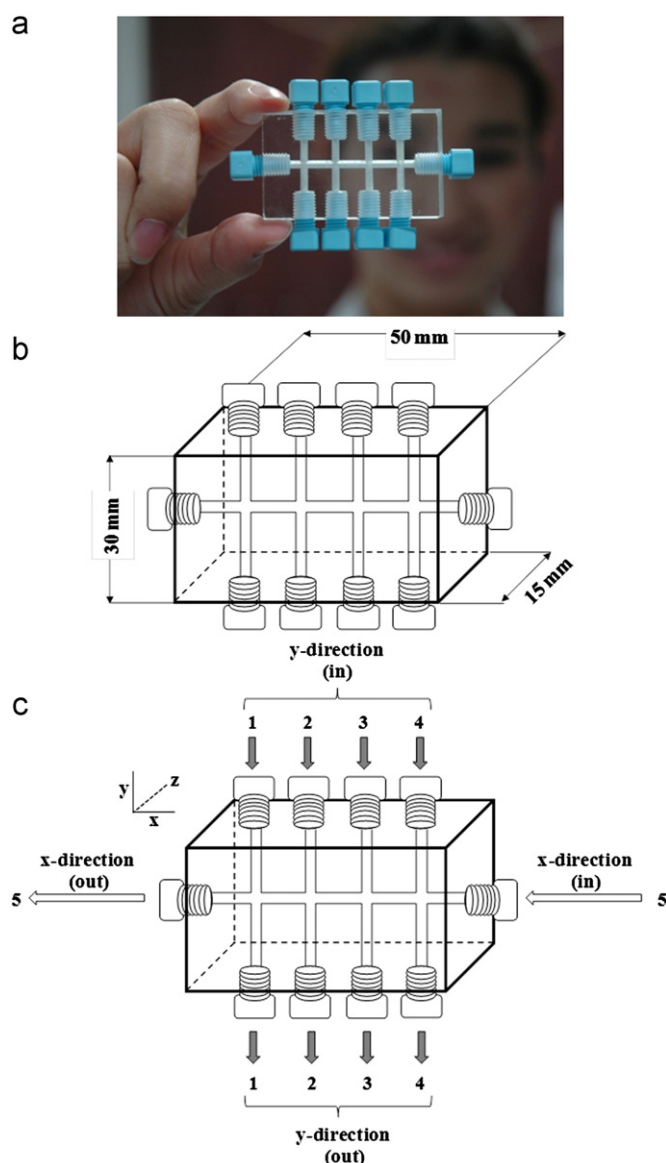
Fig. 1a is a photograph of a CIA platform, which is made from Perspex<sup>TM</sup>. Fig. 1b shows the dimensions of a regular platform with cylindrical channels drilled out using computer controlled drilling bit. The CIA platform has a main channel, designated as the '*x*-channel', for the carrier stream. The crossing channels (labeled 1–4 in Fig. 1c) are drilled perpendicular to the *x*-channel. These channels are designated as '*y*-channels' and are used for the sample and reagents solution. We can reduce or add *y*-channels according to the number of reagents required. For determination of iron, we used the CIA platform as shown in Fig. 1 with four *y*-channels.

### 2.3. The manifold

Fig. 2 is a schematic diagram of the CIA flow-manifold employed for the determination of iron (II) and total iron. An Ismatec peristaltic pump (model ISM843, Switzerland), designated as P1 with capacity for accommodating eight pump tubes, was used for simultaneously filling or withdrawing the sample/standard (S) and the three reagents (R1, R2 and R3), in the *y*-channels (channels 1 to 4) of the CIA platform. P2 is a peristaltic pump used for driving the carrier solution (C) through the *x*-channel (designated as channel 5 in Fig. 1c and in Fig. 2). For this work, we employed an Ismatec pump (model IS7610, Switzerland). The system was also equipped with an Upchurch valve, V (model V-101L, USA). When the valve is set at the 'open' position (solid line), the flow line of the CIA platform in the *x*-direction is connected to the detection cell of the detector D, and then to waste (waste 2). When the valve V is set to 'close' position (dashed line), the carrier solution flows out of the platform via the *y*-channels to waste 1. A Jenway spectrophotometer (model 6450, UK) with 1-cm path length flow-through cell (Hellma, USA) was employed for absorbance measurement at 510 nm. Labview<sup>TM</sup> program, version 8.0, was used for data acquisition of the signal from the detector. An in-house CIA electronic board was built to control the peristaltic pumps P1, P2 and the valve V using software written in Visual Basic 6.0.

### 2.4. Investigated operating procedures

In this work, there are two operating procedures that were investigated as shown in Table 1. In procedure 1, flow in the



**Fig. 1.** (a) Photograph, (b) schematic diagrams of CIA platform with external dimension and (c) flow directions of liquids.

x- and y-channels was applied alternately. In step 1, pump P2 loaded the buffer carrier solution for 10 s into the x-channel of the CIA platform, with pump P1 stopped and valve V in 'open' position. In step 2, standard iron solution and reagents were simultaneously loaded into the CIA platform via channels 1 to 4 for 10 s, with switching valve, V, in 'close' position. Solutions in the y-channels flowed to waste 1 (Fig. 2). Using the flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , ca.  $167 \mu\text{L}$  of liquid is dispensed in each channel during the 10 s loading time. In step 3, the switching valve V was set to 'open' position and flow of the carrier solution restarted. The plugs of sample and reagents at the four intersections of the channels were driven along the x-channel. The zones were mixed as they flowed to the detector. The flow was maintained for 50 s.

In procedure 2, we operated the system using simultaneous flow in step 2. That is, in step 2, both pumps P1 and P2 were operated. As described above valve V was closed, the carrier solution in the x-channel thus flowed out along the y-channels to waste 1. The sample and three reagents flowed along the y-channels in cross-flow manner. Precise control of the pumps ensured that this loading process was reproducible giving good precision for analysis (see Section 3.5).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Selection of operating procedure

##### 3.1.1. Sensitivity

We tested two procedures as given in Table 1 to operate the CIA system (Fig. 2) for monitoring the reaction of iron(II) with 1,10-phenanthroline. In Fig. 2, solutions of  $1 \text{ mol L}^{-1}$  hydroxylamine hydrochloride, acetate buffer (pH 5.3) and  $0.015 \text{ mol L}^{-1}$  1,10-phenanthroline were employed as the reagents R1, R2 and R3, respectively. Standard Fe(II) solution ( $5$  to  $20 \text{ mg L}^{-1}$  Fe(II)) was placed in the S reservoir for construction of the calibration curves for both procedures. The flows of reagents and standards were driven by the peristaltic pump P1. The flow of acetate buffer, carrier (C), was driven by peristaltic pump, P2.

The two procedures gave linear calibrations with comparable correlation coefficients ( $r^2 \sim 0.99$ ). However, repetitive operations showed that the sensitivity of procedure 2 was greater than procedure 1 (see Table 1). The simultaneous flow in step 2 of procedure 2 had flow-characteristics that resulted in better sensitivity. Therefore, experiment was carried out to investigate this effect.

##### 3.1.2. Flow characterization at the crossing-zones for the alternate and simultaneous flow mode

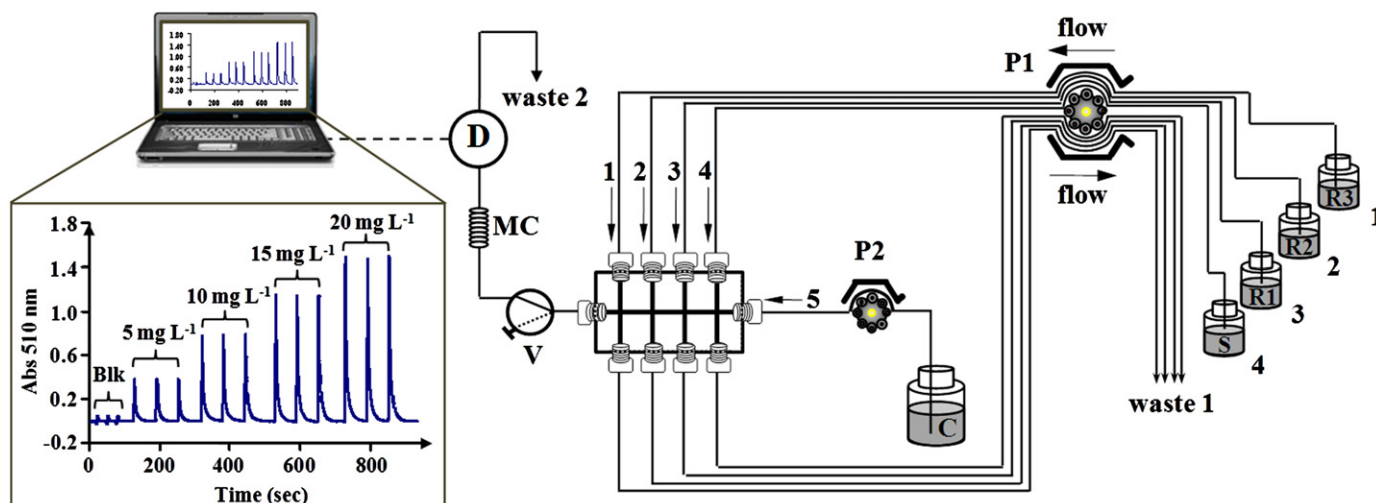
In order to investigate and compare the loading phenomena in step 2 of the two operational procedures in Table 1, the rapid formation of the pink color of 1,10-phenolphthalein with base was employed. The CIA system with the configuration shown in Fig. 2 was employed. The flow rate was set to  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ . In this particular experiment, pure water was loaded into all the reservoirs, C, S, R1, R2 and R3 (Fig. 2), and then pumped to fill all the channels. Pumps P1 and P2 were then turned off. The carrier reservoir (C) and sample reservoir (S) were then filled with  $0.003 \text{ mol L}^{-1}$  phenolphthalein and  $0.4 \text{ mol L}^{-1}$  potassium hydroxide, respectively.

When studying the alternate flow mode, the CIA system in Fig. 2 was operated using a different procedure to that given in Table 1. First, valve V was switched to the 'open' position (solid line), and pump P2 turned on for 20 s to fill channel 5 (x-channel) with the phenolphthalein solution. Valve V was then closed (dash line). Flow to channels 1 to 4 was then applied using pump P1. We began to see light pink color at the intersection of channel 4 and channel 5, indicating the arrival of the hydroxide solution Fig. 3a. The color became more intense as the flow continued. Fig. 3b is the photograph taken after 38 s.

The experiment with simultaneous flow was carried out by again first filling all the channels with water. The carrier (C) and sample (S) reservoir were filled with the phenolphthalein and potassium hydroxide solutions, respectively. Valve V was switched to 'open' position. Pump P2 was turned on for 20 s to fill channel 5 (x-channel) with phenolphthalein. Valve V was then set to 'close' position. Flows in the x- and y-channels were then applied simultaneously by operating pumps P1 and P2. Similar to the alternate flow mode, light pink color began to develop at the intersection of channel 4 and channel 5 (see Fig. 3c) and became more intense (Fig. 3d after 38 s). When compared with alternate flow mode (Fig. 3b), the length of the colored zone resulting from the simultaneous flow was significantly longer (Fig. 3d). Besides flowing directly across the intersection of channels 4 and 5, the KOH solution in this channel was also pushed by laminar flow along the x-channel towards valve V.

Using this simultaneous flow procedure, there is a larger volume of the crossing solutions injected into the carrier stream (x-channel). This was confirmed by the greater sensitivity observed





**Fig. 2.** Schematic diagram of the CIA flow manifold. P1 is the peristaltic pump with four flow lines for the sample S, and the reagents R1 to R3. P2 is the peristaltic pump with single flow line for the carrier solution C. V is the switching valve: solid line 'open'; dash line 'close'. MC is the mixing coil, 45 cm in length. D is the spectrophotometric detector. Insert shows a CIA signal profile for standard Fe(II) solutions, 0–20 mg L<sup>-1</sup>.

**Table 1**

Operation procedures investigated for the CIA system in Fig. 1 and the resulting calibrations.

Step	Process (flow pattern in CIA platform)	Duration (s)	P1	P2	V
Procedure 1: Loading of sample and reagents using alternate flow					
1	Carrier loading (flow: x-direction only)	10	Off	On	Open
2	Sample + reagents loading (flow: y-direction only)	10	On	Off	Close
3	Zone flushing to detector (flow: x-direction only)	50	Off	On	Open
Repeat step 2–3 for next sample					
Calibration equation: $A_{510} = (0.050 \pm 0.005) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.090 \pm 0.074)$ ; $r^2 = 0.991$					
Procedure 2: Loading of sample and reagent using simultaneous flow					
1	Carrier loading (flow: x-direction only)	10	Off	On	Open
2	Carrier + sample and reagents loading (flow: x-direction and y-direction)	10	On	On	Close
3	Zone flushing to detector (flow: x-direction only)	50	Off	On	Open
Repeat step 2–3 for next sample					
Calibration equation: $A_{510} = (0.073 \pm 0.003) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.041 \pm 0.039)$ ; $r^2 = 0.995$					

in the analysis of Fe(II) when using procedure 2 (simultaneous-flow mode).

Furthermore it could be observed (Fig. 3a and b) that the pink color for the alternate flow in step 2, was less intense than the color developed using the simultaneous-flow for loading (Fig. 3c and d). The laminar flow in x-direction dispersed and elongated the zones of liquid flow at the intersections of channels 1 to 4, enhancing the pre-mixing between iron(II) and reagents in x-channel. Thus, we selected procedure 2 in further experiments.

### 3.2. Zone sequence

In flow-based technique, the sequence of the sample/reagent zones may affect sensitivity. We examined two sequences as given in Table 2. In sequence a, the leading zone is 1,10-phenanthroline, followed by buffer, hydroxylamine (the reducing agent) and finally the Fe(II) standard solution. The zones are separated with zones of buffer carrier. In sequence b, the leading zone is Fe(II) standard solution, followed by hydroxylamine, buffer and finally the 1,10-phenanthroline. It was found that the slopes of the calibration lines obtained from the two sequences were not significantly different. However, we decided

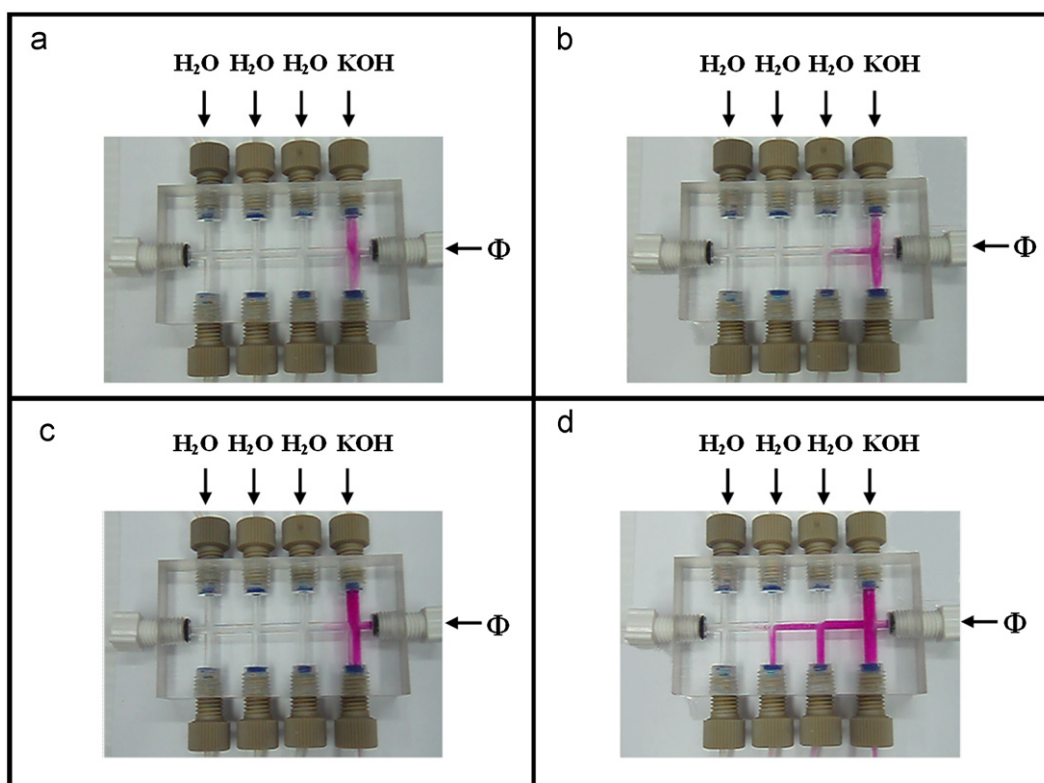
to use sequence 'a' since this sequence follows the sequence of mixing in a batch procedure.

### 3.3. Effect of channel diameter and use of mixing coil

Platforms A, B and C were made with various sizes of the channel, as shown in Table 3. The diameters of all channels for platform A and platform C are equal; that is, 2 and 3 mm, respectively. Platform B has the same size of the channels as platform A but with channel 4, the sample line, being 3 mm.

A series of iron(II) standard solutions were injected into the CIA system to compare the performance of the three platforms. The results in Table 3 clearly show increased sensitivity with increasing diameter of the sample channel (channel 4). Increasing the diameter of the channel increases the volume of solution introduced into the CIA platform. Thus by increasing the diameter of channel 4 from 2 to 3 mm in platform B, we increased the volume of iron(II). However increasing all the channels' diameter from 2 (platform A) to 3 mm (platform C) did not improve the sensitivity because the volume ratio of the solutions remained the same. In this work, we chose platform B in further experiments.

Using the CIA system in Fig. 2, the effect of employing a mixing coil placed before the detector was studied. The length of mixing coil was varied from 0 (no coil) to 90 cm. Injections of iron(II)



**Fig. 3.** Characterization of flow pattern of the crossing-zone using phenolphthalein ( $\phi$ ) and KOH solutions. Fig. 3(a) and (b) employ alternate flow mode with flow only of  $H_2O$  and KOH for 22 and 38 s, respectively. Fig. 3(c) and (d) employ flow of the phenolphthalein and the  $H_2O$ /KOH channels (simultaneous flow) for 22 and 38 s, respectively.

**Table 2**

Zone sequence and linear calibration equations.

Zone sequence		Calibration; correlation coefficient
		$A_{510} = (0.033 \pm 0.004) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.011 \pm 0.046); r^2 = 0.994$
		$A_{510} = (0.034 \pm 0.001) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.047 \pm 0.017); r^2 = 0.994$

C, buffer: acetate buffer pH 5.3;  $NH_2OH$ : hydroxylamine hydrochloride; phen: 1,10-phenanthroline; D: Spectrophotometer (510 nm).  
Note: Diameter of all CIA channels was 2 mm.

**Table 3**

Effect of channel diameter on the sensitivity of the CIA system in Fig. 2.

CIA platform	Channel diameter (mm)					Calibration; correlation coefficient
	CH 1 (R3)	CH2 (R2)	CH3 (R1)	CH4 (S)	CH5 (C)	
A	2	2	2	2	2	$A_{510} = (0.033 \pm 0.004) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.011 \pm 0.046); r^2 = 0.994$
B	2	2	2	3	2	$A_{510} = (0.074 \pm 0.001) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.040 \pm 0.002); r^2 = 0.999$
C	3	3	3	3	3	$A_{510} = (0.029 \pm 0.002) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.068 \pm 0.017); r^2 = 0.997$

CH: channel; C: carrier; S: iron standard/sample; R1, R2, R3: the reagents for iron(II).

solution (5, 10, 15 and 20 mg L<sup>-1</sup> Fe(II)) were carried out in triplicate ( $n=3$ ) for each coil length. It was found that sensitivity was enhanced with use of a mixing coil. The sensitivity increased with increasing coil length up to 45 cm. The highest sensitivity was achieved for the 45-cm coil, and was employed in the final flow manifold of the CIA system.

#### 3.4. Concentrations of 1,10-phenanthroline and hydroxylamine hydrochloride

The concentration of 1,10-phenanthroline (R3) was varied from  $5 \times 10^{-3}$  to  $1.5 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>. Iron(II) solution, at the maximum concentration ( $3.5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), was injected into the CIA system. The peak heights were constant for all concentration of the reagent, showing that 1,10-phenanthroline was in excess. The  $1.5 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> 1,10-phenanthroline was selected to ensure sufficient excess of this reagent.

Hydroxylamine hydrochloride (R1) was used as the reducing agent for Fe(III). A Fe(III) standard solution, 20 mg L<sup>-1</sup> Fe(III), was tested with various concentrations of the reducing agent (0.5–1.5 mol L<sup>-1</sup>), and the peak height measured using the manifold in Fig. 2. The signals were constant and independent of the concentration of the reducing agent. The 1.1 mol L<sup>-1</sup> solution was selected to ensure complete and rapid reaction.

#### 3.5. Analytical performance in the determination of iron(II), iron(III) and total iron

When the CIA system in Fig. 2 was operated under the optimal condition discussed above for analysis of Fe(II), calibration was linear in the range 5–20 mg L<sup>-1</sup> Fe(II) [ $A_{510}=(0.0705 \pm 0.002) \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)} + (0.031 \pm 0.011)$ ;  $r^2=0.995$ ]. The limit of quantitation of this CIA technique for Fe(II) was 0.2 mg L<sup>-1</sup> Fe(II) ( $10\sigma$  blank/slope), which is comparable to a multicommutation-based flow system [21] and a sequential injection method (SIA) using the same 1,10-phenanthroline reagent [22]. Since introduction of sample and reagents into our system is discrete, the volume employed in our method is therefore approximately three times less than in conventional FIA method for analysis of iron [23]. The consumptions of sample and reagents of the CIA system are 167 and 501  $\mu\text{L}$ , respectively. This method provides throughput of up to 60 samples h<sup>-1</sup>. With use of the electronic control, we could achieve precision with %RSD less than 2.6 (for 15 mg L<sup>-1</sup> Fe(II),  $n=10$ ).

The CIA system in Fig. 2 was also tested for its capability in speciation of Fe(II) and Fe(III). In order to determine only the Fe(II) species, the flow line for the hydroxylamine hydrochloride (R1) was replaced with water. The concentration of Fe(III) can be found by subtracting the concentration of Fe(II) from the total measured concentration of Fe. Table 4 shows that there is good agreement with the spiked amount and the measured value of Fe(II), Fe(III) and total Fe. The CIA system had good recoveries for all the iron species, as shown in Table 4.

Multivitamins also contain essential elements including I, Cl, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn and Cu. Using the sample preparation

procedure, concentrations of salts of the elements in the final solution are approximately 0.225 (KI), 36 (KCl), 162 (CaHPO<sub>4</sub>), 100 (MgSO<sub>4</sub>), 2 (MnSO<sub>4</sub>), 20 (ZnSO<sub>4</sub>) and 1 (CuSO<sub>4</sub>) mg L<sup>-1</sup>, respectively. We therefore investigated whether these salts may interfere in the analysis of iron. These salts were separately added to a standard solution of 5 mg L<sup>-1</sup> Fe(II). There was no significant difference in the signal observed when compared to the pure Fe(II) standard even up to 1500 mg L<sup>-1</sup>. Addition of mixture of these compounds at the levels expected in the final solution also gave no change. Therefore the CIA method for Fe(II) is not affected by common salts found in multivitamins.

#### 3.6. Application to multivitamins

The developed method was applied to the determination of total iron in multivitamins (Fig. 4). Four different brands of vitamins (A–D) were analyzed in triplicate by CIA. The iron content found by our method is close to the label values except for brand D. However the results of the CIA method are comparable with those using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). The paired  $t$ -test also confirm that the results of the CIA method are in significant agreement with the results of FAAS at 95% confidence level ( $t_{\text{stat}}=0.16$ ,  $t_{\text{crit}}=2.20$ ). The disagreement between the analytical results and the label content of iron for brand D may be due to the product itself.

The recovery of iron measurement in multivitamin tablets was investigated. We found that the recoveries of our method were in the range of 90.1–107%, indicating good accuracy for the CIA method.

#### 3.7. Utilization of peristaltic pump

From the aforementioned literature, there is wider application of syringe pumps in FI-based/FI-related techniques due to its robustness, with precise and accurate fluid control even at microliter levels. Operation of a syringe pump can be completely automated with good reproducibility. Other types of pumps have been used in flow analysis to replace peristaltic pump: e.g., double plunger pump, employed in 'stopped-in-loop flow analysis' (SIL-FA) [24] and in 'all injection analysis' (AIA) [25]; solenoid pump [19]; piston pump [26]. In principle, these pumps provide consistent flow rates; they are suitable for heavy duty tasks, such as continuous monitoring in environmental or industrial process analysis. Although peristaltic pump has some drawbacks, it is still effective in the implementation of many flow-based techniques, including sequential injection analysis [27–29], all injection analysis [30], and stepwise injection analysis (SWIA) [31,32]. In this work, we employed the principle of peristaltic pump, by which the flow of liquid inside the flexible pump tube results from the alternate motion of 'press' and 'release' of rollers on the pump tube. If this motion is stopped, the flow ceases. We utilized this nature of the peristaltic pump in CIA both to flow and to retain liquid instead of using syringe pump coupled with selection valve or solenoid valves.

**Table 4**  
Results obtained from speciation studies of Fe(II) and Fe(III) in four spiked solutions.

Spiked solution	Added (mg L <sup>-1</sup> Fe)			Determined value (mg L <sup>-1</sup> Fe)			%Recovery		
	Fe(II)	Fe(III)	Total Fe	Fe(II)	Fe(III)	Total Fe	Fe(II)	Fe(III)	Total Fe
A	3.00	12.0	15.0	2.81 ± 0.06	12.8 ± 0.21	15.6 ± 0.24	93.7	107	104
B	5.00	10.0	15.0	5.48 ± 0.11	9.05 ± 0.19	14.5 ± 0.22	110	90.5	96.9
C	7.00	8.00	15.0	7.32 ± 0.15	8.70 ± 0.19	16.0 ± 0.29	104	109	106
D	9.00	6.00	15.0	8.54 ± 0.17	6.65 ± 0.13	15.2 ± 0.21	94.9	111	101

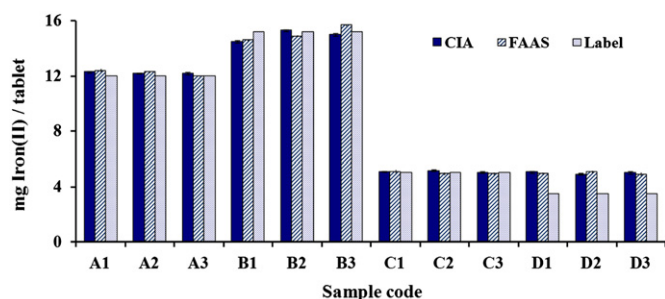


Fig. 4. Total iron content of four brands of multivitamin tablets (A–D) determined in triplicate by using the CIA system and by FAAS.

#### 4. Conclusions

Most of the later flow analysis techniques, including CIA, exploit some of the concepts of FIA. However there is a major difference between CIA and SIA. In SIA, the sample and reagent zones are aspirated sequentially into the analytical flow path, with the need for selection valve and high precision pump, such as syringe pump. The mixing is usually enhanced by introducing flow reversal a few times in the holding coil before delivering the zones to detector. However, in CIA, we aspirate sample and reagent at the same time into the platform through the *x*- and *y*-channels using multi-channel peristaltic pump. We utilize the constant pressure maintained during the stopped-flow mode of peristaltic pump to retain the liquid inside the tubing, eliminating interference into the carrier stream. CIA requires only a multi-channel peristaltic pump for liquid delivery and for maintaining the system pressure. Thus, the number of hardware components in CIA is less than in the multicommutation technique.

The introduction of liquids into the analytical flow path of CIA is also different to that of the SIA and the multicommutation. When we simultaneously aspirate the sample and reagents through the *y*-channels (no. 1 to 4), we also aspirate at the same time the carrier flow through the *x*-channel (the analytical flow path). Some of the sample and reagents are partially dispensed at the *y*-outlets of the platform. This cross-flow results in prior mixing inside the platform, leading to a significant improvement in the sensitivity. Therefore flow-reversal as in SIA is not needed. Moreover when comparing with the multicommutation and multipumping techniques, we do not need to alternately aspirate sample and reagent slugs to form a tandem zone. The software command lines for CIA are therefore shorter and simpler. In CIA, we can modify the flow path simply by changing the tubing and the cross platform. In long-term use, CIA requires less maintenance costs than SIA, multicommutation and multipumping since the system consisted mainly of low-cost consumables such as pump tubes, tubings and the acrylic platform. There is only one switching valve that may needs the maintenance from time to time.

The CIA platform, with the four crossing channels, employed for determination of Fe(II), can also be applied to other analysis employing spectrophotometric measurements. The number of cross channels can be reduced or increased to suit the number

of reagents. The CIA technique is a simple system that can be employed by other researchers working in the field of flow analysis.

#### Acknowledgements

This work was supported by RSA5580021 grants from the Thailand Research Fund (DN) and The Royal Golden Jubilee Ph.D. scholarship (TM). Supports of equipment from the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education are thankfully acknowledged. The research was also co-sponsored by the Office of Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative chaired by Prof. Manat Pohmakotr. The authors would like to thank Prof. Dr. Gary Christian for his useful comments during the development of the CIA technique.

#### References

- [1] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145–147.
- [2] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 390–393.
- [3] P.C.A.G. Pinto, M. Lúcia, M.F.S. Saraiva, J.L.F.C. Lima, *Anal. Lett.* 44 (2011) 374–397.
- [4] W.R. Melchert, B.F. Reis, F.R.P. Rocha, *Anal. Chim. Acta* 714 (2012) 8–19.
- [5] F.R. Mansour, N.D. Danielson, *Trends Anal. Chem.* 40 (2012) 1–14.
- [6] H. Bergamini, E.A.G. Zagatto, F.J. Krug, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta* 101 (1978) 17–23.
- [7] Z. Xie, J. Zhao, *Talanta* 63 (2004) 339–343.
- [8] J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329–343.
- [9] J. Ruzicka, *Analyst* 125 (2000) 1053–1060.
- [10] M. Miró, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 750 (2012) 3–15.
- [11] M.D. Luque de Castro, J. Ruiz-Jiménez, J.A. Pérez-Serradilla, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 118–126.
- [12] J. Wang, E.H. Hansen, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 225–231.
- [13] K. Grudpan, *Talanta* 64 (2004) 1084–1090.
- [14] J. Jakmunee, L. Patimapornlert, S. Suteerapataranon, N. Lenghor, K. Grudpan, *Talanta* 65 (2005) 789–793.
- [15] R. Burakham, S. Lapanantnoppakhun, J. Jakmunee, K. Grudpan, *Talanta* 68 (2005) 416–421.
- [16] V. Cerdà, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, *Talanta* 50 (1999) 695–705.
- [17] M. Miró, V. Cerdà, J.M. Estela, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 199–210.
- [18] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 129–138.
- [19] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002) 125–132.
- [20] N. Teshima, D. Noguchi, Y. Joichi, N. Lenghor, N. Ohno, T. Sakai, S. Motomizu, *Anal. Sci.* 26 (2010) 143–144.
- [21] F.R.P. Rocha, P.B. Martelli, B.F. Reis, *Talanta* 55 (2001) 861–869.
- [22] F. Mas, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdà, *Analyst* 123 (1998) 1541–1546.
- [23] J. Mortatti, F.J. Krug, L.C.R. Pessenda, E.A.G. Zagatto, *Analyst* 107 (1982) 659–663.
- [24] N. Teshima, S. Ohno, T. Sakai, *Anal. Sci.* 23 (2007) 1–2.
- [25] H. Itabashi, H. Kawamoto, T. Kawashima, *Anal. Sci.* 17 (2001) 229–231.
- [26] P.S. Francis, S.W. Lewis, K.F. Lim, K. Carlsson, B. Karlberg, *Talanta* 58 (2002) 1029–1042.
- [27] A. Ivaska, J. Ruzicka, *Analyst* 118 (1993) 885–889.
- [28] M.A. Segundo, A.O.S.S. Rangel, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 131–138.
- [29] A. Economou, M. Nika, *J. Autom. Methods Manage. Chem.* 2006 (2006) 1–9.
- [30] N. Amornthammarong, P. Anujaravat, K. Sereenonchai, P. Chaisuan, P. Sastranurak, P. Wilairat, D. Nacapricha, *Talanta* 68 (2005) 480–487.
- [31] A.V. Mozzhukhin, A.L. Moskvina, L.N. Moskvina, *J. Anal. Chem.* 62 (2007) 475–478.
- [32] A.V. Bulatov, A.V. Petrova, A.B. Vishnikin, A.L. Moskvina, L.N. Moskvina, *Talanta* 96 (2012) 62–67.





# Sequential injection system for simultaneous determination of sucrose and phosphate in cola drinks using paired emitter-detector diode sensor



Phoonthawee Saetear<sup>a,b</sup>, Kittiwut Khamtau<sup>a,b</sup>, Nuanlaor Ratanawimarnwong<sup>a,c</sup>,  
Kamonthip Sereenonchai<sup>a,d</sup>, Duangjai Nacapricha<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs), Thailand

<sup>b</sup> Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23 Road, Bangkok 10110, Thailand

<sup>d</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Paholyothin Road, Pathumthani 10120, Thailand

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 8 February 2013

Received in revised form

18 May 2013

Accepted 21 May 2013

Available online 28 May 2013

### Keywords:

Paired emitter-detector diode (PEDD)

Schlieren effect

Turbidimetry

Cola drinks

Sucrose

Phosphate

## ABSTRACT

This work presents the simultaneous determination of sucrose and phosphate by using sequential injection (SI) system with a low cost paired emitter-detector diode (PEDD) light sensor. The PEDD uses two 890 nm LEDs. Measurement of sucrose in Brix unit was carried out based on the detection of light refraction occurring at the liquid interface (the schlieren effect) between the sucrose solution and water. Phosphate was measured from the formation of calcium phosphate with turbidimetric detection. With careful design of the loading sequence and volume (sample-precipitating reagent-sample), simultaneous detection of sucrose and phosphate was accomplished with the single PEDD detector. At the optimized condition, linear calibrations from 1 to 7 Brix sucrose and from 50 to 200 mg  $\text{PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$  were obtained. Good precision at lower than 2% RSD ( $n=10$ ) for both analytes with satisfactory throughput of 21 injections  $\text{h}^{-1}$  was achieved. The method was successfully applied for the determination of sucrose and phosphate in cola drinks. The proposed method is readily applicable for automation and is found to be an alternative method to conventional procedures for on-line quality control process in cola drink industry.

Crown Copyright © 2013 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Light emitting diodes (LEDs) are commonly used as a light source for portable spectrometers due to the low power consumption and brightness [1]. Their emission spectra are rather narrow (about  $\pm 40$  nm), allowing specific selection of wavelengths without an expensive monochromator or filter. However, LEDs can also be used as a light detector [2,3]. Paired emitter-detector diode (PEDD) is an inexpensive optical sensor that consists of a pair of LEDs where one LED is used as a light emitter (LED emitter) and the other LED as a light detector (LED detector). Use of PEDD as detector of light is attractive in terms of costs, size and broad range of wavelengths from UV to near-infrared region (ca. 380–900 nm). Unfortunately, LED as detector generates very small photocurrent. Diamond's group [4–6] demonstrated the accurate and precise measurement of the photocurrent using a threshold detector and

timer circuit. The principle is based on measurement of the time taken for the photon-induced current to discharge the reverse-biased LED from an initial 5 V to 1.7 V. Later, another approach was proposed by using direct measurement of the voltage generated at the LED detector [7,8]. This method is very simple and convenient employing a common pH-meter or a digital multimeter with high input impedance.

The use of PEDD for absorbance measurement has been reported as early as 2004 when Diamond et al. employed the device as optical sensor for colorimetric analysis of dyes for pH measurement [4]. Since then, application of PEDD detector has been broaden to environmental field such as detection of heavy metals [9] and phosphate [10] in water samples as well as to bioanalytical field, such as detection of hemoglobin [11] and alkaline phosphatase activity [12–14]. PEDD has also been adopted as a detector in post column HPLC [15] and IC [16,17]. Recently, PEDD compatible with optosensing films has been developed for sequential injection (SI) system [18,19]. Prussian Blue film was used as a model optical chemoreceptor to detect hydrogen peroxide [18]. Determination of glucose in serum was demonstrated for this application [19]. With different configurations, the PEDD can also be used for fluorescence detection. The first report

\* Corresponding author at: Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand. Tel./fax: +66 2 2015127.

E-mail addresses: [duangjai.nac@mahidol.ac.th](mailto:duangjai.nac@mahidol.ac.th),  
[dnacapricha@gmail.com](mailto:dnacapricha@gmail.com) (D. Nacapricha).

of LED as fluorescence detector was in 2010 for the determination of quinine in beverage drinks [20]. Another application of fluorometric PEDD was the detection of calcium using complexation reaction with calcein [21,22].

The phenomena of light refraction and light scattering are alternative detection methods useful in analytical practice, especially with colored sample. This is because they can employ wavelengths at which that the colored solution does not absorb the light. Detection of light refraction at the liquid interface (the schlieren effect) was employed as detection in liquid chromatography using deflection of a laser beam [23] and in capillary electrophoresis [24]. In addition, the schlieren effect was also applied to flow analysis for quantitation of sucrose [25,26], alcohol [27] and glycol [28]. Another approach for analysis of colored sample is detection based on light scattering of colloidal particles (turbidimetry) [29] has been widely used through the formation of solid particles using suitable precipitating reagents. With coupling to flow-based system, it provides automation for several applications such as in environmental [30], biological [31] and food [32] samples.

In this work, implementation of PEDD for detection of the schlieren effect and the turbidity in liquid-flow system is presented. We selected sucrose and phosphate as model analytes to demonstrate this application for possible quality control in cola drink industry. The work used a sequential injection (SI) system [33]. With optimized selection of the loading sequence, simultaneous detection of the two analyte is carried out with one PEDD detector. The system is thus simple and compact.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

All solutions were prepared in deionized water (Barnstead EASYpure II, USA). The sucrose standard used in this work was

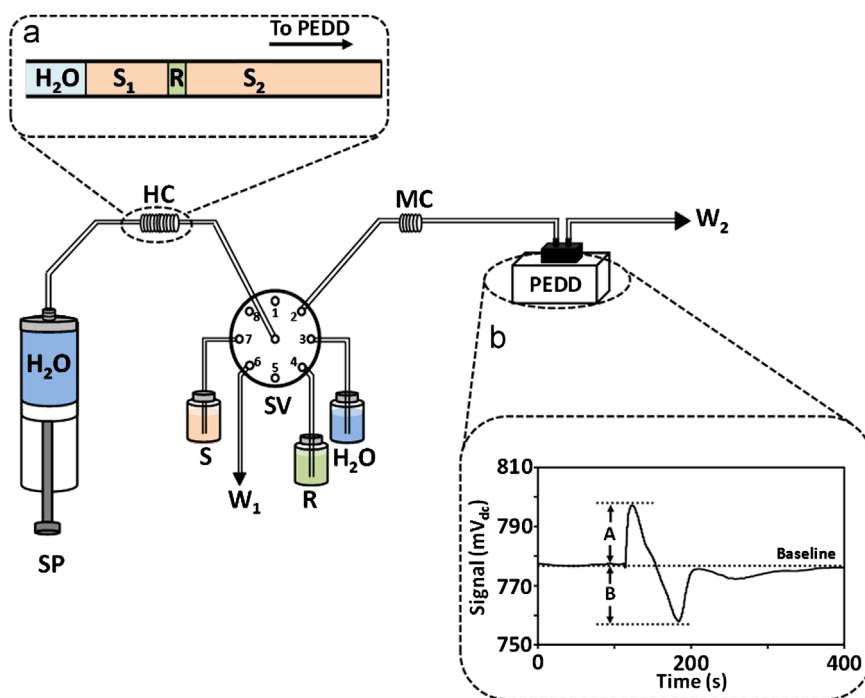
commercial grade sugar (Mitr Phol, Thailand). A 50 Brix (Bx) stock sucrose solution was prepared by dissolving exactly 50.00 g of solid sucrose in 50.00 g of deionized water with stirring on a magnetic stirrer until the solid has completely dissolved. The stock solution was stored at 4 °C and used within one week.

A 5000 mg  $\text{PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$  stock phosphate solution was prepared by dissolving 0.7157 g of potassium dihydrogenphosphate (Fluka, Switzerland), previously dried at 60 °C for 2 h and kept in a desiccator, in 100.00 mL with deionized water. Working standard solutions used for calibration were mixed standards of sucrose and phosphate, prepared in deionized water by appropriate dilution of the stock solutions.

The precipitating reagent (R in Fig. 1) was a solution of 0.08 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  in 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA). This solution was prepared by weighing 0.888 g of calcium chloride (Merck, USA) and 0.10 g of PVA (Merck, USA), dissolving in approximately 90 mL of 0.3 mol  $\text{L}^{-1}$  ammonium buffer pH 10 and heating on a hot plate with magnetic stirring until all solids dissolved. After cooling to room temperature, ammonium buffer was added to make 100.0 mL. The buffer was prepared by dissolving 0.1338 g of ammonium chloride (Ajax Finechem, New Zealand) and 0.9 mL of 30% (w/w) ammonia (density 0.892 g  $\text{L}^{-1}$ , Panreac, Spain) in deionized water to give 100 mL.

### 2.2. Sample preparation

Regular and sugar-free cola drink samples were purchased from supermarkets in Bangkok, Thailand. All samples were degassed in an ultrasonic bath for 15 min. Dilutions of samples with water (1:1) were carried out prior to analysis. Five synthetic samples were also analyzed. These samples were prepared by dissolving analytical grade sucrose (UNIVAR, Australia) and potassium dihydrogenphosphate (Fluka, Switzerland) in deionized water (Table 2).



**Fig. 1.** Schematic diagram of the SI-PEDD system for simultaneous determination of sucrose and phosphate in cola drinks: S<sub>1</sub>, 1st aspirated sample zone; R, precipitating reagent 0.08 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  with 0.1% (w/v) PVA in ammonium buffer pH 10; S<sub>2</sub>, 2nd aspirated sample zone; W, waste; SP, syringe pump; SV, selection valve; HC, 4.6-mL holding coil (i.d. 1 mm, 588 cm long); MC, mixing coil (i.d. 1 mm, 144 cm long); inset (a), sequence of the detection zone in HC; inset (b), signal profile of a mixed standard of sucrose and phosphate.

**Table 1**

The steps in the SI-PEDD operation for simultaneous determination of sucrose and phosphate in cola drinks.

Step	Mode of syringe pump	Volume (mL)	Flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	Port no.	Action	Duration (s)
1	Aspirate	4.00	4.0	3	Aspiration of water carrier	60
2	Aspirate	0.50	4.0	7	Aspiration of 1st sample zone (S <sub>1</sub> )	7.5
3	Aspirate	0.10	4.0	4	Aspiration of precipitating reagent (R)	1.5
4	Aspirate	1.75	4.0	7	Aspiration of 2nd sample zone (S <sub>2</sub> )	26
5	Dispense	6.35	5.0	2	Dispense of all zones to detector and waste (W <sub>2</sub> )	76

Total analysis time is 171 s.

**Table 2**

Comparison of accuracy obtained from analysis of synthetic samples by using the developed and conventional methods. The numbers in parenthesis are %RSD for six replicate injections.

Nominal values of synthetic sample	Sugar (Brix)		Phosphate (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup> )	
	Our method	Refractometric method <sup>a</sup>	Our method	Spectrophotometric method <sup>b</sup>
5 Brix+200 mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup>	5.16 ± 0.14 (2.7)	5.16 ± 0.05 (1.0)	197.7 ± 3.0 (1.5)	202.7 ± 2.1 (1.0)
7 Brix+200 mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup>	6.42 ± 0.12 (1.9)	6.47 ± 0.07 (1.1)	200.0 ± 2.5 (1.3)	199.0 ± 2.1 (1.1)
10 Brix+300 mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup>	9.79 ± 0.14 (1.4)	9.94 ± 0.10 (1.0)	300.7 ± 2.5 (0.8)	296.3 ± 2.6 (0.9)
10 Brix+300 mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup>	10.44 ± 0.22 (2.1)	10.27 ± 0.10 (1.0)	299.9 ± 3.9 (1.3)	303.9 ± 3.0 (1.0)
12 Brix+300 mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup>	11.95 ± 0.24 (2.0)	12.31 ± 0.14 (1.1)	300.7 ± 3.3 (1.1)	306.4 ± 4.3 (1.4)

<sup>a</sup> Refractometer 30PX/GS. Mettler Toledo, USA.<sup>b</sup> See Ref. [35].

### 2.3. The SI-PEDD system and its operation

#### 2.3.1. The SI-PEDD system

The SI system, shown in Fig. 1, consisted of a syringe pump (SP) equipped with an eight-port selection valve (SV) (Kloehn Versa Pump 6, USA). A 10-mL zero dead volume syringe (Kloehn, USA) was fitted to the pump. PTFE tubings with 1.0 mm i.d. (Cole Parmer, USA) were used as holding coil (HC) and mixing coil (MC). The syringe pump and selection valve were computer controlled by means of an in-house software written using LabVIEW 8.0™. The simple paired emitter-detector diode (PEDD) was made of two gallium–aluminium arsenide NIR-LEDs (890 nm, Model OP291, OPTTEK Technology Inc., USA). A dc power supply (Model PS-1502DD, BEST, China) was used to supply the 5 V to the LED emitter. A 100 Ω resistor was used as a current-limiting load to the LED emitter. A 6-digit digital multimeter with 10<sup>12</sup> Ω impedance (Model 8845A, Fluke, USA) was used to measure voltage signal from the LED detector. Data was recorded and stored on a computer via RS-232 port with in-house software written using LabVIEW 8.0™. A 10-mm path length, 18-μL volume, quartz flow-through cell (PerkinElmer, USA) was placed in a cuvette holder between the two LEDs.

#### 2.3.2. System operation

A water carrier plug (4.0 mL) was introduced into the holding coil (HC in Fig. 1) followed by plugs of sample and reagent (1st aspirated sample zone (S<sub>1</sub>), reagent (R) and 2nd aspirated sample zone (S<sub>2</sub>)). These detection zones are finally driven forward to the PEDD detector to give a sequence of signal peaks. Details of the operation steps are given in Table 1.

### 2.4. Data analysis

For a PEDD, the LED detector generates a voltage, which is linearly proportional to the logarithm of the intensity of light illuminating on the LED. When there is alteration in light intensity due to light refraction or light scattering, such as in this work, the monitored voltage is changed accordingly. Thus a plot between the

voltage measured versus time is obtained, as the sample zone passes through the flow-through cell. Example of signal profile is shown in Fig. 1b.

The baseline signal is obtained when water carrier flows passing through the PEDD. The signal for sucrose is the difference of the voltage between the apex of peak and baseline ('A' in Fig. 1b). The signal for phosphate is the difference of the voltage between the baseline and the minimum of the second peak ('B' in Fig. 1b). Two calibration curves were constructed by plotting the values of A and B against the analyte concentrations.

For validation of the method, the results were compared to measurements obtained from refractometric method for sucrose [34] and spectrophotometric method based on molybdenum blue reaction [35] for phosphate, respectively.

## 3. Results and discussion

### 3.1. System design and its signal profile

A simple SI system, shown in Fig. 1, was employed to study the use of the PEDD detector for simultaneous detection of the schlieren and turbid effect within one cycle of operation. The system starts by aspirating the detection zone, with the precipitating reagent (R in Fig. 1a) inserted in the middle of the mixed standard solution containing sucrose and phosphate (S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> in Fig. 1a), into the HC, followed by dispensing to the PEDD detector. As the laminar flow is driven towards the PEDD detector, this right hand end of S<sub>2</sub> (Fig. 1a) becomes the leading parabolic interface between sample and water, which is responsible for the schlieren signal. Positive signal profile in Fig. 1b demonstrates this phenomenon. After the zone head has moved through the PEDD, the middle zone containing suspension of the calcium phosphate precipitate enters the flow cell. These calcium phosphate particles scatter light, giving rise to a decrease in the signal. If there is appreciable inhomogeneity within the zone, small negative signal is observed when the zone tail travels through the light path. Normally this negative signal is only observed at sucrose concentration greater than

5 Brix. The complete signal profile obtained for one sample is shown in Fig. 1b.

The observed schlieren effect has been explained in great details [26]. To summarize, the interface of the carrier and sugar solution forms a lens. In this case, where  $n_{\text{sample}} > n_{\text{carrier}}$  ( $n$ =refractive index), we may expect a significant population of light rays to bend towards the LED light sensor. As a result, the absorbance decreases. Thus, the signal voltage from the LED light sensor increases with decreasing absorbance. So the signal profile increases with the passage of the sugar zone (the signal change 'A' in Fig. 1b), which is the inverse of the regular signal profile using photodiode as light sensor with log amplifier (see Ref. [26] for example). For the turbidity profile, suspending particle causes light scattering away from the LED light sensor. Therefore there is an increase in absorbance which for our LED light sensor means a decrease in the signal profile (the signal change 'B' in Fig. 1b).

### 3.1.1. Interference between sucrose and phosphate measurements

In this study, the concentrations of phosphate were varied up to  $200 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$  whereas the concentration of sucrose was fixed at 7 Brix. We found no effect of phosphate concentration on the sucrose measurement. Thus the refractive index (RI) of standard/sample depends mainly on the concentration of sucrose with no contribution from the concentration of phosphate.

On the other hand, sucrose had a significant negative effect on the phosphate measurement at aspirated volumes of  $S_1$ :R: $S_2$  of 0.5:0.1:0.5 mL (see data in Fig. 2 for  $S_2=0.5 \text{ mL}$ ). This might be from inhomogeneity in the calcium phosphate zone due to the viscosity of sucrose (7 Brix). Normally, increasing the mixing coil length of the SI system improves mixing. But for our system which requires efficient mixing only in the mid-zone, but not at the leading zone, this is not a suitable choice. Therefore, enhancement of the mid-zone dispersion was investigated by increasing the aspirated volume of the second sample segment,  $S_2$ . In this way, mixing of the reagent and sample zones is promoted by increasing the longitudinal dispersion along the tube. The results are shown in Fig. 2. The signal height for phosphate in pure water increased with increasing volume of  $S_2$  from 0.5 to 0.75 mL indicating more precipitation had occurred. With larger volume dilution effect dominated and signal decreased drastically. For phosphate dissolved with sucrose, the same trend was found but with smaller signals for segment volume of  $S_2$  between 0.5 and 1.5 mL. However equal signals for solution using pure water and sucrose solution were found for volume of 1.75 mL and larger. Therefore, in order to eliminate the interference effect of sucrose, the volume of segment  $S_2$  of 1.75 mL was selected.

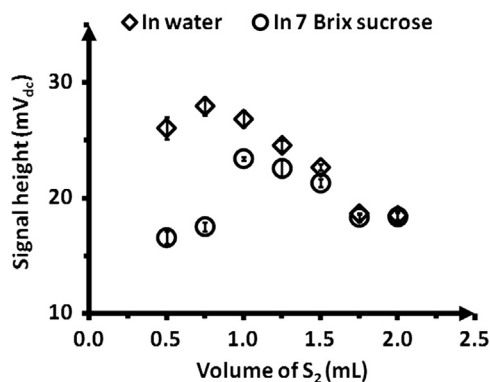


Fig. 2. Effect of volume of  $S_2$  on signal height of  $200 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$  in water (◇) and in 7 Brix sucrose (○). Each point is the result from triplicate injections for volumes of  $S_1$ :R fixed at 0.5:0.1 mL.

### 3.1.2. Light source and sensor for PEDD detector

Cola drink has a dark brown color and the wavelength of the detector must be carefully chosen to ensure that only the schlieren and turbidity effects are observed. The visible absorption spectrum of these drinks were measured and found to have absorbance only in the wavelength range of 350–700 nm. Therefore, NIR LED emitter with wavelength of 890 nm was selected as the light source. The same LED was employed as detector for maximum response. A stable output voltage at 0.8 V was found for water. Signal changes in the range of  $\pm 0.05 \text{ V}$  were observed for samples containing sucrose and phosphate.

Flow cell with small volume ( $18 \mu\text{L}$ ) was used for our experiment since it provided sharper schlieren signal than the normal  $80 \mu\text{L}$ -flow cell. The larger i.d. of the  $80 \mu\text{L}$ -flow cell produces greater dispersion of the sample zone, which is not suitable for measurement based on the schlieren effect.

## 3.2. Optimization

### 3.2.1. Flow rate

Flow rate is an important parameter which affects the sensitivity and sample throughput. The flow rate in the final step for driving all the liquid zones to the PEDD detector was varied from 1 to  $10 \text{ mL min}^{-1}$ . It was observed that at lower flow rate higher sensitivity was achieved for both phosphate and sucrose measurements. A flow rate at  $5 \text{ mL min}^{-1}$  was chosen as compromise between sensitivity and throughput.

### 3.2.2. Parameters for calcium phosphate precipitation process

The effect of various concentrations of  $\text{CaCl}_2$  was studied using concentration range from 0.04 to  $0.12 \text{ mol L}^{-1}$ . Results are shown in Fig. 3a. The signal B (Fig. 1b) increased with increasing concentration of  $\text{CaCl}_2$ , reaching a plateau value for concentrations greater than  $0.06 \text{ mol L}^{-1}$ . The concentration of  $0.08 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$  was chosen to ensure excess  $\text{Ca}^{2+}$  ion for production of the  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  precipitate.

Buffer concentrations ranging from 0.2 to  $6.5 \text{ mol L}^{-1}$  were investigated. The results in Fig. 3b showed that buffer concentration of  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  gave the highest sensitivity. At buffer concentration lower than  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$ , the buffer capacity was not sufficient to neutralize the acid in the sample. High concentration of buffer has large ionic strength, resulting in less precipitation [36]. In this work  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  buffer was chosen. The pH of buffer solution was also investigated (Fig. 3c). The sensitivity significantly increased to pH 10 and then decreased. Therefore a pH 10 buffer was selected for maximum sensitivity.

Generally, turbidity measurement requires addition of a stabilizer to control uniformity of the particle size for reproducibility. In this work, PVA was used and the effect of PVA concentration in the range of 0.02–0.30% (w/v) was studied. The results in Fig. 3d showed that 0.10% (w/v) PVA provided the highest sensitivity which decreased significantly when concentration of PVA was more than 0.1% (w/v) because increasing concentration of PVA can cause decreased number of nucleation sites of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , and hence lower number of scattering particles [37]. Hence the concentration of PVA of 0.1% (w/v) was selected as optimum condition.

The volume of the calcium chloride solution (R) was also investigated in the range of 50–200  $\mu\text{L}$ . It was found that sensitivity increased, with increasing volume, to maximum value at 100  $\mu\text{L}$ . Therefore, the volume of 100  $\mu\text{L}$  was selected because it offered highest sensitivity with least reagent.



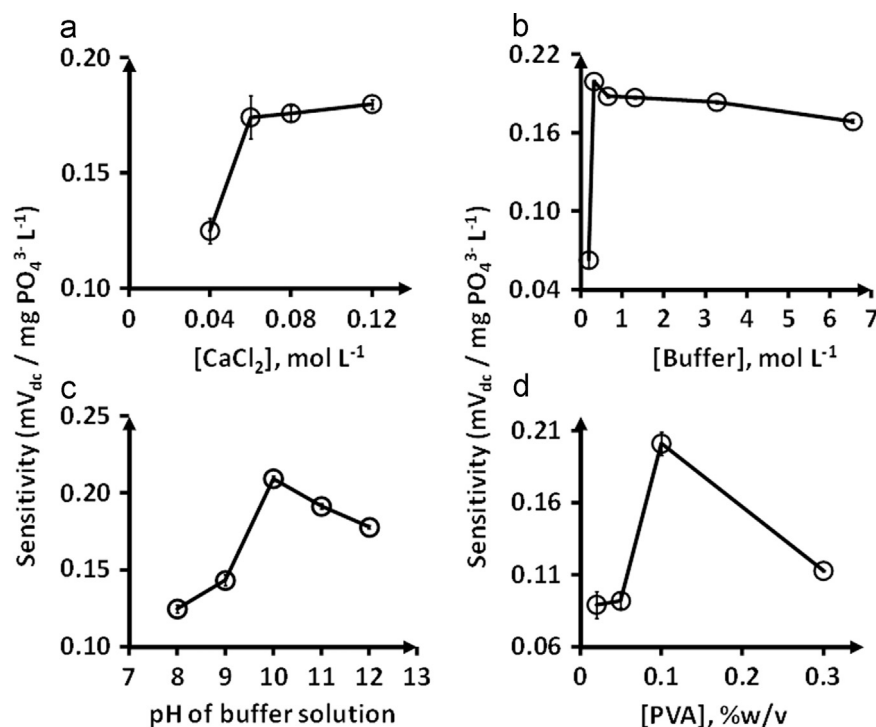


Fig. 3. Effect of the precipitating reagent on the sensitivity of phosphate analysis. Triplicate injections for each point in the graph.

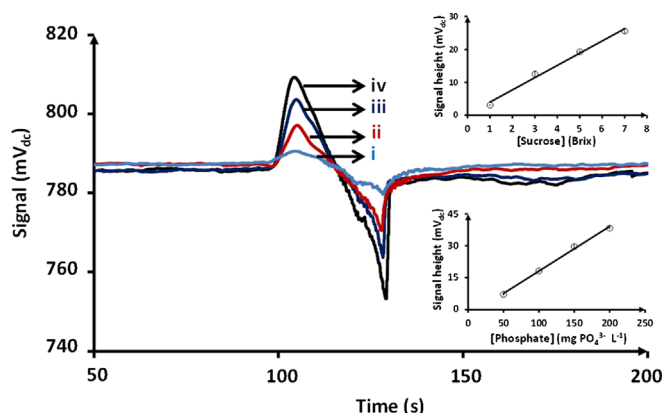


Fig. 4. Example of signal profiles obtained from mixed standards of sucrose and phosphate at (i) 1 Brix+50  $\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$  (ii) 3 Brix+100  $\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$  (iii) 5 Brix+150  $\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$  (iv) 7 Brix+200  $\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$ , using the developed system, and calibration plots for sucrose and phosphate. Each point in the calibrations was from triplicate injections.

### 3.3. Analytical features and application to cola drink samples

Using the optimum condition, representative SI-signal profiles and calibration plots are shown in Fig. 4. Calibration curve is linear in the range of 1–7 Brix sucrose ((signal height,  $\text{mV}_{\text{dc}}$ ) =  $(3.14 \pm 0.03)[\text{Brix}] + (0.14 \pm 0.13)$ ,  $r^2 = 0.999$ ) and of 50–200  $\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$  ((signal height,  $\text{mV}_{\text{dc}}$ ) =  $((1.85 \pm 0.04) \times 10^{-1})[\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}] - (1.96 \pm 0.51)$ ,  $r^2 = 0.999$ ). Detection limits (3S/N) at 0.5 Brix sucrose and 20  $\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$  were obtained. Ten replicate injections of the mixed standard of 5 Brix sucrose and 150  $\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$  were carried out to provide system precision of 0.9% and 1.7% (RSD), respectively. Reasonable throughput of 21 injections  $\text{h}^{-1}$  was achieved.

Five synthetic samples were prepared and analyzed by our method and reference methods (Table 2). Analysis of sucrose and phosphate was compared with refractometric method and the

conventional molybdenum blue method, respectively. The results show that the precision of our methods are comparable with the reference methods. The developed SI-PEDD system was subsequently applied to regular and sugar-free cola drinks (Table 3). According to the paired *t*-test, the results in Table 3 show significant agreement between the proposed method and the conventional methods for all the samples (sugar:  $t_{\text{observed}} = 1.285$ ,  $t_{\text{critical}} = 2.306$  at  $P = 0.05$ ; phosphate:  $t_{\text{observed}} = 0.005$ ,  $t_{\text{critical}} = 2.178$  at  $P = 0.05$ ) [38].

## 4. Conclusions

In this work, the PEDD sensor was employed as a single flow-based detector for measuring the schlieren effect and turbidity of sample in a SI system for automation of liquid handling. It was shown that the SI-PEDD flow system had sufficient sensitivity to detect light refraction at interface of sucrose and water or so-called the schlieren effect, as well as the light scattering of the colloidal particles of calcium phosphate, when the output of the LED detector was monitored by a high-impedance digital multimeter.

Simultaneous analysis of sucrose and phosphate in cola drinks was selected to demonstrate this application. With two fold sample dilution, the measurements were carried out using NIR-PEDD (890 nm) sensor without sample pretreatment to remove the color. At the optimum condition, the observed signal comprised one positive peak for sucrose and a second negative peak for phosphate. These two signals are well separated. Thus the contents of sucrose and phosphate were successfully determined with no interference. The developed SI-PEDD flow system has advantages in terms of simplicity, robustness and costs. Moreover, the system is environmentally friendly since only small amounts of non-toxic  $\text{CaCl}_2$  in ammonium buffer solution were used. The SI-PEDD system was successfully applied to the measurement of sucrose and phosphate in commercial cola drinks and is also suitable for on-line quality control processing plants.

**Table 3**

Analysis of cola drinks by SI-PEDD system as compared with conventional methods. The numbers in parenthesis are %RSD for six replicate injections.

Sample	Sugar (Brix)		Phosphate (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> L <sup>-1</sup> )	
	Our method	Refractometric method <sup>a</sup>	Our method	Spectrophotometric method <sup>b</sup>
Cola 1	9.55 ± 0.11 (1.2)	9.75 ± 0.05 (0.5)	341.5 ± 6.1 (1.8)	342.4 ± 3.6 (1.1)
Cola 2	9.09 ± 0.09 (1.0)	9.14 ± 0.06 (0.7)	338.2 ± 1.7 (0.5)	347.6 ± 5.6 (1.6)
Cola 3	9.96 ± 0.13 (1.3)	9.82 ± 0.10 (1.0)	340.5 ± 7.0 (2.1)	330.0 ± 3.1 (0.9)
Cola 4	9.73 ± 0.14 (1.4)	9.84 ± 0.10 (1.0)	377.7 ± 1.8 (0.5)	375.8 ± 4.4 (1.2)
Sugar-free cola 1	nd	nd	348.0 ± 5.3 (1.5)	351.7 ± 1.4 (0.4)
Sugar-free cola 2	nd	nd	343.3 ± 9.3 (2.7)	332.7 ± 5.3 (1.6)
Sugar-free cola 3	nd	nd	356.0 ± 6.1 (1.7)	347.4 ± 6.0 (1.7)
Sugar-free cola 4	nd	nd	342.5 ± 7.3 (2.1)	351.3 ± 3.6 (1.0)

nd: not detected.

<sup>a</sup> Refractometer 30PX/GS. Mettler Toledo, USA.

<sup>b</sup> See Ref. [35].

## Acknowledgements

This work was supported by Grants from the Thailand Research Fund, RSA5580021 (DN) and MRG5480201 (KS). This work was also supported by the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education, and by the Office of Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative chaired by Prof. Manat Pohmakotr. The authors are grateful to the scholarship from the Development and Promotion of the gifted in Science and Technology Project (DPST) given to PS. Finally, the authors would like to thank Assoc. Prof. Prapin Wilairat for his useful comments and editing.

## References

- [1] P.K. Dasgupta, I.Y. Eom, K.J. Morris, J. Li, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 337–364.
- [2] R.H. Lindsay, B.E. Paton, *Am. J. Phys* 44 (1976) 188–189.
- [3] F.M. Mims III, *Appl. Opt.* 31 (1992) 6965–6967.
- [4] K.T. Lau, S. Baldwin, R.L. Shepherd, P.H. Dietz, W.S. Yezunis, D. Diamond, *Talanta* 63 (2004) 167–173.
- [5] M. O'Toole, K.T. Lau, D. Diamond, *Talanta* 66 (2005) 1340–1344.
- [6] K.T. Lau, S. Baldwin, M. O'Toole, R. Shepherd, W.J. Yezunis, S. Izuo, S. Ueyama, D. Diamond, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 111–116.
- [7] L. Tymecki, M. Pokrzywnicka, R. Koncki, *Analyst* 133 (2008) 1501–1504.
- [8] L. Tymecki, R. Koncki, *Anal. Chim. Acta* 639 (2009) 73–77.
- [9] K.T. Lau, E. McHugh, S. Baldwin, D. Diamond, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 221–226.
- [10] M. O'Toole, K.T. Lau, R. Shepherd, C. Slater, D. Diamond, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 290–294.
- [11] E. Mieczkowska, R. Koncki, L. Tymecki, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3293–3297.
- [12] L. Tymecki, L. Brodacka, B. Rozum, R. Koncki, *Analyst* 134 (2009) 1333–1337.
- [13] L. Tymecki, K. Strzelek, R. Koncki, *Talanta* 79 (2009) 205–210.
- [14] K. Strzelek, R. Koncki, L. Tymecki, *Talanta* 96 (2012) 127–131.
- [15] M. O'Toole, K.T. Lau, B. Shazmann, R. Shepherd, P.N. Nesterenko, B. Paull, D. Diamond, *Analyst* 131 (2006) 938–943.
- [16] L. Barron, P.N. Nesterenko, D. Diamond, M. O'Toole, K.T. Lau, B. Paull, *Anal. Chim. Acta* 577 (2006) 32–37.
- [17] M.O' Toole, L. Barron, R. Shepherd, B. Paull, P. Nesterenko, D. Diamond, *Analyst* 134 (2009) 124–130.
- [18] M. Pokrzywnicka, D.J. Cocovi-Solberg, M. Miró, V. Cerdà, R. Koncki, L. Tymecki, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 1381–1387.
- [19] D.J. Cocovi-Solberg, M. Miró, V. Cerdà, M. Pokrzywnicka, L. Tymecki, R. Koncki, *Talanta* 96 (2012) 113–120.
- [20] M. Pokrzywnicka, R. Koncki, L. Tymecki, *Talanta* 82 (2010) 422–425.
- [21] L. Tymecki, M. Pokrzywnicka, R. Koncki, *Analyst* 136 (2011) 73–76.
- [22] M. Pokrzywnicka, M. Fiedoruk, R. Koncki, *Talanta* 93 (2012) 106–110.
- [23] J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 58 (1986) 3207–3215.
- [24] J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2796–2801.
- [25] S. Teerasong, S. Chan-Eam, K. Sereenonchai, N. Amornthammarong, N. Ratanawimarnwong, D. Nacapricha, *Anal. Chim. Acta* 668 (2010) 47–53.
- [26] T. Mantim, P. Saetear, S. Teerasong, S. Chan-Eam, K. Sereenonchai, N. Amornthammarong, N. Ratanawimarnwong, P. Wilairat, W. Meesiri, K. Uraisin, D. Nacapricha, *Pure Appl. Chem.* 84 (2012) 2015–2025.
- [27] S.R.B. dos Santos, M.C.U. Araújo, R.A. Barbosa, *Analyst* 127 (2002) 324–327.
- [28] A. Wijk, B. Karlberg, *Talanta* 41 (1994) 395–400.
- [29] D.A. Skoog, D.M. West, *Principles of Instrumental Analysis*, second ed., Saunders College, West Washington Square, Philadelphia, PA, USA294–299.
- [30] R.B.R. Mesquita, S.M.V. Fernandes, A.O.S.S. Rangel, *J. Environ. Monit.* 4 (2002) 458–461.
- [31] B.M. Simonet, F. Grases, J.G. March, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 96–102.
- [32] J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, M.R.S. Souto, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 356 (1997) 259–265.
- [33] J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329–343.
- [34] M. Bhuyan, *Measurement and Control in Food Processing*, CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, USA179–182.
- [35] E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, L.S. Clesceri, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, twenty second ed., American Public Health Association, Washington, USA, 2012 4–155–156.
- [36] Y. Song, H.H. Hahn, E. Hoffmann, *Chemosphere* 48 (2002) 1029–1034.
- [37] C.O. Costa-Neto, A.V. Pereira, C. Aniceto, O. Fetibello-Filho, *Talanta* 48 (1999) 659–667.
- [38] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, fifth ed, Pearson Education Limited, Gosport, 2005.

# Analytical Methods

rsc.li/methods



ISSN 1759-9679



## PAPER

Nacapricha *et al.*

Green analytical flow method for the determination of total sulfite in wine using membraneless gas–liquid separation with contactless conductivity detection



Cite this: *Anal. Methods*, 2017, 9, 6107

# Green analytical flow method for the determination of total sulfite in wine using membraneless gas–liquid separation with contactless conductivity detection†

Nattapong Chantipmanee,<sup>ab</sup> Waleed Alahmad,<sup>ab</sup> Thitaporn Sonsa-ard,<sup>ab</sup>  
Kanchana Uraisin,<sup>ab</sup> Nuanlaor Ratanawimarnwong,<sup>ac</sup> Thitirat Mantim<sup>ac</sup>  
and Duangjai Nacapricha<sup>id</sup> \*<sup>ab</sup>

A green analytical flow method was developed for the determination of total sulfite in white wine. The method employs the membraneless vaporization (MBL-VP) technique for gas–sample separation allowing direct analysis of wine. Sulfite in an aliquot of sample was converted to SO<sub>2</sub> gas via acidification. Dissolution of the gas into the water acceptor led to a change in the conductivity of the acceptor which was monitored using a 'capacitively coupled contactless conductivity detector' (C4D) flow cell. Only a minute amount of common acid (100 µL of 1.5 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is used. The MBL-VP unit was incorporated into the flow system to separate the SO<sub>2</sub> gas from the wine sample using the headspace above the donor and acceptor compartments as a virtual membrane. The method provides a linear working range (10–200 mg L<sup>-1</sup> sulfite) which is suitable for most wines with calibration equation  $y = (0.056 \pm 0.002)x + (1.10 \pm 0.22)$  and  $r^2 = 0.998$ . Sample throughput is 26 samples h<sup>-1</sup>. The lower limit of quantitation (LLOQ = 3SD of blank per slope) is 0.3 mg L<sup>-1</sup> sulfite for 20 s diffusion time with good precision (%RSD = 0.8 for 100 mg L<sup>-1</sup> sulfite,  $n = 10$ ). We also present a simple modification of the MBL-VP unit by the addition of a third cone-shaped reservoir to provide two acceptor zones leading to improvement in sensitivity of more than three-fold without use of heating to enhance the rate of diffusion of SO<sub>2</sub>.

Received 1st August 2017  
Accepted 22nd September 2017

DOI: 10.1039/c7ay01879g

rsc.li/methods

## 1. Introduction

Sulfite is a common preservative used in wine production to stabilize the product by preventing oxidation and bacterial growth.<sup>1,2</sup> Apart from its use in wine production, sulfite is also used in other food industries to preserve food appearance, color and aroma. Although sulfite is considered not toxic to human health when employed as recommended, it has been found that there are some adverse effects for some individuals ingesting sulfite at certain levels. These effects include sudden allergic reactions with symptoms such as dermatitis, urticaria, flushing, hypotension, abdominal pain and diarrhea. Sulfite consumption by asthmatic patients can trigger bronchoconstriction.<sup>3–5</sup>

Thus, the level of sulfite in food and beverages must be strictly controlled to the levels determined by the legislation of each country<sup>6</sup> or as set by the World Health Organization (WHO).<sup>7</sup> According to the WHO, the acceptable daily intake of sulfite (expressed as SO<sub>2</sub> equivalent) is 0.7 mg kg<sup>-1</sup> body weight.

There have been various methods available for the determination of sulfite in food and beverages. The most common is the AOAC method which employs an optimized Monier-Williams method.<sup>8</sup> The method is laborious requiring an initial distillation process. After mixing the sample with hydrochloric acid, the sample mixture is refluxed to convert sulfite into SO<sub>2</sub> gas. Nitrogen gas is used to purge the generated SO<sub>2</sub> into a hydrogen peroxide solution for converting the SO<sub>2</sub> gas to sulfuric acid which is later titrated with a standardized sodium hydroxide solution. Apart from the AOAC titrimetric method with the distillation process, there are other methods that have been developed based on different principles including spectrometric methods,<sup>9,10</sup> chemiluminescent methods<sup>11,12</sup> and electrochemical methods.<sup>13,14</sup>

Automated methods for direct analysis of sulfite based on flow injection analysis (FIA) and FIA-related methods, with the use of an on-line gas-diffusion (GD) unit to separate SO<sub>2</sub> gas

<sup>a</sup>Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (Firstlabs), Thailand. E-mail: dnacapracha@gmail.com; duangjai.nac@mahidol.ac.th; Fax: +66 2 201 5127; Tel: +66 2 201 5127

<sup>b</sup>Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>c</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Bangkok 10110, Thailand

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7ay01879g

from the sample matrix, have been developed by several groups.<sup>6,11,12,15–18</sup> The SO<sub>2</sub> gas generated from the sample diffuses from the donor stream through the porous hydrophobic membrane of the GD unit to dissolve into an acceptor stream flowing on the other side of the membrane. Detection of the dissolved SO<sub>2</sub> can be carried out in various ways including absorption spectrometry,<sup>6,15,16</sup> chemiluminescent spectrometry,<sup>11,12</sup> potentiometry,<sup>17</sup> and amperometry.<sup>18</sup> Although gas diffusion through a porous membrane has made quantitative analysis of sulfite simpler and more friendly to operate than the conventional AOAC method, it is known that use of the membrane-based gas–liquid separation has drawbacks such as contamination and clogging of the membrane surface, leading to the limited lifespan and subsequent replacement of the membrane. To overcome this problem we employed the so-called ‘membraneless vaporization’ (MBL-VP) technique to provide a more effective method for direct determination of total sulfite in wine.

The membraneless vaporization technique was first presented in 2006 (ref. 19) as an on-line technique for gas–sample separation in flow analysis. A MBL-VP unit comprises two separate reservoirs for the donor and acceptor liquids. The two regions are connected *via* an air headspace, which acts as a pseudo-membrane, allowing only volatile analytes to diffuse from the liquid donor phase to the acceptor phase. Donor and acceptor reservoirs have been designed and constructed in various configurations to fit the types of samples, such as liquid<sup>19–24</sup> or solid samples.<sup>25,26</sup> Most MBL-VP devices have been employed in continuous flow methods, such as FIA<sup>19–21,25,26</sup> or multisyringe flow injection analysis (MS-FIA).<sup>24</sup> For discontinuous flow or zone-fluidics (ZF) mode of operation,<sup>27</sup> Ratanawimarnwong *et al.*<sup>22</sup> in 2013 presented a new design of a MBL-VP unit for sequential injection analysis (SIA). The device consisted of two cone-shaped reservoirs for holding donor and acceptor aliquots under a common headspace. Aeration at the donor reservoir was employed to accelerate the gas diffusion process.<sup>22</sup> Unlike the first design in 2006 of the membraneless extraction module,<sup>28</sup> MBL-VP units were designed for complete automation and are therefore suitable as on-line gas-separation devices for flow analysis systems. Donor and acceptor liquids are transported to and out from MBL-VP units *via* flow control.

In this work, we utilized the MBL-VP technique using the cone-shaped design for quantitative analysis of total sulfite in wine. The wine sample was acidified in-line. A 200 µL aliquot of the acidified sample was delivered into a cone reservoir (donor cone). Diffusion of SO<sub>2</sub> gas from the donor cone into the MBL-VP headspace and subsequent dissolution of the gas into the pure water acceptor resting in two other reservoirs (acceptor cones) led to a change in the pH of the water. This was monitored as a change in the conductivity of the acceptor liquids using a ‘capacitively coupled contactless conductivity’ detector (C4D detector).<sup>29–32</sup> To the best of our knowledge, this is the first time that sulfite has been determined using the concept of online MBL-VP for gas–liquid separation. C4D is also new for detection of sulfite in wine. Our method is considered as ‘Green Analytical Chemistry’ (GAC)<sup>33</sup> since the liquid acceptor is chemical reagent-free. Pure water was shown to be a suitable

liquid acceptor. The only required chemical is for converting sulfite to SO<sub>2</sub> gas. Dilute sulfuric acid is used in only a small volume. This method generates no waste from employment of membranes. We also investigated an added feature of the cone-shaped reservoirs of the MBL-VP unit. A second cone-shaped acceptor reservoir was added to the original two-cone device,<sup>22</sup> thereby increasing the surface area of the acceptor zone with subsequent improvement in sensitivity and precision.

## 2. Experimental

### 2.1 Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were analytical reagent grade and solutions were prepared in deionized Milli-Q® water (resistivity 18.2 MΩ cm<sup>−1</sup>). Stock standard sulfite solution was prepared by dissolving Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Merck Millipore, Germany) in 100.0 mL of 0.1% (w/v) Na<sub>2</sub>EDTA (Fisher Scientific, UK) to give *ca.* 10 000 mg L<sup>−1</sup> sulfite stock solution. The accurate concentration of this stock solution was determined by titration with standardized iodine solution.

The working sulfite standards were freshly prepared from the 10 000 mg L<sup>−1</sup> sulfite stock solution by aliquoting appropriate volumes to give a series of sulfite standards (10 to 200 mg L<sup>−1</sup>). To each aliquot, 1.00 mL of 5% (w/v) Na<sub>2</sub>EDTA (Fisher Scientific, UK), 5.00 mL of 4 mol L<sup>−1</sup> NaOH (Merck Millipore, Germany), and 7.50 mL of 99.5% (v/v) ethanol (Merck Millipore, Germany) were added. Deionized water was added to each standard mixture to make a final volume of 50.0 mL.

### 2.2 Preparation of wine samples

Six wine samples were purchased from local supermarkets in Bangkok. A 100.0 mL sample of each wine sample was diluted with 150.0 mL of water. An aliquot of 38.75 mL of the diluted sample was accurately transferred into a glass bottle. To this sample 1.00 mL of 5% (w/v) Na<sub>2</sub>EDTA (Fisher Scientific, UK), 5.00 mL of 4 mol L<sup>−1</sup> NaOH (Merck Millipore, Germany), 5.00 mL of 99.5% (v/v) ethanol (Merck Millipore, Germany) and 0.25 mL of water were added. The sample mixture was mixed thoroughly before analysis for sulfite content using the developed method and a comparison method employing a membrane gas-diffusion system.<sup>16</sup>

For the recovery study, a sample was prepared according to the above procedure with addition of 0.25 mL of 5000 mg L<sup>−1</sup> sulfite standard instead of 0.25 mL of water.

### 2.3 Membraneless vaporization unit with 3 cone-shaped reservoirs

The MBL-VP unit with the 3 cone-shaped reservoirs is shown in Fig. 1a. The unit is made of transparent acrylic polymer (Perspex®) and comprises a base section and an adjustable screw-top upper section. The current unit has 3 reservoirs instead of 2 reservoirs as in the original design (Fig. 1b).<sup>22</sup> Reservoir D is used for holding a plug of the donor (standard or sample). Reservoirs A1 and A2 are used for holding two separate plugs of the acceptor (deionized water). The volume of each cone reservoir is 260 µL. Therefore the maximum volume

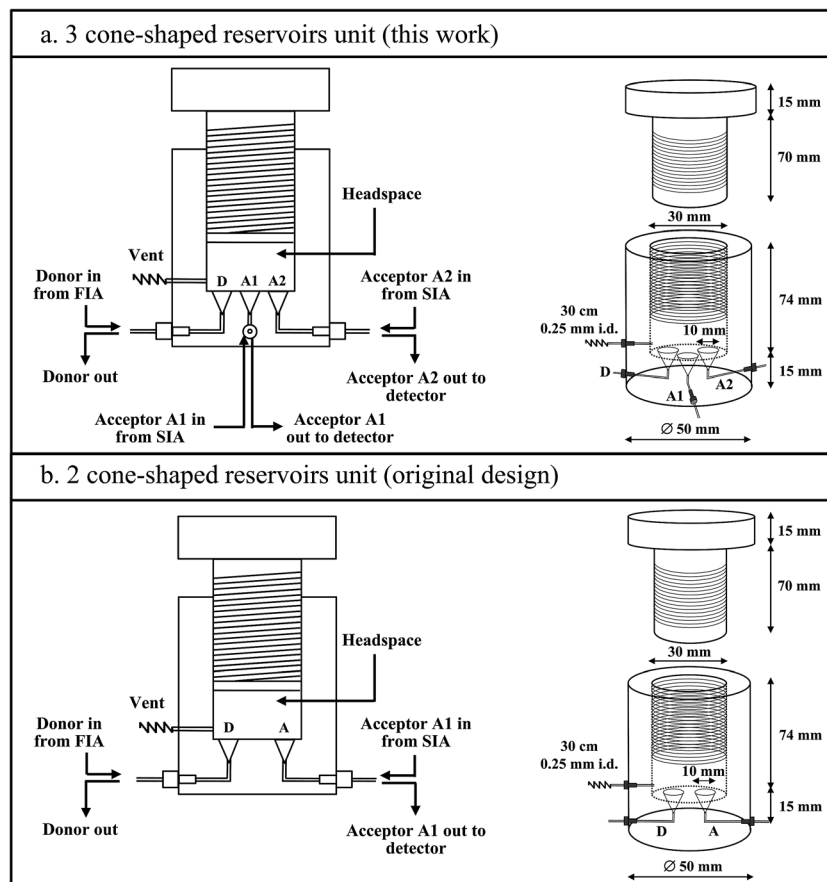


Fig. 1 Schematic diagrams (2-dimension and 3-dimension) of the new membraneless vaporization unit (a) with 3 cone-shaped reservoirs for improving the sensitivity as compared with the original unit (b) with 2 cone-shaped reservoirs. D: donor reservoir. A1, A2: acceptor reservoirs.

delivered into the cone reservoir is 200  $\mu\text{L}$  to avoid overflow and subsequent cross-contamination. The volume of the headspace above the reservoirs can be varied from 2.82 to 10.60 mL by adjusting the number of turns of the screw-top lid. Similar to the previous design, a vent tubing (0.25 mm i.d., 30 cm long) was also fitted to the new unit (Fig. 1a and b) to prevent excessive build-up of pressure within the headspace.

## 2.4 The flow system and its operation

The schematic diagram of the entire MBL-VP flow system is shown in Fig. 2. The system is divided into two sections: the 'FIA section' (left frame, Fig. 2) and the 'SIA section' (right frame, Fig. 2). The MBL-VP unit connects the two sections. PTFE tubing (1.0 mm i.d., VICI, Switzerland) is employed in all the flow lines. The FIA section is used for the preparation of the donor solution and its transportation into and out of reservoir D of the MBL-VP unit. The SIA section is used to control the flow of the plugs of the two acceptor zones into and out of the reservoirs A1 and A2.

In the FIA section, peristaltic pump PP1 (Ismatec/ISM827, Switzerland) is used to acidify the standard/sample stream by merging with a flow of sulfuric acid ( $1.5 \text{ mol L}^{-1}$ ) to convert sulfite ion into  $\text{SO}_2$  gas. In one analysis cycle, the system is operated using the steps shown in Table 1S.<sup>†</sup> In step 8 (Table

1S<sup>†</sup>), the acidified sample flowing through the 200  $\mu\text{L}$  sample loop installed at the 6-port injection valve IV (Upchurch Scientific, USA) is delivered, *via* the selection valve SV (Upchurch Scientific, USA), into the donor reservoir D by the air carrier line of the peristaltic pump PP1.

In the SIA section, a commercial SIA system (FIALab 3500, USA) with one syringe pump SP and a selection valve SLV1 was employed for the control of zone fluidics. The SIA section is used to meter and transport two water zones (100  $\mu\text{L}$  each) into the acceptor reservoirs A1 and A2 in step 4 and step 8 (Table 1S<sup>†</sup>) for trapping the  $\text{SO}_2$  gas diffusing from the donor reservoir.

The detection system of the acceptor plugs is a C4D unit.<sup>29–31</sup> The C4D flow cell is a PEEK tubing (1 mm i.d., 1.6 mm o.d.) with a total length of about 15 cm. Silver conductive ink (SPI Supplies, USA) was painted on the exterior of the tube to form two separate conducting bands. The two cylindrical silver bands (electrodes) are  $0.2 \pm 0.05 \text{ mm}$  apart.<sup>26</sup> An AC potential ( $20 V_{\text{pp}}$ , 20 kHz) is fed into one electrode from a function generator (GW Instek, SFG-2104, Taiwan). The AC current flowing between the two electrodes is monitored at the second electrode. The current is amplified and rectified by a custom built electronics unit (Bangkok High Lab Co., Ltd, Thailand). The final output DC voltage, proportional to the AC current, is recorded by a signal recorder (e-corder 210, eDAQ, Australia).

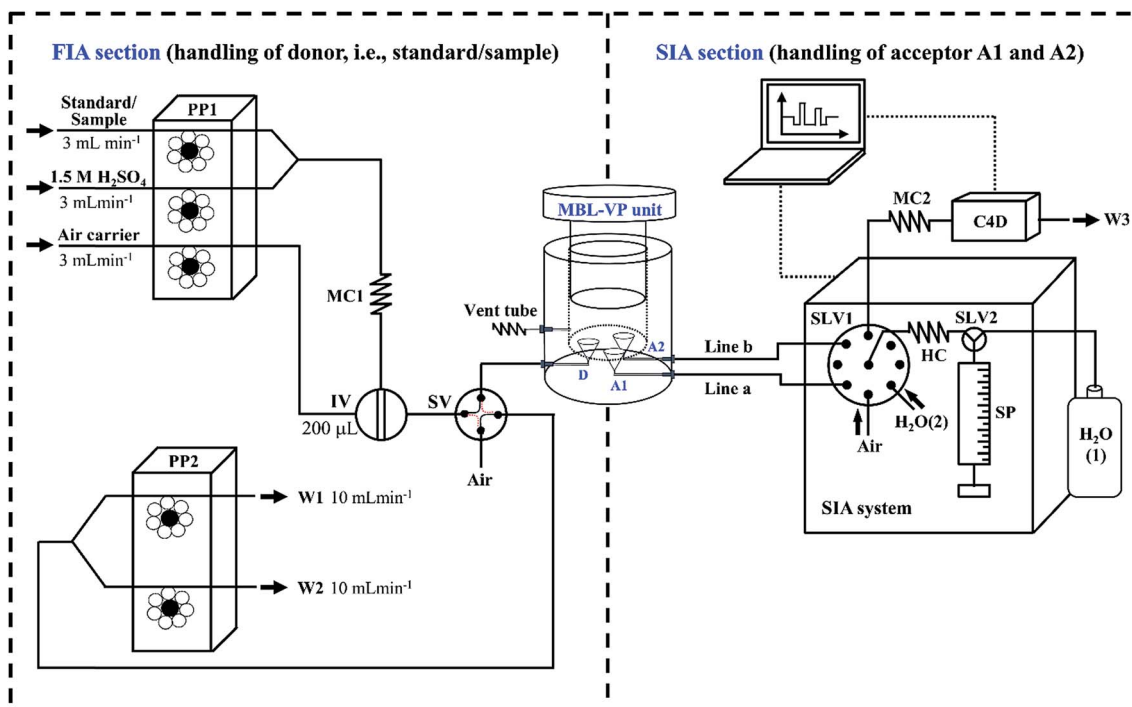


Fig. 2 The flow system with the new MBL-VP unit (3 cone-shaped reservoirs) for determination of sulfite in wine. PP1, PP2: peristaltic pumps, IV: injection valve, SV: switching valve, D: donor reservoir, A1, A2: acceptor reservoirs, SP: syringe pump, SLV1, SLV2: selection valves, W1, W2, W3: wastes, HC: holding coil (200 cm, 1 mm i.d.), MC1, MC2: mixing coils (100 cm, 1 mm i.d., 50 cm 1 mm i.d.), C4D: capacitively coupled contactless conductivity detector.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Design of liquid handling and zone stack, signal profile and calibration

The design of the flow system is shown in Fig. 2. The flow system consists of both FIA and SIA sections. The FIA section is used for the handling of sample, generation of  $\text{SO}_2$  gas and the delivery of the donor plug into the MBL-VP unit. The SIA section is employed to control the flow of the acceptor plugs (Fig. 2) into and out of the MBL-VP unit with liquid segments sequentially moved *via* use of the selection valve SLV1 and syringe pump SP. After holding the acceptor plug (water) in cone A1 for 10 s, this acceptor zone is first withdrawn from the MBL-VP unit to rest in the holding coil HC (step 10 in Table 1S<sup>†</sup>), while the acceptor plug (water) in cone A2 is still in the reservoir of the MBL-VP unit for further trapping of the  $\text{SO}_2$  gas. The A2 aliquot is held inside the MBL-VP unit for a total of 20 s before withdrawing to rest inside the holding coil together with the zone from reservoir A1 (step 11 in Table 1S<sup>†</sup>). Fig. 3a shows the stack of zones of acceptors A1 and A2 with the three air plugs as they reside in the SIA holding coil HC. On pushing the zone stack from the holding coil into the PEEK tubing of the C4D detector, a sequence of two signals (with sulfite as the donor solution) from the acceptor plug A2 and the acceptor plug A1 is observed, as seen in Fig. 3b. Similar profiles for varying concentrations of sulfite standards are shown in Fig. 1S (in the ESI<sup>†</sup>). The sum of the peak heights ( $H_{A1} + H_{A2}$  in Fig. 3b) was used for constructing the calibration graph. It was found that the calibration was

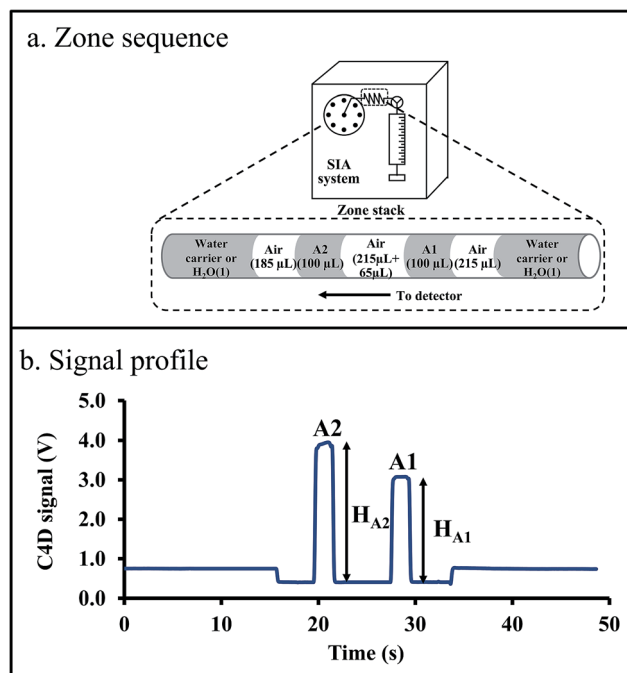


Fig. 3 (a) Zone sequence in holding coil HC of the SIA section and (b) example of a signal profile obtained from one cycle corresponding to the zone sequence, with signals of A1 and A2 and signal heights  $H_{A1} + H_{A2}$ , respectively.



satisfactorily linear over the range 10 to 200 mg L<sup>-1</sup> of sulfite [e.g.,  $y = (0.056 \pm 0.002)x + (1.10 \pm 0.22)$ ;  $r^2 = 0.998$ ].

### 3.2 Effect of the surface area and volume of the acceptor on sensitivity

Increasing the surface area of the acceptor for the same volume should enhance the sensitivity of analysis. In this work this is accomplished by employing two acceptor cones as depicted in Fig. 1a. The flow system in Fig. 2 was used to compare the performance between the new unit (Fig. 1a) and the previous design (Fig. 1b). The volume of the donor was 200 µL, the same as for the single-acceptor cone of the previous design<sup>22</sup> (Fig. 4(i)). The acceptor volume was 200 µL in the single-acceptor unit (Fig. 4(i)). However for the two-acceptor cones of the current design, the acceptor volume was divided into two 100 µL portions (Fig. 4(ii)). The operation steps for analysis are as shown in Table 1S,<sup>†</sup> but with modified operation of the SIA section suitable for the single-acceptor cone (data not shown). The total diffusion times employed for the units in Fig. 4(i) and (ii) were the same at 20 s, respectively.

When using the acceptor volume of 200 µL, the available surface area of this acceptor was 0.656 cm<sup>2</sup> (Fig. 4(i)). As shown in Fig. 4(ii), the surface area for the same volume of acceptor was increased to 0.828 cm<sup>2</sup>, when this volume is divided into two portions in cone A1 and A2 for the current MBL-VP unit (Fig. 1a). By increasing this surface area, it was found that the sensitivity (slope in Fig. 4a) was significantly improved by

3.8 times when using the two-acceptor cone design (Fig. 4(ii)), as compared to the single-acceptor cone design (Fig. 4(i)). With this increase in the sensitivity, the precision was also improved. For example, we observed that the precision (%RSD) for 50 mg L<sup>-1</sup> sulfite was improved from 4.78% to 0.57%. We therefore selected to use the modified unit with two-acceptor cones (as shown in Fig. 1a) for further development. Even though the single-acceptor cone design can be modified to have a shallower reservoir with a larger surface area of acceptor, its construction is not easy. Use of such a trough design will lead to difficulties in loading and draining of the acceptor liquid at microliter volumes.

Increasing the surface area of the acceptor liquid in the cone by increasing the volume of the liquid may appear to increase the sensitivity of analysis. However this enhancement can be offset by the dilution factor. As shown in Table 1, we observed that when the surface area of the acceptor was increased from 0.828 cm<sup>2</sup> to 1.312 cm<sup>2</sup> (condition 1 vs. condition 3) by increasing the volume of the acceptor liquid in each acceptor cone from 100 µL to 200 µL (see Table 1), the sensitivity decreased by a factor of 1.9. Thus, 'condition 1' in Table 1 (inset, Fig. 4(ii)) giving the best sensitivity was therefore employed in this work.

### 3.3 Effect of the surface area of the donor on sensitivity

It is expected that the surface area of the donor will also have an effect on the sensitivity of the analysis. Two donor volumes, 100

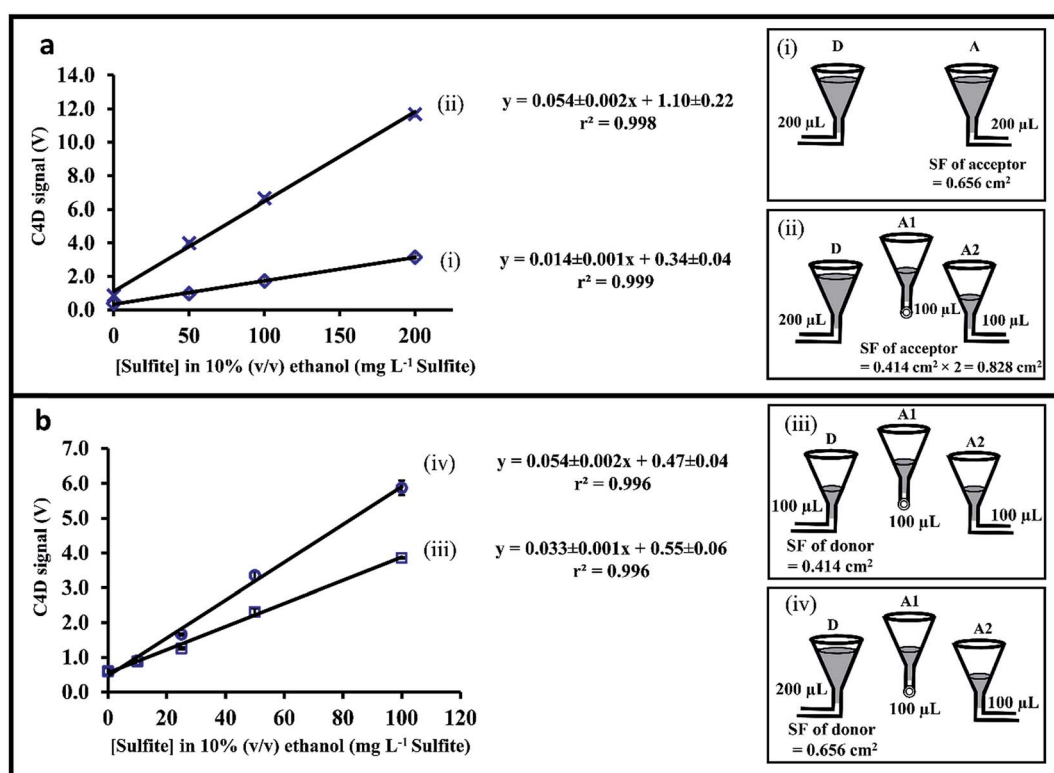
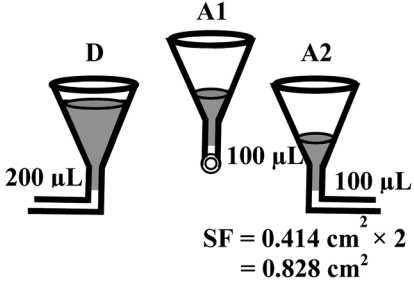
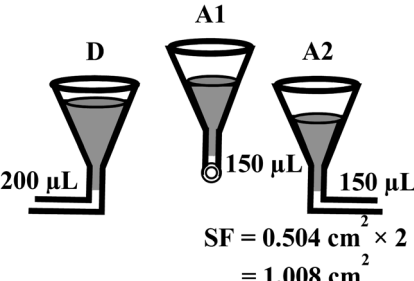
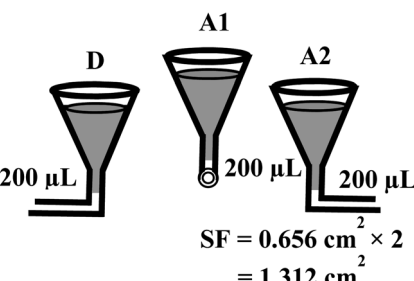


Fig. 4 (a) Effect of the surface area of the liquid acceptor on sensitivity and (b) effect of the surface area and volume of the liquid donor on sensitivity. SF: surface area. Note: the calibrations (ii) and (iv) were obtained using the same conditions but on two different days.



**Table 1** Decrease of the sensitivity enhancement with increased surface area by dilution factor

Condition	Variation in the surface area and volume of the acceptor	Calibration equation	Coefficient of determination, $r^2$
1	 <p>SF = <math>0.414 \text{ cm}^2 \times 2</math> = <math>0.828 \text{ cm}^2</math></p>	$y = (0.056 \pm 0.002)x + (1.10 \pm 0.22)$	0.998
2	 <p>SF = <math>0.504 \text{ cm}^2 \times 2</math> = <math>1.008 \text{ cm}^2</math></p>	$y = (0.041 \pm 0.001)x + (0.89 \pm 0.14)$	0.999
3	 <p>SF = <math>0.656 \text{ cm}^2 \times 2</math> = <math>1.312 \text{ cm}^2</math></p>	$y = (0.028 \pm 0.001)x + (0.57 \pm 0.13)$	0.997

$\mu\text{L}$  and  $200 \mu\text{L}$ , were selected with surface areas of  $0.414 \text{ cm}^2$  and  $0.656 \text{ cm}^2$ , respectively (Fig. 4b). The volume of the acceptor phase was fixed at  $100 \mu\text{L}$  for each acceptor cone (see Fig. 4(iii) and (iv)). The data in Fig. 4b show that the larger the donor surface area, together with the concomitant increase in volume, the higher is the sensitivity. For all work, the volume of the donor liquid in reservoir D ( $260 \mu\text{L}$  capacity) is set at  $200 \mu\text{L}$ .

### 3.4 Optimization

**3.4.1 Diffusion time and aeration.** For our membraneless systems, diffusion time is one of the parameters that affect the

sensitivity.<sup>19,22</sup> The results in Table 2 show that as the total diffusion time is increased from 20 to 80 s, sensitivity improved from  $(0.056 \pm 0.001)$  to  $(0.078 \pm 0.002) \text{ V L mg}^{-1}$  respectively. However, increase in the diffusion time would lead to decrease in the sample throughput. As shown in Table 2, the sample throughput was reduced from 26 to 18 samples  $\text{h}^{-1}$ . As a compromise between sample throughput and sensitivity, condition 1 with the shortest total diffusion time of 20 s was selected.

In our previous work employing the MBL-VP unit, with 2 cone-shaped reservoirs (Fig. 1b) for the analysis of ethanol,

**Table 2** Effect of diffusion time on the sensitivity and sample throughput<sup>a</sup>

Condition	Diffusion time (s)			Linear equation	$r^2$	LOD (3SD of blank per slope)	Throughput ( $\text{h}^{-1}$ )
	A1	A2	Total				
1	10	20	20	$y = (0.056 \pm 0.001)x + (0.90 \pm 0.10)$	0.998	0.30	26
2	30	40	40	$y = (0.064 \pm 0.002)x + (0.96 \pm 0.13)$	0.999	0.28	22
3	70	80	80	$y = (0.078 \pm 0.002)x + (1.01 \pm 0.12)$	0.999	0.24	18

<sup>a</sup> The experiments were carried out using a series of sulfite standards ( $10\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$ ) prepared in 10% (v/v) ethanol.

aeration of the donor plug improved the sensitivity up to  $13 \pm 4\%$ .<sup>22</sup> In this study, experiments were carried out to determine the effect and necessity of aeration for the new unit with 3 cone reservoirs. This MBL-VP unit has two acceptor reservoirs. When the two acceptor reservoirs contain the same liquid volume, there is twice the surface area to trap the gas. Thus it was anticipated that aeration may not be necessary. This hypothesis was tested for repetitive injections of a sulfite standard at  $100 \text{ mg L}^{-1}$  using the flow system in Fig. 2 equipped with either the current MBL-VP design or the original design (Fig. 1). For the aeration, a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$  air was used for 20 s.

The data in Fig. 5 show that aeration of the donor plug improved the sensitivity for both designs of the MBL-VP unit. The percentage improvement is almost the same: 35% increase for the 2 cones unit and 37% increase for the modified 3 cones unit. However it is observed that aeration leads to poorer precision of measurements. For the 3-cones unit with aeration, %RSD increased from 0.83% to 2.2%. Taking both factors into consideration, it was decided not to employ aeration, since the increase in efficiency of the new unit was already sufficient.

**3.4.2 Acid concentration.** Sulfur dioxide gas is produced from sulfite by acidifying the wine sample. This process is carried out by the FIA section of the flow system (left frame of Fig. 2). Sulfuric acid was selected as it has a lower vapor pressure than hydrochloric acid<sup>34</sup> in order to reduce the baseline signal due to diffusion of the acid from the donor cone to the acceptor cones. Sufficient acid is required to convert all the sulfite to sulfur dioxide (maximum concentration of sulfite in this work is  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) and also to neutralize the sodium hydroxide added to the sample ( $0.4 \text{ mol L}^{-1}$ ). Fig. 6a shows the plot of the C4D signal for a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  standard sulfite sample for various concentrations of sulfuric acid in the acid flow line (Fig. 2). The presence of a sufficient amount of acid is indicated by constant signal peak heights. This is observed for acid concentration  $>0.10 \text{ mol L}^{-1}$ . In order to ensure that there is sufficient acid, sulfuric acid at  $1.5 \text{ mol L}^{-1}$  was selected as the suitable concentration for sulfur dioxide production.

**3.4.3 Effect of ethanol content.** Ethanol is the major volatile component in wine and can vary from 8 to 15% (v/v). Ethanol can be taken up by the water acceptor phase, which may affect the sensitivity of the sulfur dioxide analysis. Calibration curves were constructed for standard sulfite solutions containing ethanol from 0 to 30% (v/v). The results are shown in Fig. 6b. It is observed that the sensitivity of analysis increases with ethanol concentration, but remains constant for ethanol concentration  $>10\%$  (v/v). It is also interesting to note that the coefficient of determination ( $r^2$ ) of the calibration is closer to 1 with increase in ethanol content. Without aeration the presence of co-existing volatile compounds such as ethanol could help to improve volatilization (*via* a non-ideal effect) of the generated  $\text{SO}_2$  from the donor to the acceptor. This leads to improvement in terms of precision (data not shown) and sensitivity. With improvement in the precision, the coefficient of determination  $r^2$  also improved as we increased the concentration of ethanol in the donor. In this work the standard sulfite solutions were prepared with 15% (v/v) ethanol content.

**3.4.4 Headspace volume.** The volume of the headspace can be adjusted by varying the height of the screw-top lid of the MBL-VP unit (Fig. 1a). The volume of headspace will affect the concentration of  $\text{SO}_2$  gas during the diffusion process. To determine the optimal volume of the headspace, analysis of a standard solution of sulfite ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) was carried out for headspace volumes of 2.82 to 10.60 mL, respectively. Diffusion times for the acceptor plugs A1 and A2 were fixed at 10 s and 20 s, respectively (see Table 1S†). The flow rate for venting of the headspace was  $20 \text{ mL min}^{-1}$  for 90 s. The results are shown in Fig. 6c.

Fig. 6c shows that the C4D signal decreases with increasing volume of the headspace due to the dilution effect arising from the increased volume. The imprecision of measurements ( $n = 3$ ) also varied with the volume of the headspace. The buildup of the pressure within the headspace due to the vaporization of sulfur dioxide and ethanol is highest for 2.82 mL volume, leading to possible venting fluctuation through the vent line (%)

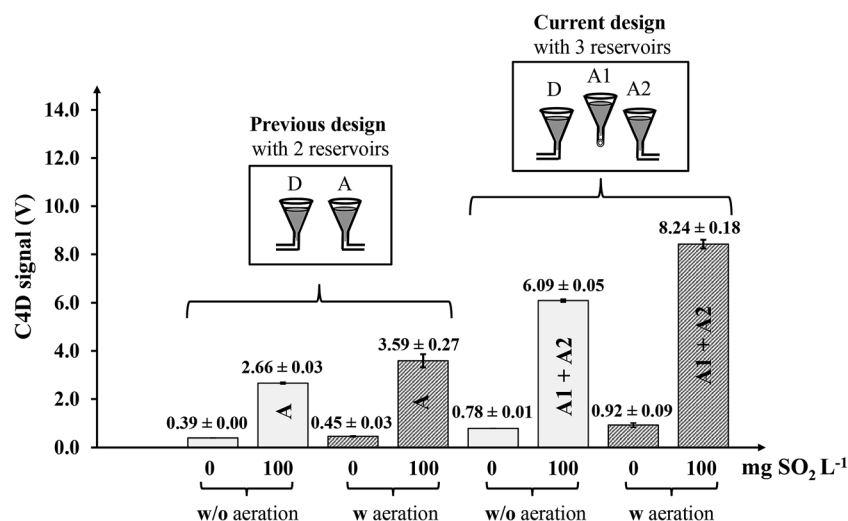


Fig. 5 Effect of aeration on signal size and precision investigated using previous<sup>22</sup> and current designs of the MBL-VP unit.

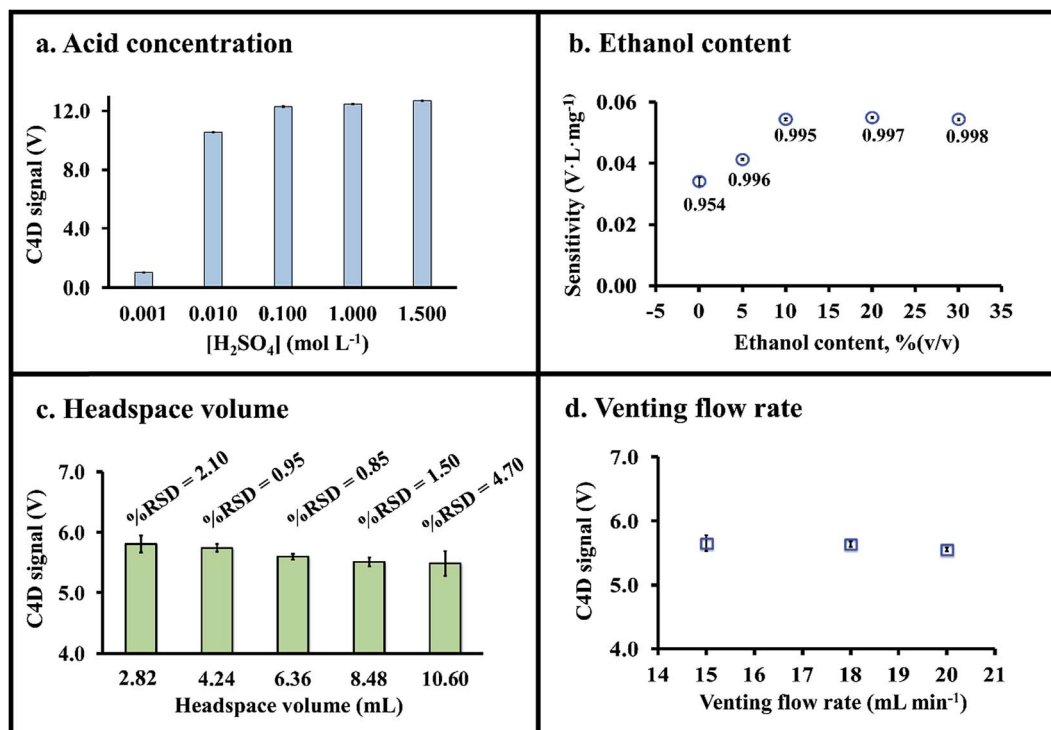


Fig. 6 Optimization using a sulfite standard at 200 mg L<sup>-1</sup> for (a) and at 100 mg L<sup>-1</sup> for (c) and (d). Note: (i) the sulfite standard employed in (a, c, and d) was prepared in 10% (v/v) ethanol. (ii) Values under the data points in (b) are the coefficients of determination (*r*<sup>2</sup>) of the calibration for sulfite standards from 10 to 200 mg L<sup>-1</sup>.

RSD = 2.10). The precision improved for headspace volumes of 4.24, 6.36 and 8.48 mL, respectively (%RSD 0.95, 0.85 and 1.5). However when the headspace volume was set to the maximum volume of 10.60 mL, %RSD increased to 4.7%. Although the headspace was flushed with up to 30 mL of air (20 mL min<sup>-1</sup> for 1.5 min), it was found that there was still some SO<sub>2</sub> residue. In this work, a headspace volume of 6.36 mL was selected as a compromise between signal size and precision.

**3.4.5 Flow rate for venting of the headspace.** In the flow system shown in Fig. 2, peristaltic pump PP2 is used to remove any residual volatile gas from the headspace. Air and residual volatile gases are flushed out to wastes W1 and W2 (Fig. 2, FIA section). The venting flow rate is the sum of the flow of the two pumping tubes. In this work three venting flow rates, 15, 18 and 20 mL min<sup>-1</sup>, were tested using the final selected headspace volume of 6.36 mL (see Section 3.4.4). The venting time was fixed at 1.5 min for all flow rates. The results in Fig. 6d for analysis of a standard solution of sulfite (100 mg L<sup>-1</sup>) clearly show that the C4D signals are not significantly different for the three flow rates, indicating that there is no carryover of SO<sub>2</sub> gas. It may also be noticed in Fig. 6d that the precision improved when increasing the venting flow rate to 20 mL min<sup>-1</sup>. This flow rate was therefore selected as the optimal condition.

### 3.5 Analytical features

Using the optimized parameters (Table 2S<sup>†</sup>), the MBL-VP flow system in Fig. 2 provides a linear working range of 10–200 mg L<sup>-1</sup> sulfite. A typical calibration line is  $y = (0.056 \pm$

$0.002)x + (1.10 \pm 0.22)$ , with  $r^2 = 0.998$ , where *y* is the C4D signal in volts. This working range is suitable for sulfite analysis of most wines and also for regulatory purposes (*e.g.* labeling is required for sulfite content >10 mg L<sup>-1</sup> (ref. 35)). Our working range is comparable with another membrane-based GD-FIA method<sup>16</sup> and with a GD-SIA method,<sup>6</sup> both employing formaldehyde and pararosaniline as reagents for spectrometric detection. Our throughput is 26 samples h<sup>-1</sup> which is also similar to the throughput of the GD-FIA method employed as our comparison method.<sup>16</sup> Our throughput is 1.6 times faster than that of the GD-SIA method.<sup>6</sup> The lower limit of quantitation (LLOQ = (3SD of blank)/slope) is 0.3 mg L<sup>-1</sup> sulfite. Our method is very precise with %RSD as low as 0.8 (for 100 mg L<sup>-1</sup>, *n* = 10). The C4D detection is reagent-free with use of only pure water as the acceptor. Generation of sulfur dioxide gas in the donor zone uses only 100 μL of 1.5 mol L<sup>-1</sup> sulfuric acid.

### 3.6 Application to wine samples

The MBL-VP flow system (Fig. 2) was applied to analyze six wine samples and the results compared with a GD-FIA method (Table 3). Applying the statistical paired *t*-test for the white wine, the calculated *t*-value (0.086) was lower than the critical *t*-value (2.57) for *P* = 0.05, indicating that there was absence of systematic differences between the results of the two methods. Measured recoveries for the white wines were between 84 and 97% (*n* = 18). All 6 white wines did not contain sulfite exceeding the permitted levels of 300 mg L<sup>-1</sup> sulfite as set by the Thai Industrial Institute.<sup>36</sup> However all samples were found to

**Table 3** Sulfite content in white wine and red wine determined by MBL-VP and GD-FIA methods

Sample	Sulfite content (mg L <sup>-1</sup> )	
	MBL-VP (this work)	GD-FIA <sup>16</sup>
White wine #1	118.0 ± 0.2	116.0 ± 1.2
White wine #2	110.0 ± 1.1	111.0 ± 1.2
White wine #3	72.2 ± 1.3	74.1 ± 1.2
White wine #4	69.6 ± 1.8	67.9 ± 0.6
White wine #5	121.0 ± 2.0	123.0 ± 1.6
White wine #6	85.5 ± 0.4	83.4 ± 1.2
Red wine #1	116.0 ± 1.9	86.7 ± 0.7
Red wine #2	116.0 ± 0.9	89.3 ± 0.5
Red wine #3	51.1 ± 0.1	24.5 ± 0.5
Red wine #4	34.8 ± 1.6	19.3 ± 0.2

contain sulfite higher than 10 mg L<sup>-1</sup>, and were properly labeled as containing sulfite in accordance with the regulation.<sup>36</sup>

We also analyzed the sulfite content of four red wines. However the results were statistically different from the results using the comparison method which employed a membrane. The data from our membraneless vaporization method were always significantly higher than those using the membrane-based gas diffusion method. Red color stains were observed on the membrane surface which may have led to clogging of membrane pores and hence underestimation of the sulfite content.

## 4. Conclusion

We have successfully developed a new flow-based method for determination of total sulfite suitable for quality control of white wine. Since its first report in 2006, this is the first application of the membraneless vaporization technique for the determination of sulfite. Dissolution of the evolved volatile SO<sub>2</sub> gas into the water acceptor leads to change in the conductivity of the acceptor which was measured using a C4D flow cell. Our method offers direct analysis of samples. This method fulfills all the four priorities of 'Green Analytical Chemistry'. The method significantly reduces use of reagents. Only pure water is used as the acceptor solvent. Only a small amount of common acid is used for on-line acidification of the sample. Membrane is no longer used and therefore there is no non-degradable waste. Our method is automated, reducing labor consumption.

It has also been demonstrated that improvement of the sensitivity of the MBL-VP flow system can be achieved by increasing the surface area of the acceptor solution but without increasing its volume. This was conveniently accomplished by introducing a second acceptor cone in the vaporization unit. In the new unit one reservoir is used for the donor plug and two reservoirs for holding two separate plugs of acceptor solution. The two acceptor plugs are measured sequentially and the sum of the two signals employed for analysis. By doing so, we could effectively improve the sensitivity of the MBL-VP flow system 3.8 fold without heating or additional aeration. The precisions (% RSD) were also significantly improved.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the financial supports from the Thailand Research Fund for the following grants: RSA5580021 (for DN) and IRN59W0007 (chaired by Prof. Skorn Mongkolsuk), TRG5880170 (for TM). Equipment was partially supported by the Office of Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative, chaired by Prof. Manat Pohmakotr and by Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education. We would like to thank scholarship from the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (for NC) and scholarship for international graduate students of the Faculty of Science, Mahidol University (for WA). The work is also partially supported by RA scholarship from the Faculty of Graduate Studies, Mahidol University (for WA). The authors would like to thank Prof. Prapin Wilairat for the editing work. We would like to thank Dr Jirayu Sitanurak, Ms Saichon Sumantakul, Ms Jutamanee Rattana and Ms Kamolchanok Kotakanok for their photography in all art production.

## References

- 1 M. Iammarino, A. R. Ientile and A. Di Taranto, *Food Addit. Contam., Part B*, 2017, **10**, 99.
- 2 Z. J. Bo, Z. Hong, W. H. Li, Z. J. Yue, L. P. Jie, Z. Lei and W. Z. Tian, *Biomed. Environ. Sci.*, 2014, **27**, 147.
- 3 A. F. Gunnison and D. W. Jacobsen, *Crit. Rev. Toxicol.*, 1987, **17**, 185.
- 4 H. Vally, N. L. Misso and V. Madan, *Clin. Exp. Allergy*, 2009, **39**, 1643.
- 5 M. R. Lester, *J. Am. Coll. Nutr.*, 1995, **14**, 229.
- 6 A. M. Segundo and A. O. S. S. Rangel, *Anal. Chim. Acta*, 2001, **427**, 279.
- 7 C. Leclercq, C. L. Donne and M. C. F. Toledo, *Safety Evaluation of Certain Food Additives*, World Health Organization, Geneva, 2009.
- 8 AOAC Official Method 990.28, Sulfites in Foods, Optimized Monier-Williams Method, AOAC Official Methods of Analysis, <http://www.aoac.org/>, accessed August 2017.
- 9 S. S. M. Hassan, M. S. A. Hamza and A. H. K. Mohamed, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **570**, 232.
- 10 P. D. Tzanavaras, E. Thiakouli and D. G. Themelis, *Talanta*, 2009, **77**, 1614.
- 11 Y. L. Huang, J. M. Kim and R. D. Schmid, *Anal. Chim. Acta*, 1992, **266**, 317.
- 12 R. L. Bonifácio and N. Coichev, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **517**, 125.
- 13 A. Isaac, C. Livingstone, A. J. Wain, R. G. Compton and J. Davis, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 589.
- 14 M. Amatongchai, W. Sroysee, S. Chairam and D. Nacapricha, *Talanta*, 2015, **133**, 134.

- 15 J. Bartroli, M. Escalada, C. J. Jorquera and J. Alonso, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 2532.
- 16 P. Linares, M. D. Luque de Castro and M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 1989, **225**, 443.
- 17 A. N. Araujo, C. M. Couto, J. L. F. C. Lima and M. C. B. S. M. Montenegro, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 168.
- 18 D. Corbo and M. Bertotti, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **374**, 416.
- 19 N. Choengchan, T. Mantim, P. Wilairat, P. K. Dasgupta, S. Motomizu and D. Nacapricha, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **579**, 33.
- 20 S. Teerasong, S. Chan-Eam, K. Sereenonchai, N. Amornthammarong, N. Ratanawimarnwong and D. Nacapricha, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **668**, 47.
- 21 T. Mantim, P. Saetear, S. Teerasong, S. Chan-Eam, K. Sereenonchai, N. Amornthammarong, N. Ratanawimarnwong, P. Wilairat, W. Meesiri, K. Uraisin and D. Nacapricha, *Pure Appl. Chem.*, 2012, **84**, 2015.
- 22 N. Ratanawimarnwong, T. Pluangklang, T. Chysiri and D. Nacapricha, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **796**, 61.
- 23 P. Mornane, J. van den Haak, T. J. Cardwell, R. W. Cattrall, P. K. Dasgupta and S. D. Kolev, *Talanta*, 2007, **72**, 741.
- 24 M. I. G. S. Almeida, J. M. Estela, M. A. Segundo and V. Cerdà, *Talanta*, 2010, **84**, 1244.
- 25 K. Sereenonchai, P. Saetear, N. Amornthammarong, K. Uraisin, P. Wilairat, S. Motomizu and D. Nacapricha, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **597**, 157.
- 26 K. Sereenonchai, S. Teerasong, S. Chan-Eam, P. Saetear, N. Choengchan, K. Uraisin, N. Amornthammarong, S. Motomizu and D. Nacapricha, *Talanta*, 2010, **81**, 1040.
- 27 G. Marshall, D. Wolcott and D. Olson, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **499**, 29.
- 28 L. M. Goncalves, M. F. Da Anunciacao, I. M. Valente, J. G. Pacheco, J. A. Rodrigues and A. A. Barros, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 2010, **75**, 721.
- 29 P. Kubáň and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2013, **34**, 55.
- 30 P. Kubáň and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2015, **36**, 195.
- 31 P. Kubáň and P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2017, **38**, 95.
- 32 A. A. Elbashir, O. J. Schmitz and H. Y. Aboul-Enein, *Biomed. Chromatogr.*, 2017, **31**, 1.
- 33 M. Tobiszewski, A. Mechlińska and J. Namieśnik, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 2869.
- 34 D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC press, New York, 82nd edn, 2001.
- 35 Scientist Live, <http://www.scientistlive.com/content/total-sulphite-wine>, accessed August 2017.
- 36 Thai wine standard, Thai Industrial Standards Institute (TISI) Bulletin, 2002, **327**, 1.