

การหาปริมาณสีสังเคราะห์ โดยมอนอลิธ C<sub>18</sub> HPLC  
Determination of synthetic dye by monolithic C<sub>18</sub> HPLC

กฤษณพงศ์ ทองทิพย์ และ สมศักดิ์ ศิริไชย\*

ภาควิชาเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Kritsanapong Tongtip and Somsak Sirichai\*

*Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry,*

*Faculty of Science, Burapha University*

**บทคัดย่อ**

ในการศึกษาวิธีการหาปริมาณสีสังเคราะห์ 3 ชนิด ทาร์ทราซีน อะมาร์เรนทร์ และอินดิโกคาร์มีน ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลต่อ 20 มิลลิโมลาร์แอมโมเนียมอะซีเตต (pH 5.0) อัตราส่วน 15:85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คอลัมน์วิเคราะห์คือมอนอลิธ C<sub>18</sub> (4.6 mm x 100 mm) ซีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 0.01 ถึง 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดในการหาปริมาณอยู่ในช่วง 0.04 ถึง 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นเส้นตรงและกราฟมาตรฐานมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.9986 รัยยะการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 99.27-106.09

**คำสำคัญ :** ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี / ทาร์ทราซีน / อะมาร์เรนทร์ / อินดิโกคาร์มีน

---

\*Corresponding author. E-mail: sirichai@buu.ac.th

## Abstract

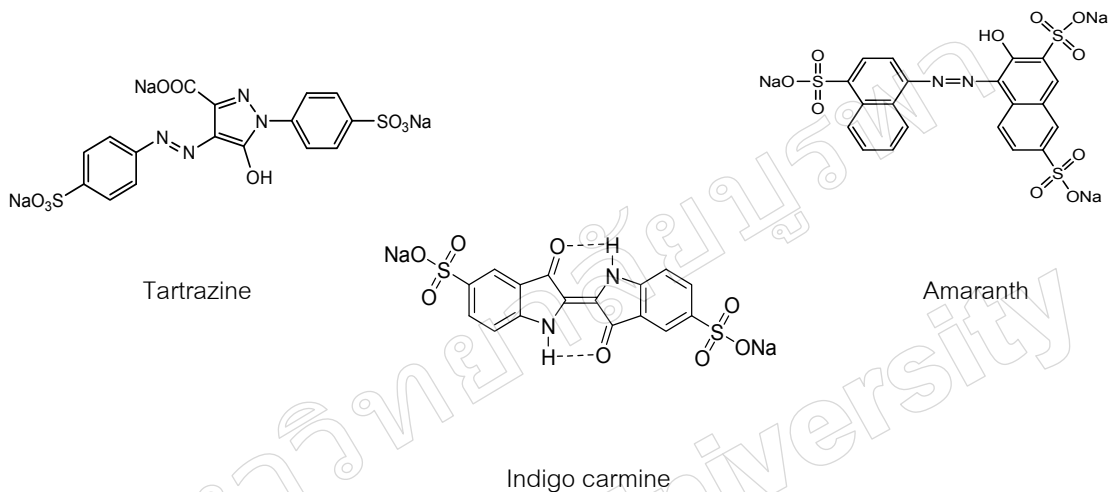
Method for determination of three synthetic dyes: Tartrazine, Amaranth and Indigo carmine by high-performance liquid chromatography was studied. The mobile phase was methanol: 20 mM ammonium acetate (pH 5.0) (15:85 v/v). The analytical column was a monolithic  $C_{18}$  (4.6 mm x 100 mm). The limits of detection (LOD) were in the range of 0.01 to 0.20 mg/L, and limits of quantification (LOQ) were in the range of 0.04 to 0.60 mg/L. The linearity and calibration curves with a correlation coefficient ( $R^2$ ) better than 0.9986 were obtained. Recoveries were in the range of 99.27-106.09 %.

**Keywords :** High-performance liquid chromatography / Tartrazine / Amaranth / Indigo carmine

## 1. บทนำ

สีสังเคราะห์ (Synthetic dyes) ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งใช้แทนสีที่ได้จากธรรมชาติให้สีสันทึบสวยงาม สีเหล่านี้ถูกนำมาใช้ผสมลงในอาหาร และใช้กันอย่างแพร่หลาย หาซื้อได้ง่าย ราคาถูก และมีความคงทนกว่าสีที่ได้จากธรรมชาติ ไม่ทำให้อาหารบูดเน่าง่าย นอกจากประโยชน์เหล่านี้แล้ว ยังต้องคำนึงถึงอันตรายจากสีสังเคราะห์แม้จะเป็นสีสังเคราะห์ที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารได้ แต่หากบริโภคในปริมาณมากหรือบ่อยครั้งจะเกิดอันตรายต่อผู้บริโภค คือ สีจะไปเคลือบเยื่อบุกระเพาะอาหารและลำไส้ ทำให้น้ำย่อยออกมาไม่สะดวก อาหารย่อยยาก เกิดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และขัดขวางการดูดซึมอาหาร ทำให้ท้องเดิน น้ำหนักลด อ่อนเพลีย อาจมีอาการของตับ และไตอักเสบ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งในอนาคตได้ ดังนั้นจึงมีการกำหนดปริมาณของสีสังเคราะห์ในอาหารที่สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัย การหาปริมาณสีสังเคราะห์ที่ผสมลงในผลิตภัณฑ์จึงมีความสำคัญและจำเป็นในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม เช่น อาหาร เครื่องสำอางค์ และยา เพราะต้องมีการควบคุมปริมาณที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ และเพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค ปัจจุบันมีรายงานการวิเคราะห์สีสังเคราะห์ด้วยกันหลายเทคนิค เช่น เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) (Amjad *et al.*, 2013) แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟเรซิส (Capillary Electrophoresis) (Liu *et al.*, 1995) และไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิตโครมาโทกราฟี (High-performance Liquid Chromatography) (Zou *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2008; Yahya 2009; Garcia *et al.*, 2005; Kucharska *et al.*, 2010; Zatar 2007; Kiseleva *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2006;)

งานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สีสังเคราะห์ในตัวอย่างเครื่องดื่ม โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซิลิคิดโคโรมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์มอนอลิธ C18 และตัวตรวจวัดชนิดยูวี-วิสิเบิล ซึ่งสามารถใช้ในการหาปริมาณสีสังเคราะห์ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มต่างๆ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพ โดยตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่ ผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลในเฟสเคลื่อนที่และผลของพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ และศึกษาความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธี (method validation) ในเทอมขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการหาปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ความเป็นเส้นตรง (linearity) และร้อยละการได้กลับคืน (%recovery) โครงสร้างของสารที่ศึกษาแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของ ทราทราซีน (TAR) อะมาร์เรนทร์ (AMA) และอินดิโกคาร์มีน (IND)

## 2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### 1. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

สารเคมีทุกตัวเป็นเกรดวิเคราะห์ ทราทราซีน (tartrazine,  $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ ) อะมาร์เรนทร์ (amaranth,  $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$ ) และอินดิโกคาร์มีน (indigo carmine,  $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$ ) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา เมทานอล (methanol,  $CH_3OH$ ) จากบริษัท OREC ประเทศมาเลเซีย แอมโมเนียมอะซิเตรด (ammonium acetate,  $C_2H_7NO_2$ ) จากบริษัท Ajax Chemical ประเทศออสเตรเลีย น้ำปราศจากไอออนจากเครื่อง Water Purification System รุ่น EASYpure LF ของบริษัท Barnstead ประเทศเยอรมัน เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซิลิคิดโคโรมาโทกราฟีรุ่น 1050 Series ของบริษัท Hewlett Packard ประเทศเยอรมัน ประกอบด้วยปั๊มรุ่น HP 1050 Series เครื่องตรวจวัดชนิด UV-Visible รุ่น HP 1050 Series คอลัมน์วิเคราะห์คือ Monolith C18 (4.6 mm x 100 mm) ของบริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา

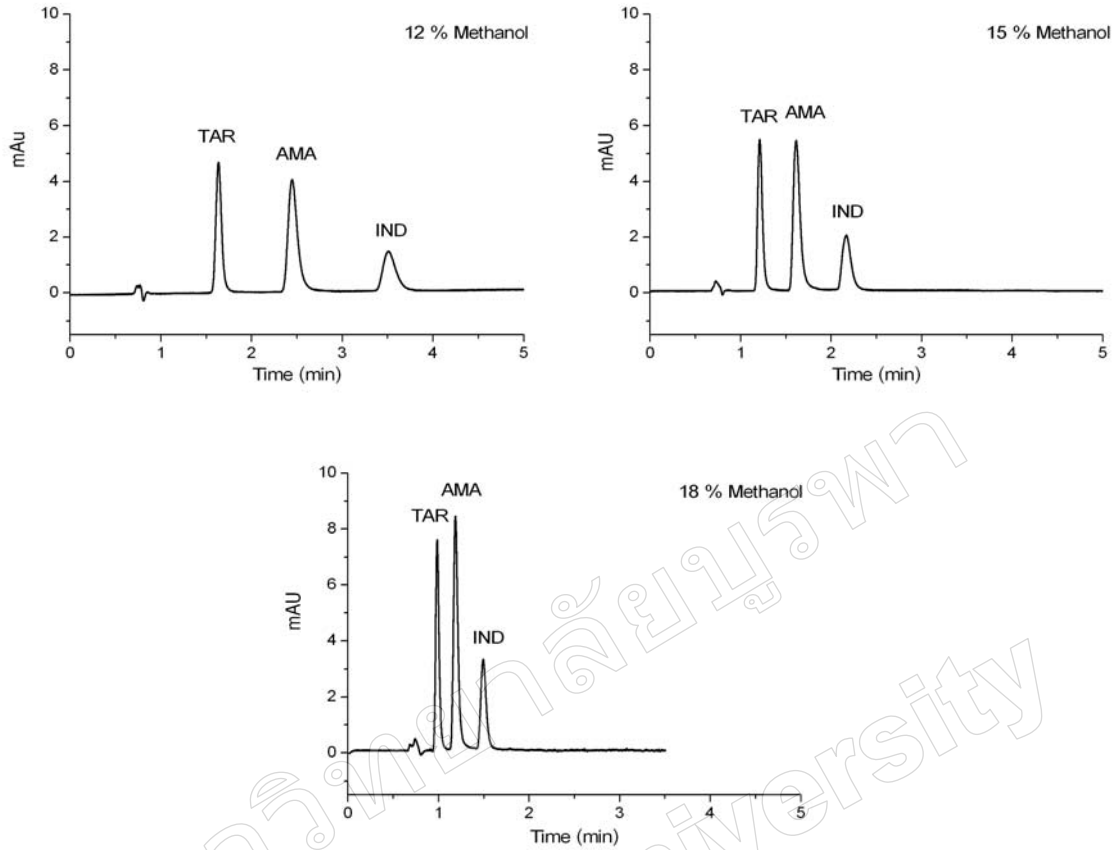
## 2. วิธีการทดลอง

ฉีดสารผสมของทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ทาร์ทราซีน อะมาร์เรนทร์ และอินดิโกคาร์มีน เข้าสู่เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซีลิวิดโครมาโทกราฟี ซึ่งตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลและ 20 มิลลิโมลาร์แอมโมเนียมอะซีเตตที่อัตราไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะที่ศึกษาได้แก่ ผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลในเฟสเคลื่อนที่ ผลของพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ และทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการวิเคราะห์โดยการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัด ขีดจำกัดในการหาปริมาณ ช่วงความเป็นเส้นตรง กราฟมาตรฐาน และความเที่ยงของการวิเคราะห์

## 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

### 1. ผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลในเฟสเคลื่อนที่

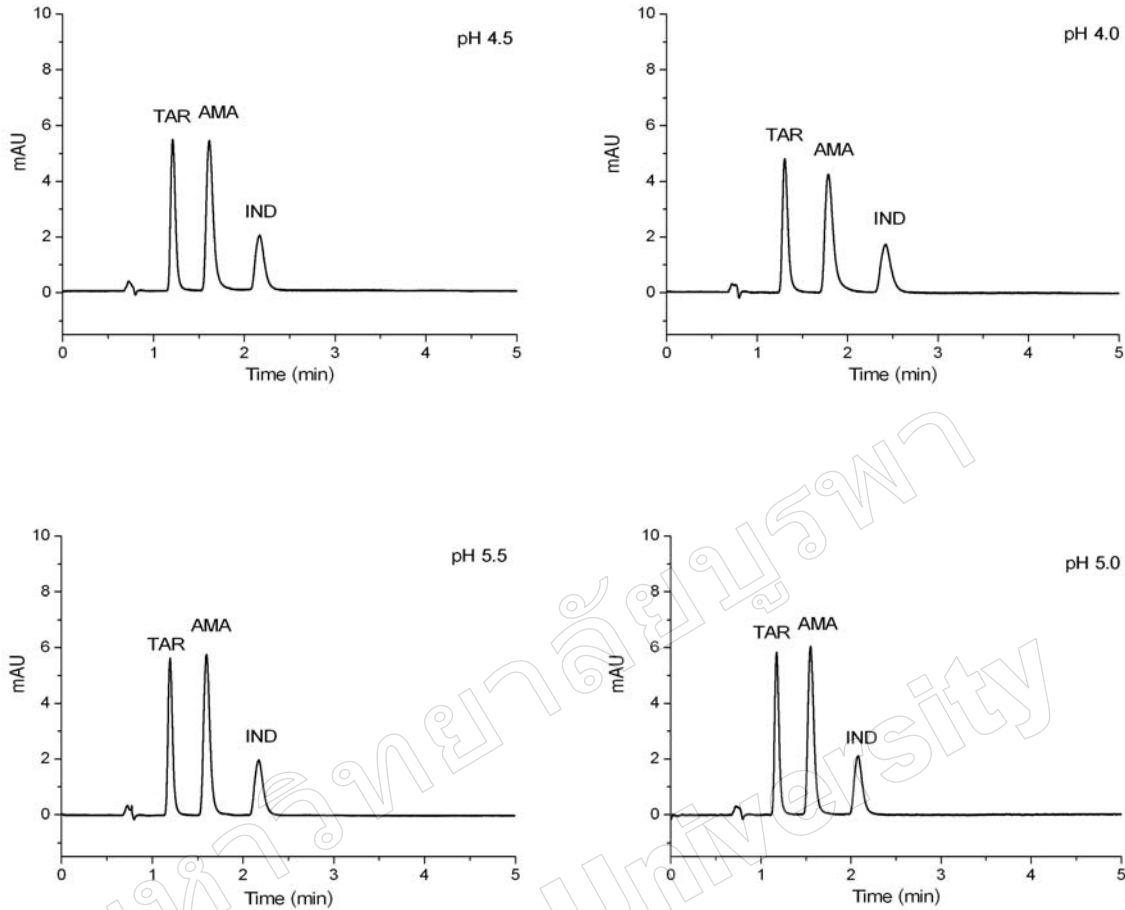
การศึกษาผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลในเฟสเคลื่อนที่ ทำโดยการเตรียมเฟสเคลื่อนที่ที่มีเปอร์เซ็นต์เมทานอล ตั้งแต่ 12 ถึง 18 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 2 ซึ่งจะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์เมทานอลที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อค่าการแยก (resolution) โดยค่าการแยกของสารลดลง และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์เร็วขึ้น เมื่อเปอร์เซ็นต์เมทานอลในเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นสารจึงออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะ การเกิดอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) กล่าวคือ สารมีความสามารถในการละลายกับเฟสเคลื่อนที่มากขึ้น เมื่อมีเปอร์เซ็นต์เมทานอลมากขึ้น สารจึงออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น จึงเลือกที่ 15 เปอร์เซ็นต์เมทานอลเป็นสภาวะที่เหมาะสม



**ภาพที่ 2** ผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของทาร์ทราซีน (TAR) อะมาร์แอนท์ (AMA) และอินดิโกคาร์มีน (IND) เฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอลต่อ 20 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตด (pH 4.5)

## 2. ผลของพีเอชของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดในเฟสเคลื่อนที่

การศึกษาผลของพีเอชของสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์แอมโมเนียมอะซิเตดที่พีเอชต่างๆ (4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5) ผลแสดงดังภาพที่ 3 เห็นได้ว่า พีเอชไม่มีผลต่อเวลาในการวิเคราะห์แต่มีผลต่อสภาพไวของสาร กล่าวคือ เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นสภาพไวของสารเพิ่มขึ้น และสภาพไวคงที่ในช่วงพีเอช 4.5 ถึง 5.5 ดังนั้น จึงเลือกพีเอช 5.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสม



**ภาพที่ 3** ผลของพีเอชของสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตรดในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของทราทราซีน (TAR) อะมารีเรนทร์ (AMA) และอินดิโกคาร์มีน (IND) เฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอลต่อ 20 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมอะซีเตรด อัตราส่วน 15 : 85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

### 3. การทดสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์

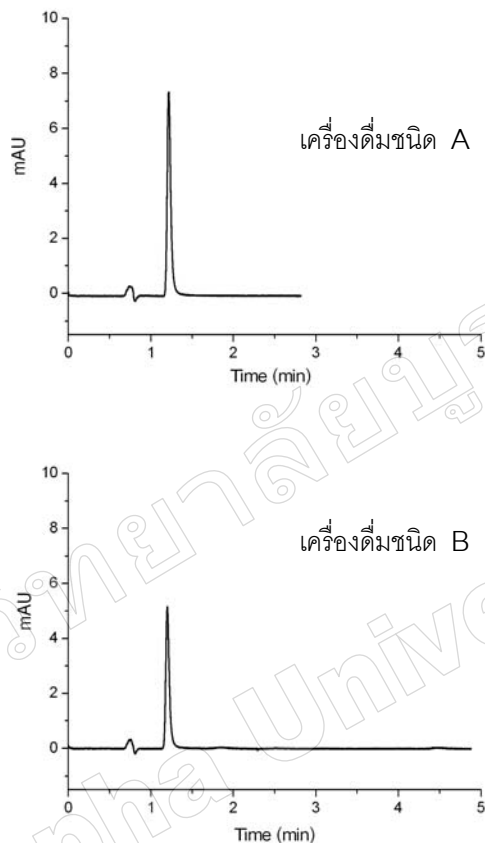
ตัวแปรที่ใช้ทดสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าความเป็นเส้นตรงของความเข้มข้นของสารกับสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) มากกว่า 0.9986 ซึ่งจำกัดของการตรวจวัดที่อัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 3 อยู่ในช่วง 0.01 ถึง 0.20 mg/L และขีดจำกัดในการหาปริมาณที่อัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 10 อยู่ในช่วง 0.04 ถึง 0.60 mg/L โดยการวิเคราะห์สารซ้ำ 5 ครั้ง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของรีเทนชันไทม์และพื้นที่พีคของสารน้อยกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการได้กลับคืนของสารทุกตัวอยู่ในช่วง 99.27 ถึง 106.09 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 1** ผลการทดสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือได้ของวิธีการวิเคราะห์

parameter	Tartrazine	Amaranth	Indigo carmine
Linear calibration curve (mg/L)	0.04 – 2.00	0.25 – 2.00	0.60 – 2.00
Correlation coefficient ( $R^2$ )	0.9986	0.9986	0.9997
Limit of detection (mg/L)	0.01	0.08	0.20
Limit of quantification (mg/L)	0.04	0.25	0.60
<b>ความเที่ยงภายในวัน (intra-day)</b>			
Retention time, RSD(%) (n=5)			
ที่ความเข้มข้น 0.8 mg/L	0.00	0.00	0.00
ที่ความเข้มข้น 1.2 mg/L	0.00	0.00	0.00
ที่ความเข้มข้น 1.8 mg/L	0.00	0.00	0.00
Peak area, RSD(%) (n=5)			
ที่ความเข้มข้น 0.8 mg/L	1.04	1.74	0.63
ที่ความเข้มข้น 1.2 mg/L	0.30	1.70	1.69
ที่ความเข้มข้น 1.8 mg/L	0.70	1.81	1.26
<b>ความเที่ยงระหว่างวัน (inter-day)</b>			
Retention time, RSD(%) (n=5)			
ที่ความเข้มข้น 0.8 mg/L	0.48	0.36	0.61
ที่ความเข้มข้น 1.2 mg/L	0.39	0.36	0.21
ที่ความเข้มข้น 1.8 mg/L	0.39	0.30	0.33
Peak area, RSD(%) (n=5)			
ที่ความเข้มข้น 0.8 mg/L	0.74	2.85	2.14
ที่ความเข้มข้น 1.2 mg/L	1.38	0.84	1.23
ที่ความเข้มข้น 1.8 mg/L	1.11	1.19	1.75
%Recovery			
ที่ความเข้มข้น 0.4 mg/L	103.46 ± 0.54	-	-
ที่ความเข้มข้น 0.8 mg/L	99.27 ± 0.43	-	-
ที่ความเข้มข้น 1.2 mg/L	106.09 ± 0.25	-	-

#### 4. การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองมาวิเคราะห์สารทราซีนในตัวอย่างเครื่องดื่มที่เจือจาง 25 เท่าจำนวน 2 ตัวอย่าง โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มแสดงดังภาพที่ 4



**ภาพที่ 4** โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม 2 ตัวอย่างภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เฟสเคลื่อนที่คือเมทานอลต่อ 20 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมอะซิเตด (pH 5.0) อัตราส่วน 15:85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัด 440 นาโนเมตร

จากการศึกษาวิเคราะห์ตัวอย่างภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ เฟสเคลื่อนที่เมทานอลต่อ 20 มิลลิโมลาร์แอมโมเนียมอะซิเตด (pH 5.0) อัตราส่วน 15:85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่ม 2 ตัวอย่าง แสดงดังภาพที่ 4 จะเห็นว่าพีคของสารสนใจไม่มีสัญญาณรบกวนจากสารอื่น จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มสองชนิดคือ ชนิด A และ ชนิด B พบปริมาณของสารทราซีนเท่ากับ 29.02 mg/L และ 14.04 mg/L ตามลำดับ และไม่พบสัญญาณของสารอะมารีเรนทร์ และสารอินดิโกคาร์มีนในตัวอย่างเครื่องดื่ม



#### 4. สรุปผลการวิจัย

เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซีลิกวิดโครมาโทกราฟีสามารถตรวจวัด ทาร์ทราซีน อะมาร์เจนท์ และอินดิโกคาร์มีนในตัวอย่าง เครื่องดื่มได้พร้อมกัน เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพและปริมาณที่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี อีกทั้งสามารถประยุกต์ใช้ในตัวอย่าง อื่นๆ ได้ เช่น ยา และเครื่องสำอาง เป็นต้น เทคนิคที่นำเสนอนี้ สามารถวิเคราะห์สารโดยใช้เวลาประมาณ 2 นาที ให้สภาพไวสูง การแยกชัดเจน ไม่มีสัญญาณรบกวนจากสารอื่น และไม่จำเป็นต้องมีการเตรียมตัวอย่างนอกจากการเจือจางเท่านั้น เมื่อ เปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ได้รายงานก่อนหน้านี (Alves et al., 2008; Kiseleva et al., 2003; Liu et al., 1995) พบว่าวิธีที่ นำเสนอ สามารถวิเคราะห์สารได้เร็วกว่า 2-14 เท่า

#### 5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

#### 6. เอกสารอ้างอิง

- Alves, P.S., Brum, M.D., Andrade de, B.C., & Netto, P.D.A., (2008). Determination of synthesis dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection. *Food Chemistry*, 107, 489-496.
- Amjad, H.E-S., & Yahya, S.A-D., (2013). Spectrophotometric determination of food dyes in soft drinks by second order multivariate calibration of the absorbance spectra-pH data matrices. *Dyes and Pigments*, 97, 330-339.
- Garcia-Falcon, M.S., & Simal-Gandara J., (2005). Determination of food dyes in soft drinks containing natural pigment by liquid chromatography with minimal clean-up. *Food Chemistry*, 16, 293-297.
- Kiseleva, M.G., Pimenova, V.V., & Eller, K.I., (2003). Optimization of conditions for the HPLC determination of synthetic dyes in food. *Journal of Analytical Chemistry*, 58(7), 766-772.
- Kucharska, M., & Grabka, J., (2010). A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta*, 80, 1045-1051.
- Liu, H., Zhu, T., Zhang, Y., Qi, S., Huang, A., & Sun, Y., (1995). Determination of synthetic colourant food additives by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 718, 448-453.

- Long, C., Mai, Z., Yang, Y., Zhu, B., Xu, X., Lu, L., & Zou, X., (2009). Synthesis and characterization of novel molecularly imprinted polymer for simultaneous extraction and determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in chili product by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 8379-8385.
- Ma, M., Luo, X., Chen, B., Su, S., and Yao, S., (2006). Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1103, 170-176.
- Yahya, S.A-D., (2009). Determination of three dyes in commercial soft drink using HPLC/MS and liquid chromatography. *Food Chemistry*, 117, 485-490.
- Zatar, N.A., (2007). Simultaneous determination of seven synthetic water-soluble food colorants by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Technology*, 3, 220-224.
- Zou, T., He, P., Yasen, A., & Li, Z., (2013). Determination of seven dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors. *Food Chemistry*, 138, 1742-1748.