

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในเนื้อหมู โดยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรี เปรียบเทียบกับเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี

Determination of Phosphate in Pork by Digital Image Colorimetry Compared with UV-Visible Spectrophotometry

ปริญา มาสวัสต์^{1,2}, ธนธรณ์ คำมุข¹, ณัฐริกา ฤทธิเยี่ยม¹ และ ธิติสรณ์ ขวัญวงศ์¹

Prinya Masawat^{1,2}, Tanatorn Kammuk¹, Nuttarika Riteaim¹ and Thitisorn Khanwong¹

¹ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประเทศไทย

² สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการ ด้านนวัตกรรมและเทคโนโลยีการตรวจและวัสดุขั้นสูง ประเทศไทย

¹ Chemistry Department, Faculty of Science, Naresuan University, Thailand

² Center of Excellence for Innovation and Technology for Detection and Advanced Materials (ITDAM), Thailand

Received : 2 November 2023, Received in revised form : 16 July 2024, Accepted : 31 July 2024

Available online : 6 August 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : จากปัญหาการพบเนื้อหมูในร้านหมูกระทะมีการนำสารฟอสเฟตมาใช้ในการหมัก เพื่อให้เนื้อเกิดการนุ่มขึ้นได้ดี คงความนุ่ม รักษารสชาติ และมีแนวโน้มว่ามีการใช้อย่างแพร่หลาย ทำให้ผู้บริโภคส่วนใหญ่มีความกังวลว่าจะได้รับสารฟอสเฟตเข้าไปสู่ร่างกายที่เกิดจากการตกค้างในเนื้อหมู และทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อหมูผ่านการปรุงแต่งโดยการย่อยด้วยแสงยูวีที่ได้พัฒนาขึ้น ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตโดยใช้สารละลายที่ทำให้เกิดสีในการทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีกับสารฟอสเฟต แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรี โดยการถ่ายภาพสีของสารในกล่องควบคุมแสงด้วยกล้องของโทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะและวัดค่าสีแดง สีเขียวและสีน้ำเงิน ด้วยแอปพลิเคชัน และเปรียบเทียบผลที่ได้จากเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้กับเทคนิคขั้นสูงคือ ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี

วิธีดำเนินการวิจัย : ชั่งตัวอย่างเนื้อหมู 0.10 กรัม แล้วนำมาเติมสารผสมระหว่างกรดไนตริกเข้มข้นและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ในอัตราส่วน 2 : 1) จากนั้นนำไปย่อยด้วยแสงยูวีจนสารละลายแห้ง และเติมน้ำปราศจากไอออนในตัวอย่างที่ย่อยแล้ว ก่อนนำไปทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารละลายที่ทำให้เกิดสี สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นระหว่างสารละลายที่ทำให้เกิดสีและฟอสเฟตจะมีสีน้ำเงิน แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตด้วยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรี และเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี

ผลการวิจัย : เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรี จะพบช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 0.10-0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.996 ร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 87.2 – 100 มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณเท่ากับ 0.09 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย : การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างเนื้อหมูด้วยสารละลายที่ทำให้เกิดสี โดยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจ คัลเลอริเมตรีนั้นมีความถูกต้อง แม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธี พบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยการทำ paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

คำสำคัญ : เครื่องดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริมิเตอร์ที่ใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะ ; เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ; ฟอสเฟต ; สารละลายที่ทำให้เกิดสี ; การย่อยด้วยแสงยูวี

Abstract

Background and Objectives : From the problem of pork found in Thai barbecue restaurants which phosphate is used in marinating to make the meat absorb water well, maintain softness, maintain flavor, and is likely to be widely used. Most consumers are concerned that phosphates will enter the body from residues in pork and cause harmful to the body. Therefore, in this research work, the developed method for preparing processed pork samples using UV light digestion was utilized before analyzing the phosphate content by complexing with the coloring forming solution. The color of the complexes solution was then analyzed by the digital image colorimetry (DIC) by capturing in a light-controlled box with the camera of a smart mobile phone and measuring the red, green and blue (RGB) color value with an application and compared the results obtained from the developed technique with an advanced technique which is UV-visible spectrophotometry.

Methodology : Pork samples were weighed approximately 0.1 g then mixing it with the mixtures of concentrated nitric acid (65%) and hydrogen peroxide (30%) (2:1 v/v). Next, the mixture was irradiated by UV light until the solution dried followed by the addition of deionized water then forming complex compounds with chromogenic reagent followed by digital image colorimetry compared with UV-visible spectrophotometry.

Main Results : The color of the complex was blue and subsequently analyzed with a digital image colorimetry. The linear range was found in the range of 0.10 – 0.50 mg L⁻¹ with a correlation coefficient of 0.996. The percentage recoveries were in the range of 87.2 – 100. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.09 and 0.30 mg L⁻¹, respectively.

Conclusions : From the results of the experiment, it was concluded that the analysis of the phosphate content in the pork samples was done with chromogenic reagent followed by digital image colorimetry which is accurate, convenient, fast, and environmentally friendly. When comparing with the UV-visible spectrophotometry to confirm

the correctness of the method, it was found that the results were not significantly different at the 95% confidence level by paired t-test.

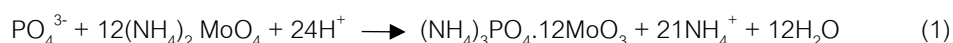
Keywords : smartphone-based digital image colorimeter ; UV-visible spectrophotometer ; phosphate ; chromogenic reagent ; UV digestion

*Corresponding author. E-mail : prinyam@nu.ac.th

บทนำ

ในปัจจุบันคนไทยนิยมรับประทานเนื้อหมูในเมนูที่เรียกว่า หมูกระทะ ซึ่งเป็นหนึ่งในเมนูอาหารยอดนิยมของประเทศไทย มีวัฒนธรรมการกินที่แพร่หลาย จนกลายเป็นอาหารประจำเทศกาล ไม่ว่าจะเป็นเทศกาลไหน เมนูนี้มักจะได้รับความนิยมมากที่สุดก็คือ หมูกระทะ ด้วยจุดเด่นของเมนูนี้ที่ทานง่าย ไม่ว่าใครก็ทานได้ รสชาติมีความหลากหลาย และสามารถประยุกต์ได้จากน้ำจิ้ม หรือซอสที่ใช้หมักเนื้อหมู และที่สำคัญคือไม่ต้องใช้วัตถุดิบเยอะก็สามารถกลายเป็นเมนูถูกปากของทุกคนที่ได้ลองทาน ฟอสเฟต คือ เกลือของกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบสำคัญที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวภาพ ช่วยในรักษาการควบคุมสภาวะสมดุลปกติของเซลล์ ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย โดยนิยมใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่ทำจากเนื้อสัตว์ เช่น ลูกชิ้น หมูแดง หมูยอ แหนม ไส้กรอกอีสาน และกุนเชียง เป็นต้น เพื่อให้เนื้อเกิดการอุ้มน้ำได้ดี คงความนุ่ม มีสัมผัสที่ชุ่มชื้น ไม่แห้งกระด้าง และป้องกันการเกิดกลิ่นหืนในผลิตภัณฑ์ ซึ่งฟอสเฟตเมื่อปนเปื้อนอยู่ในอาหารจะส่งผลให้มนุษย์ได้รับฟอสเฟตเข้าสู่ร่างกาย แล้วถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก จากนั้นถูกขับออกที่ไต ระดับฟอสเฟตปกติในเลือดมีปริมาณ 3.5 – 5.5 มิลลิโมลต่อลิตร หากการทำงานของไตลดลงจนไม่สามารถกำจัดฟอสเฟตได้ จะทำให้มีระดับฟอสเฟตในเลือดสูง อาจส่งผลให้มีอาการคันตามผิวหนังจากฟอสเฟตที่มากเกินไปสะสมตามเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง เกิดภาวะกระดูกบางลงเนื่องจากแคลเซียมถูกสลายออกจากกระดูก มีก้อนแคลเซียมเกาะตามเนื้อเยื่อ เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งและเกิดภาวะต่อมพาราไทรอยด์โตได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการหาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างเนื้อหมูปรุงแต่ง หรือเนื้อหมูกระทะ ซึ่งเป็นอาหารยอดนิยมของคนไทยในปัจจุบัน ซึ่งเน้นย้ำถึงความสำคัญของวิธีการที่เรียบง่าย สะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และอิงตามหลักเคมีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยจากการศึกษาค้นคว้าพบว่ามีนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาการหาปริมาณฟอสเฟต ในตัวอย่างต่างๆ โดยใช้รีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี (Chromogenic reagent) ที่คล้ายกันซึ่งส่วนใหญ่จะอาศัยปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟตและโมลิบดีนัม โดยใช้สภาวะที่เป็นกรด มีทั้งใช้สารเคมีได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (Masawat *et al.*, 2014; Mazzaracchio *et al.*, 2022) โดยเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ส่วนใหญ่คือเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี และยังมีงานวิจัยที่ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตที่ตกค้างในกุ้งแช่แข็ง โดยใช้เทคนิคเอนิธรินฟราเรดสเปคโตรสโกปี (Sringarm *et al.*, 2019) แม้ว่าการใช้เครื่องมือขั้นสูงจะให้ผลการทดลองที่มีช่วงความแม่นยำตรงที่กว้างกว่า มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ที่ดีกว่า แต่ก็ยังเป็นเทคนิคที่มีราคาสูง เครื่องมือมีขนาดใหญ่ ไม่สามารถเคลื่อนย้ายเพื่อทำงานในสถานที่จริงได้และยังต้องการผู้ชำนาญการในการใช้เครื่องด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะนำเสนอวิธีที่มีความง่าย สะดวก รวดเร็ว และยังสามารถพกพา

นำไปวิเคราะห์นอกสถานที่ได้ นั่นคือ เทคนิคการวัดค่าสี หรือที่เรียกว่า เทคนิคดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรี (Digital image colorimetry; DIC) โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจะนำเทคนิคดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรีมาใช้ให้แตกต่าง และมีความสะดวก รวดเร็วกว่างานวิจัยที่ผ่านมาคือ จะทำการถ่ายภาพสีของสารประกอบเชิงซ้อนของฟอสเฟต ในกล่องควบคุมแสงที่สามารถ ถ่ายได้พร้อมกันที่หลายตัวอย่างโดยใช้เครื่องมือที่ได้ออกแบบขึ้น (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 16753 ชื่อ กล่องควบคุมแสงสำหรับวัด ความเข้มข้นของสารเคอร์คูมินพร้อมกันหลายความเข้มข้น) แต่จะเปลี่ยนจากการใช้กล่องของไอพอด แทช (iPod touch) ในการ ถ่ายภาพเป็นการถ่ายภาพด้วยกล่องของโทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะ และประมวลผลค่าสี RGB ด้วยแอปพลิเคชันที่สามารถ ดาวน์โหลดได้ฟรี (Pixel Picker) ซึ่งงานวิจัยนี้จะได้ทำการย่อยตัวอย่างเนื้อหูดด้วยแสงยูวีก่อนในกล่องสำหรับการย่อย สารอินทรีย์ (Masawat *et al.*, 2022) ซึ่งได้มีการปรับปรุงกล่องใหม่โดยใช้ไม้จริงที่พ่นสีดำทนความร้อนด้านในแทนกล่อง กระดาษอัดสีดำ ใช้วิธีบดคอกเป็นแท่งให้ความร้อน (Kheamphet & Masawat, 2022) โดยจะวางตะแกรงใส่หลอดทดลอง ชนิดสแตนเลส แล้วย่อยตัวอย่างในหลอดทดลอง โดยสามารถย่อยตัวอย่างอาหารได้ที่หลายตัวอย่างพร้อมกัน ใช้เวลา ไม่นาน อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ปลอดภัยและมีราคาถูกกว่าวิธีย่อยแบบอื่นๆ มาก ก่อนนำมาพอร์มสีกับสารละลายที่ทำให้เกิดสี โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างสารละลายฟอสเฟตเมื่อทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมโมลิบเดตภายใต้สภาวะที่เป็นกรดเกิดเป็นสาร เชิงซ้อนแอมโมเนียมฟอสโฟโมลิบเดต (สมการ 1) สารนี้จะถูกรีดิวส์เป็นสารประกอบสีน้ำเงิน (molybdenum blue) เมื่อตัว รีดิวส์ที่ใช้ทำปฏิกิริยาคือกรดแอสคอร์บิก (สมการ 2) โดยความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณฟอสเฟต ที่มีอยู่ (Masawat *et al.*, 2014)



และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริมิเตอร์ที่ใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะที่ได้พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับ เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงถือว่าเป็นงานวิจัยที่ใหม่ทั้งในเรื่องของการเตรียมตัวอย่างก่อนการ วิเคราะห์และวิธีการตรวจวัด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Rankem, India), โพแทสเซียม แอนติโมนีทาร์เทรต (Riedel-de Haen, Germany), แอมโมเนียมโมลิบเดต (Ajax Finechem, Australia), กรดแอสคอร์บิก (Rankem, India), กรดซัลฟิวริก (Labchemie PVT, India), กรดไนตริก (Carlo Erba, Italy) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Merck, Germany) โดยสารทุกตัว

เป็นชนิดเกรตวีกะระห์ นำปราศจากไอออนใช้ในการเตรียมสารทุกชนิดโดยใช้เครื่องรุ่น Milli Q Direct 3 บริษัท Merck, ประเทศ Germany

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่นสเปคอร์ด เอส 600 (Double Beam UV/Vis spectrophotometer SPECORD S 600 ; Analytik Jena, Germany)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลายที่ทำให้เกิดสี

เตรียมโดยตวงสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สารละลายโพแทสเซียม แอนติโมนีทาร์เทรตเข้มข้น 4.11×10^{-3} มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดตเข้มข้น 3.19×10^{-2} มิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายผสมนี้สามารถเก็บไว้ได้ 4-6 ชั่วโมง

3.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อสัตว์

ได้มีการศึกษางานวิจัยการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างเนื้อสัตว์เช่น กุ้งแช่แข็ง (Sringarm *et al.*, 2019) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตตามวิธีมาตรฐาน (AOAC, 1995) โดยนำตัวอย่างกุ้งดิบ 5 กรัมผสมด้วย Zinc oxide 0.5 กรัม ใช้ Blank เป็น Zinc oxide 0.5 กรัมจากนั้นนำตัวอย่างกุ้งและ Blank มาอบที่อุณหภูมิ 101 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารอินทรีย์ที่เหลือจากการเผามาละลายในกรดไฮโดรคลอริก 5 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสด้วยเครื่องกวนสารเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปกรองแบบธรรมดาด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ล้างด้วยน้ำร้อน 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง รอให้เย็น นำส่วนใสเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนกว่าจะขาว แล้วนำไปเติมกรดไฮโดรคลอริกจนกว่าจะใส รอให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร เติมสารลิบเดตแอสคอร์บิก 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน จากวิธีการมาตรฐานข้างต้น จะเห็นได้ว่าวิธีการในการเตรียมตัวอย่างนั้นใช้ปริมาณสารเคมีในการย่อยที่มาก และใช้เวลานาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ใช้วิธีการในการเตรียมตัวอย่างเนื้อหมู ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟต โดยการย่อยด้วยแสงยูวี ซึ่งวิธีนี้ใช้สารเคมีในการย่อยตัวอย่างเนื้อหมูในปริมาณน้อย และใช้เวลาในการย่อยที่น้อยกว่า สามารถทำได้โดยตั้งตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดที่ได้ปั่นจนละเอียดแล้ว 0.1000 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายผสมระหว่างกรดไนตริกเข้มข้นกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อัตราส่วน 2 : 1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร วางปิกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตรปิดปากหลอดทดลองไว้ก่อนนำหลอดทดลองไปวางในตะแกรงใส่หลอดทดลองชนิดสแตนเลสแล้วนำไปวางในกล่องสำหรับการย่อยสารอินทรีย์ด้วยแสงยูวีซึ่งได้มีการวอร์มหลอดยูวีไว้ก่อนหน้าเป็นเวลา 15 นาที ทำการย่อยเป็นเวลา 90 นาที จะได้สารที่แห้งติดที่ก้นหลอด ทิ้งให้เย็นแล้วนำออกจากกล่องสำหรับการย่อยสารอินทรีย์ด้วยแสงยูวี เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร

5 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายแล้วปิเปตออกมา 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไป ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ตามด้วยปิเปตสารละลายที่ทำให้เกิดสี (Masawat *et al.*, 2014) ปริมาตร 1.60 มิลลิลิตร สุดท้ายทำการปิเปตสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีที่ได้ใส่ลงในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิทัลอิมเมจเซลล์เลอริมิเตอร์ที่ใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะที่ได้พัฒนาขึ้น (Wongthanyakram *et al.*, 2019) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้โทรศัพท์รุ่น iPhone 11 (Apple, U.S.A.) ระยะในการถ่ายภาพจากกล้องจนถึงไมโครเพลทคือ 8 เซนติเมตรและพื้นที่สำหรับการอ่านค่าสี RGB คือ 15 x 15 พิกเซล นอกจากนี้ให้แบ่งสารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีที่ได้ข้างต้นมาเทใส่ในคิวเวทพลาสติก ชนิดโพลีสไตรีน (Polystyrene) ขนาด 10 x 10 x 45 มิลลิเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยมีแผนภาพของการวิเคราะห์ดัง Figure 1

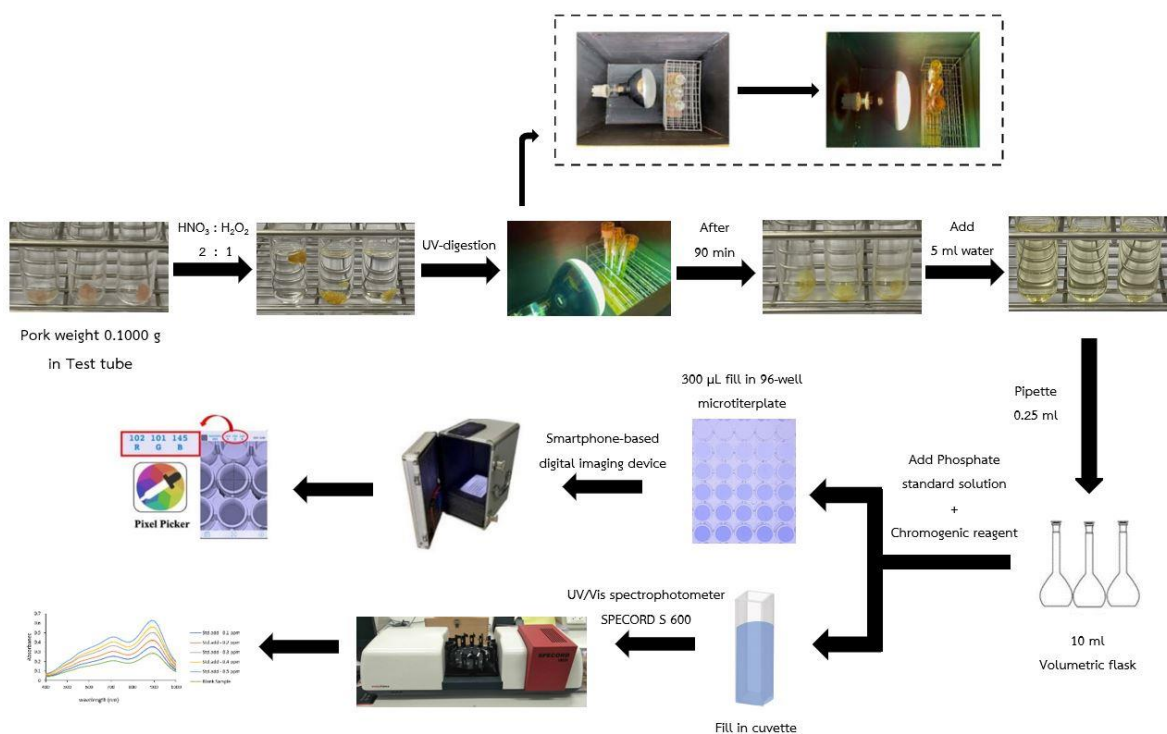


Figure 1 Diagram of preparation of pork samples for phosphate determination.



859

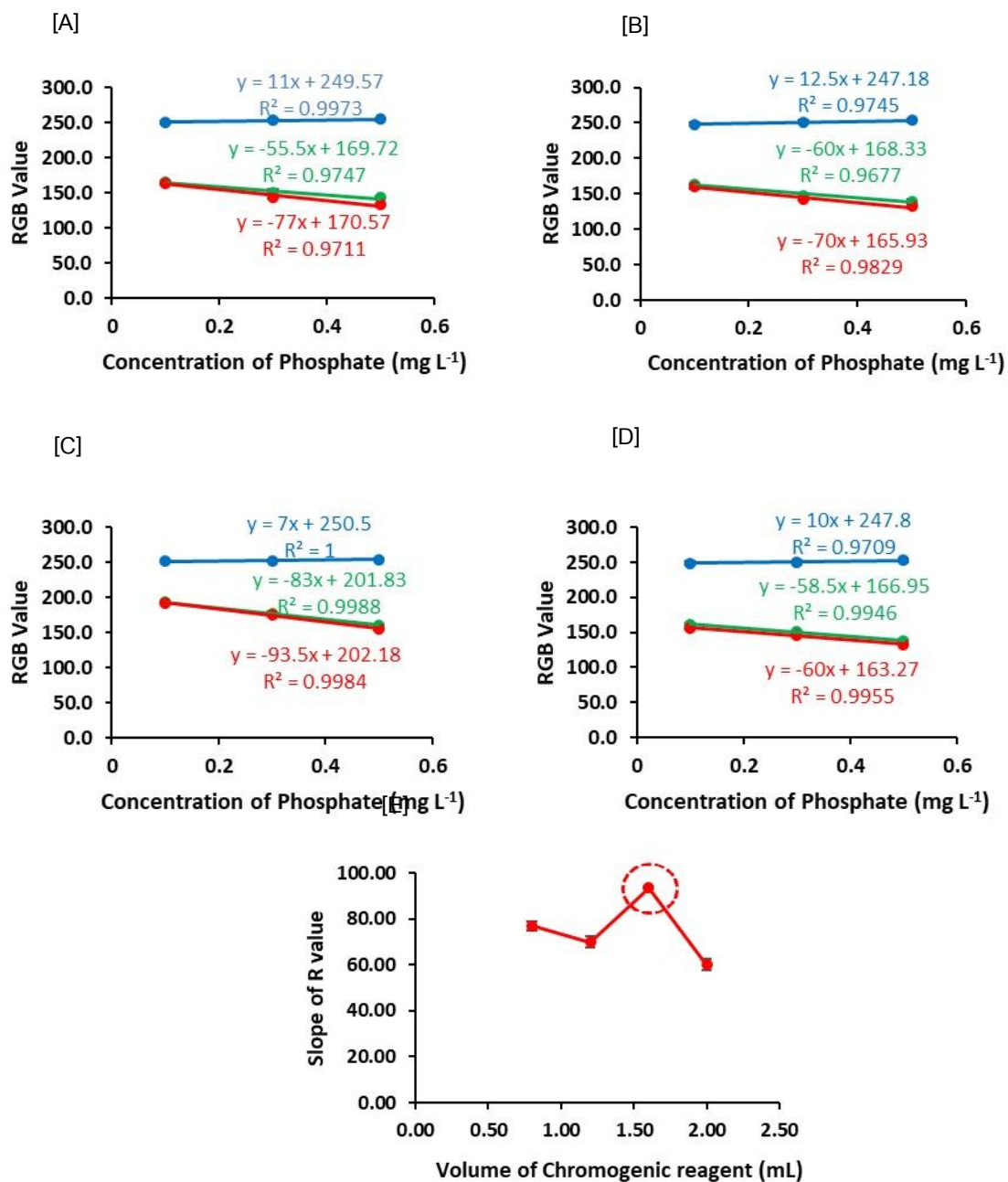


Figure 2 Graph plots between RGB (red, green and blue) value and concentration of phosphate at difference volume of chromogenic reagent 0.80 [A], 1.20 [B], 1.60 [C] and 2.00 [D] mL, respectively and [E] Graph plots between slope of R value and volume of chromogenic reagent

10 เท่าทางผู้วิจัยได้ใช้สารละลายตัวรบกวนมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิตร จากนั้นนำสารละลายที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อน ไปถ่ายภาพด้วยเครื่องดิจิทัลอิมเมจเคิลเลอริมิเตอร์แบบพกพาที่ใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะในการถ่ายภาพสารละลายสี เพื่อเปรียบเทียบสีของสารละลายที่มีโลหะรบกวนระหว่างโลหะทั้ง 3 ชนิดและสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตได้ผลดัง Figure 5 ซึ่งพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนมีสีเข้มขึ้น และมีค่าสีแดงลดลงเล็กน้อย ซึ่งที่อัตราส่วน 1: 1 และ 1:10 มีการลดลงเท่ากัน และทำให้ค่าร้อยละการกลับคืนมีค่าลดลงด้วย ดังนั้นแสดงว่าโลหะรบกวนทุกตัวมีผลต่อการวิเคราะห์ เพราะเกิดการแข่งขันในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารที่ทำให้เกิดสีกับฟอสเฟต และโลหะรบกวนที่ศึกษา

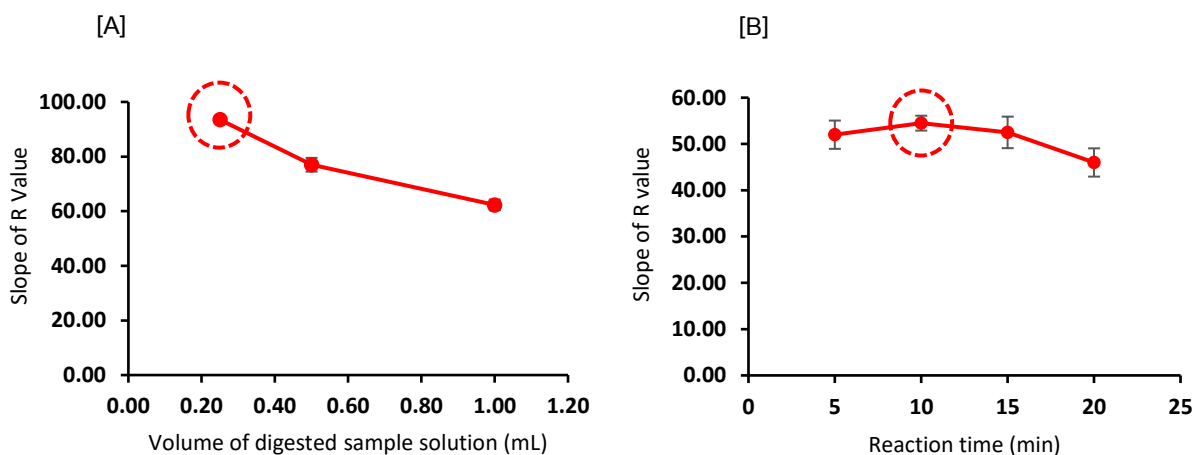


Figure 3 [A] Graph plots between slope of R value and volume of digested sample solution and [B] Graph plots between slope of R value and reaction time

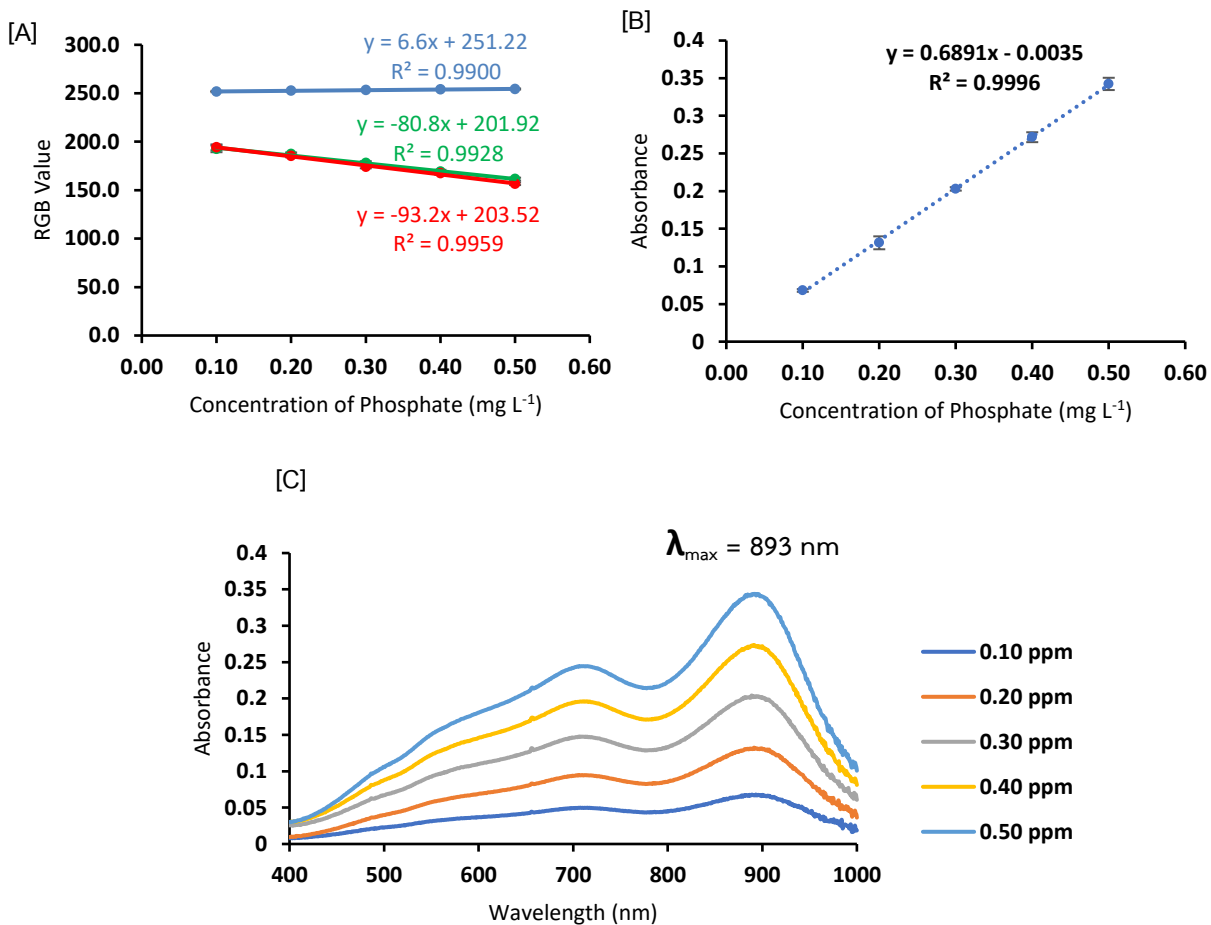


Figure 4 [A] Graph plots between RGB (red, green and blue) value and concentration of phosphate, [B] Graph plots between absorbance at the wavelength of 893 nm and concentration of phosphate and [C] absorption spectrum of the complex between phosphate and chromogenic reagent

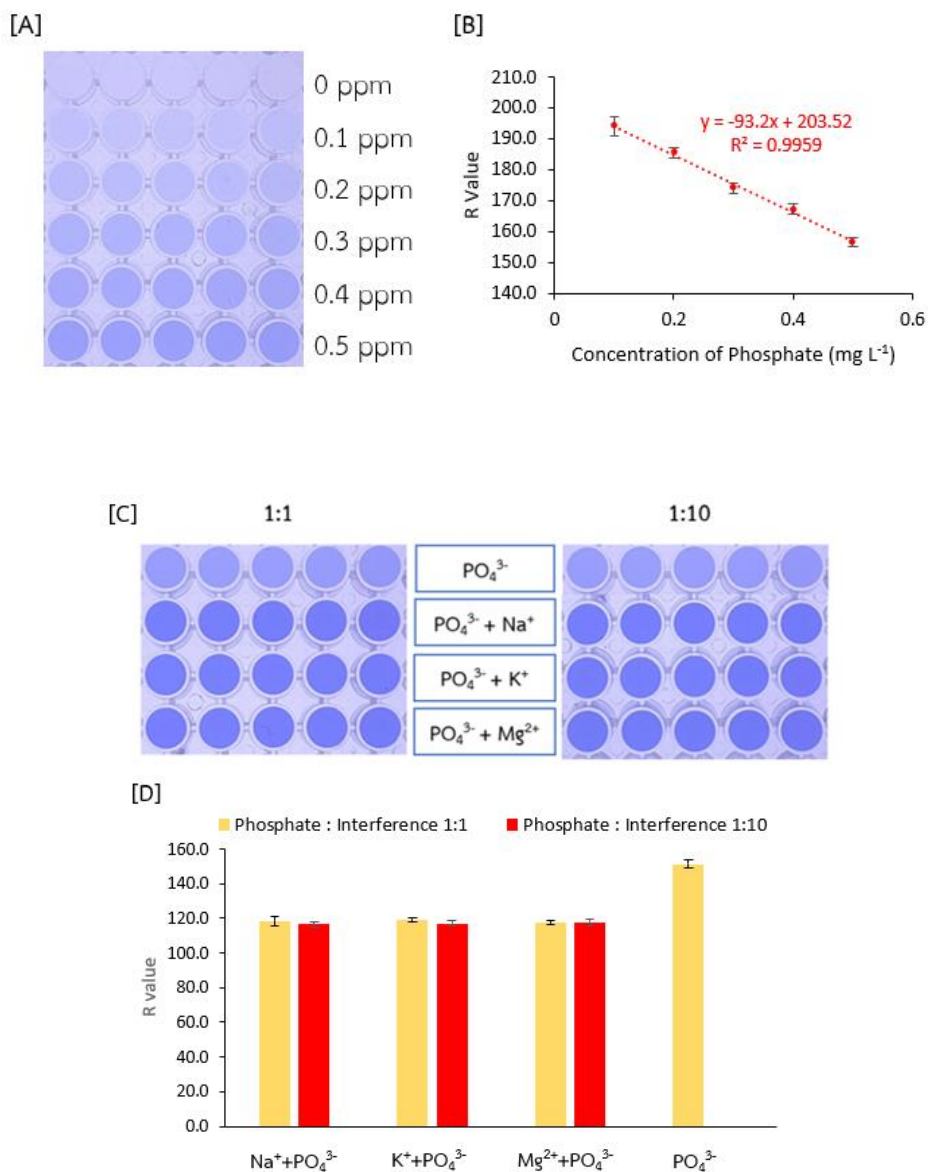


Figure 5 [A] Color images of the complexes between various concentrations of phosphate and the chromogenic reagent, [B] Graph plots between R value of the complexes and concentration of phosphate, [C] Color images of the complexes with the addition of three interfering metals in a ratio of 1:1 to 1:10 and [D] R value measured when three interfering metals were added in a ratio of 1:1 to 1:10 into the complexes

4. การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างเนื้อหมู

นำสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ไปใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรี ที่ใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะในการถ่ายภาพ เปรียบเทียบกับวิธียูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรีได้ผลดัง Table 1 และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างเนื้อหมูในหน่วย mg/g ได้ผลแสดงดัง Table 2

Table 1 The detected phosphate content and %recovery obtained by digital image colorimetry and UV-visible spectrophotometry

Pork sample from	Spiked phosphate (mg/L)	Detected phosphate content (mg/L), n = 3		% Recovery ± SD (n=3)	
		Digital image	UV-visible	Digital image	UV-visible
		colorimetry	spectrophotometry	colorimetry	spectrophotometry
Lada Moo Kratha	0	0.62	0.65	0	0
	0.10	0.71	0.76	90.0±1.0	110±5.7
	0.30	0.92	0.93	100±1.2	93.0±3.0
	0.50	1.10	1.13	96.0±0.5	84.0±0.5
SK Interfood	0	0.75	0.79	0	0
	0.10	0.85	0.89	100±2.9	100±2.8
	0.30	0.99	1.05	80.0±3.5	86.6±1.0
	0.50	1.18	1.19	86.0±2.6	80.0±3.6
Jim Jum Mum Tuek	0	0.45	0.36	0	0
	0.10	0.54	0.49	90.0±3.5	96.0±5.7
	0.30	0.75	0.64	100±1.1	94.0±1.7
	0.50	0.95	0.91	102±0.6	102±4.1

%Recovery = ร้อยละการกลับคืน หาได้จากสมการ

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่ตรวจพบ} - \text{ความเข้มข้นที่มีในตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มข้นของโลหะที่เติมลงในตัวอย่าง}} \times 100$$

Table 2 The detected phosphate content obtained by digital image colorimetry and UV-visible spectrophotometry

Pork sample from	Detected phosphate content (mg/g), n = 3	
	Digital image colorimetry	UV-visible spectrophotometry
Lada Moo Kratha	0.051±0.0020	0.046±0.0005
SK Interfood	0.072±0.0015	0.067±0.0006
Jim Jum Mum Tuek	0.045±0.0021	0.033±0.0005

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณของฟอสเฟต

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลายที่ทำให้เกิดสี และฟอสเฟต เมื่อใช้ปริมาณเนื้อหมู 0.1 กรัม พบว่าปริมาตรของสารละลายที่ทำให้เกิดสีที่เหมาะสมคือ 1.60 มิลลิลิตร ปริมาตรของสารตัวอย่าง หลังจากการย่อยที่เหมาะสมคือ 0.25 มิลลิลิตร เวลาในการฟอรมสีที่เหมาะสมคือ 10 นาที จากผลดัง Figure 2 และ Figure 3 [A]-[B] ตามลำดับ สารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จะมีสีน้ำเงิน และถ่ายภาพสีในเครื่องดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริมิเตอร์ ความสว่างของแสงไฟที่เหมาะสมเท่ากับ 200 ลักซ์ ซึ่งจากสภาวะดังกล่าวเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรีจะให้ค่าความชันของสีแดง (R value) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกค่าสีแดงในการหาปริมาณต่อไป และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Specord S 600 สเปกตรัมที่ได้นั้นมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 893 นาโนเมตร ดังนั้นจึงเลือกความยาวคลื่นนี้ในการหาปริมาณต่อไป

2. การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของเครื่องมือ (Limit of Detection; LOD และ Limit of Quantitation ; LOQ)

จากผลการหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของเครื่องมือโดยนำสารละลายที่ทำให้เกิดสี (แบบลงค์) มาตรวจวัดด้วยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรี และเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี แม้จะพบว่าเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ต่ำกว่าเทคนิคดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรี แต่ในการวิเคราะห์หาปริมาณของฟอสเฟตในเนื้อหมูโดยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจคัลเลอริเมตรินั้นก็ยังสามารถวิเคราะห์ได้เนื่องจากฟอสเฟตที่ตกค้างในตัวอย่างเนื้อหมูจากร้านหมูกระทะมีปริมาณค่อนข้างสูง จึงสามารถตรวจวัดได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังให้คำร้อยละการกลับคืนอยู่ในเกณฑ์ที่แสดงผลดังแสดงใน Table 1

3. การศึกษาตัวรบกวนของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิคดิจิทัลอิมเมจแคลเลอริเมตรี

ผลการเปรียบเทียบสีของสารละลายที่มีโลหะรบกวนระหว่างโลหะทั้ง 3 ชนิดและสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต ได้ผลดัง Figure 5 ซึ่งพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนมีสีเข้มขึ้น และมีค่าสีแดงลดลงเล็กน้อย ซึ่งที่อัตราส่วน 1: 1 และ 1:10 มีการลดลงเท่ากัน และทำให้ค่าร้อยละการกลับคืนมีค่าลดลงด้วย ดังนั้นแสดงว่าโลหะรบกวนทุกตัวมีผลต่อการวิเคราะห์ เพราะเกิดการแข่งขันในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารที่ทำให้เกิดสีกับฟอสเฟต และโลหะรบกวนที่ศึกษา แต่ในการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างเนื้อหุ้มาจากร้านหมูกระทะนั้นโลหะที่รบกวนไม่ได้ส่งผลให้ค่าร้อยละการกลับคืนน้อยลง ดังนั้นในผลการวิเคราะห์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ก็มีความถูกต้องสูง

4. การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟต ในตัวอย่างเนื้อหุ้

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อหุ้จาก Table 1 แสดงให้เห็นว่าค่าร้อยละการกลับคืนที่วิเคราะห์ได้จากวิธีดิจิทัลอิมเมจแคลเลอริเมตรี มีค่าใกล้เคียงกับค่าร้อยละการกลับคืนที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐาน และเมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโดยใช้หลักทางสถิติ t-Test: Paired Two Sample for Means ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าค่า t Stat มีค่าเท่ากับ 0.06 และค่า t Critical two-tail มีค่าเท่ากับ 2.20 ซึ่งค่า t Stat มีค่าน้อยกว่า t Critical two-tail แสดงให้เห็นว่าทั้งสองเทคนิคให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตด้วยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจแคลเลอริเมตรี จึงสามารถใช้ได้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตในเนื้อหุ้ได้อย่างถูกต้องเทียบเท่ากับเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี

สรุปผลการวิจัย

วิธีการที่นำเสนอนี้ใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณฟอสเฟตในตัวอย่างเนื้อหุ้ เป็นครั้งแรกโดยได้ใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อหุ้ที่ผ่านการปรุงแต่งที่พัฒนาขึ้นโดยการย่อยด้วยแสงยูวี ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟต โดยใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะผ่านแอปพลิเคชันวัดค่าสี RGB ที่สามารถดาวน์โหลดได้ฟรี โดยแสดงให้เห็นความสามารถในการทำซ้ำและความยืดหยุ่นที่ดีในการหาปริมาณฟอสเฟต และไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างประสิทธิภาพของเทคนิคดิจิทัลอิมเมจแคลเลอริเมตรี กับวิธีอ้างอิงที่ใช้คือเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี นอกจากนี้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่อัจฉริยะในการวิเคราะห์ปฏิกิริยาการวัดสีด้วยการสร้างของเสียที่น้อย มีความรวดเร็ว มีความแม่นยำ สะดวกในการพกพา และต้นทุนต่ำ ยิ่งไปกว่านั้น วิธีที่นำเสนอนี้ถือได้ว่าเป็นไปตามหลักการของเคมีสีเขียว (Green Analytical Chemistry) และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมโดยพิจารณาจากแนวคิดเชิงวิเคราะห์ Eco-Scale (Gatfuszka et al., 2012)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์



เอกสารอ้างอิง

AOAC. (1995). Official Methods of Analysis of AOAC International, (16th ed.). Washington D.C.

European Parliament and Council Directive No 95/2/EC of 20 February 1995. Food additives other than colors and sweeteners. Retrieved July 16, 2024, from

<https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1995L0002:20060815:EN:PDF>

Gałuszka, A., Migaszewski, Z.M., Konieczka, P., & Namieśnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, 37, 61-72.

Kheamphet P., & Masawat, P. (2022). A simple and cost-effective smartphone-based digital imaging device for the quantification of selected heavy metals in Thai rice. *Analytical Methods*, 14(2), 165-173.

Masawat, P., Panwong, B., & Udnan, Y. (2014). Development of UV digestion unit for natural rubber latex preparation before the determination of phosphorus residue with artificial neural network-digital image-based colorimetry. *Scientific Research and Essays*, 9(2), 2370-2377.

Masawat, P., Yenkom, T., Sitsirata, C., & Thongmee, T. (2022). Smartphone-based digital image colorimetry for determination of iron in cereals and crispy seaweed using Terminalia chebula retz. extract as a natural reagent. *Analytical Methods*, 14, 4321-4329.

Mazzaracchio, V., Sassolini, A., Mitra, K.Y., Mitra, D., Stojanovic, G.M., Willert, A., Sowade, E., Baumann, R.R., Zichner, R., Moscone, D., & Arduini, F. (2022). A fully-printed electrochemical platform for assisted colorimetric detection of phosphate in saliva: Greenness and whiteness quantification by the AGREE and RGB tools. *Green Analytical Chemistry*, 1, 100006.

Puljic, L., Kartalovac, B., Grbavac, J., Grbavac, M.J., Kovacevic, D., Petrovic, J., & Mastanjevic, K. (2019). Chemical composition and microbial safety of pork meat products originating from Herzegovina. *Arhiv veterinarske medicine*, 12(2), 83 – 94.

Sringarm, C., Numthum, S., & Rungchang, S. (2019). Determination of phosphate residues in frozen shrimp product using near infrared spectroscopy. *Agricultural Science Journal*, 50 : 1 (Suppl.), 130-136. (in Thai)



Wongthanyakram, J., Harfield, A., & Masawat, P. (2019). A smart device-based digital image colorimetry for immediate and simultaneous determination of curcumin in turmeric. *Computers and Electronics in Agriculture*, 166, 104981.