

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์เบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้งสำเร็จรูป

โดยใช้การสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาค

และตรวจวัดด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี

DETERMINATION OF BENZOATE IN DRY NOODLE USING
AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION AND
SPECTROPHOTOMETRIC METHOD



T117277

ณัฐพงศ์

ดวงกมลเมศ

ธนพล

ภูแก้วแก้ว

สุรภัทร

ปัญญานิลิทธิ

ดุษฎี

เลขทะเบียน 117277

วันเดือนปี 20 ก.ค. 2554

b.....	12332948
i.....	

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม- เครื่องมือวิเคราะห์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**DETERMINATION OF BENZOATE IN DRY NOODLE USING
AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION AND
SPECTROPHOTOMETRIC METHOD**



**A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN INDUSTRIAL CHEMISTRY – ANALYTICAL INSTRUMENTATION
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2010**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การวิเคราะห์เบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้งสำเร็จรูป โดยใช้
การสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคและตรวจวัดด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี

Determination of Benzoate in Dry Noodle using Aqueous Two- Phase
Extraction and Spectrophotometric Method

นักศึกษา นายณัฐพงศ์ ดวงกุ่มเมศ 50050620
 นายชนพล ภู่แกมแก้ว 50050627
 นายสุรภัทร ปัญญาพิสิทธิ์ 50050676

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม – เครื่องมือวิเคราะห์ ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล	
ดร.ณัฐฉา เจริญชัย	
ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การวิเคราะห์เบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้งสำเร็จรูปโดยใช้การสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคและตรวจวัดด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี	
นักศึกษา	นายณัฐพงศ์ ดวงภูมิเมศ	50050620
	นายชนพล ภู่แกมแก้ว	50050627
	นายสุรภัทร ปัญญาพิสิทธิ์	50050676
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม – เครื่องมือวิเคราะห์	
ปีการศึกษา	2553	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ	

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ได้นำระบบการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ประกอบด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) มาประยุกต์ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้งเพื่อสกัดเบนโซเอทแล้วทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี หาค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทโดยใช้ Baseline Technique จากสมการ $Abs_{269.5} - [(Abs_{265.5} + Abs_{275.5})/2]$ ได้กราฟมาตรฐานเบนโซเอทซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 25 – 600 มิลลิกรัมต่อลิตร มีสมการเชิงเส้นคือ $y = 0.00025x - 0.00002$ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(r^2) เท่ากับ 0.99993 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 7.584 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 26.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการวิเคราะห์เบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้ง ให้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 80 – 110 %

คำสำคัญ : การสกัด, ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค, เบนโซเอท, ผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้งสำเร็จรูป, สเปกโทรโฟโตเมทรี

Title	Determination of Benzoate in Dry Noodle using Aqueous Two-Phase Extraction and Spectrophotometric Method		
Student	Nuttapong	Duengpommet	50050620
	Thanaphol	Pookaenkeaw	50050627
	Surapat	Panyapisit	50050676
Degree	Bachelor of Science		
Major Program	Industrial Chemistry – Analytical Instrumentation		
Year	2010		
Thesis Advisor	Dr. Wiboon Praditweangkum		

ABSTRACT

The aim of this special project was to apply the aqueous two-phase system (ATPS) of polyethylene glycol (PEG) and ammonium sulphate salt ((NH₄)₂SO₄) for extraction and spectrophotometric determination of benzoate in dry noodle. The corrected absorbance, $Abs_{269.5} - [(Abs_{265.5} + Abs_{275.5})/2]$, was calculated using baseline technique. The calibration graph of benzoate (as sodium benzoate) was linear in the range of 25 to 600 mg/L. The linear equation was $y = 0.00025x - 0.00002$ and determination coefficient (r^2) was 0.99993. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) for sodium benzoate were 7.58 mg/L and 26.16 mg/L, respectively. The recovery of this method was 80.00 -110.00%.

Keyword: Extraction, Aqueous two-phase system, benzoate, dry noodle, spectrophotometry

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ อาจารย์สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ได้ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาอย่างใกล้ชิดและเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจแก้โครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล และ ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชัน อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการการสอบโครงการพิเศษ และยังให้ความรู้ และคำแนะนำในการนำเสนอผลงาน ตลอดจนตรวจทานข้อบกพร่องจนโครงการพิเศษฉบับนี้ ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณสิริพร มิตรโกสุม ที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับโครงการพิเศษ ที่ให้คำปรึกษา และเสนอแนะแนวทางในด้านการทดลอง และแก้ไขปัญห จนโครงการพิเศษสามารถผ่านและลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณสุภาพร โกกิลารัตน์ และคุณแพรวพรรณ อินโปทา นักศึกษาปริญญาโท ที่ให้การช่วยเหลือ และร่วมเป็นที่ปรึกษาผลงานโครงการพิเศษ และยังให้คำแนะนำในการค้นหาข้อมูลต่าง ๆ ในระหว่างการทำโครงการพิเศษครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณนฤชิต ไพโรจน์ , คุณวาทีณี กิจบุญ , คุณจุฑามาศ โรจน์-สัตตรัตน์ และคุณบรรเจิดศึกษา พูนทอง นักศึกษาปริญญาโท ที่ร่วมเป็นที่ปรึกษาผลงานโครงการพิเศษ และยังให้คำแนะนำ รวมถึงความรู้ในด้านต่างๆ อย่างครบถ้วน ซึ่งช่วยเติมเต็มสิ่งต่างๆ ในหลาย ๆ ด้านที่นักศึกษาไม่มี ในระหว่างการทำงานโครงการพิเศษครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความร่วมมืออำนวยความสะดวก ในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดในการทำโครงการพิเศษนี้

นายณัฐพงศ์	ดวงกุ่มเมศ
นายชนพล	ภู่แกมแก้ว
นายสุรภัทร	ปัญญาพิสิทธิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ผลិតภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว.....	3
2.1.1 ลักษณะของผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวชนิดต่าง ๆ.....	3
2.1.2 วัตถุดิบหลักของผลิตภัณฑ์เส้น.....	4
2.2 กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท.....	4
2.2.1 คุณสมบัติของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท.....	4
2.2.2 ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท.....	5
2.2.3 การใช้กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท.....	6
2.2.4 ความปลอดภัยในการใช้.....	6
2.3 การแยกวัตถุก้นเสียออกจากอาหาร.....	7
2.3.1 วิธีการแยกวัตถุก้นเสียออกจากอาหาร.....	8
2.3.2 หลักของการทดสอบทางเคมีที่ใช้เป็นวิธีตรวจเอกลักษณ์ของกรดเบนโซอิก.....	9
2.3.3 การหาปริมาณวัตถุก้นเสียที่อนุญาตให้ใช้ได้ตามพระราชบัญญัติอาหาร.....	10
2.3.4 การหาปริมาณกรดเบนโซอิก.....	11
2.4 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	12
2.4.1 แผนภาพวัฏภาค.....	16
2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	19
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....25

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....25

3.1.1 สารเคมี.....25

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....25

3.2 วิธีการวิจัย.....25

3.2.1 การเตรียมสารละลาย.....25

3.2.2 การดำเนินการทดลอง26

3.2.2.1. การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์26

3.2.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)27

3.2.2.3 การทดสอบพิสัยและความเป็นเส้นตรง (Range and Linearity)27

3.2.2.4 จีตจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)28

3.2.2.5 จีตจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantification, LOQ).28

3.2.2.6 การเตรียมตัวอย่าง28

3.2.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมเบนโซเอท ในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว.....28

3.2.2.8 ความเที่ยง (Precision)29

3.2.2.9 ความแม่นยำ (Accuracy)30

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....31

4.1 ผลการศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์.....31

4.2 ผลการสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve).....32

4.3 ผลการทดสอบพิสัยและความเป็นเส้นตรง34

4.4 ผลจีตจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)34

4.5 ผลจีตจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantification, LOQ).....35

4.6 ผลความเที่ยง (Precision)36

4.7 ผลความแม่นยำ (Accuracy).....37

4.8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่าง.....39

4.9 การหาปริมาณเบนโซเอทในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัม ในผลิตภัณฑ์ตัวอย่างวุ้นเส้น.....40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา v ะต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	43
5.1 สรุปผลการทดลอง	43
5.2 ข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง.....	45



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การละลายของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท.....	5
2.2 แสดงวิธีการแยกและหาปริมาณวัตถุกันเสียในตัวอย่างอาหาร.....	10
2.3 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	13
2.4 เวลาโดยประมาณสำหรับการแยกวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของระบบต่างกัน.....	22
4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซทความเข้มข้นต่าง ๆ (ครั้งที่ 1)	32
4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทความเข้มข้นต่าง ๆ (ครั้งที่ 2)	32
4.3 แสดงการหา ค่า Limit of Detection	34
4.4 แสดงการหา ค่า Limit of Quantification	35
4.5 แสดงผลความเที่ยงสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารละลายมาตรฐานเบนโซเอท	36
4.7 ผลการคำนวณค่าความแม่นยำของการทดสอบของสารมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท	38
4.8 เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนตามมาตรฐาน AOAC มีเกณฑ์มาตรฐาน	39
4.9 แสดงปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแห้ง	40
4.10 การหาค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการตรวจวัด ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	40
4.11 แสดงการหาค่า LOD และ LOQ ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วุ้นเส้น.....	41
4.12 แสดงปริมาณเบนโซเอทที่ได้จากการคำนวณหาค่า LOD และ LOQ	42

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	สูตร โครงสร้างของกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอท.....5
2.2	แสดงกลไกในการกำจัดความเป็นพิษของกรดเบนโซอิก.....7
2.3	ปฏิกิริยาการทดสอบกรดเบนโซอิกด้วยเฟอร์ริกคลอไรด์.....9
2.4	ปฏิกิริยาการทดสอบกรดเบนโซอิกด้วยวิธีเมอร์เลอร์.....9
2.5	แสดงลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของกรดเบนโซอิก เมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์.....11
2.6	แผนภาพวัฏภาคแบบสามเหลี่ยมด้านเท่าของระบบที่ประกอบด้วย dextran 70-Ficoll 400-น้ำ.....17
2.7	แผนภาพวัฏภาคแบบสามเหลี่ยมมุมฉากของระบบที่ประกอบด้วย dextran 70-Ficoll 400-น้ำ.....17
2.8	แผนภาพวัฏภาคของการผสมพอลิเมอร์ชนิด P และ Q ในน้ำ.....17
2.9	แสดงลักษณะของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบ ของพอลิเมอร์กับเกลือ.....18
2.10	แผนภาพวัฏภาคที่วัฏภาคล่างเป็นพอลิเมอร์ X หรือเกลือ และวัฏภาคบนเป็นพอลิเมอร์ Y.....18
2.11	แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG-(NH ₄) ₂ SO ₄ -น้ำ โดย PEG มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน.....19
2.12	แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG200-เกลือชนิดต่าง ๆ20
2.13	แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG-เด็กซ์แทรน -น้ำ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....21
4.1	แสดงช่วงความยาวคลื่นที่ตรวจพบ โซเดียมเบนโซเอท ที่เกิดขึ้นในการตรวจวัดด้วยเครื่อง UV- VIS Spectrophotometer31
4.2	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทในช่วงความเข้มข้น 25 – 600 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 33
4.3	กราฟมาตรฐานของผลิตภัณฑ์วุ้นเส้น.....41

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้งสำเร็จรูปเป็นอาหารที่ได้รับความนิยมในการบริโภคเป็นอย่างมาก เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการปรุงมีไม่มาก ทำให้ใช้เวลาปรุงไม่นาน วัตถุดิบหลักของการทำก๋วยเตี๋ยวก็คือ เส้น ในกระบวนการผลิตเส้นนั้นจะมีการเติมวัตถุกันเสีย เพื่อให้สามารถเก็บได้นานขึ้น ไม่เสียง่ายก่อนบริโภค ซึ่งกรดเบนโซอิกสามารถละลายน้ำได้น้อยกว่าเกลือเบนโซเอท จึงทำให้โซเดียมเบนโซเอท นิยมนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร [1] การใช้วัตถุกันเสียในอาหารจะมีข้อจำกัดซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของกระทรวงสาธารณสุข ตามข้อกำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 281) พ.ศ.2547 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร ข้อ 6 กรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอท อนุญาตให้ใช้ได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [2] ถ้าได้รับโซเดียมเบนโซเอท 5-10 กรัม เป็นเวลาหลายวัน จะไม่พบความเป็นพิษ ด้วยเหตุผลที่มีความเป็นพิษน้อย ร่างกายสามารถจัดการกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทออกจากร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการรวมตัวกับไกลซีนในตับอยู่ในรูปกรดฮิปีวริก และจะถูกขับออกทางปัสสาวะ [1] จึงทำให้มีการนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารหลากหลายชนิด

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทในอาหาร ตามวิธีมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ปี ค.ศ.1995 ข้อที่ 47.3.03 เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีหลายขั้นตอน และต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมากในการสกัด [3] จึงมีผู้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท เช่น วิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี [4-6] วิธีแก๊สโครมาโทกราฟี [7-11] และวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง [12-16] เป็นต้น

การสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous two-phase systems : ATPS) เป็นเทคนิคการสกัดที่มีประโยชน์ โดยการผสมสารละลายสองชนิดที่มีพอลิเมอร์ต่างชนิดกัน หรือพอลิเมอร์กับเกลือ [17] ข้อดีที่สำคัญของระบบนี้ คือ มีความจุสูง วัฏภาคมีแรงตึงผิวต่ำ เปอร์เซ็นต์การกลับคืนสูง ใช้เวลาน้อย ประหยัด ไม่เป็นพิษ ไม่ไวไฟ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม [18-19] สามารถใช้แยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ และเพิ่มความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ได้ในขั้นตอนเดียว [18] เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดแบบเดิมที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์กับระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค พบว่า ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม เนื่องจากไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic solvents:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

VOCs) ดังนั้นจึงมีแนวโน้มในการนำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมาประยุกต์ใช้งานในการแยกสารชีวเคมี และมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง[20-21] ส่วนใหญ่แล้วระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นและการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ สกัดเอนไซม์ต่างๆ รวมทั้งกรดนิวคลีอิก จุลินทรีย์ เซลล์สัตว์ และเซลล์พืช[21]

โครงการพิเศษนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อวิเคราะห์การนำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของโพลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol : PEG) กับเกลืออนินทรีย์ มาประยุกต์ใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่างสำหรับผลิตภัณฑ์เส้นแบบแห้ง เพื่อสกัดเบนโซเอท และนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. นำระบบการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ประกอบด้วยโพลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) กับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) มาประยุกต์ใช้ในการเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้ง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์เส้นแห้งที่แปรรูปจากข้าว และประยุกต์ใช้วิธีการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคระหว่างโพลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) เพื่อสกัดเบนโซเอท แล้วตรวจวัดด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี

1.4 ขั้นตอนการวิจัย และการดำเนินงาน

1. สืบค้นแหล่งข้อมูลจากแหล่งที่เกี่ยวข้อง
2. วางแผนการทดลองโดยการจัดหาอุปกรณ์ สารเคมี สารตัวอย่าง และเครื่องมือที่ใช้
3. ดำเนินการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้งที่แปรรูปจากข้าว ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค และตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้งสำเร็จรูปที่แปรรูปจากข้าว

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว [22]

ผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปแบบไม่หมัก นั้นมีอยู่ 4 ชนิด ดังนี้ คือ เส้นเล็ก เส้นหมี่ วุ้นเส้น และเส้นบะหมี่สำเร็จรูป

2.1.1 ลักษณะของผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแปรรูป

2.1.1.1 **วุ้นเส้น (แห้งและเปียก)** เป็นก๋วยเตี๋ยวที่มีความแข็งแรงมาก ในช่วงเวลาที่เป็นผลิตภัณฑ์เส้นแห้ง เนื่องจากเส้นนี้ เป็นเส้นบางและแข็ง จึงสามารถทำให้ขาด หรือหักได้ยาก จึงต้องมีการแช่น้ำ หรือ ใช้น้ำเป็นองค์ประกอบในการทำให้เส้นก๋วยเตี๋ยวละลาย และลักษณะที่สำคัญของเส้นนี้คือ จะมีการร่อนน้ำ และมีความเหนียวมากกว่าเส้นอื่นๆ จึงทำให้การทอดล่อนนั้นเป็นไปได้ยาก และต้องใช้ปริมาณของน้ำ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นตัวช่วยในการละลายด้วย สำหรับผลิตภัณฑ์นี้ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการอบแห้ง

2.1.1.2 **ก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็ก** ได้จากการนำแผ่นก๋วยเตี๋ยวสดมาผึ่งลมหรืออบในตู้อบลมร้อน เพื่อลดปริมาณความชื้น ก่อนนำมาตัดเป็นเส้นขนาด 3-4 มิลลิเมตร ก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็กสดมีความชื้นประมาณร้อยละ 35 – 37 เก็บได้นานประมาณ 3 วัน สำหรับก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็กแห้งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแผ่นก๋วยเตี๋ยวที่ผ่านการผึ่งลมและลดความชื้นแล้ว นำมาตัดเป็นเส้นตามขนาดที่ต้องการและทำให้แห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นประมาณร้อยละ 11 – 13 ซึ่งสามารถเก็บได้นานเป็นปีในสภาวะที่เหมาะสม

2.1.1.3 **เส้นหมี่** เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการอัดแป้งข้าวเจ้ากึ่งสุกประมาณร้อยละ 40-50 ของแป้งทั้งหมด และมีความชื้นร้อยละ 35-40 ผ่านหน้าแปลนของเครื่อง Hydraulic press extruder ซึ่งมีรูขนาดเล็ก หนึ่งให้สุกอีกครั้ง ผลิตภัณฑ์จะเป็นเส้นหมี่สดมีความชื้นประมาณร้อยละ 18-33 สำหรับเส้นหมี่แห้ง เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเส้นหมี่สดมาอบแห้งอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ให้มีความชื้นสุดท้ายไม่เกินร้อยละ 12

2.1.1.4 **บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป** เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปจากข้าวในอีกรูปแบบหนึ่ง ที่กรอบและทำสำเร็จรูปออกมา ในรูปแบบของเส้นแข็ง ซึ่งจะสามารถนำมาทำการละลายได้ โดยใช้น้ำ และให้ความร้อน ก็จะเกิดการขยายตัวขึ้น เพื่อที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์เส้นนุ่ม และทำการฉีกขาดได้แต่ผลสุดท้าย ก็จะไม่สามารถตรวจวัดได้ ในภายหลัง เพราะเนื่องจากผลิตภัณฑ์นี้มีสีในการปรุงแต่งเข้าไปในเส้น อาจจะส่งผลกระทบต่อ การตรวจวัดในภายหลังได้

2.1.2 วัตถุดิบหลักของการผลิตผลิตภัณฑ์เส้น [22]

ประกอบด้วย ข้าวสารหักและน้ำ หรือแป้งข้าวเจ้าที่ผ่านการปรับปรุงลักษณะให้เหมาะสมกับการผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยวแห้งสำเร็จรูป และสารเคมีบางชนิดที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ กัน

2.1.2.1 ข้าวสารหัก หรือ ปลายข้าว หรือ ข้าวเจ้า 50 เปอร์เซ็นต์ (ข้าวท่อน) เป็นข้าวสารที่ได้มาจากข้าวเจ้าชนิดที่มีปริมาณอะมิโลส (amylose) สูง ระหว่าง 27 – 33 เปอร์เซ็นต์ ควรเป็นข้าวเก่าที่เก็บไว้เป็นระยะเวลานานอย่างน้อย 4 เดือนและผ่านการขัดสีสูงได้เป็นข้าวขาวพิเศษ ทำให้เส้นก๋วยเตี๋ยวขาวไม่ติดเครื่องนึ่ง เหนียว ไม่อมน้ำ เมื่อนำไปปรุงอาหารและผ่านการทำความสะอาดเพื่อลดสิ่งปนเปื้อน เช่น หิน ดิน ทราย เปลือกข้าว เมล็ดพืช แมลง รังมอด เป็นต้น

2.1.2.2 น้ำ น้ำที่ใช้ในการผลิตควรเป็นน้ำสะอาดเหมาะสมสำหรับบริโภค ปราศจากสารแขวนลอย มีความกระด้างต่ำ มีคลอรีน 0.2 – 0.5 ส่วนในล้านส่วน ความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าระหว่าง 5.0 – 7.0 กรณีเป็นน้ำบาดาลควรสูบขึ้นมาพักไว้เพื่อให้แร่ธาตุต่างๆ ตกตะกอนก่อนนำไปใช้ จากนั้นกรองทรายและผ่านเครื่องกำจัดความกระด้าง ความเป็นกรด-เบสของน้ำและเกลือของแคลเซียม หรือ แมกนีเซียมมีผลต่อความเหนียวของผลิตภัณฑ์ น้ำที่มีเหล็ก และสารแขวนลอยปะปนจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีคล้ำ

2.1.2.3 สารเคมี เช่น การใช้โซเดียมหรือโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์มีจุดมุ่งหมาย เพื่อคงสีของอาหารมากกว่าจัดเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งซัลเฟอร์มีผลต่อสปอร์เชื้อราและแบคทีเรียมากกว่ายีสต์ ดังนั้นการใช้ร่วมกับโซเดียมเบนโซเอตซึ่งมีผลต่อยีสต์ จึงทำหน้าที่เป็นวัตถุกันเสียได้อย่างดี โดยทั่วไปซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะระเหยไปกับไอน้ำถึงร้อยละ 90 สำหรับปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่อนุญาตให้มีได้ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.2 กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต

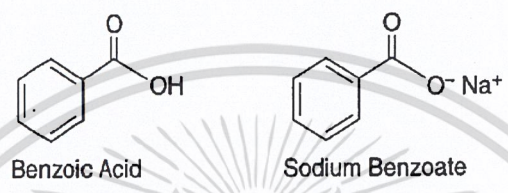
กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอตเป็นวัตถุกันเสียที่ใช้ในการถนอมอาหารมานาน และปัจจุบันก็ยังนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอตที่จำหน่ายในท้องตลาดจะอยู่ในรูปผงผลึกสีขาวหรือเป็นเกล็ด [23] มีสถานะเป็นผลึกของแข็ง และมีกลิ่นฉุน

2.2.1 คุณสมบัติของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต

กรดเบนโซอิก ที่รู้จักในชื่อทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งเป็นชื่อตาม IUPAC และที่นิยมเรียกกันตามชื่อโดยทั่วไป คือ คาร์บอกซีเบนซีน (Carboxybenzene) โดยสูตรโมเลกุลของกรดเบนโซอิก คือ C_6H_5COOH จะมีจุดเดือด 249 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลว 122 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุลของกรดเบนโซอิกคือ 122.2 ความถ่วงจำเพาะ 1.32 [24] กรดเบนโซอิกสามารถละลายได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในแอลกอฮอล์ที่ปราศจากน้ำจึงมีปัญหาเมื่อใช้กับอาหารที่มีน้ำอยู่ในปริมาณสูง การปฏิบัติทั่วไปมักใช้กรดนี้ในความเข้มข้นประมาณ 0.05-0.10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารประกอบอื่น เช่น กรดซอร์บิก และพาราเบนส์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดนี้ในรูปของเอสเทอร์ เช่น Methyl p-hydroxybenzoate สำหรับเกลือเบนโซเอท เช่น โซเดียมเบนโซเอท สูตรโมเลกุล คือ C_6H_5COONa มีน้ำหนักโมเลกุล 144.11 เป็นผลึกสีขาวสามารถละลายได้ดีกว่ากรดเบนโซอิกในอัตรา 63 กรัมต่อน้ำ 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอทที่ใช้เป็นวัตถุกันเสียซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอท [24]

2.2.2 ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท

ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทต่อการขัดขวางการทำงานของจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง โมเลกุลของกรดเบนโซอิกที่เป็นอิสระที่ไม่แตกตัวให้อิออนเท่านั้นที่จะออกฤทธิ์ปฏิกริยายับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งกรดที่ไม่แตกตัวนี้จะซึมผ่านเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้การทำงานของระบบเอนไซม์ผิดปกติไป ไม่สามารถนำเอาสารอาหารไปใช้ในเซลล์ได้ สามารถป้องกันการเจริญเติบโตและการออกของสปอร์ของจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากกรดจะทำให้ความเป็นกรดและด่างของอาหารนั้นไม่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่างๆ [23] กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอทมีช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดอยู่ระหว่าง 2.5-4.0 ซึ่งต่ำกว่ากรดซอร์บิกและกรดโพรพิรอนิก และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์และราได้ดีกว่าเบคทีเรีย [23]

ตารางที่ 2.1 การละลายของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท (กรัมต่อ 100 กรัมตัวทำละลาย)

	กรดเบนโซอิก	โซเดียมเบนโซเอท
น้ำ 25 องศาเซลเซียส	0.33	60.00
น้ำ 50 องศาเซลเซียส	1.00	60.00
น้ำ 160 องศาเซลเซียส	2.50	70.50
ร้อยละ 5 (v/v) เอทานอล 25 องศาเซลเซียส	0.29	56.60

ร้อยละ 20 (v/v) เอทานอล 25 องศาเซลเซียส	1.50	50.00
ร้อยละ 50 (v/v) เอทานอล 25 องศาเซลเซียส	10.00	40.00
ร้อยละ 10 (v/v) เอทานอล 25 องศาเซลเซียส	0.30	50.00
ไขมันและน้ำมัน 25 องศาเซลเซียส	3-4	-
กลีเซอริน 25 องศาเซลเซียส	0.40	-

2.2.3 การใช้กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท

กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทจะมีประสิทธิภาพสูงที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 4.5 ฉะนั้นอาหารที่ควรใช้วัตถุกันเสียนี้เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บนั้นจึงควรเป็นอาหารที่มีความเป็นกรดสูง [23] นิยมใช้กับพวกน้ำผลไม้ ผลไม้สด แยม เยลลี่ พวกผักต่างๆ เช่น หัวหอม ผักดอกตามฤดูกาลใช้กับพวกอาหารโปรตีนสูง พวกผลิตภัณฑ์จากปลา ปู หอย ไข่ ตามข้อกำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 281) พ.ศ.2547 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร ข้อ 6 กำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร ต้องใช้ตามชนิดวัตถุเจือปนอาหาร ชนิดของอาหาร และปริมาณสูงสุดของที่ใช้ได้ ซึ่งกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอทอนุญาตให้ใช้ได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [2] ซึ่งปริมาณการใช้กรดเบนโซอิกในผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยว ตามมาตรฐานทั่วไปสำหรับการใช้วัตถุเจือปนอาหารของโคเด็กซ์ (Codex General Standard for food additives) กำหนดการใช้กรดเบนโซอิกไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

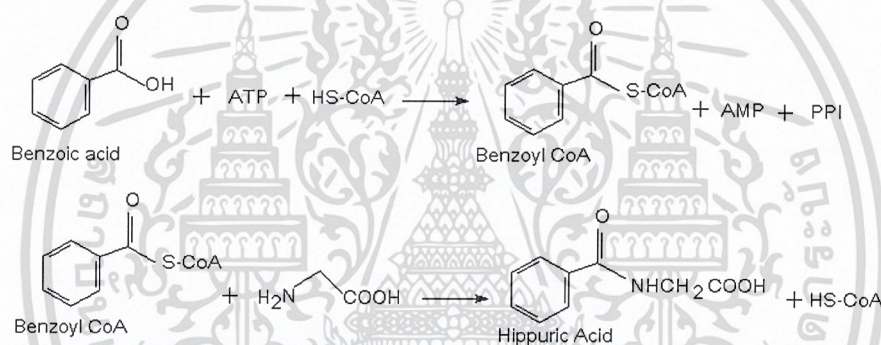
การใช้เกลือเบนโซเอทร่วมกับเกลือแกง (Sodium chloride) พบว่า ช่วยเสริมฤทธิ์กัน ปริมาณการใช้เกลือเบนโซเอทกับสารละลายที่มีความเป็นกรด-ด่าง 2.3-3.4 จะใช้เพียงร้อยละ 0.02-0.03 ก็ป้องกันการเสียจากการหมักที่เกิดจากยีสต์ได้ แต่ถ้าเป็นอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่าง 3.5-4.0 ควรใช้ที่ปริมาณสูงขึ้นไปร้อยละ 0.06-0.10 เช่น ในน้ำผลไม้ แต่สิ่งที่ควรระวัง คือ ถ้าใส่โซเดียมเบนโซเอท ในปริมาณร้อยละ 0.1 จะทำให้กลิ่นรสของน้ำผลไม้เปลี่ยนไป [25]

2.2.4 ความปลอดภัยในการใช้

ความเป็นพิษของกรดเบนโซอิกจัดอยู่ในประเภทปานกลางขนาดที่เกิดอาหารเป็นพิษประมาณ 6 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม อาการเป็นพิษได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และท้องเสีย ถ้าใช้ในปริมาณที่ถูกต้องจะไม่ก่อความเป็นพิษและไม่สะสมในร่างกาย [25] โดยพบว่ากรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทมีความปลอดภัย ซึ่ง United States Food and Drug Administration (U.S.FDA) ได้อนุญาตให้ใช้เป็นสารถนอมอาหาร และโซเดียมเบนโซเอทได้รับการรับรองจาก Good Agricultural Practice (GAP) ว่าเป็นสารถนอมอาหารที่ใช้ได้สูงสุด 0.1 เปอร์เซ็นต์ แต่ในปัจจุบันให้ใช้ได้มากถึง 0.15-0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเป็นพิษ Food and Agriculture Organization (FAO) และ World Health Organization (WHO) ได้เสนอว่า โซเดียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบนโซเอท มีความเป็นพิษในคนและสัตว์น้อยมาก พบว่าถ้าฉีดเข้าใต้ผิวหนัง 6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว จะมีพิษ แต่ถ้ากินโซเดียมเบนโซเอท 5-10 กรัม เป็นเวลาหลายวัน ไม่พบความเป็นพิษ [24] เนื่องจากการศึกษาทดลองพบว่า ร่างกายมีกลไกในการกำจัดความเป็นพิษ โดยกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทที่บริโภคเข้าไปจะไปรวมตัวกับโคเอนไซม์เอ (Coenzyme A) เกิดเป็นเบนโซอิลโคเอนไซม์เอ จะรวมกับไกลซีน (Glycine) เกิดเป็นกรดฮิปปูริก (Hippuric acid) โดยมีเอนไซม์เอซิลทรานสเฟอเรส (Acyltransferase) เป็นตัวเร่งและถูกขับออกทางปัสสาวะ และส่วนที่เหลือที่มีได้ถูกร่างกายขับออกในรูปกรดฮิปปูริกนั้น จะถูกขับออกจากร่างกาย โดยการรวมตัวกับกรดไกลคิวโรนิก (Glycuronic acid) แล้วขับออกทางปัสสาวะในรูปของกรดเบนโซอิลไกลคิวโรนิก (Benzoyl Glycuronic Acid) โดยทั่วไปการขับถ่ายของกรดฮิปปูริกทางปัสสาวะ ในคนจะประมาณ 1.0-2.5 กรัมต่อวัน ซึ่งจะเท่ากับกรดเบนโซอิกที่บริโภคเข้าไป 0.7-1.0 กรัม สำหรับความสามารถในการจัดการกรดเบนโซอิกนั้น จะแปรผันตามชนิดของสัตว์ด้วย [23]



รูปที่ 2.2 แสดงกลไกในการกำจัดความเป็นพิษของกรดเบนโซอิก [24]

2.3 การแยกวัตถุกันเสียออกจากอาหาร [26,27]

วัตถุกันเสียที่ใช้กันส่วนมากมีคุณสมบัติเป็นกรด เมื่อนำมาใช้มักอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมหรือโพแทสเซียม จุดประสงค์ก็เพื่อให้ละลายน้ำได้ดีและผสมเข้ากับอาหารได้ทุกส่วน วัตถุกันเสียเหล่านี้เมื่ออยู่ในอาหารอาจอยู่ได้ในหลายลักษณะ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่างของอาหารนั้นๆ คือ

1. อยู่ในรูปเกลือซึ่งรวมกับองค์ประกอบอาหาร (Salt form bound with food)
2. อยู่ในรูปของกรดอิสระที่แตกตัวและไม่ได้รวมกับองค์ประกอบของอาหาร (Dissociate acid, unbound form)
3. อยู่ในรูปของกรดอิสระซึ่งไม่แตกตัวและไม่ได้รวมกับองค์ประกอบของอาหาร (Undissociate acid, unbound form)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น การสกัดและการทำให้วัตถุดิบเสียที่ได้มีความบริสุทธิ์ (Extraction and Clean-Up method) เราจึงต้องคำนึงถึง ลักษณะของอาหาร และคุณสมบัติของวัตถุดิบเสียที่จะตรวจหา

2.3.1 วิธีการการแยกวัตถุดิบเสียออกจากอาหาร [26,27]

สามารถทำได้โดยใช้วิธีใดวิธีหนึ่ง หรือหลายวิธีร่วมกัน ดังนี้

2.3.1.1 วิธีการละลาย (Solubilizing method)

1. ถ้าวัตถุดิบเสียที่จะตรวจหาละลายน้ำได้ง่าย ให้นำตัวอย่างอาหารมาผสมหรือปั่นกับน้ำ อาจใช้ความร้อน อุณหภูมิไม่สูงมากช่วยในการสกัดด้วย ตัวอย่างเช่น การสกัด ในไตรท์ และ โนเทรต ออกจากอาหารประเภทเนื้อสัตว์

2. ถ้าวัตถุดิบเสียละลายน้ำได้ดี แต่มีคุณสมบัติในการรวมตัวกับอาหารได้ดีเช่นกัน เราต้องพยายามสกัดวัตถุดิบเสียออกจากตัวอย่างให้หมด โดยนำตัวอย่างมาแยกกับต่าง ตัวอย่างเช่น การแยกซัลเฟอร์ไดออกไซด์ หรือ ซัลไฟต์ ออกจากอาหารที่มีแอลกอฮอล์หรือน้ำตาลผสมอยู่ด้วย

3. สำหรับวัตถุดิบเสียอินทรีย์ มักอยู่ในรูปเกลือของกรดอินทรีย์ เพื่อให้ผสมกับองค์ประกอบของอาหารได้ดี ดังนั้น จึงแยกออกได้โดยทำให้อาหารเป็นกรดได้วัตถุดิบเสียรูปอิสระ ซึ่งละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เราจึงสกัดแยกออกมาได้ (Solvent extraction) วิธีนี้ใช้กับอาหารที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อนและมักใช้ร่วมกับวิธีการเติมเกลือ (Salting out method) ตัวอย่างเช่น การสกัดกรดเบนโซอิก หรือ พาราบิน ออกจากตัวอย่าง แยม เยลลี่ น้ำผลไม้ ผลไม้กวาน ซอซชนิดข้น (Catsup) ซึ่งได้ผ่านวิธีการเติมเกลือมาแล้ว

2.3.1.2. วิธีการเติมเกลือ (Salting out method)

หลักของวิธีนี้ คือ ใช้สารละลายอิมตัวของอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) ไปแย่งที่การละลายของสารอาหารประเภทที่เป็นสารประกอบที่ไม่เป็นอิเล็กโทรไลต์ (Non-electrolyte compound) ให้ตกตะกอนลงมา อิเล็กโทรไลต์ที่นิยมใช้ คือ โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ เพราะสารทั้งสองชนิดนี้ละลายน้ำได้ดีมาก วิธีนี้มักใช้กับอาหารประเภทที่มีแป้ง น้ำตาล เซลลูโลส เป็นองค์ประกอบ

2.3.1.3. วิธีการกลั่น (Distillation method)

วิธีนี้ใช้กับวัตถุดิบเสียที่สามารถทำให้ระเหยออกจากกันได้ง่าย เมื่อทำการทดลองให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม และใช้กับตัวอย่างอาหารที่ใช้วิธีอื่นแยกได้ไม่ดี ตัวอย่างเช่น การแยกกรดเบนโซอิกออกจากตัวอย่างที่มีลักษณะข้นเหนียว (Viscous food) การแยกกรดซอร์บิกออกจากอาหารประเภทแป้ง การแยกซัลเฟอร์ไดออกไซด์ออกจากอาหารทุกประเภทที่ใช้วัตถุดิบเสียชนิดนี้ ยกเว้น ประเภทที่มีแอลกอฮอล์ผสมอยู่ด้วย การแยกกรดโพธิ์อนิกออกจากขนมปัง

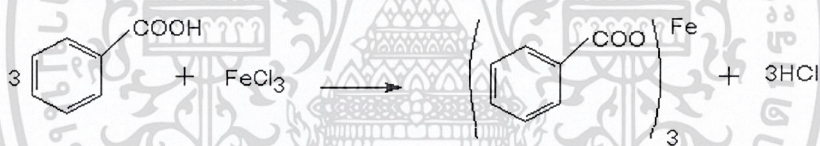
2.3.1.4. วิธีการเติมสารเคมี (Using clarifying agents)

วิธีนี้ใช้สารเคมีบางตัวแยกสารอาหารที่ละลายน้ำได้ เช่น โปรตีน หรือ น้ำตาล ให้ตกตะกอนออกมา ใช้กับวัตถุดิบเสียชนิดละลายน้ำ สารเคมีที่นิยมใช้ เช่น สารละลายอิ่มตัว เมอร์คิวริกคลอไรด์ (Saturated mercuric chloride) ซิงค์เฟอร์โรไซยานเนต อะลูมินา บอร์แรกซ์ โซเดียมทังสเตต (Sodium tungstate) กรดฟอสโฟทังสติก (Phosphotungstic acid) เลดอะซิเตต (ในรูปของ Basic and neutral solution) ซาโคล (Activated and animal charcoal) ตัวอย่างเช่น การตกตะกอนโปรตีนในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ด้วยสารละลายอิ่มตัวเมอร์คิวริกคลอไรด์

2.3.2 หลักของการทดสอบทางเคมีที่ใช้เป็นวิธีตรวจเอกลักษณ์ของกรดเบนโซอิก

2.3.2.1. การทดสอบด้วยเฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride test)

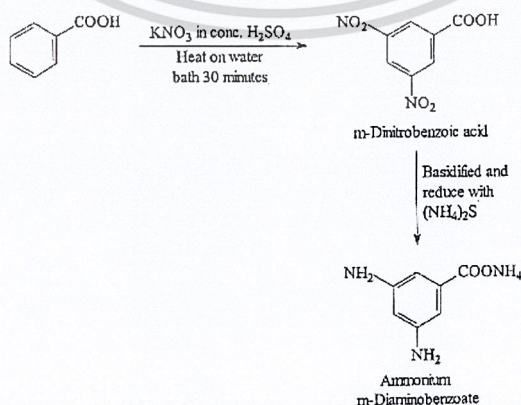
เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) ทำปฏิกิริยากับสารประกอบต่อไปนี้ ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีต่างๆ กัน (Various color complexes) คือ ฟีนอล อินอล กรดไฮโดรซามิก ออกซิม กรดไฮดรอกซี สารประกอบอินอลไลเซชัน สำหรับกรดเบนโซอิกทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริกคลอไรด์ ได้เป็นเกลือเฟอร์ริกเบนโซเอท ซึ่งเป็นตะกอนสีเนื้อ ความไวของวิธีทดสอบนี้ต่ำ ต้องใช้กรดเบนโซอิกปริมาณพอสมควร จึงจะเห็นผลชัดเจน



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการทดสอบกรดเบนโซอิกด้วยเฟอร์ริกคลอไรด์ [26]

2.3.2.2 การทดสอบด้วยวิธีเมอร์เลอร์ (Modified Mohler's test)

อาศัยหลักการทำไนเตรชัน (Nitration) ของ อะโรมาติกกรดคาร์บอกซิลิก และรีดิวซ์หมู่ไนโตรที่ได้และต่อให้เป็นสารประกอบอะมิโนได้สารประกอบตัวใหม่ ซึ่งมีสี



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการทดสอบกรดเบนโซอิกด้วยวิธีเมอร์เลอร์ [26]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3. การหาปริมาณวัตถุกันเสียที่อนุญาตให้ใช้ได้ตามพระราชบัญญัติอาหาร (Determination of permitted food Preservatives) [26]

วิธีการแยกและหาปริมาณวัตถุกันเสียในตัวอย่างอาหาร (Isolation and determination method of permitted food preservatives) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงวิธีการแยกและหาปริมาณวัตถุกันเสียในตัวอย่างอาหาร [26]

วัตถุกันเสีย	วิธีการแยกวัตถุกันเสียออกจากตัวอย่างอาหาร	วิธีหาปริมาณ
กรดเบนโซอิก	1. วิธีการเติมเกลือ และวิธีการละลาย แล้วทำการสกัดด้วยทำละลาย 2. วิธีการกลั่น (ใช้กับอาหารที่ขึ้นเหนียว)	1. วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultraviolet absorption method) 2. วิธีการไทเทรตกรด-เบส (Acid-Base titration)
เมทิล และโพพิลพาราบิน	วิธีการเติมเกลือ และวิธีการละลาย แล้วทำการสกัดด้วยทำละลาย	วิธีการทำให้เกิดสี (Colorimetric method) โดยทำให้เกิดสารประกอบที่มีสีด้วย Millon's reagent
กรดซอร์บิก	1. วิธีการเติมเกลือ และวิธีการละลาย และทำการสกัดด้วยทำละลาย (ใช้กับตัวอย่างทั่วไป) 2. วิธีการกลั่น (ใช้กับไวน์)	1. วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultraviolet absorption method) 2. วิธีออกซิเดชัน (Oxidation method) โดยทำให้เกิดสารประกอบที่มีสีด้วยสารละลาย Thiobabituric acid
กรดโพรพิโอนิก	วิธีการกลั่น	วิธีแก๊สลิควิดโครมาโทกราฟี (Gas-liquid chromatography)
ไนไตรท์	วิธีการละลาย	วิธีการทำให้เกิดสี (Colorimetric method) ด้วย 1. Azo dye formation 2. Xylenol method
ไนเตรต	วิธีการละลาย	เหมือนกับการหาปริมาณ ไนไตรท์
ซัลเฟอร์ไดออกไซด์	1. วิธีการกลั่น	ปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox reaction)

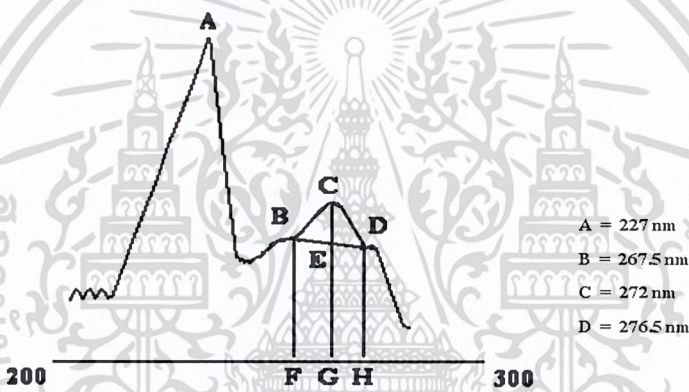
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุกัมเสีย	วิธีการแยกวัตถุกัมเสียออกจากตัวอย่างอาหาร	วิธีหาปริมาณ
	2. วิธีการละลาย (ใช้กับน้ำผลไม้หรือไวน์)	ด้วยไอโอดีน หรือสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (ในรูปของซัลไฟต์)	วิธีการละลาย (ใช้กับผลิตภัณฑ์ที่เป็นเนื้อสัตว์)	วิธีทางโพลารोगราฟิ (Differential pulse polarographic method)

2.3.4 การหาปริมาณกรดเบนโซอิก

2.3.4.1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultraviolet absorption method)

กรดเบนโซอิก มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่มีลักษณะเฉพาะตัวเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ของกรดเบนโซอิก เมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์

การหาปริมาณสารโดยวัดปริมาณการดูดกลืนแสงเรานิยมวัดค่าที่ให้ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{MAX}) กรณีของกรดเบนโซอิกความยาวคลื่นนั้นคือ 227 นาโนเมตร ซึ่งก็มีผู้ที่เลือกใช้ความยาวคลื่นนี้ แต่ไม่นิยม เท่ากับการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 267.5 (B), 272 (C), 276.5 (D) นาโนเมตร แล้วหาปริมาณการดูดกลืนแสง CE (ดังรูป) โดยอาศัย Baseline technique คือ

$$CE = CG - \left(\frac{BF + DH}{2} \right) \tag{2.1}$$

เมื่อ CE = ค่าการดูดกลืนแสง
CG = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BF = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 267.5 นาโนเมตร
DH = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร

นำค่า CE ที่ได้ไปเทียบกับปริมาณการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดเบนโซอิกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนจากกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

สาเหตุที่ไม่นิยมใช้ความยาวคลื่น 227 นาโนเมตร เพราะที่ความยาวคลื่นจุดนี้ค่าปริมาณการดูดกลืนแสงที่ได้อาจไม่ถูกต้องนัก เนื่องจาก

1. ที่ความยาวคลื่น 227 นาโนเมตร ใกล้กับความยาวคลื่นช่วง Far UV ซึ่งอาจเกิด stray radiation ได้ง่ายจากความชื้น ออกซิเจน ไนโตรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ ทำให้ค่าปริมาณการดูดกลืนแสงที่ได้ผิดไป
2. ตัวทำละลายที่ใช้มีค่า Cut-Off Point อยู่ที่ความยาวคลื่นต่ำกว่านี้ หรือที่ความยาวคลื่นบริเวณนี้ ในกรณีที่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเกรดสเปกโตร (Spectro grade) หรือ เกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) และถ้าใช้ตัวทำละลายที่มีเกรดต่ำกว่านี้ อาจมีสิ่งเจือปนอื่นที่ทำให้การดูดกลืนแสงในช่วงนี้ได้เช่นกัน เมื่อรวมกับค่าปริมาณการดูดกลืนแสงของกรดเบนโซอิกที่สูงมาก ทำให้เราไม่สามารถวัดปริมาณการดูดกลืนแสงทั้งหมดที่จุดนี้ได้เลย

สำหรับตัวอย่างอาหารที่ใช้วิธีนี้วิเคราะห์ ได้แก่ ซอสชนิดข้น ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ แยม เยลลี่ เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ น้ำผลไม้ โดยการแยกกรดเบนโซอิกออกจากตัวอย่างวิธีการเดิมเกลือ และวิธีการละลาย และทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย

2.3.4.2 วิธีการไทเทรตกรด-เบส (Acid-Base titration method)

อาศัยคุณสมบัติในการเป็นกรดของกรดเบนโซอิก ($pK_a = 4.2$) ซึ่งมีความแรงมากพอ นำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอล์ฟทาไลน์เป็นอินดิเคเตอร์ และเนื่องจากกรดเบนโซอิกละลายน้ำได้ไม่ดี จึงทำการไทเทรตในตัวทำละลายผสมระหว่างแอลกอฮอล์กับน้ำ (Aqueous alcoholic solvent) และทำการทดลองเพื่อยืนยันอีกครั้ง โดยนำตัวอย่างที่แยกได้บริสุทธิ์แล้ว (ด้วยวิธีเดียวกับการไทเทรตกรด-เบส) ไปทำการระเหิด(sublimation) ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง และชั่งน้ำหนักของสารที่ได้เทียบกับผลการไทเทรต ถ้านำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้กับตัวอย่างอาหารที่มีลักษณะข้นเหนียว จำเป็นต้องแยกกรดเบนโซอิกออกโดยใช้วิธีการกลั่นโดยกลั่นกับกรดฟอสฟอริก

2.4 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous two-phase systems, ATPS) [28-29]

การแยกสารออกจากของผสมเนื้อเดียวกันอาจมีข้อจำกัดจากคุณสมบัติทางเคมี การสร้างวัฏภาคที่สองซึ่งไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกับวัฏภาคแรกจะสามารถแยกสารออกมาได้ เนื่องจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบของสารในระบบมีค่าสัมประสิทธิ์ในการกระจาย (distribution coefficient) ระหว่าง ภูมิภาคทั้งสองต่างกัน การสกัดด้วยของเหลวจึงใช้แยกสารละลายที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันได้ โดยการเติมตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งไม่ผสมกันหรือแยกออกจากสารละลายชนิดแรกได้ และเกิดการกระจายขององค์ประกอบของของผสมระหว่างภูมิภาคทั้งสอง

ระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาค (ATPS) เป็นระบบหนึ่งของการสกัดของเหลวด้วยของเหลว ซึ่งเป็นที่รู้จักมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1896 มี 2 ระบบ คือ ระบบที่เป็นพอลิเมอร์ 2 ชนิด และระบบที่เป็นพอลิเมอร์กับเกลือ โดยน้ำเป็นตัวทำละลายในทั้งสองภูมิภาค ดังนั้นจึงได้สารละลายน้ำสองภูมิภาคที่แยกชั้นกันอยู่ เนื่องจากความแตกต่างกันทางกายภาพและเคมีของภูมิภาค โดยภูมิภาคหนึ่งจะประกอบด้วยพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งอยู่มาก ส่วนพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลือจะประกอบอยู่มากในภูมิภาคที่สอง จากความแตกต่างกันทางกายภาพและเคมีของภูมิภาคทำให้สามารถแยกตัวถูกละลายเป้าหมายออกจากสารละลายได้ เนื่องจากตัวถูกละลายแต่ละชนิดจะสามารถกระจายและละลายในแต่ละภูมิภาคได้แตกต่างกัน

ระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาคนี้สามารถจำแนกชนิดของระบบได้ตามลักษณะของสารที่ทำให้เกิดการแยกภูมิภาค ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาค (Aqueous two-phase systems, ATPS)

1. Nonionic polymer (P) – Nonionic polymer (Q) – Water	
Nonionic polymer (P)	Nonionic polymer (Q)
Polypropylene glycol	Methoxypolyethylene glycol Polyethylene glycol Polyvinyl alcohol Hydroxypropyl dextran Dextran
Polyethylene glycol	Polyvinyl alcohol Polyvinylpyrrolidone Dextran Arabinogalactan Hydroxypropyl starch Ficoll
Polyvinyl alcohol	Methylcellulose Hydroxypropyl dextran Dextran

Polyvinylpyrrolidone	Methylcellulose Maltodextrin Dextran
Methylcellulose	Hydroxypropyldextran Dextran
Ethylhydroxyethylcellulose	Dextran
Hydroxypropyldextran	Dextran
Ficoll	Dextran
2. Polyelectrolyte (P) – Nonionic polymer (Q) – Water	
Polyelectrolyte (P)	Nonionic polymer (Q)
Sodium dextran sulphate	Polypropylene glycol Methoxypolyethylene glycol NaCl Polyethylene glycol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl Ethylhydroxyethylcellulose NaCl Hydroxypropyldextran NaCl Dextran NaCl
DEAE dextran-hydrochloric acid	Polypropylene glycol NaCl Polyethylene glycol Li ₂ SO ₄ Polyvinyl alcohol Methylcellulose
Casein	Dextran Pectin Ficoll Amylopectin
Sodium carboxymethyldextran	Methoxypolyethylene glycol NaCl Polyethylene glycol NaCl Polyvinyl alcohol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	Ethylhydroxyethylcellulose NaCl Hydroxypropyl dextran NaCl
Sodium carboxymethylcellulose	Polypropylene glycol NaCl Methoxypolyethylene glycol NaCl Polyethylene glycol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl
3. Polyelectrolyte (P) – Polyelectrolyte (Q) – Water	
Polyelectrolyte (P)	Polyelectrolyte (Q)
Sodium dextran sulphate	Sodium carboxymethyldextran DEAE dextran-hydrochloric acid NaCl Sodium carboxymethylcellulose
Sodium carboxymethyldextran	Sodium carboxymethylcellulose
Casein	Sodium alginate, 0.1 M NaOH Sodium carboxymethylcellulose, 0.1 M NaOH
Ovalbumin (pH 6.6)	Soybean globulins Ovalbumin thermotropic aggregates Casein
4. Polymer (P) – Low molecular weight component (Q) – Water	
Polymer (P)	Low molecular weight component (Q)
Polypropylene glycol	Potassium phosphate Glycerol Glucose
Methoxypolyethylene glycol	Potassium phosphate
Polyethylene glycol	Inorganic salts, e.g., $K^+(Na^+, Li^+ (NH_4)^+)$, etc.) PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , etc. Glucose, maltose, cellobiose, iso-maltose, maltotriose, iso-maltotriose, β -cyclodextrin
Polyvinylpyrrolidone	Butylcellosolve Potassium phosphate
Polyvinyl alcohol	Butylcellosolve

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

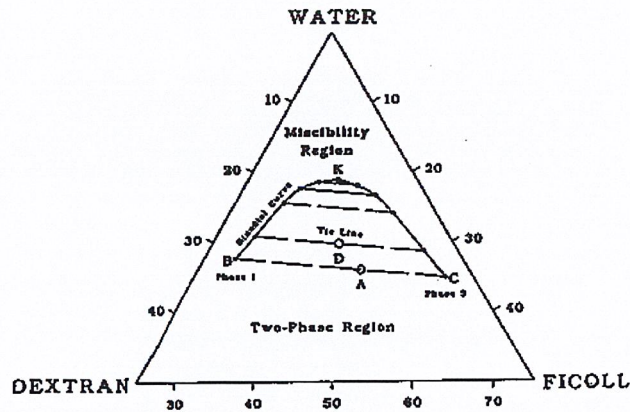
Polymer (P)	Low molecular weight component (Q)
Dextran	Butylcellosolve Propyl alcohol, Iso-propyl alcohol
Sodium dextran sulphate	Sodium chloride (0°C)

2.4.1 แผนภาพวัฏภาค (Phase diagram)

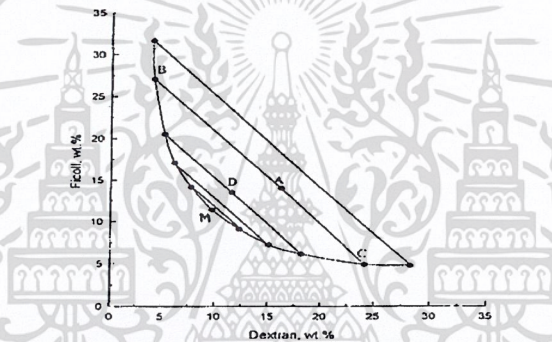
องค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค แสดงได้ในแผนภาพวัฏภาค การเขียนแผนภาพวัฏภาค สามารถเขียนได้ 2 ลักษณะ คือ เขียนแบบสามเหลี่ยมด้านเท่า และเขียนแบบสามเหลี่ยมมุมฉาก การเขียนแผนภาพวัฏภาคแบบสามเหลี่ยมด้านเท่า (รูปที่ 2.6) เมื่อจุดปลายของสามเหลี่ยมในแผนภาพวัฏภาคนั้น คือ พอลิเมอร์ทั้งสองชนิด (Ficoll และเด็กซ์แทรน) และตัวทำละลาย (น้ำ) จุดต่างๆ ที่อยู่ภายในพื้นที่สามเหลี่ยมจะแสดงถึงของผสม 3 องค์ประกอบ ซึ่งผลบวกขององค์ประกอบในแต่ละจุดที่แสดงในแผนภาพวัฏภาคนี้จะมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์เสมอ โดยทั่วไปแล้วองค์ประกอบดังกล่าวจะแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

การเขียนแผนภาพวัฏภาคในลักษณะที่เป็นแกนมุมฉาก (รูปที่ 2.7) จะนิยมใช้มากกว่าแบบแรก โดยแกน y (แนวตั้ง) จะแสดงเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์ที่มีมากในวัฏภาคบน ส่วนแกน x (แนวนอน) แสดงเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลือที่มีมากในวัฏภาคล่าง ดังนั้นทุกจุดบนแผนภาพวัฏภาคจะมีค่าโดยน้ำหนักเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์เสมอ แผนภาพวัฏภาครูปแกนมุมฉาก จะไม่แสดงความเข้มข้นของตัวทำละลายน้ำ ซึ่งแตกต่างจากแผนภาพวัฏภาครูปสามเหลี่ยมด้านเท่า

ในวัฏภาคบนจะมีความเข้มข้นของ Ficoll อยู่มาก ส่วน Dextran จะสะสมอยู่ในวัฏภาคล่าง ซึ่งสารละลายผสม A จะมีองค์ประกอบของวัฏภาคบนเหมือนองค์ประกอบในจุด B และในวัฏภาคล่างจะมีองค์ประกอบเหมือนองค์ประกอบในจุด C เมื่อเรียกจุด B และ C ว่า nodes เส้นที่เชื่อมระหว่างจุดทั้งสองนี้ คือ เส้นผูก (tie line) สารละลายที่แสดงบนเส้นผูกเดียวกันจะมีองค์ประกอบในแต่ละวัฏภาคเหมือนกัน แต่สัดส่วนของปริมาตรในวัฏภาคบนต่อปริมาตรในวัฏภาคล่าง (V_T/V_B) จะแตกต่างกัน ดังรูปที่ 2.7 โดยสัดส่วนเชิงปริมาตรดังกล่าวจะมีความสัมพันธ์กับสัดส่วนของเส้นผูก (AB/BC)

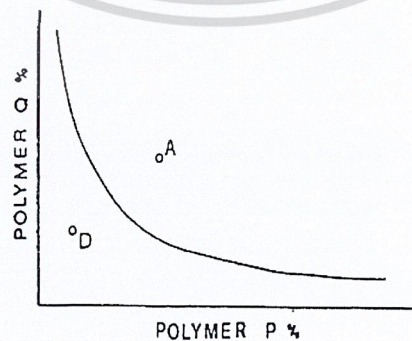


รูปที่ 2.6 แผนภาพวิภูภาคแบบสามเหลี่ยมด้านเท่าของระบบที่ประกอบด้วย dextran 70-Ficoll 400-น้ำ



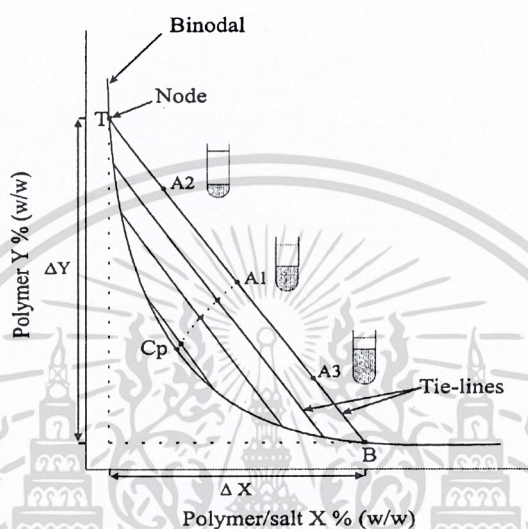
รูปที่ 2.7 แผนภาพวิภูภาคแบบสามเหลี่ยมมุมฉากของระบบที่ประกอบด้วย dextran 70-Ficoll 400-น้ำ ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส

เมื่อผสมพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำกับพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลือ องค์ประกอบของสารในแต่ละวิภูภาค และช่วงของความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดที่ทำให้เกิดการแยกวิภูภาคสามารถอธิบายได้จากแผนภาพวิภูภาค [28,30] ดังรูปที่ 2.8



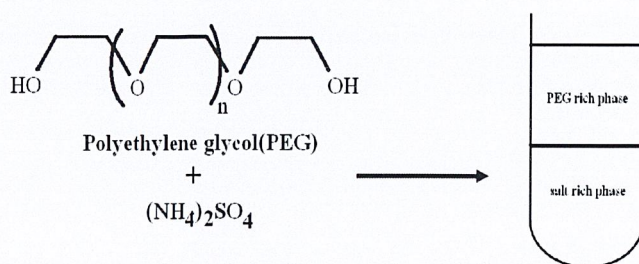
รูปที่ 2.8 แผนภาพวิภูภาคของการผสมพอลิเมอร์ชนิด P และ Q ในน้ำ

เมื่อผสมพอลิเมอร์ P และ Q ในน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน จะได้กราฟเส้นโค้ง ดังแสดงในรูปที่ 2.8 เรียกเส้นโค้งนี้ว่าเส้นแบ่งวัฏภาค (binodal curve) โดยที่เส้นโค้งดังกล่าวจะเป็นเส้นแบ่งลักษณะของวัฏภาคที่เกิดขึ้นในระบบ ถ้าสารละลายผสมนี้มีองค์ประกอบอยู่เหนือเส้นโค้ง (จุด A) ระบบนี้จะมีลักษณะเป็นของเหลวสองวัฏภาค ในขณะที่จุด D ซึ่งมีองค์ประกอบของสารละลายผสมอยู่ใต้เส้นโค้ง จะมีลักษณะเป็นของเหลววัฏภาคเดียว



รูปที่ 2.9 แผนภาพวัฏภาคที่วัฏภาคล่างเป็นพอลิเมอร์ X หรือเกลือ และวัฏภาคบนเป็นพอลิเมอร์

โดยทั่วไป รูปแบบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีน ไกลคอลกับเกลืออนินทรีย์ สามารถอธิบายบนพื้นฐานการแข่งขันของการไฮเดรชันระหว่างทั้งสององค์ประกอบ [31] การเติมเกลืออนินทรีย์จะเพิ่มดีไฮเดรชันของโซ่พอลิเมอร์ เนื่องจากปรากฏการณ์ salting-out และเกิดการแยกวัฏภาค ด้วยเหตุนี้ จึงเกิดการแยกเป็นสองวัฏภาคที่ไม่ผสมกัน วัฏภาคบนจะมีโพลีเอททิลีน ไกลคอลอยู่มาก เหมือนกับวัฏภาคของสารอินทรีย์ในระบบการสกัดแบบเดิม และวัฏภาคล่างจะมีเกลืออนินทรีย์อยู่มาก (รูปที่ 2.10)



รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของพอลิเมอร์

กับเกลืออนินทรีย์ $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ [27]

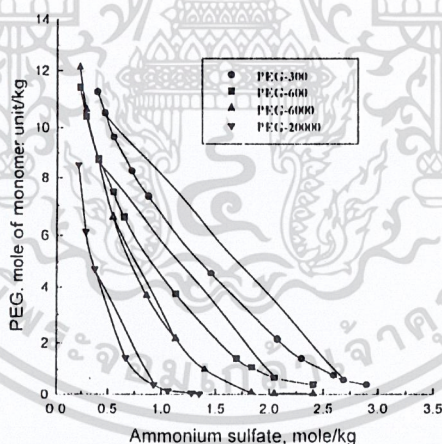
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สอดคล้องกับงานวิจัยที่อธิบายถึงการแยกของตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะของรูปแบบของระบบ (ธรรมชาติ ความเข้มข้นของเกลืออินทรีย์ น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของพอลิเมอร์) และคุณสมบัติการไฮเดรชันของตัวถูกละลาย (การสกัดตัวถูกละลายจะเพิ่มขึ้นพร้อมกับการลดลงของไฮเดรชันของตัวถูกละลาย) ความเข้มข้นขององค์ประกอบของรูปแบบวัฏภาคจะเลือกจากแผนภาพวัฏภาคของระบบ ระบบจะยังคงเป็นสองวัฏภาคตลอดการทดลอง และจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นขององค์ประกอบทั้งสองระหว่างทั้งสองวัฏภาค

2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

2.4.2.1. น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของพอลิเมอร์

การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ใช้ในระบบมีผลต่อลักษณะโครงสร้างของน้ำ และแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของสารที่อยู่ในระบบ ซึ่งทำให้ความสามารถในการสกัดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมีความแตกต่างกันไป น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์เป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดลักษณะของวัฏภาค และปฏิสัมพันธ์ต่อผลิตภัณฑ์ ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเปลี่ยนแปลงได้



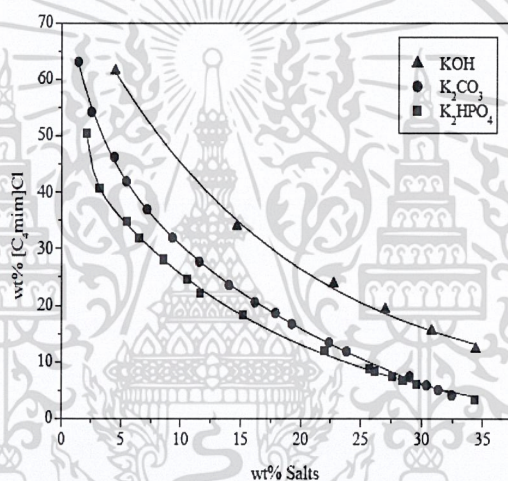
รูปที่ 2.11 แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG-(NH₄)₂SO₄ – น้ำ โดย PEG มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน

ในรูปที่ 2.11 แผนภาพวัฏภาคจะแสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่มีผลต่อการแยกซึ่งจากรูป พบว่า เมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นจะทำให้ต้องการความเข้มข้นของเกลือลดลงเพื่อให้เกิดการแยกวัฏภาค เส้นแบ่งวัฏภาคจะไม่สมมาตร ถ้ามีความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลระหว่างทั้งสองเพิ่มขึ้น ถ้าพอลิเมอร์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ความแตกต่างของคุณสมบัติเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างวัฏภาคจะเพิ่มขึ้น (รวมทั้งเส้นผก จะยาวขึ้น) ดังนั้น ความหนาแน่นจะมีแตกต่างกัน ดัชนีการหักเห (refractive index) และความหนืดจะเพิ่มขึ้น

2.4.2.2. ชนิดและความเข้มข้นของเกลือ

ความสามารถของการ salting-out ของเกลือประจุบวกและประจุลบจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดเกลือ ซึ่งเกลือแต่ละชนิดมีผลต่อลักษณะของแผนภาพวัฏภาคและความยาวของเส้นผก ดังรูปที่ 2.12 พฤติกรรมการแยกวัฏภาคของระบบโพลีเอททิลีน ไกลคอลและเกลือ จะขึ้นอยู่กับชนิดของเกลือ ซึ่งจะใช้พิจารณาแบบของวัฏภาค เกลือที่นิยมนำมาใช้ คือ โพแทสเซียมฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต และโซเดียมคาร์บอเนต โดยปกติเกลือโซเดียมฟอสเฟตจะใช้ในการเตรียมระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ(น้อยกว่า 6) สำหรับความเป็นกรด-ด่างของระบบที่มีค่าตั้งแต่ 6-7 ขึ้นไป จะใช้โพแทสเซียมฟอสเฟต



รูปที่ 2.12 แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG200-เกลือต่างชนิดกัน

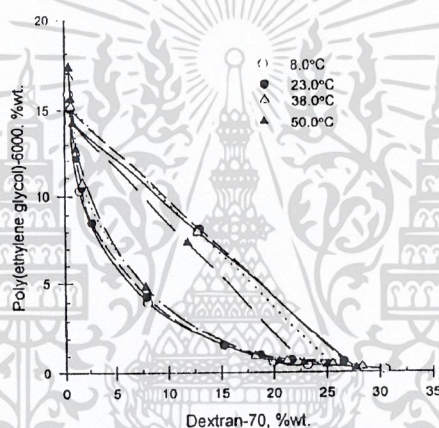
การเติมเกลือที่ความเข้มข้นพอเหมาะจะมีผลต่อแผนภาพวัฏภาคของระบบพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ชนิด nonionic ซึ่งจะแตกต่างกับพฤติกรรมของวัฏภาคในระบบที่ประกอบด้วยโพลีอิเล็กโทรไลต์ (polyelectrolytes) เช่น ระบบที่เป็น DEAE - dextrane เกลือไอออนิกจะไม่มีผลต่อองค์ประกอบของระบบ โดยทั่วไประบบที่มีความเข้มข้นของพอลิเมอร์ต่ำจะทำให้เกิดการแยกวัฏภาคโดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือลงไป เมื่อแรงไอออนิก (ionic strength) สูงขึ้น จะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนซึ่งเป็นผลจากการเกิด salting-out และเมื่อเติมเกลือที่เป็นกลางลงไปในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะทำให้แรงไอออนิกเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะวัฏภาคที่มีเกลืออยู่มาก แรงไอออนิกทำให้เกิดการตกตะกอนของสารชีวโมเลกุลหรือเกิดการแยกระหว่างวัฏภาคของพอลิเมอร์และเกลือ รวมทั้งสามารถทำให้สารชีวโมเลกุลเข้าไปใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิฤภาคของพอลิเมอร์มากขึ้น โดยการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 12 เปอร์เซ็นต์

2.4.2.3. อุณหภูมิของระบบ

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของระบบมีผลต่อสมบัติทางกายภาพของวิฤภาคของเหลว เช่น ความหนืด ความหนาแน่น ซึ่งองค์ประกอบของวิฤภาคทั้งสองเปลี่ยนแปลงไป สำหรับระบบที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ทั้งสองชนิด เช่น ระบบโพลีเอทิลีนไกลคอลกับเด็กซ์แทรน การเพิ่มอุณหภูมิของระบบจะมีผลต่อแผนภาพวิฤภาค โดยที่การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้เส้นแบ่งวิฤภาคเข้าใกล้จุดกำเนิดมากขึ้น นั่นคือ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะต้องใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ในการเกิดการแยกวิฤภาคน้อยลงดังรูปที่ 2.13 ส่วนในระบบโพลีเอทิลีนไกลคอลกับเกลือจะให้ผลตรงกันข้าม



รูปที่ 2.13 แผนภาพวิฤภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG-เด็กซ์แทรน-น้ำ ที่อุณหภูมิต่างๆ

2.4.2.4. ความเป็นกรด-ด่างของระบบ

การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวิฤภาค จะพบว่าการส่งผลต่อคุณสมบัติสองประการของวิฤภาค ประการแรก คือ คุณสมบัติทางกายภาพของวิฤภาค ทำให้องค์ประกอบของระบบและวิฤภาคเปลี่ยน โดยปริมาณของเกลือที่เพิ่มขึ้นทำให้ความหนาแน่นของวิฤภาคล่างมีค่ามากขึ้น ส่งผลให้การแยกตัวของวิฤภาคเร็วขึ้น นอกจากนี้ปริมาณของน้ำที่เอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์สามารถละลายอยู่ได้น้อยลง และส่งผลให้เอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์ถูกผลักไปอยู่ในวิฤภาคบนมากขึ้น ตามปรากฏการณ์ salting out ประการที่สอง คือ คุณสมบัติทางเคมี นั่นคือค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไป จะเหนี่ยวนำให้ประจุรวมรวมของโมเลกุลของตัวถูกละลายเปลี่ยนไปด้วย ซึ่งจะส่งผลต่อแรงกระทำระหว่างตัวถูกละลายแต่ละชนิด และแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายและโมเลกุลของพอลิเมอร์ หรือเกลือที่มีในวิฤภาคเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเหตุผลที่คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของวัสดุภาคเปลี่ยนแปลงไป จึงส่งผลให้การแยกของตัวถูกละลายต่างชนิดกันที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกัน มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยสำคัญซึ่งมีอิทธิพลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

2.4.2.5. เวลาในการแยกวัสดุภาค

เวลาที่ใช้ในการแยกขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ สัดส่วนเชิงปริมาตร อัตราการรวมตัวของหยด (droplets) และรวมทั้งองค์ประกอบของระบบ ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 เวลาโดยประมาณสำหรับการแยกวัสดุภาคที่มีองค์ประกอบของระบบต่างกัน

องค์ประกอบของระบบ	เวลา
Salt-Polyethylene glycol	5-10 นาที
Dextran-Polyethylene glycol	5-60 นาที
Dextran sulfate-Polyethylene glycol	5-60 นาที
Dextran –methylcellulose	1-12 ชั่วโมง
Dextran sulfate-methylcellulose	1-12 ชั่วโมง
Dextran-Polyvinylalcohol	$\frac{1}{2}$ - 6 ชั่วโมง
Dextran sulfate- Polyvinylalcohol	$\frac{1}{2}$ - 6 ชั่วโมง
Dextran –Hydroxypropyldextran	$\frac{1}{2}$ - 6 ชั่วโมง
Dextran sulfate- Hydroxypropyldextran	$\frac{1}{2}$ - 6 ชั่วโมง

เวลาในการตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกวัสดุภาคขึ้นอยู่กับสัดส่วนเชิงปริมาตรของทั้งสองวัสดุภาค และความหนืดที่แตกต่างกัน ถ้าวัสดุภาคหนึ่งมีความหนืดมาก และมีปริมาตรมากกว่าอีกวัสดุภาคหนึ่ง เวลาในการตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกวัสดุภาคจะใช้เวลาานานมาก ถ้าวัสดุภาคหนึ่งมีความหนืดมาก และมีปริมาตรเท่ากับหรือน้อยกว่าอีกวัสดุภาคหนึ่ง เวลาในการตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกวัสดุภาคจะใช้นเวลาน้อย เช่น ระบบเด็กซ์แทรนกับโพลีเอททิลีน ไกลคอล วัสดุภาคนมีความหนืดน้อยกว่าวัสดุภาคล่าง เมื่อวัสดุภาคล่างมีปริมาณมากจะใช้เวลาในการแยกน้อยกว่าวัสดุภาคล่างที่มีปริมาตรเท่ากับหรือมากกว่าวัสดุภาคน

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tone Agasøster (1998) [32] : ได้นำระบบสารละลายน้ำสองวัสดุภาคมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปทำการตรวจวัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงเพื่อวิเคราะห์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณยาในเลือด ทำการสกัดโดยใช้เลือด 500 มิลลิลิตร เติมลงใน PEG 300 จำนวน 2 กรัม และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 18 กรัม ทำให้วิฤภาคผสมกันและเมื่อเกิดการแยกเฟสอย่างสมบูรณ์ นำตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร มากรองและฉีดเข้าไปโดยตรงในระบบลิควิดโครมาโทกราฟี เปรียบเทียบกับการ X-ray ซึ่งให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (RSD) ของ iohexol เท่ากับ 2.0 เปอร์เซ็นต์ และ 1.2 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ iohexol ตามลำดับ

Nellie Gulyaeva และคณะ(2000) [33] : ได้ทำการศึกษาการแยกสารประกอบอินทรีย์ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของยารักษาโรคต่าง ๆ ทำการทดลองโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวิฤภาคซึ่งประกอบด้วย dextran–polyethylene glycol (Dex–PEG) และ 0.15 M NaCl ใน 0.01 M sodium phosphate buffer pH 7.3 และใน octanol–buffer (0.15 M NaCl ใน 0.01 M sodium phosphate buffer pH 7.3) ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการแยกสารในระบบนี้ด้วย dimethyl sulfoxide และศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการแยก ซึ่งสารประกอบที่เป็นไฮโดรโฟบิก จะประเมินค่าจากจำนวนที่สมดุลกับ methylene units จากผลการทดลอง พบว่า octanol–buffer ในระบบสารละลายน้ำสองวิฤภาคนี้ สามารถแยกสารประกอบที่เป็นไฮโดรโฟบิกได้ดี

Alireza Salabat (2001) [34] : ทำการศึกษาแผนภาพวิฤภาคของระบบสารละลายน้ำสองวิฤภาคซึ่งประกอบด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุล 6000 กับเกลือชนิดต่าง ๆ ซึ่งเกลือที่ใช้ทำการศึกษา คือ magnesium sulfate, sodium sulfate และ ammonium sulfate ความแรงของการ salting-out ของเกลือแต่ละชนิดเรียงลำดับ ตามประจุบวก ดังนี้ $Mg^{2+} > Na^{2+} > NH_4^{4+}$ ซึ่งจากแบบจำลองทางสถิติที่พัฒนาขึ้นโดย Cabezas และคณะ จะช่วยทำนายสมดุลของระบบ แบบจำลองนี้จะรวมถึงผลของน้ำหนักโมเลกุลต่อพฤติกรรมของวิฤภาค และสามารถคำนวณผลการทดลองได้

I-Horng Pan และคณะ (2002) [35] : ประสบความสำเร็จในการสกัด geniposide จากลูกพุด (gardenia fruit) โดยใช้ PE 62 (ethylene oxide-propylene oxide, 20:80) โพลีเอทิลีนไฮโดรเจน ฟอสเฟต และเอทานอล ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมพฤติกรรมแยก geniposide ในระบบสารละลายน้ำสองวิฤภาค รวมทั้งทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อระบบสารละลายน้ำสองวิฤภาค เช่น ความเข้มข้นของเกลือ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ปริมาตรของตัวอย่าง และการเติมเอทานอล ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มหรือความเข้มข้นของ PE62 ลดลงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยก geniposide ในวิฤภาคของเกลือ องค์ประกอบของระบบที่เหมาะสม คือ PE62 5 เปอร์เซ็นต์ โพลีเอทิลีนไฮโดรเจนฟอสเฟต 7.5 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ ผลลูกพุด 500 กรัม สามารถสกัดผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายได้ 39 กรัม (ในรูปของผง) มีความบริสุทธิ์ของ geniposide 77 เปอร์เซ็นต์ และสามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้

สิริพร [36] ได้ทำการวิจัย และทำการพัฒนาคุณสมบัติ ของสารละลายน้ำสองวัฏภาค เพื่อเป็นประโยชน์ในการสกัดปริมาณเบนโซเอท ที่ออกมาจากตัวอย่างโดยใช้กระบวนการส่วนประกอบในการสกัดเป็น โพลีเอทิลีนไกลคอล 400 1000 และ 4000 และใช้เกลืออินทรีย์ เป็นแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ โซเดียมซัลเฟต เป็นต้น เพื่อที่จะทำการวัดวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอท ในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูป ที่ได้จากข้าว โดยเส้นเหล่านี้ เป็นเส้นเปียก มีไขมันสำเร็จรูปที่อบแห้ง โดยผลการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีนั้น ออกมาว่า ถ้วยเดียวเส้นแปรรูป ที่ได้จากข้าวนั้น มีปริมาณเบนโซเอท หรือที่เราเรียกว่า “สารกันบูด” ผสมอยู่ในเส้นเหล่านั้นตามที่ได้อ้างอิงและสมมติฐานไว้ตอนแรก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมี

1. โพลีเอททิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1000 (PEG 1000) ของบริษัท Panreac sintesis
2. แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) ความบริสุทธิ์ 99.5% ของบริษัท Rankem
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความบริสุทธิ์ 97 % ของบริษัท Calrlo Erba
4. โซเดียมเบนโซเอท (CH₃COONa) ความบริสุทธิ์ 99 % ของบริษัท Fluka
5. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) บริษัท Analytical lab science รุ่น Jasco V-630
2. เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP21QD บริษัท Scientific promotion
3. เครื่อง Magnetic stirrer รุ่น Fisherrand บริษัท Fisher scientific
4. เครื่อง Vortex mixer รุ่น Vortex Genie2 บริษัท Sciencetific Industries

3.1.3 ตัวอย่าง

ผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้ง ได้แก่ เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้ง รุ้นเส้นแห้ง รุ้นเส้นเปียก เส้นหมี่แห้ง เส้นเล็กแห้ง และ บะหมี่สำเร็จรูป

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารละลาย

- 3.2.1.1 สารละลายโพลีเอททิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1000 (PEG 1000) ที่เข้มข้น 50 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก (%w/w)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซังโพลิเอททิสันไกลคอล จำนวน 125 กรัม และเติมน้ำปราศจากไอออนลงไปจนได้สารละลายหนัก 250 กรัม

3.2.1.2 สารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ ที่เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w)

ซังเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ มา จำนวน 75 กรัม และเติมน้ำปราศจากไอออนลงไปจนได้สารละลายหนัก 250 กรัม

3.2.1.3 สารละลายโพลิเอททิสันไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1000 (PEG 1000) ที่เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v)

ซังโพลิเอททิสันไกลคอล จำนวน 125 กรัม แล้วปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.2.1.4 สารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ ที่เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v)

ซังเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ จำนวน 125 กรัม แล้วปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.2.1.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 6 โมลาร์

ซังโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 60 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.2.1.6 สารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร

ซังสารมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ให้ได้น้ำหนักแน่นอนใกล้เคียง 1.0000 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายจนครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.2.2 การดำเนินการทดลอง

3.2.2.1. การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

2. ปิเปตสารละลาย PEG (50 %w/v) จำนวน 5.0 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายเกลือ (50 %w/v) จำนวน 5.0 มิลลิลิตร ใส่ผสมลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

3. นำสารละลายวัฏภาคบนซึ่งมีเบนโซเอทที่ถูกสกัดเข้าสู่ชั้นของโพลิเอททิลีน ไกลคอลไปสแกนสเปกตรัมเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ในช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร และเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมโดยอาศัย baseline technique

3.2.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5.0 มิลลิตร ใส่หลอดทดลอง

2. ปิเปตสารละลาย PEG (50 %w/v) จำนวน 5.0 มิลลิตร และปิเปตสารละลายเกลือ (50 %w/v) จำนวน 5.0 มิลลิตร ใส่ผสมลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

3. นำสารละลายวัฏภาคบนซึ่งมีเบนโซเอทที่ถูกสกัดเข้าสู่ชั้นของโพลิเอททิลีน ไกลคอลไปวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอท ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยอาศัย baseline technique จากสมการ $Abs_{269.5} - [(Abs_{265.5} + Abs_{275.5})/2]$ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้แต่ละระดับความเข้มข้น

4. พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ (แกน Y) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, r^2)

3.2.2.3 การทดสอบพิสัยและความเป็นเส้นตรง (Range and Linearity)

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายเบสลงจำนวน 5 มิลลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. ปิเปตสารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 1000 (50 %w/v) จำนวน (5.0 มิลลิตร และปิเปตสารละลายเกลือ (50 % w/v) จำนวน 5.0 มิลลิตร ในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

3. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 265.5 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร

4. หาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้แต่ละระดับความเข้มข้น พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ (แกน Y) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, r^2)

3.2.2.4 ขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

สามารถหาได้โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐานโดยใช้สูตร

$$y = y_b + 3 S_B$$

เมื่อ y_b = จุดตัดแกน $y(a)$ ที่คำนวณได้จากสมการเส้นถดถอย
 S_B = ค่า standard error of estimate, $s_{y/x}$

3.2.2.5 ขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantification, LOQ)

สามารถหาได้โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สูตร

$$y = y_b + 10 S_B$$

เมื่อ y_b = จุดตัดแกน $y(a)$ ที่คำนวณได้จากสมการเส้นถดถอย
 S_B = ค่า standard error of estimate, $s_{y/x}$

3.2.2.6 การเตรียมตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้งที่แปรรูปจากข้าว มาบดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างละ 20 กรัม ลงในบีกเกอร์
2. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ลงในตัวอย่าง ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 100 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำปราศจากไอออน 100 ml เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของตัวอย่าง
4. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปิเปตสารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 1000 (50 % w/v) จำนวน 5.0 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (50 % w/v) จำนวน 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

3.2.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมเบนโซเอท ในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว

1. นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว ได้แก่ เส้นก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็ก เส้นหมี่ วุ้นเส้น และ เส้นบะหมี่สำเร็จรูป มาหั่นให้มีขนาดเล็กๆ ชั่งตัวอย่างละ 20 กรัม ลงในภาชนะ Beaker

2. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที พร้อมทั้งคนสารละลายตัวอย่างเป็นครั้งคราว เพื่อให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ผสมกับตัวอย่างได้ดีขึ้น

3. ปิเปตสารละลายตัวอย่างจำนวน 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

4. ปิเปตสารละลายตัวอย่างจำนวน 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปิเปตสารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 1000 (50 % w/v) จำนวน 5.0 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (50 % w/v) จำนวน 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

5. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอท ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของ AOAC ข้อ 47.3.03

3.2.2.8 ความเที่ยง (Precision)

1. เตรียมสารละลายตัวอย่าง และสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ให้มีความเข้มข้น 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายเบลงค์ จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3. ปิเปตสารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 1000 (50 % w/v) จำนวน 5.0 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายเกลือ (50 % w/v) จำนวน 5.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

3. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 265.5 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร

4. หาค่าเฉลี่ยของปริมาณเบนโซเอทที่คำนวณได้ และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD)

สำหรับการทดสอบความเที่ยง จะประเมินความสามารถในการทดสอบซ้ำ (repeatability) โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Relative standard deviation, %RSD) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่เติมลงไป

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.9 ความแม่นยำ (Accuracy)

1. เตรียมสารละลายตัวอย่าง และสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ให้มีความเข้มข้น 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายเบสลง จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
3. ปิเปตสารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 1000 (50 %w/v) จำนวน 5.0 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายเกลือ (50 % w/v) จำนวน 5.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ (ทำซ้ำ 6 ครั้ง)
3. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 265.5 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณเบนโซเอท
4. หาค่าเฉลี่ยของปริมาณเบนโซเอทที่คำนวณได้ จากนั้นประเมินความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ในรูปของการหาค่าการกลับคืน (% Recovery) ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3}$$

C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน
 C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง (Unfortified sample)
 C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

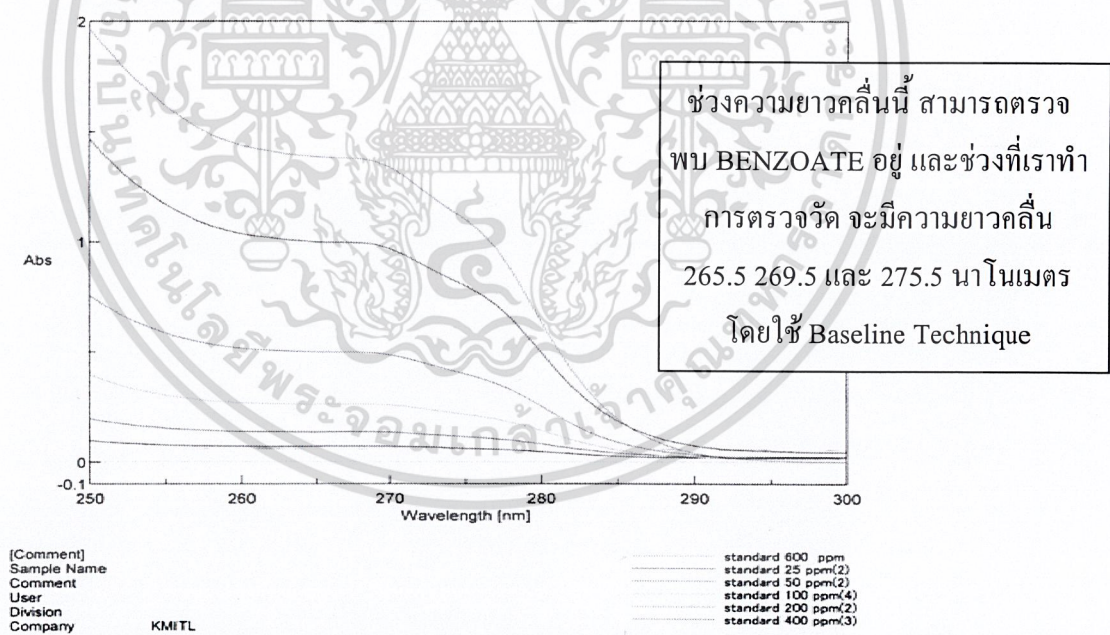
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

โครงการพิเศษนี้ ได้นำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ซึ่งประกอบด้วยโพลีเอทิลีน (PEG) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) ที่ได้พัฒนาเพื่อนำไปใช้ในการสกัดเบนโซเอท ในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว นามาประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์เบนโซเอทในผลิตภัณฑ์ เส้นแห้งโดยการสกัด และนำไปตรวจวัดด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี

4.1 ผลการศึกษาเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ทำการทดลองเพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ โดยอาศัย baseline technique ซึ่งทำการสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร ของสารละลาย โซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้น 25 50 100 200 400 600 800 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สกัด ได้ในวัฏภาคบนซึ่งเป็นชั้นของโพลีเอทิลีน ไกลคอลเปรียบเทียบกับสารละลายเบสค์ คือ น้ำ ปราศจากไอออนที่ผ่านกระบวนการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค



รูปที่ 4.1 แสดงช่วงความยาวคลื่นที่ตรวจพบ โซเดียมเบนโซเอท ที่เกิดขึ้นในการตรวจวัดด้วย เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

สารละลายโซเดียมเบนโซเอทในชั้นโพลีเอทิลีน ไกลคอลให้ค่าการดูดกลืนแสงและเป็น พิกใน ช่วงความยาวคลื่น 265.5 ถึง 275.5 นาโนเมตร โดยมียอดพิกที่ความยาวคลื่น 269.5 นาโน เมตรในการทดลองนี้เลือกใช้ baseline technique เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมเบนโซเอทในชั้นโพลิเอททิลีนไกลคอล โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นไปตามสมการ $Abs_{269.5} - [(Abs_{265.5} + Abs_{275.5})/2]$

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

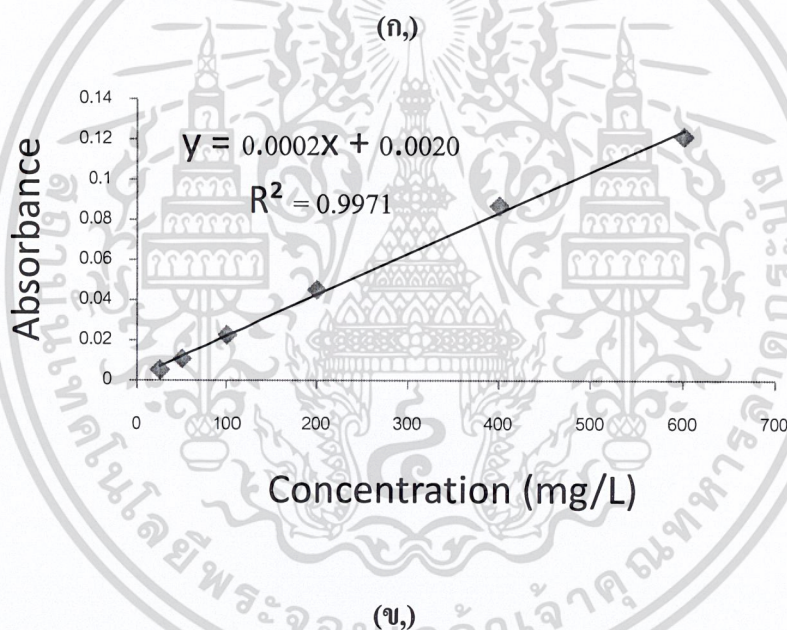
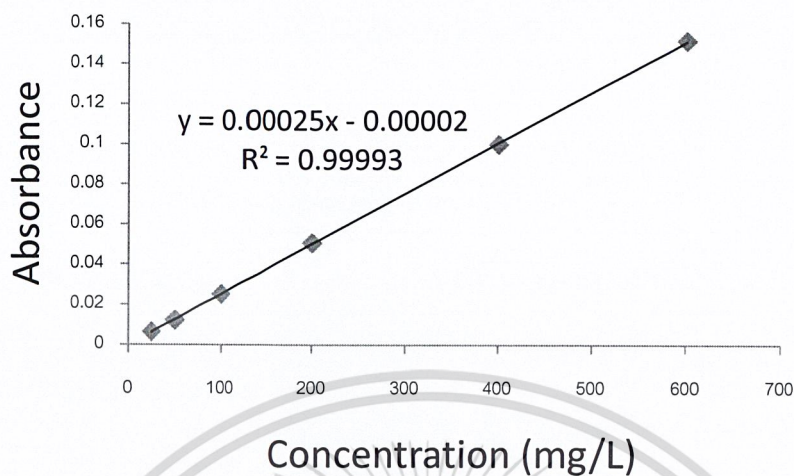
ทำการสกัดสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ในช่วงความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายมาตรฐาน 5.0 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลาย PEG (50 % w/v) 5.0 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือ (50 % w/v) 5.0 มิลลิลิตร เมื่อถึง วัฏจักรเกิดการแยกชั้นของวัฏภาคสมบูรณ์แล้ว นำสารละลายวัฏภาคส่วนบนไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 265.5, 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโซเดียมเบนโซเอทแต่ละความเข้มข้น ตามสมการ $Abs_{269.5} - [(Abs_{265.5} + Abs_{275.5})/2]$ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ ตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้นต่าง ๆ (ครั้งที่ 1)

ความเข้มข้นของโซเดียมเบนโซเอท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้
25	0.0053
50	0.0108
100	0.0227
200	0.0452
400	0.0870
600	0.1214

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้นต่าง ๆ (ครั้งที่ 2)

ความเข้มข้นของโซเดียมเบนโซเอท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้
25	0.0065
50	0.0123
100	0.0253
200	0.0508
400	0.1000
600	0.1517



รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานไซเดียมเบนโซเอทในช่วงความเข้มข้น 25 – 600 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสง ที่คำนวณได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานที่พล็อตระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไซเดียมเบนโซเอท (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ (แกน Y) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, r^2) ได้กราฟมาตรฐานแสดงในรูปที่ 4.3 จากผลการทดลองได้กราฟมาตรฐาน ของสารละลายไซเดียมเบนโซเอทในช่วงความเข้มข้น 25 - 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.00025x - 0.00002$ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.99993 นี่คือการกราฟแรก ส่วนกราฟที่สอง จะได้สมการเส้นตรงออกมาเป็น คือ $y = 0.0002x + 0.0020$ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

เอกสาร (r²) เท่ากับ 0.9971 เพื่อนำไปใช้ในการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดสอบพิสัยและความเป็นเส้นตรง (Range and Linearity)

ทำการสกัดสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ในช่วงความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายมาตรฐาน 5.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PEG (50 % w/v) 5.0 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือ (50 % w/v) 5.0 มิลลิลิตร เมื่อทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นของวัฏภาคสมบูรณ์แล้ว นำสารละลายวัฏภาคส่วนบนไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 265.5, 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโซเดียมเบนโซเอทแต่ละความเข้มข้น ตามสมการ $Abs_{269.5} - [(Abs_{265.5} + Abs_{275.5})/2]$ นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานที่พล็อตระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ (แกน Y) ได้กราฟมาตรฐานแสดงดังรูปที่ 4.3

จากการทดสอบช่วงการทดสอบหรือพิสัย และความเป็นเส้นตรงพบว่า สารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 25 - 600 มิลลิกรัมต่อลิตร กราฟแรกได้สมการเส้นตรง คือ $y = 0.00025x - 0.00002$ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.99993 กราฟที่สอง จะได้สมการเส้นตรงออกมาเป็น คือ $y = 0.0002x + 0.0020$ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.9971 ซึ่งช่วงความเข้มข้นของตัวอย่างจะอยู่ระหว่างค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด ที่เป็นเส้นตรง

สรุปได้ว่า กราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 25 – 600 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.4 ผลขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

ตารางที่ 4.3 แสดงการหา ค่า Limit of Detection

x (mg/L)	y_i	$\hat{y}$	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$
0	0.00000	0.00002	-0.00002	0.000000
25	0.00650	0.00623	0.00027	0.000000
50	0.01230	0.01248	-0.00018	0.000000
100	0.02530	0.02498	0.00032	0.000000
200	0.05080	0.04998	0.00082	0.000000
400	0.10000	0.09998	0.00002	0.000000
600	0.15170	0.14998	0.00172	0.000002

$$y = y_B + 3S_B \dots\dots\dots(1)$$

โดยที่ $S_B = S_{y/x}; = 0.000632$

แทนค่าลงในสมการที่ 1 จะได้

y

=

0.00002 + (3 x 0.000632)

=

0.001916

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

y

=

0.00025x – 0.00002

x

=

0.001916 + 0.00002

0.00025

=

7.584 มิลลิกรัมต่อลิตร

สามารถหาคัดจำกัดในการตรวจวัด ได้โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น 25-600 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากการคำนวณตามสมการ $y = y_B + 3S_B$ ความเข้มข้นน้อยที่สุดของเบนโซเอทที่สามารถตรวจพบได้ เท่ากับ 7.584 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.5 ผลขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantification, LOQ)

ตารางที่ 4.4 แสดงการหา ค่า Limit of Quantification

x (mg/L)	y _i	$\hat{y}$	y _i – $\hat{y}$	(y _i – $\hat{y}$) ²
0	0.00000	0.00002	-0.00002	0.000000
25	0.00650	0.00623	0.00027	0.000000
50	0.01230	0.01248	-0.00018	0.000000
100	0.02530	0.02498	0.00032	0.000000
200	0.05080	0.04998	0.00082	0.000000
400	0.10000	0.09998	0.00002	0.000000
600	0.15170	0.14998	0.00172	0.000002

$y = y_B + 10S_B$

.....(1)

โดยที่ $y_B = a ; 0$

$S_B = S_{y/x} ; = 0.000632$

แทนค่าลงในสมการที่ 1 จะได้

y

=

0.00002 + (10 x 0.000632)

=

0.00652

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

$$\begin{aligned} y &= 0.00025x - 0.00002 \\ x &= \frac{0.00652 + 0.00002}{0.00025} \\ &= 26.16 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

สามารถหาขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น 25-600 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากการคำนวณตามสมการ $y = y_B + 10S_B$ ความเข้มข้นน้อยที่สุดของเบนโซเอท ที่สามารถวัดปริมาณได้ เท่ากับ 26.16 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.6 ผลความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงของการวิเคราะห์ ศึกษาโดยการนำสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้น 200 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร นำผลที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเพื่อหาค่า %RSD

ตารางที่ 4.5 แสดงผลความเที่ยงสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารละลายมาตรฐานเบนโซเอท

ตัวอย่าง	ปริมาณ Benzoate ที่เติม (mg/L)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (mg/L)	S.D.	RSD	%RSD
วุ้นเส้น 1	200	178.50	0.50	0.00	0.28
	300	291.50	1.50	0.00	0.51
	400	419.50	0.38	0.00	0.09
วุ้นเส้น 2	200	206.00	9.89	0.04	4.80
	300	302.50	4.24	0.01	1.40
	400	419.50	40.30	0.09	9.60
วุ้นเส้นเปียก	200	190.48	8.26	0.04	4.33
	300	284.48	2.80	0.00	0.98
	400	372.98	5.10	0.01	1.36

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณ Benzoate ที่เติม (mg/L)	ความ เข้มข้น เฉลี่ย (mg/L)	S.D.	RSD	%RSD
เส้นหมี่ 1	200	404.50	25.00	0.06	6.18
	300	451.00	40.43	0.08	8.96
	400	482.66	18.25	0.03	3.78
เส้นหมี่ 2	200	528.00	20.50	0.03	3.88
	300	558.35	32.88	0.05	5.88
	400	531.00	13.78	0.02	2.59
เส้นเล็ก	200	465.50	28.63	0.06	6.15
	300	575.50	1.94	0.00	0.33
	400	672.00	1.41	0.00	0.21

เมื่อผลที่ออกมาใน ช่วงความเข้มข้นประมาณ 200 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร จะต้องไม่เกินค่าที่สามารถยอมรับและคาดหวังได้ จะต้องมียค่า %RSD ไม่เกินค่ามาตรฐานที่ให้การยอมรับไว้ จึงจะสามารถยอมรับได้ และผลการทดลองที่ออกมา นั้น ก็ถือว่า อยู่ในเกณฑ์ที่ให้การยอมรับได้ด้วยเช่นกัน

ซึ่งผลที่ออกมา สรุปได้ว่า รุ้นเส้นในแต่ละยี่ห้อจะมีความแตกต่างจากเส้นอื่นๆ เนื่องด้วย ปริมาณของสารเบนโซเอทที่ตรวจพบใน รุ้นเส้น จะมีน้อย และนั่นเป็นเหตุผลที่ทำให้ รุ้นเส้นมี ค่าความเที่ยง หรือการหาค่า %RSD นั้น ออกมาได้มาตรฐาน ไม่ส่งผลต่อการหามาหนัก สาเหตุที่ค่าความเที่ยงออกมา อยู่ในเกณฑ์การยอมรับนั้น เนื่องมาจาก การตรวจวัดที่ถูกต้อง รวมทั้งการเตรียมสารในแต่ละขั้นตอน ทำให้ได้วิธีการ รวมทั้งที่กล่าวมาข้างต้นว่า มีสารเบนโซเอทน้อย จึงลดการถูกรบกวนจากสารอื่นได้ง่ายมากกว่า ผลิตภัณฑ์ตัวอื่น

4.7 ผลความแม่นยำ (Accuracy)

ทำการศึกษาโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของโซเดียมเบนโซเอท จาก stock standard solution 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 200 300และ400 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมตัวอย่างและผ่านการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค และวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมเบนโซเอท จากนั้นประเมินความถูกต้องในรูปของการหาร้อยละการกลับคืน

(%Recovery) ผลความแม่นยำของวิธีแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสาร ดังตารางที่ 4.7

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลการคำนวณค่าความแม่นยำของการทดสอบของสารมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอต

ตัวอย่าง	Benzoate เฉลี่ย ใน ตัวอย่าง (mg/L)	ปริมาณ Benzoate ที่เติม (mg/L)	Benzoate ที่ตรวจ พบเฉลี่ย (mg/L)	recovery	%recovery
วุ้นเส้น 1	0	200	178.50	0.89	89.25
		300	291.50	0.97	97.16
		400	419.50	1.04	104.87
วุ้นเส้น 2	10.25	200	206.00	0.97	97.87
		300	302.50	0.97	97.41
		400	419.50	1.02	102.31
วุ้นเส้น เปียก	3.28	200	190.48	0.93	93.63
		300	284.48	0.93	93.74
		400	372.98	0.92	92.43
เส้นหมี่ 1	164	200	404.50	1.20	120.25
		300	451.00	0.95	95.66
		400	482.66	0.80	80.01
เส้นหมี่ 2	350.75	200	528.00	0.88	88.62
		300	558.35	0.69	69.16
		400	531.00	0.45	45.02
เส้นเล็ก	309.75	200	465.50	0.78	78.02
		300	575.50	0.88	88.58
		400	672.00	0.90	90.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนตามมาตรฐาน AOAC มีเกณฑ์มาตรฐาน

ความเข้มข้นของตัววิเคราะห์	ร้อยละการกลับคืน
10-100%	98-102
≥ 1% (10,000 mg/L)	97-103
> 0.1% (1,000 mg/L)	95-105
100 mg/L	90-107
10 mg/L, 1 mg/L, 100 µg/L	80-110
10 µg/L	60-115
1 µg/L	40-120

เมื่อทราบเกณฑ์การยอมรับของเปอร์เซ็นต์การกลับคืน แล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้ใน ตารางที่ 4.6 (ตัวอักษรสีแดง) ก็จะทราบว่า ตัวอย่างหรือตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์มีปริมาณเบนโซ เอทที่อยู่ในเกณฑ์หรือไม่ ซึ่งสรุปได้ว่า ตัวอย่างที่ได้นั้น อยู่ในเกณฑ์ที่ถือว่า ได้รับการยอมรับ

ส่วนตัวอย่างที่เป็นเส้นบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปนั้น จะไม่สามารถตรวจวัด หาค่าต่าง ๆ ได้ เนื่องจากว่า สีของบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปเป็นสีเหลือง ซึ่งส่งผลต่อการตรวจวัดสารเบนโซเอท จึงไม่ สามารถตรวจวัดได้ในช่วงอัลตราไวโอเล็ต ผลจึงสรุปว่า เป็นเส้นสำเร็จรูปที่มีสีเหลืองรบกวน ระหว่างทำการทดลอง

4.8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่าง

ทำการตรวจวัดปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแห้ง 4 ชนิด ประกอบด้วย เส้นหมี่แห้ง เส้นเล็กแห้ง วุ้นเส้นแห้ง และมาม่า เตรียมตัวอย่างโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ทำการสกัดโดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5.0 มิลลิลิตร ผสมกับ PEG (50% w/v) 5.0 มิลลิลิตร และ เกลือ (50% w/v) 5.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เขย่า สารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ นำสารละลายวัฏ ภาคบนค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 265.5 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร และคำนวณหา ปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแห้งด้วยวิธีเทียบกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ดัง ตารางที่ 4.9 ผลการตรวจวิเคราะห์พบปริมาณเบนโซเอทอยู่ในช่วง 0 – 3.50 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่ง ผลจากการศึกษาการใช้วัตถุกันเสียชนิดเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวนี้สามารถ นำไปเป็นข้อมูลเพื่อเป็นประโยชน์ให้ผู้ประกอบการได้ปรับปรุงพัฒนาสินค้าให้ได้คุณภาพ มาตรฐาน ซึ่งจะส่งผลให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยในการบริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแห้ง

ตัวอย่าง	ปริมาณเบนโซเอท (มิลลิกรัมต่อกรัม)			ปริมาณเบนโซเอทเฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อกรัม)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
วุ้นเส้น 1	ND	ND	ND	ND
วุ้นเส้น 2	0.09	0.11	0.10	0.10
วุ้นเส้นเปียก	0.00	0.02	0.00	0.01
เส้นเล็ก	3.10	3.09	3.09	3.09
เส้นหมี 1	1.48	1.60	1.83	1.63
เส้นหมี 2	3.65	3.36	3.49	3.50
บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป	-	-	-	มีการรบกวนจากสารอื่น

** ND = No detect

ส่วนตัวอย่างที่เป็นเส้นบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปนั้น จะไม่สามารถตรวจวัดค่าต่าง ๆ ได้ เนื่องจากมีการรบกวนจากสีเหลืองของสารอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งส่งผลต่อการตรวจวัดสารเบนโซเอท จึงไม่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงอัลตราไวโอเลต หรือช่วง UV นั้นเอง ผลจึงสรุปว่า เป็นเส้นสำเร็จรูปที่มีสีเหลืองรบกวนระหว่างทำการทดลอง จึงไม่สามารถหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัดได้อย่างแน่นอน

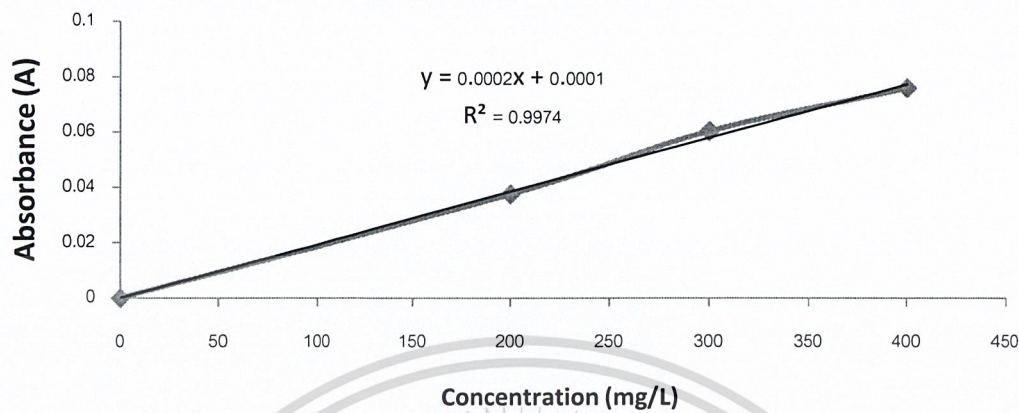
4.9 การหาปริมาณเบนโซเอทในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัม ในผลิตภัณฑ์ตัวอย่างวุ้นเส้น

ในการหาปริมาณเบนโซเอท ที่ค้นพบในผลิตภัณฑ์วุ้นเส้น จะต้องทำการหาข้อมูลในด้านต่างๆ ซึ่งจะต้องใช้ข้อมูลของการหาความเที่ยง (Presicion) และ ความแม่นยำ (Accuracy) เพื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.3 หากความเข้มข้นในแต่ละความยาวคลื่นในส่วนของการดูดกลืนแสง โดยแสดงผลดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ตารางการหาค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น ที่เดิม (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง (A)		ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (A)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
วุ้นเส้น 1	200	0.0375	0.0377	0.0376
	300	0.0600	0.0606	0.0603
	400	0.0758	0.0759	0.07585

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสง (A)
และ ความเข้มข้นที่เดิม (mg/L)



รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานของผลิตภัณฑ์วันเส้น แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A) และค่าความเข้มข้นที่เดิม (มิลลิกรัมต่อลิตร)

หาค่า LOD (Limit of Detection) และ LOQ (Limit of Quantification) เพื่อหาขีดจำกัดในการตรวจวัด และปริมาณวิเคราะห์ โดยอ้างอิงข้อมูลข้างต้น ได้แสดงผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงการหาค่า LOD และ LOQ ในผลิตภัณฑ์วันเส้น

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mg/L)	y_i	$\hat{y}$	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$
วันเส้น 1	0	0.0000	0.0001	-0.0001	0.000000
	200	0.0376	0.0401	-0.0025	0.000006
	300	0.0603	0.0601	0.0002	0.000000
	400	0.0758	0.0801	0.0077	0.000018

- หาค่า LOD (อ้างอิงตารางที่ 4.11)

$$y = y_B + 3S_B \tag{1}$$

โดยที่ $S_B = S_{y/x} = 0.0034$

แทนค่าลงในสมการที่ 1 จะได้

$$\begin{aligned} y &= 0.0001 + (3 \times 0.0034) \\ &= 0.0103 \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

$$\begin{aligned} y &= 0.0002x + 0.0001 \\ x &= \frac{0.0103 - 0.0001}{0.0002} \\ &= 51 \quad \text{มิลลิกรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

สามารถหาขีดจำกัดในการตรวจวัด ได้โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น 25-600 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากการคำนวณตามสมการ $y = y_B + 3S_B$ ความเข้มข้นน้อยที่สุดของเบนโซเอทที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 51 มิลลิกรัมต่อลิตร

- หาค่า LOQ (อ้างอิงตารางที่ 4.11)

โดยที่ $S_B = S_{y/x} = 0.0034$
แทนค่าลงในสมการที่ 1 จะได้

$$\begin{aligned} y &= 0.0001 + (10 \times 0.0034) \\ &= 0.00431 \end{aligned}$$

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

$$\begin{aligned} y &= 0.0002x + 0.0001 \\ x &= \frac{0.00341 - 0.0001}{0.0002} \\ &= 170 \quad \text{มิลลิกรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

.....(1)

สามารถหาขีดจำกัดในการตรวจวัด ได้โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น 25-600 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากการคำนวณตามสมการ $y = y_B + 10S_B$ ความเข้มข้นน้อยที่สุดของเบนโซเอทที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 170 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำค่า LOD และ LOQ ที่ได้จาก สองสมการมาหาปริมาณเบนโซเอทในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัม ผลการคำนวณ จะมีปริมาณเบนโซเอทเป็น 0.51 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 1.70 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ดังผลที่แสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณเบนโซเอทที่ได้จากการคำนวณหาค่า LOD และ LOQ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mg/L)	ค่า LOD		ค่า LOQ	
		mg/L	mg/g	mg/L	mg/g
วุ้นเส้น 1	0	51	0.51	170	1.70
	200				
	300				
	400				

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ เป็นการพัฒนาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคซึ่งมีองค์ประกอบของ โพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) กับเกลีโอนินทรีย์ เพื่อสกัดเบนโซเอทจากผลิตภัณฑ์เส้นแห้ง และตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี ซึ่งการทดลองระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในการสกัดเบนโซเอท โดยการศึกษาแผนภาพวัฏภาค (phase diagram) ของระบบโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) - เกลีโอนินทรีย์-น้ำ และปัจจัยต่างๆ องค์ประกอบของระบบในการสกัดเบนโซเอท ใช้ น้ำหนักโมเลกุลโพลีเอททิลีนไกลคอล 1000 และสารละลายเกลีอแอมโมเนียมซัลเฟต และค่าความยาวคลื่นสำหรับการวิเคราะห์คือช่วง 200-400 nm ค่าการดูดกลืนแสงเป็นพีคในช่วงความยาวคลื่น 265.5 ถึง 275.5 นาโนเมตร โดยมียอดพีคที่ความยาวคลื่น 269.5 นาโนเมตร ในการทดลองนี้เลือกใช้ baseline technique เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโซเดียมเบนโซเอทในชั้นโพลีเอททิลีนไกลคอล โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นไปตามสมการ $Abs_{269.5} - [(Abs_{265.5} + Abs_{275.5})/2]$ ปริมาณของสารละลายตัวอย่าง สารละลายโพลีเอททิลีนไกลคอล และสารละลายเกลีอ คืออัตราส่วน 1:1:1 ซึ่งระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมีคุณสมบัติดังนี้

ตารางที่ 5.1 คุณสมบัติของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

พารามิเตอร์	ค่า
สมการเส้นตรง	$y = 0.00025x + 0.00002$ $(r^2 = 0.99993)$ $y = 0.0002x + 0.0020$ $(r^2 = 0.9971)$
ช่วงความเป็นเส้นตรง	25-600 มิลลิกรัมต่อลิตร
ขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD)	7.584 มิลลิกรัมต่อลิตร
ขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ)	26.16 มิลลิกรัมต่อลิตร
ร้อยละการคืนกลับ (%Recovery)	80.00 – 110.00%
%RSD (n = 3)	0.09 – 32.88%

ทำการตรวจวัดปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้น 3 ชนิด ประกอบด้วย วุ้นเส้นแห้ง เส้นเล็กแห้ง เส้นหมี่แห้ง และคำนวณหาปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวด้วยวิธีเทียบกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 1. งานวิจัยนี้ใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของโพลีเอททิลีน ไกลคอล และเกลืออนินทรีย์ เพื่อหาปริมาณเบนโซเอทของเส้นแห้ง ซึ่งไม่ได้สกัดเบนโซเอทออกมา จึงเป็นไปได้ว่าอาจจะมีการพัฒนาไปสู่การสกัดเบนโซเอทออกมาจากเส้นแห้ง
- 2. ควรศึกษาขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เพิ่มเติมเพื่อลดขั้นตอนการเตรียมให้สะดวก ง่าย และรวดเร็วขึ้น
- 3. สามารถนำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคนี้ไปประยุกต์ใช้งานผลิตภัณฑ์อื่นๆ เพื่อเป็นการพัฒนาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคให้ใช้งานด้านต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวางขึ้น



เอกสารอ้างอิง

- [1] Branen A.L., Davidson P.M., Salminen S. and Thorngate III J. H. **Food Additives**. New York : Marcel Dekker. 2002.
- [2] กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, ฉบับที่ 281, 2547.
- [3] AOAC International. **Official Methods of Analysis Vol II**. 16th Ed. Cunniff P.(ed). 1995.
- [4] Kompany-Zareh M. and Mirzae S. I. **Analytica Chimica Acta**, vol. 526, 2004. pp. 83–94.
- [5] Ahmad I. and Vaid F. H. **J. Pharm. Sci**, vol. 22, 2009. pp. 18–22.
- [6] Chen Y.Q. and Ni Y.N. **Chinese chemical letters**, vol. 20, 2009. pp. 615–619.
- [7] Guerra R.M., Mar'in M.I., Nchez S. and Nezc J. **J. Chromatogr.A**, vol. 950, 2002. pp. 31–39.
- [8] Gonza'lez M., Gallego M. and Valca'rcel M. **J. Chromatogr.A**, vol. 848, 1999. pp. 529–536.
- [9] Pan Z., Wang I., Mo W., Wang C., Hu W. and Zhang J. **Analytica chimica acta**, vol. 545, 2005. pp. 218–223.
- [10] Dong C., Wang W., Dong C. and Wang W. **Analytica Chimica Acta**, vol.562, 2006. pp. 23–29.
- [11] Wang L., Zhang X., Wang Y. and Wang W. **Analytica chimica acta**, vol. 577, 2006. pp. 62–67.
- [12] Pylypiw H.M. and Grether M.T. **J. Chromatogr.A**, vol. 883, 2000. pp. 299–304.
- [13] Ferreira I.M., Mendes E.L., Brito P. and Ferreir M.A. "Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC" **Food research international**, vol.33, 2000. pp. 113–117.
- [14] Tfouni S.A.V. and Toledo M.C.F. "Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food" **Food Control**, vol. 13, 2002. pp. 117–123.
- [15] Abe-onishi Y., Yomota C., Sugimoto N., Kubota H. and Tanamoto K. **J. Chromatogr.A**, vol. 1040, 2004. pp. 209–214.
- [16] Saada B., Baria md. F., Saleh M.I., Ahmad K., Khairuddin M. and Talibb M. **J. Chromatogr.A**, vol. 1073, 2005. pp. 393–397.
- [17] Diamond A. D. and Hsu J. T. **Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. Advances of biochemical engineering and biotechnology**. vol. 47. 1992. pp. 89–133.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [18] Chethana S., Nayak C.A. and Raghavarao K.S.M.S. **Proceedings of the International Conference**. 2004. pp. 309–311.
- [19] Albertsson P.Å. **Partition of cell particles and macromolecules**. New York : Wiley. 1986.
- [20] Walter H., Brooks D.E. and Fisher D. **Partitioning in Aqueous Two Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology**. Orlando : Academic Press. 1985.
- [21] Huddleston J.G., Willauer H.D., Boaz K.R. and Rogers R.B. **J. Chromatogr. B**, vol. 711, 1998. pp. 237–244.
- [23] ศิวาพร ศิวเวชช. **วัตถุเจือปนอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริม และฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. 2546.
- [24] Davidson P. M., Sofos J.N. and Branen A.L. **Antimicrobials in food**. Taylor & Francis. 2005.
- [25] คณะกรรมาธิการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2539.
- [26] เกษร นันทจิต. **การวิเคราะห์วัตถุเจือปนและสารปนเปื้อนในอาหาร**. เชียงใหม่ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2551.
- [27] Person D. **Laboratory technique in food analysis**. London and Boston : Butterworths. 1975. pp. 78-84.
- [28] นันทิญา วงษ์มงคล. “ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดแอลกอฮอล์โพธิ์เอส” วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2543.
- [29] วิไลวรรณ ช่วยยก. “การสกัดแอลกอฮอล์โพธิ์เอสจากน้ำหมักโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหลอด” วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2544.
- [30] Albertsson P. A. **Partition of cell particles and macromolecules : distribution and fractionation of cells, viruses, microsomes, proteins, nucleic acids, and antigen-antibody complexes in aqueous polymer two-phase systems**. New York : Wiley. 1960.
- [31] Cabezas H. **J. Chromatogr.B**, vol. 680, 1996. pp. 3.
- [32] Agasøster T. “Aqueous two-phase partitioning sample preparation prior to liquid chromatography of hydrophilic drugs in blood” **J. Chromatogr.B**, vol. 716, 1998.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pp. 293 –298.

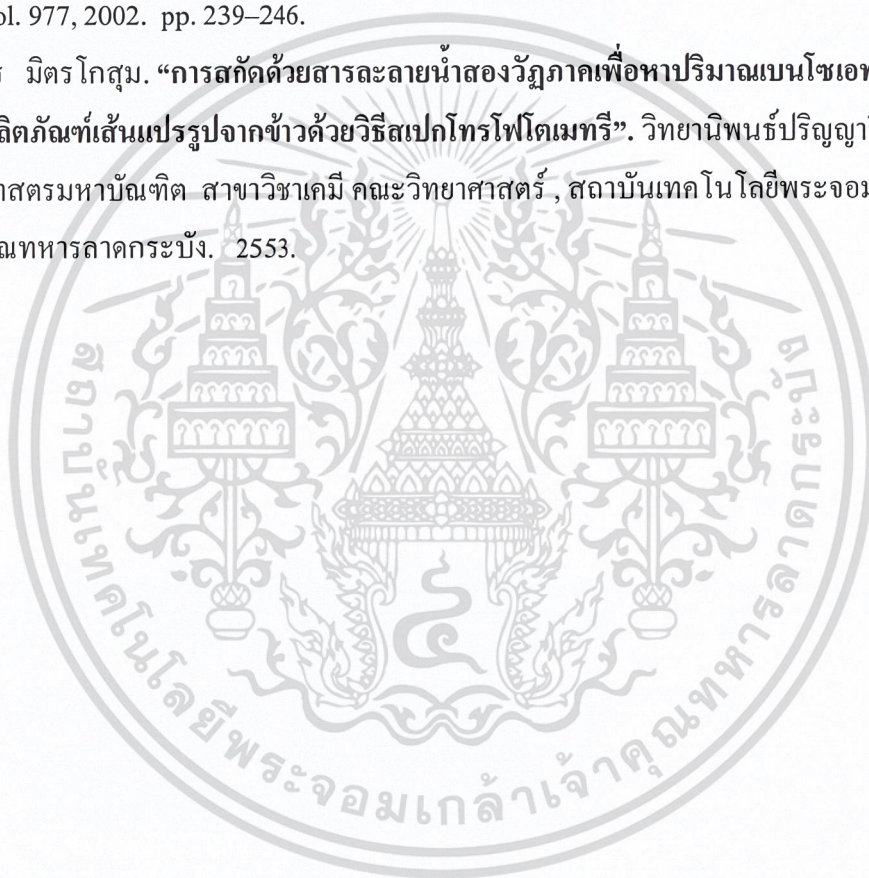
[33] Gulyaeva N., Zaslavsky A., Lechner P., Chait A. and Zaslavsky B. “Relative hydrophobicity of organic compounds measured by partitioning in aqueous two-phase systems”

J. Chromatogr.B, vol. 743, 2000. pp. 187–194.

[34] Salabat A. “The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems : experiments and predictions” **Fluid Phase Equilibria**, vol. 187–188, 2001. pp. 489–498.

[35] Pan I.H., Chiub H.H., Lub C. H., Leeb L.T. and Lia Y. “A queous two-phase extraction as an effective tool for isolation of geniposide from gardenia fruit” **J. Chromatogr.A**, vol. 977, 2002. pp. 239–246.

[36] สิริพร มิตรโกสุม. “การสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคเพื่อหาปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2553.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นายณัฐพงศ์ ดวงทุมเมศ
วัน เดือน ปีเกิด วันจันทร์ที่ 22 สิงหาคม พ.ศ. 2531
ที่อยู่ บ้านเลขที่ 21/100 ตำบลสวนใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี
รหัสไปรษณีย์ 11000
ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2550 - 2554 วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม- เครื่องมือวิเคราะห์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ- นามสกุล นายชนพล ภู่แกมแก้ว
วัน เดือน ปีเกิด วันจันทร์ที่ 4 กรกฎาคม พ.ศ. 2531
ที่อยู่ บ้านเลขที่ 127 หมู่ 3 ซอยเบริ่ง 15 ถนนสุขุมวิท 107 แขวงบางนา
เขตบางนา จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10260
ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2550 - 2554 วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม- เครื่องมือวิเคราะห์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ - นามสกุล นายสุรภัทร ปัญญาพิสิทธิ์
วัน เดือน ปีเกิด วันพุธที่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2532
ที่อยู่ บ้านเลขที่ 28/102 ตำบลบางเมืองใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ
รหัสไปรษณีย์ 10270
ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2550 - 2554 วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม- เครื่องมือวิเคราะห์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



นายณัฐพงศ์ ดวงทุมเมศ



นายชนพล ภู่แกมแก้ว



นายสุรภัทร ปัญญาพิสิทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ภายนอก

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้