



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาระบบวิเคราะห์แบบอาศัยการไหล
สำหรับการวัดปริมาณแบบต่อเนื่องของน้ำตาลและฟอสเฟต
จากผลิตภัณฑ์จากอ้อย

โดย อาจารย์ ดร.กมลทิพย์ เสรีนนท์ชัย

มิถุนายน 2556

สัญญาเลขที่ MRG5480201

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาระบบวิเคราะห์แบบอาศัยการไหล
สำหรับการวัดปริมาณแบบต่อเนื่องของน้ำตาลและฟอสเฟต
จากผลิตภัณฑ์จากอ้อย

อาจารย์ ดร.กมลทิพย์ เสรีนนท์ชัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG5480201

Project Title : Development of flow-base system for sequential analysis of sugar and phosphate in the extracted sugar-cane juice

Investigator : Kamonthip Sereenonchai

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University

E-mail Address : ksereenonchai@hotmail.com

Project Period : 15 June 2011 – 14 June 2013 (2 years)

This work presents the simultaneous determination of sucrose and phosphate in sugar-cane juice by using a spectrophotometric sequential injection (SI) system. A single detection wavelength at 880 nm was applicably used for measuring these two key constituents. Measurement of sucrose in Brix unit was carried out based on detection of light refraction occurring at the liquid interface (the schlieren effect) between the sucrose solution and water. Phosphate was measured from molybdenum blue method. With careful design of the SI system and the loading sequence, simultaneous detection of sucrose and phosphate was accomplished with the simple spectrophotometer. Under the optimum condition, linear calibrations from 0.5 to 5.0 Brix sucrose and from 20 to 200 mg P_2O_5 / L were obtained. Satisfactory throughput of 45 sample / h with good precision at lower than 4%RSD (n = 10) were achieved. The developed SI system has been successfully applied in raw sugarcane juice with an acceptable recovery. The proposed method could be able to use as an alternative method to conventional procedures for quality control in cane sugar industry.

Keywords : Sugar-cane juice; Sucrose; Phosphate; Schlieren effect; Sequential injection

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480201

ชื่อโครงการ: การพัฒนาระบบวิเคราะห์แบบอาศัยการไหลสำหรับการวัดปริมาณแบบต่อเนื่องของน้ำตาลและฟอสเฟตจากผลิตภัณฑ์จากอ้อย

ชื่อนักวิจัย: กมลทิพย์ เสรีนนท์ชัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

E-mail Address : ksereenonchai@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 15 มิถุนายน 2554 – 14 มิถุนายน 2556 (2 ปี)

งานวิจัยนำเสนอการใช้ระบบวิเคราะห์แบบไหลชนิดซีเควนเซียลอินเจคชันร่วมกับการตรวจวัดด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สำหรับหาปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตแบบต่อเนื่องในตัวอย่างน้ำอ้อย องค์ประกอบสำคัญทั้งสองนี้ ถูกตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร การหาปริมาณน้ำตาลในหน่วยความเข้มข้นบริกซ์ อาศัยหลักการหักเหของแสงระหว่างรอยต่อของสารละลายน้ำตาลและน้ำในการตรวจวัด ในขณะที่การหาปริมาณฟอสเฟตใช้วิธีโมลิบดีนัมบลูในการตรวจสอบ ด้วยการออกแบบระบบซีเควนเซียลที่เหมาะสม ทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตได้พร้อมกันด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์อย่างง่าย จากสภาวะการทดลองที่เหมาะสมทำให้ได้กราฟมาตรฐานสำหรับน้ำตาลที่มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.5 ถึง 5.0 บริกซ์ และความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับฟอสเฟตช่วง 20 ถึง 200 มก.ต่อลิตร สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 45 ตัวอย่างต่อชั่วโมง และมีความเที่ยงสูง (ร้อยละค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ต่ำกว่า 4 ด้วยการวิเคราะห์ 10 ครั้ง) นอกจากนี้ ระบบซีเควนเซียลที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้หาปริมาณในตัวอย่างน้ำอ้อยดิบได้และมีค่าร้อยละคืนกลับเป็นที่ยอมรับ รวมถึงวิธีที่นำเสนอนี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นวิธีทางเลือกใหม่ที่สามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมน้ำตาลจากอ้อยได้

คำหลัก : น้ำอ้อย ซูโครส ฟอสเฟต ซิลเลอเรน เอฟเฟกต์ ซีเควนเซียลอินเจคชัน

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 องค์ประกอบของน้ำอ้อย	2
1.3 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากน้ำอ้อย	3
1.4 ความสำคัญของน้ำตาลในอ้อย	5
1.5 ความสำคัญของฟอสเฟตในอ้อย	5
บทที่ 2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	7
บทที่ 3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
3.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในเครื่องต้ม	8
3.2 การหาปริมาณฟอสฟอรัสหรือฟอสเฟตที่มีในน้ำอ้อย	10
บทที่ 4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดในโครงการวิจัยนี้	11
4.1 ระบบวิเคราะห์แบบไหลแบบ Sequential Injection Analysis (SIA)	11
4.2 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลในอ้อย	12
4.3 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดในการตรวจวัดปริมาณฟอสเฟตในอ้อย	15
บทที่ 5 การทดลอง	16
5.1 สารเคมี	16
5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน	17

5.3 การเตรียมสารละลายรีเอเจนท์สำหรับวิเคราะห์ฟอสเฟต	18
5.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อศึกษาผลของตัวรบกวน	19
5.5 การเตรียมตัวอย่างน้ำอ้อย	20
5.6 เครื่องมือและอุปกรณ์	21
5.7 ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยระบบ SIA	23
บทที่ 6 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	25
6.1 การเลือกช่วงความยาวคลื่นในการวิเคราะห์	25
6.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมตัวอย่าง	26
6.3 การออกแบบระบบ SIA และลำดับการดูดทอนสารละลาย	28
6.4 การเปรียบเทียบสัญญาณจากสารมาตรฐานเดี่ยวและสารมาตรฐานผสม	33
6.5 ปริมาตรของตัวอย่าง	36
6.6 อัตราการไหล	37
6.7 ความยาวของท่อนอากาศ (air plug)	41
6.8 ความเข้มข้นของรีเอเจนท์ในการเกิดปฏิกิริยา molybdenum blue	43
6.9 การศึกษาผลของตัวรบกวน	46
6.10 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น	48
6.11 การรายงานคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น (Analytical performance)	50
6.12 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในตัวอย่างน้ำอ้อยสกัด	52
บทที่ 7 สรุปผลการทดลอง	54
บทที่ 8 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	55

(ค)

หน้า

เอกสารอ้างอิง

56

Output จากโครงการวิจัย

60

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 แสดงองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำอ้อย [3-5]	3
5.1 แสดงรายชื่อสารเคมี สูตรโมเลกุล และตัวแทนจำหน่าย	16
5.2 แสดงขั้นตอนการทำงานของระบบ SIA ที่พัฒนาขึ้น สำหรับการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครส และปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างน้ำอ้อยสกัด	24
6.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 880 nm จากการวัดสารละลายน้ำอ้อยที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง ด้วยวิธีต่าง ๆ ($n = 3$)	27
6.2 แสดงผลของปริมาตรตัวอย่างที่ใช้	36
6.3 อิทธิพลของอัตราการไหลในชั้น 'Flow in' ต่อความเที่ยง (reproducible) ของน้ำตาลซูโครส 3 Brix ($n = 10$)	38
6.4 อิทธิพลของอัตราการไหลในชั้น 'Flow in' ต่อ sensitivity และความเป็นเส้นตรงสำหรับวัด ปริมาณน้ำตาลซูโครส	39
6.5 อิทธิพลของอัตราการไหลในชั้น 'Flow out' ต่อความเร็วในการวิเคราะห์ (จำนวนตัวอย่างต่อ ชั่วโมง) โดยใช้สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 100 ppm ($n = 3$) ในการศึกษา	41
6.6 อิทธิพลของความยาวท่ออากาศที่มีต่อการวิเคราะห์น้ำตาลและฟอสเฟต	42
6.7 แสดงสรุปการศึกษาสภาพที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์น้ำตาลและฟอสเฟตในตัวอย่างพร้อม กัน โดยระบบ SIA รูป 6.4(ข)	49
6.8 แสดงคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์แบบ SIA ที่พัฒนาขึ้น สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ซูโครสและฟอสเฟตในตัวอย่างพร้อมกัน	51
6.9 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำอ้อยสกัดด้วยระบบ SIA ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับconventional method	52

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ได้จากอ้อย [1]	1
1.2 แสดงกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากโรงงานแห่งหนึ่ง [6]	4
1.3 (ก) แสดงอนุภาคในน้ำอ้อยเมื่อมีการเติมปูนขาวลงไป และ (ข) การตกตะกอนร่วมเป็นแคลเซียมฟอสเฟต (Calcium phosphate bridging) [3]	6
4.1 ภาพวาดจำลองระบบ FIA และ ระบบ SIA (IV: injection valve, SV: selection valve และ D: เครื่องตรวจวัด)	11
4.2 แสดงลักษณะการเกิด Reflective index โดย n_1 : ค่าดัชนีหักเหของตัวกลางที่ 1 n_2 : ค่าดัชนีหักเหของตัวกลางที่ 2 θ_1 : มุมตกกระทบ θ_2 : มุมหักเห θ_3 : มุมสะท้อน	13
4.3 แสดงการจำลองเหตุการณ์การเกิด Schlieren ในระบบ FIA อย่างง่าย ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	14
5.1 แสดงภาพจำลองระบบ SIA ที่ใช้ในการโครงการนี้ และลำดับของสารใน HC (SP: Syringe pump, MC: Mixing coil (ยาว 100 cm), HC: Holding coil (ยาว 33 cm), SV: Selection valve, C: Carrier, S: Sample, A: air, W: Waste, R1 และ R2: Reagent1 และ Reagent2 ตามลำดับ)	22
6.1 แสดงสเปกตรัมของตัวอย่างน้ำอ้อยสกัดในช่วงความยาวคลื่น 400 – 1000 nm	25
6.2 แสดงสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนฟอสเฟตสีน้ำเงิน (molybdenum blue complex) ที่ช่วงความยาวคลื่น 400 – 1000 nm	26
6.3 (ก) แสดงระบบ SIA แบบทั่วไปและลำดับของท่อนสารละลายใน HC (S: sample 50 μL , R1 และ R2: Reagent 1 และ Reagent 2 ปริมาตรอย่างละ 104 μL) และ (ข) ลักษณะของ SIA profiles ที่ได้จากสารละลายมาตรฐานน้ำตาลเข้มข้น 4 บริกซ์ สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 100 ppm และสารละลายผสมน้ำตาลและฟอสเฟต	29
6.4 (ซ้าย) แสดงระบบ SIA แบบปกติ ร่วมกับการใช้ฟองอากาศเพื่อลดผลความหนืดของน้ำตาลที่ไปรบกวนการตรวจวัดฟอสเฟต (ขวา) แสดงระบบ SIA แบบปรับปรุงใหม่ (S1: sample1 50 μL , S2: sample2 20 μL , A: air plug 55 μL , R1 และ R2: Reagent 1 และ Reagent 2 ปริมาตรอย่างละ 104 μL)	32
6.5 แสดง SIA profiles ที่ได้จากสารละลายมาตรฐานเดี่ยวและผสม (ซ้าย) และแสดงกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายในแต่ละชุด (ขวา)	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
6.6	แสดงสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงของ reagent blank (ตำแหน่งลูกศรชี้แสดง)ในช่วงการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตด้วยอัตราการไหล 'Flow out' ต่าง ๆ 40
6.7	กราฟแสดงอิทธิพลของรีเอเจนต์ R1 ที่มีต่อ sensitivity (ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราส่วนระหว่าง $[H^+]$ / $[MoO_4^{2-}]$) 44
6.8	กราฟแสดงอิทธิพลของกรดแอสคอร์บิก (R2) ที่มีต่อ sensitivity 45
6.9	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสเข้มข้น 0.00 – 6.00 บริกซ์ที่มีต่อสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3.00 บริกซ์ (หมายเหตุ ตัวเลขความเข้มข้นที่แสดงเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสรวมกัน อย่างละเท่า ๆ กัน) 47
6.10	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายซิลิเกตเข้มข้น 0 – 2000 ppm ที่มีต่อสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 100 ppm 48
6.11	แสดงลักษณะ SIA profiles และกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟต ที่สภาวะการทดลองที่เหมาะสม (แต่ละจุดบนกราฟมาตรฐานเกิดจากการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง) 50

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อ้อยเป็นพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่งของโลก เนื่องจากสามารถนำส่วนต่าง ๆ ของอ้อย มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายรูปแบบ (ดังแสดงในรูปที่ 1.1) เช่น การผลิตน้ำตาลหรือน้ำเชื่อมจากน้ำอ้อย การผลิตพลังงานทางเลือกทดแทนจากขานอ้อยและกากน้ำตาล และการผลิตกระดาษหรือบรรจุภัณฑ์จากเส้นใยอ้อย เป็นต้น



รูปที่ 1.1 แสดงผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ได้จากอ้อย [1]

จากประโยชน์ที่ได้รับมากมายจากอ้อย จึงทำให้อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในหลายประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยซึ่งประชากรประกอบอาชีพเกษตรกรรมเป็นอาชีพหลัก และอ้อยก็เป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและมีการปลูกมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ผลผลิตจากอ้อยที่สำคัญของประเทศไทย คือ น้ำตาล โดยจัดได้ว่าอุตสาหกรรมน้ำตาลเป็นอุตสาหกรรมที่สร้างรายได้ของประเทศ เนื่องจากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการประกอบอาหารและใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มหลากหลายประเภท ประเทศไทยมีการบริโภคน้ำตาลปีละ 1.6-1.7 ล้านตัน หรือคิดเป็นมูลค่า 17,000 – 19,000 ล้านบาท และมีการส่งออกน้ำตาลมากกว่าปีละ 3 ล้านตัน หรือคิดเป็นมูลค่าสูงถึง 20,000 – 30,000 ล้านบาทต่อปี [2] ทำให้ประเทศไทยเป็น 1 ใน 5 ประเทศชั้นนำของโลกที่มีการส่งออกน้ำตาลมากที่สุด นอกจากนี้จะนำรายได้เข้าประเทศดังกล่าวแล้ว อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลจากอ้อยยังมีบทบาทสำคัญต่อการจ้างงานภายในประเทศอีกด้วย เนื่องจากมีผู้ที่เกี่ยวข้องในวงการอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลในปัจจุบันนับเป็นแสน ๆ คน ทำให้อ้อยเป็นพืชไร่เศรษฐกิจชนิดเดียวของประเทศไทยที่มีพระราชบัญญัติน้ำตาลทราย โดยตราพระราชบัญญัติไว้ในปีพ.ศ. 2527 เพื่อควบคุมการปลูกอ้อยและปริมาณน้ำตาลทรายในประเทศ

จากความสำคัญดังกล่าว ส่งผลให้อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายมีความจำเป็นต้องเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนเพื่อให้สามารถแข่งขันในเวทีการค้าระดับสากลได้ ซึ่งจำเป็นต้องทำควบคู่ไปพร้อมกับการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการผลิต และกระบวนการวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพของน้ำอ้อย ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำตาลทรายก็มีความสำคัญอย่างยิ่งเช่นกัน

1.2 องค์ประกอบของน้ำอ้อย

น้ำตาลคือสารให้ความหวานชนิดหนึ่ง ซึ่งนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ในทางการค่านิยมผลิตน้ำตาลจากบีทรูท ซึ่งเก็บสะสมน้ำตาลไว้ที่หัวใต้ดิน และอ้อยซึ่งจะเก็บสะสมน้ำตาลไว้ที่ลำต้น

สำหรับประเทศไทย อ้อยเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล ซึ่งระบุค่าน้ำตาลที่ควรมีในน้ำอ้อยไว้ไม่ต่ำกว่า 12 บริกซ์ (%w/w) โดยอ้อยมีองค์ประกอบหลัก คือ น้ำอ้อย (ประมาณ 73 – 76%) ส่วนที่เหลือจะเป็นเส้นใยและของแข็งที่ไม่ละลายน้ำต่าง ๆ (ประมาณ 24 – 27%) ดังแสดงในตารางที่ 1 [3-5] และเมื่อพิจารณารายละเอียดขององค์ประกอบเฉพาะในน้ำอ้อย จะพบว่ามีองค์ประกอบหลัก ๆ เพียงน้ำและน้ำตาลเท่านั้น โดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลหลักที่มีปริมาณมากกว่า 80% เมื่อเทียบกับน้ำตาลทั้งหมดที่มีในน้ำอ้อย [3-4]

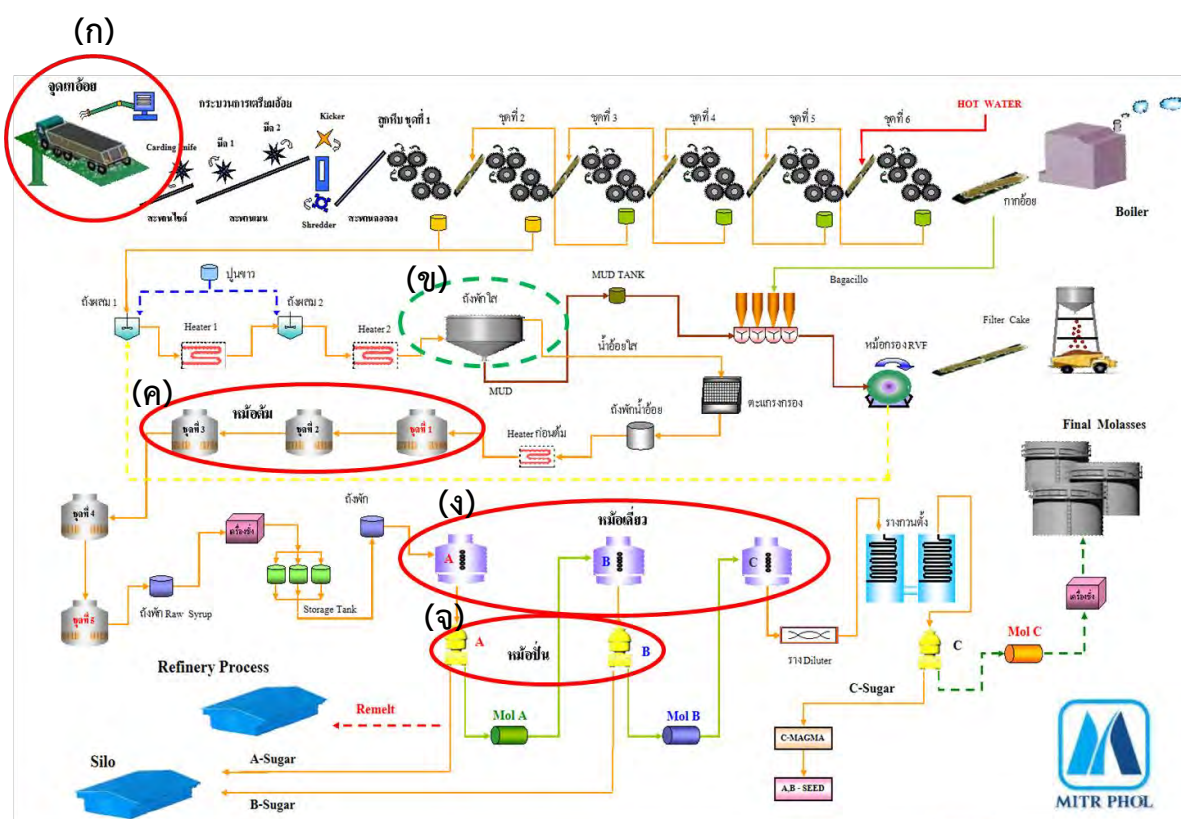
ตารางที่ 1.1 แสดงองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำอ้อย [3-5]

Constituent	Percent	
Water	73-76	
Solids	24-27	
Fiber (dry)	11-16	
Soluble solids	10-16	
Juice constituents		Percent of soluble solids
Sugars	75-92	
Sucrose		70-88
Glucose		2-4
Fructose		2-4
Salts (inorganic and organic acids)	3.0-7.5	
Free organic acids	0.5-2.5	

1.3 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากน้ำอ้อย

กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยแสดงในรูปที่ 1.2 เริ่มต้นจากการรับซื้ออ้อยจากเกษตรกรหน้าโรงงาน ทางโรงงานจะทำการสุ่มตรวจปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยจากรถบรรทุก โดยนำอ้อยที่สุ่มออกมาคั้นน้ำหรือเรียกว่าการหีบอ้อย (รูป 1.2ก) น้ำอ้อยที่มีคุณภาพเหมาะสมในการผลิตน้ำตาลควรมีปริมาณน้ำตาลที่ตรวจได้ในช่วง 12-16 บริกซ์ และปริมาณน้ำตาลนั้นนอกจากจะใช้ประเมินคุณภาพของน้ำอ้อยแล้วยังเป็นตัวกำหนดรายได้ให้แก่เกษตรกรชาวไร่อ้อยอีกด้วย

จากนั้นก็จะนำอ้อยเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลของโรงงาน อ้อยจะถูกหีบและส่งน้ำอ้อยที่ได้สู่ถังพักใส (รูป 1.2ข) ในขั้นตอนนี้จะเป็นการทำให้น้ำอ้อยสกัดมีความใสสะอาดขึ้น เนื่องจากน้ำอ้อยที่หีบได้จะมีความขุ่นและมีสีเขียวเข้ม ยังไม่เหมาะที่จะผลิตเป็นน้ำตาลทรายดังที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด ในขั้นตอนการทำใส (Juice purification) นี้จะมีการเติมปูนขาวเพื่อช่วยให้เกิดการตกตะกอนของสิ่งเจือปนและความขุ่น ซึ่งประสิทธิภาพของกระบวนการทำใสนี้จะเกี่ยวข้องกับปริมาณฟอสเฟตที่มีในน้ำอ้อยด้วย (รายละเอียดในหัวข้อ 1.5) จากนั้นน้ำอ้อยที่ผ่านกระบวนการทำใสแล้วจะถูกส่งไปยังหม้อต้ม (รูปที่ 1.2ค) เพื่อทำการระเหยน้ำบางส่วนออก ก่อนจะเข้าสู่หม้อเคี้ยว (รูปที่ 1.2ง) เพื่อทำให้มีความหนืดมากขึ้นเสมือนน้ำเชื่อม (ปริมาณความหวานประมาณ 60 บริกซ์) และสุดท้ายเข้าสู่หม้อปั่นที่อาศัยหลักการหนีศูนย์กลางปั่นเหวี่ยงให้กลายเป็นน้ำตาลเม็ดเล็ก ๆ ที่จะถูกส่งเข้าโรงเก็บเพื่อรอจำหน่ายต่อไป



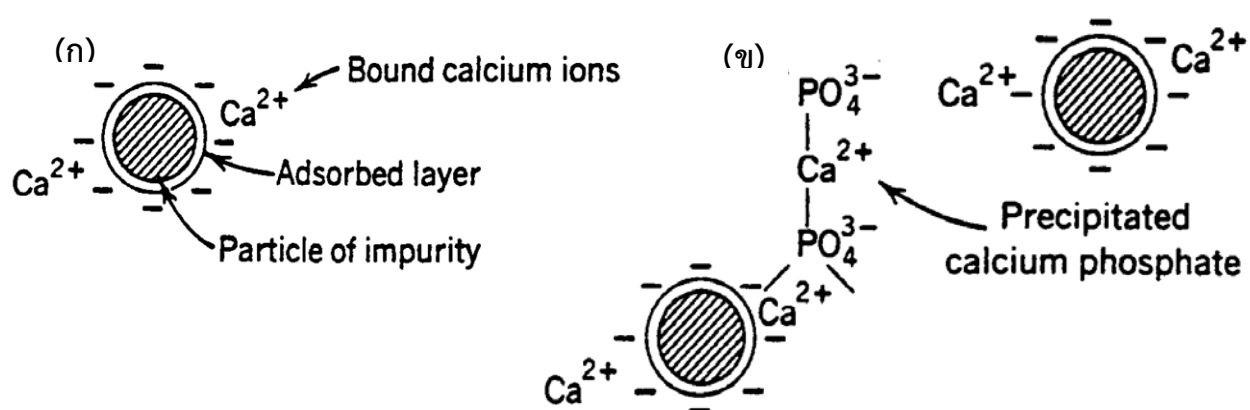
รูปที่ 1.2 แสดงกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากโรงงานแห่งหนึ่ง [6]

1.4 ความสำคัญของน้ำตาลในน้ำอ้อย

จากกระบวนการผลิตดังกล่าวในหัวข้อ 1.3 จะเห็นได้ว่าการประเมินคุณภาพของน้ำอ้อยสำหรับเป็นวัตถุดิบผลิตน้ำตาลนั้น จะใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครสเป็นตัวกำหนดคุณภาพเบื้องต้นที่ต้องทำการวิเคราะห์ตั้งแต่ขั้นตอนการรับซื้ออ้อย (รูปที่ 1.2ก) ทางโรงงานรับซื้อจะตรวจวัดค่าน้ำตาลซูโครสโดยสุ่มคั้นน้ำอ้อย 1 ลิตร/รถบรรทุกอ้อย 1 คัน เพื่อประเมินราคารับซื้อและคุณภาพวัตถุดิบเบื้องต้น รวมถึงปริมาณน้ำตาลนี้ยังคงต้องถูกตรวจวัดอีกครั้งอย่างละเอียดมากกว่า 1 ขั้นตอนในระหว่างกระบวนการผลิตเป็นน้ำตาลทราย (รูปที่ 1.2ค และ 1.2ง) เนื่องจากปริมาณน้ำตาลซูโครสเป็นข้อมูลสำคัญในการประเมินคุณภาพการผลิตน้ำตาล และต้องใช้ประกอบการปรับเปลี่ยนสภาวะระหว่างกระบวนการผลิตให้เหมาะสม นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ต่างกันในน้ำอ้อยนั้นจะมีความเหมาะสมกับการผลิตเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ กันด้วย

1.5 ความสำคัญของฟอสเฟตในน้ำอ้อย

นอกจากการติดตามปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยสกัดแล้ว ปริมาณฟอสเฟตที่มีอยู่ในน้ำอ้อยเป็นอีกองค์ประกอบหนึ่งที่มีความสำคัญและจำเป็นต้องตรวจวัดในระหว่างกระบวนการผลิต แม้ว่าฟอสฟอรัสจะเป็นเพียงองค์ประกอบส่วนน้อยในน้ำอ้อยเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อย (ต่ำกว่าอย่างน้อย 10 เท่า) เนื่องจากปริมาณที่เหมาะสมของฟอสเฟตในน้ำอ้อยเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมประสิทธิภาพของระบบการทำใส (Juice purification) เพื่อให้ น้ำตาลที่มีคุณภาพสูง โดยทั่วไปปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสมในน้ำอ้อยควรมีค่าในช่วง 300-400 ppm (mg P_2O_5 / L) [3-5, 7-9] ในกรณีที่วัตถุดิบน้ำอ้อยนั้นมีระดับฟอสเฟตต่ำ (ซึ่งบ่งบอกคุณภาพดินที่ใช้เพาะปลูกได้ทางหนึ่งด้วย) ต้องแก้ปัญหาด้วยการเติมกรดฟอสฟอริกลงไปร่วมกับน้ำปูนขาว เพื่อตกตะกอนของเกลือ Calcium phosphate พร้อมกับดั่งดูด silica และความชื้นอื่น ๆ ตกลงไปด้วย [3-5, 7, 9] ดังแสดงในรูปที่ 1.3 แต่อย่างไรก็ตาม หากทำการเติมกรดฟอสฟอริกมากเกินไปจะทำให้พบปัญหา overliming ซึ่งจะทำให้คุณภาพน้ำอ้อยแย่งลง



รูป 1.3 (ก) แสดงอนุภาคในน้ำอ้อยเมื่อมีการเติมปูนขาวลงไป และ (ข) การตกตะกอนร่วมเป็นแคลเซียมฟอสเฟต (Calcium phosphate bridging) [3]

ดังจะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในน้ำอ้อยนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งในภาคการผลิตอุตสาหกรรมน้ำตาลจากอ้อย โครงการนี้จึงสนใจพัฒนาระบบวิเคราะห์แบบใหม่ สำหรับตรวจวัดปริมาณน้ำตาลและฟอสฟอรัสในน้ำอ้อยได้ไปพร้อม ๆ กัน เพื่อรองรับปริมาณตัวอย่างจำนวนมากที่ต้องทำการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพ โดยระบบที่จะพัฒนาขึ้นนี้ได้ใช้หลักการไหลชนิด sequential injection analysis (SIA) ทำให้สามารถทำงานแบบอัตโนมัติ ซึ่งมีความสะดวก รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ เป็นการพัฒนาและยกระดับมาตรฐานระบบวิเคราะห์คุณภาพการทดสอบอ้อยเพื่อการผลิตน้ำตาล เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในคุณภาพผลิตภัณฑ์และเพิ่มขีดความสามารถการแข่งขันในเวทีการค้าระดับสากลของผลิตภัณฑ์น้ำตาลไทย

บทที่ 2

วัตถุประสงค์โครงการ

โครงการนี้ เน้นการพัฒนาระบบวิเคราะห์อัตโนมัติแบบไหลอาศัยเทคนิค sequential injection analysis หรือ SIA ซึ่งมีขนาดกระทัดรัดและทำงานแบบอัตโนมัติ โดยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนา ดังนี้

- 2.1 พัฒนาระบบ SIA ที่สามารถตรวจวัดน้ำตาลและฟอสเฟตได้อย่างต่อเนื่องในระบบเดียวกันแบบอัตโนมัติ
- 2.2 ระบบที่พัฒนาขึ้นมีความอเนกประสงค์ สามารถเลือกวิเคราะห์น้ำตาลและฟอสเฟตได้พร้อมกัน หรือเลือกวิเคราะห์เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งก็ได้ โดยไม่ต้องดัดแปลงอุปกรณ์
- 2.3 มุ่งเน้นพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ลดปริมาณการใช้สารเคมีลง

บทที่ 3

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

3.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในเครื่องดื่ม

ได้มีผู้เสนอวิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณน้ำตาลในอ้อยไว้ก่อนหน้านี้หลายวิธี ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ดั้งเดิมนั้นเป็นการหาปริมาณน้ำตาลโดยอาศัยการออกซิไดส์น้ำตาลด้วย Cu^{2+} ion และติดตามปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิค Lane-Eynon titration [4] และ Somogyi-Nelson spectrophotometric method [4] ทั้งสองวิธีข้างต้นนี้เป็นระบบวิเคราะห์แบบ Batch ทำให้การตรวจวัดเป็นไปด้วยความล่าช้าและมีโอกาสผิดพลาดสูง

ต่อมาระบบการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยและในเครื่องดื่มให้ความหวานอื่น ๆ ได้ถูกนำเสนอให้มีความเป็นอัตโนมัติมากขึ้น เช่น ระบบ Flow-injection analysis (FIA) [10-14] และ Sequential-injection analysis (SIA) [15] ซึ่ง Flow-based technique นี้ได้มีการนำมาใช้ร่วมกับ detection method ได้ในหลากหลายรูปแบบ เช่น enzymatic reaction [16-17] ซึ่งมีข้อดีอย่างยิ่งในแง่ของความจำเพาะเจาะจงกับน้ำตาลซูโครสที่ตรวจวัด แต่ข้อเสียของการใช้เอนไซม์ คือ ราคาแพงและความไม่คงทนของเอนไซม์ ทำให้วิธีนี้ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในภาคอุตสาหกรรม

ดังนั้นจึงมีผู้เสนอทางเลือกในการตรวจวัดน้ำตาลซูโครสบนพื้นฐานของ Automatic flow-based system ร่วมกับ spectrophotometric detection โดยการทำปฏิกิริยา oxidation น้ำตาลซูโครสด้วย oxidizing agents ต่างๆ เช่น hexacyanoferrate (III) [11, 13] และ periodate [10] แม้วิธีนี้จะสามารถเพิ่มความเฉพาะเจาะจงในการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสและจัดการรบกวนของน้ำตาลอื่นๆ ในน้ำอ้อยได้ แต่สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยานั้นจัดเป็นสารอันตราย ต่อมาในปี 2006 Zagatto et al [12] ได้เสนอให้ใช้ $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ใน alkaline solution แทน และปริมาณน้ำตาลที่วัดได้จากวิธีนี้เป็นปริมาณน้ำตาลรวม คือ Total reducing

sugars (Hydrolyzed sucrose + reducing sugars) ในปฏิกิริยานี้จะต้องใช้ความร้อนในการเกิดปฏิกิริยาร่วมด้วย ซึ่งต่อมากลุ่มงานวิจัยของ Lima *et al* [14] ได้นำปฏิกิริยานี้ไปประยุกต์ใช้ในระบบ Multipumping flow system (MPFS) เพื่อใช้ pulsed flow เป็นตัวทำให้สารผสมกันดีขึ้นเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้นในช่วงที่ให้ความร้อน เป็นการปรับปรุงความไวของการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องใช้ความร้อนสูงถึง 98°C และจากประสบการณ์ของการวิจัยระบบวิเคราะห์แบบไหลที่ผ่านมานั้น หากไม่จำเป็นก็ควรหลีกเลี่ยงระบบที่ต้องให้ความร้อนสูงกว่า 65 °C เนื่องจากมักเกิดฟองอากาศขึ้นมากในระบบและรบกวนเครื่องวัดอยู่ตลอดเวลา และทำให้คาดว่า การที่ต้องให้ความร้อนสูงถึง 98°C นี้จะทำให้ระบบมีความยุ่งยากขึ้นมาก นอกจากนี้ มีรายงานการใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น HPLC [18-19] สำหรับการหาปริมาณน้ำตาลซูโครสในเครื่องดื่มและอาหาร โดยการทำงานร่วมกับ on-line dialysis เพื่อเป็น sample preparation แม้ว่าเทคนิคโครมาโทกราฟีจะเป็นที่นิยมในงานวิเคราะห์ทั่วไปแบบ routine analysis แต่วิธีนี้ยังคงมีราคาเครื่องมือ ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์และค่าบำรุงรักษาที่สูง รวมทั้งความรวดเร็วในการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างต่ำ

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสโดยอาศัยหลักการทางแสง เช่น Polarimetric method [20] อาศัยความสามารถของน้ำตาลซูโครสในการเบี่ยงเบนระนาบแสงโพลาไรซ์ และวิธี refractive index [15, 18-19] ซึ่งอาศัยการหักเหแสงซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของสาร จัดเป็นวิธีดั้งเดิมที่ยังคงนิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากสะดวกและมีความเร็วในการวิเคราะห์สูง เหมาะกับการตรวจวัดในโรงงานอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการประเมินราคาอ้อยหน้าโรงงาน ซึ่งต้องการความถูกต้องและรวดเร็วในการวิเคราะห์อย่างยิ่งเพื่อสกรีนปริมาณน้ำตาลที่มีในอ้อย

3.2 การหาปริมาณฟอสฟอรัสหรือฟอสเฟตที่มีในน้ำอ้อย

แม้ฟอสฟอรัสจะไม่ใช่องค์ประกอบหลักที่มีในน้ำอ้อย แต่ก็ปัจจัยที่มีความสำคัญมากเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการทำใส [4-5, 7-8, 21] ซึ่งได้กล่าวไว้ในความสำคัญและที่มาของปัญหาแล้วนั้น แต่กลับพบว่ามียางงานวิจัยตีพิมพ์สำหรับการหาปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำอ้อยหรือเครื่องดื่มไม่มากนัก ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้

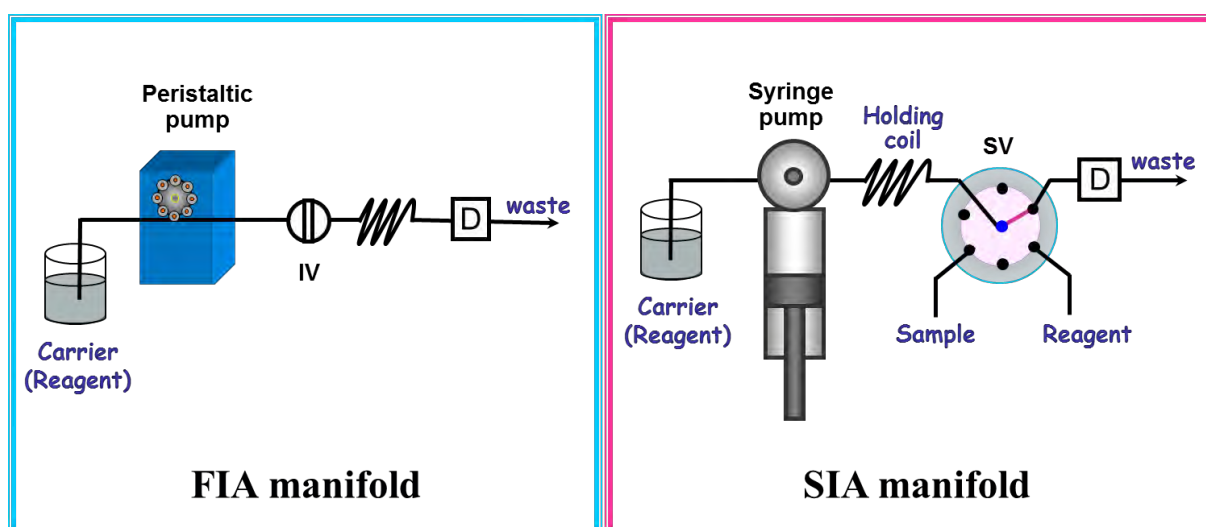
- เทคนิคไอออนโครมาโตกราฟี [22-23]
- ระบบการไหลแบบฟลูอิดเมตริก (FIA) ร่วมกับการตรวจวัดแบบ FTIR [24] และ spectrophotometric detection [21, 25]
- ระบบแบทช์ (Batch) ร่วมกับการตรวจวัดแบบสเปกโตรโฟโตเมตริก [7, 21]

บทที่ 4

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดในโครงการวิจัยนี้

4.1 ระบบวิเคราะห์แบบไหลแบบ Sequential Injection Analysis (SIA)

โครงการวิจัยนี้มีแนวคิดในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและฟอสเฟตในตัวอย่างน้ำอ้อยสกัด ด้วยระบบการวิเคราะห์แบบไหลชนิด sequential injection analysis หรือ SIA โดยระบบ SIA นั้น จัดเป็นการพัฒนาระบบวิเคราะห์แบบไหลรุ่นที่ 2 ที่พัฒนารูปแบบต่อมาจากระบบ flow injection analysis (FIA) โดยการนำเสนอของ Prof. J. Ruzicka และ Prof. G. Marshall ในปี 1990 ซึ่งระบบ SIA จะมีอุปกรณ์และรูปแบบการทำงานที่ต่างจากระบบ FIA ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ภาพวาดจำลองระบบ FIA และ ระบบ SIA

(IV: injection valve, SV: selection valve และ D: เครื่องตรวจวัด)

ระบบ SIA นั้นจะใช้ปั๊มแบบเข็มฉีดยา (syringe pump) ซึ่งมีการทำงานคล้ายกระบอกสูบ ในการควบคุมอัตราการไหลของสารละลายต่าง ๆ ในระบบ สารตัวอย่างและสารละลายรีเอเจนท์

ต่าง ๆ จะถูกดึงเข้ามาในระบบแบบเป็นลำดับ (sequent) ผ่านทาง selection valve ซึ่งในแต่ละช่องของ selection valve นี้จะมีแกนกลางในการเชื่อมต่อไปยังตำแหน่งช่องที่ต้องการ เพื่อเลือกลำดับของสารละลายตัวอย่างและสารละลายรีเอเจนต์ที่ต้องการ ดังนั้น สารละลายต่าง ๆ จะถูกดูดเข้ามาพักไว้ใน holding coil เป็นท่อนสั้น ๆ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้นทั่วทั้งโซน หรืออาจใช้ syringe pump ผลักไปมาเพื่อช่วยในการผสมท่อนสารละลายต่าง ๆ เหล่านั้นก็ได้ จากนั้นจึงผลักสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นผ่านไปยังเครื่องตรวจวัดต่อไป จากการทำงานดังกล่าว ทำให้ระบบ SIA มีข้อดีมากมาย เช่น

- ใช้ปริมาณรีเอเจนต์และสารตัวพำน้อยลง เนื่องจากการไม่มีการไหลต่อเนื่องตลอดเวลาเหมือนในระบบ FIA
- เหมาะกับสารรีเอเจนต์ที่มีราคาแพงหรือมีความเป็นพิษสูงกว่าระบบ FIA
- ปริมาณของเสียมีน้อยลง เมื่อเทียบกับระบบ FIA
- เป็นระบบอัตโนมัติ การทำงานควบคุมผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์
- อัตราการไหลมีความเที่ยงสูงกว่า เนื่องจากการไม่มีผลกระทบจากการยืดของ pump tube รวมถึงมีพัลส์ของการไหลที่ต่ำกว่าปั๊มชนิด peristaltic

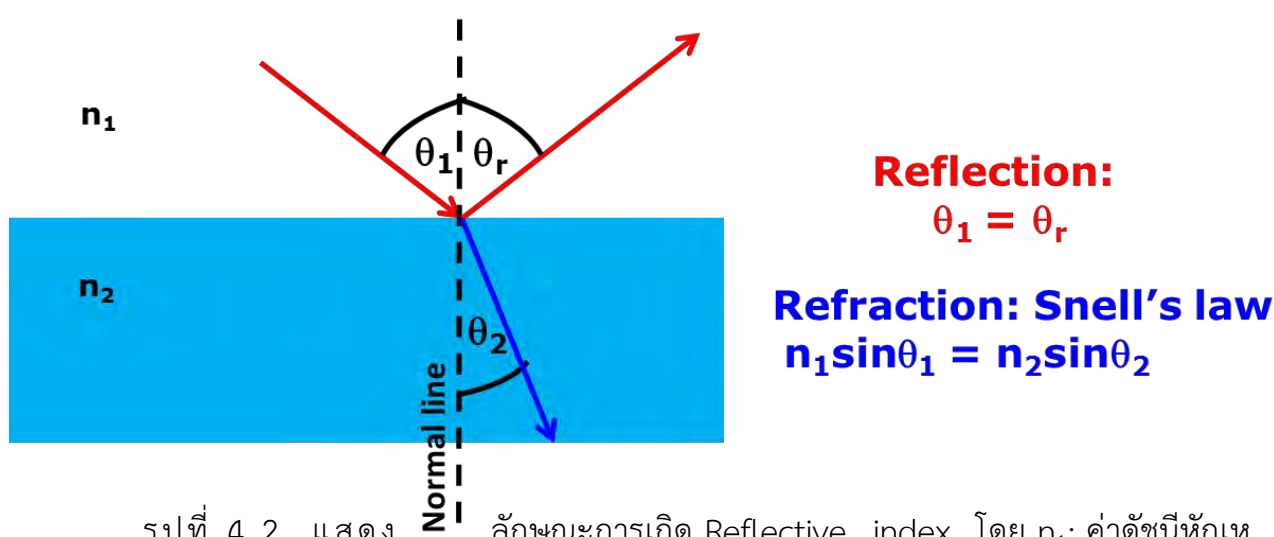
ดังนั้น โครงการนี้จึงสนใจที่จะนำระบบ SIA ซึ่งมีข้อดีหลายประการดังกล่าวข้างต้น มาพัฒนาให้เป็นระบบวิเคราะห์ที่มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรม เนื่องจากคุณลักษณะของระบบที่มีขนาดกระทัดรัด มีความคงทนและทำงานแบบอัตโนมัติ จึงเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาพัฒนาร่วมกับวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม เพื่อรองรับการวิเคราะห์หรือตรวจสอบคุณภาพตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ๆ ได้

4.2 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลในอ้อย

โครงการวิจัยนี้ได้รายงานปริมาณน้ำตาลซูโครสที่มีในน้ำอ้อยในหน่วย “บริกซ์ (Brix)” เนื่องจากเป็นหน่วยที่นิยมใช้ในการรายงานปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยทั่วไป ซึ่งบริกซ์ (Brix) เป็นหน่วยในการบอกปริมาณหรือค่าความหวานที่มีความหมายเหมือนร้อยละโดยน้ำหนัก เช่น

สารละลายที่มีค่า 10 บริกซ์ หมายถึง สารละลายนั้นมีน้ำตาลอยู่ 10 กรัมในน้ำ 90 กรัม [15] เป็นต้น

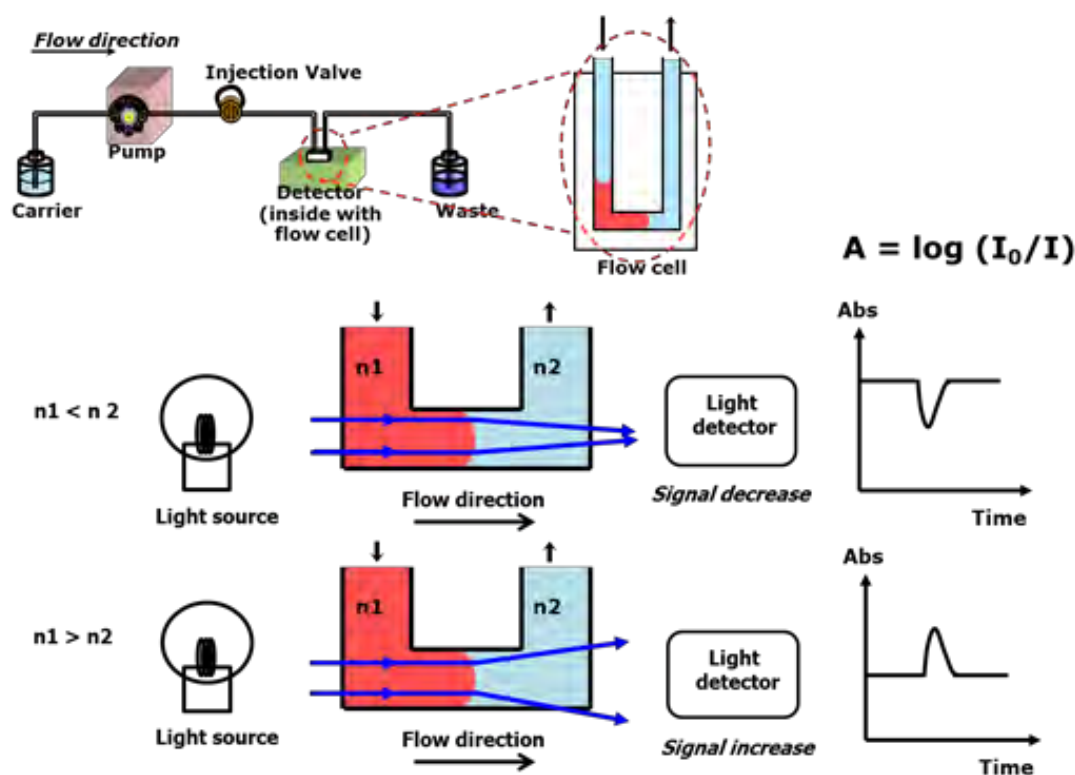
สำหรับหลักการที่งานวิจัยนี้ ได้นำมาประยุกต์ใช้ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อย คือ หลักการ **Schlieren effect** หรือ **lens effect** มาประยุกต์หาปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย ซึ่ง Schlieren effect หรือ lens effect นั้นเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดจากความแตกต่างของค่าดัชนีหักเหระหว่างรอยต่อของสารละลายสองชนิดที่มีค่าดัชนีหักเหแตกต่างกัน ดังนั้น หากแสงเดินทางจากรอยต่อที่มีค่าดัชนีหักเหต่างกันจะเกิดการหักเหของแสงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดง ลักษณะการเกิด Reflective index โดย n_1 : ค่าดัชนีหักเหของตัวกลางที่ 1 n_2 : ค่าดัชนีหักเหของตัวกลางที่ 2 θ_1 : มุมตกกระทบ θ_2 : มุมหักเห θ_3 : มุมสะท้อน

การหักเหของแสงเกิดจากการที่แสงเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่มีความหนาแน่นต่างกัน เป็นผลทำให้ทิศทางของแสงเปลี่ยนแปลงไป เมื่อแสงเดินทางผ่านตัวกลางที่ 1 ที่มีค่าดัชนีหักเห n_1 ไปยังตัวกลางที่ 2 ที่มีค่าดัชนีหักเห n_2 จะเห็นได้ว่ารังสีของแสงที่เข้าไปในตัวกลางที่ 2 มีแนวทางเปลี่ยนไปจากแนวรังสีตกกระทบเดิม แสงจะเกิดการหักเหโดยถ้าดัชนีหักเห 1 มีค่าน้อยกว่าดัชนีหักเห 2 ($n_1 < n_2$) จะทำให้มุม $\theta_1 > \theta_2$ และในทางกลับกัน ถ้าให้ดัชนีหักเห 1 มีค่ามากกว่าดัชนีหักเห 2 ($n_1 > n_2$) จะทำให้มุม $\theta_1 < \theta_2$

ปรากฏการณ์การหักเหของแสงนี้ในลักษณะดังกล่าวนี้ สามารถเกิดขึ้นได้ในระบบการวิเคราะห์แบบไหลทั้ง Flow injection analysis (FIA) และ Sequential injection analysis (SIA) ที่ใช้เครื่องตรวจวัดเป็นสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้เช่นกัน [15, 26] หากท่อนตัวอย่างมีค่าดัชนีหักเหต่างจากกระแสดำพา (carrier) หรือสารละลายรีเอเจนต์ และการผสมเกิดขึ้นไม่เพียงพอที่จะทำลายรอยต่อระหว่างท่อนของสาร จะทำให้ปรากฏฟิสิกส์สัญญาณการดูดกลืนแสงขึ้น แม้ว่าท่อนโซลของสารตัวอย่างและสารรีเอเจนต์จะไม่มีสี ซึ่งไม่ควรมีการดูดกลืนแสงในช่วงวิซิเบิล จึงไม่ควรปรากฏฟิสิกส์สัญญาณใด ๆ แต่กลับพบฟิสิกส์สัญญาณการดูดกลืนแสงเกิดขึ้นอันเนื่องมาจากผลของการหักเหแสงนั่นเอง และเรียกปรากฏการณ์นี้ว่าการเกิด Schlieren หรือ len's effect ดังแสดงในภาพจำลองเหตุการณ์รูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แสดงการจำลองเหตุการณ์การเกิด Schlieren ในระบบ FIA อย่างง่าย ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

จากการเลือกวิเคราะห์ด้วยหลักการดังกล่าว จะทำให้ระบบวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเป็น การตรวจวัดแบบสะอาด (Green chemistry) เนื่องจากในส่วนนี้จะไม่มีการใช้สารเคมีใด ๆ ใน การวิเคราะห์

4.3 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดในการตรวจวัดปริมาณฟอสเฟตในอ้อย

Molybdenum blue method นอกจากจะเป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณ ฟอสเฟตในน้ำที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายมาตั้งแต่ปี 1962 [27] จนกระทั่งในปัจจุบันได้มีการนำวิธี molybdenum blue นี้ไปใช้วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างต่าง ๆ มากมาย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) และมีความสามารถในการเลือกจำเพาะ (selectivity) สูง

ในโครงการนี้จึงได้นำวิธี molybdenum blue มาใช้วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในน้ำอ้อย เช่นกัน โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของฟอสเฟตไอออน (PO_4^{3-}) กับสารละลายแอมโมเนียมโมลิบ เดทในสภาวะกรด เกิดเป็นสารเชิงซ้อนของ molybdophosphoric acid ขึ้น จากนั้นสารเชิงซ้อน นี้จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารละลายวิตามินซี (Ascorbic acid) กลายเป็นสารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ความเข้ม ของสารผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินที่เกิดขึ้นนี้จะแปรผันตรงกับปริมาณฟอสเฟตที่มีในตัวอย่าง และสามารถตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 880 nm ได้

บทที่ 5

การทดลอง

5.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นชนิด Analytical grade (AR grade) ทั้งหมด ยกเว้น น้ำตาลซูโครสที่เป็นแบบ Food grade (ตารางที่ 5.1) และสารละลายทุกชนิดถูกเตรียมในน้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน (Barnstead EASYpure II, USA)

ตารางที่ 5.1 แสดงรายชื่อสารเคมี สูตรโมเลกุล และตัวแทนจำหน่าย

สารเคมี	สูตรโมเลกุล	ตัวแทนจำหน่าย
Sucrose (Food grade)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Mitr Phol, Thailand
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	CARLO ERBA, Italy
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	CARLO ERBA, Italy
Disodium hydrogenphosphate	Na_2HPO_4	Fluka, Switzerland
Ammonium heptamolybdate tetrahydrate	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	QReC, New Zealand
Tartaric acid	$(CHOHCOOH)_2$	Fluka, Switzerland
Ascorbic acid	$C_6H_8O_6$	Fisher, UK
Potassium antimony tartrate	$K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 0.5H_2O$	Fluka, Switzerland

Sodium metasilicate, anhydrous	Na_2SiO_3	Fluka, Switzerland
Sulfuric acid	H_2SO_4	RCI Labscan, Thailand

5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายทุกชนิดถูกเตรียมในน้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน (Deionized water)

5.2.1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 50 บริกซ์ (Stock sucrose solution)

ชั่งน้ำตาลซูโครส 50.00 g ลงในน้ำ 50.00 g ผสมให้เข้ากันจนน้ำตาลละลายหมด สารละลาย stock นี้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 สัปดาห์

5.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 1,000 ppm ($\text{mgP}_2\text{O}_5/\text{L}$) (Stock phosphate solution)

ทำการอบ $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{s})$ ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเก็บไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วจึงทำการชั่ง Na_2HPO_4 ปริมาณ 0.2xxx g ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 100 mL

5.2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม (น้ำตาลซูโครสและฟอสเฟต)

สารละลายมาตรฐานผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟต จะถูกใช้ในการหาสถานะที่เหมาะสมในการทดลองและการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยทำการเตรียมให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ด้วยการเจือจางตามความเหมาะสม (จากการคำนวณ) และใช้น้ำหนักสุทธิของสารละลายเป็นหน่วยน้ำหนัก ซึ่งทำโดยชั่งสารละลายน้ำตาลจาก stock sucrose solution ลงใน

ปิกเกอร์ตามน้ำหนักที่ได้จากการคำนวณ ปิเปตสารละลายฟอสเฟตจาก stock phosphate solution ลงไป แล้วเติมน้ำให้ได้น้ำหนักสุทธิตามที่ต้องการเตรียม

5.3 การเตรียมสารละลายรีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ฟอสเฟต

5.3.1 การเตรียมสารละลายผสม 9.7 M ammonium molybdate และ 0.016 M tartaric acid ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.6 M (R1)

สารละลาย R1 นี้ใช้เพื่อทำให้เกิดสารเชิงซ้อนของ molybdophosphoric acid (หัวข้อ 4.3) โดยมี tartaric acid ทำหน้าที่เป็น masking agent เตรียมโดยชั่ง ammonium heptamolybdate tetrahydrate 6.0 g ลงในปิกเกอร์ที่มี tartaric acid 1.2 g เติมน้ำลงไปประมาณ 300 mL แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 16.0 mL ลงไปช้า ๆ คนจนละลายเข้ากัน แล้วเจือจางด้วยน้ำจนถึงขีดบอกปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 500 mL

5.3.2 การเตรียมสารละลาย 0.2 M ascorbic acid (R2)

สารละลาย ascorbic acid (R2) นี้ใช้เป็นตัวรีดิวซ์สารเชิงซ้อน molybdophosphoric acid เปลี่ยนไปเป็นสารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (molybdenum blue complex) ทำโดยละลาย ascorbic acid 3.52 g ในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL ใน volumetric flask

5.3.3 การเตรียม combined reagent เพื่อใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีสำหรับฟอสเฟต

สารละลาย combined reagent สามารถเตรียมได้จากสารละลาย ดังนี้

5.3.3.1 การเตรียมสารละลาย ammonium molybdate

ละลาย ammonium heptamolybdate tetrahydrate 40.00 g ใน บีกเกอร์ที่มีน้ำปราศจากไอออน 250 mL แล้วปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 1000 mL จนถึงขีดปริมาตร

5.3.3.2 การเตรียมสารละลาย ascorbic acid

ละลาย ascorbic acid 1.76 g ในน้ำปราศจากไอออนประมาณ 50 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนถึงขีดบอกริมาตรใน volumetric flask ขนาด 100 mL

5.3.3.3 การเตรียมสารละลาย potassium antimony tartate

ละลาย potassium antimony tartate 1.3715 g ในน้ำปราศจาก ไอออนประมาณ 200 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนถึงขีดบอกริมาตรใน volumetric flask ขนาด 500 mL

5.3.3.4 การเตรียมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5 M

เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 35 mL ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น ประมาณ 200 mL แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 250 mL

นำสารละลายที่เตรียมได้ข้างต้น ข้อ 5.3.3.1 – 5.3.3.4 มาผสมรวมกัน ตามลำดับ ดังนี้

- สารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 2.5 M ปริมาตร 50 mL
- สารละลาย potassium antimony tartate 5 mL
- สารละลาย ammonium molybdate 15 mL
- สารละลาย ascorbic acid 30 mL

จากจึงค่อยคนสารละลายให้เข้ากัน โดย Combined reagent จะมีสีเหลืองและ มีอายุนาน 4 ชั่วโมง

5.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อศึกษาผลของตัวรบกวน

5.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ทำการเตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครส 3 ปริกซ์ จำนวน 11 ขวด โดยในแต่ละขวดให้มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.00, 0.05, 0.07, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 1.00, 2.00 และ 3.00 ปริกซ์ ตามลำดับ

5.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตส

ทำการเตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครส 3 ปริกซ์ จำนวน 11 ขวด โดยในแต่ละขวดให้มีน้ำตาลฟรุคโตสเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.00, 0.05, 0.07, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 1.00, 2.00 และ 3.00 ปริกซ์ ตามลำดับ

5.4.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเกตเข้มข้น 5,000 ppm ($\text{mgSiO}_2 / \text{L}$)

ทำการเตรียมสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น $100 \text{ mgP}_2\text{O}_5 / \text{L}$ จำนวน 10 ขวด โดยในแต่ละขวดให้มีสารละลายซิลิเกตเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0, 20, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 1500 และ 2,000 ppm ตามลำดับ

5.5 การเตรียมตัวอย่างน้ำอ้อย

น้ำอ้อยคั้นสดที่จำหน่ายทั่วไปในเขตกรุงเทพมหานคร ถูกใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา และเพื่อให้ได้น้ำอ้อยที่ใส ปราศจากสี พร้อมสำหรับกระบวนการวิเคราะห์ จะต้องทำการเตรียมตัวอย่างน้ำอ้อยคั้นสด ดังนี้

- ทำการเจือจางน้ำอ้อยด้วยน้ำปราศจากไอออนด้วยปิเปต ในอัตราส่วน 1 : 4 ลงใน centrifuge tube โดยมีปริมาตรสารละลายสุทธิ 20.00 mL
- เติมผงถ่าน (ขนาดอนุภาคเล็กกว่า $40 \mu\text{m}$, Fluka, Switzerland) ลงไปประมาณ 0.2 g

- นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 20 นาที
- นำสารละลายส่วนบน (supernatant) มากรองผ่านเมมเบรนชนิด cellulose acetate ขนาด 0.45 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany)

5.6 เครื่องมือและอุปกรณ์

5.6.1 เครื่องชั่ง (Sartorius AG GOTTINGEN, Germany)

ใช้สำหรับชั่งสารเคมีและตัวอย่างตลอดทั้งการทดลองนี้

5.6.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Scanspeed 416B, Labogene, Denmark)

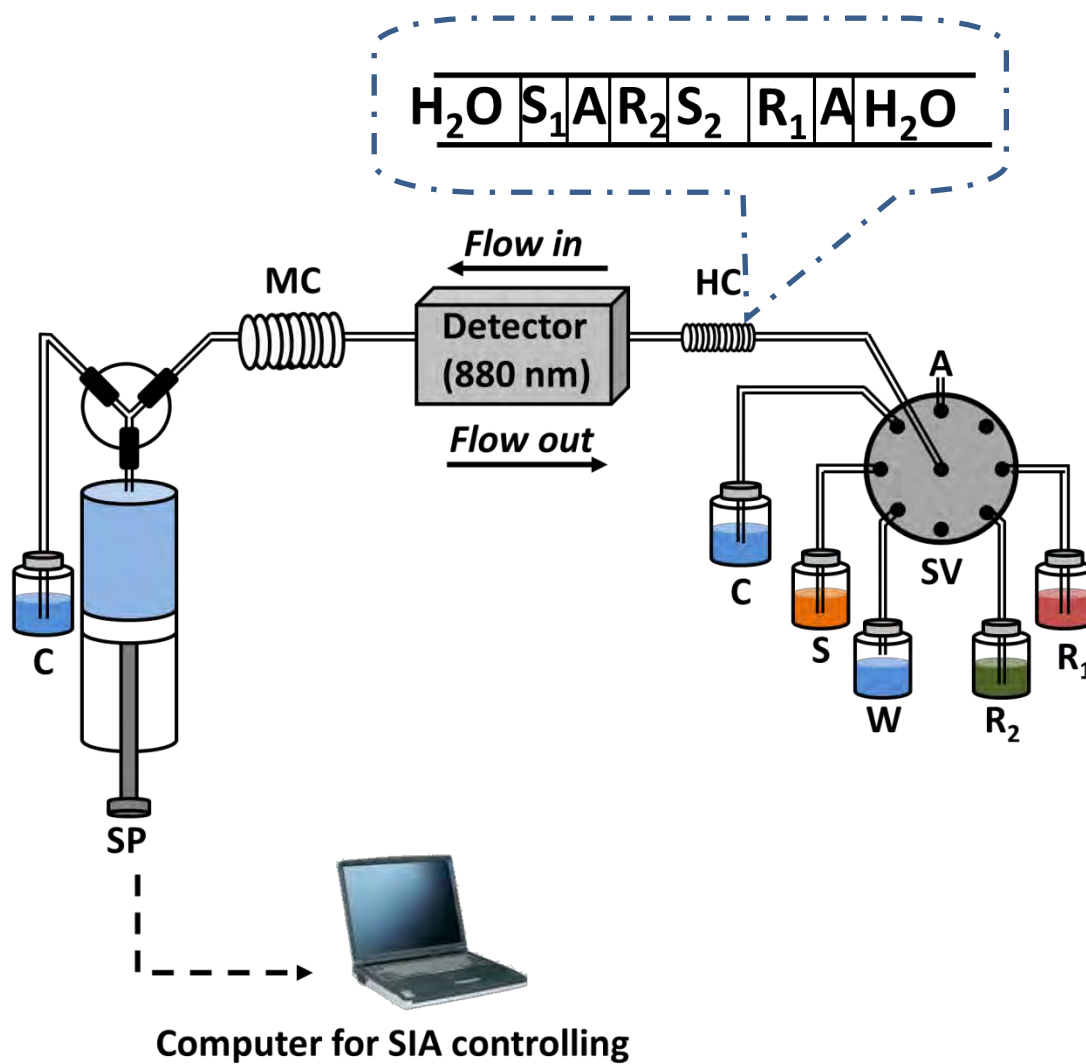
สำหรับเตรียมตัวอย่างน้ำอ้อยเพื่อการวิเคราะห์ด้วยระบบ SIA

5.6.3 UV-Vis spectrophotometer (Model 8453, Agilent, Germany)

สำหรับเป็นเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่สนใจ โดยตั้งความยาวคลื่นสำหรับติดตามปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตไว้ที่ 880 nm ภายในช่องว่างคิวเวตบรรจุด้วย flow-through cell ชนิดควอร์ซ ขนาด 10 mm ที่มีปริมาตรภายใน 80 μL (Hellma, Germany)

5.6.4 ระบบ sequential injection analysis (SIA)

รูปที่ 5.1 แสดงภาพวาดระบบ SIA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย syringe pump (Kloehn Versa Pump 6, USA) เชื่อมต่อกับ syringe ขนาด 5 mL (Kloehn, USA) ระบบท่อการไหลสร้างจาก PTFE tube (Cole Parmer, USA) โดยท่อที่เชื่อมต่อกับระบบทั้งหมด และ holding coil (HC) ใช้ท่อ PTFE ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.00 mm ส่วนท่อ PTFE ที่ใช้ทำ mixing coil (MC) นั้นทำจากท่อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.59 mm ระบบการทำงานควบคุมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (LabVIEW 8.0TM) ที่เขียนขึ้นในห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 5.1 แสดงภาพจำลองระบบ SIA ที่ใช้ในการโครงการนี้ และลำดับของสารใน HC (SP: Syringe pump, MC: Mixing coil (ยาว 100 cm), HC: Holding coil (ยาว 33 cm), SV: Selection valve, C: Carrier, S: Sample, A: air, W: Waste, R1 และ R2: Reagent1 และ Reagent2 ตามลำดับ)

5.7 ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยระบบ SIA

ตารางที่ 5.2 แสดงขั้นตอนการทำงานด้วยระบบ SIA ที่แสดงในรูปที่ 5.1 จากตารางที่ 5.2 จะเห็นได้ว่าประกอบด้วยขั้นตอนการทำงาน 9 ขั้นตอน โดยขั้นตอนการทำงานที่ 1-7 จะเป็นการดูดท่อนสารตัวพา (C) สารตัวอย่าง ท่อนอากาศและสารละลายรีเอเจนท์ให้มาอยู่ที่ holding coil (HC) จากนั้นจึงทำการดูดท่อนสารละลายทั้งหมดใน HC ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด และไหลออกมาอยู่ที่ mixing coil (MC) ซึ่งขั้นตอนนี้เหมาะที่ใช้ติดตามวัดสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากปรากฏการณ์ Schlieren effect ของน้ำตาลซูโครสและน้ำ (ขั้นตอนที่ 8) เนื่องจากการจะได้สัญญาณที่เกิดจาก Schlieren ที่ดีนั้น จะต้องทำให้รอยต่อระหว่างน้ำตาลในตัวอย่างและกระแสตัวพา (น้ำ) มีความคมชัดที่สุด นั่นคือ การผสมเกิดขึ้นน้อยที่สุดนั่นเอง จากนั้น ท่อนสารละลายทั้งหมดที่อยู่ใน MC นี้จะถูกผลักเข้าสู่เครื่องตรวจวัดและถูกดันออกสู่ waste ในที่สุด (ขั้นตอนที่ 9) ในขั้นตอนที่ 9 นี้ สัญญาณการดูดกลืนแสงในช่วงผลักท่อนสารทั้งหมดเข้าเครื่องตรวจวัดอีกครั้ง นี้ จะใช้สำหรับติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนฟอสเฟตสีน้ำเงิน เนื่องจากในระบบ SIA จะมีการผสมระหว่างท่อนโซนที่ไม่ดีนัก การดูดท่อนสารทั้งหมดเข้าสู่ MC ซึ่งเป็นท่อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในที่ใหญ่ขึ้น จะช่วยให้ท่อนสารละลายดังกล่าวผสมกันได้ดีขึ้น ทำให้ปฏิกิริยา molybdenum blue เกิดได้ดีขึ้นนั่นเอง

ตารางที่ 5.2 แสดงขั้นตอนการทำงานของระบบ SIA ที่พัฒนาขึ้น สำหรับการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสและปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างน้ำอ้อยสกัด

ขั้นตอน	ทิศทางการไหลสู่เครื่องตรวจวัด	ปริมาตร (μL)	อัตราการไหล (mL/min)	Port no.	กระบวนการที่เกิดขึ้น	ชนิดของสารวิเคราะห์
1	Flow in	2080	6.25	6	Aspiration of water carrier (C)	
2	Flow in	50	1.25	7	Aspiration of 1 st sample plug (S_1)	
3	Flow in	55	1.25	1	Aspiration of air plug (7-cm long in HC)	
4	Flow in	104	1.25	4	Aspiration of R_2	
5	Flow in	20	1.25	7	Aspiration of 2 nd sample plug (S_2)	
6	Flow in	104	1.25	3	Aspiration of R_1	
7	Flow in	55	1.25	1	Aspiration of air plug (7-cm long in HC)	
8	Flow in	1700	3.00	6	Aspiration of water	Sucrose
9	Flow out	4168	7.50	2	Dispense all liquid zones flowing out the detector and waste (W)	Phosphate

End of cycle with 80 s.

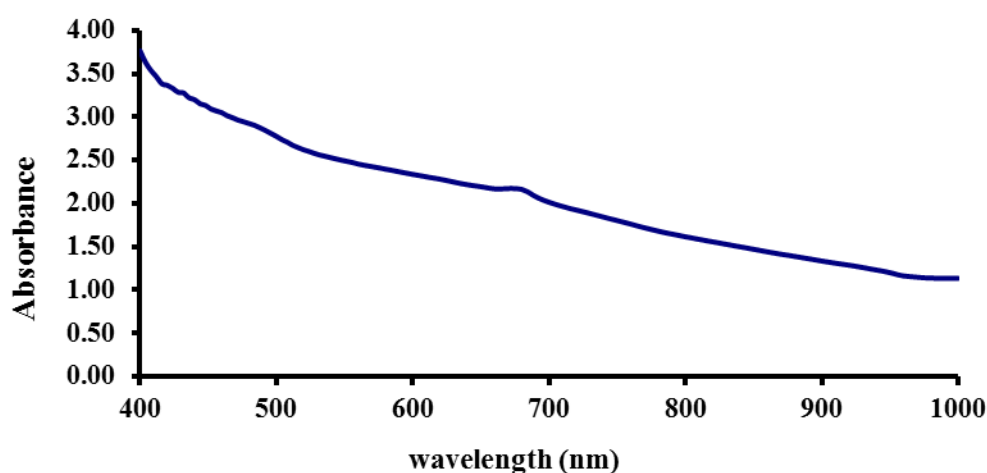
บทที่ 6

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

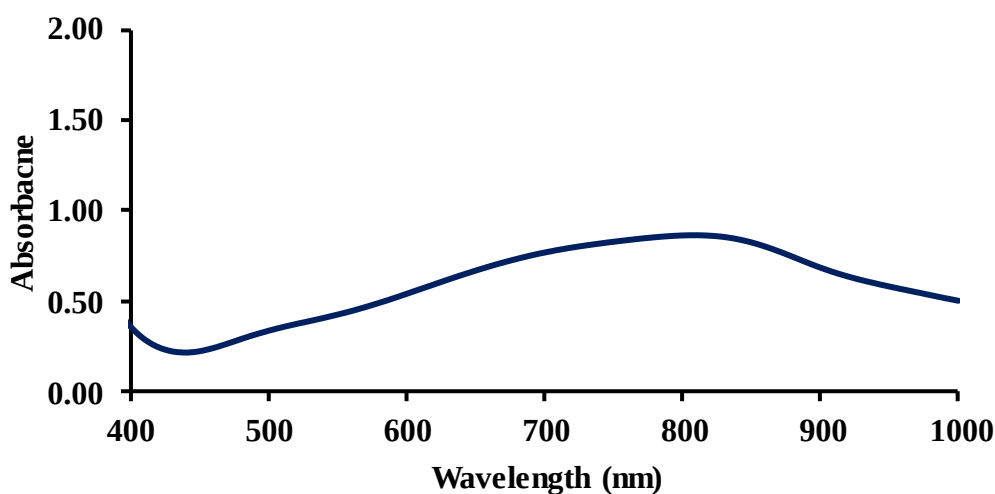
6.1 การเลือกช่วงความยาวคลื่นในการวิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบระบบวิเคราะห์ให้มีเครื่องตรวจวัดเพียง 1 ตัว และมุ่งพัฒนาให้สามารถติดตามค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลและฟอสเฟตที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้ (single wavelength) ดังนั้น จึงต้องทำการทดลองเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารทั้งสอง

เมื่อทำการ scan สเปกตรัมของน้ำอ้อยสกัดที่ความยาวคลื่น 400 – 1000 nm (รูปที่ 6.1) พบว่า น้ำอ้อยสกัดที่ได้จากการหีบอ้อยโดยตรงนั้นจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงตลอดทั้งช่วง 400 – 1000 nm ซึ่งเกิดจากความขุ่นและสีของน้ำอ้อยนั่นเอง แต่อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่บริเวณความยาวคลื่น 800 nm ขึ้นไป จะเห็นได้ว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าช่วงความยาวคลื่นสั้น และบริเวณเดียวกันนี้ก็เป็นช่วงที่สารเชิงซ้อนฟอสเฟตสีน้ำเงินให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเช่นกัน (รูปที่ 6.2) โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ประมาณ 880 nm



รูปที่ 6.1 แสดงสเปกตรัมของตัวอย่างน้ำอ้อยสกัดในช่วงความยาวคลื่น 400 – 1000 nm



รูปที่ 6.2 แสดงสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนฟอสเฟตสีน้ำเงิน (molybdenum blue complex) ที่ช่วงความยาวคลื่น 400 – 1000 nm

จากรูปที่ 6.1 และ 6.2 จะเห็นได้ว่าความยาวคลื่น 880 nm เป็นความยาวคลื่นที่มีความเป็นไปได้ในการตรวจวัดสารสนใจทั้งสองชนิด เนื่องจากเป็นความยาวคลื่นที่สารเชิงซ้อนฟอสเฟตสีน้ำเงินมีค่าการดูดกลืนแสงสูง และค่าความขุ่นและสีของจากตัวอย่างน้ำอ้อยมีการดูดกลืนที่ต่ำกว่าช่วงอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจวัดปริมาณน้ำตาลนั้น อาศัยหลักการ Schiller effect ในการติดตาม ซึ่งเป็นการตรวจวัดที่ไม่มีความเฉพาะเจาะจง (universal detection) ดังนั้น จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการกำจัดสีและความขุ่นของตัวอย่าง เพื่อให้สัญญาณการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นเป็นผลจาก Schiller effect ของน้ำตาลจริง ๆ เท่านั้น

6.2 การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำอ้อยถูกนำมาทดสอบหาวิธีที่เหมาะสมเพื่อเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์หลักเกณฑ์ในการเลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม คือ ง่าย สะดวก สามารถกำจัดสีและความขุ่นของน้ำอ้อยได้ดี โดยจะนำน้ำอ้อยที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างแบบต่าง ๆ มาวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 880 nm น้ำอ้อยที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมจะต้องให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกับ blank หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า 0.001x

การหาวิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำอ้อยถูกศึกษาเป็น 4 วิธี คือ

- 1) การเจือจางน้ำอ้อยด้วยน้ำ ในอัตราส่วน 1 : 4 และ 1 : 10
- 2) การเจือจางน้ำอ้อยด้วยน้ำ ร่วมกับการเติมผงถ่าน 0.2 g
- 3) การเจือจางน้ำอ้อยด้วยน้ำ ร่วมกับการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 μm
- 4) การเจือจางน้ำอ้อยด้วยน้ำ ร่วมกับการเติมผงถ่านและกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 μm

ผลการศึกษาให้ผลดังแสดงในตารางที่ 6.1

ตารางที่ 6.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 880 nm จากการวัดสารละลายน้ำอ้อยที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีต่าง ๆ ($n = 3$)

กระบวนการเตรียมตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 880 nm $\pm$ SD	ลักษณะทางกายภาพของน้ำอ้อย
1. น้ำอ้อยคั้นสด	1.0031 ± 0.0066	สีเขียวอมเหลือง ขุ่นมาก
2. เจือจาง 1 : 4 เจือจาง 1 : 10	0.2910 ± 0.0104 0.1151 ± 0.0041	สีเขียวอมเหลืองจางลง ขุ่น สีเขียวอมเหลืองจางลง ขุ่น
3. เจือจาง 1 : 4 + เติมผงถ่าน เจือจาง 1 : 10 + เติมผงถ่าน	0.1973 ± 0.0057 0.0527 ± 0.0030	สีขาวขุ่น สีขาวขุ่น
4. เจือจาง 1 : 4 + ผ่านเมมเบรน เจือจาง 1 : 10 + ผ่านเมมเบรน	0.0322 ± 0.0021 0.0121 ± 0.0040	สีเหลืองอ่อนจาง ๆ ขุ่นเล็กน้อย สีเหลืองอ่อนจาง ๆ ขุ่นเล็กน้อย
5. เจือจาง 1 : 4 + เติมผงถ่าน + ผ่านเมมเบรน เจือจาง 1 : 10 + เติมผงถ่าน + ผ่านเมมเบรน	0.0013 ± 0.0002 0.0007 ± 0.0002	สารละลายใส ไม่มีสี สารละลายใส ไม่มีสี

จากผลการทดลอง พบว่า การเจือจางน้ำอ้อยเพียงอย่างเดียวนั้น ไม่เพียงพอที่จะขจัดสีและความขุ่นออกจากน้ำอ้อยได้หมด การเติมผงถ่านเพื่อช่วยดูดซับสีและความขุ่นออกจากน้ำอ้อยได้ แต่ก็ยังคงมีความขุ่นเล็ก ๆ บางส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่างจาก blank มาก ส่วนการกรองผ่านเมมเบรน $0.45\ \mu\text{m}$ นั้นจะยังคงมีสีของสารละลายน้ำอ้อยที่เข้มข้นกว่าการเติมผงถ่าน ดังนั้น ในการเตรียมตัวอย่างน้ำอ้อยที่เหมาะสมจึงต้องมีการใช้ผงถ่านเพื่อช่วยขจัดสีและความขุ่นร่วมกับกรองผ่านเมมเบรนเพื่อกำจัดอนุภาคเล็กๆ ที่เหลืออยู่ ซึ่งอาจมาจากน้ำอ้อยเองหรือจากอนุภาคเล็กๆ ของผงถ่านออกไป

สำหรับช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลและฟอสเฟตที่ใช้ในการหาสภาวะการทดลองต่างๆ ในบทที่ 6 จะเลือกใช้ช่วงความเข้มข้นที่เสมือนผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่เหมาะสมแล้วมาใช้ในการศึกษา นั่นคือ ความเข้มข้นที่ใช้ศึกษาสภาวะต่าง ๆ จะต่ำกว่าที่มีเริ่มต้นในตัวอย่างจริง 4 เท่า

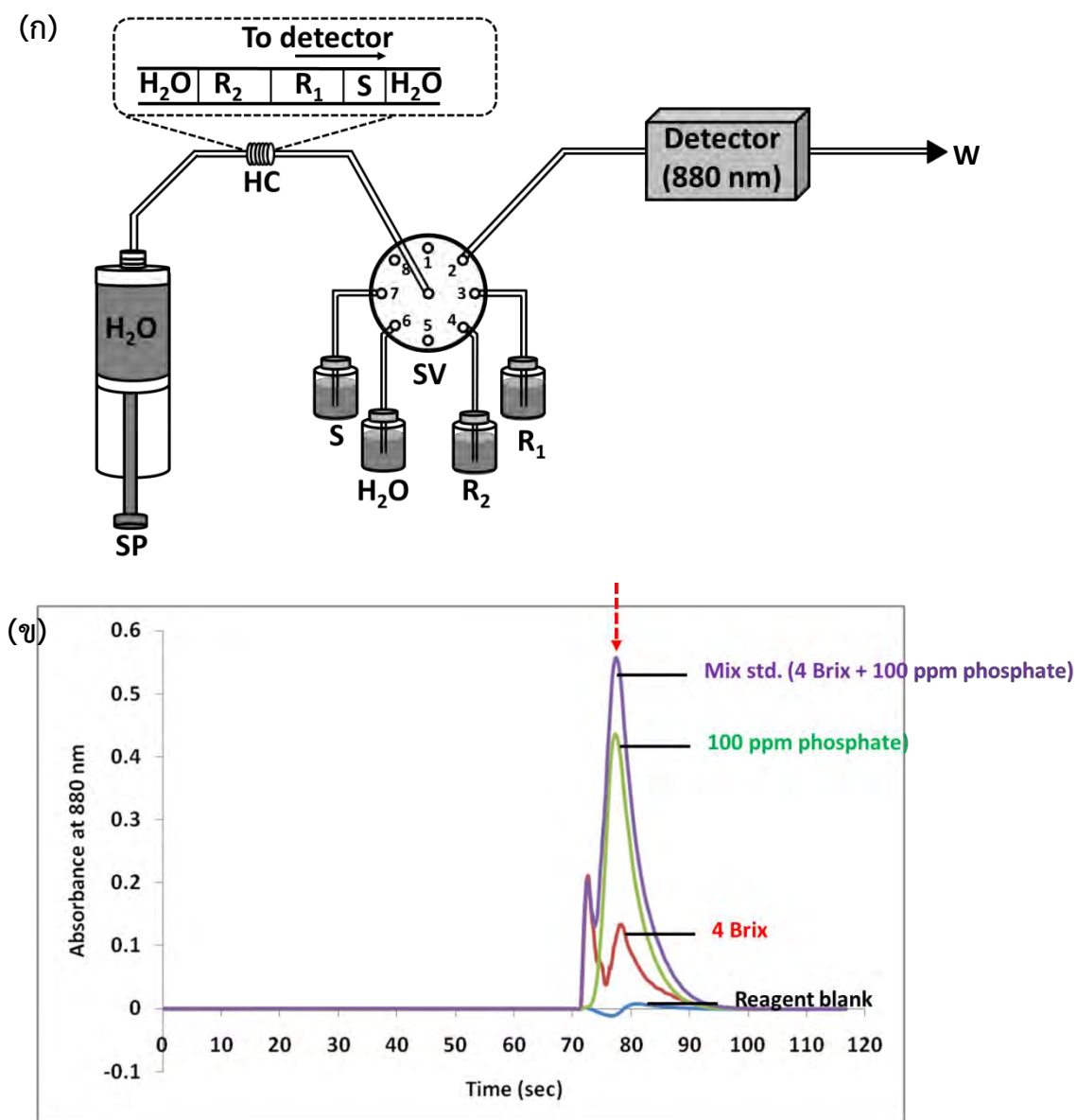
6.3 การออกแบบระบบ SIA และลำดับการดูดทอนสารละลาย

การออกแบบระบบ SIA เพื่อให้เหมาะสมในการวิเคราะห์น้ำตาลและฟอสเฟตในงานวิจัยนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 6.3 การศึกษาจะใช้สารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 4 ปริกซ์ สารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 100 ppm และสารละลายผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟต เป็นตัวทดสอบ โดยมีลำดับการศึกษาด้วยระบบ SIA รูปแบบต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

6.3.1 ระบบ SIA แบบปกติ

การศึกษาเบื้องต้นได้ใช้ระบบ SIA แบบปกติที่ใช้ทั่วไป (รูปที่ 6.3(ก)) มาลองทดสอบความเป็นไปได้ในการวัดปริมาณน้ำตาลและฟอสเฟตพร้อมกัน โดยมีลำดับขั้นตอนการดูดทอนสารละลายดังแสดงในกรอบเส้นประรูป 6.3(ก) พบว่า โพรไฟล์สัญญาณน้ำตาลซูโครสจะมีลักษณะเป็น 2 พีก อันเนื่องมาจากผลของ Schlieren บริเวณหัวท่อนโซนและหางท่อนโซนน้ำตาลกับ

กระแสน้ำ [15, 26] จากการซ้อนทับภาพสัญญาณดังกล่าว (รูปที่ 6.3(ข)) พบว่าพีคสัญญาณที่ 2 ของน้ำตาลจะเกิดขึ้นที่เวลาเดียวกันกับสัญญาณของฟอสเฟตพอดี ดังจะเห็นสอดคล้องได้จากพีคสัญญาณของสารละลายผสมน้ำตาล-ฟอสเฟต



รูปที่ 6.3 (ก) แสดงระบบ SIA แบบทั่วไปและลำดับของท่อนสารละลายใน HC (S: sample 50 μL , R1 และ R2: Reagent 1 และ Reagent 2 ปริมาตรอย่างละ 104 μL) และ (ข) ลักษณะของ SIA profiles ที่ได้จากสารละลายมาตรฐานน้ำตาลเข้มข้น 4 บริกซ์ สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 100 ppm และสารละลายผสมน้ำตาลและฟอสเฟต

ดังนั้น ระบบ SIA แบบรูปที่ 6.3(ก) นี้ จะไม่สามารถวิเคราะห์น้ำตาลและฟอสเฟตที่ปนกันอยู่ในตัวอย่างน้ำอ้อยได้

6.3.2 ระบบ SIA แบบปกติ พร้อมท่อนอากาศ

เพื่อให้สามารถวิเคราะห์น้ำตาลและฟอสเฟตในตัวอย่างได้พร้อมกัน ผู้วิจัยจึงได้ทำการเปลี่ยนแปลงลำดับการดูดท่อนตัวอย่าง (รูปที่ 6.4(ก)) โดยการใช้ท่อนอากาศเพื่อแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ท่อน ท่อน S1 สำหรับติดตามปริมาณน้ำตาล และท่อน S2 สำหรับติดตามปริมาณฟอสเฟต

จากผลการทดลอง พบว่า พีคที่ 2 ของน้ำตาลยังคงให้ค่าการดูดกลืนแสงรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตอยู่ โดยจะสังเกตเห็นได้จากรูปที่ 6.4(จ) และ (ฉ) ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของฟอสเฟตในสารละลายผสมเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนทางบวกในการวิเคราะห์ปริมาณได้ การจะลดผลรบกวนนี้จะต้องทำให้ท่อนทางของตัวอย่าง S1 มีการผสมที่ดีขึ้นก่อนเข้าเครื่องตรวจวัด ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพการผสมให้ดีขึ้นก่อนเข้าเครื่องตรวจวัดนี้จะส่งผลต่อท่อนสารละลายทั้งหมดในตัวอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จะส่งผลต่อการ sensitivity ของสัญญาณในช่วงหัวโซน S1 ของน้ำตาลเองด้วย (พีคที่ 1 รูป 6.4(จ))

6.3.3 ระบบ SIA แบบ modify พร้อมท่อนอากาศ

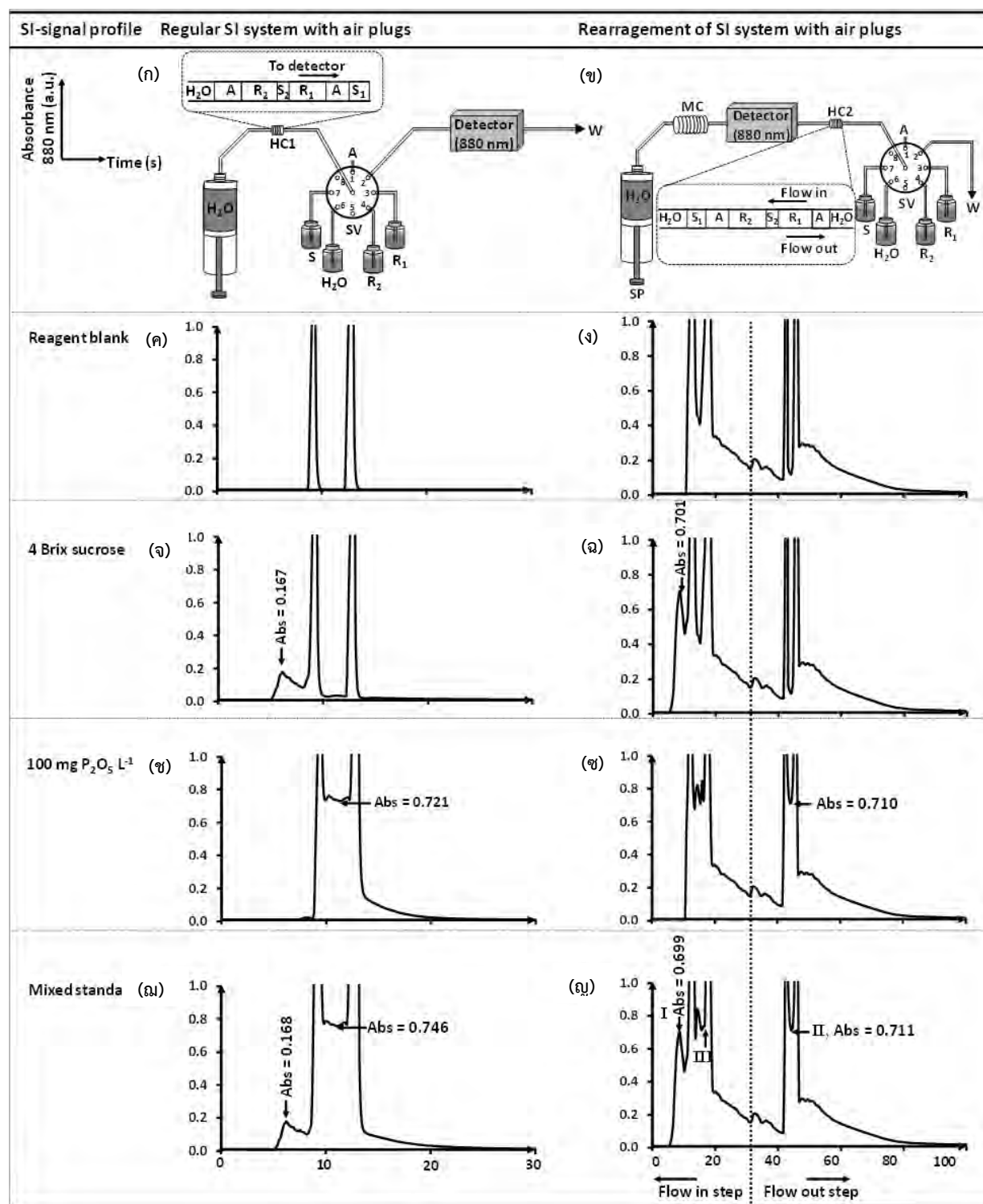
ระบบ SIA แบบ modify ได้ถูกนำเสนอขึ้นในงานวิจัยนี้ เครื่องตรวจวัดถูกย้ายมาวางไว้ระหว่าง syringe pump และ selection valve (รูปที่ 6.4(ข)) โดยยังคงลำดับการดูดสารละลายแบบมีท่อนอากาศไว้ดังเดิม และมีลำดับขั้นตอนการทำงานดังแสดงตารางที่ 5.2

ผลการทดลองที่ได้จากระบบ modified SIA นี้ พบว่า ในขั้นตอนการดูดสารละลายจาก HC (รูปที่ 6.4(ข)) ผ่านเครื่องตรวจวัดไปนั้น สัญญาณของน้ำตาลจะมีค่าสูงขึ้นจากเดิม เนื่องจากท่อนตัวอย่าง S1 ที่จะวัดน้ำตาลนั้นพักอยู่ใกล้เครื่องตรวจวัดมาก รอยต่อระหว่างกระแสดัฟฟาน้ำและสารละลายน้ำตาลจึงไม่มีการผสมเนื่องจาก laminar flow มากนัก ทำให้ sensitivity เพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาสัญญาณของ blank ในรูปที่ 6.4(ง) จะพบว่า reagent blank ของฟอสเฟตในช่วง Flow in (ตามขั้นตอนตารางที่ 5.2) ให้สัญญาณสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ

กับรูปที่ 6.4(ค) อย่างมาก อันเนื่องมาจากผลของ refractive index ของ reagent blank เอง ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นสอดคล้องกับสัญญาณน้ำตาลที่สูงขึ้นว่าในช่วง Flow in นี้มีการผสมเกิดขึ้นต่ำ (dispersion น้อยมาก) จึงเหมาะอย่างยิ่งที่จะใช้ติดตามปริมาณน้ำตาลด้วยหลักการ Schlieren effect แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาลักษณะรูปร่างสัญญาณของฟอสเฟตที่ได้จากท่อนตัวอย่าง S2 ในช่วง Flow in นั้น จะเห็นว่าไม่เหมาะสมนักในการนำมาใช้ตรวจวัดปริมาณฟอสเฟต เนื่องจากมีค่าการดูดกลืนแสงของ reagent blank สูง (รูปที่ 6.4(ง)) และมีลักษณะโพรไฟล์ของฟอสเฟตที่เป็นพีกหัวแตก อันเนื่องมาจากการผสมเกิดไม่ทั่วเท่ากันทั้งโซนนั่นเอง

ดังนั้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผสมให้เกิดปฏิกิริยา molybdenum blue ของฟอสเฟต จึงต้องให้ท่อนสารละลายทั้งหมดที่ผ่านออกจากเครื่องตรวจวัดในช่วง Flow in เข้าไปสู่ mixing coil (MC) ซึ่งทำจากท่อที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และเมื่อทำการผลักท่อนสารละลายทั้งหมดเข้าสู่เครื่องตรวจวัดอีกครั้ง (Flow out ในขั้นตอนที่ 9 ตารางที่ 5.2) จะพบว่าลักษณะสัญญาณของฟอสเฟตในช่วง Flow out เกิดการผสมที่ดีขึ้น ทำให้ได้สัญญาณที่มีความสม่ำเสมอและสวยงาม (รูปที่ 6.4(ข) และ (ญ)) รวมทั้งสัญญาณ reagent blank ของฟอสเฟตก็ลดต่ำลงเช่นกัน (รูปที่ 6.4(ง) และ (ฉ) หลังเส้นประ) อันเนื่องมาจากการผสมที่ดีขึ้นจากการเพิ่ม MC และการผลักท่อนสารละลายทั้งหมดแบบ 2 ทิศทางนั่นเอง ส่วนสัญญาณของน้ำตาลที่ได้จากขั้นตอน Flow out นั้น (รูปที่ 6.4(ฉ) และ (ญ)) จะไม่มีความคมชัดแล้ว เนื่องจากรอยต่อระหว่างน้ำตาลและกระแสดัวพาน้ำได้ผสมกันดีมากขึ้น จึงไม่เหมาะที่จะใช้ติดตาม

จากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้ระบบ SIA แบบ modify ที่มีลำดับการดูดท่อนสารละลายต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 6.4(ข) ถูกเลือกใช้เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในส่วนต่าง ๆ ต่อไป



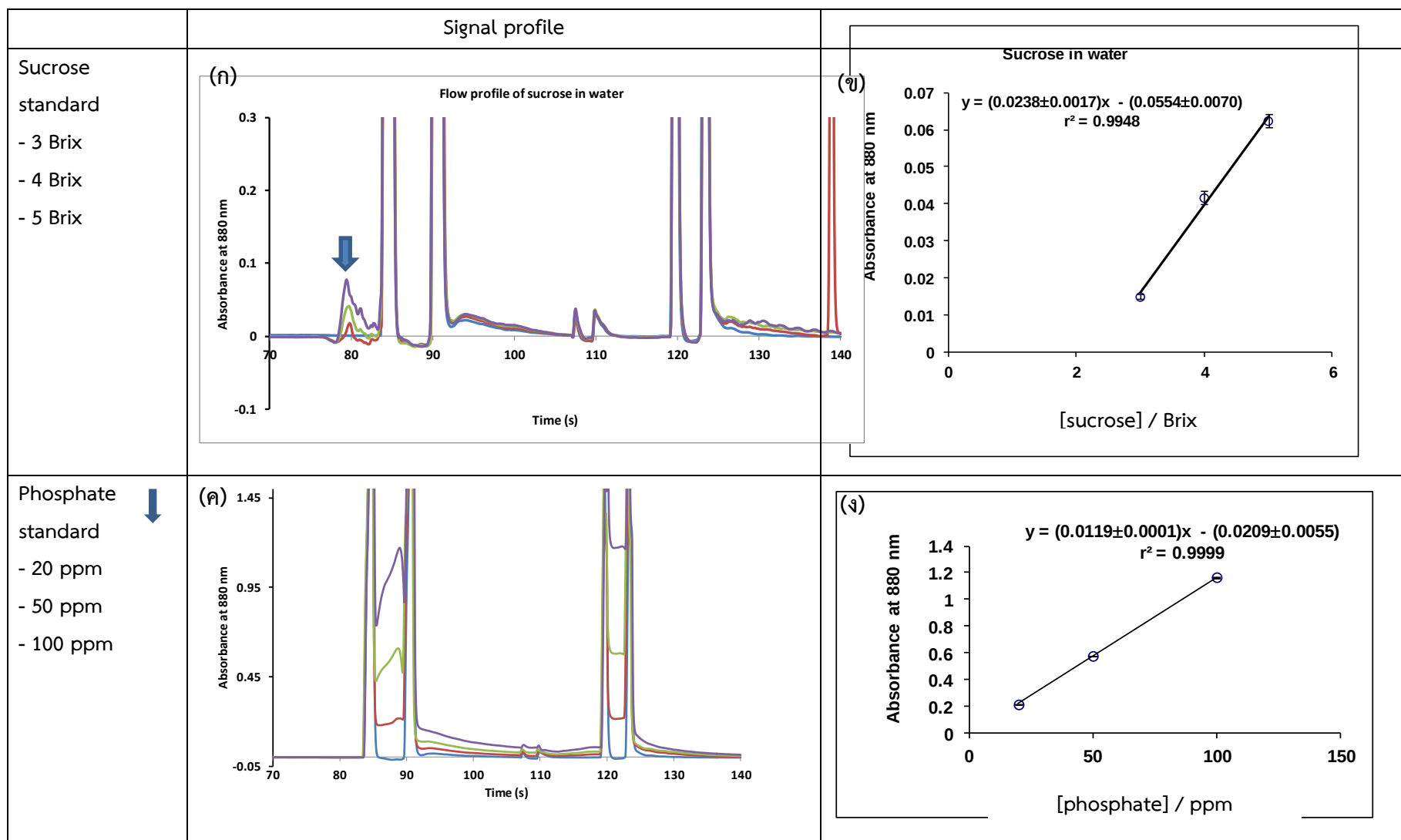
รูปที่ 6.4 (ซ้าย) แสดงระบบ SIA แบบปกติ ร่วมกับการใช้ฟองอากาศเพื่อลดผลความหนืดของน้ำตาลที่ไปรบกวนการตรวจวัดฟอสเฟต (ขวา) แสดงระบบ SIA แบบปรับปรุงใหม่ (S1: sample1 50 μ L, S2: sample2 20 μ L, A: air plug 55 μ L, R1 และ R2: Reagent 1 และ Reagent 2 ปริมาตรอย่างละ 104 μ L

6.4 การเปรียบเทียบสัญญาณจากสารมาตรฐานเดี่ยวและสารมาตรฐานผสม

เพื่อให้มั่นใจว่าระบบที่ได้เลือกแล้วในรูปที่ 6.4(ข) มีความเหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลและฟอสเฟตที่มีร่วมกันในตัวอย่างได้โดยปราศจากการรบกวนกันเอง และมีความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นแบบผันตรงกัน ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบสัญญาณการดูดกลืนแสงในลักษณะของกราฟมาตรฐานระหว่างสารมาตรฐานเดี่ยวและสารมาตรฐานผสม โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 – 5 บริกซ์ จำนวน 1 ชุด สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 20 – 100 ppm จำนวน 1 ชุด และสารละลายผสมระหว่างน้ำตาลและฟอสเฟตที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นคู่กันไปอีกหนึ่งชุด

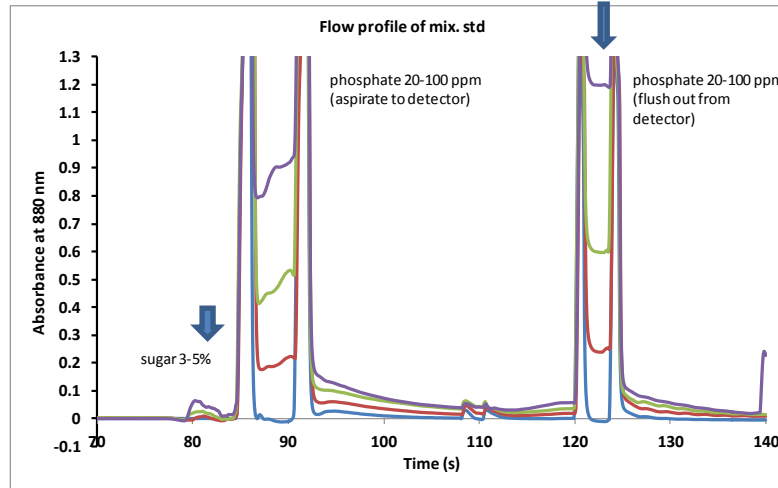
สำหรับน้ำตาลซูโครสจะใช้ค่าการดูดกลืนแสงจากช่วง Flow in ในการนำมาพล็อตเป็นกราฟมาตรฐาน และใช้ค่าการดูดกลืนแสงจากช่วง Flow out ในการนำมาพล็อตกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต โดยผลการศึกษาเพื่อเทียบสัญญาณจากสารละลายมาตรฐานนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 6.5

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบ sensitivity (จากความชัน) ระหว่างสารละลายน้ำตาลซูโครสเดี่ยว ($y = (0.0238 \pm 0.0017)x - (0.0554 \pm 0.0070)$) กับสารละลายน้ำตาลซูโครสที่มีฟอสเฟตปนอยู่ ($y = (0.0239 \pm 0.0032)x - (0.0559 \pm 0.0132)$) พบว่าสารละลายทั้งสองชุดนี้มี sensitivity ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และในทำนองเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบ sensitivity ระหว่างสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเดี่ยว ($y = (0.0119 \pm 0.0001)x - (0.0209 \pm 0.0055)$) กับสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตที่ผสมอยู่กับน้ำตาลซูโครส ($y = (0.0121 \pm 0.0002)x - (0.0125 \pm 0.0142)$) พบว่าสารละลายทั้งสองชุดนี้มี sensitivity ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ดังนั้น ผลการทดลองนี้จึงสนับสนุนความเป็นไปได้ในการใช้ระบบ SIA แบบ modify ที่ได้นำเสนอขึ้นเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและฟอสเฟตที่มีอยู่ร่วมกันในตัวอย่างน้ำอ้อยคั้นสดได้ต่อไป

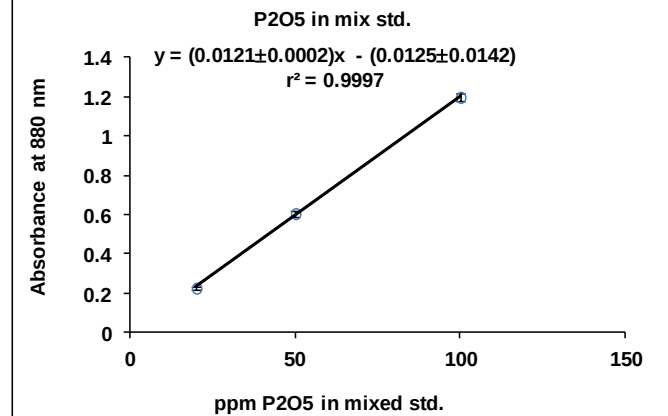
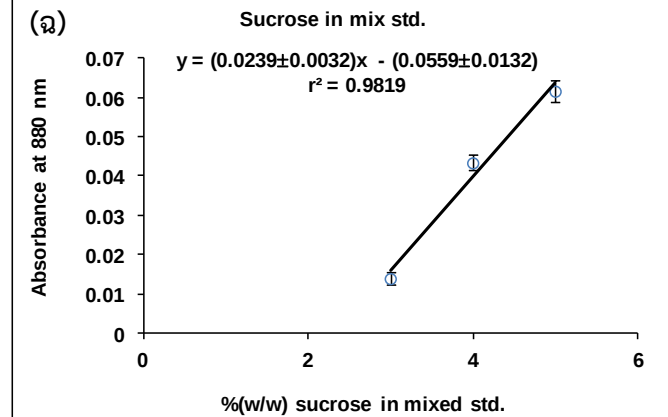


Mixed standard
 - 3 Brix + 20 ppm
 - 4 Brix + 50 ppm
 - 5 Brix + 100 ppm

(จ)



(ฉ)



รูปที่ 6.5 แสดง SIA profiles ที่ได้จากการละลายมาตรฐานเดี่ยวและผสม (ซ้าย) และแสดงกราฟมาตรฐานที่ได้จากการละลายในแต่ละชุด (ขวา)

6.5 ปริมาตรของตัวอย่าง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครส (S1) และปริมาณฟอสเฟต (S2) โดยพิจารณาจาก sensitivity และช่วงความเป็นเส้นตรง ตารางที่ 6.2 แสดงผลของปริมาตรตัวอย่างที่ใช้

Sample volume (μL)	Linear equation ^a	Linearity range
<i>S₁ for Sucrose determination (S₂ was fixed at 20 μL)</i>		
25	$y = (11.49 \pm 0.16) \times 10^{-2} x - (5.12 \pm 0.51) \times 10^{-2},$ $r^2 = 0.999$	0.5 - 5.0 Brix
50	$y = (19.34 \pm 0.18) \times 10^{-2} x - (4.79 \pm 0.54) \times 10^{-2},$ $r^2 = 0.999$	0.5 - 5.0 Brix
75	$y = (28.74 \pm 0.12) \times 10^{-2} x - (6.10 \pm 2.97) \times 10^{-2},$ $r^2 = 0.995$	0.5 - 4.0 Brix
100	$y = (28.46 \pm 0.14) \times 10^{-2} x - (1.83 \pm 3.33) \times 10^{-2},$ $r^2 = 0.993$	0.5 - 4.0 Brix
<i>S₂ for phosphate determination (S₁ was fixed at 50 μL)</i>		
10	$y = [(3.04 \times 10^{-3}) \pm (5.8 \times 10^{-5})] x - [(3.39 \times 10^{-2}) \pm (6.9 \times 10^{-3})],$ $r^2 = 0.999$	20 – 200 ppm
20	$y = [(5.51 \times 10^{-3}) \pm (5.8 \times 10^{-5})] x - [(2.11 \times 10^{-2}) \pm (6.9 \times 10^{-3})],$ $r^2 = 0.999$	20 – 200 ppm
50	$y = [(12.3 \times 10^{-3}) \pm (1.62 \times 10^{-4})] x - [(2.41 \times 10^{-2}) \pm (1.88 \times 10^{-2})],$ $r^2 = 0.999$	20 – 200 ppm
100	$y = [(18.01 \times 10^{-3}) \pm (6.20 \times 10^{-4})] x - [(4.11 \times 10^{-2}) \pm (5.65 \times 10^{-2})],$ $r^2 = 0.996$	20 – 150 ppm

^aobtained from slopes of calibration graphs within the their linear ranges

x and y are Brix and phosphate concentration and absorbance at 880 nm

จากผลการทดลองในตารางที่ 6.2 พบว่า เมื่อใช้ปริมาตรของตัวอย่าง (S1 และ S2) เพิ่มขึ้น ทำให้ได้ sensitivity ของการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นด้วย แต่ความเป็นเส้นตรงของช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์จะมีแนวโน้มที่ลดลง ดังนั้น เมื่อพิจารณาที่ปริมาตร S1 พบว่า sensitivity ของการวิเคราะห์จะเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ที่ปริมาตร 75 μL แต่อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้างขึ้น ปริมาตร 50 μL จึงเป็นปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส

ในทำนองเดียวกัน การศึกษาการเพิ่มปริมาตร S2 สำหรับติดตามปริมาณฟอสเฟตก็ให้แนวโน้มเดียวกัน คือ ปริมาตรตัวอย่างเพิ่มขึ้น ก็ทำให้ sensitivity เพิ่มขึ้น และส่งผลให้ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์มีแนวโน้มแคบลง จากผลในตารางที่ 6.2 ผู้วิจัยได้เลือกปริมาตร 20 μL เป็นปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตต่อไป แม้ว่าปริมาตร 50 μL จะมี sensitivity สูงกว่าและมีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากันก็ตาม เนื่องจากผู้วิจัยต้องการให้ระบบวิเคราะห์ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้

6.6 อัตราการไหล

อัตราการไหลเป็นปัจจัยที่สำคัญหนึ่งของการวิเคราะห์ด้วยระบบวิเคราะห์แบบไหลที่จำเป็นต้องทำการศึกษา เนื่องจากอัตราการไหลเป็นปัจจัยควบคุมการแพร่กระจาย (dispersion) ของท่อนโซนสารละลาย และควบคุมให้สารผลิตภัณฑ์หรือตัวอย่างเดินทางสู่เครื่องตรวจวัดด้วยเวลาที่คงที่เท่ากันทุกครั้ง ทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณระหว่างสารมาตรฐานและสารตัวอย่างได้อย่างแม่นยำ

ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาอัตราการไหลที่สำคัญ 2 ช่วง คือ อัตราการไหลในขั้นตอนวิเคราะห์ที่ 8 (ตารางที่ 5.2) หรือ 'Flow in' ซึ่งเป็นขั้นที่ท่อนสารละลายถูกปั๊มดูดผ่านเครื่องตรวจวัดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส และศึกษาอัตราการไหลในขั้นตอนที่ 9 (ตารางที่ 5.2) หรือ 'Flow out' ซึ่งใช้เป็นขั้นติดตามสัญญาณการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนฟอสเฟตสีน้ำเงินเมื่อถูกปั๊มผลักผ่านเครื่องตรวจวัดอีกครั้ง

6.6.1 อัตราการไหลขึ้น 'Flow in'

อัตราการไหลในช่วง 'Flow in' สำหรับตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสได้ถูกศึกษาในช่วง 1 – 10 mL / min โดยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อให้ได้ระบบวิเคราะห์ที่มี sensitivity สูงในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาล เนื่องจากช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์น้ำตาลจะอยู่ในช่วงความเข้มข้นประมาณ 2.5 – 4 Brix โดยเป็นความเข้มข้นที่ประมาณจากตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้ว (หัวข้อ 6.2) นอกจากนี้ ระบบวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงสูงและวิเคราะห์ได้รวดเร็วก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณาร่วมด้วย

ดังนั้น ในการทดลองจะแบ่งการพิจารณาเป็น 2 ส่วน คือ พิจารณาผลของอัตราการไหลที่มีต่อความเที่ยง (reproducibility) และความเร็วในการวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายน้ำตาลเข้มข้น 3 Brix เป็นตัวแทนในการศึกษา (ตารางที่ 6.3) และพิจารณาผลของอัตราการไหลที่มีต่อ sensitivity และความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ (ตารางที่ 6.4)

ตารางที่ 6.3 อิทธิพลของอัตราการไหลในขั้น 'Flow in' ต่อความเที่ยง (reproducible) ของน้ำตาลซูโครส 3 Brix (n = 10)

Flow rate (mL / min)	%RSD	Sample throughput (h ⁻¹)
1	2.24	19
2	2.29	26
3	2.97	30
5	3.02	33
10	6.58	36

ตารางที่ 6.4 อิทธิพลของอัตราการไหลในชั้น ‘Flow in’ ต่อ sensitivity และความเป็นเส้นตรงสำหรับวัดปริมาณน้ำตาลซูโครส

Flow rate (mL / min)	Linear equation	r ²
1	Abs = (0.1560 ± 0.0080) Brix – (0.0407 ± 0.0025)	0.989
2	Abs = (0.1772 ± 0.0112) Brix + (0.0056 ± 0.0341)	0.984
3	Abs = (0.1937 ± 0.0049) Brix – (0.0242 ± 0.0148)	0.998
5	Abs = (0.1650 ± 0.0045) Brix – (0.0845 ± 0.0137)	0.997

พบว่า ที่อัตราการไหลสูงถึง 10 mL / min นั้น แม้จะมีความเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างต่อชั่วโมง (ตารางที่ 6.3) แต่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่มีความเที่ยง (irreproducible) อันเนื่องมาจากความเป็นไปได้ในการเกิดการไหลแบบ turbulent flow ที่อัตราการไหลสูง ๆ จึงทำให้การเกิดเลนส์ระหว่างน้ำตาลซูโครสและกระแสตัวพาน้ำไม่คงที่ รอยต่อของสารละลายทั้งสองเกิดขึ้นแบบไม่สม่ำเสมอ ทำให้แสงที่ตกกระทบบริเวณดังกล่าวได้อย่างไม่สม่ำเสมอไปด้วย ทำให้ได้ผลที่มีค่าการกระจายของสัญญาณสูง (SD สูง) และเมื่อทำการลดอัตราการไหลลง (ดังตารางที่ 6.3) พบว่า ที่อัตราการไหลต่ำลงให้ผลที่มีความเที่ยงมากขึ้น แต่ก็สูญเสียความเร็วในการวิเคราะห์ลงไปตามลำดับ

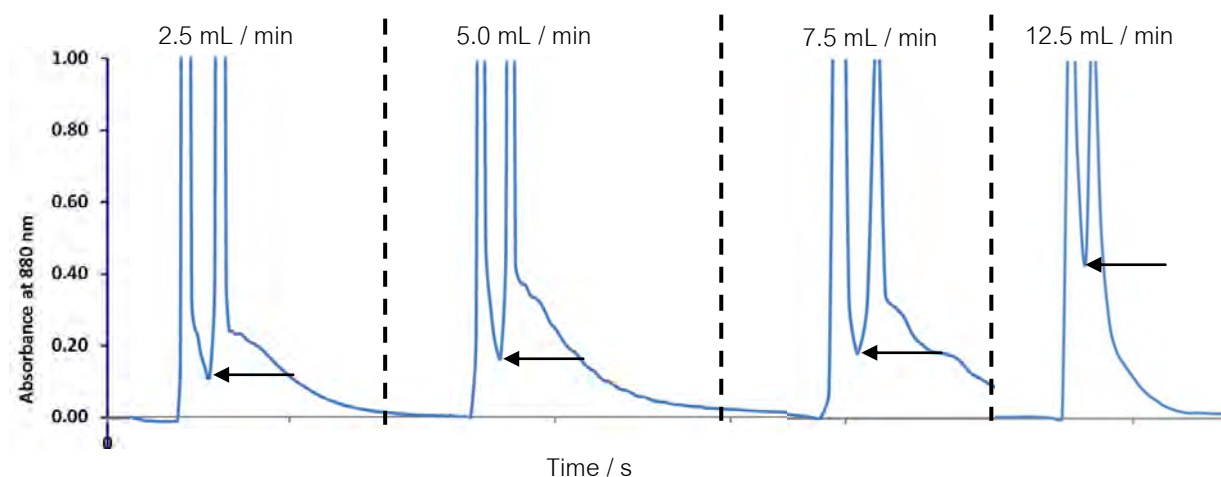
ดังนั้น อัตราการไหลที่ 1 – 5 mL / min จึงถูกนำมาศึกษาอีกครั้ง โดยพิจารณาถึงความเป็นเส้นตรงและ sensitivity ของการวิเคราะห์ในช่วง 0.5 – 5 Brix เป็นตัวแทนในการศึกษาจากตารางที่ 6.4 พบว่า เมื่ออัตราการไหลที่ใช้ต่ำเกินไปในช่วง 1 และ 2 mL / min พบว่าทั้ง sensitivity และช่วงความเป็นเส้นตรงลดต่ำลง เมื่อเทียบกับอัตราการไหลที่ 3 mL / min ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าอัตราการไหลที่ต่ำเกินไปทำให้เกิดการกระจายตัว (dispersion) ระหว่างท่อน้ำตาลและกระแสตัวพาน้ำได้มากขึ้นก่อนที่จะเข้าเครื่องตรวจวัด จึงทำให้รอยต่อระหว่างท่อนสารละลายทั้งสองไม่มีความชัดเจน ส่งผลให้ sensitivity ลดลงดังกล่าว ส่วนอัตราการไหลที่ 5 mL / min แม้ว่าจะให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ดี (ตารางที่ 6.4) และมี sample throughput ที่สูงกว่า (ตารางที่ 6.3) แต่มี sensitivity ที่ต่ำกว่าอัตราการไหล 3 mL / min ถึง 1.2 เท่า

ดังนั้น อัตราการไหล 3 mL / min จึงเป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงจาก Schlieren effect ของน้ำตาล

6.6.2 อัตราการไหลชั้น ‘Flow out’

เนื่องจากปริมาณฟอสเฟตที่มีทั่วไปในตัวอย่างน้ำอ้อยอยู่ในช่วง 300 – 400 ppm ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณที่สูงมากพอที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยปฏิกิริยา molybdenum blue ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาอัตราการไหลในช่วง ‘Flow out’ สำหรับตรวจวัดปริมาณฟอสเฟต จึงไม่ต้องคำนึงถึง sensitivity ในการวิเคราะห์ฟอสเฟตมากนัก แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ได้พยายามลดผลค่าการดูดกลืนแสงของ reagent blank สำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตลงหรือให้อยู่ในช่วงที่ไม่สูงเกินไป และได้มุ่งเน้นพัฒนาระบบให้มีความรวดเร็วในการตรวจวัดเพื่อให้ได้จำนวนตัวอย่างต่อการวิเคราะห์ภายใน 1 ชั่วโมง (sample throughput) ที่มากที่สุดด้วย

การทดลองนี้จึงทำการศึกษาผลของอัตราการไหล ‘Flow out’ ในช่วง 2.5 – 12.5 mL / min ที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสงของ reagent blank ดังแสดงในรูปที่ 6.6 และผลของ sample throughput ดังตารางที่ 6.5 ด้วย



รูปที่ 6.6 แสดงสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงของ reagent blank (ตำแหน่งลูกศรชี้แสดง) ในช่วงการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตด้วยอัตราการไหล ‘Flow out’ ต่าง ๆ

จากรูปที่ 6.6 พบว่า เมื่ออัตราการไหลเร็วขึ้นจาก 2.5 mL / min เป็น 12.5 mL / min กลับส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของ reagent blank สูงขึ้นไปด้วย คือ 0.1233, 0.1670, 0.1798 และ 0.4391 a.u. ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากอัตราการไหลสู่เครื่องตรวจวัดที่เร็วเกินไป ทำให้การผสมกันระหว่างท่อนโซนรีเอเจนต์ลดลง เนื่องจาก axial dispersion ที่ลดลงระหว่างการเดินทางไปเครื่องตรวจวัด จึงให้ค่าการดูดกลืนแสงอันเนื่องมาจากความแตกต่างของ refractive index ภายในรีเอเจนต์และ blank (ใช้น้ำเป็น blank แทนฟอสเฟต) ที่สูงขึ้น ทำให้อัตราการไหล 12.5 mL / min ไม่เหมาะสมที่จะใช้ แม้ว่าจะให้ความเร็วในการวิเคราะห์สูงสุดก็ตาม (52 ตัวอย่างต่อชั่วโมง)

เมื่อพิจารณาในประเด็นของความเร็วในการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 6.5 พบว่า อัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น ‘Flow out’ เพื่อวิเคราะห์ฟอสเฟต คือ อัตราการไหล 7.5 mL / min เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงของ reagent blank ที่ไม่สูงเกินไป (ต่ำกว่า 0.2 a.u) แล้วยังให้ความเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่างได้ถึง 45 ตัวอย่าง / ชม.อีกด้วย

ตารางที่ 6.5 อิทธิพลของอัตราการไหลในขั้น ‘Flow out’ ต่อความเร็วในการวิเคราะห์ (จำนวนตัวอย่างต่อชั่วโมง) โดยใช้สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 100 ppm ($n = 3$) ในการศึกษา

Flow rate (mL / min)	Sample throughput (h^{-1})
2.5	21
5.0	30
7.5	45
12.5	52

6.7 ความยาวของท่อนอากาศ (air plug)

เนื่องจากสารละลายน้ำตาลมีความหนืดค่อนข้างมาก แม้จะเป็นช่วงความเข้มข้นต่ำ ๆ (เช่น 3 Brix) ก็ตาม ทำให้ส่วนท้ายของท่อนโซนน้ำตาลให้สัญญาณการดูดกลืนแสงขึ้นซ้อนตำแหน่งเวลาเดียวกับสัญญาณการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารเชิงซ้อนฟอสเฟตสีน้ำเงินด้วย ทำให้

ต้องใช้ท่อนอากาศเข้าไปเพื่อค้นระหว่างการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยตัวอย่างโชน S1 และฟอสเฟตด้วยตัวอย่างโชน S2 รวมถึงการจัดวางตำแหน่งเครื่องตรวจวัดใหม่ (รูปที่ 6.4(ข)) เพื่อกำจัดผลการรบกวนดังกล่าว ดังนั้น ความยาวของท่อนอากาศที่ใส่ในระบบ (ตามขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ 3 และ 7 ในตารางที่ 5.2) ต้องถูกศึกษา ช่วงความยาวท่อนอากาศใน HC ที่ใช้ศึกษา คือ 1, 3, 5, 7 และ 10 ซม. ตามลำดับ

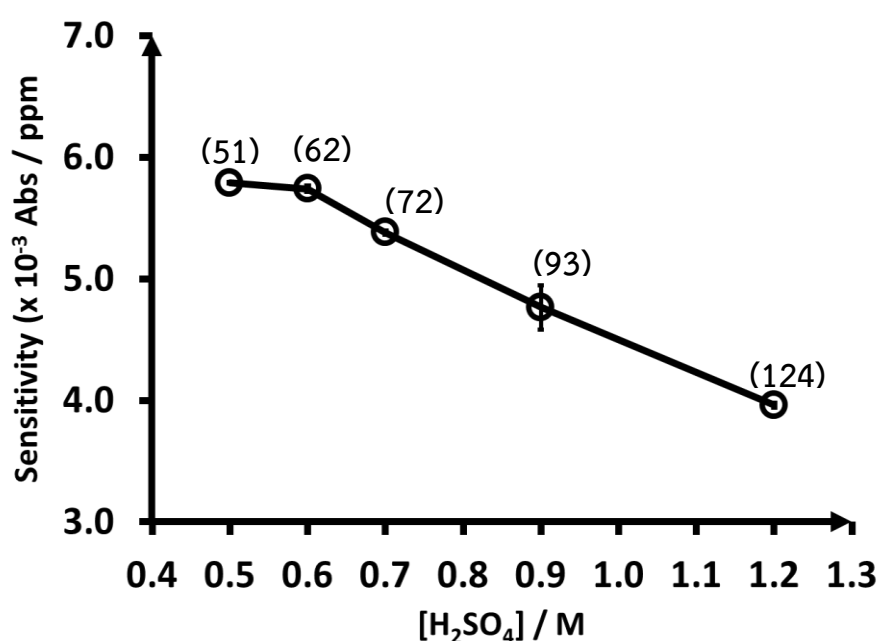
จากการทดลอง พบว่า ความยาวของท่อนอากาศที่ได้ทำการศึกษาไม่ส่งผลต่อความเร็วในการวิเคราะห์ของระบบมากนัก (ตารางที่ 6.6) แต่กลับส่งผลต่อความเที่ยงของการวิเคราะห์มากกว่า จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้ความยาวของท่อนอากาศสั้น (1 และ 3 ซม.) เข้าไปในระบบวิเคราะห์ตามรูปที่ 6.4(ข) จะทำให้เกิดปัญหาฟองอากาศแตกเป็นท่อนเล็ก ๆ ในระบบ ส่งผลต่อความเที่ยงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 880 nm ในการวิเคราะห์ทั้งน้ำตาลและฟอสเฟต (ตารางที่ 6.6) ซึ่งไม่เหมาะที่จะใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสม แต่อย่างไร หากใช้ท่อนอากาศที่ยาวเกินไป จะส่งผลให้ความเร็วในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างลดลงไปด้วย (ตารางที่ 6.6) ดังนั้น ความยาวของท่อนอากาศ 7 ซม. จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 6.6 อิทธิพลของความยาวท่อนอากาศที่มีต่อการวิเคราะห์น้ำตาลและฟอสเฟต

Length of air plug (cm)	%RSD (n = 7)		Sample throughput (h ⁻¹)
	Sucrose 2 Brix	Phosphate 75 ppm	
1	10.0	25.5	30
3	19.2	6.8	30
5	3.4	3.6	30
7	1.9	3.6	30
10	1.5	2.8	29

ในระดับหนึ่งด้วย [29] เนื่องจากทำให้ปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินของซิลิเกตเกิดช้ากว่า ฟอสเฟต [30]

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ทำการกำหนดความเข้มข้นของแอมโมเนียม โมลิบเดตให้คงที่ (9.7 mM) แต่ทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกตั้งแต่ 0.5 – 1.2 M หรือคิดเป็น $[H^+] / [MoO_4^{2-}]$ อัตราส่วน 51 – 124 ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นกรดซัลฟูริกต่ำกว่านั้นนั้น ไม่ได้ทำการศึกษาในที่นี้ เนื่องจากการสืบค้นวรรณกรรมตามเอกสารอ้างอิง [28] ได้รายงานไว้ว่าจะเกิดสารสีน้ำเงินขึ้นเองแม้ไม่มีฟอสเฟตในปฏิกิริยา เนื่องมาจากการเกิด self reduction ของโมลิบเดตเอง

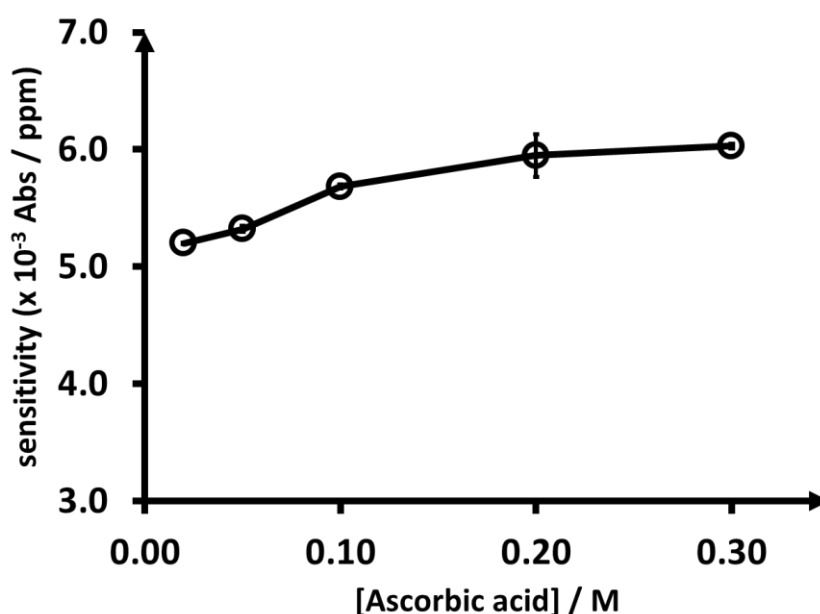


รูปที่ 6.7 กราฟแสดงอิทธิพลของรีเอเจนต์ R1 ที่มีต่อ sensitivity (ตัวเลขในวงเล็บแสดงอัตราส่วนระหว่าง $[H^+] / [MoO_4^{2-}]$)

จากผลการทดลองดังรูปที่ 6.7 พบว่า อัตราส่วนระหว่าง $[H^+] / [MoO_4^{2-}]$ เป็น 51 และ 62 ซึ่งเตรียมจากกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 และ 0.6 M ตามลำดับนั้น ให้ sensitivity ดีที่สุด ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ได้เลือกเตรียมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดตเข้มข้น 9.7 mM ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.6 M เป็นช่วงที่เหมาะสม

6.8.2 ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (R2)

กรดแอสคอร์บิกทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนฟอสเฟตสีน้ำเงิน หรือ molybdenum blue complex (สมการที่ 6.2) ซึ่งทำให้การตรวจวัดด้วยสเปกโตรโฟโตเมตรีนี้มี sensitivity สูงขึ้น ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิก (R2) ในช่วง 0.02 – 0.3 M ได้ถูกศึกษา ดังแสดงไว้ในรูปที่ 6.8 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกจะทำให้ได้ sensitivity เพิ่มขึ้นเร็วในช่วงแรก และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 0.3 M ดังนั้น ความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก 0.2 M ซึ่งเป็นช่วงตรงกลาง ๆ ที่ sensitivity เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงน้อยจึงถูกเลือกใช้



รูปที่ 6.8 กราฟแสดงอิทธิพลของกรดแอสคอร์บิก (R2) ที่มีต่อ sensitivity

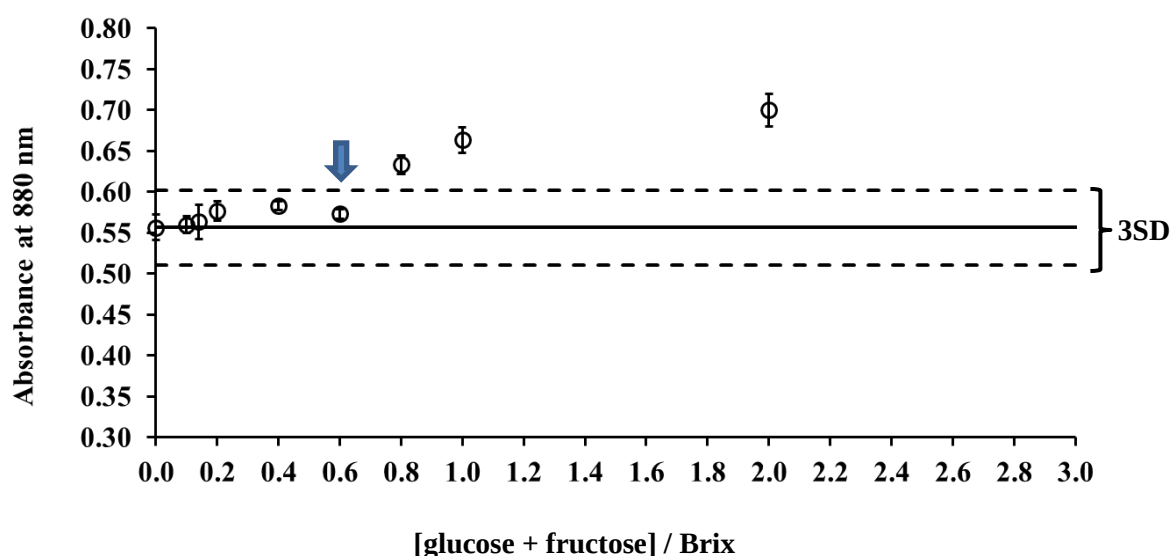
6.9 การศึกษาผลของตัวรบกวน

การศึกษาผลของตัวรบกวนจะใช้เกณฑ์ประเมินจากค่าการดุดกลืนแสงของตัวรบกวนที่ให้ค่าการดุดกลืนแสงเกิน 3SD ของค่าการดุดกลืนแสงจากน้ำตาลซูโครส หรือฟอสเฟตเป็นเกณฑ์ตัดสิน โดยถือว่าถ้าค่าการดุดกลืนแสงสูงเกิน 3SD ของสารละลายมาตรฐานซูโครส หรือฟอสเฟต จะถือว่าเป็นสัญญาณหรือค่าการดุดกลืนแสงนั้นมีความหมาย การเปรียบเทียบลักษณะนี้คล้าย ๆ กับการให้นิยามของขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด ที่ถือว่าหากความเข้มข้นใดให้สัญญาณที่สูงกว่า 3SD ของ blank จะถือว่าเป็นสัญญาณ (ไม่ใช่ noise) และความเข้มข้นนั้นจะเป็น Limit of detection ของระบบนั่นเอง

6.9.1 การรบกวนการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

ปกติน้ำอ้อยจะมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบที่มากที่สุด และมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจำพวกกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสปนอยู่ด้วยในปริมาณเล็กน้อย โดยคิดเป็นสัดส่วนน้ำตาลซูโครสที่มากกว่าถึงประมาณ 10 เท่าเป็นอย่างน้อย (ตารางที่ 1.1) เช่น โดยทั่วไปจะมีน้ำตาลซูโครสอยู่ 10 – 16 บริกซ์ น้ำตาลกลูโคสประมาณ 0.28 – 0.98 บริกซ์ และฟรุคโตสประมาณ 0.31 – 0.70 บริกซ์ [31] แต่อย่างไรก็ตาม น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสที่ปนอยู่ก็สามารถให้สัญญาณการดุดกลืนแสงอันเนื่องมาจากปรากฏการณ์ Schlieren ได้

เพื่อศึกษาผลการรบกวนของน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส ในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดลองโดยการเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสผสมกันให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ รวมกัน ตั้งแต่ 0.00 – 6.00 บริกซ์ ในสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3.00 บริกซ์



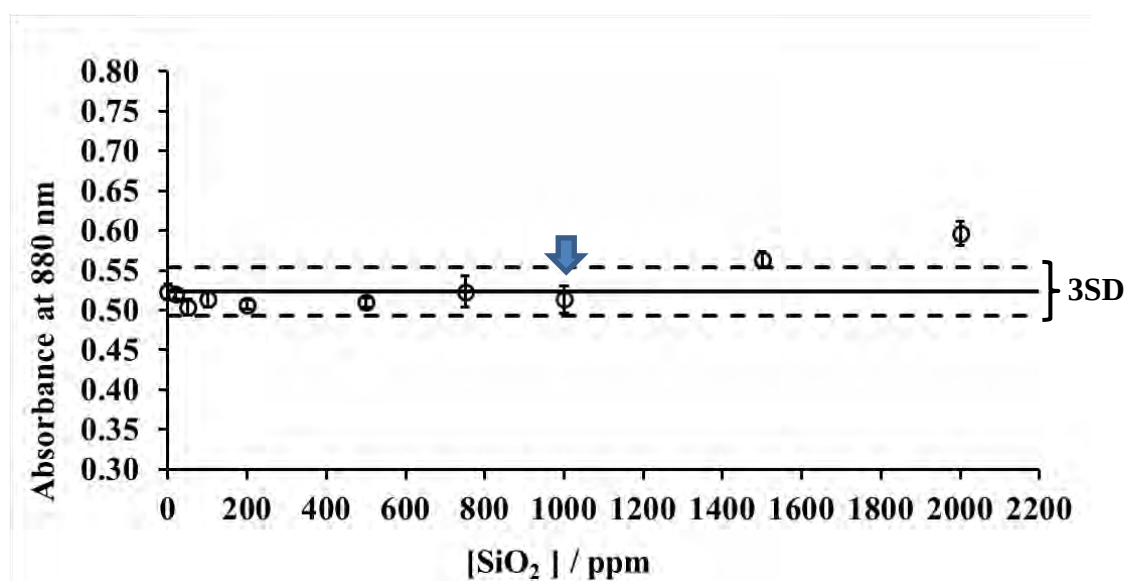
รูปที่ 6.9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส เข้มข้น 0.00 – 6.00 บริกซ์ที่มีต่อสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3.00 บริกซ์ (หมายเหตุ ตัวเลขความเข้มข้นที่แสดงเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสรวมกัน อย่างละเท่า ๆ กัน)

จากผลการทดลองดังรูปที่ 6.9 พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสที่มีรวมกันเกิน 0.6 บริกซ์จะเริ่มให้ค่าการดูดกลืนแสงที่รบกวนการวิเคราะห์ปริมาณซูโครสเข้มข้น 3.00 บริกซ์ หรือคิดเป็น 2.4 บริกซ์ ในน้ำตาลซูโครส 12.0 บริกซ์ ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าความเป็นจริงมาก ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้นั้นสามารถใช้ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสในตัวอย่างน้ำอ้อย ที่มีน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสผสมอยู่ตามธรรมชาติได้

6.9.2 การรบกวนการวิเคราะห์ฟอสเฟตจากซิลิเกต

ตัวรบกวนสำคัญในการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตด้วยวิธี molybdenum blue method ก็คือ ซิลิเกต ในน้ำอ้อยพบว่าจะมีปริมาณซิลิเกตอยู่มากกว่าฟอสเฟตถึงประมาณ 2 เท่า (4-5) ดังนั้น การเติมสารละลาย making agent เช่น Tartaric acid (32) เพื่อป้องกันการรบกวนจากซิลิเกตจึงเป็นที่นิยมอย่างยิ่ง

เพื่อศึกษาความเข้มข้นของซิลิกาที่จะเริ่มรบกวนค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนฟอสเฟตสีน้ำเงิน สารละลายซิลิกาเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 2000 ppm ($\text{mgSiO}_2 / \text{L}$) จึงถูกเตรียมในสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 100 ppm ($\text{mgP}_2\text{O}_5 / \text{L}$) และให้ผลการทดลองดังรูปที่ 6.10 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถป้องกันการรบกวนของซิลิกาได้ถึง 1000 ppm ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าฟอสเฟตถึง 10 เท่า ทำให้วิธีสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในน้ำอ้อยที่ปกติมีซิลิกาปนอยู่สูงกว่า 2 เท่าได้



รูปที่ 6.10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายซิลิกาเข้มข้น 0 – 2000 ppm ที่มีต่อสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 100 ppm

6.10 สรุปสถานะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

ตารางที่ 6.7 เป็นการสรุปสถานะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาทั้งหมด

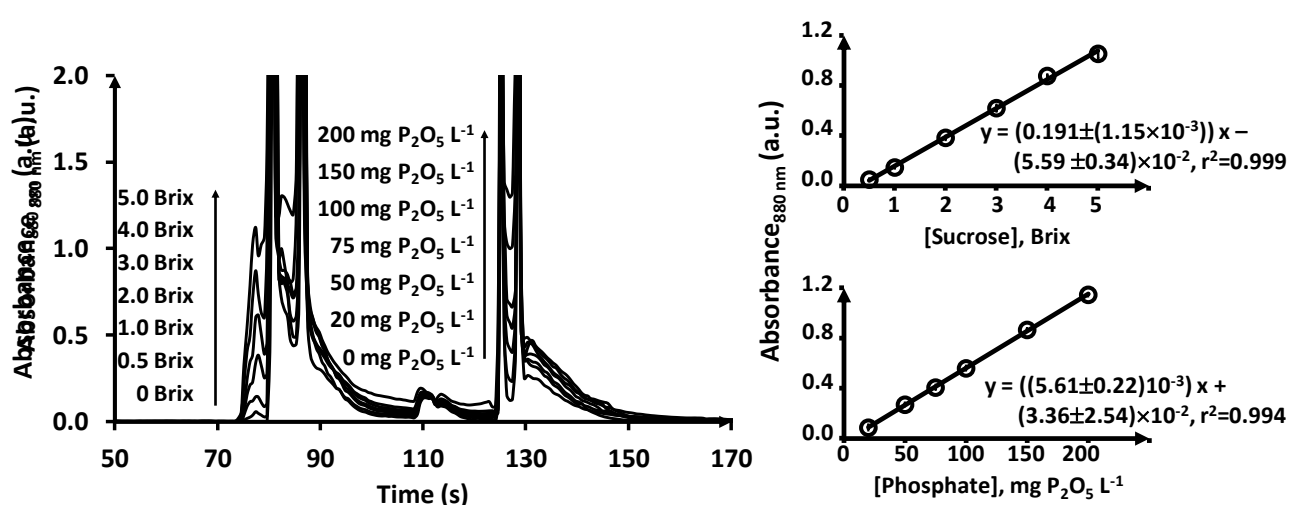
ตารางที่ 6.7 แสดงสรุปการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์น้ำตาลและฟอสเฟตในตัวอย่างพร้อมกัน โดยระบบ SIA รูป 6.4(ข)

Parameters	Sucrose analysis		Phosphate analysis	
	Studied	Selected	Studied	Selected
1. Sample preparation	← Required →			
2. Sample size per analysis (μL)	25 - 100	50	10 - 100	20
3. Flow rate (mL / min)	1.0 -10.0	3.0	2.5 – 12.5	7.5
4. Length of air plugs (cm)	1 - 10	7	1 – 10	7
5. Concentration of H ₂ SO ₄ in R1 (M)	← Not applicable →		0.5 – 1.2	0.6
6. Concentration of ascorbic acid in R2 (M)	← Not applicable →		0.02 – 0.3	0.2
7. Masking reagent	← Not applicable →		-	Tartaric acid

6.11 การรายงานคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น (Analytical performance)

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามาทั้งหมดมาตรวจสอบหาคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ทำให้ได้ระบบวิเคราะห์อัตโนมัติแบบ SIA (รูปที่ 6.4(ข)) มีคุณสมบัติในการติดตามวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตได้พร้อมกันในตัวอย่าง ดังแสดงคุณลักษณะของระบบไว้ในตารางที่ 6.8

รูปที่ 6.11 แสดงตัวอย่าง SI profiles และกราฟมาตรฐานของน้ำตาลและฟอสเฟต ที่ได้จากระบบ SIA รูปที่ 6.4(ข) ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาแล้วของการทดลองนี้



รูป

ที่ 6.11 แสดงลักษณะ SIA profiles และกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟต ที่สภาวะการทดลองที่เหมาะสม (แต่ละจุดบนกราฟมาตรฐานเกิดจากการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง)

ตารางที่ 6.8 แสดงคุณลักษณะของระบบวิเคราะห์แบบ SIA ที่พัฒนาขึ้น สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในตัวอย่างพร้อมกัน

Feature	Performance	
	Sucrose	Phosphate
Working range	0.5 - 5.0 Brix	20 - 200 ppm
Example calibration and correlation coefficient	$\text{Abs}_{880\text{nm}} = (0.191 \pm (1.15 \times 10^{-3})) \text{ Brix}$ $- (5.59 \pm 0.34) \times 10^{-2}, r^2 = 0.999$	$\text{Abs}_{880\text{nm}} = ((5.61 \pm 0.22) \times 10^{-3}) \text{ ppm}$ $+ (3.36 \pm 2.54) \times 10^{-2}, r^2 = 0.994$
Limit of detection	0.2 ^a	5.4 ^b
Precision (%RSD) ^c	3.2	2.7
Recovery (%)	84-105	87-122
Throughput (samples h ⁻¹)		

^adefined as 3S/N.

^bdefined as 3SD of blank/slope.

^cobtained from 10 replicated injections of mixed standard solution of 3 Brix sucrose and 100 mg P₂O₅ L⁻¹.

6.12 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตในตัวอย่างน้ำอ้อยสกัด

ตัวอย่างน้ำอ้อยที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้จากการนำอ้อยคั้นสดที่วางจำหน่ายทั่วไปในตลาด ก่อนทำการวิเคราะห์ปริมาณจะต้องนำน้ำอ้อยมาผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง ดังที่ได้ศึกษาไว้ในหัวข้อ 6.2 เพื่อให้ได้น้ำอ้อยที่ปราศจากสีและความขุ่น จากนั้นเพื่อเป็นการวิเคราะห์ปริมาณในตัวอย่าง และทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น (method validation) ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งวิเคราะห์ด้วยระบบ SIA ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ อีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ชนิดพกพา ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มากในโรงงานอุตสาหกรรม และวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตตามวิธีมาตรฐานแบบแบทช์ของ molybdenum blue ดังแสดงในตารางที่ 6.9

ตารางที่ 6.9 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำอ้อยสกัดด้วยระบบ SIA ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับ conventional method

Sample	Sucrose (Brix)		Phosphate (mg P ₂ O ₅ L ⁻¹)	
	SI-analyzer	Refractometry ^a	SI-analyzer	Spectrophotometry ^b
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

^aRefractometer 30PX/GS, Mettler Toledo, USA.

1. ^bSee ref. [8].

ผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยทั้ง 9 ตัวอย่าง มีปริมาณน้ำตาลอยู่ในช่วง 13 – 15 บริกซ์ ซึ่งเป็นปริมาณที่น้ำอ้อยปกติควรจะมี และมีปริมาณฟอสเฟตเหมาะสมในทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับ conventional method ด้วยการคำนวณทางสถิติแบบ Pair t -test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% [33] พบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้น ให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ซูโครส: $t_{\text{observe}} = 0.38$, $t_{\text{critical}} = 2.31$ และฟอสเฟต: $t_{\text{observe}} = 0.80$, $t_{\text{critical}} = 2.31$) จากผลการเทียบด้วยวิธีการทางสถิติแสดงให้เห็นว่า วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตแบบพร้อมกัน ด้วยระบบ SIA ที่นำเสนอนี้ มีความแม่นยำและมีความน่าเชื่อถือ

บทที่ 7

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตได้พร้อมกัน โดยใช้ระบบวิเคราะห์แบบไหลชนิด sequential injection analysis (SIA) ที่มีการปรับเปลี่ยนตำแหน่งของเครื่องตรวจวัดที่ต่างระบบ SIA ทัวไปที่เคยมีการนำเสนอมา ซึ่งทำให้ได้ระบบวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว (วิเคราะห์ได้ถึง 45 ตัวอย่างต่อชั่วโมง โดยวิเคราะห์น้ำตาลและฟอสเฟตได้พร้อมกัน) เป็นระบบอัตโนมัติที่มีความอ่อนกประสงค์ สามารถวิเคราะห์สารสองชนิดพร้อมกันหรือแยกวิเคราะห์ได้โดยไม่ต้องปรับเปลี่ยนระบบ ให้การวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ (ค่าร้อยละการคืนกลับใกล้เคียง 100) และมีความเที่ยงสูง (%RSD ต่ำกว่า 4%)

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้สังเกตเห็นการมีส่วนร่วมในการลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นหนึ่งในหัวใจของเคมีสีเขียว (green chemistry) ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้และพัฒนาระบบวิเคราะห์ SIA ให้ใช้ปริมาณตัวอย่างและสารเคมีในการวิเคราะห์น้อยที่สุด โดยใช้เพียง 278 μL ในการวิเคราะห์ได้ทั้งน้ำตาลซูโครสและฟอสเฟตต่อหนึ่งตัวอย่างเท่านั้น รวมถึงการประยุกต์ใช้ปรากฏการณ์ Schlieren effect หรือ lens effect สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส ทำให้ส่วนของการวิเคราะห์น้ำตาลนี้เป็นการวิเคราะห์แบบปราศจากสารเคมีอีกด้วย และจากผลการประเมินความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น (method validation) ให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับวิธีวัดน้ำตาลจากเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ที่นิยมใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม และให้ผลวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตที่ไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐาน เป็นการยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ได้เป็นอย่างดี ทำให้วิธีวิเคราะห์ที่นำเสนอนี้มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นวิธีตรวจสอบและควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมน้ำตาลจากอ้อยต่อไป

บทที่ 8

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากน้ำอ้อยสกัดมีสีเข้มและมีความขุ่นสูง ทำให้การวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการหักเหของแสงและการดูดกลืนแสงนั้นจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ ดังนั้น เพื่อให้การเตรียมตัวอย่างมีความสะดวก รวดเร็ว และลดความคลาดเคลื่อนจากผู้ทำการทดลองที่ต้องจัดการกับตัวอย่างที่มีจำนวนมาก การพัฒนาระบบเตรียมตัวอย่างที่มีความอัตโนมัติขึ้นจึงเป็นหนึ่งในการพัฒนาที่น่าสนใจ เพื่อนำมาเชื่อมต่อกับระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาแล้วเสร็จนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] <http://gotoknow.org/blog/porsonal/279107> สืบค้นเมื่อวันที่ 7 ตุลาคม 2553
- [2] <http://www.sugarzone.in.th> สืบค้นเมื่อวันที่ 12 มกราคม 2556
- [3] Walford SN. Composition of cane juice. *Proc S Afr Sug Technol Ass* 1996; **70**: 265-266.
- [4] Meade G.P. Cane Sugar Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufactures and their Chemists, 10th ed., John Wiley & Sons, New York, 1977.
- [5] Chen J.C.P., Chou C.C. Cane Sugar Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufacturers and their Chemists, 12th ed., John Wiley & Sons, New York, 1993.
- [6] <http://www.thaisugarmillers.com/tsmc-02-02.html>. สืบค้นเมื่อวันที่ 9 มกราคม 2556
- [7] กาวาฮารา B. Sc. Pharm. ฟอสเฟตและวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในน้ำอ้อย. วารสารอ้อยและน้ำตาลทราย 2524 ประจำเดือน ก.ค.-ส.ค. หน้า 25-28.
- [8] Kampen W.H., Method for clarifying cane sugar juice. United State Patent Number 6156563.
- [9] Rakkiyappan P., Thangavelu S., Shanthi R.M., Radhamani R. Juice chemical components and technological characteristics of some promising midlate sugarcane clones. *Sugar. Tech.* 2003; **5**: 319-322.
- [10] Zagatto E.A.G., Mattos LL., Jacintho A.O. Determination of sucrose in sugar-cane juice and molasses by flow-injection spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta.* 1988; **204**: 259-270.
- [11] Mattos LL., Zagatto E.A.G., Jacintho A.O. Sepectrophotometric flow-injection determination of sucrose and total reducing sugar in sugar-cane juice and molasses. *Anal. Chim. Acta.* 1988; **214**: 247-257.

- [12] Alves E.R., Fortes P.R., Borges E.P., Zagatto E.A.G. Spectrophotometric flow-injection determination of total reducing sugars exploiting their alkaline degradation. *Anal. Chim. Acta.* 2006; **564**: 231-235.
- [13] Li B., He Y. Simultaneous determination of glucose, fructose and lactose in food samples using a continuous-flow chemiluminescence method with the aid of artificial neural networks. *Luminescence* 2007; **22**: 317-325.
- [14] Alves E.R., Feres M.A., Zagatto E.A.G., Lima J.L.F.C. Exploiting pulsed flows for heating improvement: Application to determination of total reducing sugars in molasses and sugar-cane juices. *Current Analytical Chemistry* 2009; **5**: 65-69.
- [15] Teerasong S., Chan-Eam S., Sereenonchai K., Amornthammarong N., Ratanawimarnwong N., Nacapricha D. A reagent-free SIA module for monitoring of sugar, color and dissolved CO₂ contents in the manufacture of soft drinks. *Anal.Chim.Acta* 2010; **668**: 47-53.
- [16] Kronka E.A.M., Paim A.P.S., Reis B.R., Lima J.L.F.C., Lapa R.A. Determination of glucose in soft drink and sugar-cane juice employing a multicommutation approach in flow system and enzymatic reaction. *Fresenius J Anal Chem* 1999; **364**: 358-361.
- [17] Thavarungkul P., Suppapitnarm P., Kanatharana P., Mattiasson B. Batch injection analysis for the determination of sucrose in sugar cane juice using immobilized invertase and thermometric detection. *Biosensors & Bioelectronics* 1999; **14**: 19-25.
- [18] Greenway G.M., Kometa N. The determination of sugars in beverages and medicines using on-line dialysis for sample preparation. *Food Chem.* 1995; **53**: 105-110.
- [19] Yuan J.P., Chen F. Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC-dual detection. *Food Chem.* 1999; **64**: 423-427.

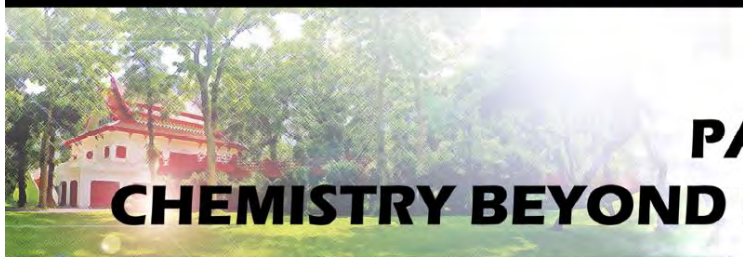
- [20] Singleton V., Horn J., Bucke C., Adlard M. A new polarimetric method for the analysis of dextran and sucrose. *Journal American Society of Sugarcane Technologists*. 2002; **22**: 112-119.
- [21] Mahadevaiah M.S., Kumar Y., Galil M.S.A., Suresha M.S., Sathish M.A., Nagendrappa G. A simple spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juices, water and detergent samples. *E-J. Chem* 2007; **4**: 467-473.
- [22] Dionex. Determination of phosphate and citrate in carbonated soft drinks using a reagent-free ion chromatography system. *Application note* 169.
- [23] Walford S.N. Applications of ion chromatography in cane sugar research and process problems. *J. Chromgr. A* 2002; **956**: 187-199.
- [24] Vonach, R.; Lendl, B.; Kellner, R. Modulation of the pH in the determination of phosphate with flow-injection and fourier transforminfrared detection. *Analyst* 1997, **122**, 525-530.
- [25] Doherty, W.O.S.; Rackemann, D.W. Stability of sugarcane juice-A preliminary assessment of the colorimetric method used for phosphate analysis. *Zuckerindustrie* 2008; **133**: 24-30.
- [26] Mantim, T.; Saetear, P.; Teerasong, S.; Chan-Eam, S.; Sereenonchai, K.; Amornthammarong, N.; Ratanawimarnwong, N.; Wilairat, P.; Meesiri, W.; Uraisin, K.; Nacapricha, D. Reagent-free analytical flow methods for the soft drink industry: Efforts for environmentally friendly chemical analysis. *Pure Appl. Chem.* 2012; **84**: 2015–2025.
- [27] Murphy, J.; Riley, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.* 1962; **27**: 31-36.
- [28] Drummond, L.; Maher, W. Determination of phosphorus in aqueous solution via formation of the phosphoantimonymolybdenum blue complex: Reexamination of optimum for the analysis of phosphate. *Anal. Chim. Acta.* 1995; **302**: 69-74.

- [29] Zhang, J.Z.; Fishcher, C.J.; Ortner, P.B. Optimization of performance and minimization of silicate interference in continuous flow phosphate analysis. *Talanta*. 1999; **49**: 293-304.
- [30] Grudpan, K.; Amper, P.; Udnan, Y.; Jayasvati, S.; Lapanantnoppakhun, S.; Jakmunee, J.; Christian, G.D.; Ruzicka, J. Stopped-flow injection simultaneous determination of phosphate and silicate using molybdenum blue. *Talanta*. 2002; **58**: 1319-1326.
- [31] Crop Production, Food and Agriculture Organization of the United Nations, June, 2010.
- [32] Amornthammarong, N.; Anujaravat, P.; Sereenonchai, K.; Chaisuwan, P.; Sastranurak, P.; Wilairat, P.; Nacapricha, D. Method development based on all injection analysis for the determination of phosphorus in soil and sediment extracts. *Talanta* 2005; **68**: 480-487.
- [33] Miller, J.C.; Miller, J.N. *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, New York, 3rd edn., 1993, pp. 55-58.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. การสอนผลงานในที่ประชุมนานาชาติ จำนวน 2 ครั้ง
2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง (เป็นเรื่องที่ทำแยกเพิ่มเติม
ออกมาจากโครงการที่นำเสนอ ซึ่งได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ
Talanta 115 (2013) 361-366
3. จะมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติเพิ่มเติมจำนวน 1 เรื่อง (อยู่ในระหว่าง
ร่างผลงานตีพิมพ์)

THE 6th PURE AND APPLIED CHEMISTRY INTERNATIONAL CONFERENCE 2012



PACCON 2012- CHEMISTRY BEYOND BOUNDARIES

**11 - 13 JANUARY 2012, THE EMPRESS CONVENTION CENTER
CHIANG MAI, THAILAND**

e-ABSTRACT



**DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE, CHIANG MAI UNIVERSITY
& THE CHEMICAL SOCIETY OF THAILAND UNDER THE PATRONAGE OF
HER ROYAL HIGHNESS PRINCESS CHULABHORN MAHIDOL**

AN AUTOMATIC METHOD FOR BRIX MONITORING IN SOFT DRINK INDUSTRY USING THE CONCEPT OF SCHLIEREN EFFECT

Phoonthawee Saetear^{1,2}, Saowapak Teerasong^{1,3}, Sumonmarn Chan-eam^{1,2}, Kamonthip Sereenonchai^{1,4},
 Nuanlaor Ratanawimarnwong^{1,5}, Duangjai Nacapricha^{1,2,*}

¹ Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs.)

² Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

⁴ Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasart University, Pathumthani 12121, Thailand

⁵ Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

*Corresponding Author : scdnc@mahidol.ac.th, dnacaprcha@gmail.com

ABSTRACT

This work presents an automatic method based on 'sequential injection analysis' (SIA) for Brix measurement which represents the concentration of sucrose in soft drink. The measurement was based on detection of light refraction at the liquid interface during its passage through the flow cell (known schlieren effect). Liquid handling was automatically operated using a syringe pump consisted of a portable photometer with near infrared (NIR) LED (890±40 nm) as the light source. A 1-cm flow-through cuvette cell was fitted inside the photometer. Pure water was used as the carrier in the flow line (2 mL min⁻¹). Degassed sucrose sample of 300 µL was aspirated into the flow line via the control of syringe pump and the selection valve of the SIA. As the liquid interface between sucrose and pure water was entering the flow-through cuvette, the light was refracted from the usual path resulting in a signal corresponding to the concentration of sucrose. A linear calibration was obtained for sucrose from 3.1 to 46.5 Brix ((peak height, a.u.) = (0.026±0.001)[sucrose, Brix] - (0.097±0.018); r² = 0.998). The system provided good precision at %RSD = 3.2 (for sucrose at 15.50 Brix, n=10). Results for analysis of soft drinks obtained from this method agreed significantly well with the results obtained from the common refractometric method ($t_{stat} = 0.509$, $t_{crit} = 2.306$).

Keywords Schlieren effect; Sucrose; Brix; Soft drinks; Sequential injection analysis (SIA)



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

Phoonthawee Saetear^{a,b}, Kittiwut Khamtau^{a,b}, Nuanlaor Ratanawimarnwong^{a,c}, Kamonthip Sereenonchai^{a,d}, Duangjai Nacapricha^{a,b,*}

^a Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs), Thailand

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

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23 Road, Bangkok 10110, Thailand

^d 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 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.

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 ± 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, 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 L^{-1} 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 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 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).

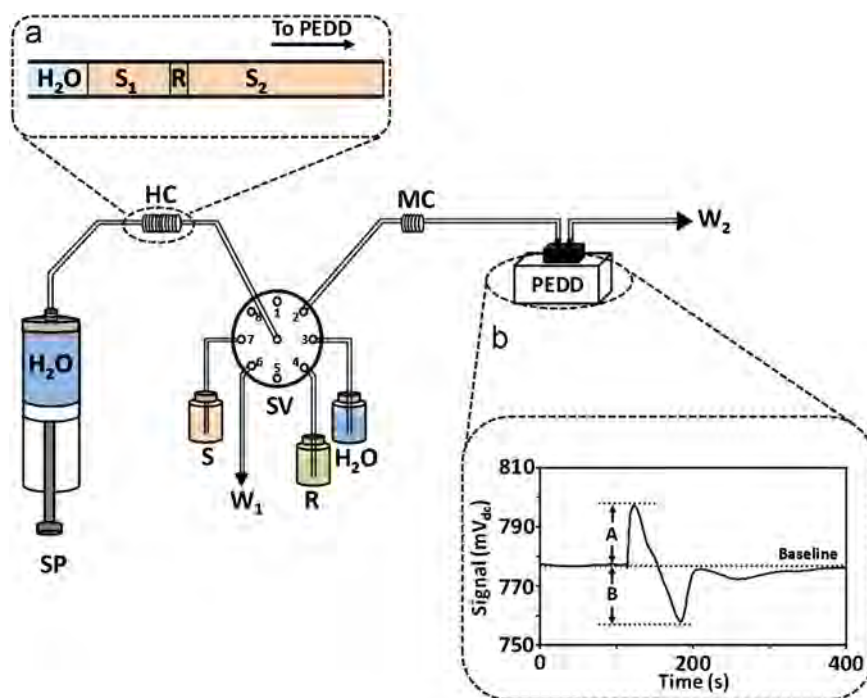


Fig. 1. Schematic diagram of the SI-PEDD system for simultaneous determination of sucrose and phosphate in cola drinks: S₁, 1st aspirated sample zone; R, precipitating reagent 0.08 mol L^{-1} CaCl_2 with 0.1% (w/v) PVA in ammonium buffer pH 10; S₂, 2nd aspirated sample zone; W, waste; SP, syringe pump; 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 ⁻¹)	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 ₁)	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 ₂)	26
5	Dispense	6.35	5.0	2	Dispense of all zones to detector and waste (W ₂)	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 ₄ ³⁻ L ⁻¹)	
	Our method	Refractometric method ^a	Our method	Spectrophotometric method ^b
5 Brix+200 mg PO ₄ ³⁻ L ⁻¹	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 ₄ ³⁻ L ⁻¹	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 ₄ ³⁻ L ⁻¹	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 ₄ ³⁻ L ⁻¹	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 ₄ ³⁻ L ⁻¹	11.95 ± 0.24 (2.0)	12.31 ± 0.14 (1.1)	300.7 ± 3.3 (1.1)	306.4 ± 4.3 (1.4)

^a Refractometer 30PX/GS. Mettler Toledo, USA.^b 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, OPTEK 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 10¹² 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 (S₁), reagent (R) and 2nd aspirated sample zone (S₂)). 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 (S₁ and S₂ 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 S₂ (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.

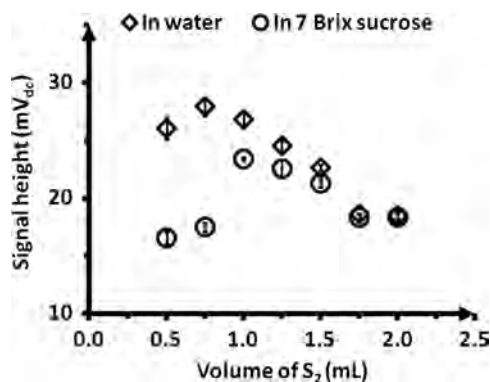


Fig. 2. Effect of volume of S_2 on signal height of $200 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ in water (◇) and in 7 Brix sucrose (○). Each point is the result from triplicate injections for volumes of S_1 :R fixed at 0.5:0.1 mL.

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 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 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 CaCl_2 was studied using concentration range from 0.04 to 0.12 mol L^{-1} . Results are shown in Fig. 3a. The signal B (Fig. 1b) increased with increasing concentration of CaCl_2 , reaching a plateau value for concentrations greater than 0.06 mol L^{-1} . The concentration of $0.08 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ was chosen to ensure excess Ca^{2+} ion for production of the $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ precipitate.

Buffer concentrations ranging from 0.2 to 6.5 mol L^{-1} were investigated. The results in Fig. 3b showed that buffer concentration of 0.3 mol L^{-1} gave the highest sensitivity. At buffer concentration lower than 0.3 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 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.

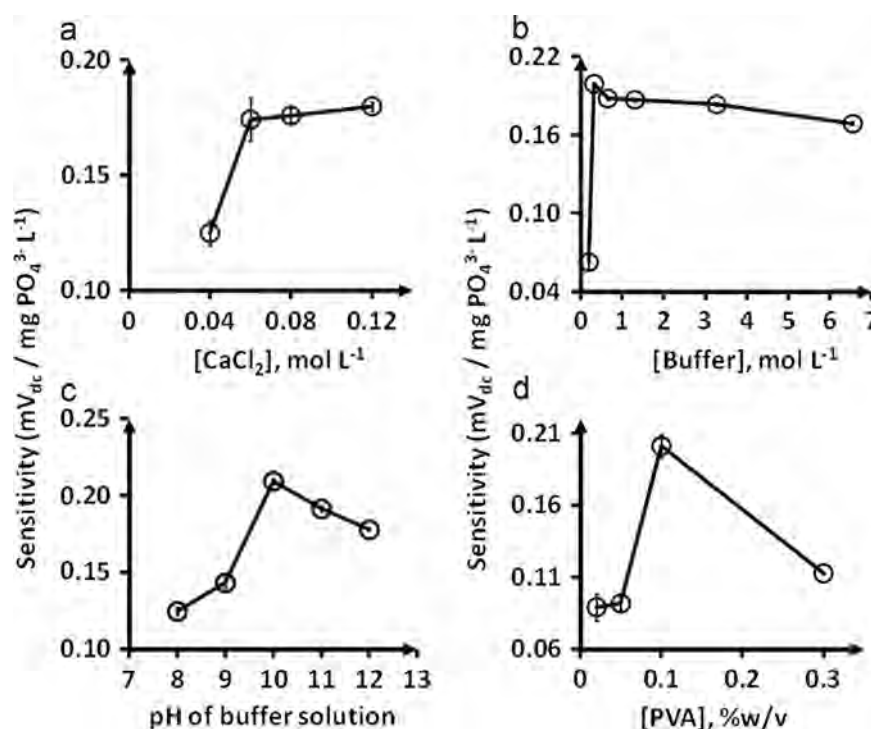


Fig. 3. Effect of the precipitating reagent on the sensitivity of phosphate analysis. Triplicate injections for each point in the graph.

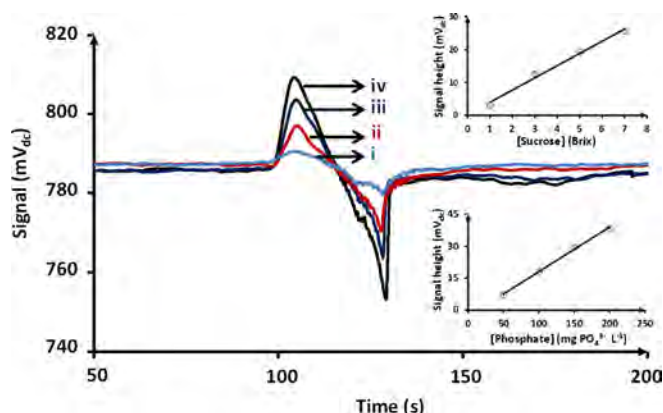


Fig. 4. Example of signal profiles obtained from mixed standards of sucrose and phosphate at (i) 1 Brix+50 mg PO₄³⁻ L⁻¹ (ii) 3 Brix+100 mg PO₄³⁻ L⁻¹ (iii) 5 Brix+150 mg PO₄³⁻ L⁻¹ (iv) 7 Brix+200 mg PO₄³⁻ L⁻¹, using the developed system, and calibration plots for sucrose and phosphate. Each point in the 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, mV_{dc}) = (3.14 ± 0.03)[Brix] + (0.14 ± 0.13), $r^2 = 0.999$) and of 50–200 mg PO₄³⁻ L⁻¹ ((signal height, mV_{dc}) = ((1.85 ± 0.04) × 10⁻¹)[mg PO₄³⁻ L⁻¹] - (1.96 ± 0.51), $r^2 = 0.999$). Detection limits (3S/N) at 0.5 Brix sucrose and 20 mg PO₄³⁻ L⁻¹ were obtained. Ten replicate injections of the mixed standard of 5 Brix sucrose and 150 mg PO₄³⁻ L⁻¹ were carried out to provide system precision of 0.9% and 1.7% (RSD), respectively. Reasonable throughput of 21 injections 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 CaCl₂ 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 ₄ ³⁻ L ⁻¹)	
	Our method	Refractometric method ^a	Our method	Spectrophotometric method ^b
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.

^a Refractometer 30PX/GS. Mettler Toledo, USA.

^b 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-Solbera, 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.