หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การทดลอง

ในการทำการทดลองโดยเฉพาะเรื่องนี้มีสิ่งจำเป็นต้องใช้ในการทดลอง และขั้นตอนของการทดลองหลายอย่าง จะกล่าวต่อไปดังนี้

3.1 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สีผสมอาหารที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในการทดลองได้แก่

1.	ปองโซ 4 อาร์	ได้รับจากบริษัท บีเออร์แห่งประเทศไทย
2.	เอโซรูบิน	" "
3.	เออริโทรซีน	ได้รับจากบริษัทฮิล์ตเอเชียติกจำกัด
4.	ตาร์ตราซีน	" "
5.	ซันเซ็ต เยลโลว์ เอฟ ซี เอฟ	" "
6.	อินดิโกคาร์มีน	" "
7.	บริลเลียนท์ บลู เอฟ ซี เอฟ	" "
8.	ฟาส์ท กรีน เอฟ ซี เอฟ	ได้รับจากกรมวิทยาศาสตร์บริการกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และการพลังงาน
9.	ไรโบฟลาวิน	ได้รับจากบริษัทดีทแฮล์ม
10.	เบตา-คาโรทีน	" "
11.	เบตา-อะโป-8' คาโรทีนาล	" "
12.	แคนทาแซนทีน	" "
13.	คลอโรฟิลล์	" "

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
กรดอะซีติก	AR. glacial	BDH. Chemicals Ltd.
โซเดียมไฮดรอกไซด์	Analar	" "
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	Analar	" "
โปตัสเซียมคลอไรด์	Analar	" "
กรดไฮโดรคลอริก	Analar	" "
กรดซัลฟูริก	Analar	" "
โซเดียมเตตระบอเรต	Analar	" "
เดคะไฮเดรต		
คลอโรฟอร์ม	Analar	" "
เมทิล เอทิล คีโตน	Lab.	" "
2 - โปรปานอล	Analar	" "
อะซีโตน	Analar	" "
โซเดียมคลอไรด์	Analar	Mallinckrodt
โปตัสเซียมโบรไมด์	Analar	" "
โซเดียมอะซีเตต	Analar	" "
ฟรีดีน	Analar	" "
ไซโคลเฮกเซน	Analar	" "
เอทานอล	AR. Absolute	Riedel-Dehan AG. Seelze - Hannover
เอน, เอน-ไดเมทิลฟอร์มาไมด์	Analysed	" "
เอทิลอะซีเตต	Analysed	" "
โปตัสเซียมไฮโดรเจนพทาเรต	AR	May & Baker Laboratory Chemicals

ชื่อสารเคมี	ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
ไตรโซเดียมซีเตรต	AR	May & Baker Laboratory Chemicals
อีเทอร์	Reagent	Siam Science Service
ปิโตรเลียมอีเทอร์	Reagent	" "
น้ำมันพาราฟิน	Reagent	เคมีกิจ
1 - บิวทานอล	Analyzed	Baker Analyzed Reagent
ฟีนอล	Reagent	Merck
ไดโซเดียมไฮโดรเจน ฟอสเฟต	Analar	" "
แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	-	Fluka-Garanti
กระดาษโครมาโตกราฟี	เบอร์ 1	Whatman Ltd.
กระดาษกรอง	-	วิทยาศรม จำกัด
ไหมพรม	wool 100 %	Stahlshe Wolle (Germany)

3.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. pH Meter ของ Radiometer Copenhagen Type PHM. 28.
2. Ultraviolet-Visible Spectrophotometer ของบริษัท Varian Techtron Model 635 พร้อม Recorder Model 7040 A.
3. Infrared Spectrophotometer ของ Pye Unicam Sp. 200 Grating.
4. ขวดโหลเส้นผ่าศูนย์กลาง 18 เซนติเมตร ส่วนสูง 28 เซนติเมตร และฝาปิด

3.2 วิธีทำการทดลอง

ในการทำการทดลองได้แบ่งออกเป็นหลายขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.2.1 การศึกษาวิธีแยกและคุณสมบัติของสีผสมอาหารแต่ละชนิดด้วยเทคนิคทางเปเปอร์โครมาโตกราฟี โดยทดลองกับ

1. สีผสมอาหารสีเดียวประเภทที่ละลายน้ำและละลายในตัวทำละลายซึ่งเป็นสารอินทรีย์
2. สีผสมอาหารที่ละลายน้ำผสมกัน 2 ชนิด

เพื่อหาทางพัฒนาเทคนิคที่จะใช้แยกสีและเปรียบเทียบผลของการแยกจากการใช้โครมาโตกราฟีเปเปอร์และกระดาษกรองธรรมดาเพื่อหาทางใช้วัสดุราคาถูก

3.2.2 การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิลของสีผสมอาหาร

3.2.3 การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรดของสีผสมอาหาร

3.2.4 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสีผสมอาหารที่มีต่อสารเคมีต่าง ๆ

3.2.5 การวิเคราะห์สีในสารตัวอย่าง คือ อาหาร และ สิปสติกบางชนิด โดยนำเทคนิคต่าง ๆ ที่ได้ศึกษามาแล้วมาใช้สำหรับการตรวจสอบ

3.2.1 การศึกษาวิธีแยกและคุณสมบัติของสีผสมอาหารแต่ละชนิดด้วยเทคนิคทางเปเปอร์โครมาโตกราฟี

เพื่อศึกษาหาวิธีแยกและหาคุณสมบัติเฉพาะของสีผสมอาหารแต่ละชนิดโดยได้ศึกษาในสารละลายที่เป็นโมบิลเฟสต่าง ๆ กัน ซึ่งการพิจารณาเลือกโมบิลเฟสนั้นอาศัยหลักการเลือกตามที่กล่าวไว้แล้วในภาคทฤษฎีและจากผู้ที่ได้แนะนำให้ใช้โมบิลเฟสที่ใช้ในการศึกษาสีผสมอาหาร[37] ซึ่งผู้ที่ทดลองได้ทำการศึกษาและทดลองมาแล้วเป็นเวลานานและเป็นโมบิลเฟสที่ใช้กันทั่วไปในการวิเคราะห์สีผสมอาหาร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทดลองใช้โมบิลเฟสที่มีผู้แนะนำใน Literature จำนวน 12 ชนิดในการศึกษากับสีผสมอาหารที่ละลายน้ำทั้งชนิดสีเดียวและสีที่ผสมกัน 2 ชนิด เพื่อศึกษาว่าในโมบิลเฟสที่ทดลองใช้นี้จะมีโมบิลเฟสใดบ้างที่ใช้ได้ดีในการแยกสีแต่ละชนิด ซึ่งจะได้พิจารณาเลือกไว้เป็นโมบิลเฟสที่ใช้ในการวิเคราะห์สีจากสารตัวอย่าง ส่วนกรณีที่สีผสมอาหารบางชนิดที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายซึ่งเป็นสารอินทรีย์ต้องใช้เทคนิครีเวิร์สเฟสเปเปอร์โครมาโตกราฟี ดังนั้นจึงได้พิจารณาการเลือกโมบิลเฟสโดยยึดสเตชันนารีเฟสชนิดที่มีสารอินทรีย์ชนิดไม่มีโพลาริตีเป็นหลัก คือ ได้เลือกโมบิลเฟสที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น ใช้เมทานอล และ เอทานอลผสมกับน้ำอัตราส่วนเท่าใดนั้นได้จากการทดลองหลาย ๆ ครั้งจนกว่าจะได้อัตราส่วนที่เหมาะสม สำหรับการใช้เทคนิครีเวิร์สเฟสเปเปอร์โครมาโตกราฟีนี้เรื่องของสเตชันนารีเฟสจะต้องใช้สารอินทรีย์ที่ไม่มีโพลาริตีซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกน้ำมันพาราฟินเป็นสารอินทรีย์ที่จะใช้ในการเคลือบกระดาษ เพราะว่าเป็นสารที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย โดยได้ศึกษาถึงปริมาณของน้ำมันพาราฟินที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นสเตชันนารีเฟสด้วย

ความสำคัญในการศึกษาหาวิธีแยกและหาคุณสมบัติเฉพาะของสีผสมอาหารแต่ละชนิดนี้ยังขึ้นกับเรื่องของกระดาษที่ใช้ทดลองด้วย ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้กระดาษชนิดดี คือกระดาษโครมาโตกราฟี เบอร์ 1. และใช้กระดาษกรองธรรมดาที่ใช้กันทั่วไปซึ่งมีราคาถูก เพื่อจะได้เปรียบเทียบผลการแยกของสีทั้งนี้เพื่อจะได้ประเมินว่า สามารถจะใช้กระดาษที่มีราคาถูกทดแทนในการวิเคราะห์สีได้หรือไม่

3.2.1.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้เป็นโมไบล์เฟส

ในการทดลองแยกสีผสมอาหารประเภทที่ละลายน้ำได้ทั้งสีเดียวและสีผสมระหว่าง 2 สี โดยเลือกสารละลายที่เป็นโมไบล์เฟส 12 ชนิด ตามที่กล่าวข้างต้น ดังนี้

สารละลายที่ 1. เป็นสารละลายแอมโมเนียซึ่งเตรียมได้จากใช้ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น (ความถ่วงจำเพาะ 0.91) จำนวน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ละลายน้ำแล้วทำให้ครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในขวดมาตรฐาน

สารละลายที่ 2 เป็นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ยัน 2.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)

สารละลายที่ 3 เป็นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ยัน 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลาย 50 % เอทานอล (โดยปริมาตร)

สารละลายที่ 4 เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 2-เมทิลโปรเปน-1-ออล, เอทานอลและน้ำ ผสมกันในอัตราส่วน 1 : 2 : 1 โดยปริมาตรตามลำดับ

สารละลายที่ 5 เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 - บิวทานอล , น้ำ และกรดอะซีติก ผสมกันในอัตราส่วน 20 : 12 : 5 โดยปริมาตรตามลำดับ

สารละลายที่ 6 เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 2-เมทิลโปรเปน-1-ออล, เอทานอลและน้ำ ผสมกันในอัตราส่วน 3 : 2 : 2 โดยปริมาตรตามลำดับ แล้วนำสารละลายนี้มา 99 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น (ความถ่วงจำเพาะ 0.91) ลงไปอีก 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายที่ 7 เป็นสารละลายของฟีนอล 80 กรัม ละลายในน้ำ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายที่ 8 เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย เมทิล เอทิล คีโตน, อะซีโตน, น้ำ และ แอมโมเนีย ในอัตราส่วน 350 : 150 : 150 : 1 โดยปริมาตรตามลำดับ

สารละลายที่ 9 เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย เมทิล เอทิล คีโตน, อะซีโตน และ น้ำ ผสมกันในอัตราส่วน 7 : 3 : 3 โดยปริมาตรตามลำดับ

สารละลายที่ 10 เป็นสารละลายเอทิลอะซีเตต,(ฟีรีดีน และน้ำผสมกันในอัตราส่วน 11 : 5 : 4 โดยปริมาตรตามลำดับ

สารละลายที่ 11 เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย ไตรโซเดียมซิเตรต 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายแอมโมเนียอัน 5 % (โดยปริมาตร)

สารละลายที่ 12 เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย น้ำ และ กรดไฮโดรคลอริก ผสมกันในอัตราส่วน 30 : 6.5 โดยปริมาตรตามลำดับ

สำหรับสีผสมอาหารที่ละลายในตัวทำละลายซึ่งเป็นสารอินทรีย์ ได้ทำการทดลองหลาย ๆ ครั้งเพื่อหาว่าสารละลายใดที่เหมาะสม

3.2.1.2 การเตรียมสารละลายสีต่าง ๆ

<u>การเตรียมสารละลายสีเดียว</u> นำสีผสมอาหารแต่ละชนิดที่ละลายน้ำได้ประมาณ 2-3 มิลลิกรัม ไปละลายในน้ำประมาณ 1-2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนสีที่ละลายในสารอินทรีย์ก็เตรียมเช่นเดียวกันโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

<u>การเตรียมสารละลายสีผสม</u> ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสีผสมอาหาร 2 ชนิด ได้นำเอาสีผสมอาหารมาผสมกันตามหลักการผสมสี คือ ใช้สีแดงผสมกับสีน้ำเงินเป็นสีม่วง สีแดงผสมสีเหลืองเป็นสีส้ม และสีเหลืองผสมสีน้ำเงินกลายเป็นสีเขียว ในการเตรียมสารละลายของสีผสมอาหารที่ผสมกันดังรายการต่อไปนี้

1. ปองโซ 4 อาร์ ผสมกับ บริลเลียนท์ บลู เอฟ ซี เอฟ เป็นสีม่วงเบอร์ 1.
2. เอโซรูบิน ผสมกับ บริลเลียนท์ บลู เอฟ ซี เอฟ เป็นสีม่วงเบอร์ 2.
3. เออริโทรซีน ผสมกับ บริลเลียนท์ บลู เอฟ ซี เอฟ เป็นสีม่วงเบอร์ 3.

4. ปองโซ 4 อาร์ ผสมกับ อินดิโกคาร์มีน เป็นสีม่วงเบอร์ 4.

5. เอโซรูบิน ผสมกับ อินดิโกคาร์มีน เป็นสีม่วงเบอร์ 5.

6. เออริโทรซีน ผสมกับ อินดิโกคาร์มีน เป็นสีม่วงเบอร์ 6.

7. ปองโซ 4 อาร์ ผสมกับ ตาร์ตราซีน เป็นสีส้มเบอร์ 1.

8. เอโซรูบิน ผสมกับ ตาร์ตราซีน เป็นสีส้มเบอร์ 2.

9. เออริโทรซีน ผสมกับ ตาร์ตราซีน เป็นสีส้มเบอร์ 3.

10. บริลเลียนท์ บลู เอฟ ซี เอฟ ผสมกับ ตาร์ตราซีน เป็นสีเขียวเบอร์ 1.

11. อินดิโกคาร์มีน ผสมกับ ตาร์ตราซีน เป็นสีเขียวเบอร์ 2.

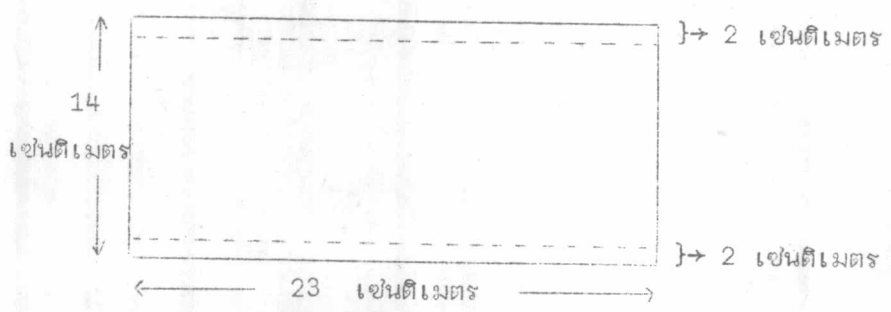
นำสีผสมอาหารแต่ละตัวผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 ละลายในน้ำ 1-2 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.2.1.3 การเตรียมภาชนะที่จะใช้สำหรับทำโครมาโตกราฟี

ใช้ขวดโหลรูปทรงกระบอก ขนาดปริมาตร 2 ลิตร สามารถปิดได้ด้วยกระจกนาฬิกา

3.2.1.4 การเตรียมกระดาษที่ใช้ในการทดลองโครมาโตกราฟี

จากที่กล่าวในตอนต้นถึงการเลือกใช้กระดาษ ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ใช้กระดาษ 2 ประเภท ได้แก่ กระดาษที่ใช้ในโครมาโตกราฟีโดยเฉพาะ (เบอร์ 1.) และ กระดาษกรองธรรมดาแผ่นใหญ่ที่ใช้ทั่วไปซึ่งมีราคาถูก โดยนำกระดาษแต่ละชนิดมาตัดให้ได้ขนาด 14 x 23 เซนติเมตร[38] ขีดเส้นไว้ห่างจากขอบบนและล่าง 2 เซนติเมตร ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงการเตรียมกระดาษเพื่อใช้ในการทำโครมาโตกราฟี

กระดาษที่ตัดตามรูปที่ 8. นี้สามารถนำไปทดลองโดยตรงกับสีผสมอาหารที่ละลายน้ำได้เลย แต่กรณีที่สีผสมอาหารละลายในสารอินทรีย์จะต้องนำกระดาษมาแช่ลงในสารละลายน้ำมันพาราฟินที่ละลายในอีเทอร์เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วนำกระดาษนั้นมาทำให้แห้งในบรรยากาศที่อุณหภูมิห้องในตู้ควันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง[39] เพื่อให้อีเทอร์ระเหยออกไปจนหมดแล้วจึงนำกระดาษนั้นมาทดลองได้

สำหรับสารละลายของน้ำมันพาราฟินที่ใช้ทดลอง ได้เตรียมไว้ 3 ชนิด คือ ชนิดที่มีน้ำมันพาราฟินอยู่ 1 %, 5 % และ 10 % โดยปริมาตร ทั้งนี้เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

3.2.1.5 วิธีทำการทดลอง

นำสารละลายสีมาตรฐานมาหยดลงบนกระดาษแต่ละชนิดซึ่งเป็นกระดาษสำหรับทำโครมาโตกราฟี และ กระดาษกรอง ตรงเส้นที่ขีดไว้ด้วยหลอดแคปพิลลารีให้ห่างกันพอประมาณ โดยหยดด้วยปริมาณสีที่เท่ากันทุกครั้งพิจารณาให้เห็นสีเข้มข้นพอเพียงที่จะสังเกตได้ด้วยตาเปล่า การหยดสีแต่ละครั้งต้องเอาเครื่องเป่าช่วยทำให้แห้งเพื่อป้องกันมิให้หยดสีกระจายออกไปกว้างเกินไป ม้วนกระดาษเป็นทรงกระบอก โดยนำปลายมาชนกัน ดังรูปที่ 3. เย็บกระดาษให้ปลายชนกันแล้วนำไปแช่ในโมไบล์เฟสต่าง ๆ (ตามข้อ 3.2.1.1) ซึ่งอิ่มตัวอยู่ในภาชนะที่ใช้ทำโครมาโตกราฟีที่ได้เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเห็นว่าแนวของโมไบล์เฟสเคลื่อนที่ขึ้นไปถึงขีดหมายที่ทำไว้แล้ว เอากระดาษออกมาจากขวดโหล นำไปไว้ในตู้ดูดอากาศแล้วใช้เครื่องเป่าลมช่วยเป่าให้แห้ง ขีดแนวโมไบล์เฟสที่ได้หลังจากดีเวลลอปโครมาโตแกรมที่ได้ทำให้แห้งแล้วและทำเครื่องหมายรอบจุดของสี วัดระยะทางจากจุดตั้งต้นที่หยดสีจนถึงจุดกึ่งกลางของจุดสีที่ได้กับวัดระยะทางจากแนวโมไบล์เฟสกับจุดเริ่มต้น เพื่อนำไปคำนวณหาค่า R_f ของสีแต่ละชนิด ผลการคำนวณหาค่า R_f แสดงในตารางที่ 6,7 และ 8

3.2.2 การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิลของสีผสมอาหาร

ในการศึกษาคุณสมบัติของสีผสมอาหารด้วยเทคนิคนี้เพื่อจะศึกษาคุณสมบัติเฉพาะตัวของสีแต่ละชนิดในการดูดกลืนแสงซึ่งอยู่ในช่วงของวิสิเบิล สีแต่ละชนิดจะให้ลักษณะเฉพาะตัวของมัน คือ สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่นเฉพาะ ในการทดลองนี้ยังได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อ

การดูดกลืนแสงโดยได้ศึกษาในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 1-13 ทั้งนี้เพราะสารละลายของสีที่อยู่ใน pH ต่างกันอาจแตกต่างกันได้และเพื่อเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่า Absorbance ในแต่ละ pH ด้วย เพื่อจะได้ศึกษาว่าที่ pH ใดสีนั้น ๆ สามารถจะดูดกลืนแสงได้มากที่สุดและที่ความยาวคลื่นเท่าใด ทั้งนี้เพื่อจะได้เลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สีในสารตัวอย่างต่อไป ผลของการทดลองแสดงอยู่ในรูปที่ 11-34

3.2.2.1 การเตรียมสารละลายสีตั้งต้น (stock solution)

ก. สีผสมอาหารที่ละลายน้ำได้

ชั่งสีประมาณ 0.05กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากอิออนใส่ในขวดมาตรฐานขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บไว้เป็นสารละลายเพื่อใช้สำหรับทดลองต่อไป การเตรียมสารละลายของไรโบฟลาวินจะต้องเติมกรดอะซิติกลงไปในสารละลายด้วย[40] ทั้งนี้เพราะว่าสารไรโบฟลาวินละลายได้ดีในสารละลายที่เป็นกรดหรือด่าง จึงต้องเติมกรดลงไปเล็กน้อยเพื่อช่วยทำให้การละลายของไรโบฟลาวินดีขึ้น

กรณีการเตรียมสีผสม 2 ชนิดผสมกันให้นำสีแต่ละชนิดมาชั่งประมาณ 0.025 กรัม ละลายในน้ำที่ปราศจากอิออนใส่ในขวดมาตรฐานขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บไว้

ข. สีผสมอาหารที่ละลายในสารอินทรีย์

เนื่องจากสีผสมอาหารประเภทนี้มีลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมันให้ชั่งพอประมาณ (0.05 กรัม) ละลายในไซโคลเฮกเซนใส่ในขวดมาตรฐานขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บไว้เป็นสารละลายตั้งต้น

3.2.2.2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ กัน

ได้เลือกศึกษาสีในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH1, pH3, pH5, pH7, pH9, pH11 และ pH13 ดังนี้[41]

สารละลายบัฟเฟอร์ pH1. ใช้โปตัสเซียมคลอไรด์ ขัน 0.2 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 12.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับกรดไฮโดรคลอริค ขัน 0.2 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 33.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายบัฟเฟอร์ pH3. ใช้สารละลายโปตัสเซียมทาเทรต ขัน 0.1 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับ กรดไฮโดรคลอริก ขัน 0.1 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 11.15 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายบัฟเฟอร์ pH5. ใช้สารละลายโปตัสเซียมทาเทรต ขัน 0.1 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ขัน 0.1 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 11.30 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายบัฟเฟอร์ pH7. ใช้สารละลายโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ขัน 0.1 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ขัน 0.1 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 14.55 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายบัฟเฟอร์ pH9. ใช้สารละลายบอแรกซ์ ขัน 0.025 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ขัน 0.1 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 2.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายบัฟเฟอร์ pH11. ใช้สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ขัน 0.05 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ขัน 0.1 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 2.05 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารละลายบัฟเฟอร์ pH13. ใช้สารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ขัน 0.2 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 12.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมกับ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ขัน 0.2 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร จำนวน 33 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.2.2.3 เตรียมสารละลายที่ใช้ทดลอง

ก. สีผสมอาหารที่ละลายน้ำได้

ไปเปตสารละลายสีตั้งต้น จากข้อ 3.2.2.1 ก. มา 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละ pH ที่เตรียมได้แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำจนครบ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

(ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่พอเหมาะ) นำไปวัดค่า pH ด้วย pH Meter แล้วจึงนำไปศึกษาลักษณะของแอบซอบชันส์เปกตราด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลต-วิสิเบิลส์เปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เซลล์กว้าง 10 มิลลิเมตร ใส่สารละลาย ผลของการทดลองอยู่ในหน้า 88-96,112-122 รูปที่ 11-19 และ 24-34

ข. สีผสมอาหารที่ละลายในสารอินทรีย์

ไปเปตสารละลายตั้งต้น จากข้อ 3.2.2.1 ข. มา 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ใส่ในขวดมาตรฐาน) ขนาด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วทำให้เจือจางด้วยไซโคลเฮกเซนจนปริมาตรครบ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะได้สารละลายของสีที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งจะเป็นความเข้มข้นที่พอเหมาะในการวัดค่า absorbance

3.2.2.4 วิธีทำการทดลอง

นำสารละลายสีที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2.3 ก. ไปบันทึกสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงในช่วงประมาณ 700-300 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลตวิสิเบิลส์เปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เซลล์กว้าง 10 มิลลิเมตร เทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ pH เดียวกัน

ส่วนสารละลายสีที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2.3 ข. ก็ทำเช่นเดียวกัน แต่ใช้ไซโคลเฮกเซนเป็นแบลงค์ ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปที่ 20-23

3.2.3 การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรดของสีผสมอาหาร

เพื่อเป็นการดูลักษณะเฉพาะของสีผสมอาหารแต่ละชนิดได้นำสารตัวอย่างมาศึกษาลักษณะของสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงช่วงนี้ซึ่งเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของสีมาก

ก. สีผสมอาหารที่ละลายน้ำ

นำสีผสมอาหารที่เป็นผงปริมาณพอเหมาะบดรวมกับโปตัสเซียมโบรไมด์ที่อบแห้งแล้วที่อุณหภูมิประมาณ 105-110 องศาเซลเซียส บดในโกร่งอะเกตจนเข้ากันดี นำไปใส่เครื่องอัดให้เป็นแผ่นโดยใช้ความดันประมาณ 15,000 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นำแผ่นที่อัดได้ไปศึกษาการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ บันทึกอินฟราเรดสเปกตราในช่วง 650-2000 เซนติเมตร$^{-1}$ และ 1300 - 4000 เซนติเมตร$^{-1}$ ผลการทดลองอยู่ในรูปที่ 35-43

ข. สีผสมอาหารที่ละลายในสารอินทรีย์

เนื่องจากสีผสมอาหารชนิดนี้เป็นของเหลวข้น ๆ จึงนำไปป้ายบนแผ่นโซเดียมคลอไรด์ เซลล์ประกบ เซลล์เข้าด้วยกัน แล้วนำไปบันทึกสเปกตราเช่นเดียวกับข้อ ก. ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 44-47

3.2.4 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสีผสมอาหารที่มีต่อสารเคมีต่าง ๆ

การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีนี้เนื่องจากสีผสมอาหารแต่ละชนิดเมื่อทำปฏิกิริยากับกรด หรือด่าง แล้วจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีเกิดขึ้น ไม่ว่าสีนั้นจะอยู่สภาพเป็นสารละลายหรือของแข็ง ก็จะให้การเปลี่ยนแปลงของสีเป็นลักษณะเฉพาะตัวของสีแต่ละชนิด อันเป็นข้อมูลที่ให้ประโยชน์ในการวิเคราะห์สี[42] นอกจากนี้การย้อมสีให้ติดบนไหมพรมซึ่งทำด้วยขนสัตว์ก็สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีได้เช่นกัน[43] ดังนั้นในการทดลองศึกษาคุณสมบัติทางเคมีที่มีต่อกรดหรือด่างนี้จึงทำให้ทราบข้อมูลของสีแต่ละชนิดเพื่อเก็บไว้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบเมื่อทำการวิเคราะห์สีในสารตัวอย่าง

ก. สีผสมอาหารที่ละลายน้ำได้ มีการทดลองแบ่งเป็น 3 ประเภท

1. ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างสีที่เป็นผงกับสารเคมี โดยนำเอาสีที่เป็นผงใส่ลงในฝากระเบื้องสีขาวแล้วหยดกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไปบนสีนั้นแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อหยดกรดหยดแรก แล้วใช้แท่งแก้วเขี่ยสีให้เป็นแนวจะทำให้เห็นสีชัดเจนยิ่งขึ้น บันทึกสีที่เปลี่ยนแปลงจากสีเดิมไว้ ต่อจากนั้นทำให้สีเจือจางโดยเติมน้ำประมาณ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร บันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีอีกครั้ง ผลของการทดลองแสดงอยู่ในตารางที่ 14

2. ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างสารละลายสีกับสารเคมี เตรียมสารละลายของสีที่เข้มข้นประมาณ 0.01 % แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) บันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีกับสารเคมีแต่ละชนิดไว้ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 15

3. ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างสีผสมอาหารที่ย้อมติดบนไหมพรมกับสารเคมี นำสีประมาณ 2.5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำประมาณ 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วปรับสภาพกรดของสารละลาย

สีให้เป็นกรดด้วยกรดอะซีติกที่เข้มข้น 1 % (โดยปริมาตร) นำไปตั้งบนเครื่องอังไอน้ำ (water bath)แล้วใส่ไหมพรมที่ทำด้วยขนสัตว์ 100 % ลงไป เพื่อย้อมจนสีติดไหมพรมใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที เอาไหมพรมที่ติดสีแล้วออกมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด นำมาทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น, กรดซัลฟูริกเข้มข้น, สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ สารละลายแอมโมเนียเข้มข้น โดยตัดไหมพรมที่ย้อมติดสีแล้วเป็นชิ้นเล็ก ๆ ยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร ใส่ลงในจานกระเบื้องสีขาว แล้วนำสารเคมีแต่ละชนิดหยดลงบนไหมพรมแต่ละชิ้น บันทึกการเปลี่ยนแปลงสีไว้ ผลของการทดลองอยู่ที่หน้า ตารางที่ 16

ข. สีผสมอาหารที่ละลายในสารอินทรีย์

นำสีมาทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น, กรดซัลฟูริกเข้มข้น, สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) และสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น บันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีไว้ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 17

3.2.5 การวิเคราะห์สีในสารตัวอย่าง

3.2.5.1 วิเคราะห์สีในอาหาร

การวิเคราะห์สีในอาหารนี้จะแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน[37,38] ดังนี้

ขั้นที่ 1. แยกสีออกจากอาหาร

ขั้นที่ 2. ทำสีที่แยกออกมาได้ให้บริสุทธิ์

ขั้นที่ 3. ตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของสีเพื่อการ identification

<u>เทคนิคของการแยกสีออกจากอาหาร</u>

การแยกสีออกจากอาหารนั้นมีเทคนิคแตกต่างกันออกไปแล้วแต่ชนิดของอาหาร ซึ่งมีดังต่อไปนี้

ก. <u>พวกอาหารเหลวที่ไม่มี แอลกอฮอล์</u> เช่น น้ำหวาน เครื่องดื่ม สามารถนำสารตัวอย่างไปทดลองได้โดยตรง หรือ อาจจะปรับให้อาหารนั้นมีฤทธิ์เป็นกรดเล็กน้อยด้วยกรด

อะซิติกที่ขัน 1 % (โดยปริมาตร) แล้วนำไปทดลองขั้นที่ 2 คือการแยกสีที่ได้ทำให้บริสุทธิ์

ข. อาหารที่มีแอลกอฮอล์ ให้นำไประเหยเอาแอลกอฮอล์ออกไปเสียก่อนแล้วทำตามข้อ ก.

ค. อาหารที่ละลายน้ำได้ เช่น ทอฟฟี่ อมยิ้ม วุ้น และอื่น ๆ ให้ไปละลายน้ำกรองเอากากทิ้งไปแล้วนำเอาน้ำสีไปปรับให้สารละลายมีฤทธิ์เป็นกรดด้วยกรดอะซิติกขัน 1 % (โดยปริมาตร)

ง. อาหารพวกแป้งและพวกที่มีไขมันมาก เช่น ขนมขัน ขนมต้วง ขนมตาล ขนมปุยฝ้าย ขนมล่าสี่ ช็อล ใส้กรอก กุ้งแห้ง เต้าหู้ ข้าวเกรียบกุ้ง ส่ลิ่ม ลอดช่อง และอื่น ๆ ให้นำอาหารแป้งและประเภทที่มีไขมันนั้นไปแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วยแอมโมเนียขัน 2 % ในเอทานอล ขัน 70 % (โดยปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนกระทั่งสังเกตเห็นสีในอาหารจางลงหรือเกือบหมดสีส่วนน้ำสีที่แยกได้จะมีสีเข้ม กรองเอาเศษอาหารทิ้งไปเอาแต่น้ำสีมาทดลองต่อไป แต่กรณีที่น้ำสีที่แยกได้มีลักษณะขุ่นเพราะมีไขมันก็ต้องนำน้ำสีนั้นไปส่กัดเอาไขมันออกโดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ส่กัดประมาณ 3 ครั้ง ครั้งละ15-20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในกรณีที่มีไขมันมาก ๆ อาจต้องส่กัดหลายครั้งจนกว่าไขมันจะออกไปหมดหรือเกือบหมด แยกเอาชั้นของน้ำสีมาระเหยเอาเอทานอลออกให้หมดแล้วจึงค่อยปรับส่ภาพของน้ำสีให้เป็นกรดด้วยกรดอะซิติกขัน 1 % (โดยปริมาตร)

การทำให้สีที่แยกออกมาได้บริสุทธิ์

นำน้ำสีที่แยกได้ตามวิธีการข้างบนมาปรับส่ภาพให้เป็นกรดแล้วใส่ไหมพรมซึ่งได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการต้มในสารละลายแอมโมเนียหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เข้มขันประมาณ 0.01 โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร และต้มในน้ำแล้วนำมาตากให้แห้งก่อน จึงจะนำมาย้อมสีจากสีที่แยกมาได้ เมื่อต้มน้ำสีที่มีไหมพรมจนกระทั่งสังเกตเห็นสีลับไหมพรมจนหมดหรือเกือบหมดจึงเอาไหมพรมที่ติดสีแล้วมาล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้งจนไหมพรมส่ะอาด นำไหมพรมไปแช่ในสารละลายแอมโมเนียขัน 1 % (โดยปริมาตร) ตั้งบนเครื่องอังไอน้ำอีกครั้ง จนสีละลายออกมาจากไหมพรมจนหมด เอาไหมพรมออกไปย้อมใหม่ตามกรรมวิธีเดิมทำหลายครั้งจนได้น้ำสีที่บริสุทธิ์และมีความเข้มมากพอ ระเหยเอาแอมโมเนียออกให้หมดเพื่อนำไปวิเคราะห์ขั้นต่อไป

ถ้าย้อมสีในส่ภาพเป็นกรดไม่ติดก็ให้ปรับสารละลายให้เป็นด่าง นำไปย้อมใหม่จนติดแล้วละลายสีออกจากไหมพรมโดยต้มกับสารละลายกรดและทำวิธีเดียวกันเช่นข้างต้น

การตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของสีที่จะวิเคราะห์

นำน้ำสีที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากขั้นที่ 2 ข้างบนมาแบ่งเป็น 3 ส่วน นำไปวิเคราะห์ต่ออีก 3 ขั้นดังนี้

ก. วิเคราะห์ทางเคมี

ข. วิเคราะห์ด้วยเปเปอร์โครมาโตกราฟี

ค. วิเคราะห์ด้วยวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี

ก. วิเคราะห์ทางเคมี

แบ่งน้ำสีส่วนที่จะใช้วิเคราะห์ทางเคมีออกเป็นอีก 3 ส่วน

ส่วนที่ 1 นำไประเหยให้แห้งบนเครื่องอังไอน้ำเพื่อทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี กับกรดซัลฟูริกเข้มข้น แล้วเทียบสีของสารละลายที่ได้กับสีผสมอาหารที่ใช้เป็นมาตรฐาน

ส่วนที่ 2 นำสารละลายสีไปทดสอบโดยตรงกับ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ขัน 10 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เทียบผลกับข้อมูลจากตารางการทดลองในข้อ 3.2.4

ส่วนที่ 3 นำสารละลายสีไปย้อมให้ติดไหมพรมแล้วนำไปทดสอบกับ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น, สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ขัน 10 % (น้ำหนัก/ปริมาตร), กรดซัลฟูริกเข้มข้น และ สารละลายแอมโมเนียเข้มข้น เทียบผลที่ได้กับข้อมูลจากตารางการทดลองในข้อ 3.2.4

ข. วิเคราะห์ด้วยเปเปอร์โครมาโตกราฟี

นำน้ำสีส่วนนี้ไประเหยให้เกือบแห้ง เพื่อเป็นการทำให้สีเข้มข้นขึ้น แล้วนำสีไปหยดลงบนกระดาษโครมาโตกราฟี เบอร์ 1 และ กระดาษกรอง แล้วนำไปแช่ในสารละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซึ่งพิจารณาจากผลการทดลองในข้อ 3.2.1.5 นำเอาสภาวะที่เหมาะสมมาใช้วิเคราะห์กับสีที่แยกได้จากสารตัวอย่าง โดยต้องเทียบกับสีมาตรฐานในสภาวะเดียวกันทำการวิเคราะห์พร้อมกันทุกครั้ง พิจารณาดูค่า R_f ควรจะใกล้เคียงกันอย่างน้อยในสารละลาย 2 ชนิด ถ้าวิเคราะห์ยากก็ให้ทำการทดลองในสารละลายมากชนิดขึ้นเพื่อเปรียบเทียบค่า R_f กับสารมาตรฐาน

ค. วิเคราะห์ด้วยวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี

จากผลการวิเคราะห์ในข้อ ก. และ ข. ทำให้พอทราบได้ว่าสีในอาหารเป็นสีใดแล้วนำสีนั้นมาวัดความสามารถในการดูดกลืนแสง โดยเลือกจากแอบซอบชันสเปกตรัมของสีมาตรฐานที่คาดว่าจะเป็นสีที่ตรวจพบในอาหารประเภทนั้นมาพิจารณา ลักษณะของแอบซอบชันสเปกตรัมในสารละลายบัฟเฟอร์และให้เลือก pH ที่สีนั้นดูดกลืนแสงได้ดีสุดสำหรับทดลองกับสีที่แยกได้จากอาหารตัวอย่าง เมื่อเทียบกับสีมาตรฐานที่ pH เดียวกันและความยาวคลื่นที่สีดูดกลืนแสงได้มากที่สุดและดูลักษณะสเปกตรัมด้วย ถ้าตรงกันทุกอย่างจึงจะสรุปว่า สีในอาหารนั้นเป็นสีเดียวกันกับสีตัวอย่าง

3.2.5.2 วิเคราะห์สีในลิปสติก[44]

นำลิปสติกมาประมาณ 0.5 กรัม ละลายในเอทานอลขัน 70 % (โดยปริมาตร) พยายามคนให้ละลายให้หมด ถ้าละลายไม่หมดให้เติม เอน, เอน - ไดเมทิลฟอร์มามีดลงไปช่วยด้วยและอาจจะนำไปอุ่นให้ร้อนบนเครื่องอังไอน้ำเพื่อช่วยการละลายด้วยก็ได้ ต่อจากนั้นนำสารละลายลิปสติกไปสกัดเอาไขมันพวก wax และ oil ต่าง ๆ ออกไปโดยใช้กรวยแยก สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ประมาณ 1-2 ครั้ง ครั้งละ 10-15 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถ้า wax หรือ oil ยังออกไม่หมดก็ให้สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์อีกจนกว่าจะละลายเอาไขมันออกมาได้หมด นำชั้นของน้ำสีไประเหยบนเครื่องอังไอน้ำจนแห้งแล้วจึงนำสีที่แห้งแล้วลงมาละลายน้ำเข้าไปเล็กน้อย ถ้ามีสีที่ละลายน้ำก็จะละลายออกมานำสีที่ละลายน้ำไปหยดลงบนกระดาษโครมาโตกราฟีเบอร์ 1 และ กระดาษกรอง เทียบกับสีผสมอาหารมาตรฐานที่มีสีใกล้เคียงกัน ถ้าในลิปสติกมีสีที่ละลายในตัวทำละลายสารอินทรีย์ซึ่งจะสังเกตได้จากตอนที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ จะเห็นว่ามีสีปรากฏในชั้นของปิโตรเลียมอีเทอร์ให้เก็บชั้นของปิโตรเลียมอีเทอร์มาระเหยให้แห้งแล้วละลายสีที่แห้งด้วยเอทานอลนำไปทำรีเวิร์สเฟสเปเปอร์โครมาโตกราฟีเทียบกับสีผสมอาหารประเภทที่ละลายในสารอินทรีย์ด้วยกัน

นำสีที่แยกได้ไปตรวจลอบทางสเปกโตรโฟโตเมตรีด้วย โดยถ้าเป็นสีที่ละลายน้ำก็นำไปใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เลือก pH ไว้แล้ว โดยบันทึกแอบซอบชันสเปกตรัมไว้พิจารณาเทียบกับของสีผสมอาหารมาตรฐาน ถ้าเป็นสีที่ละลายในสารอินทรีย์ให้นำสีไปละลายในไซโคลเฮกเซนแล้วเทียบกับลักษณะของสเปกตรัมกับสีมาตรฐาน