การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่างน้ำส้มสายชูด้วยเทคนิคแลปออนไมโครเพลทโดยใช้สารสกัดจากกะหล่ำปลีแดงเป็นรีเอเจนต์ธรรมชาติ

นภาพร วรรณาพรม และเยาวลักษณ์ ขันหัวโทน*

Determination of acetic acid in vinegar samples with lab-on-microplate technique by using red cabbage extracts as natural reagent

Napaporn Wannaprom and Yaowalak Khanhuathon*

สาขาวิชาเคมี คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย เชียงราย 57100

Chemistry Program, Faculty of Education, Chiang Rai Rajabhat University, Chiang Rai, 57100

*Corresponding author. E-mail: fonyaowalak@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิคที่มีราคาประหยัดสามารถวิเคราะห์นอกสถานที่ได้ด้วยเทคนิคแลปออนไมโครเพลทร่วมกับการถ่ายรูป โดยใช้สารสกัดกะหล่ำปลีแดงเป็นรีเอเจนต์ธรรมชาติในการหาปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่างน้ำส้มสายชู โดยได้มีการศึกษาตัวแปรต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อสภาพไววิเคราะห์และค่าความแม่นยำ จากการศึกษาลักษณะสเปกตราของสารที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไซยานิดินที่เป็นสารกลุ่มแอนโทไซยานิน กับกรดอะซิติกให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 nm ค่าภาวะการทดลองที่เหมาะสมของ ความเข้มแสง RGB ความเข้มข้นของสารสกัดกะหล่ำปลีแดง เวลาในการสกัด และอัตราส่วนปริมาตรของสารสกัดธรรมชาติกับสารตัวอย่างเท่ากับ ความเข้มแสงสีแดง 80 %w/v 20 นาที และ 150:150 μL ตามลำดับ พบว่า ภายใต้ภาวะการทดลองที่เหมาะสมข้างต้นให้ช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติก ในช่วง 0.25-2.00 %w/v โดยได้สมการเส้นตรง $y = 10.39x + 46.731$, $R^2 = 0.9038$ ค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์ของกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.25, 1.00 และ 2.00 %w/v พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.9, 3.9 และ 3.2 ตามลำดับ ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดและค่าต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ % 0.025w/v และ 0.07 %w/v ตามลำดับ โดยร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 80.4-90.2 % ทั้งนี้ได้มีการประยุกต์ใช้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้น สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่าง ซึ่งเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีมาตรฐานโดยทดสอบทางสถิติแบบที พบว่าทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Df. = 9) สามารถกล่าวได้ว่า วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องแม่นยำสูง เป็นเทคนิคที่มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และราคาประหยัด

คำสำคัญ: กรดอะซิติก น้ำส้มสายชู แลปออนไมโครเพลท รีเอเจนต์ธรรมชาติ เคมีสีเขียว แสงสีแดง เขียว และน้ำเงิน

Abstract

This work has been developed a cost effective and portable method for acetic acid determination in vinegar samples with red cabbage extracts as a natural reagent by using lab-on-microplate with a camera as a detector. The various parameters which are effect on sensitivity and precison were studied. Spectral characteristic of proposed compound which is produced between cyadinin-based anthocyanin pigments with acetic acid reaction was studied. It was found that the maximum absorbance of proposed compound at 515 nm. The suitable of RGB color intensity, concentration of natural extracts, extraction time and the volume ratio between natural extracts:sample were R color intensity, 80 %w/v, 20 min and 150:150 μL, respectively. Under the optimum condition, the linearity range was 0.25-2.00 %w/v of acetic acid concentration ($y = 10.39x + 46.731$, $R^2 = 0.9038$). The precision of proposed method were studied on 0.25, 1.00 and 2.00 %w/v, the result found that %RSD were 4.9, 3.9 and 3.2, respectively. The limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were 0.025 and 0.07 %w/v with %recovery in the range of 80.4-90.2 %. In addition, the proposed method was applied for acetic acid determination in vinegar samples. The results were compared with standard method by t-test. It was found that both methods not significant different at 95 % interval level (Df. =9). It could be indicated that this work offers high precision and accuracy, environmental friendly and cost-effective.

Keywords: Acetic acid, Vinegar samples, Lab-on-microplate, Natural reagent, Green chemistry, RGB

บทนำ

กรดอะซิติก (Acetic Acid, CH_3COOH) หรือกรดน้ำส้ม ซึ่งจัดเป็นกรดอินทรีย์ที่พบได้ในธรรมชาติ มีสมบัติเป็นกรดอ่อน สารละลายใสไม่มีสี มีกลิ่นฉุน รสเปรี้ยว สามารถละลายได้ในน้ำและแอลกอฮอล์ ใช้เป็นสารเติมแต่งรสอาหาร ช่วยรักษาค่าพีเอชในอาหาร และยังเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสีย้อม ยาฆ่าแมลง กาว และพอลิเมอร์ เป็นต้น กรดอะซิติกมีฤทธิ์กัดกร่อน ถ้าร่างกายได้รับในปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลเสียต่อระบบทางเดินอาหาร ตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้กรดน้ำส้มหรือน้ำส้มสายชูควรมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกอยู่ร้อยละ 4 ถ้าเป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักธรรมชาติ และร้อยละ 4–7 ในน้ำส้มสายชูสังเคราะห์ (Ministry of public Health, 2000) ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่างน้ำส้มสายชูจะวิเคราะห์โดยวิธีการไทเทรตกรด–เบส ซึ่งจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกกับโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยใช้ฟีนล์อฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ จัดเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ง่าย แต่อาจทำให้เกิดของเสียจากการวิเคราะห์ในปริมาณมาก รวมทั้งใช้อินดิเคเตอร์ที่เป็นสารเคมี (Horwitz, 2000) ดังนั้น ในปี ค.ศ. 1990 ได้มีการเสนอแนวคิดเกี่ยวกับเคมีสีเขียว (Green chemistry) ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อลดปริมาณของเสียจากการวิเคราะห์ การใช้ตัวทำละลาย และรีเอเจนต์ที่มีความปลอดภัย และลดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการนำเสนอการวิเคราะห์ระดับไมโคร ที่พยายามนำทุกขั้นตอนการวิเคราะห์ไว้ในเครื่องมือเดียว และเกี่ยวข้องกับสารในระดับไมโครลิตร ใช้รีเอเจนต์ธรรมชาติแทนสารเคมีที่เป็นพิษหรืออันตราย (Anastas, 1999; Manz, et al., 1990) ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้เทคนิคการไหลควบคู่กับการใช้รีเอเจนต์ธรรมชาติ เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กโดยใช้สารสกัดจากใบฝรั่งร่วมกับเทคนิคโฟลอินเจคชัน อะนาลิซิส (Flow injection analysis) (Settheeworrarit, et al., 2005) และชาเขียวร่วมกับเทคนิคซีเควนเชียล อินเจคชัน อะนาลิซิส (Sequential injection analysis) (Pinyou, et al., 2010) และตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ การวิเคราะห์หาปริมาณอะลูมิเนียมโดยใช้สารสกัดจากแก่นฝาง (Siriangkhawut, et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีการรายงานเกี่ยวกับการใช้ขมิ้นชันกับมะนาวเป็นรีเอเจนต์ธรรมชาติในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกด้วยเทคนิค ซีเควนเชียล อินเจคชัน อะนาลิซิส (Supharoek, et al., 2018) และได้มีการใช้สารสกัดจากดอกบานไม่รู้โรยในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกด้วยเทคนิคแลป-ออน-ชิป (Lab-on-chip) อย่างง่าย (Ueda, et al., 2010) ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาการวิเคราะห์แบบลดขนาดและใช้รีเอเจนต์ธรรมชาติตามแนวคิดเคมีสีเขียว โดยจะใช้สารสกัดจากกะหล่ำปลีแดง (Red cabbage) ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Brassicaoleraceae L.var.* ซึ่งเป็นพืชที่มีรงควัตถุที่ให้สีแดง สีน้ำเงิน กับพืช มีสารประกอบเคมีที่สำคัญคือ ไซยาดินิน (Cyadinin) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี และเปลี่ยนสีได้เมื่อค่าพีเอชเปลี่ยน โดยจะมีสีแดงชมพูในภาวะที่เป็นกรด สีม่วงในภาวะที่เป็นกลาง และสีน้ำเงินอมเขียวถึงสีเหลืองในภาวะที่เป็นเบส (วงศ์ชูพันธ์ และคณะ, 2016; Ahmadiani, et al., 2016) สารสกัดจากกะหล่ำปลีแดงจัดเป็นอินดิเคเตอร์ธรรมชาติที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและสีย้อมสำหรับยา (Chigurupati, et al., 2002) รวมทั้งมีรายงานการใช้เป็นสีย้อมฟิล์มในการตรวจวัดพีเอช (Prietto, et al, 2017) ในปี ค.ศ. 2014 ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้กะหล่ำปลีแดงเป็นรีเอเจนต์ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะทรานซิชัน 4 ชนิด และตรวจวัดค่าสีด้วยตาเปล่า (Khaodee, et al., 2014)

การวิเคราะห์แบบลดขนาดอย่างง่ายและราคาประหยัดสำหรับการตรวจวัดค่าสี (Colorimetric detection) เช่น การตรวจวัดด้วยตาเปล่าควบคู่กับการใช้นาฬิกาจับเวลาด้วยเทคนิคแลปออนชิป (Lab-on-chip) อย่างง่าย ซึ่งวิธีนี้ได้มีการสาธิตในการวิเคราะห์หาปริมาณกรด เบส เหล็ก และกรดแอสคอบิก (Krudpan, et al., 2009) และเพื่อให้เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น จึงได้มีการพัฒนาจากการใช้ตาเปล่าในการตรวจวัดเป็นการใช้กล้องเวปแคมในการวิเคราะห์ความเข้มแสงของสีแดง เขียว และน้ำเงิน (RGB) ในการวิเคราะห์ปริมาณกรด (Wongwilai, et al., 2010) ซึ่งงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นนั้นสามารถวิเคราะห์ได้ทีละหนึ่งตัวอย่างต่อการตรวจวัด ดังนั้นจึงได้มีรายงานการพัฒนาการวิเคราะห์โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาในไมโครเพลทร่วมกับการตรวจวัดค่าสี เช่น ในงานวิจัยที่มีการตรวจวัดคาร์โบไฮเดรตในตัวอย่างน้ำเสียที่ผ่านการบำบัด (Le and Stuckey, 2016)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจใช้สารสกัดจากกะหล่ำปลีแดงเป็นรีเอเจนต์ธรรมชาติสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่างน้ำส้มสายชูด้วยเทคนิคแลปออนไมโครเพลท (Lab-on-microplate) ทั้งนี้จะได้มีการนำเอาไมโครเพลทขนาด 96 หลุมที่มีปริมาตรระดับไมโครลิตรมาใช้เป็นอุปกรณ์ในการเกิดปฏิกิริยา ควบคู่กับการถ่ายรูปในกล่องควบคุมแสง และนำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ความเข้มแสง RGB โดยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ซึ่งจะได้วิธีการวิเคราะห์ที่ลดขนาดระดับไมโครลิตร สามารถตรวจวัดได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน มีราคาประหยัด เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีไทเทรตซึ่งใช้อุปกรณ์ที่มีขนาดใหญ่ และสารเคมีหลายชนิดที่มีราคาแพง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและยังสามารถวิเคราะห์นอกสถานที่ได้ รวมทั้งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเรียนการสอนทางด้านเคมีได้

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติกความเข้มข้น 50 %w/v

เตรียมโดยการเจือจางสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น (CH_3COOH, $\geq$ 99.8%, AR grade, RCI-Labscan) แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI) ให้ได้ความเข้มข้น 50 %w/v จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไป

หาค่าความเข้มข้นที่แน่นอน โดยการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ และใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานด้วยน้ำ DI ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 0.25-2.00 %w/v

การเตรียมสารสกัดจากกะหล่ำปลีแดง

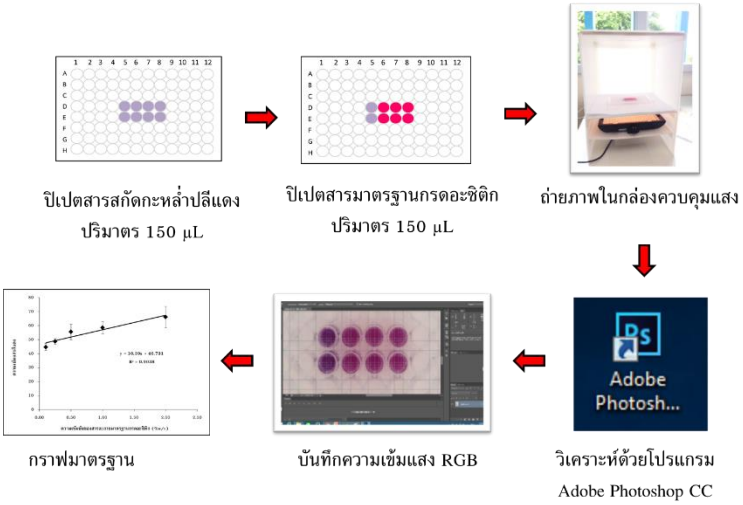
นำกะหล่ำปลีแดงที่ล้างและผึ่งให้แห้งแล้วนำมาหั่นให้ละเอียดมาชั่งปริมาณ 100 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ นำไปบดในโกร่งให้ละเอียด จากนั้นถ่ายเทใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำ DI 80 มิลลิลิตร ลงไปในบีกเกอร์ดังกล่าว จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อสกัดสารไซยาดินิน (Cyadinin) ออกมา นำไปกรองแบบหยาบด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปกรองอย่างละเอียดอีกครั้งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) เก็บสารสกัดที่กรองได้ในขวดสีชาก่อนนำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป โดยเตรียมใหม่ทุกครั้งสำหรับแต่ละครั้งของการวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำส้มสายชูที่ซื้อจากร้านค้าในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงราย มาทำการเจือจาง 5 เท่า ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกด้วยเทคนิคแลปออนไมโครเพลทโดยใช้สารสกัดจากกะหล่ำปลีแดงเป็นรีเอเจนต์ธรรมชาติ

ปิเปตสารสกัดกะหล่ำปลีแดงปริมาตร 150 µL และสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 150 µL ลงในถาดหลุมขนาด 96 หลุม (96 well plate) นำถาดหลุมที่เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดกับสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติกไปถ่ายภาพในกล่องควบคุมแสง นำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มแสงของแสงสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน (RGB) ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CC และนำค่าความเข้มแสงของแสง RGB ไปทำการสร้างกราฟมาตรฐาน ขั้นตอนการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 1 จากนั้นนำตัวอย่างน้ำส้มสายชูไปทำการวิเคราะห์ และนำค่าความเข้มแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานจะได้ปริมาณกรดอะซิติกที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง



รูปที่ 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกด้วยเทคนิคแลปออนไมโครเพลทโดยใช้สารสกัดจากกะหล่ำปลีแดงเป็นรีเอเจนต์ธรรมชาติ

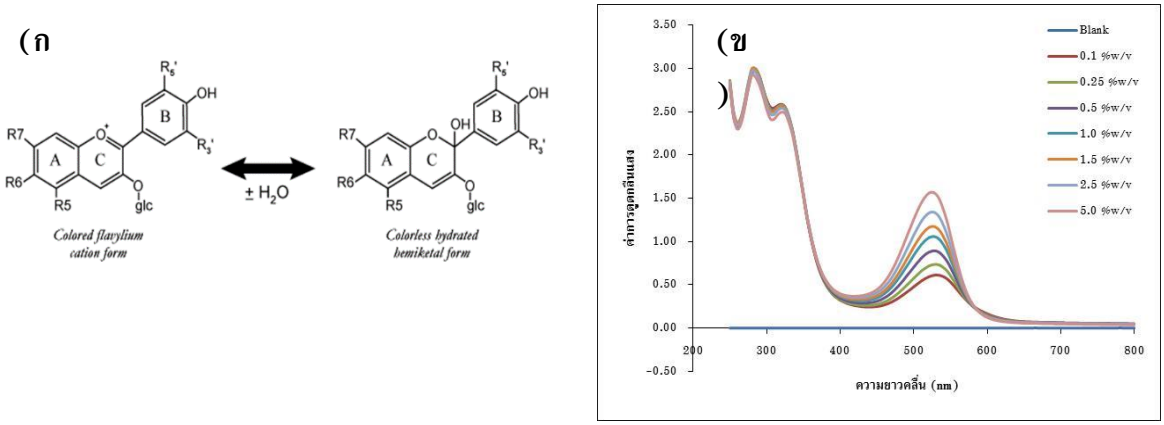
การศึกษาลักษณะสเปกตราของการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดกะหล่ำปลีแดงกับสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติก

ปิเปตสารสกัดกะหล่ำปลีแดงความเข้มข้น 40 %w/v ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตรลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในขวดวัดปริมาตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำ DI ตั้งสารละลายผสมทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงซึ่งวัดเทียบกับน้ำ DI โดยทำการแสกนในช่วงความยาวคลื่น 250–800 nm ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Thermo Scientific Genesys 840-208100 UV–Visible spectrophotometer)

ผลการศึกษา

ลักษณะสเปกตราของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดกะหล่ำปลีแดงกับสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติก

เมื่อทำการสกัดกะหล่ำปลีแดงด้วยน้ำ สารละลายที่สกัดได้มีสีม่วงอมน้ำเงินซึ่งเป็นสีที่เกิดจากรงควัตถุของสารประกอบกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanins) ซึ่งสารดังกล่าวจะเปลี่ยนแปลงสีขึ้นกับค่าพีเอชของสารละลาย เมื่ออยู่ในสารละลายพีเอช 7–8 สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินที่อยู่ในรูปแอนไฮดราเบส แอนไอออน (Anhydrabase anion) และในช่วงพีเอชมากกว่า 3 สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดงที่อยู่ในรูปฟลาวิเลียม แคทไอออน (Flavylium cation) (Raymond Brouillard, et al, 1977) ซึ่งกรดอะซิติกเป็นกรดอ่อนมีค่าพีเอช 3–4 ดังนั้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มแอนโทไซยานินเกิดเป็นสารในรูปฟลาวิเลียม แคทไอออน ดังแสดงในรูป 2 (ก) และจากการศึกษาลักษณะสเปกตราของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดกะหล่ำปลีแดงกับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงความยาวคลื่น 250–800 nm พบว่า สารละลายสีแดง (Magenta red) ที่เกิดจากปฏิกิริยาจะเข้มขึ้นตามความเข้มข้นของกรดอะซิติก และแสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ความยาวคลื่น 515 nm แสดงดังรูปที่ 2 (ข) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดกะหล่ำปลีแดงสามารถใช้เป็นรีเอเจนต์ธรรมชาติในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกได้



รูปที่ 2 (ก) แสดงการปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารกลุ่มแอนโทไซยานินเมื่อค่าพีเอชของสารละลายเปลี่ยนไป และ (ข) แสดงลักษณะสเปกตราของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดกะหล่ำปลีแดงกับกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงความยาวคลื่น 250–800 nm

การหาภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาตัวแปรต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์และความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาผลความเข้มของแสง RGB, ความเข้มข้นของกะหล่ำปลีแดง, เวลาในการสกัดสาร และอัตราส่วนระหว่างสารสกัดธรรมชาติกับสารมาตรฐานกรดอะซิติกหรือตัวอย่าง ผลการทดลองอธิบายได้ดังนี้

ผลการศึกษาความเข้มข้นของกะหล่ำปลีแดง

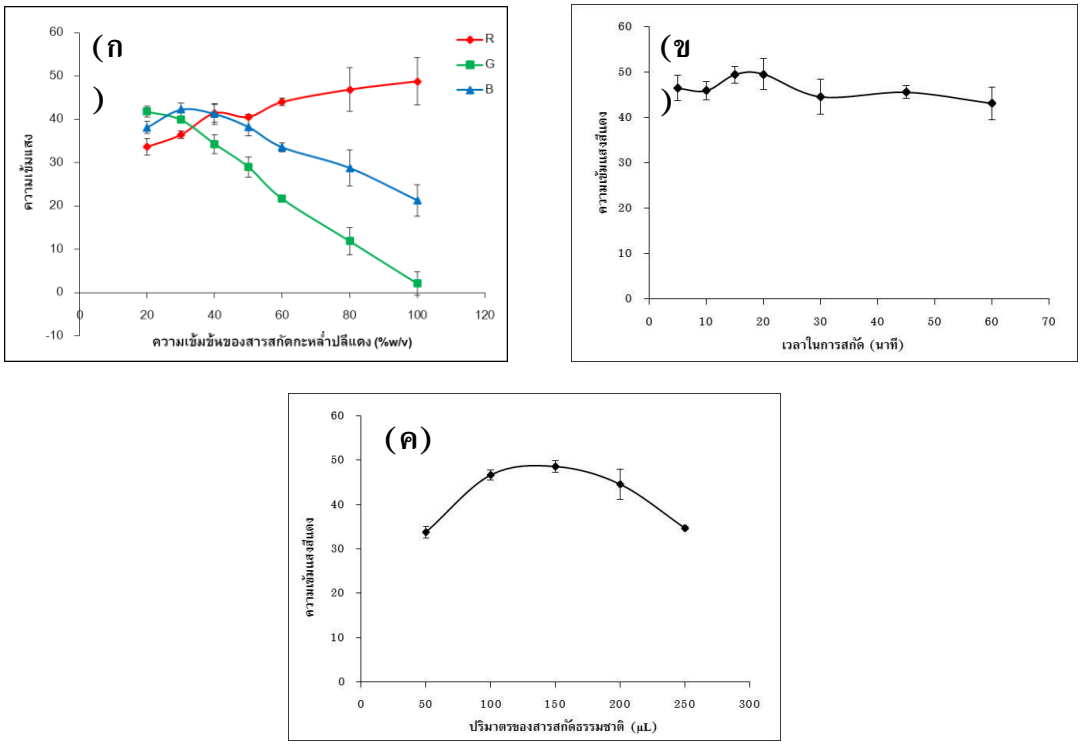
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกะหล่ำปลีแดงในช่วง 10–100 %w/v พบว่า เมื่อทำการสร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มแสง (Intensity) ของแสงสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน (RGB) กับความเข้มข้นของสารสกัดกะหล่ำปลีแดง พบว่า ค่าความเข้มแสงของแสงสีแดงมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นช่วง 20 – 100 %w/v แต่ค่าความเข้มแสงที่ความเข้มข้น 80 และ 100 %w/v ไม่แตกต่างกันมาก และเมื่อความเข้มข้นสารสกัดกะหล่ำปลีแดงเพิ่มขึ้น จะทำให้บดบังสีที่แท้จริงจากการทำปฏิกิริยา และทำให้ค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์ลดลง ส่วนความเข้มแสงของแสงสีเขียวและน้ำเงินมีแนวโน้มลดลง แสดงดังรูปที่ 3 (ก) ดังนั้น จึงเลือกตรวจวัดค่าความเข้มแสงสีแดง และเลือกความเข้มข้นของกะหล่ำปลีแดงที่ 80 %w/vเพื่อประหยัดปริมาณกะหล่ำปลีแดงในการวิเคราะห์ ซึ่งจะใช้ค่าที่เหมาะสมดังกล่าวในการวิเคราะห์ตัวแปรอื่น ๆ ต่อไป

ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัดกะหล่ำปลีแดง

เนื่องจากสารในกลุ่มแอนโทไซยานินมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัด อีกทั้งน้ำเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาผลของเวลาในการสกัดใน 5–60 นาที พบว่า ค่าความเข้มแสงสีแดงมีค่าเพิ่มขึ้น ในช่วงเวลา 5–20 นาที จากนั้นค่าความเข้มแสงลดลงเล็กน้อยและคงที่จนถึงเวลา 60 นาที ดังรูปที่ 3 (ข) ที่เวลาน้อยกว่า 20 นาที เวลาอาจไม่มากพอต่อการสกัดสารออกจากกะหล่ำปลีแดง และที่เวลามากกว่า 20 นาที อาจเกิดการสลายตัวของสารสกัดกะหล่ำปลีแดง โดยพบว่าที่เวลาในการในการสกัด 20 นาที ของสารสกัดกะหล่ำปลีแดง ให้ค่าความเข้มแสงที่สูงที่สุด และ %RSD ที่ต่ำที่สุด รวมไปถึงยังประหยัดเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงเลือกที่เวลาในการสกัดที่ 20 นาที ใช้ในการวิเคราะห์ตัวแปรอื่น ๆ ต่อไป

ผลการศึกษาอัตราส่วนของสารสกัดธรรมชาติกับสารตัวอย่าง

จากการศึกษาตัวแปรอัตราส่วนของสารสกัดธรรมชาติกับกรดอะซิติกในช่วง 50:250, 100:200, 150:150, 200:100 และ 250:50 μL จากผลการทดลองในรูปที่ 3 (ค) พบว่า ค่าความเข้มแสงของแสงสีแดงมีแนวโน้มค่อย ๆ สูงขึ้นและสูงที่สุดที่อัตราส่วนสารสกัดธรรมชาติกับกรดอะซิติก 150:150 μL และหลังจากนั้นค่าความเข้มแสงจะค่อย ๆ ลดลง ที่อัตราส่วนที่มีปริมาณสารสกัดธรรมชาติมากกว่ากรดอะซิติกจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการบดบังของสีที่เกิดจากปฏิกิริยา และในกรณีที่ปริมาณสารสกัดธรรมชาติน้อยกว่าปริมาณของกรดอะซิติกจะทำให้ไม่เพียงพอในการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้น ค่าความเข้มแสงจึงลดลง และพบว่าที่ปริมาณของสารสกัดธรรมชาติกับกรด อะซิติกที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา คือ 150:150 μL



รูปที่ 3 แสดงการศึกษา (ก) ผลของความเข้มข้นของสารสกัดกะหล่ำปลีแดงกับค่าความเข้มแสงของแสงสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน (RGB) (ข) ผลของเวลาในการสารสกัดกะหล่ำปลีแดง และ (ค) ผลของอัตราส่วนของสารสกัดธรรมชาติกับสารตัวอย่าง

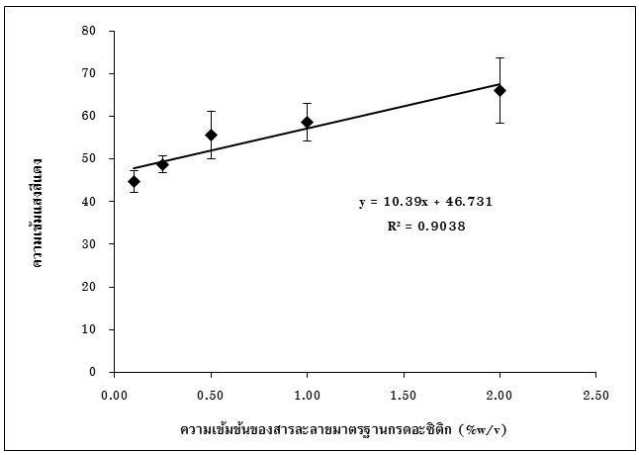
จากการศึกตัวแปรต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ สามารถสรุปภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกด้วยเทคนิคแลปออนไมโครเพลทโดยใช้สารสกัดจากกะหล่ำปลีแดงเป็นรีเอเจนต์ธรรมชาติได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงภาวะการทดลองที่เหมาะสม

ตังแปรที่ศึกษา	ช่วงที่ศึกษา	ค่าที่เหมาะสม
ความเข้มข้นของกะหล่ำปลีแดง	10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 และ 100 %w/v	80 %w/v
ค่าความเข้มแสงของสีที่เหมาะสม	แสงสีแดง (R), สีเขียว (G), สีน้ำเงิน (B)	แสงสีแดง (R)
เวลาที่ใช้ในการสกัดกะหล่ำปลีแดง	5, 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที	20 นาที
อัตราส่วนระหว่างสารสกัดธรรมชาติ:สารตัวอย่าง	50:250, 100:200, 150:150, 200:100, 250:50 μL	150:150 μL

ค่าคุณลักษณะทางการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกด้วยเทคนิคแลปออนไมโครเพลท

จากการหาภาวะการทดลองที่เหมาะสมสามารถนำมาหาค่าคุณลักษณะทางการวิเคราะห์ได้ โดยพบว่าช่วงการใช้งานที่เป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติกอยู่ในช่วง 0.25–2.00 %w/v ($y = 10.39x+46.731$, $R^2 = 0.90380$) แสดงดังรูปที่ 4 พบว่า ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) เท่ากับ 0.025 %w/v และ 0.07 %w/v ตามลำดับ และจากการศึกษาค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติก 0.25, 1.00 และ 2.00 %w/v ด้วยการวัดสัญญาณความเข้มแสงสีแดงจำนวน 6 ครั้ง พบว่า ค่า % RSD เท่ากับ 4.9, 3.9 และ 3.2 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า %RSD น้อยกว่า 5% แสดงว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำสูง นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้หาค่าการคืนกลับ (%Recovery) โดยได้ศึกษาด้วยการเติมสารมาตรฐานกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 %w/v ในตัวอย่างน้ำส้มสายชูในขั้นตอนการเจือจางตัวอย่าง 5 เท่า ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น โดยทำการเทียบค่าสัญญาณที่ได้ข้างต้นกับสารมาตรฐานกรดอะซิติก 0.5 %w/v ตามสูตรการหาค่าการคืนกลับ (%Recovery) พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 80.4–90.2 %



รูปที่ 4 กราฟแสดงช่วงความเป็นเส้นตรงจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดอะซิติกกับค่าความเข้มแสงของแสงสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน (RGB)

การประยุกต์ใช้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่างน้ำส้มสายชู

งานวิจัยนี้ได้นำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ตัวอย่างมาจากท้องตลาดจำนวน 10 ตัวอย่าง เทียบกับผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีการไทเทรตซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน จากการทดลองพบว่า ปริมาณกรดอะซิติกที่อยู่ในตัวอย่างน้ำส้มสายชูมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 3.59±0.67–5.37±0.17 %w/v (ตารางที่ 2) เมื่อทดสอบทางสถิติแบบที (t-test) ระหว่างวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน พบว่า ค่าที่วิเคราะห์ได้ทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 2 การประยุกต์ใช้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชู

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของกรดอะซิติก (%w/v) ที่ปรากฏบนฉลาก	ปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่าง %)w/v)	
		วิธีที่พัฒนาขึ้น	วิธีมาตรฐาน
1	5	4.75 ± 0.69	4.77 ± 0.05
2	5	5.10 ± 0.76	5.09 ± 0.05
3	5	5.21 ± 0.22	5.18 ± 0.05

4	5	5.37± 0.17	5.33 ± 0.00
5	5	4.32 ± 0.06	4.38 ± 0.05
6	5	4.85 ± 0.21	4.97 ± 0.09
7	5	4.94 ± 0.35	4.94 ± 0.05
8	5	3.59 ± 0.67	3.52 ± 0.05
9	6	4.48 ± 0.68	4.44 ± 0.09
10	5	4.67 ± 0.27	4.91 ± 0.05

อภิปรายผลการศึกษา

ในงานวิจัยนี้ใช้สารสกัดจากกะหล่ำปลีแดงเป็นรีเอเจนต์ธรรมชาติที่ประกอบด้วยรงควัตถุม่วงอมน้ำเงินของสารไซยาดินินซึ่งอยู่ในกลุ่มแอนโทไซยานิน เมื่อสารนี้ทำปฏิกิริยากับกรดจะเปลี่ยนรูปจากแอนไฮดราเบส แอนไอออน (Anhydrabase anion) เป็นรูปฟลาวิเลียม แคทไอออน (Flavylium cation) ซึ่งสารละลายจะมีสีแดงให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 515 nm จากปฏิกิริยาข้างต้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติก ร่วมกับการวิเคราะห์แบบลดขนาดด้วยเทคนิคแลปออนไมโครเพลท (Lab-on-microplate) และทำการตรวจวัดด้วยกล้องถ่ายรูปและวิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ซึ่งพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดตัวอย่างได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่มีราคาประหยัดเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมวิเคราะห์นอกสถานที่ได้ แต่เนื่องจากว่าสารที่สกัดได้ยังไม่บริสุทธิ์ ทั้งนี้เพื่อให้ได้การวิเคราะห์ที่มีสภาพไววิเคราะห์ และความถูกต้องแม่นยำมากขึ้นอาจจำป็นต้องแยกสารประกอบแอนโทไซยานินจากกะหล่ำปลีแดงเพื่อใช้เป็นรีเอเจนต์

สรุปผลการศึกษา

เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ในงานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิคที่มีราคาประหยัด โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติกกับสารสกัดกะหล่ำปลีแดงด้วยเทคนิคแลปออนไมโครเพลท (Lab-on-microplate) ร่วมกับการถ่ายรูปและวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ และพบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องและแม่นยำ และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย และคณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงรายที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยประกอบด้วยนายคณิศร แดนไตรมาศสิงขร นายวัชรพงษ์ นันตาชัยวุฒิ และนางสาวปติญญา ลือชา

เอกสารอ้างอิง

รัตนา วงศ์ชูพันธ์ และคณะ. (2559). พืชมีสีกับการเป็นอินดิเคเตอร์ธรรมชาติ. *Rajabhat Journal of Sciences, Humanities & Social Sciences*, *17*, 74-83

Anastas, P. T. (1999). Green chemistry and the role of analytical methodology development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *29*, 167-175.

Ahmadiani, N., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2016). Molar absorptivity (ε) and spectral characteristics of cyanidin-based anthocyanins from red cabbage, *Food Chemistry*, *197*, 900-906.

Brouillard, R., & Dubois J-E. (1977). Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of American the Journal Society*, 9, 1359-1364.

Chigurupati, N., Saiki, L., Gayser, C., & Dash, A. K. (2002). Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use, *International Journal of Pharmaceutics*, *241*, 293-299.

Grudpan, K., Lapanantnoppakhun, S., Hartwell S. K., Watla-iad, K., Wongwilai, W., Siriangkhawut, W., Jangbai, W., Kumutanat, W., Nuntaboon, P., & Tontrong, S. (2009). Simple lab-on-chip approach with time-based detection. *Talanta*, *79*, 990-909.

Horwitz W. (2000). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International*. 17 ed. Maryland: AOAC International.

Khaodee, W., Aeungmaitrepirom, W., & Tuntulani, T. (2014). Effectively simultaneous naked-eye detection of Cu(II), Pb(II), Al(III) and Fe(III) using cyanidin extracted from red cabbage as chelating agent. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *126*, 98-104.

Le, C., & Stuckey, D. C. (2016). Colorimetric measurement of carbohydrates in biological wastewater treatment systems: a critical evaluation. *Water Research*, *94*, 280-287.

Manz A., Graber N., & Widmer H.M. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *1*, 244-248.

Ministry of Public Health. (2000). *Notification of the Ministry of public Health* (No. 204): vinegar., Bangkok: Prachachon.

Pinyou, P., Hartwell, S.K., Jakmunee,J. Lapanantnoppakhun, S., & Grudpan, K. (2010). Flow injection determination of iron ions with green tea extracts as a natural chromogenic reagent. *Analytical Sciences*, *26*, 619-623.

Prietto, L., Mirapalhete, T. C., Pinto, V. Z., Hoffmann, J. F., Vanier, N. L., Lim, L-T., Guerra Dias, A. R., & E. da R. Zavareze. (2017). pH-sensitive films containing anthocyanins extracted from black bean seed coat and red cabbage. *Journal of Food Science and Technology*, *80*, 492-500.

Settheeworrarit, T., Hartwell, S. K., Lapanatnoppakun,S. Jakmunee, J. Christan, G. D., & Grudpan, K. (2002). Exploiting guava leaf extract as an alternative natural reagent for flow injection determination of iron. *Talanta*, *68*, 262-267.

Siriangkhawut, W., Khanhuathon, Y., Chantiratikul, P., Ponhong, K., & Grudpan, K. (2016). A Green sequential injection spectrophotometric approach using natural reagent extracts from heartwood of ceasalpinia sappan linn. for determination of aluminium. *Analytical Sciences*, *32*, 329-336.

Supharoek, S., Ponhong, K., Siriangkhawut, W., & Grudpan, K. (2018). Employing natural reagents from turmeric and lime for acetic acid determination in vinegar sample. *Journal of Food and Drug Analysis*, *26*, 583-590.

Ueda M., Lapanatnoppakun, S., Wongwilai, W., Teshima, N., Sakai, T., & Grudpan, K. (2010). Exploiting a simple water extract of a flower as a natural reagent for acidity assay using a lab-on-chip. *Journal of Flow Injection Analysis*, *27*, 57-60.

Wongwilai, W., Lapanantnoppakhun, S., Grudpan, S., & Grudpan, K. (2010). Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach. *Talanta*, *81*, 1137-1141.