

บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 สารเคมี เครื่องมือ และ อุปกรณ์

2.1.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็น AR-grade ทั้งหมด ยกเว้นที่ระบุความบริสุทธิ์เป็นอย่างอื่น ซึ่งมีดังต่อไปนี้

- 1.1 Oleic acid : $C_{18}H_{34}O_2$, MW 282.47, ~65 % , Fluka, Switzerland
- 1.2 Linoleic acid : $C_{18}H_{32}O_2$, MW 280.45 , ~70 % , BDH, England
- 1.3 Iodine resublimed : I_2 , BDH, England
- 1.4 Bromine , Br_2 , MW 159.81, Riedel-de Haen, Germany
- 1.5 Glacial acetic acid, CH_3COOH , MW 60.05, Merck, Germany
- 1.6 Sodium thiosulphate pentahydrate, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, MW 248.18, Merck, Germany
- 1.7 Potassium dichromate, $K_2Cr_2O_7$, MW 294.2 , M&B, England
- 1.8 Potassium iodide, KI, MW 166.01, Carlo Erba, Italy
- 1.9 Chloroform, $CHCl_3$, MW 119.38, Carlo Erba, Italy
- 1.10 Soluble starch
- 1.11 Fumaric acid , $HOOC-CH=CH-COOH$, MW 116.08, Fluka , Switzerland
- 1.12 Tetramethylammonium bromide, $(CH_3)_4NBr$, MW 154.06 , BDH, England
- 1.13 Lithium Chloride Anhydrous , $LiCl$, MW 42.40, M&B, England
- 1.14 Methanol , CH_3OH
- 1.15 Sodium chloride , $NaCl$, MW 58.44, BDH, England
- 1.16 Oxygen free-nitrogen gas, N_2

2.1.2 เครื่องมือ และ อุปกรณ์

1. Spectrophotometer : Spectronic 21, Milton Roy Company, USA
2. Peristaltic pump : Ismatec, Japan
3. Flow through cell (quartz) : light path 10 mm , Hellma, Germany
4. Voltammograph : BAS CV 50 W , Bioanalytical Systems Inc. , USA
5. Injection Valve (Home made)
6. Chart Recorder : MP-1027, McKee-Pedersen Instruments, USA.

2.1.3 การเตรียมสารละลาย

1. น้ำแข็ง [21]

ละลายแข็ง 0.1 g ด้วยน้ำเล็กน้อย จากนั้นเทลงในน้ำร้อนปริมาตร 100 ml ต้มและคนตลอดเวลาจนเดือด 1 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมด้วยโปแตสเซียมไอโอไดด์ 2 ถึง 3 g เก็บใส่ภาชนะและจะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้

2. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต [4]

ละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตน้ำหนัก 24.818 g ด้วยน้ำกลั่น(ที่ต้มเดือดและทิ้งไว้ให้เย็น) ในบีกเกอร์ จากนั้นนำไปเจือจางให้ครบปริมาตร 1 ลิตรในขวดปริมาตร จะได้ความเข้มข้นโดยประมาณ 0.1 โมลาร์ (M)

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

ชั่งโปแตสเซียมไดโครเมต(ที่อบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง) น้ำหนัก 0.20 - 0.23 g (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อยเติมโปแตสเซียมไอโอไดด์ 2 g จากนั้นเติม 2 M กรดไฮโดรคลอริก 20 ml คนสารละลายจนโปแตสเซียมไดโครเมตละลายหมด จากนั้นปิดฝาภาชนะ นำเก็บในที่มืด 10 นาทีแล้วนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต จนได้สารละลายสีเหลืองอ่อนจึงเติมน้ำแข็ง 2 ml แล้วไทเทรตต่อจนสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี บันทึกปริมาตร(ml)ของ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ที่ใช้ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตคำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลาย } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (M)} = \frac{\text{น้ำหนักโปแตสเซียมไดโครเมตที่ใช้} \times 1000}{\text{ปริมาตร } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ ที่ใช้} \times 49.032}$$

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน [4]

สารละลายมาตรฐานจะได้จากการผสมของสารละลายไอโอดีนกับโบรมีนซึ่งสารละลายทั้งสองชนิดเตรียมได้ดังต่อไปนี้

สารละลายไอโอดีน ละลายไอโอดีน 13.615 g ในกรดอะซิติกกลาเซียล 825 ml ช้อนเพื่อช่วยให้ไอโอดีนละลายได้ดีขึ้น ทำให้เย็น จากนั้นปิเปตสารละลายนี้ 25 ml นำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 M โดยมีน้ำแบ่งเป็นอินดิเคเตอร์ บันทึกปริมาตรที่ใช้(ml) เป็น A

สารละลายโบรมีน ผสมโบรมีน(ของเหลว)ปริมาตร 3 ml กับกรดอะซิติกกลาเซียล 200 ml จากนั้นปิเปตสารละลายนี้ 5 ml ผสมกับสารละลาย KI เข้มข้น 15 % (w/v) 10 ml แล้วไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 M โดยใช้ น้ำแบ่งเป็นอินดิเคเตอร์ บันทึกปริมาตร(ml) ที่ใช้เป็น B

สารละลายมาตรฐานจะได้จากการผสมสารละลายไอโอดีนในข้อ 1 กับสารละลายโบรมีนในข้อ 2 ตามอัตราส่วน ดังนี้

สารละลายโบรมีนที่ต้องใช้ในการผสมกับสารละลายไอโอดีน V_1 ml คำนวณจาก

$$\text{ปริมาตรสารละลายโบรมีนที่ใช้} = \frac{V_1 \times A}{5 \times B}$$

สารละลายมาตรฐานจะได้จากการผสมสารละลายไอโอดีน V_1 ml กับสารละลายโบรมีนปริมาตรที่ได้จากการคำนวณข้างต้น เก็บสารละลายมาตรฐานไว้ในขวดสีชาและในที่มืด

4. สารละลายมาตรฐานกรดฟูมาริก 1000 µg/ml

ละลายกรดฟูมาริก 0.1000 g ในปิเกตอร์ด้วยเมธานอล จากนั้นนำไปเจือจางในขวดปริมาตรขนาด 100 ml แล้วเติมเมธานอลจนครบปริมาตร

สำหรับสารละลายมาตรฐานกรดฟูมาริก 500 และ 100 µg/ml จะได้จากการเจือจางสารละลายมาตรฐานกรดฟูมาริก 1000 µg/ml นี้ ด้วยเมธานอล

5. สารละลาย supporting electrolyte

ละลาย $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 7.7 g และ LiCl 0.210 g ด้วยน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อยจากนั้นเจือจางให้ครบปริมาตร 500 ml ในขวดปริมาตร จะได้สารละลาย supporting electrolyte ที่มีความเข้มข้นของ $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M และ LiCl 0.01 M

2.2 การหาค่าไอโอดีนโดยวิธีไทเทรต [4]

ชั่งตัวอย่างไขมัน(fat) 0.5000 g หรือ น้ำมัน (oil) 0.2500 g (อาจจะชั่งน้ำมัน 0.1000-0.2000 g สำหรับน้ำมันที่มีค่าไอโอดีนสูง ๆ) ใส่ลงในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml เติมน้ำคลอโรฟอร์ม 10 ml ปิดสารละลายฮาน์สลงไปในปริมาตร 25 ml ลงไป เขย่าสารละลายจากนั้นปิดฝาภาชนะแล้วเก็บไว้ในที่มืด 30 นาที

นำสารละลายออกมาเติมด้วยสารละลาย KI เข้มข้น 15 % (w/v) ปริมาตร 10 ml เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 100 ml แล้วไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 M จนสารละลายมีสีเหลืองอ่อนจึงเติมน้ำแป้ง ไทเทรตต่อจนสารละลายเริ่มเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี บันทึกปริมาตร(ml) สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้

ทำการไทเทรตสารละลายแบบลงค์เช่นเดียวกันกับตัวอย่างน้ำมัน

ค่าไอโอดีนคำนวณจาก

$$\text{ค่าไอโอดีน} = \frac{(B-S) \times M \times 12.69}{\text{น้ำหนักเป็นกรัมของตัวอย่าง}}$$

เมื่อ B, S คือ ปริมาตรสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ในการไทเทรตกับแบบลงค์ และ ตัวอย่าง (ml) ตามลำดับ

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเป็นโมลาร์ (M)

2.3 การศึกษาการหาค่าไอโอดีนโดยวิธี FIA

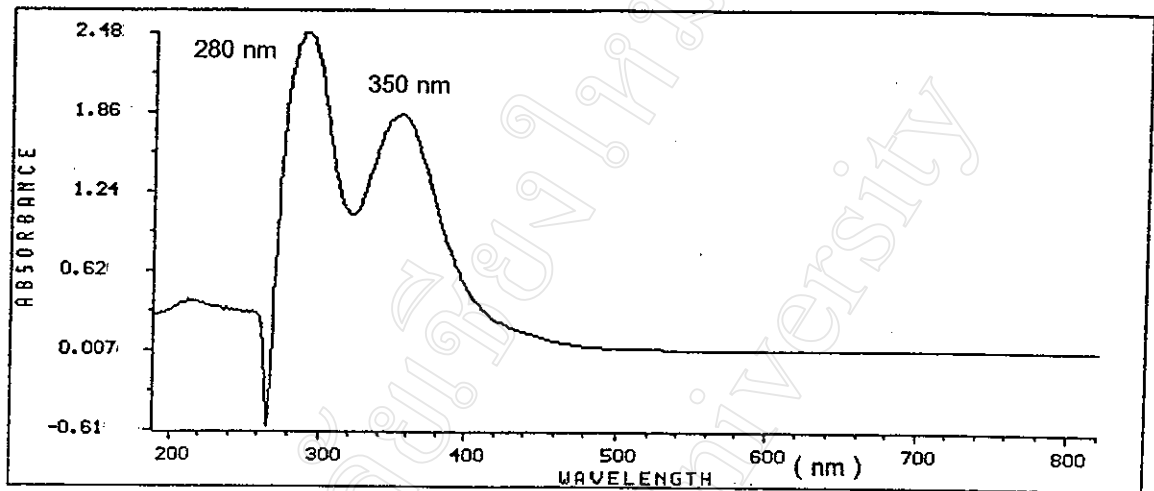
พิจารณาปฏิกิริยาการเติมฮาโลเจน (Halogenation) ในพันธะคู่ของน้ำมันโดยใช้สารละลาย
 ฮาโนส [22-24]



I_3^- ที่เกิดขึ้นในสมการ (3) จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับไอโอดีนที่เกิดขึ้นในสมการ (2) หรือ IBr ที่เหลือจากปฏิกิริยาในสมการ (1) ดังนั้นจากการหาปริมาณ I_3^- ก็จะสามารถหาปริมาณไอโอดีนที่เหลือจากปฏิกิริยา(จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง) และปริมาณไอโอดีนที่เติมจนเกินพอ(จากการวิเคราะห์แบบลงค์) ซึ่งหาปริมาณไอโอดีนที่ถูกเติมที่พันธะคู่ของตัวอย่างได้ และ คำนวณค่าไอโอดีนได้

2.3.1 การศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฮาโนส

ทำการปิเปตสารละลายฮาโนสลงในขวดสีชาที่มีคลอโรฟอร์ม 10 ml นำเก็บในที่มืด 5 นาที จากนั้นนำออกมาเติมสารละลาย KI เข้มข้น 10 % (w/v) 10 ml เขย่าให้เข้ากันเพื่อสกัดเอาไอโอดีนออกจากชั้นคลอโรฟอร์มให้มากที่สุด เติมน้ำกลั่นเพื่อเจือจางเขย่าสารละลายให้เข้ากันอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นทิ้งสารละลายให้แยกชั้น นำสารละลายชั้นน้ำไปบันทึกสเปกตรัมการดูดกลืนแสงเทียบกับสารละลายแบบลงค์ (สารละลาย KI เข้มข้น 10% (w/v) + คลอโรฟอร์ม+ กรดอะซิติก) ได้ผลการทดลองดังรูป 2.1



รูป 2.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายชั้นน้ำที่ได้จากการผสมสารละลายฮานัสกับสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์และคลอโรฟอร์ม

จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในรูป 2.1 จะได้ใช้ความยาวคลื่นที่ 350 นาโนเมตร ซึ่งเป็นของไตรไอโอไคด์ มาใช้ในการหาค่าไอโอดีนเนื่องจากที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ซึ่งมีสารหลายชนิดสามารถดูดกลืนแสงได้เช่นเดียวกันซึ่งจะไปรบกวนการวิเคราะห์ จึงไม่เลือกใช้ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ไอโอดีนในสารละลายไอโอไคด์จะเกิดเป็นไตรไอโอไคด์ ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ซึ่งก็ให้ผลตรงกับที่ Kamson ได้ศึกษา [25] ดังนั้นจะใช้ความยาวคลื่นที่ 350 นาโนเมตร มาศึกษาปฏิกิริยาของสารละลายฮานัสกับตัวอย่างน้ำมัน

2.3.2 การศึกษาการเติมไอโอดีนในตัวอย่างน้ำมันโดยวิธีไทเทรต

ปิเปต stock oil sample (ซึ่งตัวอย่างน้ำมัน 20 g ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วเจือจางจนครบปริมาตร 100 ml ในขวดปริมาตร) 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 ml จะได้น้ำมัน 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 g ตามลำดับ แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 9.5 9.0 8.5 และ 8 ml ตามลำดับ แล้วนำไปไทเทรตหาค่าไอโอดีน

เหมือนขั้นตอนในข้อ 2.2 ค่าไอโอดีนจะสัมพันธ์กับปริมาณไอโอดีนที่ถูกเติมในพันธะคู่ของน้ำมัน
ดังสมการ

$$\text{ปริมาณไอโอดีนที่ถูกเติม (centigrams of absorbed Iodine)} = (B - S) \times M \times 12.69$$

เมื่อ B, S คือ ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตกับสารละลายเบลงค์ และ ตัวอย่าง
น้ำมัน (ml) ตามลำดับ

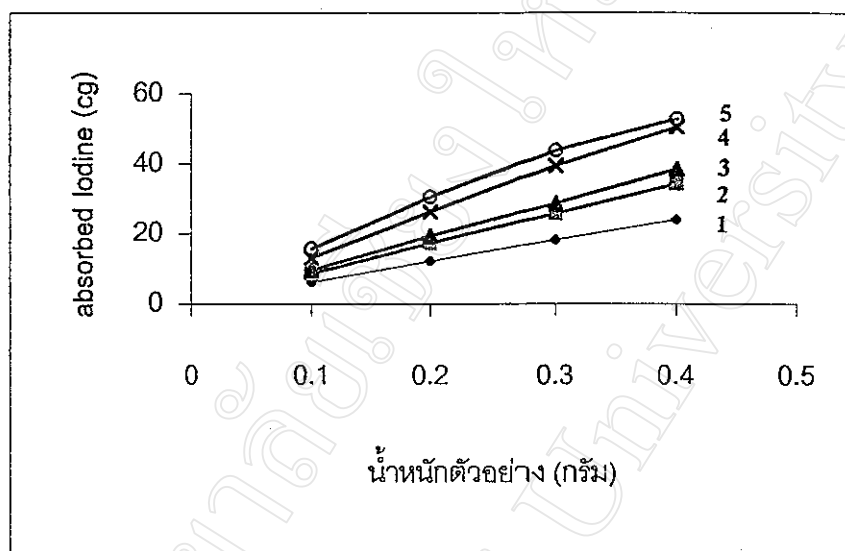
และ M คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตเป็นโมลาร์
ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.1

ตาราง 2.1 ปริมาณไอโอดีนที่ถูกเติมในน้ำมัน

ตัวอย่างน้ำมัน	ปริมาณไอโอดีนที่ถูกเติม (centigrams) *สำหรับตัวอย่างน้ำมันหนัก			
	0.1 g	0.2 g	0.3 g	0.4 g
น้ำมันปาล์ม ตรรก	6.2 ± 0.2	12.3 ± 0.3	18.2 ± 0.2	24.1 ± 0.2
น้ำมันมะกอกตรา Bertolli	8.6 ± 0.1	17.2 ± 0.2	25.7 ± 0.2	34.3 ± 0.2
กรดโอเลอิก	9.6 ± 0.3	19.3 ± 0.1	28.6 ± 0.4	38.6 ± 0.2
น้ำมันถั่วเหลืองตราอรุณ	13.0 ± 0.3	26.3 ± 0.3	39.5 ± 0.2	50.6 ± 0.1
กรดไลโนลิก	15.6 ± 0.2	30.5 ± 0.2	43.7 ± 0.2	52.8 ± 0.1

* Mean ± SD, จากการทดลอง 5 ซ้ำ

จากผลการทดลองในตารางเมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างปริมาณไอโอดีนที่ถูกเติมกับน้ำหนัก
ตัวอย่างที่ใช้ของแต่ละตัวอย่างได้ผลดังรูป 2.2



รูป 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไอโอดีนที่ถูกเติมกับน้ำหนัkdตัวอย่าง

(1 2 3 4 5 = iodine number 61 86 96 130 และ 147 ตามลำดับ)

จากรูป 2.2 แสดงให้เห็นว่าปริมาณไอโอดีนที่ถูกเติมแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับน้ำหนัkdที่ใช้ของแต่ละตัวอย่างน้ำมันในช่วงที่ศึกษา (0.1-0.4 g และค่าไอโอดีน 61-147)

เมื่อนำผลในตาราง 2.1 มาคำนวณค่าไอโอดีนโดยหารค่าปริมาณไอโอดีนที่ถูกเติมด้วยน้ำหนัkdตัวอย่างที่ใช้ ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.2

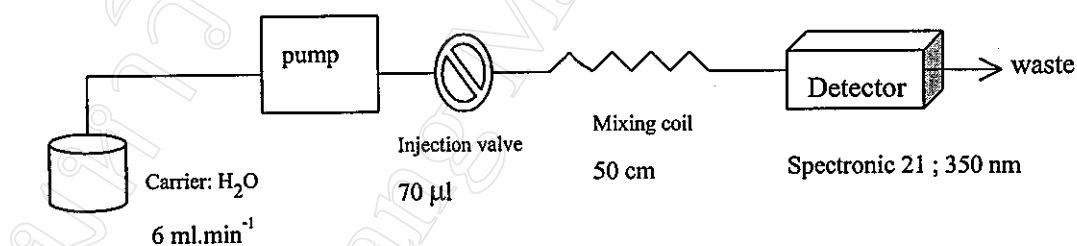
ตาราง 2.2 ค่าไอโอดีนของตัวอย่างน้ำมัน โดยวิธีไทเทรต

ตัวอย่างน้ำมัน	ค่าไอ โอดีน * สำหรับตัวอย่างน้ำมันหนัก				
	0.1 g	0.2 g	0.3 g	0.4 g	เฉลี่ย (n=4)
น้ำมันปาล์ม ตรหายก	61.9 ± 1.8	61.5 ± 1.3	60.7 ± 0.6	60.2 ± 0.5	61.1 ± 0.8
น้ำมันมะกอกตรา Bertolli	84.9 ± 1.7	86.2 ± 0.9	85.5 ± 0.5	85.8 ± 0.6	85.6 ± 0.5
กรดโอเลอิก	96.6 ± 3.0	96.4 ± 0.5	95.3 ± 1.4	96.4 ± 0.6	96.2 ± 0.6
น้ำมันถั่วเหลืองตรางู	130.5 ± 2.8	131.3 ± 1.6	131.6 ± 0.6	126.5 ± 0.3	130.0 ± 2.4
กรดไลโนลิก	156.3 ± 2.3	152.5 ± 0.9	145.7 ± 0.5	132.0 ± 0.2	146.6 ± 10.7

* Mean ± SD, จากการทดลอง 5 ซ้ำ

2.3.3 ระบบ เอฟ ไอ เอ ในการตรวจวัดไตรไอโอดด์

ระบบ FIA ได้ถูกจัดขึ้นในการตรวจวัด I_3^- ที่เกิดจากปฏิกิริยา(ดูหัวข้อ 2.3) ดังแสดงในรูป 2.3



รูป 2.3 ระบบ FIA ที่ใช้ในการตรวจวัด I_3^- [26]

2.3.4 การศึกษาผลของปริมาตรสารละลายหาค่าและปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ในการศึกษาปริมาตรสารละลายหาค่าและปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาจะทำการทดลองดังต่อไปนี้

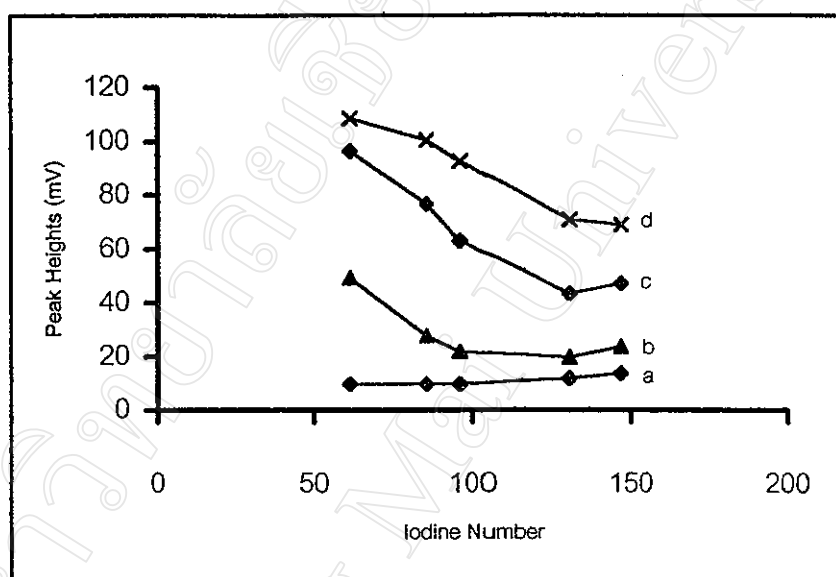
ชั่งตัวอย่างน้ำมัน 0.1 - 0.3 g (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ขวดสีชา เติมน้ำมัน 10 ml แล้วปิเปตสารละลายหาค่าปริมาตร 2 4 6 และ 8 ml ใส่ขวดสีชาแล้วปิเปตยาละลายละลาย นำเก็บในที่มืด 5 นาที จากนั้นนำออกมาเติมด้วยสารละลาย KI เข้มข้น 10 % (w/v) 10 ml เขย่าให้เข้ากัน เพื่อสกัดไอโอดีนออกจากชั้นของคลอโรฟอร์ม เติมน้ำกลั่น 15 ml เขย่าสารละลาย จากนั้นทิ้งสารละลายให้แยกชั้น ปิเปตสารละลายชั้นน้ำมา 0.5 ml มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 15 ml เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วฉีดสารละลายนี้เข้าสู่ระบบ FIA บันทึกความสูงของพีคที่ได้ ได้ผลดังแสดงใน ตาราง 2.3

ตาราง 2.3 ความสูงของฟีกเมื่อใช้น้ำหนักตัวอย่างน้ำมันและปริมาตรสารละลายฮานัสต่างๆ

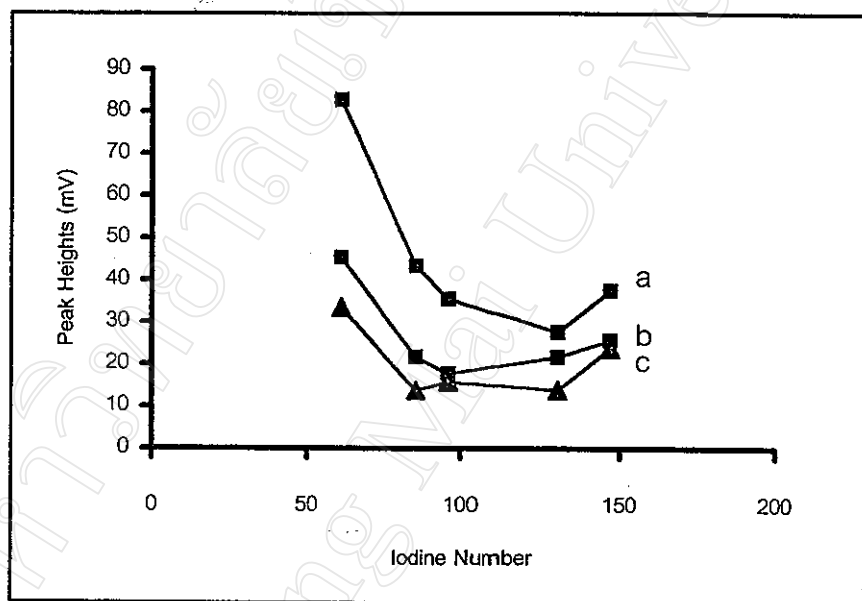
ตัวอย่าง	ความสูงของฟีก (cm)						
	ที่ได้จากการใช้น้ำหนักของตัวอย่างและปริมาตรของ Hanus reagent						
	0.1 g				0.2 g		0.3 g
	2 ml	4 ml	6 ml	8 ml	6 ml	8 ml	8 ml
หยก (ค่าไอโอดีน 61.1 ± 0.8)	0.5 (9.8) ^a	2.5 (49.2)	4.9 (96.4)	5.5 (108.3)	2.3 (45.3)	4.2 (82.7)	1.7 (33.5)
น้ำมันปาล์มตรา Bertolli (ค่าไอโอดีน 85.6 ± 0.5)	0.5 (9.8)	1.4 (27.6)	3.9 (76.8)	5.1 (100.4)	1.1 (21.6)	2.2 (43.3)	0.7 (13.8)
กรดโอลีอิก (ค่าไอโอดีน 96.2 ± 0.6)	0.5 (9.8)	1.1 (21.7)	3.2 (63.0)	4.7 (92.5)	0.9 (17.7)	1.8 (35.4)	0.8 (15.7)
กรดไลโนลิก (ค่าไอโอดีน 146.6 ± 10.7)	0.7 (13.8)	1.2 (23.6)	2.4 (47.2)	3.5 (68.9)	1.3 (25.6)	1.9 (37.4)	1.2 (23.6)
น้ำมันถั่วเหลืองตรา อุ่น (ค่าไอโอดีน 130.0 ± 2.4)	0.6 (11.8)	1.0 (19.7)	2.2 (43.3)	3.6 (70.7)	1.1 (21.6)	1.4 (27.6)	0.7 (13.8)

^a ค่าในวงเล็บคือความสูงของฟีกเป็น mV

เมื่อนำผลที่ได้ในตาราง 2.3 มาแสดงเป็นกราฟจะได้ผลดังรูป 2.4 และ 2.5



รูป 2.4 ผลของปริมาตรสารละลายไฮไดรเจนไอโอดีนที่มีต่อความสูงของพีคเมื่อใช้น้ำหนักตัวอย่าง 0.1 g
เมื่อใช้ Hanus reagent ปริมาตร : (a) 2 (b) 4 (c) 6 และ (d) 8 ml



รูป 2.5 ผลของปริมาณสารละลายไอโอดีนที่มีต่อความสูงของพีคเมื่อใช้น้ำหนักตัวอย่าง(g)และปริมาณ Hanus reagent (ml) : (a) 0.2, 8 (b) 0.2, 6 และ (c) 0.3 , 8

พิจารณารูป 2.4 ซึ่งเขียนระหว่างความสูงของฟีกกับค่าไอโอดีน ความสูงของฟีกนี้จะแสดงถึงปริมาณไอโอดีนที่เหลือจากปฏิกิริยาของสารละลายฮานส์กับน้ำมัน เนื่องจากค่าไอโอดีนแปรผันตรงกับปริมาณไอโอดีนที่ถูกดูดกลืนหรือแปรผกผันกับปริมาณไอโอดีนที่เหลือจากปฏิกิริยา ดังนั้นความสูงของฟีกมากปริมาณไอโอดีนที่เหลือจากปฏิกิริยามีค่ามาก นั่นคือมีการดูดกลืนไอโอดีนน้อยหรือมีค่าไอโอดีนน้อยนั่นเอง จากรูป 2.4 จะเห็นว่าเมื่อใช้ปริมาตรสารละลายฮานส์เพิ่มขึ้นจาก 2 และ 4 ml เป็น 6 ml ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟจะเพิ่มขึ้น สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของฟีกกับค่าไอโอดีนเมื่อใช้ปริมาตรสารละลายฮานส์ต่างๆ สำหรับตัวอย่างน้ำมันหนัก 0.1 g แสดงในตาราง 2.4

ตาราง 2.4 สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของฟีกกับค่าไอโอดีน

ปริมาตรสารละลายฮานส์ (ml)	สมการเส้นตรง	r^2	ช่วงความเป็นเส้นตรง ของค่าไอโอดีน
4	$Y = -0.80X + 97.7$	0.9913	61-96
6	$Y = -0.77X + 142.2$	0.9812	61-130
8	$Y = -0.56X + 145.1$	0.973	61-130

จากตาราง 2.4 จะเห็นว่าเมื่อใช้ปริมาตรสารละลายฮานส์ 6 ml จะได้กราฟที่มีช่วงความเป็นเส้นตรงมากกว่าเมื่อใช้ปริมาตรอื่นๆ ดังนั้นปริมาตรสารละลายฮานส์ที่เหมาะสมกับน้ำหนักน้ำมัน 0.1 g คือ 6 ml

เมื่อพิจารณารูป 2.5 จะเห็นว่า ณ สภาวะที่ใช้ความสัมพันธ์ของความสูงของฟีกกับค่าไอโอดีนมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่น้อยกว่าในกรณีที่ใช้ตัวอย่าง 0.1 g และ ปริมาตรสารละลายฮานส์ 6 ml ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ปริมาตรสารละลายฮานส์ 6 ml และ น้ำหนักตัวอย่าง 0.1 g เป็นสภาวะที่เหมาะสม

2.3.5 การศึกษาการหาค่าไอโอดีนโดยวิธี FIA

การศึกษาปริมาณไอโอดีนที่ถูกเติมในน้ำมันพืช โดยวิธี FIA จะได้ทำการทดลองดังนี้

2.3.5.1. กราฟมาตรฐานสำหรับการหาความเข้มข้นไอโอดีนที่เหลือจากปฏิกิริยา

ความเข้มข้นไอโอดีนที่ใช้สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งสามารถคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นไอโอดีน} = (V \times M \times 2) / \text{total volume of aqueous solution}$$

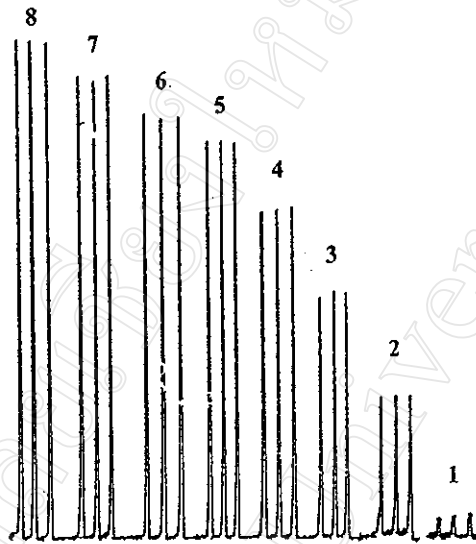
เมื่อ V, M คือ ปริมาตร (ml) และ ความเข้มข้นของสารละลายฮานส์ (Molarity) ตามลำดับ

สร้างกราฟมาตรฐานได้โดยปิเปตสารละลายฮานส์เข้มข้น 0.1M ปริมาตร 0.5 1 2 3 4 5 6 และ 7 ml ใส่ในขวดสีชาซึ่งมีคลอโรฟอร์มอยู่ 10 ml ปิดฝาแล้วนำเก็บในที่มืด นำออกมาเติมด้วยสารละลาย KI เข้มข้น 10 % (w/v) ปริมาตร 10 ml เขย่าแล้วเติมน้ำกลั่น 15 ml เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งสารละลายไว้ให้แยกชั้น ปิเปตสารละลายชั้นน้ำมา 0.5 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่น 15 ml เขย่าสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นฉีดเข้าสู่ระบบ FIA วัดความสูงของพีค

กราฟมาตรฐานจะได้จากการเขียนระหว่างความเข้มข้นของไอโอดีนกับความสูงของพีค(mV) ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.5 และ รูป 2.6

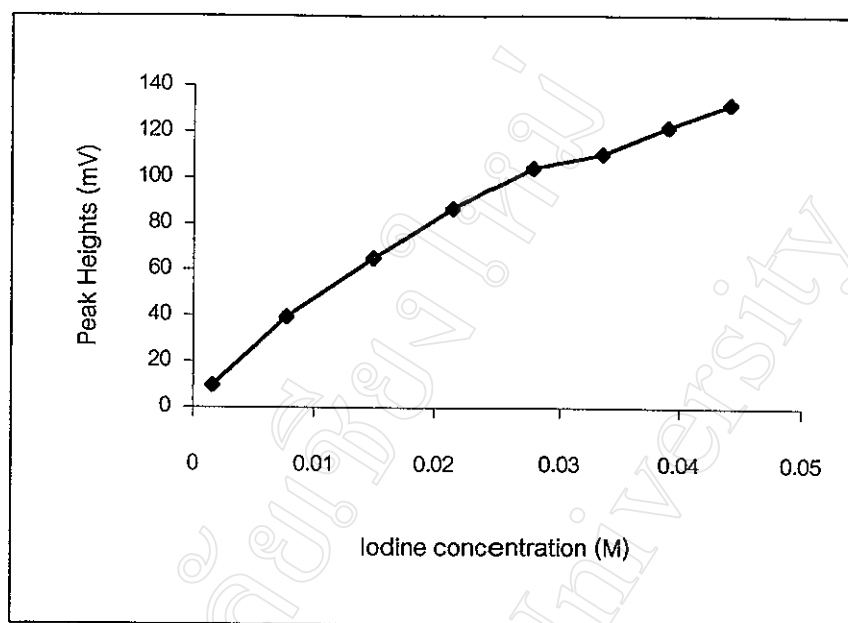
ตาราง 2.5 ความสูงของพีค ณ ความเข้มข้นไอโอดีนค่าต่างๆ

หมายเลขพีค	Iodine concentration (M)	ความสูงของพีค	
		cm	mV
1	0.0016	0.5	9.8
2	0.0077	2.0	39.4
3	0.0149	3.3	65.0
4	0.0215	4.4	86.6
5	0.0277	5.3	104.3
6	0.0335	5.6	110.2
7	0.0389	6.2	122.0
8	0.0439	6.7	131.9

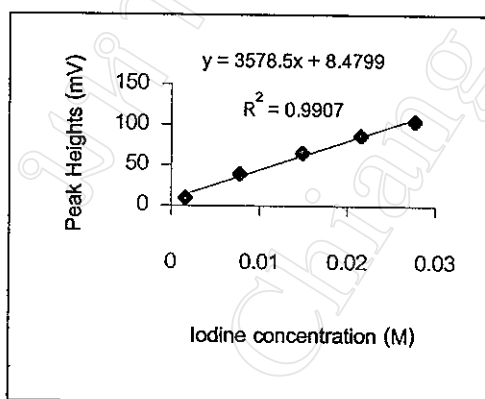


รูป 2.6 FIA-grams ของความเข้มข้นของไอโอดีนมาตรฐาน
(ความหมายของพีคหมายเลข 1-8 ดูในตาราง 2.5)

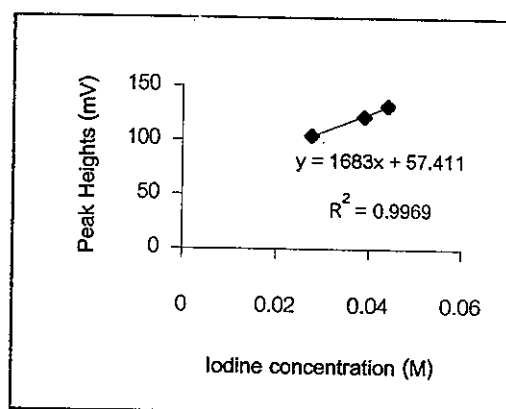
กราฟมาตรฐาน ได้จากการเขียนระหว่างความเข้มข้นของไอโอดีนกับความสูงของพีค ซึ่งช่วง
ความเป็นเส้นตรงสำหรับความเข้มข้นของไอโอดีน มี 2 ช่วง คือ 0.0016-0.0277 M และ 0.0277 -
0.0439 M ดังแสดงในรูป 2.7



ก



ข



ค

รูป 2.7 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นไอโอดีนมาตรฐาน
 (ก) ช่วง 0.0016-0.0439 M (ข) ช่วง 0.0016-0.0277 M และ
 (ค) ช่วง 0.0277-0.0439 M

2.3.5.2. การหาค่าไอโอดีนของน้ำมันพืชตัวอย่าง

ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำมันพืชจากห้างสรรพสินค้าฮั่วหละ 1 ขวด ประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม ตราหยก น้ำมันมะกอกตรา Bertolli น้ำมันถั่วเหลืองตราอุ๋น แล้วทำการหาค่าไอโอดีนของน้ำมันพืช โดยทำการทดลองดังนี้

ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 0.1 g (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ในขวดสีชา เดมคลอโรฟอร์ม 10 ml จากนั้นเปิดสารละลายฮานัส 6 ml ปิดฝา แล้วเก็บไว้ในที่มืด 5 นาที นำออกมาเติมสารละลาย KI เข้มข้น 10 % (w/v) 10 ml เขย่า เติมน้ำกลั่น 15 ml เขย่าสารละลายและตั้งสารละลายทิ้งไว้จนแยกชั้น เปิดสารละลายชั้นน้ำมัน 0.5 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่น 15 ml เขย่าสารละลายให้เข้ากันแล้วฉีดเข้าสู่ระบบ FIA ได้ผลดังแสดงในรูป 2.8 และตาราง 2.6

ทำการวิเคราะห์แบลงค์โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง นำความสูงของพีคที่ได้จากการวิเคราะห์แบลงค์ และการวิเคราะห์ตัวอย่างไปหาความเข้มข้นของไอโอดีนโดยใช้กราฟมาตรฐาน จากความเข้มข้นของไอโอดีนทั้งสองกรณี นำไปคำนวณปริมาณไอโอดีนเป็นเซนติกรัมตมการ

$$\text{ปริมาณไอโอดีนเป็นเซนติกรัม} = ([I]_{\text{remain}} * \text{total volume} * 126.9 * 100) / 1000$$

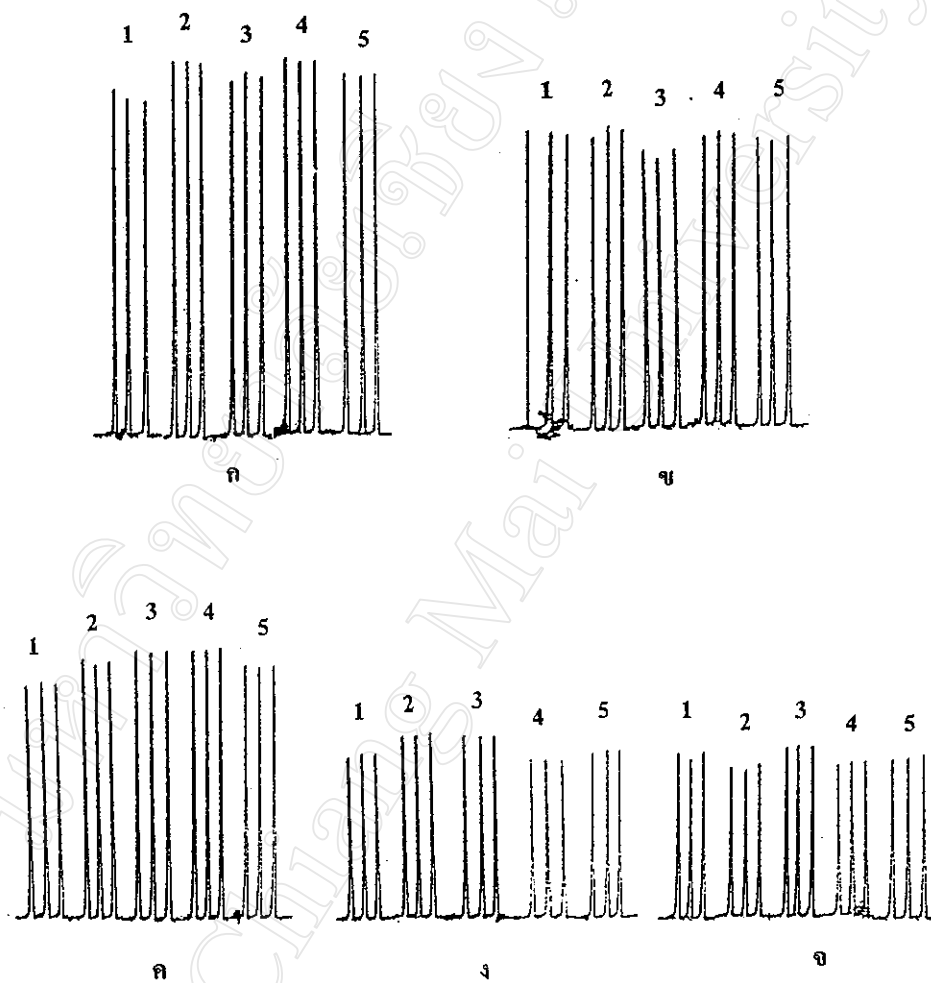
เมื่อ $[I]_{\text{remain}}$ คือ ความเข้มข้นของไอโอดีน(M)ที่เหลือจากปฏิกิริยาที่คำนวณจากกราฟมาตรฐาน
total volume คือ ปริมาตรสารละลายชั้นน้ำมันรวม (ml) ในที่นี้คือ 31 ml

ปริมาณไอโอดีนที่ถูกดูดกลืนในตัวอย่างจะคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ปริมาณไอโอดีนที่ถูกดูดกลืน} = I_{\text{blank}} - I_{\text{sample}}$$

เมื่อ $I_{\text{blank}} \cdot I_{\text{sample}}$ คือ ปริมาณไอโอดีนเป็นเซนติกรัมที่ได้จากการวิเคราะห์แบลงค์และการวิเคราะห์ตัวอย่าง ตามลำดับ

ดังนั้นค่าไอโอดีนจะได้รับการหารปริมาณไอโอดีนที่ถูกดูดกลืน (เป็นเซนติกรัม) ด้วยน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (เป็นกรัม)



รูป 2.8 FIA-grams ของความเข้มข้นไอโอดีนที่เหลือหลังจากทำปฏิกิริยากับ ตัวอย่างน้ำหนัก 0.1 g (ก ข ค ง จ = น้ำมันปาล์มตราหยก, น้ำมันมะกอกตรา Bertoli , กรดโอเลอิก, กรดไลโนลิก, น้ำมันถั่วเหลืองตราอรุณ ตามลำดับ)

* แต่ละชุดของ 3 พิก คือ การชั่งน้ำหนัก 1 ครั้ง ดูตาราง 2.6 ประกอบ

ตาราง 2.6 ค่าไอโอดีนของตัวอย่างน้ำมันพืชที่วิเคราะห์โดยวิธี เอฟ ไอ เอ

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (g)	ความสูง		ปริมาณไอโอดีน ที่เติม (cg)	ค่าไอโอดีน
		cm	mV		
น้ำมันปาล์ม ตราหยก	1. 0.1059	4.6	90.6	6.3	59.2
	2. 0.1016	5.1	100.4	5.2	51.1
	3. 0.1036	4.8	94.5	5.8	56.4
	4. 0.1009	5.0	98.4	5.4	53.6
	5. 0.1020	4.9	96.4	5.6	55.1
	เฉลี่ย 0.1028 ± 0.0020	4.9 ± 0.2	95.7 ± 4.5	5.7 ± 0.4	55.1 ± 3.0
น้ำมันมะกอก ตรา Bertolli	1. 0.1003	4.0	78.7	7.6	75.5
	2. 0.1005	4.0	78.7	7.6	75.3
	3. 0.1004	3.7	72.8	8.2	81.9
	4. 0.1055	3.9	76.8	7.8	73.8
	5. 0.1032	3.9	76.8	7.8	75.5
	เฉลี่ย 0.1020 ± 0.0023	3.9 ± 0.1	76.8 ± 2.4	7.8 ± 0.3	76.4 ± 3.0
กรดโอเลอิก	1. 0.1085	3.2	63.0	9.3	85.7
	2. 0.1030	3.5	68.9	8.7	84.0
	3. 0.1019	3.6	70.9	8.4	82.8
	4. 0.0992	3.6	70.9	8.4	85.1
	5. 0.1032	3.4	66.9	8.9	86.0
	เฉลี่ย 0.1032 ± 0.0033	3.5 ± 0.2	68.1 ± 3.3	8.7 ± 0.4	84.7 ± 1.3
กรดไลโนเลอิก	1. 0.1018	2.3	45.3	11.3	11.05
	2. 0.1004	2.5	49.2	10.8	107.8
	3. 0.1026	2.4	47.2	11.0	107.6
	4. 0.1094	2.1	41.3	11.7	106.8
	5. 0.1004	2.3	45.3	11.3	112.1
	เฉลี่ย 0.1029 ± 0.0040	2.1 ± 0.2	43.7 ± 3.8	11.2 ± 0.3	109.0 ± 2.2
น้ำมันถั่วเหลือง ตราอรุณ	1. 0.1044	2.3	45.3	11.3	112.1
	2. 0.1071	2.2	39.4	11.9	111.1
	3. 0.1016	2.3	45.3	11.3	110.8
	4. 0.1056	2.1	41.3	11.7	110.7
	5. 0.1009	2.2	43.3	11.5	113.7
	เฉลี่ย 0.1039 ± 0.0026	2.2 ± 0.1	43.7 ± 1.6	11.5 ± 0.3	111.7 ± 1.3

จากค่าไอโอดีนที่วิเคราะห์ได้ในตาราง 2.6 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการไทเทรตได้
ผลดังแสดงในตาราง 2.7

ตาราง 2.7 การเปรียบเทียบค่าไอโอดีนที่วิเคราะห์โดยวิธี FIA และวิธีไทเทรต

ตัวอย่าง	ค่าไอโอดีน		% Relative Difference
	Titrate (n=5)	FIA (n=5)	
น้ำมันปาล์ม ตรา หยก	61.9 $\pm$ 1.8	55.1 $\pm$ 3.0	-11
น้ำมันมะกอก ตรา Bertolli	84.9 $\pm$ 1.7	76.4 $\pm$ 3.0	-10
กรดโอเลอิก	96.6 $\pm$ 3.0	84.7 $\pm$ 1.3	-12
กรดไลโนเลอิก	156.3 $\pm$ 2.3	109.0 $\pm$ 2.2	-30
น้ำมันถั่วเหลือง ตรา อุ่น	130.5 $\pm$ 2.8	111.7 $\pm$ 1.3	-14

จากผลที่ได้ในตาราง 2.7 ค่าไอโอดีนที่วิเคราะห์โดยวิธี FIA สำหรับตัวอย่างที่มีค่าไอโอดีน 60 ถึง 100 มีค่าไอโอดีนแตกต่างสัมพัทธ์ประมาณ 10 % เมื่อเทียบกับวิธีไทเทรต ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ยังยอมรับได้ สำหรับตัวอย่างที่มีค่าไอโอดีน 130 ถึง 156 ค่าความแตกต่างสัมพัทธ์มีค่าสูงดังนั้นการวิเคราะห์โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ จึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ในการหาค่าไอโอดีนสำหรับกรณีนี้ได้

2.3.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงตัวอย่างแทนการชั่งน้ำหนัก

เนื่องจากการชั่งน้ำหนักตัวอย่างนั้นมีความล่าช้าดังนั้นจึงได้มีการทดลองใช้วิธีการปิเปตตัวอย่างน้ำมันแทนการชั่ง ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการปิเปตคือ 100 μ l ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกับ 0.1 g และทำการทดลองดังนี้

2.3.6.1 กราฟมาตรฐาน

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 2.3.5.1

2.3.6.2 ตัวอย่าง

ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยทำการปิเปตตัวอย่าง 100 μ l แทนการชั่ง แล้วใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 2.3.5.2 ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.8

ตาราง 2.8 ผลการหาค่าไอโอดีนของตัวอย่างน้ำมันพืชใช้การบีบอัดตัวอย่างแทนการชั่งน้ำหนัก

ตัวอย่างหมายเลข	ความสูงของฟีกเฉลี่ย(n=3)		ปริมาณไอโอดีนที่ดูดเก็บ (cg)	ค่าไอโอดีน
	cm	mV		
1	2.5	49.2	11.2	118
2	2.3	45.3	11.5	122
3	2.4	47.2	11.4	120
4	2.1	41.3	11.9	125
5	2.4	47.2	11.4	120
6	2.7	53.1	10.8	110
7	2.3	45.3	11.5	122
8	2.6	51.2	11.0	117
9	2.4	47.2	11.4	120
10	2.3	45.3	11.5	122
11	2.1	41.3	11.9	125
12	2.1	41.3	11.9	125
13	2.8	55.1	10.7	113
14	1.9	37.4	12.2	129
15	2.4	47.2	11.4	120
16	2.2	43.3	11.7	124
17	2.3	45.3	11.5	122
18	2.0	39.4	12.1	127
19	2.3	45.3	11.5	122
20	2.3	45.3	11.5	122
21	1.9	37.4	12.2	129
เฉลี่ย	2.3 ± 0.2	45.3 ± 4.7	11.5 ± 0.4	115.4 ± 4.2

หมายเหตุ : ตัวอย่างที่ใช้คือน้ำมันถั่วเหลืองตราถั่ว

จากค่าไอโอดีนที่วิเคราะห์ได้ในตารางเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่วิเคราะห์ได้โดยการไทเทรตได้ผลดังแสดงในตาราง 2.9

ตาราง 2.9 ค่าไอโอดีนที่วิเคราะห์ได้โดยเทคนิค FIA เทียบกับการไทเทรต

ตัวอย่าง	FIA		ไทเทรต	
	ค่าไอโอดีน*	%RSD	ค่าไอโอดีน**	%RSD
น้ำมันถั่วเหลือง ตราถั่ว	115.4 ± 4.2	3.6 %	131.6 ± 0.8	0.6 %

*Mean ± SD , จากการทดลอง 21 ซ้ำ และ ** จากการทดลอง 3 ซ้ำ

จะเห็นว่าเมื่อใช้การปิเปตตัวอย่างแทนการชั่งน้ำหนัก ค่าไอโอดีนที่วิเคราะห์โดยวิธี FIA ก็มี ความแม่นยำดี (%RSD = 3.6 %) ดังนั้นจะได้ใช้การปิเปตตัวอย่างแทนการชั่งน้ำหนัก เนื่องจากลดเวลา ในการวิเคราะห์ที่มาจากการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง

2.3.7 ความคลาดเคลื่อนเนื่องจากการปิเปตของ Operator

ในการศึกษาความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดจาก operator ได้ทำโดยให้ operator 4 คน ปิเปต ตัวอย่างน้ำมันเดียวกันใส่ขวดสีชา คนละ 5 ขวด จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ดังสภาวะเดียวกัน กับข้อ 2.3.5.2 ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.10

ตาราง 2.10 ค่าไอโอดีนที่วิเคราะห์ได้เมื่อให้ operator หลายคนทำการปิเปตตัวอย่าง

Operator	ค่าไอโอดีน*	% Difference from titration	%RSD
Operator 1	107.0 $\pm$ 4.4	10 %	4.1 %
Operator 2	114.5 $\pm$ 3.8	4 %	3.3 %
Operator 3	121.0 $\pm$ 4.1	2 %	3.4 %
Operator 4	114.1 $\pm$ 6.4	4 %	4.2 %
เฉลี่ย	114.2 $\pm$ 9.6	4 %	8.4 %

* Mean $\pm$ SD, จากการทดลอง 5 ซ้ำ ตัวอย่างที่ใช้ คือ น้ำมันดอกทานตะวันตราทุ๊ก ค่าไอโอดีนที่วิเคราะห์โดยวิธีไทเทรต เท่ากับ 119.1 ± 0.2 (n=3)

ในการศึกษานี้จะดูผลของ operator ในการปิเปตตัวอย่างน้ำมันต่อการหาค่าไอโอดีน ถ้า operator ทำการปิเปตน้ำมันมาไม่เท่ากันย่อมส่งผลต่อการหาค่าไอโอดีนเนื่องจากจะไม่ได้น้ำหนักน้ำมันเท่ากับ 0.1 กรัมทำให้การคำนวณค่าไอโอดีนผิดพลาด จากผลในตาราง 2.10 จะเห็นว่าค่า %RSD ของค่าไอโอดีนของแต่ละ operator มีค่าประมาณ 4 % และค่า %RSD ของค่าไอโอดีนรวมของ operator ทั้ง 4 คน มีค่าประมาณ 8 % ซึ่งค่า %RSD ดังกล่าวมีค่าน้อยแสดงว่า operator แต่ละคนทำการปิเปตได้แม่นยำดี ค่าไอโอดีนที่วิเคราะห์ได้มีค่าใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงกับค่าจากการไทเทรต (% difference < 10 %) จึงสรุปได้ว่าไม่มีผลจากการปิเปตตัวอย่างของ operator ในการหาค่าไอโอดีน

2.3.8 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันพืช

ปีเปตตัวอย่าง 100 μ l แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.5.2 ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.11

ตาราง 2.11 ค่าไอโอดีนของตัวอย่างน้ำมันที่วิเคราะห์โดยวิธี FIA และ ไทเทรต

ตัวอย่าง	ไทเทรต		FIA		% Difference from titration
	ค่าไอโอดีน*	%RSD	ค่าไอโอดีน*	%RSD	
น้ำมันปาล์ม ตรา หยก	61.9 $\pm$ 1.8	2.9 %	55.1 $\pm$ 3.0	2.9 %	11 %
น้ำมันมะกอก ตรา Bertolli	84.9 $\pm$ 1.7	2.0 %	76.4 $\pm$ 3.1	2.0 %	10 %
กรดโอเลอิก	96.9 $\pm$ 3.0	3.1 %	84.7 $\pm$ 1.3	3.1 %	12 %
น้ำมันดอกทานตะวันตรา กู๊ก	119.1 $\pm$ 0.2	0.2 %	114.2 $\pm$ 9.6	8.4 %	4 %
น้ำมันถั่วเหลือง ตรา กู๊ก	131.6 $\pm$ 0.8	0.6 %	115.4 $\pm$ 4.2**	3.6 %	12 %

*Mean $\pm$ SD, จากการทดลอง 5 ซ้ำ ยกเว้น ** ทดลอง 21 ซ้ำ

จากผลการทดลองในตาราง 2.11 ค่าไอโอดีนที่วิเคราะห์โดยวิธี FIA มีค่าสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธีไทเทรตในช่วงค่าไอโอดีน 60-120 ดังนั้นสามารถประยุกต์ระบบ FIA ในการหาค่าไอโอดีนของน้ำมันพืชในช่วงค่าไอโอดีน 60-120

2.4 การศึกษาการหาปริมาณกรดฟูมาริก

ตามวิธีมาตรฐาน AOAC [13] ได้มีการหาปริมาณกรดฟูมาริกโดยใช้เทคนิค voltammetry หรือ polarography ซึ่ง working electrode ที่ใช้จะเป็นขั้วไฟฟ้าหยดปรอท (mercury drop electrode) สารละลาย supporting electrolyte ที่ใช้เป็นสารละลายผสมของ tetramethylammonium bromide และ lithium chloride ณ ศภาวะดังกล่าวค่า peak potential ของกรดฟูมาริกจะเกิดขึ้นที่ประมาณ -1150 mV

ในงานการศึกษานี้จะได้นำเอาเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ โวลแทมเมตรี มาใช้ในการหาปริมาณกรดฟูมาริกในน้ำผลไม้ โดยพัฒนาดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานข้างต้นเพื่อให้วิเคราะห์ได้สะดวก รวดเร็วขึ้นและประหยัดค่าใช้จ่าย

สภาวะของเครื่องโวลแทมโมกราฟที่ใช้ในการศึกษาต่างๆ ได้แสดงไว้ในตาราง 2.12

ตาราง 2.12 สภาวะของเครื่องโวลแทมโมกราฟที่ใช้ในการศึกษา

พารามิเตอร์	สภาวะ
Electrode :	
1. Working electrode	HMDE drop size 4
2. Reference electrode	Ag/AgCl
3. Auxiliary electrode	Pt wire
Scan rate	80 mV/s
Pulse amplitude	50 mV
Pulse width	50 ms
Pulse period	100 ms
Measuring time	30 ms
Scanning potential :	
Initial potential	-600 mV
Final potential	-1300 mV

2.4.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย supporting electrolyte

สารละลาย supporting electrolyte ที่ใช้ในการศึกษาประกอบไปด้วยสารละลายผสมของ tetramethylammonium bromide และ lithium chloride

2.4.1.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ LiCl

เตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นของ $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M จากนั้นใช้สารละลายนี้เป็นตัวทำละลายการเตรียมสารละลาย supporting electrolyte ที่มีความเข้มข้นของ LiCl ต่างๆ กัน

เปิดสารละลาย supporting electrolyte 10 ml ใส่ใน measuring cell ของเครื่องโวลแทมโมกราฟ จากนั้นทำการไล่ก๊าซออกซิเจนออกจากสารละลายโดยการผ่านก๊าซไนโตรเจนลงในสารละลายเป็นเวลา 3 นาที บันทึก voltammograms ของกรดฟูมาริกเมื่อเติมสารละลายกรดฟูมาริกมาตรฐาน 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 ml วัดกระแสของพีก (peak current) และศักย์ไฟฟ้าของพีก (peak potential) ได้ผลดังตาราง 2.13 จากนั้นทำการเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดฟูมาริกที่เติมกับค่า peak current เมื่อใช้ความเข้มข้นของ LiCl ต่างๆ ได้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดฟูมาริกที่เติมกับค่า peak current ของกรดฟูมาริก ดังแสดงในตาราง 2.14

ตาราง 2.13 ค่า peak current เมื่อใช้ supporting electrolyte ที่มี LiCl เข้มข้นต่าง ($(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M)

Fumaric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Peak current (nA) เมื่อใช้ LiCl เข้มข้นต่างๆ ($\times 10^{-2}\text{M}$)				
	0.3	0.5	1.0	1.9	3.1
1	ND	ND	2.63(-1145)	3.26(-1155)	2.85(-1148)
2	6.41(-1146)*	6.71(-1150)	8.44(-1145)	11.01(-1139)	10.66(-1137)
3.8	23.78(-1140)	25.46(-1137)	27.75(-1135)	30.17(-1138)	29.43(-1132)
5.7	41.9(-1134)	44.95(-1127)	45.41(-1128)	48.85(-1125)	47.64(-1125)
7.4	57.72(-1128)	63.33(-1124)	-	-	-
9.9	85.13(-112)	87.29(-1118)	86.37(-1122)	94.29(-1119)	93.72(-1118)

หมายเหตุ :- คือ ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ , ND คือ not detectable , * ค่าในวงเล็บคือศักย์ไฟฟ้าของพีก (mV)

ตาราง 2.14 สมการของกราฟมาตรฐานเมื่อใช้ความเข้มข้นของ LiCl ต่างๆ ($(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M)

ความเข้มข้นของ LiCl ($\times 10^{-2}\text{M}$)	สมการของกราฟมาตรฐาน	r^2
0.3	$y = 9.89 X - 13.96$	0.9988
0.5	$y = 10.25 X - 13.47$	0.9996
1.0	$y = 9.57 X - 8.75$	0.9984
1.9	$y = 10.32 X - 8.69$	0.9989
3.1	$y = 10.28 X - 9.19$	0.9984

ในตาราง 2.12 จะเห็นว่าค่าความชันและค่า r^2 ของกราฟมาตรฐานเมื่อใช้ความเข้มข้นของ LiCl ต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณา peak current เมื่อใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี LiCl เข้มข้น 5.0×10^{-3} และ 1.0×10^{-2} M ดังแสดงในตาราง 2.13 พบว่า ณ ความเข้มข้นของกรดฟูมาริก 1.0 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อใช้ LiCl เข้มข้น 1.0×10^{-2} M สามารถตรวจวัดได้แต่ที่ความเข้มข้นของ LiCl 5.0×10^{-3} M ไม่สามารถตรวจวัดได้ ดังนั้นจะเลือกใช้ LiCl เข้มข้น 1.0×10^{-2} M เนื่องจากมี sensitivity ที่ดีกว่า และจะเป็นการสิ้นเปลืองสารเคมีเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ LiCl มากกว่า 1.0×10^{-2} M เนื่องจากค่ากระแสของฟลักไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

2.4.1.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$

ทำการเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นของ LiCl 0.01 M จากนั้นใช้สารละลายนี้ในการเตรียมสารละลาย supporting electrolyte ที่มีความเข้มข้นของ $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ ต่างๆ กัน ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 2.4.1.1 บันทึก voltammograms แล้ววัด peak current และ peak potential ได้ดังแสดงในตาราง 2.15

ตาราง 2.15 ค่า peak current เมื่อใช้ supporting electrolyte ที่มี $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ เข้มข้นต่างๆ
(LiCl 0.01 M)

Fumaric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Peak current (nA) เมื่อใช้ $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ เข้มข้นต่างๆ ($\times 10^{-2}\text{M}$)				
	2.5	5.0	10.0	20.0	30.0
1.0	5.13(-1170)*	4.69(-1155)	4.86(-1134)	4.7(-1143)	4.46(-1141)
2.0	17.99(-1152)	18.15(-1144)	15.06(-1141)	12.37(-1141)	10.94(-1142)
3.9	47.64(-1113)	45.88(-1127)	41.52(-1129)	29.38(-1135)	26.27(-1139)
5.7	71.78(-1124)	70.06(-1121)	68.08(-1123)	54.34(-1130)	49.84(-1133)
7.4	-	94.68(-1117)	93.63(-1119)	79.08(-1125)	72.02(-1130)
9.1	117.17(-1114)	122.34(-1118)	130.14(-1112)	111.91(-1122)	103.69(-1128)

หมายเหตุ :- คือ ไม่ได้ทำการวิเคราะห์, * ค่าในวงเล็บคือศักย์ไฟฟ้าของพีค(mV)

หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกรดฟูมาริกที่เติมกับค่า peak current ได้ดัง
ตาราง 2.16

ตาราง 2.16 สมการของกราฟมาตรฐานเมื่อใช้ supporting electrolyte ที่มีความเข้มข้น
ของ $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ ต่างๆ (LiCl 0.01 M)

ความเข้มข้นของ $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ ($\times 10^{-2}\text{M}$)	สมการของกราฟมาตรฐาน	r^2
2.5	$y = 11.32X - 3.32$	0.9939
5.0	$y = 13.39X - 7.22$	0.9974
10.0	$y = 14.24 X - 11.85$	0.9990
20.0	$y = 12.26 X - 12.23$	0.9924
30.0	$y = 11.33X - 11.75$	0.9906

จากตาราง 2.16 จะเห็นว่าค่าความชันและค่า correlation coefficient (r^2) ของกราฟมาตรฐานจะมีค่ามากที่สุดเมื่อใช้เตตระเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์เข้มข้น 0.1 M ดังนั้นจะเลือกใช้ความเข้มข้นของเตตระเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์เข้มข้น 0.1 M (เมื่อใช้ LiCl เข้มข้น 0.01M)

2.4.2 การศึกษา pH ของสารละลาย supporting electrolyte

เตรียมสารละลาย supporting electrolyte ที่มีความเข้มข้นของ $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M และ LiCl 0.01 M จากนั้นปรับ pH ของสารละลายค่าต่าง ๆ โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ นำสารละลาย supporting electrolyte ที่ปรับ pH แล้วไปศึกษาผลต่อกราฟมาตรฐานโดยทดลองโดยใช้สภาวะเช่นเดียวกันกับข้อ 2.4.1.1 ได้ peak current และ peak potential ดังตาราง 2.17 และหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานได้ดังตาราง 2.18

ตาราง 2.17 ค่า peak current ของกรดฟูมาริก เมื่อใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี pH ต่างๆ

Fumaric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Peak current (nA)*				
	pH 1.9	pH 3.6	pH 5.0	pH 6.8	pH 9.4
1.0	13.42 (-775)	14.85 (-1060)	2.13 (-1160)	ND	ND
2.0	27.35 (-778)	28.68 (-1060)	10.94 (-1156)	ND	ND
3.9	50.84 (-782)	53.41 (-1060)	33.6 (-1135)	7.68 (-1164)	ND
5.7	71.28 (-785)	79.58 (-1061)	58.11 (-1128)	28.53 (-1153)	ND
7.5	89.97 (-789)	101.53 (-1061)	81.79 (-1124)	49.49 (-1147)	ND
10.0	112.78 (-792)	128.33 (-1061)	112.83 (-1118)	80.03 (-1142)	32.2 (-1155)
11.6	-	-	-	-	53.45 (-1150)
13.1	-	-	-	-	71.92 (-1146)
16.8	-	-	-	-	144.64 (-1140)

หมายเหตุ ND คือ not detectable , - คือ ไม่ได้ทำการวัด , * ในวงเล็บคือ peak potential (mV)

ตาราง 2.18 สมการของกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี pH ต่างๆ

pH ของสารละลาย supporting electrolyte	สมการของกราฟมาตรฐาน	r^2	ช่วงความเป็นเส้นตรง ($\mu\text{g/ml}$ fumaric acid)
1.9	$y = 11.06X - 5.45$	0.9950	1-10
3.6	$y = 12.77X - 3.65$	0.9972	1-10
5.0	$y = 12.53X - 12.95$	0.9984	1-10
5.0	$y = 11.86X - 38.39$	0.9998	3.9-10
9.4	$y = 1.25X - 110.03$	0.9902	10-16.8

จากตาราง 2.17 ที่ pH ต่ำกว่า 9 ไม่ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของกรดฟูมาริกมากกว่า 10 $\mu\text{g/ml}$ เนื่องจากสนใจความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 10 $\mu\text{g/ml}$ และผลที่ได้ในตาราง 2.18 แสดงให้เห็นว่า ณ pH ของสารละลาย supporting electrolyte เท่ากับ 3.6 ค่าความชันของกราฟมาตรฐานมีค่าใกล้เคียงกับที่ pH 5.0 แต่ค่า peak current ของกรดฟูมาริกที่ pH 3.6 มีค่ามากกว่าที่ pH 5.0 ทั้งนี้เนื่องจากที่ pH 3.6 การแตกตัวของกรดฟูมาริกจะน้อยกว่าที่ pH 5.0 ดังนั้นที่ pH 3.6 จะมีความเข้มข้นของกรดฟูมาริกในรูปที่ไม่แตกตัวมาก การเกิดปฏิกิริยารีดักชันที่ขั้วไฟฟ้าจึงมากกว่า ค่า peak current จึงสูง และ ที่ pH ต่ำ กรดฟูมาริกจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ง่ายกว่า(ค่าศักย์ไฟฟ้าของฟิคมีค่าน้อย)ที่ pH สูง ดังนั้นจะเลือกใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี pH ประมาณ 3

2.4.3 สรุปสถานะที่เหมาะสมที่ควรใช้ในการวิเคราะห์

จากที่ได้ทำการศึกษาอาจสรุปได้สถานะที่เหมาะสมที่ควรใช้ในการวิเคราะห์คือใช้ สารละลาย อิเล็กโทรไลต์ที่ประกอบด้วย $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M และ LiCl 0.01 M ที่มี pH ประมาณ 3

2.4.4 การนำ NaCl มาใช้แทน LiCl

เนื่องจากต้องการที่จะประหยัดค่าสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดฟูมาริก NaCl เป็นสารเคมีที่หาง่ายและราคาถูกกว่า LiCl ดังนั้นจะได้นำเอา NaCl ใช้แทน LiCl ในการเตรียมสารละลาย supporting electrolyte

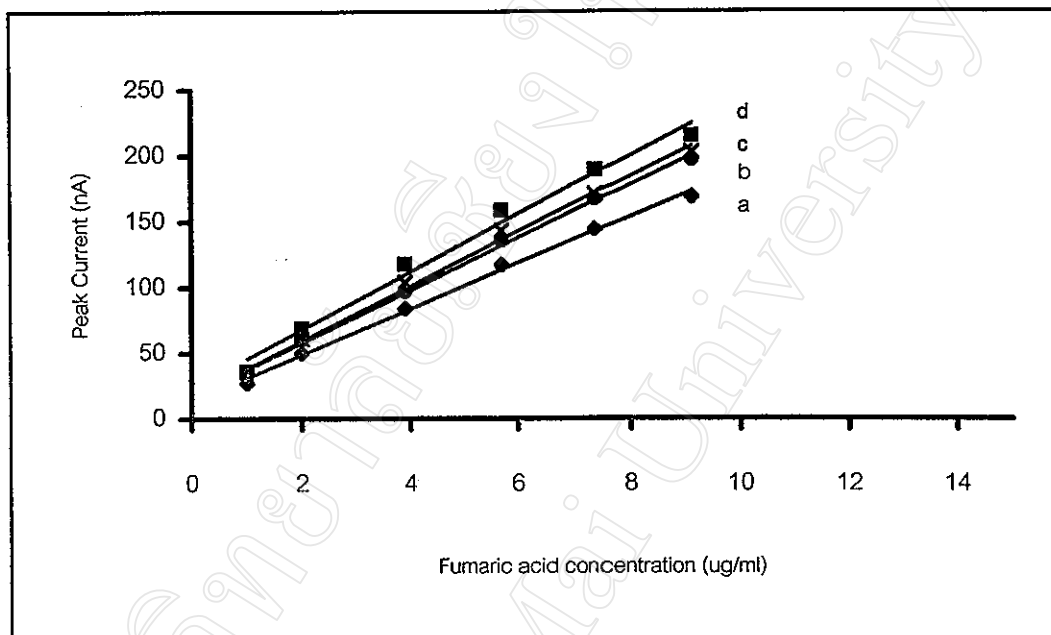
2.4.4.1 การศึกษาความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลาย supporting electrolyte pH 3 ที่มีความเข้มข้นของ $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M และ NaCl เข้มข้นต่างๆ นำสารละลาย supporting electrolyte ที่ได้ไปศึกษาผลต่อกราฟมาตรฐานโดยใช้สภาวะเช่นเดียวกันกับข้อ 2.4.1.1 ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.19 และสร้างกราฟมาตรฐานได้ผลดังรูป 2.9 หากผลการกราฟมาตรฐานแสดงในตาราง 2.20

ตาราง 2.19 ค่า peak current เมื่อใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี NaCl เข้มข้นต่างๆ

Fumaric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Peak current (nA) เมื่อใช้ NaCl เข้มข้นต่างๆ			
	0.01 M	0.02 M	0.04 M	0.06 M
1.0	27.08(-1040)*	32.46(-1040)	31.85(-1056)	36.10(-1040)
2.0	50.07(-1032)	59.99(-1040)	60.70(-1056)	68.33(-1040)
3.9	83.84(-1024)	96.73(-1032)	103.70(-1040)	117.35(-1040)
5.7	116.93(-1024)	135.53(-1024)	143.10(-1040)	158.30(-1032)
7.4	144.30(-1016)	166.97(-1024)	171.05(-1032)	188.73(-1032)
9.1	168.63(-1008)	196.40(-1024)	202.30(-1050)	214.40(-1024)

*ค่าในวงเล็บคือค่าศักย์ไฟฟ้าของพีก (mV)



รูป 2.12 กราฟมาตรฐานเมื่อใช้ สารละลาย supporting electrolyte ที่มี NaCl เข้มข้น
(a) 0.01 (b) 0.02 (c) 0.04 และ (d) 0.06 M

ตาราง 2.20 สมการกราฟมาตรฐานเมื่อใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี NaCl เข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ NaCl (M)	สมการกราฟมาตรฐาน	r^2
0.01	$y = 17.45X - 13.84$	0.9964
0.02	$y = 20.10X - 14.17$	0.9970
0.04	$y = 20.83X - 17.76$	0.9935
0.06	$Y = 22.02X - 23.75$	0.9862

จากผลในตาราง 2.20 ค่า r^2 ของกราฟมาตรฐานมีค่าดีที่สุดเมื่อใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี NaCl เข้มข้น 0.02 M แต่มีค่าความชันของกราฟมาตรฐานน้อยกว่าเมื่อใช้ NaCl เข้มข้น 0.04 และ 0.06 M เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl มากกว่า 0.02 M ค่า peak current ก็ไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl มากกว่า 0.02 M จึงเป็นการสิ้นเปลืองสารเคมี ดังนั้นจะเลือกใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0.02 M

2.4.5 การศึกษาความแม่นยำของการวัดกระแส

เตรียมสารละลาย supporting electrolyte pH 3 ที่ประกอบด้วย $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ และ NaCl เข้มข้น 0.1 และ 0.02 M ตามลำดับ

เปิดสารละลาย supporting electrolyte 10 ml ใส่ measuring cell ใส่ก๊าซออกซิเจนโดยผ่านก๊าซไนโตรเจนลงในสารละลาย 3 นาที แล้วเติมสารละลายมาตรฐานกรดฟูมาริกเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 0.2 ml (20 μg) แล้วบันทึก voltammogram สารละลายเดิม 11 ขั้ว หา peak current ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.21

ตาราง 2.21 ความแม่นยำของการวัดค่า peak current ของกรดฟูมาริกเข้มข้น 2 $\mu\text{g/ml}$

Fumaric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Peak current (nA)	Mean $\pm$ SD	% RSD
2	46.12, 47.39, 46.65, 47.17, 50.62, 47.15, 47.18, 48.57, 50.40, 50.77, 50.17	48.38 $\pm$ 1.78	3.7 %

2.4.6 การศึกษาร้อยละของการกลับคืน (% Recovery)

ทำการหาปริมาณกรดฟูมาริกในน้ำผลไม้ตัวอย่างโดยวิธีที่ดัดแปลงเทียบกับวิธีมาตรฐาน (ดูภาคผนวก ก) ซึ่งทั้ง 2 วิธีใช้สภาวะของเครื่องโวลแทมโทกราฟีเช่นเดียวกัน (ดังตาราง 2.10)

2.4.6.1 วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน

ใช้วิธีที่ได้ศึกษามานี้โดยใช้ สารละลาย supporting electrolyte ที่มี pH 3 ที่ประกอบด้วย $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ และ NaCl เข้มข้น 0.1 และ 0.02 M ตามลำดับ ถ้ามีองค์ประกอบที่ไม่ละลายปนอยู่ในน้ำ ผลไม้ให้ทำการ centrifuge แล้วกรองเอาเฉพาะส่วนที่ใสมาทำการวิเคราะห์

บันทึก voltammograms เมื่อเติมกรดฟูมาริกมาตรฐานปริมาณต่างๆ ลงในตัวอย่างน้ำผลไม้จาก peak current ที่หาได้นำไปคำนวณหาความเข้มข้นกรดฟูมาริกรวมในสารโดยใช้กราฟมาตรฐาน ละลาย และคำนวณหาความเข้มข้นของกรดฟูมาริกในตัวอย่างน้ำผลไม้จากกราฟ standard addition ค่าร้อยละของการกลับคืนสามารถคำนวณจาก :

$$\text{ร้อยละของการกลับคืน} = \frac{(A_{\text{found}} - A_{\text{calculated}}) \times 100}{A_{\text{added}}}$$

เมื่อ A_{found} คือ ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกที่คำนวณจากกราฟมาตรฐาน (calibration graph)

$A_{\text{calculated}}$ คือ ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกที่หาได้จากวิธี standard addition

A_{added} คือ ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกที่เติม

ก. กราฟมาตรฐาน

เปิดสารละลาย supporting electrolyte 9 ml และ น้ำกลั่น 1 ml ใส่ใน measuring cell จากนั้นทำการใส่ก๊าซออกซิเจนโดยผ่านก๊าซในโตรเจนลงไปในสารละลาย 3 นาที แล้วบันทึก voltammograms เมื่อเติมสารละลายกรดฟูมาริกมาตรฐานเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตรต่างๆ บันทึก voltammograms ได้ผลดัง รูป 1 (ดูภาคผนวก ก) หา peak current ได้ดังตาราง 2.22

ตาราง 2.22 ค่า peak current ของสารละลายมาตรฐานกรดฟูมาริกเข้มข้นต่างๆ

Fumaric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Peak current (nA)	Peak potential (mV)
1	25.17	-1040
2	44.08	-1032
4	82.55	-1032
6	108.30	-1024
7	136.30	-1024
9	164.40	-1024

จากผลในตาราง 2.22 จะได้สมการของกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นกรดฟูมาริกคือ

$$y = 17.0X + 11.32, r^2 = 0.9959$$

ข. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปีเปตตัวอย่างน้ำผลไม้ 1 ml และ สารละลาย supporting electrolyte 9 ml ใส่ใน measuring cell แล้วทำการใส่ก๊าซออกซิเจนโดยการผ่านก๊าซในโตรเจนลงไปในสารละลาย 3 นาที บันทึก voltammograms เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานกรดฟูมาริกเข้มข้น 100 µg/ml ในปริมาตรต่างๆ ได้ผลรูป 2 (ดูภาคผนวก ค) หา peak current และคำนวณค่าร้อยละการกลับคืนได้ดังตาราง 2.23

ตาราง 2.23 ค่าร้อยละของการกลับคืนของตัวอย่างน้ำผลไม้

Fumaric acid added (µg/ml)	น้ำฝรั่ง ตรา Tipco			น้ำพีช ตรา Ivy		
	Peak current (nA) ^a	Fumaric acid found (µg/ml) ^c	% recovery	Peak current (nA)*	Fumaric acid found (µg/ml) ^c	% recovery
0	32.74 (-1024) ^b	1	-	30.47 (-1024)	1	-
1	45.01 (-1016)	2	0	43.66 (-1024)	2	0
2	58.48 (-1016)	3	0	55.83 (-1024)	3	50
4	83.06 (-1008)	4	25	84.34 (-1024)	4	50

^a ค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ^b ค่าในวงเล็บคือ peak potential (mV) ^c โดย calibration graph ค่าที่ได้จากการ

วิเคราะห์โดยวิธี standard addition คือ 3 และ 2 µg/ml สำหรับ น้ำฝรั่งและน้ำพีช ตามลำดับ

2.4.6.2 วิธีมาตรฐาน

ได้ทำการศึกษาร้อยละของการกลับคืนของกรดฟูมาริกในตัวอย่างน้ำผลไม้โดยใช้วิธีมาตรฐาน (ดังภาคผนวก ก) หาปริมาณกรดฟูมาริกในน้ำผลไม้ โดยทำการทดลองดังนี้

ก. กราฟมาตรฐาน

ทำตามขั้นตอนและใช้สภาวะดังแสดงในภาคผนวก ก ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.24

ตาราง 2.24 ค่า peak current เมื่อใช้กรดฟูมาริกเข้มข้นต่างๆ

Fumaric acid concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peak current (nA) ^a
3	53.28 (-1080) ^b
10	160.05 (-1048)
15	233.15 (-1032)
20	290.70 (-1024)

^a ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ^b ค่า peak potential (mV)

จากผลในตาราง 2.24 จะได้สมการกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นกรดฟูมาริกคือ

$$y = 14.08 X + 15.28, r^2 = 0.9963$$

ข. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปีเปตตัวอย่างที่เตรียมแล้ว(ดังแสดงในภาคผนวก ก) 10 ml แล้วบันทึก voltammograms เมื่อเติมสารละลายกรดฟูมาริกมาตรฐาน 500 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตรต่างๆ ได้ผลดังรูป 3 (ดูภาคผนวก ก)และหา peak current และคำนวณค่าร้อยละของการกลับคืนได้ดังตาราง 2.25

ตาราง 2.25 ค่าร้อยละการกลับคืนของตัวอย่างน้ำผลไม้

Fumaric acid added ($\mu\text{g/ml}$)	น้ำฝรั่ง ตรา tipco			น้ำพีช ตรา ivy		
	Peak current (nA) ^a	Fumaric acid found ($\mu\text{g/ml}$) ^c	% recovery	Peak current (nA)	Fumaric acid found ($\mu\text{g/ml}$) ^c	% recovery
0	87.86 (-1016) ^b	5	-	80.97 (-1032)	6	-
5	142.5 (-1024)	9	80	144.7 (-1024)	9	60
10	198.3 (-1024)	13	80	202.83 (-1024)	13	70
15	252.30 (-1032)	17	80	265.2 (-1032)	18	80

^a ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ^b ค่า peak potential (mV) ^c โดย calibration graph ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี standard addition คือ 5 และ 6 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ น้ำฝรั่งและน้ำพีช ตามลำดับ

จากผลการคำนวณค่าร้อยละของการกลับคืนโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน ดังแสดงในตาราง 2.23 พบว่าค่าร้อยละของการกลับคืนมีค่าต่ำ (0-50%) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก matrix ในน้ำผลไม้ (ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของเกลือต่างๆ ในน้ำผลไม้) ซึ่งไม่เหมือนกับสารละลายที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน มีผลในการลดสัญญาณ(กระแสของฟลัก)ของกรดฟูมาริกในการทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง เมื่อนำสัญญาณดังกล่าวไปคำนวณความเข้มข้นของกรดฟูมาริกโดยใช้กราฟมาตรฐาน จะได้ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกน้อยกว่าที่ควรจะเป็น

จากค่าร้อยละการกลับคืนที่มีค่าต่ำ ทำให้ไม่สามารถใช้กราฟมาตรฐานคำนวณความเข้มข้นของกรดฟูมาริกในน้ำผลไม้ได้ (การหาความเข้มข้นของกรดฟูมาริกในน้ำผลไม้ในกรณีนี้จะใช้วิธี standard addition แทนเพื่อแก้ปัญหา matrix effect แต่จะใช้เวลาในการวิเคราะห์มาก)

เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงได้ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (ที่มากกว่า 0.02 M) ในการหาความเข้มข้นของกรดฟูมาริกในตัวอย่างน้ำผลไม้ เพื่อที่จะได้นำกราฟมาตรฐานมาใช้ในการหาความเข้มข้นของกรดฟูมาริกแทนการใช้วิธี standard addition

2.4.7 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ NaCl ในการหาความเข้มข้นของกรดฟูมาริก และ ค่าร้อยละการกลับคืน

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของ NaCl ในการหาความเข้มข้นของกรดฟูมาริกและค่าร้อยละการกลับคืนจะได้ทำการทดลองดังต่อไปนี้

เตรียมสารละลาย supporting electrolyte ที่มี pH 3 ที่ประกอบด้วย $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M และ NaCl เข้มข้นต่างๆ (0.02 0.2 และ 0.4 M)

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่เตรียมขึ้นนี้ทำการทดลองโดยใช้สภาวะเช่นเดียวกันกับข้อ 2.4.6.1 (ก) บันทึก voltammograms และหาค่า peak current ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.26 และนำผลที่ได้ในตาราง 2.26 ไปหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของกรดฟูมาริกได้ผลดังตาราง 2.27

ตาราง 2.26 ค่า peak current เมื่อใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี NaCl เข้มข้นต่างๆ

Fumaric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Peak current (nA) ^a		
	ความเข้มข้นของ NaCl (M)		
	0.02	0.2	0.4
1	19.57	18.05	16.06
2	35.2	33.98	29.81
4	68.16	61.50	57.27
7	126.57	112.40	104.47
9	157.50	140.80	133.07

^a ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตาราง 2.27 สมการกราฟมาตรฐานของกรดฟูมาริกเมื่อใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี NaCl เข้มข้นต่างๆ ($(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M)

ความเข้มข้น NaCl (M)	สมการกราฟมาตรฐาน	r^2
0.02	$Y = 17.0X + 2.28$	0.9996
0.20	$Y = 14.9X + 3.70$	0.9994
0.40	$Y = 14.2X + 1.80$	0.9988

2.4.7.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ NaCl ต่อการหาความเข้มข้นของกรดฟูมาริกในน้ำผลไม้

นำตัวอย่างน้ำผลไม้ (ถ้ามีองค์ประกอบที่ไม่ละลายปนอยู่ให้ทำการ centrifuge แล้วกรองเอาเฉพาะส่วนที่ใสมาทำการวิเคราะห์) มาทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดฟูมาริกโดยใช้กราฟมาตรฐานเทียบกับการวิเคราะห์โดยวิธี standard addition โดยทำการทดลองดังต่อไปนี้

ก. การหาความเข้มข้นของกรดฟูมาริกโดยใช้วิธี standard addition

ปิเปตตัวอย่าง 1 ml และ สารละลาย supporting electrolyte 9 ml ใส่ใน measuring cell ทำการใส่ก๊าซออกซิเจนโดยผ่านก๊าซไนโตรเจนลงไปในสารละลายเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นบันทึก voltammograms แล้วหาค่ากระแสของกรดฟูมาริก เมื่อเติมสารละลายกรดฟูมาริกมาตรฐานเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตรต่างๆ เขียนกราฟระหว่างค่ากระแส (แกน y) กับความเข้มข้นของกรดฟูมาริกที่เติม (แกน X) ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกจะได้ออกจากการหาค่าจุดตัดแกน X ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.28

ข. การหาความเข้มข้นของกรดฟูมาริกโดยใช้กราฟมาตรฐาน

ปิเปตตัวอย่าง 1 ml และสารละลาย supporting electrolyte 9 ml ใส่ใน measuring cell ทำการใส่ก๊าซออกซิเจนโดยผ่านก๊าซไนโตรเจนลงไปในสารละลายเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นบันทึก voltammograms แล้วหาค่ากระแสของกรดฟูมาริก จากค่ากระแสของกรดฟูมาริกที่ได้นำไปคำนวณความเข้มข้นของกรดฟูมาริกโดยใช้กราฟมาตรฐานในตาราง 2.27 ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.28

ตาราง 2.28 ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกในน้ำพืช

ความเข้มข้น NaCl (M)	ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกในน้ำพืชตรา Ivy ($\mu\text{g/ml}$)	
	Standard addition (n=3)	Calibration curve (n=3)
0.02	23 ± 3	19 ± 2
0.2	20 ± 2	21 ± 1
0.4	25 ± 2	24 ± 3

ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกที่วิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน (สภาวะดังแสดงในภาคผนวก ก) มีค่า $20 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ (n=3)

2.4.7.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ NaCl ต่อการหำร้อยละการกลับคืน

ทำการทดลองและใช้สภาวะเช่นเดียวกันกับข้อ 2.4.7.1 (ก) ค่าร้อยละการกลับคืนจะคำนวณโดยใช้สมการในข้อ 2.4.6.1 ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.29

ตาราง 2.29 ค่าร้อยละการกลับคืนของน้ำพืช

Fumaric acid added ($\mu\text{g/ml}$)	NaCl 0.02 M			NaCl 0.2 M			NaCl 0.4 M		
	I(nA) ^a	Fumaric acid found ($\mu\text{g/ml}$)	% recovery	I(nA) ^a	Fumaric acid found ($\mu\text{g/ml}$)	% recovery	I(nA) ^a	Fumaric acid found ($\mu\text{g/ml}$)	% recovery
0	34.77	2.0 ^b	-	34.63	2.1 ^b	-	38.15	2.6 ^b	-
1	48.40	2.7	70	47.79	3.0	90	51.17	3.5	90
2	59.43	3.4	70	61.00	3.8	85	64.51	4.4	90
3.8	88.03	5.0	79	93.67	6.0	103	92.94	6.4	100

^a ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ^b ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกใน measuring solution ที่วิเคราะห์จากวิธี standard addition

จากผลการทดลองในตาราง 2.28 ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกที่วิเคราะห์ โดยใช้การคำนวณ โดยใช้กราฟมาตรฐานมีความสอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์ โดยวิธี standard addition เมื่อใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี NaCl เข้มข้น 0.2 และ 0.4 M และผลในตาราง 2.29 ค่าร้อยละของการกลับคืนเมื่อใช้ NaCl เข้มข้น 0.2 และ 0.4 M มีค่าดีกว่าเมื่อใช้ NaCl เข้มข้น 0.02 M

ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่าเมื่อใช้ NaCl เข้มข้น 0.2 และ 0.4 M จะมีผลไปลดการแพร่(diffusion) ของกรดฟูมาริก ทำให้ค่ากระแสที่เกิดจากการแพร่(diffusion current)มีค่าลดลง ดังจะเห็นได้จากค่ากระแสของพีคมีค่าลดลง และค่าความชันของกราฟมาตรฐานมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl (ดูตาราง 2.27) ดังนั้นเมื่อนำค่ากระแสที่อ่านได้ไปคำนวณความเข้มข้นของกรดฟูมาริกโดยใช้กราฟมาตรฐานจะให้ผลความเข้มข้นของกรดฟูมาริกที่สูงขึ้น นั่นคือผลของความเข้มข้นของ NaCl ที่มีต่อกระแสของกรดฟูมาริกที่เกิดขึ้นในตัวอย่างน้ำผลไม้จะเกิดขึ้นเช่นเดียวกันกับในกรณีของการสร้างกราฟมาตรฐานของกรดฟูมาริกมาตรฐาน ทำให้ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกโดยใช้กราฟมาตรฐานมีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธี standard addition

เมื่อพิจารณาสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มี NaCl เข้มข้น 0.2 และ 0.4 M จะเห็นว่ามีความร้อยละของการกลับคืนใกล้เคียงกัน (ดูตาราง 2.29) แต่ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดฟูมาริกเมื่อใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มี NaCl เข้มข้น 0.2 M มีความสอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์จากวิธีมาตรฐานมากกว่าเมื่อใช้ NaCl เข้มข้น 0.4 M ดังนั้นจะเลือกใช้สารละลาย supporting electrolyte ที่มี NaCl เข้มข้น 0.2 M ($(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M และ pH 3) มาใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดฟูมาริกในตัวอย่างน้ำผลไม้

2.4.8 สรุปสถานะที่เหมาะสมที่ควรใช้ในการวิเคราะห์

จากที่ได้ทำการศึกษาอาจสรุปได้ว่าสถานะที่เหมาะสมที่ควรใช้ในการวิเคราะห์คือ ใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มี pH 3 ที่ประกอบด้วย $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ 0.1 M และ NaCl 0.2 M

2.4.9 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผลไม้

ได้นำตัวอย่างน้ำผลไม้มาทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นกรดฟูมาริก โดยใช้สถานะและวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.4.7.1 (ข) ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.30

ตาราง 2.30 ปริมาณกรดฟูมาริกที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำผลไม้	Fumaric acid concentration ($\mu\text{g/ml}$)*	
	Modified standard method	Standard method
น้ำฝรั่ง ตรา Tipco **	28 ± 2	20 ± 1
น้ำพีช ตรา Ivy	21 ± 3	20 ± 1
น้ำองุ่นแดง ตรา Tipco	28 ± 2	29 ± 4
น้ำแอปเปิล ตรา Tipco	ND	ND

* Mean $\pm$ SD, จากการทดลอง 3 ซ้ำ และ ** จากการทดลอง 5 ซ้ำ, ND คือ not detectable