

การสกัดโพแทสเซียมซัลเฟตจากกากน้ำตาล  
ด้วยระบบการสกัดด้วยน้ำที่มีสารเติมแต่ง

EXTRACTION OF POTASSIUM SULFATE FROM MOLASSES  
USING AQUEOUS TOW-TRASH SYSTEM WITH SALT ADDITIVE

จตุมาต ใจบัวรัตน์  
JUTAMART BOJSATRATS

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของรายงานการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยี  
อาหาร

สาขาวิชาเทคโนโลยี

อาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

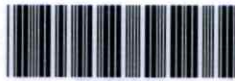
พ.ศ. 2555

KMUTT-2012-SC-11-012-017

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสกัดเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว  
ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้เกลือเป็นสารเติมแต่ง

**EXTRACTION OF BENZOATE IN RICE PRODUCTS  
USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM WITH SALT ADDITIVE**

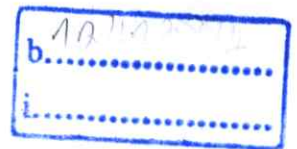


T123003

จุฑามาศ โรจน์สัตตรัตน์

JUTAMART ROJSATRATS

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน.....123003  
วัน,เดือน,ปี.....10 ต.ค. 2555



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-SC-M-012-017

**EXTRACTION OF BENZOATE IN RICE PRODUCT  
USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM WITH SALT ADDITIVE**

**JUTAMART ROJSATRATS**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2012  
KMITL-2012-SC-M-012-017**

**COPYRIGHT 2012**

**FACULTY OF SCIENCE**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสกัดเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้เกลือเป็นสารเติมแต่ง  
Extraction of Benzoate in Rice Products Using Aqueous Two-Phase System with Salt Additive

นักศึกษา นางสาวจุฑามาศ โรจนสัตตรัตน์  
รหัสประจำตัว 52651106  
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชา เคมี  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.เสาวภาคย์ อีราทรง	เสาวภาคย์ อีราทรง
ดร.ณัฐวุฒิ เริงชัย	ณัฐวุฒิ เริงชัย
ดร.งามเนตร วรกิจเจริญชัย	งามเนตร วรกิจเจริญชัย
ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ	วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 11 พฤษภาคม พ.ศ. 2555 เวลา 10.00 - 12.00 น.  
สถานที่สอบ ณ ห้อง 316 ชั้น 3 อาคารปฏิบัติการใหม่

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุชนิ ธนะบริพัตน์)  
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 31 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 55

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้เกลือเป็นสารเติมแต่ง
นักศึกษา	นางสาวจุฑามาศ โรจน์สัตตรัตน์
รหัสประจำตัว	52651106
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมี (เคมีวิเคราะห์)
พ.ศ.	2555
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการสกัดเบนโซเอทในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี การสกัดอาศัยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous Two-Phase Systems : ATPS) ที่มีองค์ประกอบของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ร่วมกับสารเติมแต่งเกลืออนินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง คือ เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ศึกษาผลที่เกิดจากการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG / (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / H<sub>2</sub>O ศึกษาความเข้มข้นที่ใช้ในการสกัดจากแผนภาพวัฏภาค (phase diagram) ของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคด้วยวิธีการไทเทรตแบบ turbidimetric ปริมาตรที่เหมาะสมในการสกัดเบนโซเอท คือ 5 : 8 : 5 (สารละลายตัวอย่าง : สารละลาย PEG4000 (50%w/v) : สารละลาย (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ผสม NaCl (1 + 1.8 โดยน้ำหนัก) (40%w/v)) เตรียมตัวอย่างโดยนำผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวมาหั่นให้ละเอียดแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ นำมาสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคโดยใช้สารละลายตัวอย่าง 5.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PEG4000 (50%w/v) 8.0 มิลลิลิตร และสารละลาย (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ผสม NaCl (1 + 1.8) (40%w/v โดยน้ำหนัก) 5.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองเขย่าสารละลายให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายวัฏภาคบนที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 - 400 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณเบนโซเอทโดยอาศัย baseline technique จากสมการ  $Abs_{269.5} - [(Abs_{266} + Abs_{275.5})/2]$  จากผลการทดลองพบว่า ระบบการสกัดนี้ให้ประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอทเท่ากับ  $89.96 \pm 0.76\%$  มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50 - 800 มิลลิกรัมต่อลิตร ( $y = 0.000171x - 0.002678; r^2 = 0.9991$ ) ให้ร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ในช่วง 90.45 - 105.38% เทคนิคการสกัดที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้

วิเคราะห์หาเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวได้ เช่น เส้นขนมจีน เส้นก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็ก เส้นใหญ่ เส้นหมี่ และแผ่นก๋วยจั๊บ เป็นต้น

**คำสำคัญ :** การสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค, เบนโซเอท, ผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว, สารเติมแต่งเกลือ, สเปกโทรโฟโตเมทรี

<b>Thesis Title</b>	Extraction of Benzoate in Rice Products Using Aqueous Two-Phase System with Salt Additive
<b>Student</b>	Miss Jutamart Rojsatrats
<b>Student ID</b>	52651106
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Chemistry (Analytical Chemistry)
<b>Year</b>	2012
<b>Thesis Advisor</b>	Dr. Wiboon Praditweangkum

### ABSTRACT

A new approach has been developed for separation and spectrophotometric determination of benzoate in rice product. The extraction in this method is based on aqueous two-phase system (ATPS) of polyethylene glycol (PEG) /  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  with salt additives. The effect of added salt, NaCl, on the PEG4000 /  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aqueous two-phase system was investigated. Phase diagrams of this aqueous two-phase system were determined by turbidimetric titration method. ATPS of sample solution : 50%(w/v) PEG 4000 : 40%(w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + NaCl (1 + 1.8 by weight) by a volume ratio 5:8:5 was selected for extraction of benzoate. Sample of rice product was chopped into small pieces and dissolved with 1.0 M NaOH solution. 5.0 mL of this prepared solution was mixed with 8.0 mL of PEG4000 solution (50%w/v) and 5.0 mL of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + NaCl solution (1 + 1.8 by weight) (40%w/v) in a test tube. After phase separation was completed, the upper PEG-rich phase was spectrophotometrically measured. Spectrum of the upper phase was scanned from 200 to 800 nm. The corrected absorbance,  $\text{Abs}_{269.5} - [(\text{Abs}_{266} + \text{Abs}_{275.5})/2]$ , was calculated using baseline technique. The extraction efficiency of benzoate at  $89.96 \pm 0.76\%$  was obtained. The calibration curve was linear from 50 to 800 mg/L ( $y = 0.000171x - 0.002678$ ;  $r^2 = 0.9991$ ). The recovery of 90.45 – 105.38% was observed. This optimized method was applied for determination of benzoate in various types of rice products.

**Keyword:** aqueous two-phase extraction, benzoate, rice products, salt additives, spectrophotometry

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ ที่ได้กรุณาเสียสละเวลาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ข้อคิดเห็น และเป็นกำลังใจ ตลอดจนพิจารณา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้สมบูรณ์

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.เสาวภาคย์ ชีราทรง ประธานกรรมการในการสอบ วิทยานิพนธ์ ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น และ ดร.งามเนตร วรกิจเจริญชัย กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไขพร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะ ข้อคิดเห็นในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จน สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ของสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคาร ตลอดจนเพื่อน พี่ น้อง นักศึกษาปริญญาโท สาขาเคมี(เคมีวิเคราะห์) ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

จุฬามาศ โรจน์สัตตรัตน์

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	IV
สารบัญ.....	V
สารบัญตาราง.....	XI
สารบัญรูป.....	XV
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและการดำเนินงาน.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous two-phase systems, ATPS).....	4
2.1.1 แผนภาพวัฏภาค (Phase diagram).....	7
2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค .....	14
2.2 ผลึกภัณฑ์จากข้าว.....	17
2.2.1 ประเภทผลึกภัณฑ์แปรรูปจากข้าว.....	17
2.2.2 ผลึกภัณฑ์เส้นและแผ่น.....	19
2.3 วัตถุกันเสีย (Preservatives).....	21
2.3.1 ชนิดของวัตถุกันเสียที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร.....	22
2.3.2 กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท.....	23
2.4 ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี.....	26
2.5 การหาปริมาณกรดเบนโซอิก.....	28
2.5.1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultraviolet absorption method).....	28
2.5.2 วิธีการไทเทรตกรด-เบส (Acid-Base titration method).....	30

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	39
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	39
3.1.1 สารเคมี.....	39
3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	39
3.2 การเตรียมสารละลาย.....	40
3.2.1 สารละลายโพลิเอททิลีน ไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1500 4000 และ 8000 (PEG 1500 4000 และ 8000) ที่เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w).....	40
3.2.2 สารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) ที่เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w).....	40
3.2.3 สารละลายเกลือผสมแอมโมเนียมซัลเฟตกับ โซเดียมคลอไรด์ ในอัตราส่วนต่างๆ คือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่อโซเดียมคลอไรด์เป็น 1:1.8 และ 2:1 ที่เข้มข้นต่างๆ เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w).....	40
3.2.4 สารละลายโพลิเอททิลีน ไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1500 4000 และ 8000 (PEG 1500 4000 และ 8000) ที่เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v).....	40
3.2.5 สารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) ที่เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v).....	41
3.2.6 สารละลายเกลือผสมแอมโมเนียมซัลเฟตกับ โซเดียมคลอไรด์ ในอัตราส่วนต่างๆ คือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่อโซเดียมคลอไรด์เป็น 1:1.8 และ 2:1 ที่เข้มข้นต่างๆเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v).....	41
3.2.7 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นเข้มข้น 6 โมลาร์.....	41
3.2.8 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 6 โมลาร์.....	41
3.2.9 สารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร.....	41

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.10	สารละลายมาตรฐาน โปแทสเซียมซอร์เบทเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร.....	42
3.2.11	สารละลายมาตรฐาน โซเดียมซัลไฟด์เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร.....	42
3.3	วิธีการดำเนินการทดลอง.....	42
3.3.1	การศึกษาผลการละลายของเกลือ.....	42
3.3.2	การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	44
3.3.3	การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วย ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	44
3.3.4	การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	45
3.3.5	การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve).....	48
3.3.6	การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์.....	48
3.3.7	การศึกษาเวลาในการแยกวัฏภาค.....	51
3.3.8	การวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว.....	51
3.3.9	วิธีมาตรฐานของ AOAC ข้อ 47.3.03.....	52
บทที่ 4	ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	54
4.1	ผลการศึกษาการละลายของเกลือ.....	54
4.2	ผลการศึกษาแผนภาพวัฏภาคของการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	56
4.3	ผลการศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วยระบบ สารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	59
4.4	ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	59
4.4.1	ผลการศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลโพลีเอททิลีนไกลคอล.....	60
4.4.2	ผลการศึกษาผลของชนิดเกลือ.....	62
4.4.3	ผลการศึกษาผลของปริมาตรเกลือเพื่อหาปริมาตรที่เหมาะสมในการสกัด.....	64
4.4.4	ผลการศึกษาผลของปริมาตรโพลีเอททิลีนไกลคอลเพื่อหาปริมาตรที่เหมาะสม ในการสกัด.....	65
4.4.5	ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นของกรด-ด่างที่มีต่อการสกัดเบนโซเอท.....	67
4.4.6	ผลการศึกษาผลรบกวนของโปแทสเซียมซอร์เบท และ โซเดียมซัลไฟด์.....	69

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์.....	73
4.5.1 ผลการทดสอบพิสัยและความเป็นเส้นตรง (Range and Linearity).....	73
4.5.2 ผลขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และผลขีดจำกัด ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantification, LOQ).....	75
4.5.3 ผลความเที่ยง (Precision).....	75
4.5.4 ผลความแม่นยำ (Accuracy).....	76
4.6 ผลการศึกษาเวลาในการแยกวัฏภาค.....	77
4.7 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว.....	80
4.8 ผลการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้น.....	81
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	82
เอกสารอ้างอิง.....	84
ภาคผนวก.....	89
ภาคผนวก ก. การศึกษาการละลายของเกลือ.....	90
ภาคผนวก ข. การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) เกลือ และน้ำ.....	93
ข.1 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) เกลือโซเดียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (40%w/w) และน้ำ.....	93
ข.2 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30%w/w) และน้ำ.....	94
ข.3 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w) และน้ำ.....	94

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

- ข.4 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w) และน้ำ.....95
- ข.5 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 4000 (40%w/w) เกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (40%w/w) และน้ำ.....95
- ข.6 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30%w/w) และน้ำ.....96
- ข.7 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w) และน้ำ.....96
- ข.8 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1.8:1) (30%w/w) และน้ำ.....97
- ข.9 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 4000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w) และน้ำ.....97
- ข.10 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30%w/w) และน้ำ.....98
- ข.11 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1) (30%w/w) และน้ำ.....98

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ข.12 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w) และน้ำ.....	99
ข.13 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1.8:1) (30%w/w) และน้ำ.....	99
ข.14 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w) และน้ำ.....	100
ข.15 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1.8:1) (40%w/w) และน้ำ.....	100
ภาคผนวก ค. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์.....	101
ค.1 ผลการคำนวณค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) ของโซเดียมเบนโซเอท.....	101
ค.2 ผลการคำนวณค่าขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของโซเดียมเบนโซเอท.....	102
ค.3 การคำนวณค่าความเที่ยง (precision) .....	103
ค.4 การคำนวณค่าความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีทดสอบ.....	105
ภาคผนวก ง. การคำนวณหาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างจริง.....	107
ง.1 ผลการคำนวณหาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างจริง.....	107
ง.2 ผลเวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาคของการสกัดเบนโซเอทด้วยระบบที่พัฒนาขึ้น และระบบเดิม.....	108
ง.3 ผลการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้น.....	112
ภาคผนวก จ. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง วัตถุเจือปนในอาหาร.....	116
ภาคผนวก ฉ. วิธีมาตรฐานของ AOAC ข้อ 47.3.03 สำหรับการหาปริมาณกรดเบนโซอิก.....	120
ประวัติผู้เขียน.....	121

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous two-phase systems, ATPS).....	4
2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	13
2.3 เวลาโดยประมาณสำหรับการแยกวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของระบบต่างกัน.....	16
2.4 การละลายของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท.....	24
2.5 แสดงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอท ด้วยเทคนิคต่างๆ.....	33
3.1 การศึกษาหาการละลายที่เหมาะสมของเกลือ ในอัตราส่วนและความเข้มข้นต่างๆ.....	42
3.2 น้ำหนักของสารละลายเกลือและสารละลายโพลิเอททิลีน ไกลคอลสำหรับเตรียมระบบ สารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	44
4.1 แสดงผลการศึกษาการละลายของเกลือ ในอัตราส่วนและช่วงความเข้มข้นต่างๆ.....	54
4.2 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของโพลิเอททิลีน ไกลคอล ชนิดและความเข้มข้นของ เกลือที่ใช้ในการศึกษาต่อไป.....	58
4.3 แสดงผลของน้ำหนักโมเลกุลโพลิเอททิลีน ไกลคอลและชนิดสารละลายเกลือต่อประสิทธิภาพ การสกัด (n=3).....	61
4.4 แสดงผลของปริมาตรเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อ ประสิทธิภาพการสกัด ซึ่งมีองค์ประกอบของสารละลายโพลิเอททิลีน ไกลคอล (n=3).....	64
4.5 แสดงผลของปริมาตรโพลิเอททิลีน ไกลคอลต่อประสิทธิภาพการสกัด ซึ่งมีองค์ประกอบของ สารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (n=3).....	66
4.6 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง และประสิทธิภาพการสกัดของสารละลายโซเดียมเบนโซเอทความ เข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นต่างๆ (n=3).....	67
4.7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (n = 10).....	70
4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอท เมื่อมีการรบกวนจากสารละลายโพแทสเซียม ซอร์เบท.....	71
4.9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอท เมื่อมีการรบกวนจากสารละลายโซเดียมซัลไฟด์.....	72

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.10 แสดงระดับปริมาณสารบกพร่องที่สามารถพบอยู่ในสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้โดยไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไป (Tolerance limit)...73	
4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3).....75	
4.12 แสดงค่าความเที่ยงในการหาปริมาณสารละลายมาตรฐานเบนโซเอท.....76	
4.13 แสดงผลค่าความแม่นยำในการทดสอบสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท.....77	
4.14 แสดงผลการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาคของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น และระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแบบเดิม.....78	
4.15 แสดงผลการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาคของตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น และระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแบบเดิม.....78	
4.16 แสดงปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวต่างๆ.....80	
4.17 แสดงผลการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐาน....81	
ก.1 ผลการศึกษาการละลายของเกลือ.....90	
ข.1 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) เกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (40%w/w) .....93	
ข.2 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30%w/w) .....94	
ข.3 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w) .....94	
ข.4 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w) .....95	

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข.5 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (40%w/w) เกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (40%w/w) .....	95
ข.6 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30%w/w) .....	96
ข.7 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w) .....	96
ข.8 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1.8:1) (30%w/w) .....	97
ข.9 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w) .....	97
ข.10 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30%w/w) .....	98
ข.11 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1) (30%w/w) .....	98
ข.12 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w) .....	99
ข.13 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1.8:1) (30%w/w) .....	99

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แผนภาพวัฏภาคแบบสามเหลี่ยมด้านเท่าของระบบที่ประกอบด้วยเด็กซ์แทรน 70-พีคอลล 400- น้ำ.....	8
2.2 แผนภาพวัฏภาคของการผสมพอลิเมอร์ชนิด P และ Q ในน้ำ.....	8
2.3 แผนภาพวัฏภาคแบบสามเหลี่ยมมุมฉากของระบบที่ประกอบด้วยเด็กซ์แทรน 70-พีคอลล 400- น้ำ ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส.....	9
2.4 แผนภาพวัฏภาคที่วัฏภาคบนเป็นพอลิเมอร์ Y และวัฏภาคล่างเป็นพอลิเมอร์ X หรือเกลือ.....	10
2.5 แสดงลักษณะของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของพอลิเมอร์ (โพลีเอททิลีน ไกลคอลล) กับเกลืออนินทรีย์ (แอม โมเนียมซัลเฟต).....	11
2.6 แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของโพลีเอททิลีน ไกลคอลล - แอม โมเนียมซัลเฟต - น้ำ โดยโพลีเอททิลีน ไกลคอลลมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน.....	14
2.7 แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของโพลีเอททิลีน ไกลคอลล 6000 - เกลือ ต่างชนิดกัน.....	15
2.8 สูตรโครงสร้างของกรดเบน โซอิก (ก) และเกลือเบน โซเอท (ข).....	24
2.9 แสดงกลไกในการขจัดความเป็นพิษของกรดเบน โซอิก.....	25
2.10 แสดงคลื่นแสงที่มีความเข้ม ( $I_0$ ) ถูกดูดกลืนจากสารทำให้ความเข้มของคลื่นแสงลดลง (I) และถูกส่งผ่านออกมา.....	26
2.11 แสดงลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของกรดเบน โซอิก เมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์.....	29
4.1 แสดงแผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG 1500 - เกลืออนินทรีย์หรือเกลืออนินทรีย์ร่วมกับ สารเติมแต่งเกลือ - น้ำ.....	57
4.2 แสดงสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบน โซเอทในชั้น โพลีเอททิลีน ไกลคอลล.....	59
4.3 แสดงผลของน้ำหนักโมเลกุล โพลีเอททิลีน ไกลคอลลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบน โซเอท โดยใช้สารละลายเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$ (1:1.8).....	61
4.4 แสดงผลของชนิดเกลือต่อประสิทธิภาพการสกัดเบน โซเอทโดยใช้สารละลาย PEG 1500 PEG 4000 และ PEG 8000.....	63
4.5 แสดงผลของปริมาตรเกลือแอม โมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ต่อประสิทธิภาพการสกัดเบน โซเอทความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีองค์ประกอบ ของสารละลายโพลีเอททิลีน ไกลคอลล.....	65

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6	แสดงผลของปริมาตรโพลิเอททิสีน ไกลคอลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอท ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์.....66
4.7	แสดงค่าประสิทธิภาพการสกัดของสารละลายโซเดียมเบนโซเอทความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นต่างๆ.....69
4.8	แสดงแผนภูมิควบคุมของค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอท เมื่อมีการรบกวนจากสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบทในช่วงความเข้มข้น 25-200 มิลลิกรัมต่อลิตร.....71
4.9	แสดงแผนภูมิควบคุมของค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอท เมื่อมีการรบกวนจากสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ในช่วงความเข้มข้น 5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร.....72
4.10	แสดงสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทในชั้นโพลิเอททิสีน ไกลคอล ในช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร และกราฟมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ในช่วงความเข้มข้น 50 – 800 มิลลิกรัมต่อลิตร.....74
4.11	แสดงการแยกวัฏภาคของตัวอย่างนมจืดที่เวลาต่างๆ ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแบบเดิม.....79
4.12	แสดงการแยกวัฏภาคของตัวอย่างนมจืดที่เวลาต่างๆ ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น.....79

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในอุตสาหกรรมการผลิต “ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว” เช่น เส้นขนมจีน เส้นหมี่ เส้นก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็กและเส้นใหญ่ จะมีความชื้นเกิดขึ้นมากกว่าร้อยละ 62 จึงเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้สามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิห้องได้เพียง 1-2 วัน [1] เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษานานขึ้นจึงมีการเติมวัตถุกันเสีย เช่น กรดเบนโซอิกหรือเกลือเบนโซเอทลงในผลิตภัณฑ์เพราะวัตถุกันเสียชนิดนี้มีราคาถูกและยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 281) พ.ศ. 2547 เรื่อง “วัตถุเจือปนอาหาร” กำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปจากข้าวต้องได้ตามมาตรฐานทั่วไปของโคเด็กซ์ โดยระบุให้มีปริมาณกรดเบนโซอิกหรือเกลือเบนโซเอทไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [2] โดยปกติปริมาณที่ควรบริโภคต่อวัน (Acceptable Daily Intake, ADI) เท่ากับ 0-5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม [3] และเมื่อคินน้ำหนักเฉลี่ยของคนไทย 50 กิโลกรัม จะพบว่าไม่ควรบริโภควัตถุกันเสียชนิดนี้เกิน 250 มิลลิกรัมต่อวัน แต่เนื่องจากวัตถุกันเสียชนิดนี้นิยมใช้ในอาหารหลายชนิด ผู้บริโภคจึงมีความเสี่ยงต่อการได้รับวัตถุกันเสียสูงเกินกว่าค่า ADI

การหาปริมาณกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอทสามารถทำได้หลายวิธี ตามวิธีมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ข้อ 47.3.03 เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีหลายขั้นตอน และต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมากในการสกัด [4] ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous two-phase system : ATPS) เป็นวิธีการสกัดของเหลวด้วยของเหลวที่ได้รับความนิยมในเรื่องของวิธีการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย และไม่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัด เป็นระบบที่ทำได้ง่ายมีประสิทธิภาพในการสกัดสูง ซึ่งสารละลายน้ำสองวัฏภาคมีด้วยกัน 2 ระบบ คือ ระบบที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิด และระบบที่เป็นพอลิเมอร์หนึ่งชนิดร่วมกับเกลือ โดยการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสามารถทำให้สารวิเคราะห์บริสุทธิ์หรือเข้มข้นขึ้น เนื่องจากการเลือกที่จะละลายในวัฏภาคใดวัฏภาคหนึ่งมากกว่าอีกวัฏภาคหนึ่ง ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของระบบ เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์หรือเกลือ ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะมีแรงดึงดูดระหว่างวัฏภาคต่ำ [5] เมื่อมีการกวนระบบเกิดขึ้นทำให้หยดของวัฏภาคมีขนาดเล็กกลงและมีพื้นที่ผิวสัมผัสของวัฏภาคมากขึ้น ทำให้ลดปัญหาเรื่องการถ่ายเทมวลในขั้นตอนการสกัดได้

ได้มีงานวิจัยที่นำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมาประยุกต์ใช้กับการสกัดเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว [6] แต่ยังไม่ได้มีการใช้สารเติมแต่งเกลือในระบบสารละลายน้ำ

สองภูมิภาค ข้อดีของสารเติมแต่งเกลือ คือ ลดการใช้เกลืออนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในระบบ ใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์และเกลือในการเกิดระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาคน้อยลง ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ช่วยให้ประหยัดเวลามากขึ้นเนื่องจากในการเตรียมตัวอย่างโดยทั่วไปนั้นจะมีการเติมเกลือลงไปเพื่อให้แข็งตกตะกอนก่อน ประหยัดค่าใช้จ่าย ให้ประสิทธิภาพในการสกัดเบนโซเอทเทียบเท่า หรือมากกว่าระบบที่ไม่เติมสารเติมแต่งสำหรับเกลืออนินทรีย์บางชนิด งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาวิธีการสกัดเบนโซเอทในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวด้วยระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาคร่วมกับการใช้สารเติมแต่งเกลือ โดยใช้โพลีเอทิลีน ไกลคอล (Polyethylene glycol: PEG) กับเกลืออนินทรีย์ เป็นองค์ประกอบหลักในระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาค และตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาคระหว่างสารละลายโพลีเอทิลีน ไกลคอลและสารละลายเกลือร่วมกับสารเติมแต่งเกลืออนินทรีย์
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกและประสิทธิภาพในการสกัดเบนโซเอทของระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาคระหว่างสารละลายโพลีเอทิลีน ไกลคอลและสารละลายเกลือร่วมกับสารเติมแต่งเกลืออนินทรีย์
3. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาคระหว่างสารละลายโพลีเอทิลีน ไกลคอลและสารละลายเกลือร่วมกับสารเติมแต่งเกลืออนินทรีย์ โดยทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาวิธีการสกัดเบนโซเอทในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว โดยระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาคของสารละลายพอลิเมอร์ คือ โพลีเอทิลีน ไกลคอล ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1500 4000 และ 8000 กับสารละลายเกลือชนิดต่างๆร่วมกับสารเติมแต่งเกลืออนินทรีย์ คือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ( $\text{NaHCO}_3$ ) และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) โดยทำการศึกษาดังนี้

1. ศึกษาการละลายของเกลืออนินทรีย์ และแผนภาพภูมิภาคของระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาคที่มีองค์ประกอบของสารเติมแต่งเกลือชนิดต่าง ๆ คือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ( $\text{NaHCO}_3$ ) และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อแผนภาพภูมิภาคและประสิทธิภาพการสกัด น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของโพลีเอทิลีน ไกลคอล ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายเกลือ ชนิดและความ

เข้มข้นของสารเคมีแต่งเกลืออนินทรีย์ ปริมาตรโพธิ์เอททีลินไกลคอลและเกลือ ความเป็นกรด-ด่างของระบบ การรบกวนของโพแทสเซียมซอร์เบทและโซเดียมซัลไฟด์ และเวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาค

3. ศึกษาการสกัดเบนโซเอทจากระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคและตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี และพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงโดยอาศัย baseline technique

4. ศึกษาคุณลักษณะของวิธีการสกัดในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค โดยใช้ข้อมูลทางสถิติ คือ ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ ขีดจำกัดในการตรวจวัด ขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ ความแม่นยำ และความเที่ยง

5. วิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวด้วยวิธีการสกัดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้นและเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน AOAC

#### 1.4 ขั้นตอนการวิจัยและการดำเนินงาน

1. ค้นหาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. ศึกษาแผนภาพวัฏภาคระหว่างสารละลายพอลิเมอร์และสารละลายเกลือร่วมกับสารเคมีแต่งเกลืออนินทรีย์เพื่อหาความเข้มข้นและปริมาตรที่เหมาะสมในการสกัด
3. นำระบบการสกัดที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการสกัดแยกและหาปริมาณเบนโซเอท
4. หาคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์
5. ทดสอบความถูกต้องของวิธีการสกัดหาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโดยเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน

#### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เหมาะสมสำหรับสกัดแยกและวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอท โดยใช้เกลืออนินทรีย์เป็นสารเคมีแต่งที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเบนโซเอท ลดการใช้สารละลายพอลิเมอร์และสารละลายเกลือในระบบหลัก และประหยัดเวลาในการเตรียมตัวอย่าง
2. ได้วิธีการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในการหาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวเพื่อควบคุมปริมาณวัตถุกันเสียในอาหาร
3. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ไปประยุกต์ใช้ในงานประจำ ทดแทนการใช้วิธีมาตรฐานซึ่งมีความยุ่งยากได้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous two-phase systems, ATPS) [7-8]

การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Liquid - liquid extraction) เป็นวิธีการแยกสารผสมที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งละลายอยู่ในตัวทำละลายชนิดหนึ่ง และทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งที่สามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีกว่าและไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายชนิดแรก ควรมีจุดเดือดต่ำ ระเหยได้ง่าย และไม่เป็นพิษ

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ATPS) เป็นระบบหนึ่งของการสกัดของเหลวด้วยของเหลว เป็นที่รู้จักมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1896 มี 2 ระบบ คือ ระบบที่เป็นพอลิเมอร์ 2 ชนิด และ ระบบที่เป็นพอลิเมอร์กับเกลือ โดยมีน้ำเป็นตัวทำละลายในทั้งสองวัฏภาค ดังนั้นจึงได้สารละลายน้ำสองวัฏภาคที่แยกชั้นกันอยู่ เนื่องจากความแตกต่างกันทางกายภาพและเคมีของวัฏภาค โดยวัฏภาคหนึ่งจะประกอบด้วยพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งอยู่มาก ส่วนพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลือจะประกอบอยู่มากในวัฏภาคที่สอง จากความแตกต่างกันทางกายภาพและเคมีของวัฏภาคทำให้สามารถแยกตัวถูกละลายที่ต้องการสกัดออกจากสารละลายได้ เนื่องจากตัวถูกละลายแต่ละชนิดจะสามารถกระจายและละลายในแต่ละวัฏภาคได้แตกต่างกัน

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคนี้สามารถจำแนกชนิดของระบบได้ตามลักษณะของสารที่ทำให้เกิดการแยกวัฏภาค ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous two-phase systems, ATPS) [9]

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

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Nonionic polymer (P)	Nonionic polymer (Q)
Polyethylene glycol	Polyvinyl alcohol Polyvinylpyrrolidone Dextran Arabinogalactan Hydroxypropyl starch Ficoll
Polyvinyl alcohol	Methylcellulose Hydroxypropyldextran 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

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

<b>Polyelectrolyte (P)</b>	<b>Nonionic polymer (Q)</b>
DEAE dextran-hydrochloric acid	Polypropylene glycol NaCl Polyethylene glycol Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Polyvinyl alcohol Methylcellulose
Casein	Dextran Pectin Ficoll Amylopectin
Sodium carboxymethyldextran	Methoxypolyethylene glycol NaCl Polyethylene glycol NaCl Polyvinyl alcohol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl Ethylhydroxyethylcellulose NaCl Hydroxypropyldextran NaCl
Sodium carboxymethylcellulose	Polypropylene glycol NaCl Methoxypolyethylene glycol NaCl Polyethylene glycol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl

**3. Polyelectrolyte (P) – Polyelectrolyte (Q) - Water**

<b>Polyelectrolyte (P)</b>	<b>Polyelectrolyte (Q)</b>
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

### ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

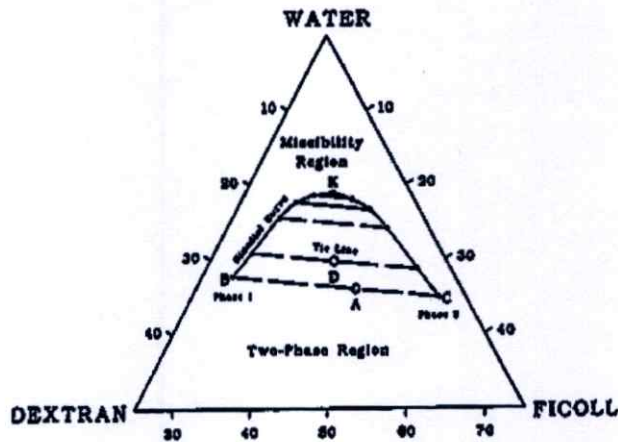
Polyelectrolyte (P)	Polyelectrolyte (Q)
Ovalbumin (pH 6.6)	Soybean globulins Ovalbumin thermotropic aggregates Casein

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, $\beta$ -cyclodextrin
Polyvinylpyrrolidone	Butylcellosolve Potassium phosphate
Polyvinyl alcohol	Butylcellosolve
Dextran	Butylcellosolve Propyl alcohol, Iso-propyl alcohol
Sodium dextran sulphate	Sodium chloride (0°C)

#### 2.1.1 แผนภาพวัฏภาค (Phase diagram) [7-8]

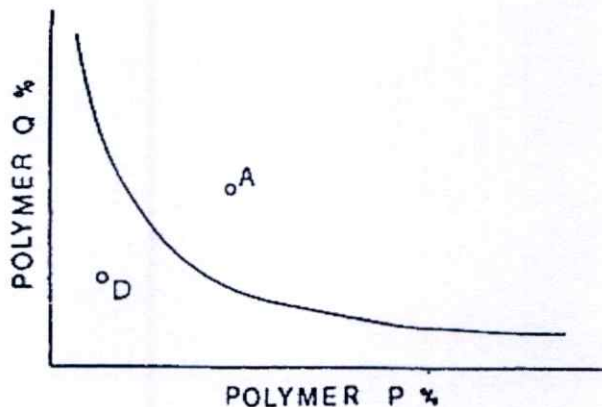
องค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแสดงได้ด้วยแผนภาพวัฏภาค การเขียนแผนภาพวัฏภาคนั้นสามารถเขียนได้ 2 ลักษณะ คือ เขียนแบบสามเหลี่ยมด้านเท่า และเขียนแบบสามเหลี่ยมมุมฉาก การเขียนแผนภาพวัฏภาคแบบสามเหลี่ยมด้านเท่า (รูปที่ 2.1) จุดปลายของสามเหลี่ยมในแผนภาพวัฏภาค คือ พอลิเมอร์ทั้งสองชนิด (ฟิคอลและเด็กซ์แทรน) และตัวทำละลาย (น้ำ) จุดต่างๆ ที่อยู่ภายในพื้นที่สามเหลี่ยมจะแสดงถึงของผสม 3 องค์ประกอบ ซึ่งผลบวกขององค์ประกอบในแต่ละจุดที่แสดงในแผนภาพวัฏภาคนี้นี้จะมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์เสมอ โดยทั่วไปแล้วองค์ประกอบดังกล่าวจะแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

การเขียนแผนภาพวัฏภาคในลักษณะที่เป็นแกนมุมฉาก (รูปที่ 2.2) จะนิยมใช้มากกว่าแบบแรก โดยแกน y (แนวตั้ง) จะแสดงเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์ที่มีมากในวัฏภาคบน ส่วนแกน x (แนวนอน) แสดงเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลือ ที่มีมากในวัฏภาคล่าง ดังนั้นทุกจุดบนแผนภาพวัฏภาคจะมีค่าโดยน้ำหนักเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์เสมอ แผนภาพวัฏภาครูปแกนมุมฉาก จะไม่แสดงความเข้มข้นของตัวทำละลายน้ำ ซึ่งแตกต่างจากแผนภาพวัฏภาครูปสามเหลี่ยมด้านเท่า



รูปที่ 2.1 แผนภาพวัฏภาคแบบสามเหลี่ยมด้านเท่าของระบบที่ประกอบด้วยเด็กซ์แทรน 70-ฟิคอล 400-น้ำ [9]

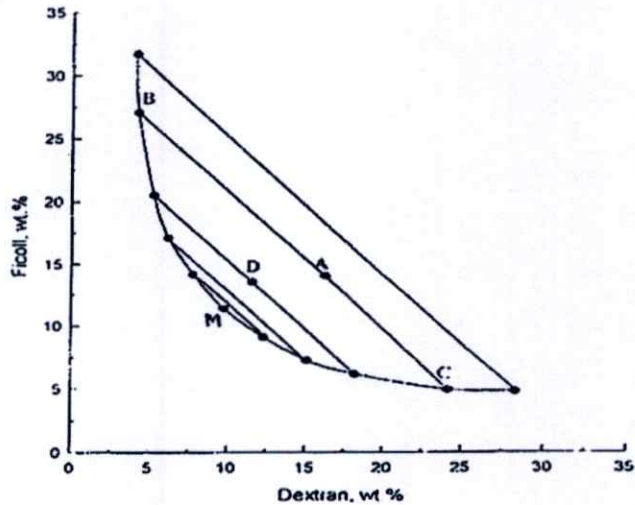
เมื่อผสมพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำกับพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลือ องค์ประกอบของสารในแต่ละวัฏภาค และช่วงของความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดที่ทำให้เกิดการแยกวัฏภาคสามารถอธิบายได้จากแผนภาพวัฏภาค [7,10] ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แผนภาพวัฏภาคของการผสมพอลิเมอร์ชนิด P และ Q ในน้ำ [10]

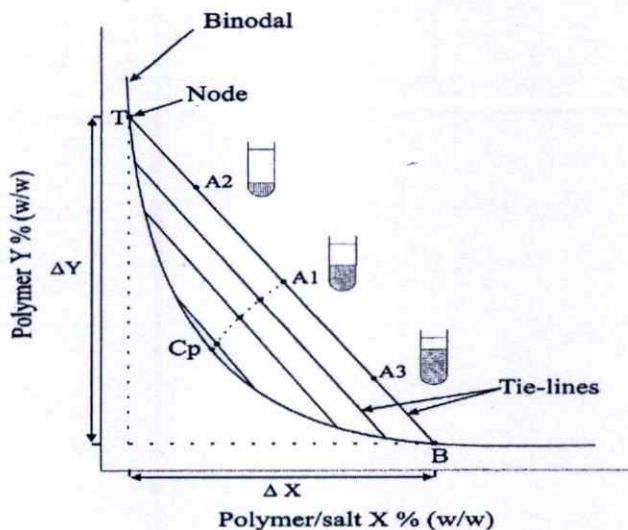
เมื่อผสมพอลิเมอร์ P และ Q ในน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน จะได้กราฟเส้นโค้ง ดังแสดงในรูปที่ 2.2 เรียกเส้นโค้งนี้ว่า เส้นแบ่งวัฏภาค (binodal curve) โดยที่เส้นโค้งดังกล่าวจะเป็นเส้น

แบ่งลักษณะของวัฏภาคที่เกิดขึ้นในระบบ ถ้าสารละลายผสมนี้มีองค์ประกอบอยู่เหนือเส้นโค้ง (จุด A) ระบบนี้จะมีลักษณะเป็นของเหลวสองวัฏภาค ในขณะที่จุด D ซึ่งมีองค์ประกอบของสารละลายผสมอยู่ใต้เส้นโค้ง จะมีลักษณะเป็นของเหลววัฏภาคเดียว [7,10]



รูปที่ 2.3 แผนภาพวัฏภาคแบบสามเหลี่ยมมุมฉากของระบบที่ประกอบด้วยเด็กซ์แทรน 70-ฟิคอล 400-น้ำ ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส [9]

รูปที่ 2.3 แสดงแผนภาพวัฏภาคของระบบเด็กซ์แทรน 70-ฟิคอล 400-น้ำ ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ในวัฏภาคบนจะมีความเข้มข้นของฟิคอลอยู่มาก ส่วนเด็กซ์แทรนจะสะสมอยู่ในวัฏภาคล่าง ซึ่งสารละลายผสม A จะมีองค์ประกอบของวัฏภาคบนเหมือนองค์ประกอบในจุด B และในวัฏภาคล่างจะมีองค์ประกอบเหมือนองค์ประกอบในจุด C เรียกจุด B และ C ว่า nodes เส้นที่เชื่อมระหว่างจุดทั้งสองนี้ คือ เส้นผูก (tie line) สารละลายที่แสดงบนเส้นผูกเดียวกันจะมีองค์ประกอบในแต่ละวัฏภาคเหมือนกัน แต่สัดส่วนเชิงปริมาตรในวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง ( $V_T/V_B$ ) นั้นแตกต่างกัน ดังรูปที่ 2.4 โดยสัดส่วนเชิงปริมาตรดังกล่าวจะมีความสัมพันธ์กับสัดส่วนของเส้นผูก (AB/AC) จุด M ที่อยู่ในรูปที่ 2.3 เรียกว่า จุดวิกฤติ (critical point) จะมีองค์ประกอบและปริมาตรของทั้งสองวัฏภาคไม่แตกต่างกัน สำหรับองค์ประกอบของระบบที่มีค่าใกล้จุด M จะมีความแตกต่างระหว่างวัฏภาคทั้งสองน้อยมาก



รูปที่ 2.4 แผนภาพวัฏภาคที่วัฏภาคบนเป็นพอลิเมอร์ Y และวัฏภาคล่างเป็นพอลิเมอร์ X หรือเกลือ [11]

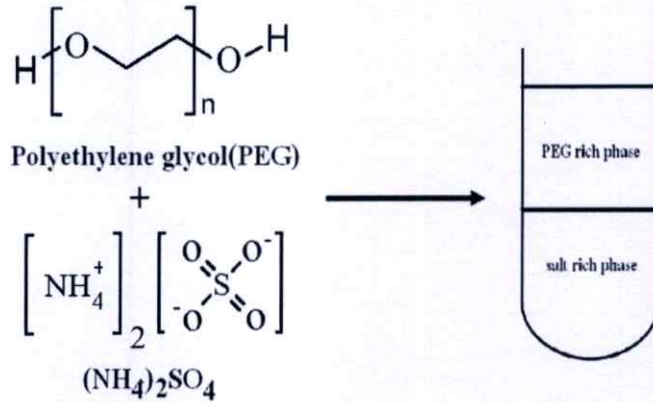
การหาความยาวของเส้นผูก (tie line length, TLL) [7] สามารถหาค่าได้โดยการคำนวณจากความเข้มข้นของพอลิเมอร์หรือเกลือที่มีในแต่ละวัฏภาค ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{TLL} &= \{[C(P)_1 - C(P)_2]^2 + [C(Q)_1 - C(Q)_2]^2\}^{0.5} \\ &= \{[\Delta C(P)]^2 + [\Delta C(Q)]^2\}^{0.5} \end{aligned} \quad (2.1)$$

เมื่อ  $C(P)$  คือ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ P ในวัฏภาคนั้นๆ  
 $C(Q)$  คือ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ Q ในวัฏภาคนั้นๆ  
 ตัวห้อย 1 และ 2 คือ วัฏภาคบนและวัฏภาคล่าง ตามลำดับ  
 $\Delta C(P)$  และ  $\Delta C(Q)$  คือ ความแตกต่างของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ P และ Q ในทั้งสองวัฏภาค

การเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคส่วนใหญ่ที่นิยมใช้ คือ ระบบที่ใช้โพลีเอททิลีนไกลคอลกับเด็กซ์แทรน และระบบที่ใช้โพลีเอททิลีนไกลคอลกับเกลือ ซึ่งในระดับอุตสาหกรรมการใช้ระบบโพลีเอททิลีนไกลคอลกับเด็กซ์แทรนนี้นั้นมีข้อจำกัดเนื่องจากเด็กซ์แทรนมีราคาสูง และทำให้วัฏภาคล่างมีความหนืดค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเกิดเป็นเจล (gel) ทำให้ยากต่อการผลิต ดังนั้นระบบที่ใช้โพลีเอททิลีนไกลคอลกับเกลือ จึงเป็นระบบที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป เนื่องจากเกิดวัฏภาคได้ง่ายกว่าระบบของโพลีเอททิลีนไกลคอลกับเด็กซ์แทรน ในระบบโพลีเอททิลีนไกลคอลกับเกลือ จะมีโพลีเอททิลีนไกลคอลปริมาณมากหรือเกือบทั้งหมดในวัฏภาคบน และเกลือมีมากในวัฏภาคล่าง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเกลื่อยังคงสูงในทั้งสองวัฏภาค โดยเกลือที่เหมาะสมต่อการเกิดวัฏภาคกับโพลีเอททิลีนไกลคอลได้แก่ เกลือฟอสเฟต และเกลือซัลเฟต [7]

รูปแบบโดยทั่วไปของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ โพลีเอททิลีน ไกลคอลกับเกลืออนินทรีย์ สามารถอธิบายบนพื้นฐานการแข่งขันของการไฮเดรชันระหว่างทั้งสององค์ประกอบ [12] การเติมเกลืออนินทรีย์จะเพิ่มดีไฮเดรชันของ โซลโพลิเมอร์ เนื่องจากปรากฏการณ์ salting-out และเกิดการแยกวัฏภาค ด้วยเหตุนี้ จึงเกิดการแยกเป็นสองวัฏภาคที่ไม่ผสมกัน วัฏภาคบนจะมีโพลีเอททิลีน ไกลคอลอยู่มาก เหมือนกับการแยกวัฏภาคของสารอนินทรีย์ในระบบการสกัดแบบเดิม และวัฏภาคล่างจะมีเกลืออนินทรีย์อยู่มาก (รูปที่ 2.5)



**รูปที่ 2.5** แสดงลักษณะของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของพอลิเมอร์ (โพลีเอททิลีน ไกลคอล) กับเกลืออนินทรีย์ (แอม โมเนียมซัลเฟต) [13]

การสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ประกอบด้วยสารละลายที่มีความสามารถในการละลายน้ำในระบบที่เป็นพอลิเมอร์สองชนิด หรือพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งกับเกลือได้แตกต่างกัน โดยโมเลกุลของสารทั้งสองชนิดจะถูกล้อมรอบด้วย โมเลกุลของน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลาย และมีโครงสร้างแตกต่างกันตามพันธะที่เกิดขึ้นกับสารชนิดนั้น ๆ ส่วนที่สามารถผสมกันได้จะเกิดการรวมตัวกัน ในขณะที่ส่วนที่ผสมกันไม่ได้จะทำให้เกิดความขุ่นและเกิดการแยกวัฏภาคขึ้น ระบบจึงมีลักษณะเป็นสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ไม่ผสมกันซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการใช้ตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่ผสมกัน และระบบจะพยายามเข้าสู่สมดุลไม่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้เองตามธรรมชาติ [14]

ลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ ที่ใช้บอกลักษณะที่แตกต่างกันของวัฏภาคทั้งสอง [7] ได้แก่

1. ความมีขั้วของตัวทำละลาย (solvent polarity) ขึ้นกับความเข้มข้นของพอลิเมอร์และเกลือที่มีในวัฏภาค ซึ่งความมีขั้วของวัฏภาคทั้งสองจะแตกต่างกันน้อยลง เมื่อความเข้มข้นของพอลิเมอร์ลดลง ดังนั้นระบบที่ใช้พอลิเมอร์และเกลือต่างชนิดกัน จึงมีความเป็นขั้วต่างกัน ลักษณะของตัวทำละลายในทั้งสองวัฏภาคจึงต่างกันด้วย

2. ความสามารถในการเคลื่อนที่ของน้ำ (water mobility) โดย Zaslavsky (1995) [9] กล่าวว่า วัฏภาคล่างจะมีความสามารถในการเคลื่อนที่ของน้ำระหว่างวัฏภาคทั้งสองวัฏภาคที่มีความเข้มข้นของโพลีเอททิลีน ไกลคอล

โพลีไวนิลไพโรลิโดน และฟิโคลอยู่มาก (มีขั้วน้อย) กับวัฏภาคที่มีความเข้มข้นของเด็กซ์แทรนอยู่  
มาก (มีขั้วมาก) จะมีค่าเท่ากับ  $0.7 \times 10^{-12}$  วินาที ซึ่งแตกต่างจากความสามารถในการเคลื่อนที่ของน้ำ  
บริสุทธิ์ที่มีค่าเท่ากับ  $8.25 \times 10^{-12}$  วินาที แสดงว่าสมบัติของน้ำที่มีพอลิเมอร์ผสมอยู่ในวัฏภาคของ  
ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะแตกต่างจากสมบัติเดิมของน้ำบริสุทธิ์

3. ลักษณะไฮโดรโฟบิกของวัฏภาค มีผลต่อโครงสร้างของน้ำในวัฏภาคทั้งสองของระบบ  
ความแตกต่างของไฮโดรโฟบิกของวัฏภาคขึ้นกับชนิดของพอลิเมอร์และความเข้มข้นของพอลิเมอร์  
ในวัฏภาคทั้งสองด้วย สำหรับระบบที่ใช้พอลิเมอร์และเกลือจะมีค่าไฮโดรโฟบิกของวัฏภาคบน(มี  
โพลีเอททิลีนไกลคอลลอยู่มาก) มากกว่าในวัฏภาคล่าง (มีเกลืออยู่มาก) ซึ่งความแตกต่างของ  
ไฮโดรโฟบิกของวัฏภาคในระบบจะเพิ่มขึ้นดังนี้ เด็กซ์แทรน/ฟิโคล < เด็กซ์แทรน/โพลีไวนิลไพ  
โรลิโดน < เด็กซ์แทรน/โพลีเอททิลีนไกลคอลล < โพลีเอททิลีนไกลคอลล / แอมโมเนียมซัลเฟต  
< โพลีเอททิลีนไกลคอลล / โพแทสเซียมฟอสเฟต < โพลีเอททิลีนไกลคอลล / แมกนีเซียมซัลเฟต  
[9] อย่างไรก็ตามลักษณะไฮโดรโฟบิกของวัฏภาคทั้งสองในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะมีค่า  
แตกต่างกันน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับระบบของน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์

การแยกวัฏภาคที่เกิดขึ้นในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะถูกควบคุมโดยลักษณะของ  
โครงสร้างของน้ำภายในระบบ ความสามารถในการละลายของพอลิเมอร์สองชนิด หรือพอลิเมอร์  
กับเกลือในตัวทำละลายน้ำขึ้นกับพารามิเตอร์ 2 ชนิด คือ ลักษณะโมเลกุลของพอลิเมอร์หรือเกลือ  
(structural parameters) และแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์หรือเกลือกับน้ำ (interaction  
parameter) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของน้ำ จึงทำให้ระบบที่มีพารามิเตอร์ทั้งสอง  
ต่างกันจะเกิดการแยกวัฏภาคต่างกัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่มีผลต่อการรบกวนโครงสร้างของน้ำใน  
ระบบ เช่น อุณหภูมิ ชนิดของตัวถูกละลาย น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ และสารเติมแต่งที่เป็น  
เกลืออนินทรีย์ [7,9] เป็นต้น ดังนั้นปัจจัยดังกล่าวจึงมีอิทธิพลต่อการแยกวัฏภาคของระบบด้วย ซึ่ง  
จะมีแผนภาพวัฏภาคเป็นสิ่งที่ใช้ในการอธิบายโครงสร้างของระบบที่เป็นสองวัฏภาคที่เกิดขึ้น

พฤติกรรมของการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค อธิบายได้ใน 2 กลไก  
[9] ดังนี้

1. การแยกตัวถูกละลาย เกิดจากแรงดึงดูดหรือแรงผลักระหว่าง โมเลกุลของตัวถูกละลาย  
กับพอลิเมอร์ หรือเกลือที่มีวัฏภาค
2. การแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เกิดจากความแตกต่างของแรง  
ดึงดูดระหว่าง โมเลกุลตัวถูกละลายกับสารละลายน้ำในแต่ละวัฏภาคของระบบ

อย่างไรก็ตามลักษณะพื้นฐานของการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค  
จะคล้ายกับระบบน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (aqueous-organic two-phase system) ซึ่งขึ้นกับแรง  
กระทำระหว่าง โมเลกุลของตัวถูกละลายกับตัวทำละลายในระบบ แต่ความแตกต่างเพียงเล็กน้อย  
ของลักษณะตัวทำละลายในวัฏภาคทั้งสองของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคเป็นสิ่งสำคัญในการ

แยกตัวถูกละลายที่มีโครงสร้างที่ไม่แตกต่างกันมากนักได้ จึงเป็นข้อได้เปรียบในการแยกสารที่เฉพาะเจาะจงกว่าระบบอื่น [9]

แรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วกับสารละลายน้ำเป็นแรงแวนเดอร์วาล ส่วนตัวถูกละลายที่มีขั้วจะมีแรงกระทำต่อน้ำซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงสูง เช่น แรงไดโพล-ไดโพล ไดโพล-อินดิวิสต์ไดโพล พันธะไฮโดรเจน ฯลฯ สำหรับตัวถูกละลายหรืออนุภาคทางชีวภาพ ส่วนมากจะถูกแยกในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีประจุ ตัวถูกละลายที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ เช่น เอนไซม์ จะมีแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับตัวทำละลายเป็นแรงทางไฟฟ้าระหว่างไอออน-ไอออน และไอออน-ไดโพล รวมอยู่ด้วย ซึ่งแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับตัวทำละลายที่แตกต่างกันในระบบนี้ จะทำให้พฤติกรรมการแยกของตัวถูกละลายในระบบแตกต่างกันด้วย

พฤติกรรมการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิดด้วยกัน ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการแยกตัวถูกละลายดังกล่าวแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของตัวทำละลายในทั้งสองวัฏภาค และปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของตัวถูกละลายที่มีความสำคัญต่อแรงกระทำระหว่างโมเลกุลตัวถูกละลายกับตัวทำละลายน้ำที่มีในวัฏภาคทั้งสอง [7] ดังแสดงในตารางที่ 2.2

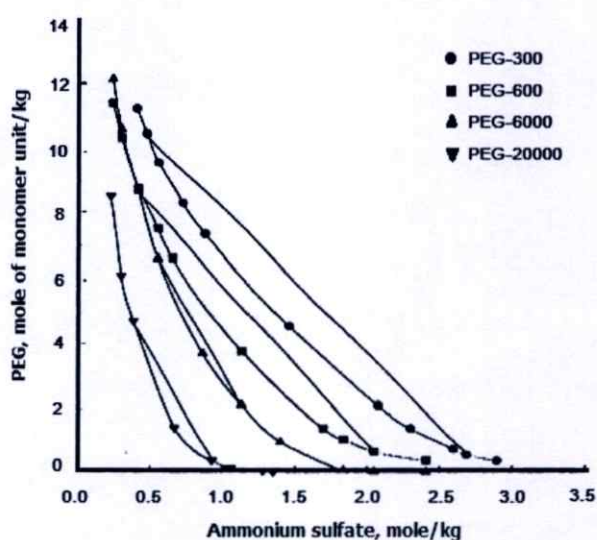
ตารางที่ 2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค [7]

ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของตัวทำละลาย	ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของตัวถูกละลาย
ชนิดของพอลิเมอร์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์	ชนิดของสารเติมแต่ง
ความเข้มข้นของพอลิเมอร์	ความเข้มข้นของสารเติมแต่ง
ชนิดของสารเติมแต่ง	การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารเติมแต่ง
ความเข้มข้นของสารเติมแต่ง	
เวลาในการแยกวัฏภาค	
อุณหภูมิ	

## 2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

### 2.1.2.1 น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของพอลิเมอร์

การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ใช้ในระบบมีผลต่อลักษณะโครงสร้างของน้ำ และแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของสารที่อยู่ในระบบ ซึ่งทำให้ความสามารถในการสกัดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมีความแตกต่างกันไป น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์เป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดลักษณะของวัฏภาค และปฏิสัมพันธ์ต่อผลิตภัณฑ์ ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเปลี่ยนแปลงได้ [7] เมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นจะทำให้ความต้องการความเข้มข้นของเกลือในการแยกวัฏภาคลดลง และถ้ามีความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลระหว่างสองพอลิเมอร์ หรือพอลิเมอร์กับเกลือเพิ่มขึ้น เส้นแบ่งวัฏภาคที่ได้จะไม่สมมาตร [15] ดังรูปที่ 2.6 ซึ่งแสดงแผนภาพวัฏภาคการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่มีผลต่อการแยก

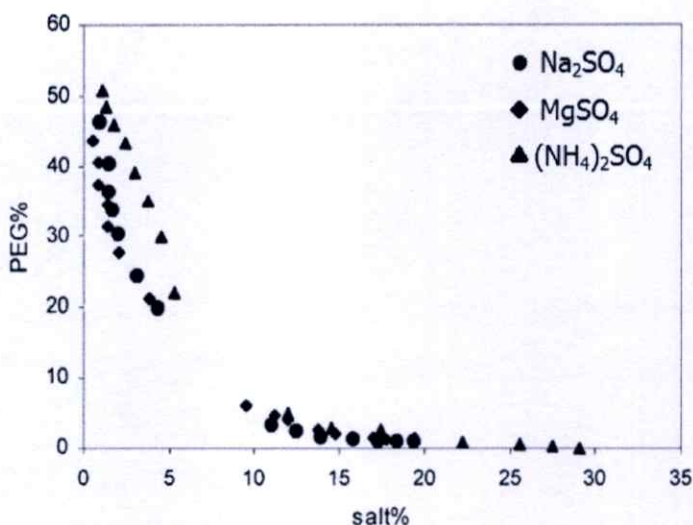


รูปที่ 2.6 แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของโพลีเอทิลีน ไกลคอล - แอมโมเนียม ซัลเฟต - น้ำ โดยโพลีเอทิลีน ไกลคอลมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน [9]

ถ้าพอลิเมอร์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ความแตกต่างของคุณสมบัติระหว่างวัฏภาคทั้งสองจะเพิ่มขึ้น (รวมทั้งเส้นผูก จะยาวขึ้น) อีกทั้งยังทำให้ความหนาแน่น ดัชนีการหักเห (refractive index) และความหนืดนั้นเพิ่มขึ้นด้วย [15]

### 2.1.2.2 ชนิดและความเข้มข้นของเกลือ

ความสามารถของการ salting-out ของเกลือประจุบวกและประจุลบจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดเกลือ ซึ่งเกลือแต่ละชนิดมีผลต่อลักษณะของแผนภาพวัฏภาคและความยาวของเส้นผูก [16] ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของโพลีเอททิลีน ไกลคอล 6000 – เกลือต่างชนิดกัน [16]

พฤติกรรมการแยกวัฏภาคของระบบโพลีเอททิลีน ไกลคอลและเกลือ จะขึ้นอยู่กับชนิดของเกลือ ซึ่งใช้พิจารณารูปแบบของวัฏภาค เกลือที่นิยมนำมาใช้ คือ โพแทสเซียมฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต และโซเดียมคาร์บอเนต [14] การเติมเกลือที่ความเข้มข้นพอเหมาะจะมีผลต่อแผนภาพวัฏภาคของระบบพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ชนิดนอนไอออนิก (nonionic) ซึ่งจะแตกต่างกับพฤติกรรมของวัฏภาคในระบบที่ประกอบด้วยโพลีอิเล็กโทรไลต์ (polyelectrolytes) เช่น ระบบที่เป็นโคเอทิลอะมิโนเอทิลกับเด็กซ์แทรน เกลือไอออนิกจะไม่มีผลต่อองค์ประกอบของระบบ โดยทั่วไประบบที่มีความเข้มข้นของพอลิเมอร์ต่ำ จะทำให้เกิดการแยกวัฏภาคได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือลงไป [15] เมื่อเติมเกลือลงไปในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะทำให้แรงไอออนิก (ionic strength) สูงขึ้น ผลจากการ salting-out จะทำให้วัฏภาคที่มีเกลืออยู่มาก เกิดการตกตะกอนของตัวถูกละลายหรือเกิดการแยกระหว่างวัฏภาคของพอลิเมอร์และเกลือ รวมทั้งสามารถทำให้ตัวถูกละลายเข้าไปในวัฏภาคของพอลิเมอร์มากขึ้น [17]

### 2.1.2.3 ความเป็นกรด-ด่างของระบบ [7]

การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค พบว่ามีผลโดยตรงกับคุณสมบัติของตัวถูกละลาย จะเหนี่ยวนำให้ประจุรวมรวมของโมเลกุลของตัวถูกละลายเปลี่ยนไป ซึ่งส่งผลต่อแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายและโมเลกุลของพอลิเมอร์ หรือเกลือที่มีในวัฏภาคเปลี่ยนแปลงไป เมื่อความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น องค์ประกอบของเกลือที่แตกตัวเป็นไอออนในวัฏภาคล่างถูกสะสมให้มีความหนาแน่นมากขึ้น ส่งผลให้การแยกวัฏภาคเกิดได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ปริมาณน้ำที่ตัวถูกละลายสามารถละลายได้มีน้อยลงจึงถูกผลักไปอยู่ในวัฏภาคบนมากขึ้น เนื่องจากปรากฏการณ์ salting-out จากเหตุผลดังกล่าวจึงส่งผลให้การแยกของตัวถูกละลาย

ต่างชนิดกันในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของพอลิเมอร์กับเกลือแตกต่างกัน ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกันจะให้ค่าที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

#### 2.1.2.4 เวลาในการแยกวัฏภาค [10,15]

เวลาที่ใช้ในการแยกขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ สัดส่วนเชิงปริมาตร อัตราการรวมตัวของหยด (droplets) และรวมทั้งองค์ประกอบของระบบ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 เวลาโดยประมาณสำหรับการแยกวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของระบบต่างกัน [10]

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 -Hydroxypropyl-dextran	$\frac{1}{2}$ - 6 ชั่วโมง
Dextran sulfate- Hydroxypropyl-dextran	$\frac{1}{2}$ - 6 ชั่วโมง

เวลาในการตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกวัฏภาคขึ้นอยู่กับสัดส่วนเชิงปริมาตรของ ทั้งสองวัฏภาค และความหนืดที่แตกต่างกัน ถ้าวัฏภาคหนึ่งมีความหนืดมาก และมีปริมาตรมากกว่า อีกวัฏภาคหนึ่ง เวลาในการตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกวัฏภาคจะใช้เวลาานาน แต่ถ้าหากวัฏภาคหนึ่ง มีปริมาตรเท่ากับหรือน้อยกว่าอีกวัฏภาคหนึ่ง จะใช้เวลาในการแยกวัฏภาคน้อย เช่น ระบบเด็กซ์ แทรนกับ โพลีเอททิลีน ไกลคอล ซึ่งวัฏภาคบนมีความหนืดน้อยกว่าวัฏภาคล่าง เมื่อวัฏภาคล่างมี ปริมาณมากจะใช้เวลาในการแยกมากกว่าวัฏภาคล่างที่มีปริมาตรเท่ากับหรือน้อยกว่าวัฏภาคบน

#### 2.1.2.5 ชนิดของสารเติมแต่ง

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เกิดจากพอลิเมอร์กับเกลือ ที่มีสารเติมแต่งเกลือ ชนิดต่างๆ และมีความเข้มข้นของสารเติมแต่งเกลือต่างกัน ถือว่าเป็นระบบที่แตกต่างกัน อิทธิพล ของสารเติมแต่งเกลือที่เติมลงไปในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การ

แยก เนื่องจากสารเติมแต่งเกลือมีอิทธิพลกับลักษณะของตัวทำละลายในระบบ และคุณสมบัติของ โมเลกุลตัวถูกละลายซึ่งเป็นตัวควบคุมพฤติกรรมแยก แรงแท่งที่กระทำระหว่างโมเลกุลตัวถูกละลายกับเกลือ นั้นมีความเฉพาะเจาะจงแตกต่างกันจึงทำให้ตัวถูกละลายบางชนิดเกิดการแยกดีหรือ แย่ลงเมื่อมีการเติมสารเติมแต่งเกลือลงไป [9] ดังนั้นอิทธิพลของเกลือต่อระบบที่มีความเฉพาะเจาะจงนั้นมีความแตกต่างกันตามลักษณะของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคและตัวถูกละลายหรือผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสกัด

## 2.2 ผลผลิตจากข้าว [18]

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทยมาโดยตลอด เนื่องจากเป็นอาหารหลักของคนไทย และเป็นอาชีพหลักของเกษตรกรในหลายพื้นที่ พื้นที่ถือครองทางการเกษตรกว่าร้อยละ 50 เป็นพื้นที่เพาะปลูกข้าว ผลผลิตข้าวกว่าร้อยละ 55 ใช้บริโภคในประเทศ ส่วนที่เหลือประมาณร้อยละ 45 ส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศทั่วโลก และเนื่องจากผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว มีราคาสูงกว่าข้าวอย่างเด่นชัด แม้ในกลุ่มข้าวคุณภาพดีก็ยังคงมีราคาต่ำกว่าราคาผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว ดังนั้นจึงมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวให้กว้างขวางยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของข้าวให้สูงขึ้น ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ข้าวแปรรูปของไทยในระดับอุตสาหกรรมได้มีการพัฒนาความหลากหลายของชนิดผลิตภัณฑ์เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของตลาดมากขึ้น

### 2.2.1 ประเภทผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว

#### 2.2.1.1 แป้งข้าว (Rice flour)

มีทั้งชนิดแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียว วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตคือ ข้าวหักหรือ ปลายข้าว กรรมวิธีการผลิตมี 3 วิธี คือ วิธีโม่แห้ง วิธีโม่ น้ำและวิธีผสม เป็นผลิตภัณฑ์ใช้ทดแทน แป้งข้าวที่นำเข้าจากต่างประเทศได้ ซึ่งแป้งชนิดนี้จะนำมาใช้ในการผลิตขนมปัง เบเกอรี่ และขนม ขบเคี้ยวต่างๆ

#### 2.2.1.2 ผลิตภัณฑ์เส้นและแผ่น

ผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ได้แก่ ก๋วยเตี๋ยว เส้นหมี่ ขนมหุ้น และแป้งแผ่นหรือใบเมี่ยง ข้าวที่เหมาะสมเป็นข้าวที่มีโมลัสไม่ต่ำกว่า 27 เปอร์เซ็นต์ และควรเป็นข้าวเก่า 3-4 เดือน

#### 2.2.1.3 แป้งบริสุทธิ (Starch)

เป็นแป้งที่ผ่านการแยกส่วนของโปรตีนออกจนมีความบริสุทธิ์ของแป้งสูงมาก การแยกโปรตีนมักแยกด้วยสารละลายของด่าง โซดาไฟหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์หลายๆ ครั้ง และล้างด่างออกด้วยน้ำ หลังจากนั้นจึงแยกน้ำออกและอบแห้ง จากแป้งบริสุทธิที่ได้สามารถนำมาผลิตเป็น

แป้งดัดแปร (modified starch) แป้งประเภทนี้สามารถใช้ในทางเภสัชกรรม เช่น เป็นส่วนประกอบในการผลิตยาเม็ด

#### 2.2.1.4 อาหารประเภทพองกรอบ (Expanded product)

การผลิตอาหารประเภทพองกรอบมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การพองด้วยการย่างบนความร้อน (baking) การพองที่เกิดจากแรงอัดที่อุณหภูมิสูง (extrusion) ใช้ในการผลิตอาหารที่มีการเติมสารอาหารเพื่อเสริมคุณค่าทางโภชนาการ การพองตัวที่เกิดจากแผ่นความร้อน (puffing machine) ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ ได้แก่ rice cake และการพองที่เกิดจากการอบหรือทอดในน้ำมันร้อน (Oven or deep fry puffing) ใช้ผลิตพวก ข้าวตอกซึ่งทำจากข้าวเหนียว ข้าวตังทอด ขนมปังเล็ด เป็นต้น

#### 2.2.1.5 ข้าวกึ่งสำเร็จรูป (Quick cooking rice or instant rice)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้เวลาหุงต้มหรือคั้นรูปสั้น ๆ และด้วยวิธีที่ไม่ยุ่งยาก เมื่อต้องการบริโภคหลังจากคั้นรูปแล้ว ผลิตภัณฑ์ยังคงมีรสชาติ กลิ่น และเนื้อสัมผัสใกล้เคียงกับข้าวที่หุงต้มปกติ ผลิตภัณฑ์ข้าวกึ่งสำเร็จรูปมีหลายรูปแบบ เช่น Cup rice, Standing rice, Simmering rice, Saute rice และ Boil in bag เป็นต้น

#### 2.2.1.6 ข้าวบรรจุกระป๋อง (Canned rice)

เป็นผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องชนิดหนึ่งที่สามารถเก็บไว้ได้นานเช่นเดียวกับอาหารกระป๋องทั่วไป การผลิตแช่ข้าวในสารละลายก่อนข้างเป็นกรด (pH 5.0-5.5) และแช่ข้าวที่สุกบางส่วนใน surfactant ระยะเวลาสั้นๆ เพื่อลดความเหนียวและการเกาะติดกันของข้าวสวย สาร surfactant ที่ใช้อาจเป็นน้ำมัน หรือสารละลายน้ำมัน (oil + emulsifier)

#### 2.2.1.7 อาหารเช้า (Breakfast cereal)

ที่รู้จักกันทั่วไปแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ชนิดที่ต้องต้มกับนมหรือน้ำเพื่อบริโภค (hot cereal breakfast cereal) ได้แก่ โจ๊กกึ่งสำเร็จรูปที่ใช้เวลาต้มสั้น ๆ ข้าวที่นำมาผลิตอาจเป็นปลายข้าวหรือแป้งข้าวบดเพื่อช่วยให้ต้มสุกเร็ว อาจมีการเติมรสชาติต่างๆ และชนิดที่บริโภคได้ทันที (Ready to eat breakfast cereal) ผลิตภัณฑ์ประเภทนี้อาจมีการนำรสชาติชนิดอื่นมาผสม ในการผลิตอาจเตรียมเป็นลักษณะของวัตถุดิบ สุก แห้ง เป็นแผ่นเล็กๆ (flake) หรือเป็นก้อนโด (dough) ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ อาจมีการเติมสารปรุงรส (flavoring material) วิตามิน แร่ธาตุ และโปรตีนเพื่อเสริมโภชนาการ ตัวอย่างอาหารเช้าพร้อมรับประทาน ได้แก่ rice crispy

### 2.2.1.8 อาหารเด็กอ่อน (Baby food)

แป้งข้าวหรือข้าวบดหยาบ สามารถใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเด็กอ่อน การผลิตเริ่มจากการต้มน้ำแป้งชั้นๆ แล้วนำไปลดความชื้นด้วย double drum drier จะได้แผ่นแป้งเล็กๆ (flake) ส่วนประกอบมักประกอบด้วย แป้งข้าว รำละเอียด น้ำตาล dibasic calcium phosphate, กลีเซอไรด์, sodium iron pyrophosphate, glycerol monostearate (emulsifier), น้ำมันรำข้าว thiamine hydrochloride, riboflavin และ niacin หรือ niacinamide

### 2.2.1.9 ข้าวเสริมโภชนาการหรือข้าวอนามัย (Enriched rice)

เป็นข้าวที่มีการเสริมวิตามินหรือแร่ธาตุลงไป ข้าว เช่น การผสมข้าวเสริมโภชนาการกับข้าวขาว (Premix kernel) การผสมกับผงของสารอาหาร การเติมสารอาหารในธัญพืชพร้อมบริโภคน และการสเปรย์ เป็นต้น นับว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มโภชนาการให้มีคุณค่ามากขึ้น

### 2.2.1.10 ข้าวกล้องงอกกานา (Gaba Rice)

ข้าวกล้องงอกกานา เป็นการนำข้าวกล้องมาผ่านกระบวนการงอก ทำให้ช่วยเพิ่มปริมาณสารกาบาในข้าวกล้อง สารกาบาจะช่วยบำรุงเซลล์ประสาท ดังนั้น จึงมีการนำสารกาบามาใช้ในวงการแพทย์ เพื่อการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทต่างๆ

### 2.2.1.11 อื่นๆ

ผลิตภัณฑ์หมักดอง เช่น การผลิตลูกแป้ง ที่ใช้ในการผลิตเครื่องดืมต่างๆ ข้าวแดง (Anka) เป็นสีผสมอาหาร เช่น ใช้ในเหล้าแดง ผสมในผักดอง ผลิตภัณฑ์เครื่องดืมแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์จากรำข้าว และน้ำมันรำข้าว เป็นต้น

## 2.2.2 ผลิตภัณฑ์เส้นและแผ่น [26]

ผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว ที่ผลิตในประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ผลิตภัณฑ์เส้นไม่หมัก และผลิตภัณฑ์เส้นหมัก ผลิตภัณฑ์เส้นไม่หมักมี 4 ประเภท คือ กว๊วยเดี่ยวเส้นใหญ่ เส้นเล็ก เส้นหมี และเส้นก๊วยจั๊บ สำหรับผลิตภัณฑ์เส้นหมักได้แก่ ขนมหุ้น และแป้งแผ่น (ใบเมี่ยงญวน)

### 2.2.2.1 ลักษณะของผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว

1. กว๊วยเดี่ยวเส้นใหญ่ ได้จากการนำแผ่นก๊วยเดี่ยวสดมาหั่นเป็นเส้นตามขนาดที่ต้องการ โดยไม่ผ่านขั้นตอนการทำแห้ง ปกติจะมีความชื้นประมาณ ร้อยละ 60-64 เป็นเส้นก๊วยเดี่ยวสดที่เก็บได้ไม่นานต้องรับประทานภายใน 1-2 วัน

2. กว๊วยเดี่ยวเส้นเล็ก ได้จากการนำแผ่นก๊วยเดี่ยวสดมาผึ่งลมหรืออบในตู้อบ ลมร้อน เพื่อลดปริมาณความชื้น ก่อนนำมาตัดเป็นเส้นขนาด 3-4 มิลลิเมตร กว๊วยเดี่ยวเส้นเล็กสดมีความชื้นประมาณร้อยละ 35-37 เก็บได้นานประมาณ 3 วัน สำหรับก๊วยเดี่ยวเส้นเล็กแห้งเป็น

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแผ่นก้วยเดี่ยวที่ผ่านการผึ่งลมและลดความชื้นแล้ว นำมาตัดเป็นเส้นตามขนาดที่ต้องการและทำให้แห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นประมาณร้อยละ 11-13 ซึ่งสามารถเก็บได้นานเป็นปีในสภาวะที่เหมาะสม

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

4. **ขนมจีน** เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำแป้งข้าวเจ้ากึ่งสุกหรือมีส่วนสุกประมาณร้อยละ 27-34 ของแป้งทั้งหมดมาวนและปรับความชื้นให้ได้ ร้อยละ 70 - 75 บีบผ่านแวนที่มีลักษณะเป็นแผ่น โลหะกลมซึ่งเจาะรูเล็กๆ ตามขนาดที่ต้องการลงในน้ำเดือด เมื่อเส้นลอยจึงดักขึ้นแช่ในน้ำเย็นและจับเส้น ผลิตภัณฑ์ขนมจีนจะมีความชื้นประมาณร้อยละ 70 - 77

5. **ก้วยจับ** เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนึ่งแผ่นก้วยเดี่ยวให้สุกเพียงครั้งเดียวของความหนา นำมาผึ่งลมหรืออบในตู้อบลมร้อนเพื่อลดปริมาณความชื้นให้เหลือประมาณร้อยละ 12 โดยทั่วไปจะตัดให้มีลักษณะเป็นแผ่น รูปสามเหลี่ยม เมื่อนำมาต้มสุกจะม้วนเป็นหลอด

6. **แป้งแผ่น (ใบเมี่ยงญวน)** เป็นผลิตภัณฑ์จากแป้งข้าวเจ้าที่ผ่านการหมักแป้ง 2-3 วัน เดิมเกลือไม่เกินร้อยละ 5 นำมาทำให้เป็นแผ่นบาง หนึ่งให้สุกและทำให้แห้งมีความชื้นไม่เกินร้อยละ 16

#### 2.2.2.2 วัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์เส้นและแผ่น [19]

ประกอบด้วย ข้าวสารหักและน้ำ หรือแป้งข้าวเจ้าที่ผ่านการปรับปรุงลักษณะให้เหมาะสมกับการผลิตเส้นก้วยเดี่ยวหรือเส้นขนมจีน และสารเคมีบางชนิดที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ กัน

1. **ข้าวสารหัก หรือ ปลายข้าว หรือ ข้าวเจ้า 50 เปอร์เซนต์ (ข้าวท่อน)** เป็นข้าวสารที่ได้มาจากข้าวเจ้าชนิดที่มีปริมาณอะมิโลส (amylose) สูง ระหว่าง 27 - 33 เปอร์เซนต์ ควรเป็นข้าวเก่าที่เก็บไว้เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4 เดือนและผ่านการขัดสีสูงได้เป็นข้าวขาวพิเศษ ทำให้เส้นก้วยเดี่ยวขาวไม่ติดเครื่องนึ่ง เหนียว ไม่อมน้ำ เมื่อนำไปปรุงอาหารและผ่านการทำความสะอาดเพื่อลดสิ่งปนเปื้อน เช่น หิน ดิน ทราย เปลือกข้าว เมล็ดพืช แมลง รังมอด เป็นต้น

2. **น้ำ** น้ำที่ใช้ในการผลิตควรเป็นน้ำสะอาดเหมาะสมสำหรับบริโภค ปราศจากสารแขวนลอย มีความกระด้างต่ำ มีคลอรีน 0.2 - 0.5 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าระหว่าง 5.0 - 7.0 กรณีเป็นน้ำบาดาลควรสูบขึ้นมาพักไว้เพื่อให้แร่ธาตุต่างๆ ตกตะกอนก่อนนำไปใช้ จากนั้นกรองเอาพวกกรวดทรายออกและผ่านเครื่องกำจัดความกระด้าง

ความเป็นกรด-เบสของน้ำและเกลือของแคลเซียม หรือแมกนีเซียมมีผลต่อความเหนียวของผลิตภัณฑ์ น้ำที่มีเหล็ก และสารแขวนลอยปะปนจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีคล้ำ

3. สารเคมี เช่น การใช้โซเดียมหรือโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์มีจุดมุ่งหมายเพื่อคงสีของอาหารมากกว่าขจัดเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งซัลเฟอร์มีผลต่อสปอร์เชื้อราและแบคทีเรียมากกว่ายีสต์ ดังนั้นการใช้ร่วมกับโซเดียมเบนโซเอทซึ่งมีผลต่อยีสต์ จึงทำหน้าที่เป็นวัตถุกันเสียได้ดี โดยทั่วไปซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะระเหยไปกับไอน้ำถึงร้อยละ 90 สำหรับปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่อนุญาตให้มีได้ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอท เป็นสารเคมีใช้ป้องกันการเน่าเสียที่อยู่ในสภาพของเกลือจะละลายน้ำได้ดีกว่าในสภาพกรด กรดเบนโซอิกจะช่วยขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียแต่จะทำให้สีอาหารเปลี่ยนแปลงเร็วขึ้น แก้ไขโดยใช้ร่วมกับซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ปริมาณกรดหรือเกลือเบนโซเอทที่อนุญาตให้ใช้โดยทั่วไปไม่เกินร้อยละ 0.1

### 2.3 วัตถุกันเสีย (Preservatives) [20]

วัตถุกันเสีย หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าสารกันบูด เป็นสารประกอบทางเคมีที่ใช้ในการถนอมอาหารหรือยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร เนื่องจากสามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารได้ ส่วนใหญ่วัตถุกันเสียจะไปออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์รบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ หรือกลไกทางพันธุกรรม (Genetic mechanism) ในเซลล์เป็นผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้หรืออาจตายได้ในที่สุด เนื่องจากการเน่าเสียของอาหารส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร ดังนั้นวัตถุกันเสียที่ดีควรมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียมากกว่าที่จะออกฤทธิ์เพียงแค่นับยังการเจริญเติบโต เพราะจุลินทรีย์ที่ไม่ถูกทำลายอาจมีโอกาสรอดพ้นไปเป็นสายพันธุ์ต้านทาน (Resistant strain) ได้นอกจากนี้วัตถุกันเสียไม่ควรมีผลทำให้รสชาติของอาหารเปลี่ยนแปลง และไม่ควรเสื่อมฤทธิ์หรือเสื่อมคุณภาพเมื่อใส่ลงในอาหาร ยกเว้นวัตถุกันเสียประเภทออกฤทธิ์ฆ่าหรือทำลายจุลินทรีย์ควรจะถูกเปลี่ยนสภาพให้เป็นสารไม่มีพิษ หรือควรถูกทำลายได้ด้วยการหุงต้มธรรมดา วัตถุกันเสียที่นำมาใช้สำหรับอาหารมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยดังนี้

1. ความเข้มข้นของวัตถุกันเสียที่ใช้ ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์สูงตามไปด้วย
2. จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยจุลินทรีย์จะมีความต้านทานต่อวัตถุกันเสียแต่ละชนิดแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิด ปริมาณ และสภาวะของจุลินทรีย์
3. สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของอาหาร เช่น ลักษณะของอาหารเป็นของเหลวหรือของแข็ง

สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหาร เป็นต้น ปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อกลไกและประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ รวมถึงปริมาณวัตถุกันเสียที่จะต้องใช้

### 2.3.1 ชนิดของวัตถุกันเสียที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

#### 2.3.1.1 กรดและเกลือของกรดบางชนิด

กรดและเกลือของกรดที่นำมาใช้เป็นวัตถุกันเสีย เช่น กรดเบนโซอิก (Benzoic acid) กรดซอร์บิก (Sorbic acid) กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) และเกลือของกรดเหล่านี้ เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์มากกว่าแบคทีเรีย ส่วนใหญ่นิยมใช้ในรูปเกลือของกรดเพราะละลายน้ำง่าย เมื่อใส่ลงในอาหารเกลือเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของกรด กรดจะคงอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวซึ่งเป็นรูปที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ ดังนั้นวัตถุกันเสียในกลุ่มนี้จึงเหมาะสำหรับใช้ในอาหารที่มีสภาพความเป็นกรด-ด่างประมาณ 4-6 เช่น น้ำผลไม้ อาหารดอง แยม เยลลี่ ซอสถั่วเหลือง เป็นต้น วัตถุกันเสียในกลุ่มนี้มีข้อดี คือ มีความเป็นพิษต่ำเพราะร่างกายสามารถเปลี่ยนเป็นสารอื่นที่ไม่เป็นพิษและขับออกทางปัสสาวะได้ในที่สุด

#### 2.3.1.2 พาราเบน (Parabens)

พาราเบนเป็นสารประกอบไม่มีสี กลิ่น และรส มีประสิทธิภาพยับยั้งหรือทำลายเชื้อราและยีสต์ได้ดีกว่าแบคทีเรีย สารในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ในช่วงความเป็นกรด-ด่างกว้างกว่าสารในกลุ่มแรก คือประมาณ 2-9 อาหารที่เหมาะสมต่อการใช้พาราเบน ได้แก่ น้ำผลไม้ แยม เยลลี่ ครีม ขนมหวานต่างๆ และสารปรุงแต่งรส เป็นต้น พาราเบนมีความเป็นพิษน้อยมากเนื่องจากร่างกายมีกระบวนการกำจัดพิษของพาราเบน โดยปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (Hydrolysis) และถูกขับออกทางปัสสาวะในที่สุด

#### 2.3.1.3 ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Sulfur dioxide) และซัลไฟต์ (Sulfites)

ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ใช้สำหรับยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยใช้วิธีการรมผักและผลไม้ก่อนการทำแห้ง หรืออาจใช้สารละลายซัลไฟต์ฉีดพ่นผักและผลไม้ก่อนการทำแห้งเพื่อช่วยคงสภาพของสี กลิ่นและรส รวมทั้งรักษาวิตามินซีและแคโรทีนในผักและผลไม้ไม่ให้สลายตัวได้ง่าย ซัลเฟอร์ไดออกไซด์และซัลไฟต์มีประสิทธิภาพสูงเมื่อใช้กับอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่า 4 จึงนิยมใช้ในไวน์ น้ำผลไม้ต่างๆ ผักและผลไม้แห้ง เป็นต้น สำหรับความปลอดภัยต่อผู้บริโภคสารนี้สามารถถูกขับออกนอกร่างกายได้ แต่ถ้าได้รับในปริมาณที่มากเกินไปจะมีผลไปลดการใช้โปรตีนและไขมันในร่างกายได้ นอกจากนี้สารในกลุ่มนี้ยังสามารถทำลายไทอามีน (Thiamine) หรือวิตามินบี 1 ในอาหารได้ด้วย ดังนั้นจึงมีประกาศห้ามใช้สาร

ดังกล่าวในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นแหล่งของวิตามินบี 1 รวมไปถึงผักสด และผลไม้สดด้วย

#### 2.3.1.4 สารปฏิชีวนะ

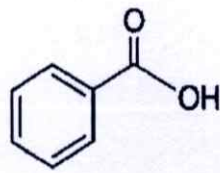
การใช้สารปฏิชีวนะเป็นวัตถุกันเสียสำหรับอาหารมีข้อดี คือ สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ สารปฏิชีวนะจะออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลาย จุลินทรีย์ได้หลายชนิดโดยขึ้นกับชนิดของสารที่ใช้ อาหารที่นิยมใช้สารปฏิชีวนะเป็นวัตถุกันเสีย ส่วนใหญ่จะเป็นพวกเนื้อสัตว์ต่างๆ อาจพบว่ามีการใช้กับผักและผลไม้สดบ้าง สำหรับข้อเสียของการใช้สารปฏิชีวนะ คือ มักเป็นการชักนำให้เกิดจุลินทรีย์สายพันธุ์ต้านทาน

#### 2.3.2 กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท

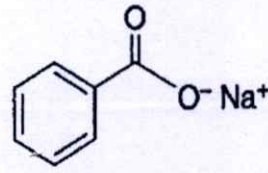
กรดเบนโซอิกและ โซเดียมเบนโซเอทเป็นวัตถุกันเสียที่ใช้ในการถนอมอาหาร และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร กรดเบนโซอิกพบอยู่ในพืชบางชนิดตามธรรมชาติในลูกพ룬 แครนเบอร์รี่ พลัม อบเชย เซอร์รี่ กานพลู แอปเปิล และมะกอกสุก กรดเบนโซอิกและ โซเดียมเบนโซเอทที่จำหน่ายในท้องตลาดจะอยู่ในรูปผงผลึกสีขาวหรือเป็นเกล็ด [21]

##### 2.3.2.1 คุณสมบัติของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท

กรดเบนโซอิก สูตรโมเลกุล คือ  $C_6H_5COOH$  มีสถานะเป็นผลึกของแข็ง กลิ่นฉุน มีน้ำหนักโมเลกุล 122.2 จุดเดือด 249 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว 122 องศาเซลเซียส ความถ่วงจำเพาะ 1.32 [22] ที่อุณหภูมิห้อง น้ำ 100 กรัม สามารถละลายกรดได้ 0.34 กรัม หรือน้ำมัน 100 กรัม ละลายกรดได้ 1-2 กรัม กรดเบนโซอิกสามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ที่ปราศจากน้ำจึงมีปัญหาเมื่อใช้กับอาหารที่มีน้ำอยู่ในปริมาณสูงมีสูตรโครงสร้างของกรดเบนโซอิกดังรูปที่ 2.8 (ก) สำหรับเกลือเบนโซเอท เช่น โซเดียมเบนโซเอท สูตรโมเลกุล คือ  $C_6H_5COONa$  มีน้ำหนักโมเลกุล 144.11 เป็นผลึกสีขาวสามารถละลายน้ำได้ดีกว่ากรดเบนโซอิกซึ่งในน้ำ 100 กรัม สามารถละลายได้ 63 กรัม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในอุตสาหกรรมอาหารจึงนิยมใช้เกลือของกรดนี้มากกว่า แต่สามารถละลายในแอลกอฮอล์ได้น้อยกว่ากรดเบนโซอิก [23] เกลือเบนโซเอทที่ใช้เป็นวัตถุกันเสียมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.8 (ข) และการละลายของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทดังแสดงในตารางที่ 2.4



(ก) กรดเบนโซอิก



(ข) เกลือเบนโซเอท

รูปที่ 2.8 สูตรโครงสร้างของกรดเบนโซอิก (ก) และเกลือเบนโซเอท (ข) [23]

ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทต่อการขัดขวางการทำงานของจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในรูปของกรดที่ไม่แตกตัว สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ กรดที่ไม่แตกตัวนี้จะซึมผ่านเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้การทำงานของผนังเซลล์และเอนไซม์ผิดปกติไม่สามารถนำเอาสารอาหารไปใช้ในเซลล์ได้ และสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์และการทำงานของเอนไซม์บางชนิดที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากกรดจะทำให้ความเป็นกรดและด่างของอาหารนั้นไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่างๆ กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอทมีช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดอยู่ระหว่าง 2.5-4.0 ซึ่งต่ำกว่ากรดซอร์บิกและกรดกรดโพทิโอนิกและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์และเชื้อราได้ดีกว่าแบคทีเรีย [21]

ตารางที่ 2.4 การละลายของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอท (กรัมต่อ 100 กรัมตัวทำละลาย) [24]

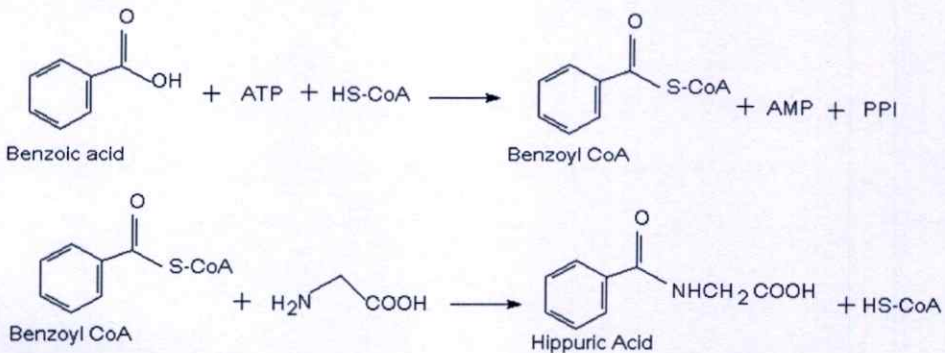
	กรดเบนโซอิก	โซเดียมเบนโซเอท
น้ำ 25 องศาเซลเซียส	0.34	60.00
น้ำ 50 องศาเซลเซียส	1.00	60.00
น้ำ 160 องศาเซลเซียส	2.50	70.50
ร้อยละ 5 (v/v) เอทานอล 25 องศาเซลเซียส	0.29	56.60
ร้อยละ 10 (v/v) เอทานอล 25 องศาเซลเซียส	0.30	50.00
ร้อยละ 20 (v/v) เอทานอล 25 องศาเซลเซียส	1.50	50.00
ร้อยละ 50 (v/v) เอทานอล 25 องศาเซลเซียส	10.00	40.00
ไขมันและน้ำมัน 25 องศาเซลเซียส	1-2	-
กลีเซอริน 25 องศาเซลเซียส	0.40	-

### 2.3.2.2 การใช้กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์อาหาร

กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทจะมีประสิทธิภาพสูงที่ความเป็นกรดต่ำกว่า 4.5 ดังนั้นอาหารที่ควรใช้วัตถุกันเสียนี้ เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บนั้นจึงควรเป็นอาหารที่มีความเป็นกรดสูง [21] นิยมใช้กับเครื่องดื่มนิตต่างๆ ทั้งที่อัดและไม่อัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำผลไม้ เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ แยม เยลลี่ ผลไม้ดอง ผักดองตามฤดูกาล น้ำสลัด เนยเทียม และใช้กับพวกอาหารโปรตีนสูง เป็นต้น ตามข้อกำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 281) พ.ศ.2547 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร ข้อ 6 กำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร ต้องใช้ตามชนิดวัตถุเจือปนอาหาร ชนิดของอาหาร และปริมาณสูงสุดของที่ใช้ได้ ซึ่งกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอทอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [25]

### 2.3.2.3 ความปลอดภัยในการนำไปใช้

การบริโภคเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอทไม่พบว่าเกิดการสะสมในร่างกาย เนื่องจากการศึกษาทดลองพบว่า ร่างกายมีกลไกในการขจัดความเป็นพิษ โดยกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคจะรวมตัวกับโคเอนไซม์เอ (Coenzyme A) เกิดเป็นเบนโซอิลโคเอนไซม์เอ (benzoyl coenzyme A) โดยมีเอนไซม์ซิททีเทส (synthetase) เป็นตัวเร่งจากนั้นจะไปรวมกับไกลซีน (Glycine) เกิดเป็นกรดฮิปปูริก (Hippuric acid) โดยมีเอนไซม์อะซิลทรานเฟอร์เรส (Acyltransferase) เป็นตัวเร่งและถูกขับออกทางปัสสาวะ ส่วนที่เหลือที่ไม่ได้ถูกร่างกายขับออกในรูปกรดฮิปปูริกนั้นจะถูกขจัดออกจากร่างกาย โดยการรวมตัวกับกรดไกลคิวโรนิก (Gycuronic acid) แล้วขับออกทางปัสสาวะในรูปของกรดเบนโซอิลไกลคิวโรนิก (Benzoyl Glycuronic Acid) โดยทั่วไปการขับถ่ายของกรดฮิปปูริกทางปัสสาวะ ในคนจะประมาณ 1.0-2.5 กรัมต่อวัน ซึ่งจะเท่ากับกรดเบนโซอิกที่บริโภคเข้าไป 0.7-1.0 กรัม สำหรับความสามารถในการขจัดกรดเบนโซอิกนั้น จะแปรผันตามชนิดของสัตว์ด้วย [21-22] รูปที่ 2.9 แสดงกลไกในการขจัดความเป็นพิษของกรดเบนโซอิก



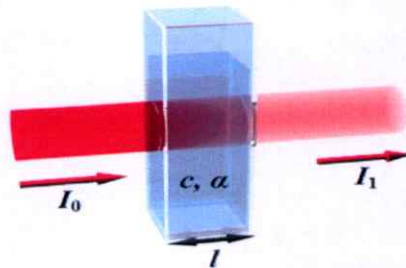
รูปที่ 2.9 แสดงกลไกในการขจัดความเป็นพิษของกรดเบนโซอิก [23]

ส่วนความเป็นพิษ Food and Agriculture Organization (FAO) และ World Health Organization (WHO) ได้เสนอว่า โซเดียมเบนโซเอตมีความเป็นพิษในคนและสัตว์น้อยมาก จากการศึกษาเกี่ยวกับสัตว์ทดลองพบว่า โซเดียมเบนโซเอตไม่มีผลต่อการเกิดสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagenic) ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อพัฒนาการของทารกในครรภ์ (teratogenic effect) รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดสารก่อมะเร็ง (carcinogen) [23] อีกทั้ง United States Food and Drug Administration (U.S.FDA) ได้จัดกลุ่มของกรดเบนโซอิกและเบนโซเอต ให้อยู่ในสารเคมีประเภทวัตถุเจือปนอาหารที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe, GRAS) ด้รับรองปริมาณที่อนุญาตให้ใช้เติมลงในอาหารได้ในระดับที่มีความปลอดภัยสูงสุดไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอาหาร และทางคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญว่าด้วยวัตถุเจือปนอาหารของโคเด็กซ์ (Codex General Standard for food additives) ได้กำหนดค่า Acceptable Daily Intake (ADI) กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตไว้เท่ากับ 0-5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักร่างกายต่อวัน ซึ่งหากมีการบริโภคในปริมาณมากเกินไปเกินเกณฑ์มาตรฐานต่อวัน อาจทำให้เกิดการสะสมและส่งผลเสียต่อร่างกายได้ [23]

## 2.4 ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี [26]

การดูดกลืนแสงหรือรังสีที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเล็ตและวิสิเบิลซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 190 – 800 นาโนเมตร ของสารเคมีนั้นส่วนใหญ่ได้แก่พวกสารอินทรีย์ (Organic compound) หรือสารประกอบเชิงซ้อน (Complex compound) หรือสารอนินทรีย์ (Inorganic compound) ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สมบัติของสารดังกล่าวนี้ได้นำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณอย่างกว้างขวาง เพราะวิธีนี้ให้ความถูกต้องแม่นยำและมีสภาพไว (Sensitivity) สูง โดยอาจทำการวิเคราะห์ที่อยู่ในรูปของธาตุหรือโมเลกุลก็ได้

สำหรับเทคนิคทางยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคหนึ่งในเทคนิคการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Absorption of radiation) ที่อาศัยการดูดกลืนโดยโมเลกุล ซึ่งเป็นการวัดอัตราส่วนของลำแสงที่ทะลุออกจากสารละลาย ( $I$ ) ต่อลำแสงที่ตกกระทบ ( $I_0$ ) ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงคลื่นแสงที่มีความเข้ม ( $I_0$ ) ถูกดูดกลืนจากสารทำให้ความเข้มของคลื่นแสงลดลง ( $I$ ) และถูกส่งผ่านออกมา

ปริมาณลำแสงที่ผ่านทะลุออก (Transmitted) แทนด้วยค่าความส่องผ่าน โดยค่าความส่องผ่าน (Transmittance ; T) คือ อัตราส่วนของปริมาณลำแสงที่ผ่านทะลุออกมาจากสารละลาย (I) ต่อปริมาณแสงที่ตกกระทบสารละลาย ( $I_0$ ) แทนค่าดังสมการ

$$T = I/I_0$$

ความส่องผ่านมักแสดงในรูปร้อยละหรือเปอร์เซ็นต์ความส่องผ่าน (%T) ดังสมการ

$$\%T = 100T$$

ปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืน แทนด้วยค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance ; A) โดยค่าการดูดกลืนแสง คือ ลอการิทึมของอัตราส่วนของปริมาณลำแสงที่ตกกระทบสารละลาย ต่อปริมาณลำแสงที่ผ่านทะลุออกมาจากสารละลาย แทนค่าดังสมการ

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

ค่าการส่องผ่านและค่าการดูดกลืนแสงมีความสัมพันธ์ ดังสมการ

$$\%T = \frac{I_0}{I} \times 100$$

อย่างไรก็ตาม ค่าการดูดกลืนแสง ก็มีความสัมพันธ์กับค่าความส่องผ่าน ดังสมการ

$$A = -\log T$$

$$A = \log (100/\%T)$$

$$A = 2.000 - \log \%T$$

ซึ่ง  $A = \log \frac{I_0}{I}$  ขณะที่  $T = \log \frac{I}{I_0}$

เมื่อ  $I_0$  เป็นความเข้มของแสงเริ่มต้น

I เป็นความเข้มของแสงที่ปล่อยออกมา

#### 2.4.1 กฎของเบียร์ และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert's Law) [26]

เบียร์ และแลมเบิร์ต ได้ศึกษากระบวนการดูดกลืนแสงพบความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย กฎของเบียร์มีใจความว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น ดังสมการ

$$A = abc$$

โดยที่

A = ค่าการดูดกลืน

a = แอปซอร์ปติวิตี (ลิตรต่อกรัมเซนติเมตร)

b = ความกว้างของเซลล์ (เซนติเมตร)

c = ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)

และเมื่อสารละลายที่ศึกษามีความเข้มข้นในหน่วยโมลต่อลิตร สามารถหาค่าแอมพลิจูดจากสมการ

$$A = \epsilon bc$$

โดยที่

$$A = \text{ค่าการดูดกลืนแสง}$$

$$\epsilon = \text{โมลาร์แอมพลิจูดสัมประสิทธิ์ (ลิตรต่อโมลเซนติเมตร)}$$

$$b = \text{ความกว้างของเซลล์ (เซนติเมตร)}$$

$$c = \text{ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)}$$

ค่าแอมพลิจูดสัมประสิทธิ์เป็นค่าคงที่แสดงคุณลักษณะของสารที่ความยาวคลื่นและตัวทำละลายหนึ่ง ๆ เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น ได้กราฟเป็นเส้นตรงเรียกว่า กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ซึ่งสามารถคำนวณเพื่อหาความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารตัวอย่างได้

#### ข้อจำกัดของการใช้กฎของเบียร์

ข้อจำกัดที่ทำให้กฎของเบียร์ต้องเบี่ยงเบนไปหรือใช้ไม่ได้ คือ เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากความเข้มข้นต่างๆ กันเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นแล้วได้กราฟไม่เป็นเส้นตรง

สาเหตุที่สำคัญอาจจำแนกได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

1. เนื่องจากความเบี่ยงเบนทางเคมี (Chemical deviation) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารที่ปนกันอยู่ในสารละลาย
2. เนื่องจากความเบี่ยงเบนของเครื่องมือ (Instrumental deviation) ซึ่งเกี่ยวกับเครื่องโดยเฉพาะ

## 2.5 การหาปริมาณกรดเบนโซอิก [6]

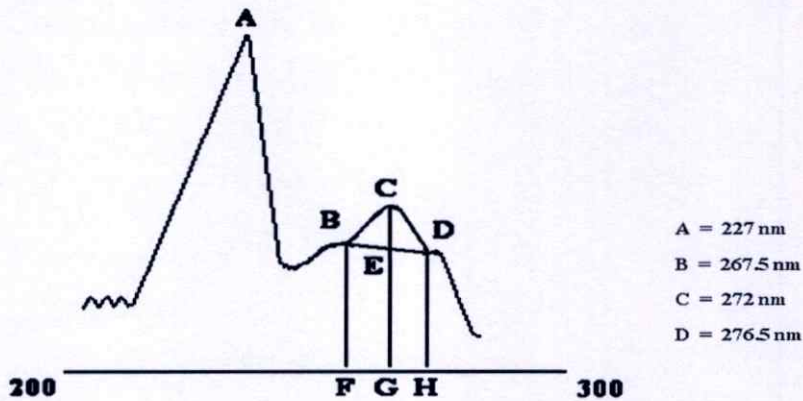
### 2.5.1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultraviolet absorption method)

การหาปริมาณสารทำได้โดยวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของสาร นิยมวัดค่าที่ให้ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด ( $\lambda_{MAX}$ ) กรณียของกรดเบนโซอิกได้มีผู้เลือกใช้ที่ความยาวคลื่นสูงสุดคือ 227 นาโนเมตร แต่ไม่นิยมเท่ากับการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงโดยอาศัย Baseline technique ที่ความยาวคลื่น 267.5 (B), 272 (C), 276.5 (D) นาโนเมตร แล้วหาปริมาณการดูดกลืนแสง CE (ดังรูป 2.12) คือ

$$CE = CG - \left( \frac{BF + DH}{2} \right) \quad (2.2)$$

เมื่อ	CE	=	ค่าการดูดกลืนแสง
	CG	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร
	BF	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 267.5 นาโนเมตร
	DH	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร

กรดเบนโซอิก มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่มีลักษณะเฉพาะตัว เมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.11 แสดงลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของกรดเบนโซอิก เมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ [6]

นำค่า CE ที่ได้ไปเทียบกับปริมาณการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดเบนโซอิกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนจากกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

สาเหตุที่ไม่นิยมใช้ความยาวคลื่น 227 นาโนเมตร เพราะที่ความยาวคลื่นจุดนี้ค่าปริมาณการดูดกลืนแสงที่ได้อาจไม่ถูกต้อง เนื่องจาก

1. ที่ความยาวคลื่น 227 นาโนเมตร ใกล้กับความยาวคลื่นช่วง Far UV ซึ่งอาจเกิด stray radiation ได้ง่ายจากความชื้น ออกซิเจน ไนโตรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ ทำให้ค่าปริมาณการดูดกลืนแสงที่ได้ผิดไป

2. ตัวทำละลายที่ใช้มีค่า Cut-Off Point อยู่ที่ความยาวคลื่นต่ำกว่านี้ หรือที่ความยาวคลื่นบริเวณนี้ ในกรณีในตัวทำละลายที่ใช้เป็นเกรดสเปกโทร (Spectro grade) หรือเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) และถ้าใช้ตัวทำละลายที่มีเกรดต่ำกว่านี้ อาจมีสิ่งเจือปนอื่นที่ทำให้การดูดกลืนแสงในช่วงนี้ได้เช่นกัน เมื่อรวมกับค่าปริมาณการดูดกลืนแสงของกรดเบนโซอิกที่สูงมาก ทำให้เราไม่สามารถวัดปริมาณการดูดกลืนแสงทั้งหมดที่จุดนี้ได้

สำหรับตัวอย่างอาหารที่ใช้วิธีนี้วิเคราะห์ ได้แก่ ซอสชนิดข้น ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ แยมเชลลี เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ น้ำผลไม้ โดยการแยกกรดเบนโซอิกออกจากตัวอย่างวิธีการเดิมก็คือ วิธีการละลาย และการสกัดด้วยตัวทำละลาย

### 2.5.2 วิธีการไทเทรตกรด-เบส (Acid-Base titration method) [6]

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

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.6.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอท

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอทสามารถวิเคราะห์ได้หลายเทคนิคดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 แสดงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซอิกด้วยเทคนิคต่าง ๆ

เทคนิค	สารวิเคราะห์	ตัวอย่าง	ช่วงความเป็นเส้นตรง	ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์	เอกสารอ้างอิง
Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) – mass spectrometry MS/MS	16 fluorinated benzoic acids (FBAs)	น้ำมัน	-	0.05 - 50 ng/mL	[27]
Capillary electrophoresis (CE)	benzoate, sorbate ions	เครื่องดื่ม	197–401 mg/L (benzoate), 28–144 mg/L (sorbate)	0.9 mg/L (benzoate), 0.3 mg/L (sorbate)	[28]
Electrokinetic flow analysis system (EFA)	benzoic acid, sorbic acid	อาหาร	0.06–20 µg/mL (benzoic acid), 0.03–20 µg/mL (sorbic acid)	0.02 µg/mL (benzoic acid), 0.01 µg/mL (sorbic acid)	[29]
Gas chromatography (GC)	benzoic acid	เครื่องดื่ม	1–10,000 mg/L	0.1 mg/L	[30]
Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) gas chromatography (GC)	benzoic acid, sorbic acid	เครื่องดื่ม	0.1 - 20 mg/L	11.4 µg/L (benzoic acid), 5.83 µg/L (sorbic acid)	[31]
Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) gas chromatography (GC)	benzoic acid, sorbic acid	เครื่องดื่ม	0.02 - 40 mg/L	1.22 µg/L (benzoic acid), 2.00 µg/L (sorbic acid)	[32]

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

เทคนิค	สารวิเคราะห์	ตัวอย่าง	ช่วงความเป็นเส้นตรง	ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์	เอกสารอ้างอิง
High-performance liquid chromatography (HPLC)	benzoic acid, sorbic acid, methylparaben, propylparaben	อาหาร	5.0–120 mg/L (benzoic acid), 1.0–75 mg/L (sorbic acid), 3.0–100 mg/L (methylparaben), 1.0–75 mg/L (propylparaben)	0.5 mg/L (benzoic acid), 0.1 mg/L (sorbic acid), 0.3 mg/L (methylparaben), 0.1 mg/L (propylparaben)	[33]
High-performance liquid chromatography (HPLC)–mass spectrometry	benzoyl peroxide, benzoic acid	อาหาร	-	30 ng/mL (benzoyl peroxide) 20 ng/mL (benzoic acid)	[34]
High-performance liquid chromatography (HPLC)	dextromethorphan, guaifenesin, benzoate	อาหาร	1.501–2.401 mg/mL (guaifenesin), 0.263–0.421 mg/mL (benzoate), 0.150–0.241 mg/mL (dextromethorphan)	-	[35]
Potentiometric sensor	benzoate ion	เครื่องดื่ม	$5 \times 10^{-4}$ – $1 \times 10^{-1}$ mol/L	$1.6 \times 10^{-4}$ mol/L	[36]
High-performance liquid chromatography (HPLC)	sodium benzoate และ potassium sorbate	อาหาร	-	10 mg/L	[37]

จากตารางสรุปที่ 2.5 จะเห็นได้ว่ามีหลายเทคนิคที่วิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอท ในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม บางเทคนิคสามารถวิเคราะห์สารที่สนใจหลายชนิดในคราวเดียวกัน แต่ใช้เครื่องมือที่ราคาสูง และใช้สารเคมีที่เป็นพิษในการเตรียมตัวอย่าง ดังนั้นเทคนิคที่มีของเสียจากระบบน้อยและใช้สารเคมีปริมาณน้อยจึงได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เทคนิคการสกัดสารด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์ตัวอย่างอาหาร

### 2.5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพราะเป็นวิธีการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจึงมีของเสียจากระบบน้อย ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูง เป็นวิธีที่ง่ายสะดวกในการดำเนินการ อีกทั้งมีค่าใช้จ่ายที่ถูกลง

Xiangyang Wu และคณะ (2011) [38] ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) คือ แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) ทั้ง 4 ชนิดจากน้ำผลไม้มัลเบอร์รี่ (Mulberry) โดยการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคซึ่งใช้เอทานอล ( $C_2H_5OH$ ) และแอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ ) เพื่อแยกแอนโทไซยานินและน้ำตาลให้อยู่ในวัฏภาคบน (เอทานอล) และวัฏภาคล่าง (แอมโมเนียมซัลเฟต) ตามลำดับ ทำการตรวจวัดแอนโทไซยานิน ทั้ง 5 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS/MS จากการศึกษาพบว่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อโครงสร้างของ แอนโทไซยานิน เมื่อความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 4-6 จะอยู่ในรูป Flavylium cation, Anhydrous quinoidal base, Colourless carbinol base และ The pale yellow chalcone เมื่อความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 7.2 ทำให้ปริมาณแยกแอนโทไซยานินลดลง สภาวะในการวิเคราะห์ทำการเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 สำหรับแผนภาพวัฏภาค (Phase diagram) ทำการเลือก เอทานอลและแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 30 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w) ตามลำดับ เนื่องจากให้ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วน (Partition coefficient) และร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) มากที่สุด การเพิ่มอุณหภูมิทำให้แอมโมเนียมซัลเฟตละลายในวัฏภาคบนมากขึ้นแยกน้ำตาลออกมาได้มากขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส

Xueqiao Xie และคณะ (2011) [39] ทำการสกัดซัลฟาเมทอกซาโซล (SMX) ในตัวอย่างแหล่งน้ำธรรมชาติด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคโดยใช้โพลีโพรพิลีนไกลคอล (PPG) มวลโมเลกุล 400 ร่วมกับการศึกษาเกลือ 6 ชนิด ได้แก่ ไตรโพแทสเซียมซีเตรต ( $K_3C_6H_5O_7$ ), โพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $K_2CO_3$ ), ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ), โซเดียมได

ไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), โพแทสเซียมคลอไรด์ ( $\text{KCl}$ ) และนำมาหาปริมาณด้วยเทคนิค HPLC ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมให้ประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency) 99.2 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) 96-100.6 เปอร์เซ็นต์ ซีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร การแบ่งส่วน (Partitioning) ของ SMX ที่อยู่ในวัฏภาคบนเกิดขึ้นเนื่องจากผลของ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และผลจากการเกิด salting out การศึกษาพบว่าเส้นแบ่งวัฏภาค (Phase diagram) มีการยกตัวสูงขึ้นโดยเรียงลำดับดังนี้  $\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 > \text{K}_2\text{HPO}_4 > \text{K}_2\text{CO}_3 > \text{NaH}_2\text{PO}_4 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{KCl}$  โครงสร้างของแอนไอออนจะแสดงอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำได้ดีกว่าซึ่งมีประโยชน์ต่อการสร้างระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแอนไอออนที่มีเวเลนซ์สูงจะทำหน้าที่เป็น salting out agent ได้ดีกว่าแอนไอออนเวเลนซ์ต่ำเพราะแอนไอออนที่มีเวเลนซ์สูงจะมีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบมากกว่า ดังนั้นการลดปริมาณน้ำลงจะมีประโยชน์ต่อ PEG 400 ที่มีน้ำล้อมรอบอยู่ ทำการเลือก  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  เนื่องจากมีค่าพลังงานอิสระกิบส์ (Gibbs free energy) เป็นลบมาก [40] และสามารถวิเคราะห์ได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการตรวจวัด SMX

Juan Han และคณะ (2011) [41] ใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคร่วมกับเทคนิค Solvent sublation (SS) เพื่อทำการเตรียมตัวอย่างและแยกคลอแรมเฟนิคอล (CAP) ในตัวอย่างน้ำและอาหาร จากนั้นหาปริมาณ CAP โดยใช้เทคนิค HPLC ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคน้ำของเหลวไอออนิก (ionic liquid) คือ 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ( $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ ) มาใช้แทนพอลิเมอร์ และใช้เกลืออินทรีย์ คือ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ขั้นตอนการแยก CAP จะดูดซับอยู่บนผิวของฟองอากาศที่เกิดขึ้นจากการไหลแก๊สในโตรเจนภายใน flotation cell ที่บรรจุด้วยไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและตัวอย่าง และมีของเหลวไอออนิกอยู่ส่วนบนสุดของ sublation cell โดย CAP ที่ดูดซับอยู่กับฟองอากาศจะลอยตัวไปยังชั้นของของเหลวไอออนิกและเกิดการถ่ายโอนมวลทำให้ CAP สามารถละลายอยู่ในชั้นของเหลว ไอออนิกได้และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ CAP ต่อไป จากการศึกษาชนิดของเกลือที่นำมาใช้ เช่น โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{KOH}$ ), โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ), ไตรโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ ), ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), โพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) สามารถทำให้เกิดการแยกระหว่างวัฏภาคได้ แต่เกลือกรด หรือเกลือกลาง เช่น โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ), โพแทสเซียมคลอไรด์ ( $\text{KCl}$ ) ไม่ทำให้เกิดการแยกระหว่างวัฏภาค แสดงว่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อสภาพขั้วของวัฏภาคโดยไอออนลบที่มีประจุมากจะเป็น salting-out agents ได้ดีกว่าไอออนลบที่ประจุน้อยเนื่องจากมีวาเลนซ์อิเล็กตรอนมากทำให้โมเลกุลของน้ำมาล้อมรอบ (hydrate) ได้มากกว่า ดังนั้นจึงเลือก  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ในการวิเคราะห์ เพราะมีคุณสมบัติเป็น

salting-out agents ที่ดีและให้ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการแยกวัฏภาค และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ  $K_2HPO_4$  มากขึ้นทำให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง เพราะเมื่อความเข้มข้น  $K_2HPO_4$  มากขึ้นทำให้สารละลายมีความหนืดมากขึ้นทำให้การถ่ายโอนมวลระหว่าง CAP กับฟองอากาศแยกลง ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ  $K_2HPO_4$  คือ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v) เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 0.5–500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชัดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชัดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณ 0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) 97.1–101.9 เปอร์เซ็นต์

Jun Yuan และคณะ (2011) [42] ทำการสกัด Iturin A จาก *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 ที่ได้จากการหมัก โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในการสกัดและหาปริมาณด้วยเทคนิค HPLC ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคประกอบด้วยเอทานอลกับแอมโมเนียมซัลเฟต สารประกอบทางชีวภาพสามารถเสื่อมสภาพได้ง่ายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษและในสถานะที่มีแรงตึงผิวสูง แต่ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมีส่วนประกอบของน้ำมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และมีแรงตึงผิวดำ Iturin A จะถูกสกัดไปอยู่ในวัฏภาคบนที่มีเอทานอลอยู่นำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิค HPLC การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้ปริมาณของชั้นเกลือลดลงแต่ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้นทำให้ยากต่อการทดลอง ดังนั้นจึงใช้การสังเกตลักษณะของวัฏภาคร่วมด้วยโดยจะใช้ได้เมื่อสารละลายเกิดความขุ่นและเกิดการแยกวัฏภาคเมื่อนำไปปั่นกวน สถานะที่เหมาะสมเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม และเอทานอล 0.2 มิลลิลิตร อุณหภูมิ และเวลาส่งผลเพียงเล็กน้อยในการสกัดจึงเลือกการปั่นกวนที่ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ประสิทธิภาพการสกัดจะลดลงเมื่อความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5-8 เทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 20–140 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.9976 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ของเวลาในการแยกและพื้นที่พิกเท่ากับ 1.29 และ 1.45 ตามลำดับ

Guilherme Dias Rodrigues และ คณะ (2010) [43] ทำการสกัดฟีนอล (Phenol) และโอครีซอล (o-cresol) ในตัวอย่างน้ำเสียและน้ำธรรมชาติด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคและหาปริมาณด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี เทคนิคนี้อาศัยปฏิกิริยาระหว่างฟีนอล, โซเดียมไนโตรปริสไซค์ (NPS) และไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ (HL) ในสถานะเบส (pH 12.0) เกิดเป็นสารเชิงซ้อน  $[Fe_2(CN)_{10}]^{10-}$  ซึ่งละลายอยู่ในวัฏภาคบนคือ โพลีเอททิลีนออกไซด์ (มวลโมเลกุล 1500) โดยทำการเปรียบเทียบกับเกลือทั้ง 3 ชนิด  $Li_2SO_4$ ,  $Na_2SO_4$  และ  $K_2HPO_4 + KOH$  ภายใต้สถานะที่เหมาะสมเทคนิคนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 1.50 – 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของฟีนอลและโอครีซอล เท่ากับ 0.38 และ 0.30 ตามลำดับ ชัดจำกัดในการตรวจวัดของฟีนอลและโอครีซอล เท่ากับ 1.27 และ 1.88 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ชัดจำกัดในการวิเคราะห์ของฟีนอลและโอครีซอล เท่ากับ 4.22 และ 6.28 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ตามลำดับ ร้อยละการคืนกลับในตัวอย่างน้ำธรรมชาติและตัวอย่างน้ำเสียเท่ากับ 95.7 เปอร์เซ็นต์ และ 107 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Chun-Xiang Li และคณะ (2009) [44] ทำการสกัด รอกซิโทรมัยซิน (ROX) ในตัวอย่างน้ำ โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ประกอบด้วยของเหลวไอออนิก 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Bmim]BF<sub>4</sub>) และเกลือโซเดียมคาร์บอเนต (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ในการเตรียมตัวอย่างร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์โฟโตเมทรี ใช้ของเหลวไอออนิกเป็น salting-out agent แทน Cl<sup>-</sup> เพราะเมื่อของเหลวไอออนิกละลายน้ำ BF<sub>4</sub><sup>-</sup> จะเป็นสารที่ทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในสายพอลิเพปไทด์ และระหว่างตัวทำละลายที่เป็นน้ำกับ โปรตีน (chaotropic) ได้ดีกว่า Cl<sup>-</sup> จากการเปรียบเทียบเกลือทั้ง 4 ชนิด คือ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ที่ใช้ในการสร้างวัฏภาคพบว่า alkaline salts คือ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ให้ประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุด เพราะเป็น kosmotropic ions ที่มีอันตรกิริยากับโมเลกุลน้ำแรงกว่า เนื่องจากไอออนลบที่มากจะมีเวเลนซ์อิเล็กตรอนมากกว่าไอออนลบที่น้อยทำให้โมเลกุลของน้ำมาเกาะได้มากกว่าจึงเป็น salting-out agent ที่ดี ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 8-12 และในสภาวะที่เป็นกรดหรือเบสที่รุนแรง ROX จะถูกย่อยสลาย ปริมาณที่เหมาะสมของ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ที่เติมลงไปเท่ากับ 2.9 กรัม เพราะความเข้มข้นของ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> สูงพอที่ทำให้ ROX ตกตะกอนและไม่ทำให้เกิดการสลายตัวของ ROX อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 323.15 เคลวิน เนื่องจากเมื่อให้อุณหภูมิที่สูงกว่านี้ ROX จะเริ่มสลายตัวทำให้ยากต่อการแยกวัฏภาคเพราะความสามารถในการแยกวัฏภาคของของเหลวไอออนิกจะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ จากการศึกษากลไกของการเกิดวัฏภาคพบว่าแรงที่ใช้ในการดึงดูดโมเลกุลของน้ำ (hydration strength) ของเกลืออนินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จะมีผลต่อการเกิด salting-out เมื่อละลายเกลือลงในน้ำทำให้เกิดการแข่งขันระหว่างเกลืออนินทรีย์และส่วนที่ชอบน้ำของของเหลวไอออนิก โดยเกลืออนินทรีย์มีอิทธิพลมากกว่าเนื่องจากมีแรงดึงดูดกับน้ำมากกว่า การเกิดไมเกรชันของโมเลกุลน้ำที่เคลื่อนที่ออกจากของเหลวไอออนิกทำให้การละลายน้ำและโมเลกุลน้ำรอบๆ ลดลง เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการสกัด 90 เปอร์เซ็นต์ ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 1.00–20.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 1.9

สิริพร (2010) [6] : ทำการสกัดเบนโซเอทจากผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค และตรวจวัดวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี มีการศึกษาแผนภาพวัฏภาค (phase diagram) ของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG - เกลือ - น้ำ โดยการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ เช่น น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ชนิดของเกลืออนินทรีย์ และช่วงความเป็นกรด-ด่าง สภาวะที่เหมาะสมซึ่งเลือกใช้ในการสกัดตัวอย่าง คือ สารละลาย PEG1000 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v) กับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v) โดยให้

ประสิทธิภาพการสกัดในช่วง 94.36 – 103.21 เปอร์เซ็นต์ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์และคำนวณหาปริมาณเบนโซเอทโดยอาศัย baseline technique ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 25 – 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ( $r^2 = 0.9999$ ) ร้อยละการกลับคืน (%Recovery) มีค่าในช่วง 90.24 - 104.19 เปอร์เซ็นต์

Qing Cao และคณะ (2007) [45] ทำการสกัดพาวาเวอรีน (Papaverin) ในดอกฝิ่น (Pericarpium papaveris) โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคโพลีเอททิลีนไกลคอลกับแอมโมเนียมซัลเฟต และหาปริมาณพาวาเวอรีน ด้วยเทคนิค HPLC ระบบโพลีเอททิลีนไกลคอลกับเกลืออื่นที่มีข้อดีกว่าการใช้ของเหลวไอออนิก คือ ค่าใช้จ่ายถูกกว่า และดีกว่าระบบโพลีเอททิลีนไกลคอลกับเด็กซ์แทรน คือ มีความหนืดต่ำกว่า จากการเปรียบเทียบโพลีเอททิลีนไกลคอลที่น้ำหนักโมเลกุลต่างกัน PEG800, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 พบว่า PEG6000 สามารถแยกเป็นสองวัฏภาคได้ดีที่สุด เมื่อโพลีเอททิลีนไกลคอลมีน้ำหนักโมเลกุลมากขึ้นจะเกิดการเข้ากันไม่ได้ของน้ำ (hydration shells) ที่ล้อมรอบอยู่ระหว่างไอออนและโพลีเอททิลีนไกลคอลเนื่องจากแรง repulsive electrostatic image ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสมให้ประสิทธิภาพการสกัด 93-96 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการคืนกลับ 97-100 เปอร์เซ็นต์ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 1.8-2.5 เปอร์เซ็นต์ ชีดจำกัดในการตรวจวัด 2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงความเป็นเส้นตรง 0.1 – 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Shehong Li และคณะ (2007) [46] ได้พัฒนาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคซึ่งประกอบด้วยโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) ร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ในการแยกและวิเคราะห์มอร์ฟีนในชะเอม โดยทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการแยก เช่น ชนิดและความเข้มข้นของเกลือ น้ำหนักโมเลกุลของโพลีเอททิลีนไกลคอล อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งพบว่าชนิดของเกลือมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดของมอร์ฟีนและสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกั่มอร์ฟีน ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแรงไฮโดรโฟบิกของพันธะไฮโดรเจนมีอันตรกิริยาระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์และวัฏภาค ซึ่งสำคัญมากต่อกระบวนการสกัด สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ประกอบด้วย PEG 2000 จำนวน 0.5 กรัม และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 1.5 กรัม และให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนจากการเดิมสารมาตรฐานเท่ากับ 91.7–100.3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.0–3.0 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยระบบของเหลว หรือวิธีการสกัดด้วยระบบของแข็ง (solid-phase extraction) พบว่า วิธีการนี้ราคาถูก กระบวนการสกัดไม่มีสารอินทรีย์และเป็นเทคนิคใหม่ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

S. Chethana และคณะ (2007) [47] : ได้นำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมาใช้ในการสกัด betalains จากน้ำตาล ทำการศึกษาผลของพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ความยาวของเส้นผูก สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาค ความเข้มข้นของวัฏภาคที่มีผลต่อการแยก betalains ความแตกต่างของการแยก

betalains และน้ำตาลในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะทำให้เส้นผุกเพิ่มขึ้น 34 เปอร์เซ็นต์ และมี betalains ประมาณ 70-75 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาล มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในวัฏภาคบน และวัฏภาคล่าง

# บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

#### 3.1.1 สารเคมี

1. โพลีเอททิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1500 (PEG 1500) ของบริษัท SDF
2. โพลีเอททิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 4000 (PEG 4000) ของบริษัท Ajax Finechem
3. โพลีเอททิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 8000 (PEG 8000) ของบริษัท Sigma-Aldrich
4. แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) ความบริสุทธิ์ 99% ของบริษัท Calrlo Erba
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความบริสุทธิ์ 99.9% ของบริษัท Rankem
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความบริสุทธิ์ 99% ของบริษัท Calrlo Erba
7. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ( $\text{NaHCO}_3$ ) ความบริสุทธิ์ 99% ของบริษัท Calrlo Erba
8. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ความบริสุทธิ์ 99% ของบริษัท Calrlo Erba
9. โซเดียมเบนโซเอต ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{COONa}$ ) ความบริสุทธิ์ 99% ของบริษัท Fluka
10. โซเดียมซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) ความบริสุทธิ์ 99% ของบริษัท Calrlo Erba
11. โพแทสเซียมซอร์เบต ( $\text{C}_5\text{H}_7\text{COOK}$ ) ความบริสุทธิ์ 99% ของบริษัท Sigma-Aldrich
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความบริสุทธิ์ 98% ของบริษัท Rankem
13. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Calrlo Erba
14. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

#### 3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) บริษัท Shimadzu Corporation รุ่น UV-1800
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น AUX220 บริษัท Shimadzu Corporation

3. เครื่อง Magnetic stirrer รุ่น Fisherrand บริษัท Fisher scientific

4. เครื่อง Vortex mixer รุ่น Vortex Genie2 บริษัท Scientetific Industries

### 3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 สารละลายโพลีเอททิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1500 4000 และ 8000 (PEG 1500 4000 และ 8000) ที่เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w)

- ชั่งโพลีเอททิลีนไกลคอลแต่ละน้ำหนักโมเลกุลจำนวน 50 กรัม และเติมน้ำปราศจากไอออนลงไปจนได้สารละลายหนัก 100 กรัม

3.2.2 สารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ที่เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w)

- ชั่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จำนวน 30 กรัม และเติมน้ำปราศจากไอออนลงไปจนได้สารละลายหนัก 100 กรัม

3.2.3 สารละลายเกลือผสมแอมโมเนียมซัลเฟตกับโซเดียมคลอไรด์ ในอัตราส่วนต่างๆ คือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่อโซเดียมคลอไรด์เป็น 1:1.8 และ 2:1 ที่เข้มข้นต่าง ๆ เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w)

- ชั่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จำนวน 14 กรัม และเกลือโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 26 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออนลงไปจนได้สารละลายหนัก 100 กรัม จะได้สารละลายเกลือผสมแอมโมเนียมซัลเฟตกับโซเดียมคลอไรด์ ในอัตราส่วน 1:1.8 เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w)

- ชั่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จำนวน 20 กรัม และเกลือโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 10 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออนลงไปจนได้สารละลายหนัก 100 กรัม จะได้สารละลายเกลือผสมแอมโมเนียมซัลเฟตกับโซเดียมคลอไรด์ ในอัตราส่วน 2:1 เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w)

3.2.4 สารละลายโพลีเอททิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1500 4000 และ 8000 (PEG 1500 4000 และ 8000) ที่เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v)

- ชั่งโพลีเอททิลีนไกลคอลแต่ละน้ำหนักโมเลกุลจำนวน 125 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.2.5 สารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ที่เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v)

- ชั่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จำนวน 100 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.2.6 สารละลายเกลือผสมแอมโมเนียมซัลเฟตกับโซเดียมคลอไรด์ ในอัตราส่วนต่างๆ คือเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่อโซเดียมคลอไรด์เป็น 1:1.8 และ 2:1 ที่เข้มข้นต่างๆ เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v)

- ชั่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จำนวน 35 กรัม และเกลือโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 65 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายเกลือผสมแอมโมเนียมซัลเฟตกับโซเดียมคลอไรด์ ในอัตราส่วน 1:1.8 เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v)

- ชั่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จำนวน 50 กรัม และเกลือโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 25 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายเกลือผสมแอมโมเนียมซัลเฟตกับโซเดียมคลอไรด์ ในอัตราส่วน 2:1 เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v)

3.2.7 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นเข้มข้น 6 โมลาร์

- ตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จำนวน 125 มิลลิลิตร เทลงในบีกเกอร์ซึ่งบรรจุน้ำปราศจากไอออนอยู่ 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสารละลายจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.2.8 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 6 โมลาร์

- ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 60 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.2.9 สารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร

- ชั่งสารมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ให้ได้น้ำหนักแน่นอนใกล้เคียง 1.0000 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายจนครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.2.10 สารละลายมาตรฐาน โพแทสเซียมซอร์เบทเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร

- ชั่งสารมาตรฐาน โพแทสเซียมซอร์เบทให้ได้น้ำหนักแน่นอนใกล้เคียง 0.1000 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายจนครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.2.11 สารละลายมาตรฐาน โซเดียมซัลไฟต์เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร

- ชั่งสารมาตรฐาน โซเดียมซัลไฟต์ให้ได้น้ำหนักแน่นอนใกล้เคียง 0.0100 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายจนครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

### 3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง

#### 3.3.1 การศึกษาผลการละลายของเกลือ

การศึกษาการละลายที่เหมาะสมของเกลือชนิดต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคต่อไป

1. เตรียมสารละลายเกลือ และเกลือผสมระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตกับสารเติมแต่งเกลือชนิดต่างๆ คือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO<sub>3</sub>) และ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ในอัตราส่วนและช่วงความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 3.1 ด้วยน้ำปราศจากไอออน

ตารางที่ 3.1 การศึกษาหาการละลายที่เหมาะสมของเกลือ ในอัตราส่วนและความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดของเกลือ	อัตราส่วน	ความเข้มข้น (%w/w)		
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	-	30	40	50
NaCl	-	25	30	40
KCl	-	15	18	30
NaHCO <sub>3</sub>	-	10	20	30
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	40	50	60

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) การศึกษาหาการละลายที่เหมาะสมของเกลือ ในอัตราส่วนและความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดของเกลือ	อัตราส่วน	ความเข้มข้น (%w/w)		
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> + NaCl	1:1	30	40	
	1:1.5	30	40	
	1:1.8	30	40	
	1:2	30	40	
	1:4	30	40	
	1:5	30	40	
	1.8:1	30	40	
	2:1	30	40	
	4:1	30	40	
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> + KCl	1:1	12	18	
	1:1.5	12	18	
	1:2	12	18	
	1:4	12	18	
	1.5:1	12	18	
	2:1	12	18	
	4:1	12	18	
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1:1	30	40	50
	1:1.8	30	40	50
	1:4	30	40	50
	1.8:1	30	40	50
	4:1	30	40	50

2. สังเกตการละลายของเกลือต่างๆ และบันทึกผลการทดลอง

3. นำสารละลายเกลือที่เหมาะสมไปใช้ในการศึกษาแผนภาพวัฏภาคต่อไป

### 3.3.2 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีน ไกลคอล กลีเซอ และน้ำ ด้วยวิธีการไทเทรตแบบ turbidometry เพื่อหาเส้นแบ่งวัฏภาค (binodal curve)

1. ชั่งสารละลายกลีเซอที่เหมาะสม จากหัวข้อ 3.3.1 ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w) และสารละลายโพลีเอททิลีน ไกลคอล ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%w/w) ให้มีน้ำหนักของสารละลายแต่ละชนิด ดังตารางที่ 3.2 ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีลักษณะขุ่น

ตารางที่ 3.2 น้ำหนักของสารละลายกลีเซอและสารละลายโพลีเอททิลีน ไกลคอลสำหรับเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

หลอดที่	น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนักรวม (กรัม)
	สารละลายกลีเซอ	สารละลายโพลีเอททิลีนไกลคอล	
1	0.5	4.5	5.0
2	1.5	3.5	5.0
3	2.5	2.5	5.0
4	3.5	1.5	5.0
5	4.5	0.5	5.0

2. เติมน้ำปราศจากไอออนที่ละน้อย ผสมให้เข้ากันจนได้สารละลายที่มีลักษณะใส

3. นำหลอดทดลองไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อหาน้ำหนักของน้ำปราศจากไอออนที่เติมลงไป

4. คำนวณหาความเข้มข้นของโพลีเอททิลีนไกลคอล และกลีเซอที่มีในสารละลายนั้น เพื่อเป็นค่าหนึ่งบนเส้นแบ่งวัฏภาค จากนั้นเปลี่ยน โพลีเอททิลีนไกลคอลที่น้ำหนัก โมเลกุลต่าง ๆ และชนิดของกลีเซอ เพื่อหาจุดอื่นๆ ที่อยู่บนเส้นแบ่งวัฏภาคต่อไป

### 3.3.3 การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200, 400 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

2. ปิเปตสารละลาย PEG โดยใช้ความเข้มข้นที่ได้จากหัวข้อ 3.3.2 จำนวน 5 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายเกลือที่ได้จากการศึกษาหาการละลายที่เหมาะสมในหัวข้อ 3.3.1 ที่ความเข้มข้นจากหัวข้อ 3.3.2 จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

3. นำสารละลายวัฏภาคบนซึ่งมีเบนโซเอทที่ถูกสกัดเข้าสู่ชั้นของโพลิเอททิลีนไกลคอลไปสแกนสเปกตรัมเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ในช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร และเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม โดยอาศัย baseline technique

### 3.3.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

การพิจารณาประสิทธิภาพการสกัดสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ที่ผ่านกระบวนการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค และนำสารละลายวัฏภาคบนไปวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอท ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยอาศัย baseline technique จากสมการ  $Abs_{269.5} - [(Abs_{266} + Abs_{275.5})/2]$  สามารถหาประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency, %E) โดยคำนวณจาก

$$E = V_t c_t / m_s$$

เมื่อ	$V_t$	=	ปริมาตรของวัฏภาคบน (mL)
	$c_t$	=	ความเข้มข้นของโซเดียมเบนโซเอทในวัฏภาคบน (mg/L)
	$m_s$	=	ปริมาณของโซเดียมเบนโซเอทที่เติมลงไป (mg/L)

#### 3.3.4.1 การศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลโพลิเอททิลีนไกลคอล

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

2. ปิเปตสารละลาย PEG 1500 โดยใช้ความเข้มข้นที่ได้จากหัวข้อ 3.3.2 (60%w/v) จำนวน 5 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายเกลือ ความเข้มข้นจากหัวข้อ 3.3.2 จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ผสมลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

3. นำสารละลายวัฏภาคบนซึ่งมีเบนโซเอทถูกสกัดเข้าสู่ชั้นของโพลิเอททิลีนไกลคอลไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร

4. ทำการทดลองซ้ำ ข้อ 1-3 โดยเปลี่ยนน้ำหนักโมเลกุลของ PEG เป็น 4000 (50%w/v) และ 8000 (45%w/v) และคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัด

### 3.3.4.2 การศึกษาผลของชนิดเกลือ

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5 มิลลิตร ใส่หลอดทดลอง
2. ปิเปตสารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 1500 โดยใช้ความเข้มข้นที่ได้จากหัวข้อ 3.3.2 (60%w/v) จำนวน 5 มิลลิตร และปิเปตสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นจากหัวข้อ 3.3.2 (40%w/v) จำนวน 5 มิลลิตร ใส่ผสมลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์
3. นำสารละลายวัฏภาคบนซึ่งมีเบนโซเอทถูกสกัดเข้าสู่ชั้นของโพลิเอททิลีนไกลคอลไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร
4. ทำการทดลองซ้ำ ข้อ 1-3 โดยเปลี่ยนชนิดของเกลือเป็นสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) และคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัด

### 3.3.4.3 การศึกษาผลของปริมาณเกลือเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการสกัด

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5.0 มิลลิตร ใส่หลอดทดลอง
2. ปิเปตสารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/v) ปริมาณคงที่ 5 มิลลิตร และปิเปตสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) โดยเปลี่ยนค่าปริมาณเป็น 4, 5, 6, 8 และ 10 มิลลิตร ใส่ผสมลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์
3. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัด

### 3.3.4.4 การศึกษาผลของปริมาณโพลิเอททิลีนไกลคอลเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการสกัด

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5 มิลลิตร ใส่หลอดทดลอง
2. ปิเปตสารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/v) โดยเปลี่ยนค่าปริมาณเป็น 4, 5, 6, 8 และ 10 มิลลิตร และปิเปตสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) ปริมาณคงที่ 5 มิลลิตร ใส่ผสมลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

3. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัด

#### 3.3.4.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกรด-ด่างที่มีต่อการสกัดเบนโซเอท

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยให้ความเข้มข้นของกรดและเบสเป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.5, และ 1.0 โมลาร์

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปิเปตสารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/v) ปริมาตรที่ได้จากหัวข้อ 3.3.4.3 (8 มิลลิลิตร) และปิเปตสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) ปริมาตรจากหัวข้อ 3.3.4.4 (5 มิลลิลิตร) ลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

3. บันทึกค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของกรดและเบส

4. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร

5. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ของกรดและเบส

#### 3.3.4.6 การศึกษาผลรบกวนของโพแทสเซียมซอร์เบท และโซเดียมซัลไฟต์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบท ความเข้มข้นในช่วง 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ความเข้มข้นในช่วง 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ผสมสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ไม่มีสารรบกวน) กับสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) 8 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

3. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง เพื่อหาค่า  $\pm 3SD$

4. จากนั้นผสมสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีสารรบกวนความเข้มข้นต่าง ๆ กับสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) 8 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v)

5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยก วัฏภาคอย่างสมบูรณ์

5. นำสารละลายวัฏภาคบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณค่าการดูดกลืนแสง

6. เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีสารรบกวนจากสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบท และสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ไม่มีสารรบกวน)

### 3.3.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400, 600 และ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

2. ปิเปตสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) 8 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิลิตร ใส่ผสมลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

3. นำสารละลายวัฏภาคบนซึ่งมีเบนโซเอทถูกสกัดเข้าสู่ชั้นของโพลิเอททิลีนไกลคอลไปวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอท ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยอาศัย baseline technique จากสมการ  $Abs_{269.5} - [(Abs_{266} + Abs_{275.5})/2]$  ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้แต่ละระดับความเข้มข้น

4. พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y)

### 3.3.6 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

นำสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลอง มาดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบหาปริมาณเบนโซเอท ดังนี้

#### 3.3.6.1 การทดสอบพิสัยและความเป็นเส้นตรง (Range and Linearity)

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400, 600 และ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายเบสลงค์ จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. ผสมกับสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) 8 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

3. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร

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

### 3.3.6.2 ขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

สามารถหาได้โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สูตร

$$y = y_b + 3 S_B$$

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

### 3.3.6.3 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,  $s_{y/x}$

### 3.3.6.4 ความเที่ยง (Precision)

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

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

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
 $\bar{x}$  = ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์

โดยใช้เกณฑ์การประเมินด้วย HORRAT โดยนำค่าความเข้มข้นมาคำนวณหา %RSD, โดยใช้ Horwitz's equation

สำหรับ Repeatability  $RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} = 0.66 \times 2C^{-0.1505}$

$RSD_r$  = ค่า RSD จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (repeatability); จัดเป็น Predicted RSD

C = Concentration ratio (ไม่มีหน่วย)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท และสารละลายเบลงค์ จำนวน 5 มิลลิตร ลงในหลอดทดลอง
3. ผสมกับสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) 8 มิลลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิตร ในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)
3. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร
4. หาค่าเฉลี่ยของปริมาณเบนโซเอท และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD)

### 3.3.6.5 ความแม่นยำ (Accuracy)

1. เตรียมสารละลายตัวอย่าง และสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ให้มีความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายเบลงค์ จำนวน 5 มิลลิตร ลงในหลอดทดลอง
3. ผสมกับสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) 8 มิลลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิตร ในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)
4. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณเบนโซเอท
5. หาค่าเฉลี่ยของปริมาณเบนโซเอทที่คำนวณได้ จากนั้นประเมินความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ในรูปของการหาค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้

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

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

### 3.3.7 การศึกษาเวลาในการแยกวัฏภาค

1. เตรียมสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600 และ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปิดสารละลายตัวอย่าง สารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท และสารละลายแบลงค์ จำนวน 5 มิลลิตร ลงในหลอดทดลอง
3. ผสมกับสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) 8 มิลลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิตร ในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ พร้อมทั้งจับเวลาในการแยกวัฏภาค
4. นำสารละลายวัฏภาคบนไปวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอท ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer และคำนวณหาปริมาณเบนโซเอท
5. ทำการทดลองซ้ำ ข้อ 1-3 โดยเปลี่ยนเป็นสารละลาย PEG 1500 (50%w/v) 5 มิลลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (50%w/v) 5 มิลลิตร
6. บันทึกเวลาในการแยกวัฏภาค

### 3.3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมเบนโซเอท ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว

1. นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากข้าว ได้แก่ เส้นก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็ก เส้นใหญ่ เส้นหมี่ ขนมหุ้น และเส้นกวยจั๊บ มาหั่นให้มีขนาดเล็กๆ ซึ่งตัวอย่างละ 20 กรัม ลงในกระบอกตวง
2. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 100 มิลลิตร แล้วถ่ายใส่ลงในบีกเกอร์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที พร้อมทั้งคนสารละลายตัวอย่างเป็นครั้งคราว เพื่อให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ผสมกับตัวอย่างได้ดีขึ้น
3. ปิเปิดสารละลายตัวอย่างจำนวน 25 มิลลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิตรและปรับด้วยน้ำปราศจากไอออน
4. จากนั้นปิเปิดสารละลายตัวอย่างจำนวน 5 มิลลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมกับสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) 8 มิลลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับ

สารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์

5. นำสารละลายวัฏภาคบนซึ่งมีเบนโซเอทถูกสกัดเข้าสู่ชั้นของโพลิเอทิลีนไกลคอลไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 266 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณเบนโซเอท

6. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีผู้ศึกษาก่อนหน้า [6] และวิธีมาตรฐานของ AOAC ข้อ 47.3.03

### 3.3.9 วิธีมาตรฐานของ AOAC ข้อ 47.3.03

#### 3.3.9.1 วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานของกรดเบนโซอิก

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิก (Stock standard solution) ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวทำละลายอีเทอร์

2. ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิก (Stock standard solution) มา 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 20, 60, 100, 140, 180 และ 220 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3. นำสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปสแกนสเปกตรัมความยาวคลื่นในช่วง 250 – 360 นาโนเมตร เพื่อหาตำแหน่งการดูดกลืนแสง

4. นำสารละลายมาตรฐานข้อ 2 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 267.5, 272 และ 276.5 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณการดูดกลืนแสง CE โดยอาศัย Baseline technique คือ

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

เมื่อ	CE	=	ค่าการดูดกลืนแสง
	CG	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร
	BF	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 267.5 นาโนเมตร
	DH	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร

5. พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ (แกน Y) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination,  $r^2$ )

### 3.3.9.2 วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการตรวจวัดปริมาณกรดเบนโซอิก

1. ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักแน่นอน 10.0 กรัม หรือปิเปตตัวอย่างให้มีปริมาตรแน่นอน 10.0 มิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวอย่าง
2. เจือจางตัวอย่างให้มีปริมาตรครบ 200 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายอิมตัวของโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งจะช่วยตกตะกอนสารอาหารที่ไม่ต้องการออกไป สำหรับกรดเบนโซอิก หรือโซเดียมเบนโซเอท ยังคงละลายอยู่ในสารละลาย เพราะใช้สารละลายเกลืออิมตัวของเกลือแกงในปริมาณมาก
3. ทำสารละลายตัวอย่างให้เป็นกรดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นและทดสอบความเป็นกรดด้วยกระดาษลิตมัส
4. สกัดสารละลายตัวอย่างด้วยอีเทอร์ 4 ครั้ง โดยใช้ปริมาตร 70, 50, 40 และ 30 มิลลิลิตร ตามลำดับ
5. นำสารละลายทั้งหมดที่สกัดด้วยอีเทอร์รวมกัน และล้างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นเท่ากับ 1+1000 จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ปริมาตร 50, 40 และ 30 มิลลิลิตร ตามลำดับ และทิ้งสารละลายกรดที่ใช้ล้างทิ้งไป
6. นำสารละลายที่สกัดด้วยอีเทอร์ จากข้อ 5 ใสลงในกระบอกตวง แล้วปรับปริมาตรจนครบ 200 มิลลิลิตร ด้วยอีเทอร์
7. นำสารละลายในข้อ 6 วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 267.5, 272 และ 276.5 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณการดูดกลืนแสง โดยอาศัย Baseline technique
8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิก ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจากกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณกรดเบนโซอิก หากต้องการคำนวณให้อยู่ในรูปเบนโซเอท สามารถคำนวณได้ดังนี้  

$$\text{กรดเบนโซอิก} \times 1.18 = \text{โซเดียมเบนโซเอท}$$

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เพื่อสกัดเบนโซเอทในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยใช้โพลีเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol: PEG) กับเกลืออนินทรีย์ เป็นองค์ประกอบหลักในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคร่วมกับการใช้สารเติมแต่งเกลือ ซึ่งการทดลองนั้นประกอบไปด้วย การศึกษาการละลายของเกลือ การศึกษาแผนภาพวัฏภาค (phase diagram) ของการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการแยกเบนโซเอท การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ การศึกษาเวลาในการแยกวัฏภาค และการนำระบบที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้สำหรับหาเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน

#### 4.1 ผลการศึกษาการละลายของเกลือ

การศึกษาระบบการละลายที่เหมาะสมของเกลือ จะทำการละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นเกลือหลักในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือชนิดต่างๆ คือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ( $\text{NaHCO}_3$ ) และ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ในอัตราส่วนและช่วงความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 3.1 ด้วยน้ำปราศจากไอออน ผลการศึกษาการละลายของเกลือชนิดต่างๆ ได้แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการศึกษาการละลายของเกลือ ในอัตราส่วนและช่วงความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดของเกลือ	อัตราส่วน	ความเข้มข้น (%w/w)			ความเข้มข้นของเกลือที่สามารถละลายน้ำเป็นสารละลายใส (%w/w)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	30	40	50	30 40 50
NaCl	-	25	30	40	25 30
KCl	-	15	18	30	15 18
$\text{NaHCO}_3$	-	10	20	30	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	-	40	50	60	40 50

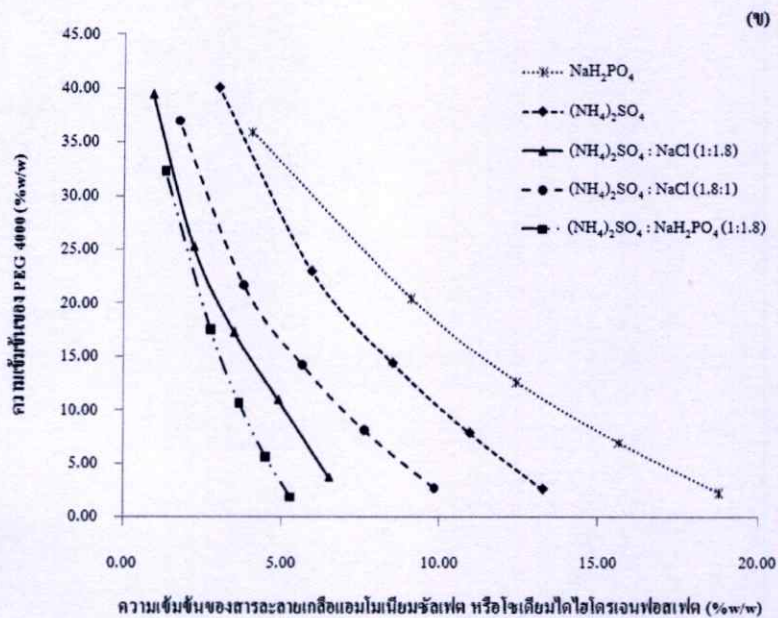
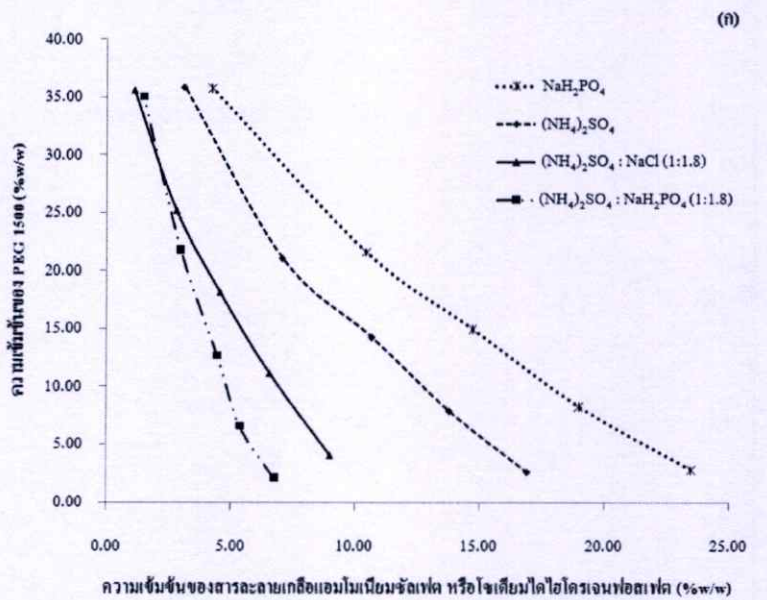
ชนิดของเกลือ	อัตราส่วน	ความเข้มข้น (%w/w)			ความเข้มข้นของเกลือที่สามารถละลายน้ำเป็นสารละลายใส (%w/w)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$	1:1	30	40		30 40
	1:1.5	30	40		30 40
	1:1.8	30	40		30 40
	1:2	30	40		30 40
	1:4	30	40		-
	1:5	30	40		-
	1.8:1	30	40		30 40
	2:1	30	40		30
	4:1	30	40		-
	5:1	30	40		-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{KCl}$	1:1	12	18		12
	1:1.5	12	18		12
	1:2	12	18		12
	1:4	12	18		12
	1.5:1	12	18		12
	2:1	12	18		12
	4:1	12	18		12
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$	1:1	30	40	50	30 40
	1:1.8	30	40	50	30 40
	1:4	30	40	50	30 40
	1.8:1	30	40	50	30 40
	4:1	30	40	50	30 40

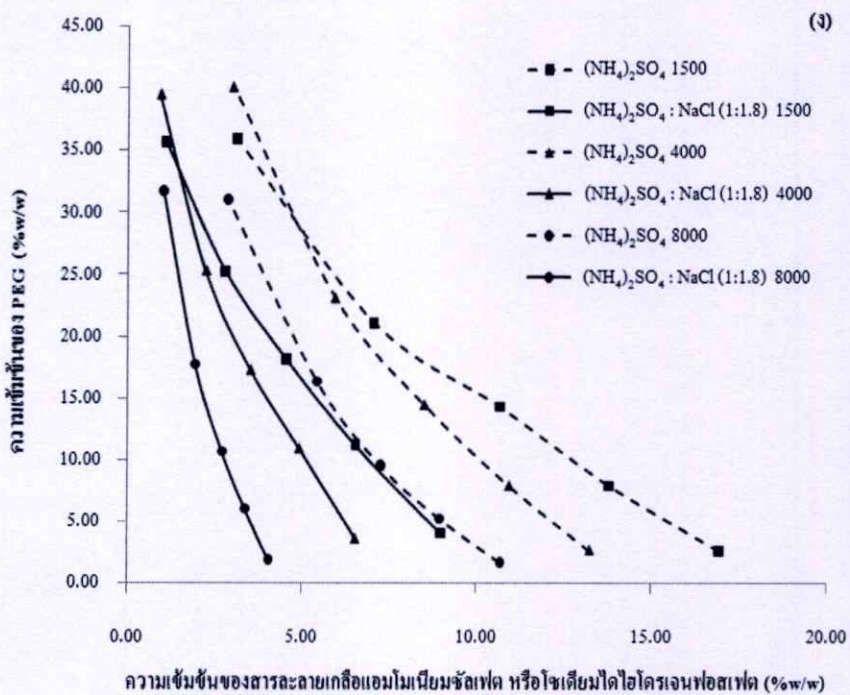
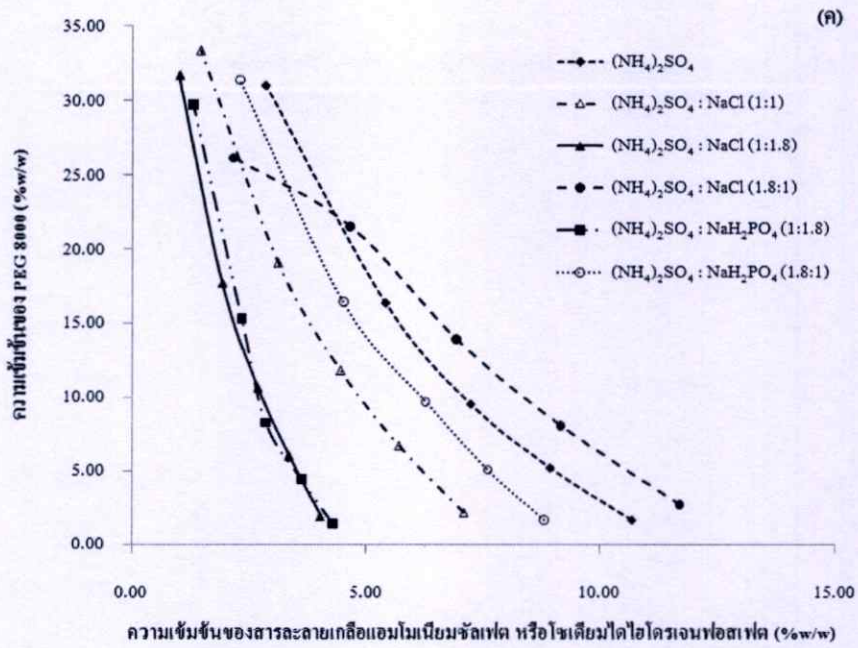
หมายเหตุ (-) หมายถึง ไม่สามารถละลายเป็นสารละลายใสได้ทั้งหมด

การศึกษาการละลายที่เหมาะสมของเกลือนั้นมีจุดประสงค์เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค จะเห็นได้ว่าเกลือแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายที่แตกต่างกัน และเมื่อนำมาผสมกับเกลืออีกชนิดหนึ่ง (สารเติมแต่งเกลือ) ก็ทำให้ความสามารถในการละลายเปลี่ยนไปด้วย ในการศึกษาต่อไปจะนำสารละลายเกลือที่สามารถละลายเป็นสารละลายใสได้ทั้งหมดไปศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

#### 4.2 ผลการศึกษาแผนภาพวัฏภาคของการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล เกลือ และน้ำ ด้วยวิธีการไทเทรตแบบ turbidometry เพื่อหาเส้นแบ่งวัฏภาค (binodal curve) เป็นการไทเทรตสารละลายสองวัฏภาคที่มีลักษณะเป็นสารละลายขุ่น กับน้ำปราศจากไอออน จนเกิดเป็นสารละลายวัฏภาคเดียวที่มีลักษณะใส (clear phase) ซึ่งจะนำสารละลายเกลือที่ศึกษาการละลายที่เหมาะสมแล้วดังตารางที่ 4.1 มาสร้างแผนภาพวัฏภาคกับโพลีเอททิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1500 4000 และ 8000 โดยแต่ละระบบจะทำการศึกษาจุด (node) บนเส้นแบ่งวัฏภาคทั้งหมด 5 จุด เมื่อแปรค่าแล้ว (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข) ให้แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG – เกลืออนินทรีย์ หรือเกลืออนินทรีย์ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ – น้ำ แสดงดังรูปที่ 4.1





**รูปที่ 4.1** แสดงแผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG 1500 – เกลื่อนิทรีย์หรือเกลื่อนิทรีย์ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ – น้ำ (ก) แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG 4000- เกลื่อนิทรีย์หรือเกลื่อนิทรีย์ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ – น้ำ (ข) แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG 8000 – เกลื่อนิทรีย์หรือเกลื่อนิทรีย์ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ – น้ำ (ค) แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG – เกลื่อนิทรีย์หรือเกลื่อนิทรีย์ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ – น้ำ (ง)

จากแผนภาพวิภูภาคของระบบสารละลายน้ำสองวิภูภาค พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของโพลิเอททิลีนไกลคอล ชนิดของเกลือและสารเติมแต่งเกลือที่ผสมกันมีผลต่อการเกิดวิภูภาค ในสภาวะการทดลองเดียวกันนั้นเกลืออนินทรีย์ และเกลืออนินทรีย์ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือบางชนิดไม่สามารถสร้างเป็นแผนภาพวิภูภาคได้ น่าจะมีสาเหตุมาจากเกลือบางชนิดที่มีแรงกระทำกับโมเลกุลของน้ำได้ดี เช่น  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  :  $\text{KCl}$  ที่อัตราส่วนต่างๆ,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  :  $\text{NaCl}$  และ  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ในบางอัตราส่วน และพบว่า เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของโพลิเอททิลีนไกลคอลเพิ่มขึ้น จะทำให้ความต้องการความเข้มข้นของสารละลายเกลือในการแยกวิภูภาคลดลง และเส้นแบ่งวิภูภาคที่ได้ไม่สมมาตร [15] ดังนั้น น้ำหนักโมเลกุลของโพลิเอททิลีนไกลคอล ชนิดของเกลือและสารเติมแต่งเกลือจึงเป็นปัจจัยที่กำหนดลักษณะของการเกิดวิภูภาค

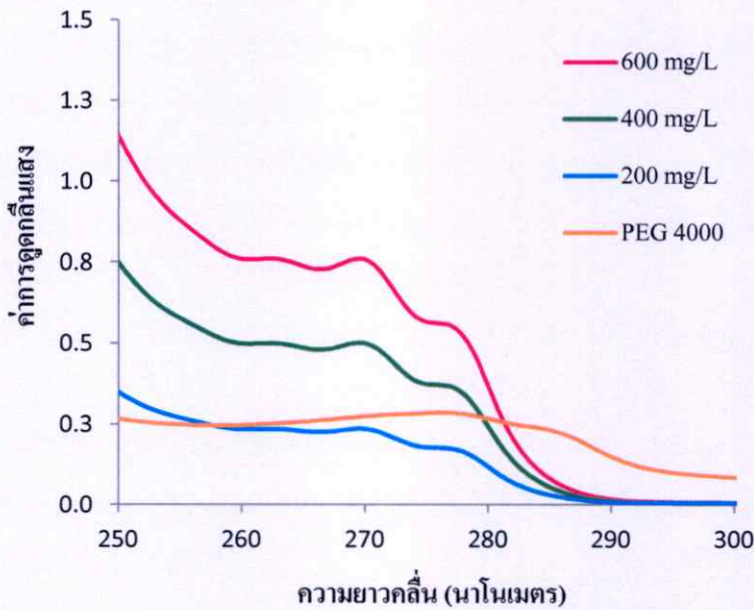
นอกจากนี้ยังพบว่าเกลือ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  นั้นมีความต้องการความเข้มข้น โพลิเอททิลีนไกลคอล และเกลือมากในการเกิดวิภูภาค และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างของระบบได้ง่ายจึงไม่เหมาะต่อการศึกษาต่อ ส่วนเกลือ  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ที่มีส่วนผสมของ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน เกลือ  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  นั้น ได้มีผู้เลือกใช้ในการงานวิจัยที่ศึกษาก่อนหน้านี้ [6] และในงานวิจัยนี้จึงสนใจนำมาพัฒนาต่อโดยการเติมเกลือ  $\text{NaCl}$  ที่เป็นสารเติมแต่งเกลือลงไป เนื่องจากเกลือที่เติมลงไปจะมีผลต่อแรงไอออนิกของระบบ ทำให้องค์ประกอบของระบบเปลี่ยนแปลงไป จากรูปที่ 4.1(ง) จะเห็นว่าเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบที่มีสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์นั้นจะเข้าใกล้จุดกำเนิดมากขึ้น คือ จะใช้ความเข้มข้นของโพลิเอททิลีนไกลคอลและเกลือในการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวิภูภาคน้อยลง ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้ระบบสารละลายน้ำสองวิภูภาคดังแผนภาพวิภูภาคในรูปที่ 4.1(ง) โดยใช้น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้นของโพลิเอททิลีนไกลคอล ชนิดและความเข้มข้นของเกลือตารางที่ 4.2 ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของโพลิเอททิลีนไกลคอล ชนิดและความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

น้ำหนักโมเลกุล โพลิเอททิลีนไกลคอล	ชนิดสารละลายเกลือ	ความเข้มข้น (%w/v)	
		โพลิเอททิลีนไกลคอล	สารละลายเกลือ
1500	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	60	40
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : $\text{NaCl}$ (1:1.8)		40
4000	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50	40
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : $\text{NaCl}$ (1:1.8)		40
8000	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45	24
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : $\text{NaCl}$ (1:1.8)		40

### 4.3 ผลการศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

ทำการทดลองเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ โดยจะนำสารที่สกัดได้จากวัฏภาคบนในชั้นของโพลิเอททิลีน ไกลคอล ซึ่งมีสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 200, 400 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายแบล็ก คือ น้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค สเปกตรัมที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทในชั้นโพลิเอททิลีน ไกลคอล

จากรูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทในช่วงความยาวคลื่น 266 ถึง 275.5 นาโนเมตร คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทโดยอาศัย baseline technique จากสมการ  $Abs_{269.5} - [(Abs_{266} + Abs_{275.5})/2]$

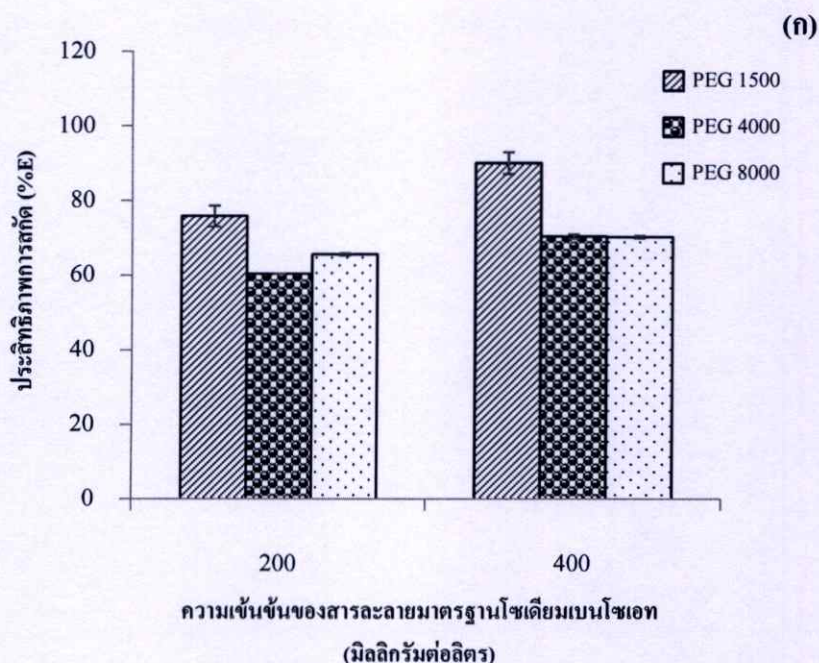
### 4.4 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

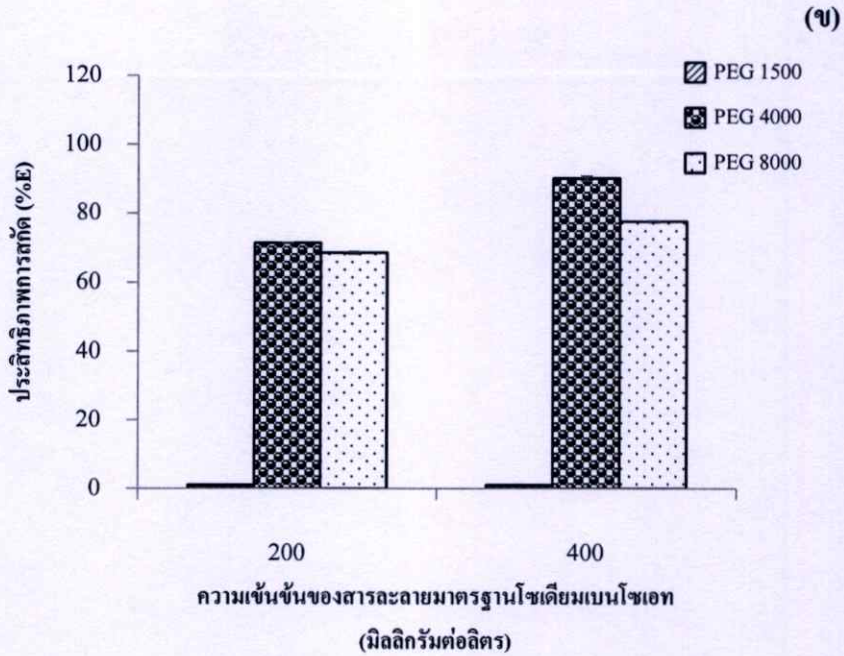
การแยกจะเกิดขึ้นได้นั้นขึ้นอยู่กับการแข่งขันการไฮเดรชันระหว่างโพลิเอททิลีน ไกลคอล กับเกลืออนินทรีย์หรือเกลืออนินทรีย์ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ (NaCl) ซึ่งถ้าระบบเกิดปฏิกิริยาไฮโดรโฟบิกระหว่างเบนโซเอทและโพลิเอททิลีน ไกลคอล เมื่อไฮโดรโฟบิกของเบนโซเอทจับไฮโดรโฟบิกของโพลิเอททิลีน ไกลคอล ได้มากขึ้น จะทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงขึ้น ทำให้เบนโซเอทง่ายที่จะเข้าไปอยู่ในชั้นของโพลิเอททิลีน ไกลคอล ดังนั้นจึงต้องศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อ

พฤติกรรมของการแยกของตัวถูกละลาย (solute) คือ เบนโซเอท ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เช่น น้ำหนักโมเลกุลพอลิเมอร์ ชนิดและความเข้มข้นของเกลือและสารเติมแต่ง ความเป็นกรด-ด่างของระบบ เวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาค และคุณลักษณะของตัวถูกละลาย

#### 4.4.1 ผลการศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลโพลีเอททิลีนไกลคอล

การศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลโพลีเอททิลีนไกลคอลทำได้โดยการสกัดสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายมาตรฐาน 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PEG 1500 (60%w/v) 5 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์แล้ว นำวัฏภาคบนที่เบนโซเอทถูกสกัดเข้าสู่ชั้นของโพลีเอททิลีนไกลคอลไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266, 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนน้ำหนักโมเลกุลเป็น 4000 (50%w/v) และ 8000 (45%w/v) กำหนดค่าการดูดกลืนแสง และหาประสิทธิภาพการสกัด ผลของน้ำหนักโมเลกุลโพลีเอททิลีนไกลคอลต่อประสิทธิภาพการสกัด ดังรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.3





รูปที่ 4.3 แสดงผลของน้ำหนักโมเลกุล โพลีเอททิลีน ไกลคอลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอท โดยใช้สารละลายเกลือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (ก) และเกลือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$  (1:1.8) (ข)

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของน้ำหนักโมเลกุล โพลีเอททิลีน ไกลคอลและชนิดสารละลายเกลือต่อประสิทธิภาพการสกัด (n=3)

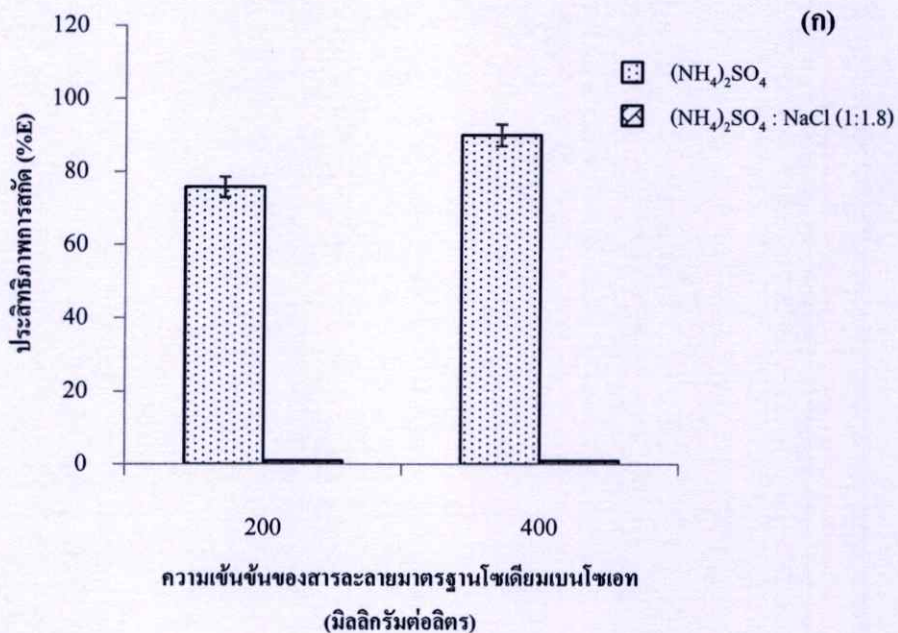
น้ำหนักโมเลกุล โพลีเอททิลีน ไกลคอล	ชนิดสารละลายเกลือ	ประสิทธิภาพการสกัด (%E)	
		ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท	
		200 มิลลิกรัมต่อลิตร	400 มิลลิกรัมต่อลิตร
1500	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$75.80 \pm 2.82$	$83.02 \pm 2.77$
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$ (1:1.8)	ไม่เกิดการแยกวัฏภาค	
4000	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$61.36 \pm 1.01$	$70.34 \pm 0.60$
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$ (1:1.8)	$71.36 \pm 1.28$	$89.96 \pm 0.76$
8000	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$65.56 \pm 3.21$	$70.14 \pm 2.32$
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$ (1:1.8)	$68.49 \pm 0.23$	$77.41 \pm 0.16$

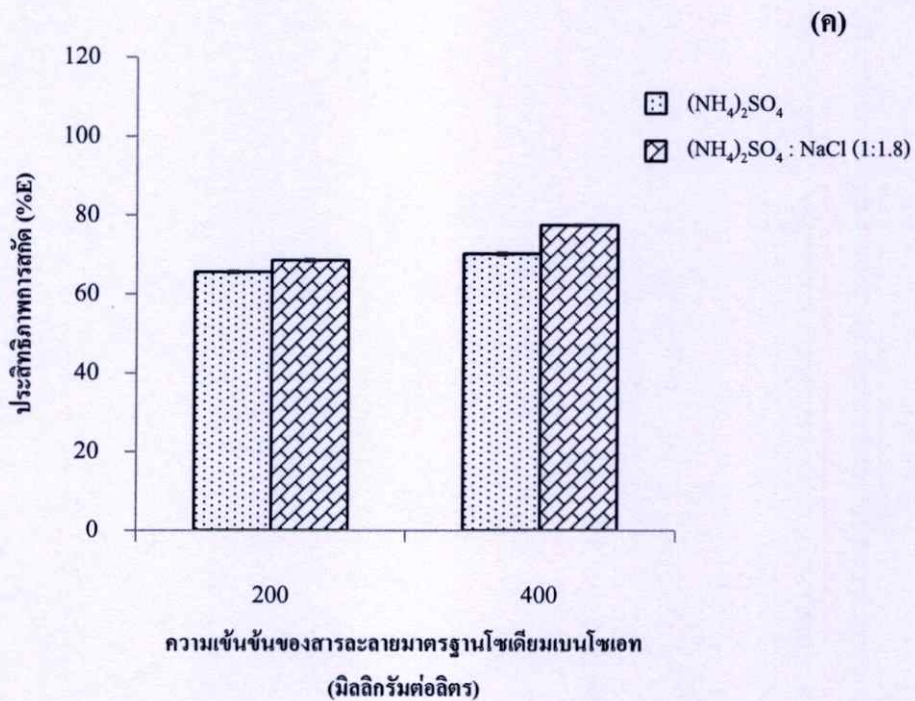
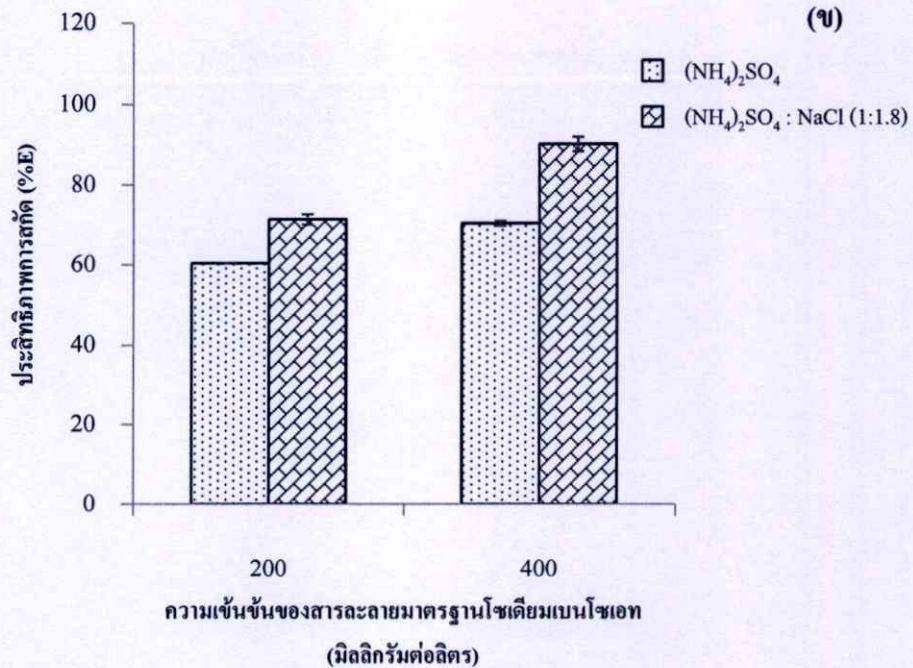
จากรูปที่ 4.3 (ก) แสดงให้เห็นว่า PEG 1500 ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่า PEG 4000 และ 8000 เมื่อใช้สารละลายเกลือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  และในรูปที่ 4.3 (ข) เป็นการใส่สารละลายเกลือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$  (1:1.8) พบว่า PEG 1500 ไม่สามารถทำให้เกิดการแยกวัฏภาคได้ เนื่องจากโพลีเอททิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีโครงสร้างโมเลกุลขนาดเล็ก และมีสภาพขั้ว

ที่มีแรงกระทำกับโมเลกุลของน้ำได้ดีกว่าโพลีเอททิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และจะเห็นได้ว่า PEG 4000 และ 8000 ให้ประสิทธิภาพในการสกัดใกล้เคียงในทั้งสองสารละลายเกลือ โดยปกติแล้วน้ำหนักโมเลกุลของ PEG เพิ่มขึ้น แนวโน้มของความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งมีผลทำให้เบนโซเอทถูกสกัดเข้าไปในชั้นของสารละลายพอลิเมอร์ได้ยากขึ้น เนื่องจากมีแรงดึงผิวระหว่างวัฏภาคสูง ดังนั้นการทดลองนี้ จึงเลือกใช้ PEG 4000 เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

#### 4.4.2 ผลการศึกษาผลของชนิดเกลือ

การศึกษาผลของชนิดเกลือ ซึ่งพิจารณาจากประสิทธิภาพการสกัดของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้สารละลายมาตรฐาน 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PEG 5 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (40%w/v) 5 มิลลิลิตร ทำการทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนชนิดของเกลือเป็น  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$  (1:1.8) (40%w/v) เมื่อทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นของวัฏภาคสมบูรณ์ นำสารละลายวัฏภาคส่วนบนไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266, 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสง และหาประสิทธิภาพการสกัด ผลของชนิดสารละลายเกลือต่อประสิทธิภาพการสกัด ดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.4





รูปที่ 4.4 แสดงผลของชนิดเกลือต่อประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอทโดยใช้สารละลาย PEG 1500 (ก) ใช้สารละลาย PEG 4000 (ข) และใช้สารละลาย PEG 8000 (ค)

ความสามารถของการ salting-out ของเกลือประจุบวกและประจุลบแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ชนิดของเกลือจะมีผลอย่างมากต่อพฤติกรรมและการแยกวัฏภาคและประสิทธิภาพการสกัด ในระบบของสารละลายน้ำสองวัฏภาคซึ่งมีองค์ประกอบของโพลีเอททิลีนไกลคอลและเกลือ จากรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่า ชนิดของเกลือนั้นมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอท ทั้งในสารละลาย

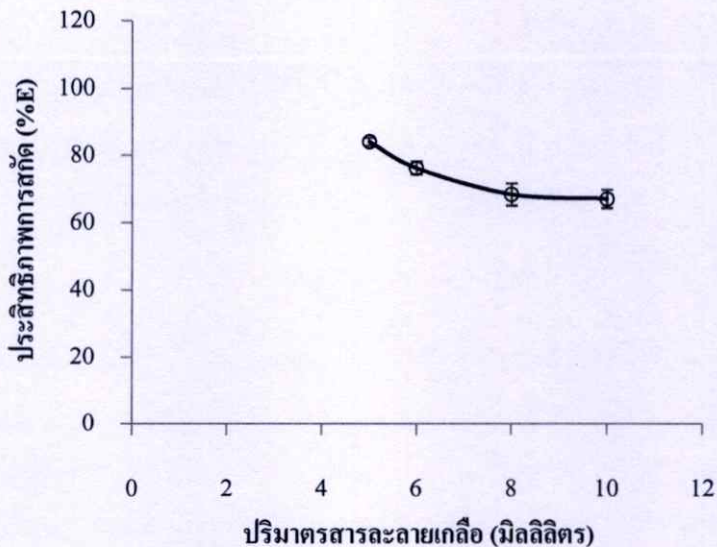
PEG 1500 4000 และ 8000 จะให้ประสิทธิภาพการสกัดที่แตกต่างกันเมื่อสกัดร่วมกับเกลือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  และ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$  (1:1.8) สารละลายเกลือที่เติมสารเติมแต่งโซเดียมคลอไรด์นั้น จะให้ประสิทธิภาพให้การสกัดที่ดีกว่า เนื่องจากการเติมเกลือนั้นมีผลต่อโครงสร้างน้ำในระบบ เมื่อเติมสารเติมแต่งโซเดียมคลอไรด์จะทำให้มีแรงไอออนิกสูงขึ้น มีแรงดึงดูดโมเลกุลของน้ำได้ไว้มาก ปริมาณน้ำที่เบนโซเอทสามารถละลายได้น้อยลงจึงถูกผลักไปอยู่ในชั้นของโพลีเอททิลีนไกลคอลมากขึ้น ดังนั้น การทดลองนี้จึงเลือกใช้  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$  (1:1.8) เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

#### 4.4.3 ผลการศึกษาผลของปริมาณเกลือเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการสกัด

การศึกษาปริมาณเกลือที่เหมาะสมต่อการสกัด ทำโดยใช้สารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) ที่ปริมาตรคงที่ 5 มิลลิลิตร ผสมกับปริมาตรสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในช่วง 4-10 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266, 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร และคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัด ผลของปริมาณเกลือต่อประสิทธิภาพการสกัด ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 แสดงผลของปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการสกัด ซึ่งมีองค์ประกอบของสารละลายโพลีเอททิลีนไกลคอล (n=3)

ปริมาณของสารละลาย (มิลลิลิตร)		ปริมาณของวัฏภาค (มิลลิลิตร)		ประสิทธิภาพการสกัด (%E)
สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$ (1:1.8)	วัฏภาคบน	วัฏภาคล่าง	
5.0	4.0	ไม่เกิดการแยกวัฏภาค		
5.0	5.0	12.7	2.3	83.96 ± 1.21
5.0	6.0	10.8	5.2	76.13 ± 1.90
5.0	8.0	9.2	8.8	68.23 ± 3.27
5.0	10.0	8.5	11.5	66.93 ± 2.72



**รูปที่ 4.5** แสดงผลของปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่อประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอทความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีองค์ประกอบของสารละลายโพลีเอททิลีนไกลคอล

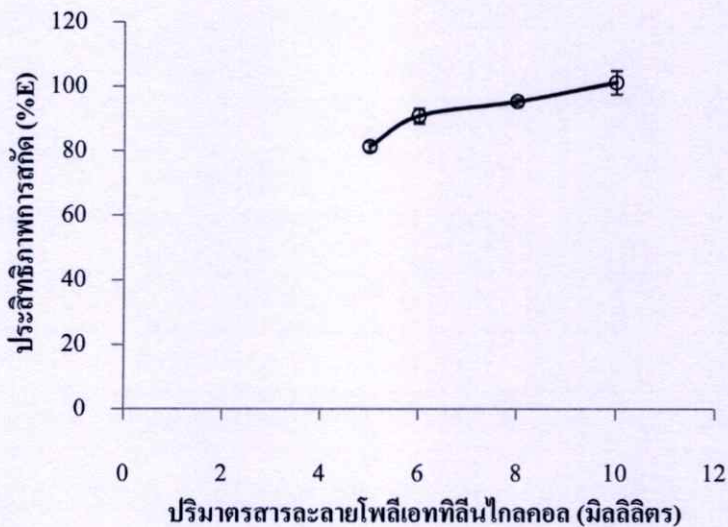
จากผลการทดลองในรูปที่ 4.5 พบว่า เมื่อปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์มีปริมาณมากขึ้น ปริมาตรวิกฤตบนจะมากขึ้นด้วย แต่ประสิทธิภาพในการสกัดเบนโซเอทจะลดลง เพราะเมื่อปริมาณของเกลือมาก ความเข้มข้นของไอออนจะมากขึ้นทำให้สารละลายมีความหนืดมากขึ้น การถ่ายโอนมวลระหว่างเบนโซเอทกับสารละลายโพลีเอททิลีนไกลคอลแย่ง ดังนั้น จึงเลือกปริมาณ 5 มิลลิลิตรของสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ เพราะให้ประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุด และที่ปริมาณต่ำกว่านี้ไม่สามารถเกิดการแยกวิกฤตได้

#### 4.4.4 ผลการศึกษาผลของปริมาณโพลีเอททิลีนไกลคอลเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการสกัด

การศึกษาปริมาณโพลีเอททิลีนไกลคอลที่เหมาะสมต่อการสกัด ทำโดยใช้สารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) ที่ปริมาตรคงที่ 5 มิลลิลิตร ผสมกับปริมาณสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) ในช่วง 4-10 มิลลิลิตรผสมสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวิกฤตอย่างสมบูรณ์ นำสารละลายวิกฤตบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266, 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร และคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัด ผลของปริมาณโพลีเอททิลีนไกลคอลต่อประสิทธิภาพการสกัด ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.5 แสดงผลของปริมาณโพลิเอททิลีนไกลคอลต่อประสิทธิภาพการสกัด ซึ่งมีองค์ประกอบของสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (n=3)

ปริมาณของสารละลาย (มิลลิลิตร)		ปริมาณของวัฏภาค (มิลลิลิตร)		ประสิทธิภาพการสกัด (%E)
สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaCl (1:1.8)	วัฏภาคบน	วัฏภาคล่าง	
4.0	5.0	ไม่เกิดการแยกวัฏภาค		
5.0	5.0	11.7	3.3	81.22 ± 1.37
6.0	5.0	13.4	2.6	90.77 ± 2.37
8.0	5.0	15.0	3.0	95.21 ± 1.13
10.0	5.0	17.6	2.4	101.10 ± 3.64



รูปที่ 4.6 แสดงผลของปริมาณโพลิเอททิลีนไกลคอลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอทความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์

จากรูปที่ 4.6 เป็นการศึกษาปริมาณโพลิเอททิลีนไกลคอลต่อประสิทธิภาพการสกัด พบว่าเมื่อปริมาณโพลิเอททิลีนไกลคอลเพิ่มขึ้นจะให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงขึ้น และใกล้เคียงกันเมื่อพิจารณาปริมาณโพลิเอททิลีนไกลคอลที่เหมาะสมต่อการสกัด คือ 8 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการสกัดเบนโซเอทเข้าไปอยู่ชั้นของโพลิเอททิลีนไกลคอลทั้งหมด เนื่องจากที่ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพต่างกันไม่มากนัก และที่ปริมาณโพลิเอททิลีนไกลคอล

มากกว่านี้จะทำให้ปริมาณเกลือในวัฏภาคล่างมีน้อยลง ซึ่งส่งผลต่อการเกิด salting-out ได้ เมื่อนำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่าง

#### 4.4.5 ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นของกรด-ด่างที่มีต่อการสกัดเบนโซเอท

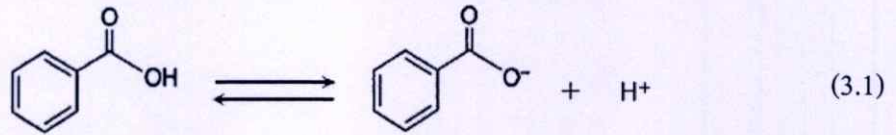
ความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งมีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอท โดยจะศึกษาประสิทธิภาพการสกัดสารละลายมาตรฐานเบนโซเอท ที่ความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเตรียมในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีความเข้มข้นของกรดและเบสอยู่ในช่วง 0.02 – 1.00 โมลาร์ ผสมกับสารละลาย PEG 4000 (40%w/v) 8 มิลลิลิตร และ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$  (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 266, 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัด เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดของกรด-ด่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 4.7

#### ตารางที่ 4.6 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง และประสิทธิภาพการสกัดของสารละลายโซเดียม

เบนโซเอทความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นต่างๆ (n=3)

ความเข้มข้น ของกรด-ด่าง (โมลาร์)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)		ประสิทธิภาพการสกัด (%E)	
	สารละลาย มาตรฐานใน HCl	สารละลายมาตรฐาน ใน NaOH	สารละลาย มาตรฐานใน HCl	สารละลายมาตรฐาน ใน NaOH
0.02	5	8	75.46 ± 1.09	80.78 ± 0.11
0.04	3	8	61.04 ± 3.39	80.14 ± 0.48
0.06	3	8	40.77 ± 1.16	70.39 ± 0.23
0.50	1	9	38.28 ± 1.39	55.60 ± 0.35
1.00	1	10	39.12 ± 2.25	58.44 ± 0.40

สมการ การแตกตัวของกรดเบนโซอิกเป็นดังนี้



กรดเบนโซอิกเป็นกรดอ่อนชนิดโมโนโปรติก มีค่าคงที่การแตกตัวของกรด ( $K_a$ )

$$K_a = \frac{[\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}]}$$

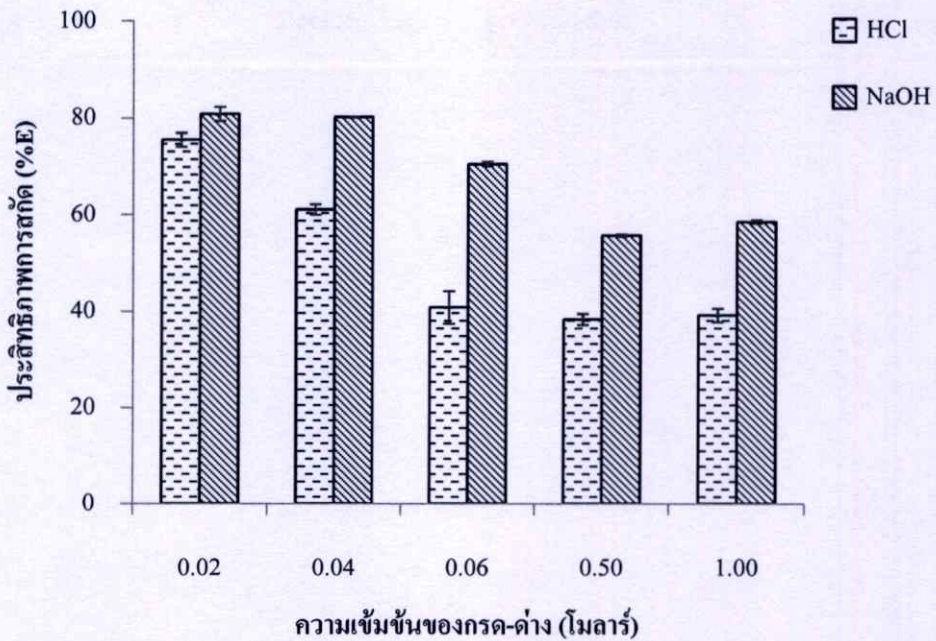
$$\frac{K_a}{[\text{H}^+]} = \frac{[\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-]}{[\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}]}$$

$$\frac{-\log K_a}{-\log[\text{H}^+]} = \frac{-\log[\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-]}{-\log[\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}]}$$

$$\frac{\text{p}K_a}{\text{pH}} = \log \frac{[\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}]}{[\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-]}$$

จากผลการทดลองรูปที่ 4.7 พบว่า ประสิทธิภาพในการสกัดเบนโซเอทในสถานะที่เป็นกรดจะมีค่าน้อยกว่าสถานะที่เป็นด่าง เพราะว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่ามากกว่า  $\text{p}K_a$  กรดเบนโซอิกจะแตกตัวอยู่ในรูปของเบนโซเอทไอออน ( $\text{p}K_a$  กรดเบนโซอิกเท่ากับ 4.202) ซึ่งจะมีสภาพขั้วใกล้เคียงกับโพลิเอทิลีนไกลคอล ทำให้เบนโซเอทถูกสกัดออกมาได้ดีตามความสามารถในการละลายของขั้วที่เหมือนกัน และในทางตรงกันข้ามสถานะกรด หรือมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) น้อยกว่า  $\text{p}K_a$  กรดเบนโซอิกจะไม่แตกตัวจึงอยู่ในรูปของกรดซึ่งมีสภาพขั้วต่างกัน ทำให้ค่าประสิทธิภาพการสกัดสารละลายโซเดียมเบนโซเอทที่เตรียมในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้ามาในชั้นของโพลิเอทิลีนไกลคอลได้ลดลง และจากตารางที่ 4.6 จะเห็นได้ว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายโซเดียมเบนโซเอทในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ มีค่ามากกว่า  $\text{p}K_a$  เพราะฉะนั้นที่ความเข้มข้นนี้โซเดียมเบนโซเอทจะอยู่ในรูปของเบนโซเอทไอออน จึงทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทมีค่าใกล้เคียงกัน

ในการทดลองจะเลือกสถานะต่างของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.02 M เนื่องจากเมื่อพิจารณาถึงการเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวจะใช้ด่างในการย่อย และที่ค่าความเป็นด่างมากเกินไป จะเหนี่ยวนำให้ประจุรวมของโมเลกุลตัวถูกละลายเปลี่ยนไปด้วย ซึ่งจะส่งผลต่อแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายและโมเลกุลของโพลิเอทิลีนไกลคอล หรือเกลือที่มีในวัฏภาคเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดแย่ง



**รูปที่ 4.7** แสดงค่าประสิทธิภาพการสกัดของสารละลายโซเดียมเบนโซเอทความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นต่างๆ

#### 4.4.6 ผลการศึกษาผลรบกวนของโพแทสเซียมซอร์เบท และโซเดียมซัลไฟต์

ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว นอกจากวัตถุดิบเสียประเภทโซเดียมเบนโซเอท ยังมีวัตถุดิบเสียประเภทอื่น เช่น โพแทสเซียมซอร์เบท โซเดียมซัลไฟต์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาผลการรบกวนของสารดังกล่าว

ทำการศึกษาการรบกวนของโพแทสเซียมซอร์เบท และโซเดียมซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการสกัดสารละลายมาตรฐานเบนโซเอทความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.7) นำค่าการดูดกลืนแสงสารละลายมาตรฐานเบนโซเอท (ไม่มีสารรบกวน) ที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ละลายในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบทความเข้มข้น 25-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.8) และสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.9) ที่เป็นสารรบกวนตามลำดับ

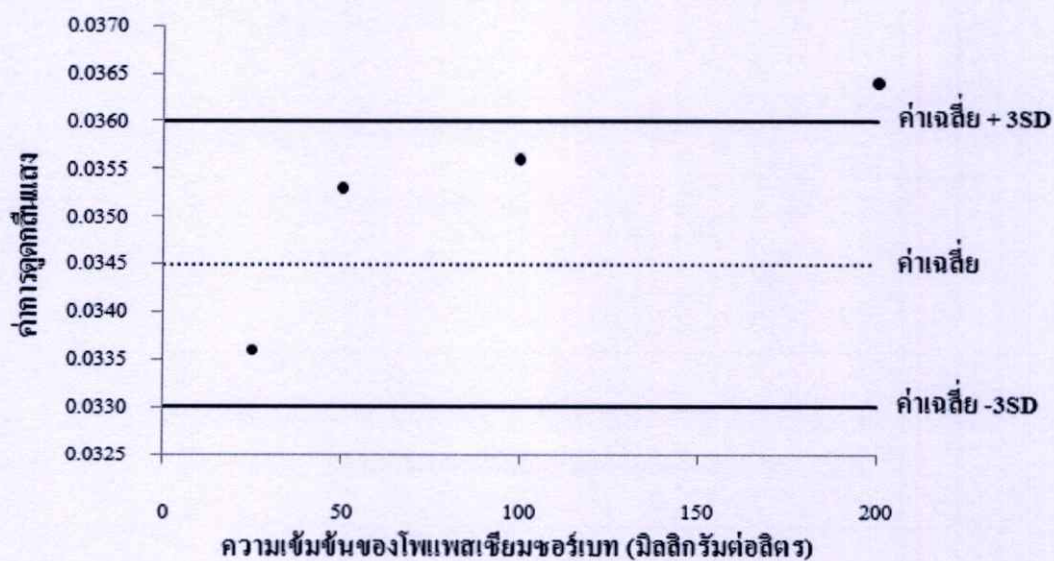
ตารางที่ 4.7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (n = 10)

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.0348
2	0.0343
3	0.0333
4	0.0345
5	0.0347
6	0.0350
7	0.0345
8	0.0341
9	0.0347
10	0.0349
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	0.0345
<b>SD</b>	0.0005
<b>3SD</b>	0.0015

ในการศึกษาปริมาณสารบวกรู้หลักเกณฑ์ที่ว่าปริมาณของสารบวกรู้ที่มีอยู่ต้องไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้เปลี่ยนไป เกินกว่าบวกลบสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $\pm 3SD$ ) ของค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอทที่ไม่มีสารบวกรู้ ซึ่งแสดงผลโดยใช้แผนภูมิควบคุม (Control chart)

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอท เมื่อมีการรบกวนจากสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบท

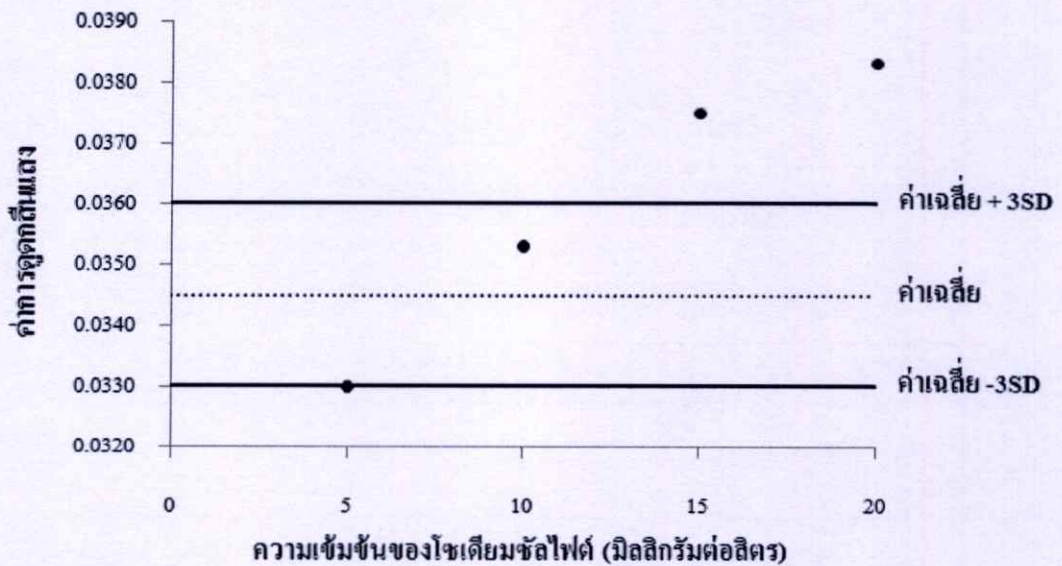
ความเข้มข้นของโพแทสเซียมซอร์เบท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าเฉลี่ย	SD
25	1	0.0337	0.0336	0.0002
	2	0.0334		
	3	0.0338		
50	1	0.0354	0.0353	0.0005
	2	0.0355		
	3	0.0349		
100	1	0.0352	0.0356	0.0003
	2	0.0355		
	3	0.0361		
200	1	0.0365	0.0364	0.0004
	2	0.0367		
	3	0.0359		



รูปที่ 4.8 แสดงแผนภูมิควบคุมของค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอท เมื่อมีการรบกวนจากสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบทในช่วงความเข้มข้น 25-200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอท เมื่อมีการรบกวนจากสารละลายโซเดียมซัลไฟด์

ความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าเฉลี่ย	SD
5	1	0.0329	0.0330	0.0005
	2	0.0327		
	3	0.0336		
10	1	0.0333	0.0353	0.0002
	2	0.0336		
	3	0.0337		
15	1	0.0372	0.0375	0.0003
	2	0.0376		
	3	0.0377		
20	1	0.0380	0.0383	0.0004
	2	0.0382		
	3	0.0387		



รูปที่ 4.9 แสดงแผนภูมิควบคุมของค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอท เมื่อมีการรบกวนจากสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ในช่วงความเข้มข้น 5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร

**ตารางที่ 4.10** แสดงระดับปริมาณสารบวกรที่สามารถปนอยู่ในสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้โดยไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไป (Tolerance limit)

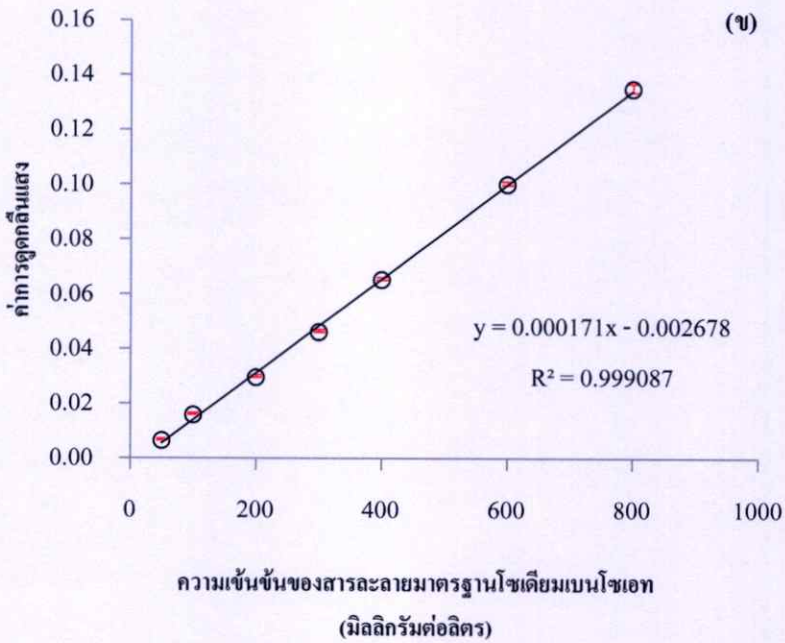
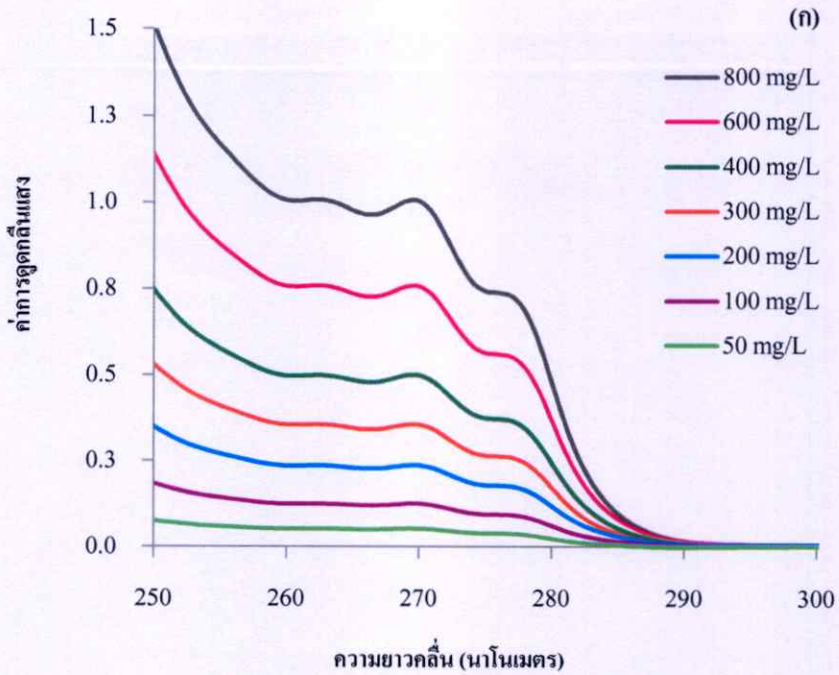
สารบวกร	Tolerance limit
โพแทสเซียมซอร์เบท	100 มิลลิกรัมต่อลิตร
โซเดียมซัลไฟด์	10 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากตารางที่ 4.10 พบว่า ระดับความเข้มข้นของสารบวกรที่สามารถปนอยู่ในสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้เปลี่ยนแปลงไป (Tolerance limit) คือ ความเข้มข้นของโพแทสเซียมซอร์เบท เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟด์ เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.5 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

##### 4.5.1 การทดสอบพิสัยและความเป็นเส้นตรง (Range and Linearity)

นำช่วงการดูดกลืนแสงสูงสุดของเบนโซเอทมาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ในช่วงความเข้มข้น 50 - 800 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายมาตรฐาน 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PEG 4000 (50%w/v) 8 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ แล้วนำวัฏภาคบนที่เบนโซเอทถูกสกัดเข้าสู่ชั้นของโพสิเอททิลีน ไกลคอลไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 266, 269.5 และ 275.5 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.8 (ก) และคำนวณหาปริมาณเบนโซเอทของสารละลายโซเดียมเบนโซเอทแต่ละความเข้มข้น จากสมการ  $Abs_{269.5} - [(Abs_{266} + Abs_{275.5})/2]$  ดังแสดงในตารางที่ 4.11



รูปที่ 4.10 แสดงสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทในชั้นโพลิเอททิลีนไกลคอล ในช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร (ก) และกราฟมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ในช่วงความเข้มข้น 50 – 800 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข)

ตารางที่ 4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
50	0.0069 ± 0.0003
100	0.0163 ± 0.0004
200	0.0301 ± 0.0004
300	0.0465 ± 0.0005
400	0.0657 ± 0.0005
600	0.1003 ± 0.0006
800	0.1351 ± 0.0016

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) ดังแสดงในรูปที่ 4.8(ข) จะเห็นได้ว่ากราฟมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ในช่วงความเข้มข้น 50 – 800 มิลลิกรัมต่อลิตร มีสมการเส้นถดถอย  $y = 0.000171x - 0.002678$  และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.9991 ซึ่งช่วงความเข้มข้นของตัวอย่างจะอยู่ระหว่างค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด ของกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรง

#### 4.5.2 ศึกษาขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantification, LOQ)

ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด และค่าขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ จะคำนวณตามสมการ  $y = y_B + 3S_B$  และ  $y = y_B + 10S_B$  ตามลำดับ (ภาคผนวก ค) โดยใช้กราฟมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น 50 - 800 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการคำนวณค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดของเบนโซเอท มีค่าเท่ากับ 27.11 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของเบนโซเอท มีค่าเท่ากับ 90.38 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.5.3 ความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยงของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น ศึกษาโดยการนำสารละลายมาตรฐานเบนโซเอท ความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการตรวจวัดซ้ำ 6 ครั้ง นำผลที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเพื่อหาค่า %RSD<sub>r</sub> โดยใช้ Horwitz's equation ใน

แต่ละความเข้มข้นเพื่อประเมินการยอมรับความเที่ยงโดยใช้  $HORRAT = \text{Experimental RSD} / \text{Predicted RSD}_r$  ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าความเที่ยงในการหาปริมาณสารละลายมาตรฐานเบนโซเอท

ครั้งที่	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร	ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร
1	211.57	401.63
2	210.11	387.30
3	205.72	369.75
4	211.16	3998.70
5	215.95	401.63
6	210.54	404.55
ค่าเฉลี่ย	210.84	393.93
% RSD	1.55	3.37
<b>Horwitz equation (RSD<sub>r</sub>)</b>	<b>4.76</b>	<b>4.28</b>
<b>HORRAT target</b>	<b>0.33</b>	<b>0.79</b>

เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.33 และ 0.79 อยู่ในเกณฑ์น้อยกว่า 2 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์ ดังนั้นวิธีการสกัดดังกล่าว จึงมีความเที่ยงที่ยอมรับได้ (ภาคผนวก ค)

#### 4.5.4 ความแม่นยำ (Accuracy)

ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) นำมาใช้ในการประเมินความแม่นยำของวิธี โดยค่า %recovery นั้นหาได้จากการเติมสารมาตรฐานของโซเดียมเบนโซเอทลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิธีคำนวณ ดังแสดงในภาคผนวก ค) จากนั้นสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ สารละลายมาตรฐาน 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PEG 4000 (40%w/v) 8 มิลลิลิตรและสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิลิตร และวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมเบนโซเอท ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นประเมินความถูกต้องในรูปของการหาร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ผลความแม่นยำของการทดสอบสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท แสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แสดงผลค่าความแม่นยำในการทดสอบสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เบนโซเอทที่เดิม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ เบนโซเอทที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการกลับคืน (% Recovery)
1	0	15.66	-
	200	223.04	103.69
	400	397.13	95.37
2	0	86.71	-
	200	280.11	96.70
	400	472.70	96.50
3	0	163.81	-
	200	344.71	90.45
	400	585.35	105.38
4	0	124.82	-
	200	335.26	105.22
	400	514.28	97.36
		<b>ค่าเฉลี่ย</b>	98.83

จากตารางที่ 4.13 พบว่าค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) สารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอทที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนของสารเท่ากับ 98.83 ซึ่งร้อยละการกลับคืนของสารอยู่ในเกณฑ์ตามมาตรฐาน โคเด็กซ์

#### 4.6 ผลการศึกษาเวลาในการแยกวิฤภาค

ทำการศึกษาผลของเวลาที่มีต่อการแยกวิฤภาค โดยเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการแยกวิฤภาคด้วยระบบสารละลายน้ำสองวิฤภาคที่พัฒนาขึ้น และระบบระบบสารละลายน้ำสองวิฤภาคแบบเดิม จากตารางที่ 4.14 เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการแยกวิฤภาคของสารมาตรฐาน พบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีแบบเดิมใช้เวลาในการแยกวิฤภาคไม่ต่างกัน เพราะในการสกัดสารมาตรฐานเบนโซเอทไม่มีแป้งอยู่ในองค์ประกอบของวิฤภาค แต่จากการศึกษาในตัวอย่างไม่ผลิตกันซ์แปรรูปจากข้าวต่างๆ (ตารางที่ 4.15) พบว่าระบบสารละลายน้ำสองวิฤภาคที่พัฒนาขึ้นใช้เวลาแยกวิฤภาคเร็วกว่าระบบสารละลายน้ำสองวิฤภาคแบบเดิม เนื่องจากการเติมสารเติมแต่งเกลือมีส่วนช่วยในการตกตะกอน

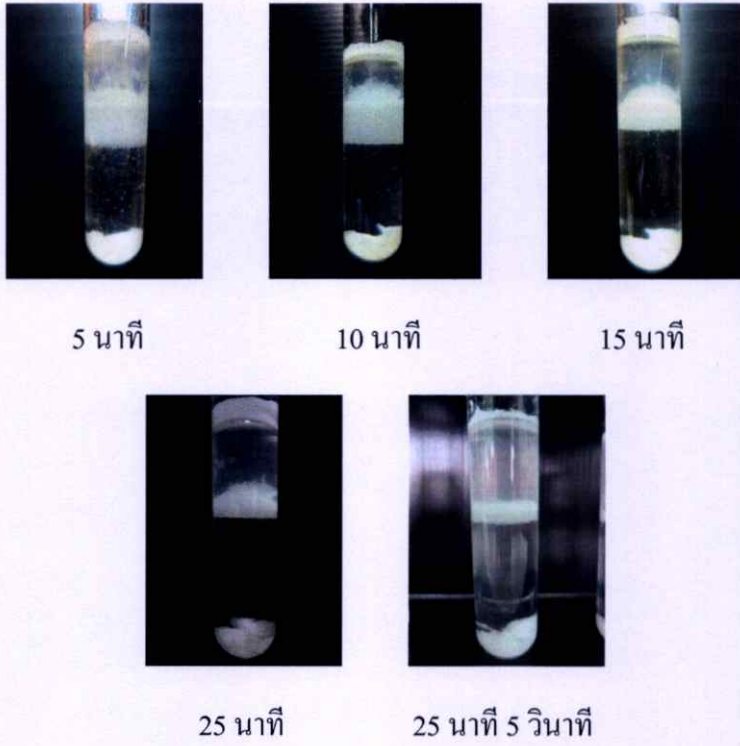
ของแข็ง (salting out) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว ดังนั้นจึงเป็นข้อดีอีกอย่างหนึ่งของการเติมสารเติมแต่งเกลือ นอกเหนือจากประโยชน์ของการลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง (ภาคผนวก ง)

**ตารางที่ 4.14** แสดงผลการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาคของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น และระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแบบเดิม [6]

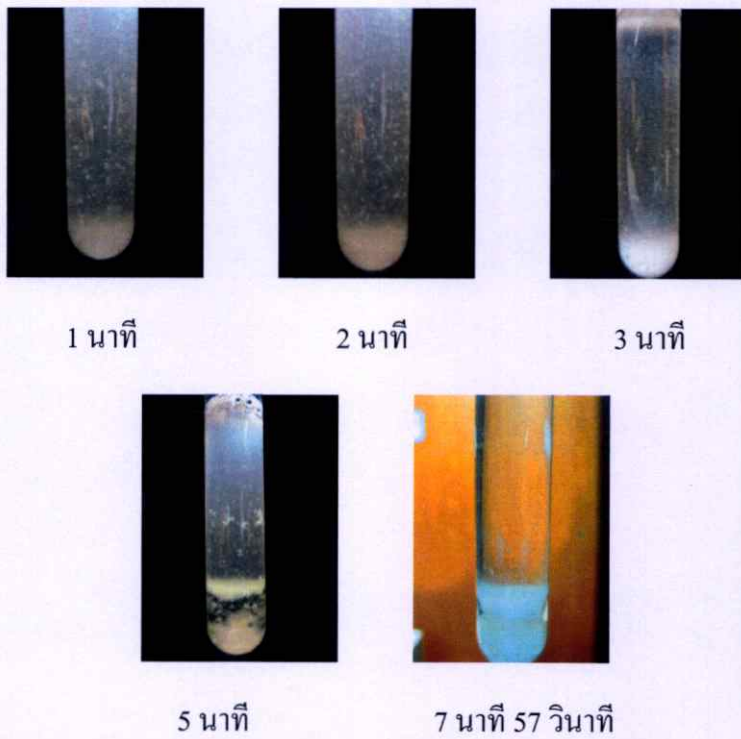
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาค (นาที . วินาที)	
	ATPS ที่พัฒนาขึ้น	ATPS แบบเดิม
100	4.29	3.15
200	5.13	2.41
400	6.58	3.12
600	4.48	3.24
800	5.17	4.34

**ตารางที่ 4.15** แสดงผลการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาคของตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น และระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแบบเดิม [6]

ชนิดของตัวอย่าง	เวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาค (นาที . วินาที)	
	ATPS ที่พัฒนาขึ้น	ATPS แบบเดิม
ขนมจีน	7.57	25.55
เส้นเล็ก	4.53	8.04
เส้นหมี่	5.30	25.58
เส้นใหญ่	4.18	10.05
แผ่นก๋วยจั๊บน้ำแข็ง	4.00	9.37



รูปที่ 4.11 แสดงการแยกวัฏภาคของตัวอย่างขมจีนที่เวลาต่างๆ ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแบบเดิม [6]



รูปที่ 4.12 แสดงการแยกวัฏภาคของตัวอย่างขมจีนที่เวลาต่างๆ ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น

#### 4.7 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว

นำวิธีการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น มาประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวต่างๆ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบเสียนิดเบนโซเอทที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เพื่อให้ผู้ประกอบการได้ปรับปรุงพัฒนาสินค้าให้ได้คุณภาพมาตรฐาน ซึ่งจะส่งผลให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์ การวิเคราะห์จะใช้สภาวะการสกัดที่เหมาะสม คือ สารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PEG 4000 (40%w/v) 8 มิลลิลิตร และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (40%w/v) 5 มิลลิลิตร จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.16) พบว่า ในตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณเบนโซเอทเกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นเกณฑ์มาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) เพื่อเป็นการยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธี ดังนั้นจึงทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยการเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน AOAC ข้อ 47.3.03 (ตารางที่ 4.18)

ตารางที่ 4.16 แสดงปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวต่างๆ

ชนิด	ตัวอย่างที่	ปริมาณเบนโซเอทที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
ขนมจีน	1	147.71
	2	820.51
	3	1136.50
เส้นเล็ก	1	914.46
	2	306.10
	3	1097.91
เส้นหมี	1	820.66
	2	1002.90
	3	1151.63
เส้นใหญ่	1	974.99
	2	595.00
	3	1081.23
แผ่นก๋วยจั๊บน้ำ	1	2238.81
	2	703.57
	3	992.15

#### 4.8 ผลการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้น

ตารางที่ 4.17 แสดงผลการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น และวิธีมาตรฐาน

ชนิดของตัวอย่าง	ปริมาณเบนโซเอท (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
	วิธีที่พัฒนาขึ้น ATPS	วิธีมาตรฐาน AOAC
ขนมจีน	820.51 ± 0.56	851.56 ± 0.13
เส้นเล็ก	306.10 ± 0.09	327.05 ± 0.24
เส้นหมี่	820.66 ± 0.44	806.30 ± 0.23
เส้นใหญ่	1081.23 ± 0.02	1096.29 ± 0.49
แผ่นกวยจั๊บน้ำแข็ง	703.57 ± 0.01	715.48 ± 0.12

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง คือขนมจีน เส้นเล็ก เส้นหมี่ เส้นใหญ่ และแผ่นกวยจั๊บน้ำแข็ง ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐานของ AOAC ข้อ 47.3.03 และวิธีการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น ดังตารางที่ 4.17 จะเห็นได้ว่าค่าปริมาณที่ตรวจพบทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ คือ *paired t-test* พบว่า ผลลัพธ์ของการวิเคราะห์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $t_{\text{observed}} = -1.71, t_{\text{critical}} = 2.78$ )

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว โดยใช้การสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของโพลีเอทิลีนไกลคอล-กลีเซอรินทรียน้ำ ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ การสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค จะทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมพบว่าระบบที่เหมาะสมต่อการสกัดเบนโซเอท คือ โพลีเอทิลีนไกลคอล (มวลโมเลกุล 4000) และสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ผสมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในอัตราส่วน 1:1.8 โดยน้ำหนัก โดยคิดเป็นความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 26 และ 14 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ ให้ประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอทสูงสุด ซึ่งการเติมสารเติมแต่งเกลือมีส่วนช่วยให้เกิดการแยกเป็นสองวัฏภาคได้เร็วขึ้น เมื่อนำวัฏภาคบนของโพลีเอทิลีนไกลคอลที่มีเบนโซเอทมาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยอาศัย baseline technique ตามสมการ  $Abs_{266} - [(Abs_{269.5} + Abs_{275.5})/2]$  เพื่อหาปริมาณเบนโซเอทจากการสร้างกราฟมาตรฐาน ในช่วงความเป็นตรงเท่ากับ 50-800 มิลลิกรัมต่อลิตร และภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทำให้ได้คุณลักษณะเด่นของวิธีการหาปริมาณเบนโซเอทครั้งนี้ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 27.11 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของเบนโซเอท มีค่าเท่ากับ 90.38 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับความเที่ยงของวิธีประเมินจากค่า RSD ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.33-0.79% และความแม่นยำของวิธีประเมินได้จากค่าร้อยละการวิเคราะห์คืนกลับ (%recovery) มีค่าเท่ากับ 90.45 – 105.38% จากการศึกษาสารรบกวน พบว่า ไม่มีการรบกวนค่าการดูดกลืนแสงของโซเดียมเบนโซเอทในวัตถุดิบเสี่ย ชนิดโพแทสเซียมซอร์เบท (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ โซเดียมซัลไฟต์ (10 มิลลิกรัมต่อลิตร)

เมื่อนำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้นมาหาปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว 5 ชนิดประกอบด้วย เส้นขนมจีน เส้นเล็ก เส้นใหญ่ เส้นหมี่ และแผ่นก๋วยจั๊บ ชนิดละ 3 ตัวอย่าง เมื่อเทียบกับปริมาณเบนโซเอทที่กำหนดในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) พบตัวอย่างเกินเกณฑ์มาตรฐานจำนวน 6 ตัวอย่าง ในตัวอย่างขนมจีน 1 ตัวอย่าง เส้นเล็ก 1 ตัวอย่าง เส้นใหญ่ 1 ตัวอย่าง เส้นหมี่ 2 ตัวอย่าง และแผ่นก๋วยจั๊บ 1 ตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (AOAC ข้อ 47.3.03) ปริมาณเบนโซเอทมีค่าใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน และเมื่อทดสอบด้วยค่าทางสถิติ paired t-test พบว่า การวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น

ร้อยละ 95 ( $t_{\text{observed}} = -1.71$ ,  $t_{\text{critical}} = 2.78$ ) ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทได้ซึ่งมีข้อดี คือ วิธีเตรียมตัวอย่างง่าย ประหยัดเวลา ใช้สารเคมีที่ไม่เป็นพิษและใช้ปริมาณสารเคมีในการวิเคราะห์ต่อครั้งในปริมาณที่น้อย ค่าใช้จ่ายถูกซึ่งอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในวิธีการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาสารเติมแต่งเกลือชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้ ทำให้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคใช้งานได้กว้างขึ้น
2. ควรศึกษาเรื่องอุณหภูมิ เนื่องจากเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อพฤติกรรมการแยกของตัวถูกละลาย และประสิทธิภาพการสกัดของสาร
3. ควรศึกษาขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อลดขั้นตอนการเตรียมให้สะดวก ง่าย และรวดเร็วขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

- [1] วิภา สุโรจนะเมธากุล. “คุณสมบัติของข้าวและการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการผลิต ก๋วยเตี๋ยวและเส้นหมี่”, การพัฒนาเพื่อเพื่อยกระดับอุตสาหกรรมก๋วยเตี๋ยวและขนมจีน โดยใช้เทคโนโลยีสะอาด, สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2541. น.18-39
- [2] FAO/WHO. **Codex General Standard for Food Additives (GSFA) Online Database.**, Available: [http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/CXS\\_192e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/CXS_192e.pdf), 2008
- [3] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)., “Sodium Benzoate.” in Combined Compendium of Food Additive Specifications., Available: <http://fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-393.pdf>, 2001
- [4] AOAC International. **Official Methods of Analysis Vol II.** 16<sup>th</sup> Ed. Cunniff P.(ed). 1995.
- [5] Andersson Elis., Mattiasson Bo., Hahn-Hägerdal Bärbel., “Enzymatic conversion in aqueous two-phase systems: deacylation of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid with penicillin acylase”. **Enzyme and Microbial Technology**, Vol 6, July 1984. pp. 301-306
- [6] สิริพร มิตร โกสุม. “การสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคเพื่อหาปริมาณเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี” วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต สาขาเคมีวิเคราะห์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2553.
- [7] นันทิญา วงษ์มงคล. “ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดแอสคาโลไนโพรทีเอส” วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย. 2543.
- [8] วิไลวรรณ ช่วยยก. “การสกัดแอสคาโลไนโพรทีเอสจากน้ำหมักโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัด” วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2544.
- [9] Zaslavsky B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications.** New York: Marcel Dekker. 1995.
- [10] 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.

- [11] Hatti-Kaul R. **Aqueous Two Phase Systems: Methods and Protocols**. New Jersey: Humanae Press. 2000.
- [12] Cabezas H. J. **Chromatogr.B**, vol. 680, 1996. pp. 3
- [13] Bulgariu L. and Bulgari D. “The extraction of Zn (II) in aqueous PEG (1550) – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> two-phase system using Cl<sup>-</sup> ions as extracting agent” **J. Serb. Chem. Soc.** vol. 72, 2007. pp. 289–297.
- [14] Albertsson P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**. New York: Wiley. 1986.
- [15] Walter H. and Johansson G. **Aqueous two-phase systems**. San Diego : Academic Press. 1994.
- [16] 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.
- [17] Azevedo A. M., Rosa P. A.J., Ferreira I. F. and Aires-Barros M. R. **Trends in Biotechnology**. vol. 27.
- [18] งามชื่น คงเสรี. **ผลิตภัณฑ์จากข้าว**. สถาบันวิจัยข้าว, กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- [19] Sagee S. and Boonritra R. “Production of noodle and fermented rice noodle from Rice” Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, 2006.
- [20] อัญญา เชนวิทีสุข. **วัตถุดิบเสียใช้อย่างไรจึงจะปลอดภัยต่อผู้บริโภค**. เชียงใหม่ : สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- [21] สิวาพร สิวเวช. **วัตถุดิบอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2546.
- [22] Davidson P. M., Sofos J.N. and Branen A.L. **Antimicrobials in food**. Taylor & Francis. 2005.
- [23] Wibbertmann A., Kielhorn J., Koennecker G., Mangelsdorf I., and Melber C. **Benzoic acid and sodium benzoate**. World Health Organization Geneva. 2000.
- [24] คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2539.
- [25] กระทรวงสาธารณสุข. **“วัตถุดิบอาหาร”** ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, ฉบับที่ 281, 2547.

- [26] รศ.แม่น อมรสิทธิ์ และคณะ. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ: ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2553.**
- [27] C. Serres-Piole, N. Moradi-Tehrani, R. Lobinski, H. Preud'homme. "Direct sensitive simultaneous determination of fluorinated benzoic acids in oil reservoir waters by ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry" **Journal of Chromatography A**, vol. 1218, 2011. pp. 5872– 5877.
- [28] Ana Carolina O. Costa , Lisliane da Silva Perfeito, Marina F.M. Tavares, Gustavo A. Micke. "Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis - Optimization of the method with inspection of ionic mobilities" **Journal of Chromatography A**, vol. 1204, 2008. pp. 123–127.
- [29] Fang Han, You-Zhao He, Lian Li, Guo-Ni Fu, Hai-Yang Xie, Wu-Er Gan. "Determination of benzoic acid and sorbic acid in food products using electrokinetic flow analysis–ion pair solid phase extraction–capillary zone electrophoresis" **Analytica chimica acta**, vol. 618, 2008. pp. 79–85.
- [30] Zaifa Pan, Lili Wang, Weimin Mo, Chen Wang, Wei Hu, Juanjuan Zhang. "Determination of benzoic acid in soft drinks by gas chromatographywith on-line pyrolytic methylation technique" **Analytica Chimica Acta**, vol. 545, 2005. pp. 218–223.
- [31] Chunzhou Dong, Wenfang Wang. "Headspace solid-phase microextraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in beverages" **Analytica Chimica Acta**, vol. 562, 2006. pp. 23–29.
- [32] Chunzhou Dong, Yong Mei, Lin Chen. "Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in food dressing by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography" **Journal of Chromatography A**, vol. 1117, 2006. pp. 109–114.
- [33] Bahruddin Saad, Md. Fazlul Bari, Muhammad Idris Saleh, Kamarudzaman Ahmad, Mohd. Khairuddin Mohd. Talib. "Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography" **Journal of Chromatography A**, vol. 1073, 2005. pp. 393–397.

- [34] Yukiko Abe-Onishi, Chikako Yomota, Naoki Sugimoto, Hiroki Kubota, Kenichi Tanamoto. "Determination of benzoyl peroxide and benzoic acid in wheat flour by high-performance liquid chromatography and its identification by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry" **Journal of Chromatography A**, vol. 1040, 2004. pp. 209–214.
- [35] V. Galli, C. Barbas. "High-performance liquid chromatographic analysis of dextromethorphan, guaifenesin and benzoate in a cough syrup for stability testing" **Journal of Chromatography A**, vol. 1048, 2004. pp. 207–211.
- [36] L. Pezza, A.O. Santini, H.R. Pezza, C.B. Melios, V.J.F. Ferreira, A.L.M. Nasser. "Benzoate ion determination in beverages by using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix" **Analytica Chimica Acta**, vol. 433, 2001. pp. 281–288.
- [37] Harry M. Pylypiw Jr., Maureen T. Grether. "Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods" **Journal of Chromatography A**, vol. 883, 2000. pp. 299–304.
- [38] Xiangyang Wu, Linghong Liang, Ye Zou, Ting Zhao, Jiangli Zhao, Fang Li, Liuqing Yang. "Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry" **Food Chemistry**, vol.129, 2011. pp. 443–453.
- [39] Xueqiao Xie, Yun Wang, Juan Han, Yongsheng Yan. "Extraction mechanism of sulfamethoxazole in water samples using aqueous two-phase systems of poly(propylene glycol) and salt" **Analytica Chimica Acta**, vol. 687, 2011. pp. 61–66.
- [40] R.D. Rogers, A.H. Bond, C.B. Bauer **J. Chromatogr. B**, vol.680, 1996. pp. 221–229.
- [41] Juan Han, Yun Wang, Cuilan Yu, Chunxiang Li, Yongsheng Yan, Yan Liu, Liang Wang. "Separation, concentration and determination of chloramphenicol in environment and food using an ionic liquid/salt aqueous two-phase flotation system coupled with high-performance liquid chromatography" **Analytica Chimica Acta**, vol.685, 2011. pp. 138–145.
- [42] Jun Yuan, Waseem Raza, Qiwei Huang, Qirong Shen. "Quantification of the antifungal lipopeptide iturin A by high performance liquid chromatography coupled with aqueous two-phase extraction" **Journal of Chromatography B**, vol. 879, 2011. pp. 2746– 2750.

- [43] Guilherme Dias Rodrigues, Leandro Rodrigues de Lemos, Luis Henrique Mendes da Silva, Maria do Carmo Hespanhol da Silva, Luis Antonio Minimb, Jane Selia dos Reis Coimbra. "A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two-phase system" **Talanta**, vol. 80, 2010. pp. 1139–1144.
- [44] Chun-Xiang Li, Juan Han, Yun Wang, Yong-Sheng Yan, Xiao-Hui Xu, Jian-Ming Pan. "Extraction and mechanism investigation of trace roxithromycin in real watersamples by use of ionic liquid–salt aqueous two-phase system" **Analytica Chimica Acta** , vol. 653, 2009. pp. 178–183.
- [45] Qing Cao, Shehong Li, Chiyang He, Kean Li, Feng Liu. "Extraction and determination of papaverin in pericarpium papaveris using aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol)–(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> coupled with high-performance liquid chromatography" **Analytica Chimica Acta**, vol. 590, 2007. pp. 187–194.
- [46] Shehong Li, Chiyang He, Fei Gao, Daobing Li, Zheng Chen, Huwei Liu, Kean Li, Feng Liu. "Extraction and determination of morphine in compound liquorice using an aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol)/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> coupled with HPLC" **Talanta**, vol. 71, 2007. pp. 784–789.
- [47] Li S., He C., Gao F., Li D., Chen Z., Liu H., Li K. and Liu F. "Extraction and determination of morphine in compound liquorice using an aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol)/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> coupled with HPLC" **Talanta**, vol. 71, 2007. pp.784–789

**ภาคผนวก**

## ภาคผนวก ก.

### การศึกษาการละลายของเกลือ

ตารางที่ ก.1 ผลการศึกษาการละลายของเกลือ

ชนิดของเกลือ	อัตราส่วน	ความเข้มข้น (%w/w)	ลักษณะการละลาย
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	-	30	ละลายหมด
		40	ละลายหมด
		50	ละลายหมด
NaCl	-	25	ละลายหมด
		30	ละลายหมด
		40	ละลายได้เกือบหมด
KCl	-	15	ละลายหมด
		18	ละลายหมด
		30	ละลายได้เกือบหมด
NaHCO <sub>3</sub>	-	10	ละลายได้เล็กน้อย
		20	ละลายได้เล็กน้อย
		30	ละลายได้เล็กน้อย
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	40	ละลายหมด
		50	ละลายหมด
		60	ละลายได้เกือบหมด
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> + NaCl	1:1	30	ละลายหมด
		40	ละลายหมด
	1:1.5	30	ละลายหมด
		40	ละลายหมด
	1:1.8	30	ละลายหมด
		40	ละลายหมด
	1:2	30	ละลายหมด
		40	ละลายหมด
	1:4	30	ละลายได้เล็กน้อย
		40	ละลายได้เล็กน้อย

ตารางที่ ก.1 (ต่อ)

ชนิดของเกลือ	อัตราส่วน	ความเข้มข้น (%w/w)	ลักษณะการละลาย	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$	1:5	30	ละลายได้เล็กน้อย	
		40	ละลายได้เล็กน้อย	
	1.8:1	30	ละลายหมด	
		40	ละลายหมด	
	2:1	30	ละลายหมด	
		40	ละลายได้เกือบหมด	
	4:1	30	ละลายได้เล็กน้อย	
		40	ละลายได้เล็กน้อย	
	5:1	30	ละลายได้เล็กน้อย	
		40	ละลายได้เล็กน้อย	
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{KCl}$	1:1	12	ละลายหมด
			18	ละลายได้เล็กน้อย
1:1.5		12	ละลายหมด	
		18	ละลายได้เล็กน้อย	
1:2		12	ละลายหมด	
		18	ละลายได้เล็กน้อย	
1:4		12	ละลายหมด	
		18	ละลายได้เล็กน้อย	
1.5:1		12	ละลายหมด	
		18	ละลายได้เล็กน้อย	
2:1		12	ละลายหมด	
		18	ละลายได้เล็กน้อย	
4:1		12	ละลายหมด	
		18	ละลายได้เล็กน้อย	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$		1:1	30	ละลายหมด
			40	ละลายหมด
			50	ละลายได้เกือบหมด

ตารางที่ ก.1 (ต่อ)

ชนิดของเกลือ	อัตราส่วน	ความเข้มข้น (%w/w)	ลักษณะการละลาย
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1:1.8	30	ละลายหมด
		40	ละลายหมด
		50	ละลายได้เกือบหมด
	1:4	30	ละลายหมด
		40	ละลายหมด
		50	ละลายได้เกือบหมด
	1.8:1	30	ละลายหมด
		40	ละลายหมด
		50	ละลายได้เกือบหมด
	4:1	30	ละลายหมด
		40	ละลายหมด
		50	ละลายได้เกือบหมด

## ภาคผนวก ข.

### การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีน ไกลคอล (PEG) เกลือ และน้ำ

#### วิธีการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายโพลีเอททิลีนไกลคอล

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลาย PEG} = \frac{\text{น้ำหนักของ PEG} \times \text{ความเข้มข้นของ PEG}}{\text{น้ำหนักรวม} + \text{น้ำหนักของน้ำ}}$$

#### วิธีการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายเกลือ

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ} = \frac{\text{น้ำหนักของเกลือ} \times \text{ความเข้มข้นของเกลือ}}{\text{น้ำหนักรวม} + \text{น้ำหนักของน้ำ}}$$

#### ข.1 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) เกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (40%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.1 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) เกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (40%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนักรวม (กรัม)	น้ำหนักของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย % (w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4$			สารละลาย PEG	สารละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
0.5488	4.5856	5.1344	2.6800	2.81	23.47
1.5279	3.5041	5.0320	2.3499	8.28	18.99
2.5442	2.5070	5.0512	1.7524	14.96	14.74
3.5222	1.7027	5.2249	1.2980	21.60	10.44
4.5499	0.5361	5.0860	0.0000	35.78	4.22

ข.2 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (30%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.2 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (30%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนักรวม (กรัม)	น้ำหนักของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย % (w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0.5302	4.5106	5.0408	2.9260	2.66	16.99
1.5353	3.5704	5.1057	2.6449	7.92	13.82
2.5181	2.5013	5.0194	1.8842	14.59	10.87
3.5065	1.6023	5.1088	1.2410	22.09	7.57
4.5392	0.5199	5.0591	0.0014	35.88	3.08

ข.3 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.3 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนักรวม (กรัม)	น้ำหนักของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย % (w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$			สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$
0.5018	4.5903	5.0921	0.0016	3.94	8.99
1.5216	3.5233	5.0449	0.3848	11.21	6.54
2.5266	2.5677	5.0943	0.5039	18.05	4.54
3.5169	1.5706	5.0875	0.5295	25.04	2.78
4.5129	0.6005	5.1134	0.0008	35.31	1.09

ข.4 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.2 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1500 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียม ซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนัก รวม (กรัม)	น้ำหนัก ของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย %(w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.5013	4.6007	5.1020	4.4493	2.10	6.74
1.5193	3.5259	5.0452	4.1652	6.60	5.36
2.5262	2.5291	5.0553	2.9111	12.68	4.44
3.6327	1.4137	5.0464	1.6214	21.79	2.97
4.5336	0.5391	5.0727	0.1031	35.04	1.46

ข.5 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 4000 (40%w/w) เกลือโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (40%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.5 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (40%w/w) เกลือโซเดียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (40%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนักรวม (กรัม)	น้ำหนัก ของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย %(w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			สารละลาย PEG	สารละลาย NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.5456	4.5116	5.0572	4.5481	2.27	18.79
1.5694	3.5371	5.1065	3.9397	6.94	15.64
2.5574	2.5141	5.0715	3.0187	12.64	12.43
3.5063	1.5631	5.0694	1.7995	20.42	9.10
4.5073	0.5063	5.136	0.0000	35.96	4.04

ข.6 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (30%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.6 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (30%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนักรวม (กรัม)	น้ำหนักของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย % (w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0.5419	4.5011	5.0430	5.1335	2.67	13.27
1.5408	3.5642	5.1050	4.6513	7.89	10.96
2.5556	2.5112	5.0668	3.7805	14.44	8.52
3.5099	1.5075	5.0174	2.5895	23.07	5.95
4.5074	0.5595	5.0669	0.5499	40.12	2.99

ข.7 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.7 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนักรวม (กรัม)	น้ำหนักของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย % (w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : NaCl			สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : NaCl
0.5132	4.5369	5.0501	1.8958	3.70	6.53
1.5669	3.5066	5.0736	2.0633	10.98	4.91
2.5022	2.5285	5.0307	2.1817	17.35	3.51
3.5096	1.5370	5.0446	1.8810	25.33	2.22
4.5317	0.5215	5.0532	0.6790	39.53	0.91

ข.8 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (1.8:1) (30%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.8 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (50%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (1.8:1) (30%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนัก รวม (กรัม)	น้ำหนัก ของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย %(w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaCl			สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaCl
0.5058	4.5480	5.0538	4.1889	2.74	9.84
1.5010	3.5296	5.0306	4.2279	8.11	7.62
2.5240	2.5187	5.427	3.8425	14.20	5.67
3.5405	1.5478	5.0883	3.0623	21.72	3.79
4.5368	0.5334	5.0702	1.0647	36.97	1.74

ข.9 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 4000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.9 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 4000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนัก รวม (กรัม)	น้ำหนัก ของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย %(w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.5575	4.4916	5.0491	6.8375	1.87	5.29
1.5275	3.5373	5.0648	5.9123	5.57	4.51
2.5405	2.5041	5.0446	4.5059	10.64	3.67
3.5028	1.5658	5.0686	2.8947	17.60	2.75
4.5444	0.5282	5.0726	0.5490	32.34	1.32

ข.10 การศึกษาแผนภาพวิภูภาคของระบบสารละลายน้ำสองวิภูภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (30%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.10 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวิภูภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (30%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนักรวม (กรัม)	น้ำหนักของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย % (w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0.5452	4.6201	5.1653	7.7913	1.69	10.69
1.5437	3.5320	5.0757	6.7529	5.22	8.96
2.5073	2.5407	5.0480	5.4548	9.55	7.26
3.5061	1.5506	5.0567	3.5152	16.36	5.42
4.5613	0.5587	5.1200	0.7584	31.04	2.85

ข.11 การศึกษาแผนภาพวิภูภาคของระบบสารละลายน้ำสองวิภูภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1) (30%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.11 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวิภูภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ (1:1) (30%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนักรวม (กรัม)	น้ำหนักของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย % (w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$			สารละลาย PEG	สารละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 : \text{NaCl}$
0.5327	4.5955	5.1282	4.5545	2.20	7.12
1.5471	3.5092	5.0563	4.1410	6.73	5.72
2.5190	2.5271	5.0461	3.4442	11.87	4.46
3.5125	1.5311	5.0436	2.3095	19.11	3.12
4.5083	0.5278	5.0361	0.3657	33.39	1.47

ข.12 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.12 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (1:1.8) (30%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนัก รวม (กรัม)	น้ำหนัก ของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย %(w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaCl			สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaCl
0.5403	4.5000	5.0403	6.0989	1.94	4.04
1.5755	3.5157	5.0912	5.3620	6.03	3.36
2.5254	2.5441	5.0695	4.3763	10.69	2.69
3.5376	1.5393	5.0769	2.9030	17.73	1.92
4.5045	0.5737	5.0782	0.6003	31.32	1.01

ข.13 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (1.8:1) (30%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.13 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (1.8:1) (30%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนัก รวม (กรัม)	น้ำหนัก ของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย %(w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaCl			สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaCl
0.5213	4.5147	5.0360	2.6783	2.70	11.70
1.5574	3.5427	5.1001	2.6252	8.06	9.17
2.5442	2.5308	5.0750	2.2244	13.94	6.93
3.5475	1.5341	5.0816	1.5032	21.55	4.66
4.5240	0.5631	5.0871	0.1016	26.16	2.17

ข.14 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.14 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1:1.8) (40%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนัก รวม (กรัม)	น้ำหนัก ของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย %(w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.5223	4.5175	5.0398	9.6285	1.42	4.31
1.5220	3.5560	5.0780	8.6272	4.44	3.63
2.5522	2.5150	5.0672	7.2398	8.29	2.86
3.5073	1.5349	5.0422	4.1221	15.31	2.34
4.5477	0.5698	5.1175	0.9997	29.74	1.30

ข.15 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอล (PEG) น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1.8:1) (40%w/w) และน้ำ

ตารางที่ ข.15 แสดงน้ำหนักและความเข้มข้นของสารละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มี องค์ประกอบของ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 (40%w/w) และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารเติมแต่งเกลือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1.8:1) (40%w/w)

น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนัก รวม (กรัม)	น้ำหนัก ของน้ำ (กรัม)	ความเข้มข้นของสารละลาย %(w/w)	
สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			สารละลาย PEG	สารละลาย (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.5681	4.5450	5.1131	8.2702	1.70	8.83
1.5445	3.5220	5.0965	7.0264	5.10	7.62
2.5362	2.5216	5.0578	5.3655	9.73	6.29
3.5491	1.5006	5.0497	3.5909	16.43	4.52
4.5542	0.5120	5.0662	0.7345	31.40	2.29

## ภาคผนวก ก.

### การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

#### ก.1 ผลการคำนวณค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) ของโซเดียมเบนโซเอท

สามารถหาได้จากข้อมูลการทำ system linearity

LOD หาได้สูตร

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

เมื่อ  $y_b$  = จุดตัดแกน y(a) ที่คำนวณได้จากสมการเส้นถดถอย

$$y = 0.000171x - 0.002678$$

$S_B$  = ค่า standard error of estimate,  $s_{y/x}$

$$S_{y/x} = \left( \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right)^{1/2}$$

	$x_i$	$x_i^2$	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i$	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	50	2500	-300	90000	0.00685	0.005872	0.000978	0.000001
	100	10000	-250	62500	0.01625	0.014422	0.001828	0.000003
	200	40000	-150	22500	0.03005	0.031522	-0.001472	0.000002
	300	90000	-50	2500	0.04650	0.048622	-0.002122	0.000005
	400	160000	50	2500	0.06565	0.065722	-0.000072	0.000000
	600	360000	250	62500	0.10025	0.099922	0.000328	0.000000
	800	640000	450	202500	0.13505	0.134122	0.000928	0.000001
<b>ผลรวม</b>	2450	6002500		445000				0.000012
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	350							

$$\text{โดยที่ } y_B = a; -0.002678$$

$$S_B = S_{y/x}; = 0.001545$$

แทนค่าลงในสมการที่ 1 จะได้

$$\begin{aligned} y &= (-0.002678) + (3 \times 0.001545) \\ &= 0.001958 \end{aligned}$$

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

$$\begin{aligned} y &= 0.000171x - 0.002678 \\ x &= (0.001958 + 0.002678) / 0.000171 \\ &= 27.11 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

## ค.2 ผลการคำนวณค่าขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) ของโซเดียมเบนโซเอท

สามารถหาได้จากข้อมูลการทำ system linearity

LOQ หาได้สูตร

$$y = y_B + 10S_B \quad \dots\dots\dots(2)$$

เมื่อ  $y_b$  = จุดตัดแกน y(a) ที่คำนวณได้จากสมการเส้นถดถอย

$$y = 0.000171x - 0.002678$$

$S_B$  = ค่า standard error of estimate,  $s_{y/x}$

$$S_{y/x} = \left( \frac{\sum i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right)^{1/2}$$

$$\text{โดยที่ } y_B = a; -0.002678$$

$$S_B = S_{y/x}; = 0.001545$$

แทนค่าลงในสมการที่ 2 จะได้

$$\begin{aligned} y &= (-0.002678) + (10 \times 0.001545) \\ &= 0.01278 \end{aligned}$$

จากนั้นนำค่า  $y$  ที่ได้ไปแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

$$\begin{aligned} y &= 0.000171x - 0.002678 \\ x &= (0.01278 + 0.002678) / 0.000171 \\ &= 90.38 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

### ค.3 การคำนวณค่าความเที่ยง (precision)

เกณฑ์การยอมรับความเที่ยงประเมินโดยการเปรียบเทียบกับค่าที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation และ HORRAT (Horwitz ratio) ซึ่งเกิดจากความสัมพันธ์ระหว่าง %RSD กับความเข้มข้น โดยไม่คำนึงถึงวิธีวิเคราะห์ที่ใช้และตัวอย่างที่วิเคราะห์ เนื่องจากวิธีวิเคราะห์และลักษณะตัวอย่าง ไม่มีอิทธิพลต่อ %RSD

การคำนวณ %RSD

$$\%RSD = \left( \frac{SD \times 100}{\bar{x}} \right) \dots\dots\dots(3)$$

### Horwitz equation

สำหรับ reproducibility :  $RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)} = 2C^{-0.1505}$

สำหรับ repeatability :  $RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} = 0.66 \times 2C^{-0.1505}$

โดย C เป็น Concentration ratio (ไม่มีหน่วย)

ตารางที่ ค.1 แสดงค่า expected %RSD<sub>r</sub> ที่คำนวณจาก Horwitz' equation ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ analyte	C	Expected %RSD <sub>r</sub>
100% (100g/100g)	1	$0.66 \times 2 \times (1)^{-0.1505} = 1.3$
10% (10g/100g)	0.1	$0.66 \times 2 \times (0.1)^{-0.1505} = 1.8$
1% (1g/100g)	0.01	$0.66 \times 2 \times (0.01)^{-0.1505} = 2.6$
0.1% (0.1g/100g)	0.001	$0.66 \times 2 \times (0.001)^{-0.1505} = 3.7$
100 ppm(100mg/kg)	$1 \times 10^{-4} = 0.0001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-4})^{-0.1505} = 5.2$
10 ppm(10mg/kg)	$1 \times 10^{-5} = 0.00001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-5})^{-0.1505} = 7.4$
1ppm(1mg/kg)	$1 \times 10^{-6} = 0.000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-6})^{-0.1505} = 10.5$
0.1 ppm หรือ 100 ppb	$1 \times 10^{-7} = 0.0000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-7})^{-0.1505} = 14.9$
0.01 ppm หรือ 10 ppb	$1 \times 10^{-8} = 0.00000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-8})^{-0.1505} = 21.1$
0.001 ppm หรือ 1 ppb	$1 \times 10^{-9} = 0.000000001$	$0.66 \times 2 \times (10^{-9})^{-0.1505} = 29.8$

### เกณฑ์การยอมรับ

ใช้เกณฑ์ AOAC และ Codex กับ EU กำหนดไว้ทั่วไป ดังนี้

ตารางที่ ค.2 แสดงเกณฑ์ค่า HORRAT ที่ยอมรับ

Reference	ค่า HORRAT ที่ยอมรับ
AOAC	< 2
Codex, EU	≤ 2

โดย HORRAT หรือ Horwitz ratio คือ อัตราส่วนระหว่างค่า RSD ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง ( $RSD_{obs}$ ) กับค่า RSD ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ( $RSD_{expected}$ ) ใช้ประเมินการยอมรับความเที่ยงได้ สำหรับ repeatability;  $HORRAT = RSD_{obs} / RSD_{expected}$  ความเที่ยงเป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลการทดสอบซ้ำ ภายใต้ภาวะที่กำหนด

ตารางที่ ค.3 แสดงการคำนวณค่าความเที่ยงของการทดสอบสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอทที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

ครั้งที่	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	ความเข้มข้นที่เดิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร	ความเข้มข้นที่เดิม 400 มิลลิกรัมต่อลิตร
1	211.57	401.63
2	210.11	387.30
3	205.72	369.75
4	211.16	398.70
5	215.95	401.63
6	210.54	404.55
ค่าเฉลี่ย	210.84	393.93
% RSD	3.27	3.37
<b>Horwitz equation (RSD<sub>e</sub>)</b>	<b>4.76</b>	<b>4.28</b>
<b>HORRAT target</b>	<b>0.33</b>	<b>0.79</b>

สารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทระดับความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อประเมินด้วยความเที่ยง พบว่า HORRAT มีค่าเท่ากับ 0.33 และ 0.79 อยู่ในเกณฑ์น้อยกว่า 2 ตามมาตรฐานโคเด็กซ์

#### ค.4 การคำนวณค่าความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีทดสอบ

ค่าความแม่นยำ คือ การแสดงความใกล้เคียงของค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบค่าความถูกต้อง  
คำนวณได้จากร้อยละการกลับคืน (%Recovery)

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3} \dots\dots\dots(4)$$

เมื่อ  $C_1$  = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน  
 $C_2$  = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน  
 $C_3$  = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

The AOAC Manual for the Peer Verified Methods Program (1993) ได้กำหนดแนวทาง  
สำหรับการยอมรับร้อยละการกลับคืน (%Recovery) โดยทั่วไปตามตารางที่ ค.4

ตารางที่ ค.4 เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนตามมาตรฐาน AOAC มีเกณฑ์มาตรฐาน

ความเข้มข้นของ analyte	%Recovery
10-100%	98-102
≥ 1% (10,000 ppm)	97-103
> 0.1% (1,000 ppm)	95-105
100 ppm	90-107
10 ppm, 1 ppm, 100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนของสารตามมาตรฐาน โคเด็กซ์ ได้กำหนดงานด้าน  
สารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ตกค้างในอาหาร มีเกณฑ์มาตรฐาน ดังตารางที่ ค.5

ตารางที่ ค.5 เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืนตามมาตรฐาน โคเด็กซ์

ความเข้มข้นของ analyte	%Recovery
< 1 µg/kg	50-120
> 1 µg/kg ≤ 0.001 mg/kg	60-120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	70-120
> 0.1 mg/kg < 1 mg/kg	70-110
>10 mg/kg	70-110

**ตารางที่ ค.6** แสดงผลการคำนวณค่าความแม่นยำของการทดสอบของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เบนโซเอทที่เดิม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ เบนโซเอทที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการกลับคืน (% Recovery)
1	0	15.66	-
	200	223.04	103.69
	400	397.13	95.37
2	0	86.71	-
	200	280.11	96.70
	400	472.70	96.50
3	0	163.81	-
	200	344.71	90.45
	400	585.35	105.38
4	0	124.82	-
	200	335.26	105.22
	400	514.28	97.36
		<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>98.83</b>

สารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทระดับความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อประเมินด้วยความแม่นยำ พบว่า ร้อยละการกลับคืนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.83 อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานโคเด็กซ์

## ภาคผนวก ง.

## การคำนวณหาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างจริง

## ง.1 ผลการคำนวณหาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างจริง

ตารางที่ ง.1 แสดงผลการคำนวณหาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างจริง

ชนิดของ ตัวอย่าง	ชื่อ	น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณเบนโซเอท ที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณเบนโซเอท ที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
ขนมจีน	ก1	21.2048	15.66	147.71
	ก2	21.1352	86.71	820.51
	ก3	21.1274	124.82	1136.50
เส้นเล็ก	ข1	20.0862	91.84	914.46
	ข2	20.0884	30.74	306.10
	ข3	20.1452	110.59	1097.91
เส้นหมี่	ค1	20.4508	83.92	820.66
	ค2	20.0614	100.60	1002.90
	ค3	20.4080	117.51	1151.63
เส้นใหญ่	ง1	21.5010	104.82	974.99
	ง2	20.0753	59.72	595.00
	ง3	21.4214	115.81	1081.23
แผ่นก๋วยจั๊บน้ำเย็น	จ1	21.0158	235.25	2238.81
	จ2	21.1356	74.35	703.57
	จ3	20.1636	100.03	992.15

## ง.2 ผลเวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาคของการสกัดเบนโซเอทด้วยระบบที่พัฒนาขึ้นและระบบเดิม





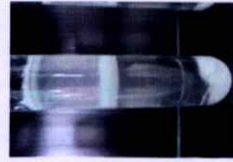










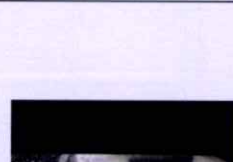
ตารางที่ ง.2 แสดงผลการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาคของสารละลายมาตรฐาน โขเดียมเบนโซเอท ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น และระบบระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแบบเดิม [6]

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โขเดียมเบนโซเอท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาค (นาที . วินาที)	
	ATPS ที่พัฒนาขึ้น	ATPS แบบเดิม
100	4.29	3.15
200	5.13	2.41
400	6.58	3.12
600	4.48	3.24
















ตารางที่ ง.3 แสดงผลการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาคของตัวอย่างชนิดต่างๆ ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น และระบบระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแบบเดิม [6]

ชนิดของตัวอย่าง	เวลาที่ใช้ในการแยกวัฏภาค (นาที . วินาที)	
	ATPS พัฒนาขึ้น	ATPS แบบเดิม
ขนมจีน	7.57	25.55
เส้นเล็ก	4.53	8.04
เส้นหมี่	5.30	25.58
เส้นใหญ่	4.18	10.05
แผ่นก๋วยจั๊บน้ำ	4.00	9.37










ตารางที่ ง.4 แสดงภาพการแยกแ้วภูมิภาคของตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างกันด้วยระบบสารสนเทศภายใต้ภาพแบบเดิม [6]

ชนิดของตัวอย่าง	เวลา				
ขนมจีน	 <p>5 นาที</p>	 <p>10 นาที</p>	 <p>15 นาที</p>	 <p>25 นาที</p>	 <p>25 นาที 5 วินาที</p>
เส้นเด็ก	 <p>1 นาที</p>	 <p>3 นาที</p>	 <p>5 นาที</p>	 <p>7 นาที</p>	 <p>8 นาที</p>
เส้นหมี่	 <p>5 นาที</p>	 <p>10 นาที</p>	 <p>15 นาที</p>	 <p>20 นาที</p>	 <p>15 นาที</p>
					 <p>25 นาที 58 วินาที</p>

ตารางที่ ๕.5 แสดงภาพการแยกวิถีภาคของตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างกันด้วยระบบสารละลายนำสองวิถีภาคที่พัฒนาขึ้น

ชนิดของตัวอย่าง	เวลา				
ขมจีน	 <p>1 นาที</p>	 <p>2 นาที</p>	 <p>3 นาที</p>	 <p>5 นาที</p>	 <p>7 นาที 57 วินาที</p>
เส้นเด็ก	 <p>1 นาที</p>	 <p>2 นาที</p>	 <p>3 นาที</p>	 <p>4 นาที</p>	 <p>4 นาที 53 วินาที</p>
เส้นหมี่	 <p>1 นาที</p>	 <p>2 นาที</p>	 <p>3 นาที</p>	 <p>4 นาที</p>	 <p>5 นาที 30 วินาที</p>

ตารางที่ ๖.5 แสดงภาพการแยกแยะลักษณะของตัวอ่อนชนิดต่าง ๆ ที่เวลาต่างกันด้วยระบบสารละลายนำส่งวิทยาศาสตร์ที่พัฒนาขึ้น (ต่อ)

ชนิดของตัวอ่อน	เวลา				
เส้นใหญ่	 <p>1 นาที</p>	 <p>2 นาที</p>	 <p>3 นาที</p>	 <p>4 นาที</p>	 <p>4 นาที 18 วินาที</p>
แผ่นแก้วจับ	 <p>1 นาที</p>	 <p>2 นาที</p>	 <p>3 นาที</p>	 <p>4 นาที</p>	

### ง.3 ผลการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้น

ตารางที่ ง.6 แสดงผลการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เบนโซเอทด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น  
และวิธีมาตรฐาน

ชนิดของ ตัวอย่าง	วิธีที่พัฒนาขึ้น ATPS		วิธีมาตรฐาน AOAC	
	น้ำหนักของ ตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณเบนโซเอท (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	น้ำหนักของ ตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณเบนโซเอท (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
ขนมจีน	21.1352	820.51	21.1328	851.56
เส้นเล็ก	20.0884	306.10	20.0450	327.05
เส้นหมี่	20.4508	820.66	20.3490	806.30
เส้นใหญ่	21.4214	1081.23	20.0383	1096.29
แผ่นกวยจั๊บ	21.1356	703.57	20.4506	715.48

t-Test: Paired Two Sample for Means

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	746.4143	759.3351
Variance	79704.5863	78260.9564
Observations	5	5
Pearson Correlation	0.998232	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t <sub>Stat</sub>	-1.70886	
P(T<=t) one-tail	0.08133	
t <sub>Critical</sub> one-tail	2.131847	
P(T<=t) two-tail	0.162659	
t <sub>Critical</sub> two-tail	2.776445	

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง คือขนมจีน เส้นเล็ก เส้นหมี่ เส้นใหญ่ และแผ่นกวยจั๊บ ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐานของ AOAC ข้อ 47.3.03 และวิธีการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น ดังตารางที่ ง.4 จะเห็นได้ว่าค่าปริมาณที่ตรวจพบทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ คือ *paired t-test* พบว่า ผลลัพธ์ของการวิเคราะห์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $t_{\text{observed}} = -1.71, t_{\text{critical}} = 2.78$ )

**ตารางที่ ง.7** ผลการคำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของการทดสอบของสารมาตรฐาน โขเดียมเบนโซเอทที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว ซึ่งใช้วิธีการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น

ชนิดของ ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เบนโซเอทที่เติม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ เบนโซเอทที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการคืนกลับ (% Recovery)
ขนมจีน 1	0	15.66	-
	200	223.04	103.69
	400	397.13	95.37
ขนมจีน 2	0	86.71	-
	200	280.11	96.70
	400	472.70	96.50
ขนมจีน 3	0	124.82	-
	200	335.26	105.22
	400	514.28	97.36
เส้นเล็ก 1	0	91.84	-
	200	291.59	99.87
	400	478.21	96.59
เส้นเล็ก 2	0	30.74	-
	200	227.13	98.19
	400	410.83	95.02
เส้นเล็ก 3	0	110.59	-
	200	309.01	99.21
	400	530.18	104.90

ตารางที่ ง.7(ต่อ) ผลการคำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของการทดสอบของ  
 สารมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัม  
 ต่อลิตร ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว ซึ่งใช้วิธีการสกัดด้วยสารละลาย  
 น้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น

ชนิดของ ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เบนโซเอทที่เดิม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ เบนโซเอทที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการคืนกลับ (% Recovery)
เส้นหมี่ 1	0	83.92	-
	200	281.79	98.94
	400	477.35	98.36
เส้นหมี่ 2	0	100.60	-
	200	308.77	104.08
	400	485.16	96.14
เส้นหมี่ 3	0	117.51	-
	200	323.36	102.92
	400	536.23	104.68
เส้นใหญ่ 1	0	104.82	-
	200	311.84	103.51
	400	465.36	90.14
เส้นใหญ่ 2	0	59.72	-
	200	250.93	95.60
	400	473.32	104.65
เส้นใหญ่ 3	0	115.81	-
	200	335.24	109.72
	400	537.98	105.54
แผ่นก๋วยจั๊บน้ำเย็น 1	0	235.25	-
	200	433.77	99.26
	400	617.66	95.60
แผ่นก๋วยจั๊บน้ำเย็น 2	0	74.35	-
	200	284.54	105.10
	400	483.76	102.35

ตารางที่ ง.7(ต่อ) ผลการคำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของการทดสอบของ สารมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัม ต่อลิตร ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว ซึ่งใช้วิธีการสกัดด้วยสารละลาย น้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้น

ชนิดของ ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ เบนโซเอทที่เติม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ เบนโซเอทที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการคืนกลับ (% Recovery)
แผ่นกัวยับ 3	0	100.03	-
	200	311.28	105.63
	400	503.72	100.92

## ภาคผนวก จ.

### ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง วัตถุเจือปนในอาหาร

(สำเนา)

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

(ฉบับที่ 281) พ.ศ. 2547

เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง สีสผสมอาหาร วัตถุที่ใช้ปรุงแต่งรสอาหาร และวัตถุเจือปนอาหาร ให้เหมาะสมกับสภาพการณ์ในปัจจุบันและเพิ่มประสิทธิภาพในการคุ้มครองผู้บริโภคยิ่งขึ้น

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 5 และมาตรา 6(1)(2)(4)(5)(6)(7)(9) และ (10) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 อันเป็นพระราชบัญญัติที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและเสรีภาพของบุคคล ซึ่งมาตรา 29 ประกอบกับมาตรา 35 มาตรา 39 มาตรา 48 และมาตรา 50 ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทยบัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตามบทบัญญัติแห่งกฎหมาย รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ 1 ให้ยกเลิก

(1) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 21 (พ.ศ.2522) เรื่อง กำหนดสีผสมอาหาร เป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน การใช้ การผสม และฉลาก ลงวันที่ 13 กันยายน พ.ศ.2522

(2) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 38 (พ.ศ.2522) เรื่อง กำหนดวัตถุที่ใช้ปรุงแต่งรสอาหาร เป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน ลงวันที่ 13 กันยายน พ.ศ.2522

(3) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 55 (พ.ศ.2524) เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติมประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 21 (พ.ศ.2522) ลงวันที่ 2 มกราคม พ.ศ.2524

(4) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 66 (พ.ศ.2525) เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติมประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 55 (พ.ศ.2524) ลงวันที่ 11 มกราคม พ.ศ.2525

(5) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 84 (พ.ศ.2527) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร ลงวันที่ 25 ธันวาคม พ.ศ.2527

(6) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 119 (พ.ศ.2532) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 8 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2532

ข้อ 2 ให้วัตถุเจือปนอาหาร (Food Additive) เป็นอาหารควบคุมเฉพาะ

ข้อ 3 วัตถุเจือปนอาหาร หมายความว่า วัตถุที่ตามปกติมิได้ใช้เป็นอาหารหรือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร ไม่ว่าวัตถุนั้นจะมีคุณค่าทางอาหารหรือไม่ก็ตาม แต่ใช้เจือปนในอาหารเพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต การแต่งสีอาหาร การปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร การบรรจุ การเก็บรักษา หรือการขนส่ง ซึ่งมีผลต่อคุณภาพหรือมาตรฐานหรือลักษณะของอาหาร ทั้งนี้ให้หมายความรวมถึงวัตถุที่มิได้เจือปนในอาหาร แต่มีภาชนะบรรจุไว้เฉพาะแล้วใส่รวมอยู่กับอาหารเพื่อประโยชน์ดังกล่าวข้างต้นด้วย เช่น วัตถุกันชื้น วัตถุดูดออกซิเจน เป็นต้น

ความในวรรคหนึ่ง ไม่รวมถึงสารอาหารที่เติมเพื่อเพิ่มหรือปรับให้คงคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน เกลือแร่

ข้อ 4 วัตถุเจือปนอาหาร ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามเงื่อนไขใดเงื่อนไขหนึ่ง ดังต่อไปนี้

(1) ตามที่กำหนดไว้ใน Codex Advisory Specification for the Identity and Purity of Food Additives

(2) ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการอาหาร

(3) ตามที่ได้รับความเห็นชอบจากคณะอนุกรรมการเพื่อศึกษาวิเคราะห์ปัญหาและวินิจฉัยในเชิงวิชาการเกี่ยวกับอาหาร โดยผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าจะต้องส่งมอบผลการประเมินความปลอดภัยของวัตถุเจือปนอาหารชนิดนั้น พร้อมรายละเอียดข้อมูลประกอบการขึ้นขอ ดังนี้

(3.1) การระบุส่วนประกอบและลักษณะทางเคมีของวัตถุเจือปนอาหารที่นำมาประเมินความปลอดภัยโดยมีรายละเอียด ดังนี้

(3.1.1) เอกลักษณะและความบริสุทธิ์ของวัตถุเจือปนอาหารที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ เพื่อประเมินความปลอดภัย (Identity and Purity)

(3.1.2) ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นและวิถีของวัตถุเจือปนอาหารนั้น ๆ ในอาหาร (Reactions and Fate of Food Additives in Food)

(3.1.3) ข้อกำหนดคุณลักษณะเฉพาะของวัตถุเจือปนอาหาร (Specifications)

(3.2) กระบวนการทดสอบและการประเมินความปลอดภัย โดยแสดงรายละเอียดดังนี้

(3.2.1) ระบุตัวชี้วัดในการทดสอบและการศึกษาข้อมูลเรื่องการเกิดพิษ ดังต่อไปนี้

(ก) ผลกระทบต่อหน้าที่การทำงานของร่างกาย (Functional Manifestations)

(ข) การก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะ (Morphological

Manifestations)

(ค) การก่อมะเร็ง (Neoplasms)

(ง) ความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์และการพัฒนาการของร่างกาย

(Reproduction and Developmental Toxicity)

(จ) ผลการศึกษาออกสัตว์ทดลอง (In Vitro Studies)

(3.2.2) การนำข้อมูลด้านการเปลี่ยนแปลงในร่างกายและเภสัชจลนศาสตร์ของวัตถุเจือปนอาหารนั้น ๆ มาใช้ในการประเมินความปลอดภัย (The Use of Metabolic and Pharmacokinetic Studies in Safety Assessment) โดยกล่าวถึงประเด็น ดังต่อไปนี้

(ก) ชนิดของสัตว์ที่นำมาใช้ในการศึกษาทดลองว่ามีความเทียบเคียงกับมนุษย์ได้หรือไม่ มากน้อยเพียงใด (Identifying Relevant Animal Species)

(ข) กลไกการเกิดพิษของวัตถุเจือปนอาหารที่ประเมิน (Determining the Mechanisms of Toxicity)

(ค) การเปลี่ยนแปลงของวัตถุเจือปนอาหารนั้น ๆ ในร่างกาย (Metabolism into Normal Body Constituents)

(ง) ผลกระทบของจุลินทรีย์ที่อยู่ในทางเดินอาหารต่อวัตถุเจือปนอาหารนั้น ๆ และผลกระทบของวัตถุเจือปนอาหารนั้น ๆ ต่อจุลินทรีย์ที่อยู่ในทางเดินอาหาร (Effects of the Gut Microflora on the Chemical and Effects of the Chemical on the Gut Microflora)

(3.2.3) อิทธิพลของอายุ ภาวะโภชนาการ และภาวะสุขภาพของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาทดลองต่อการแปลผลการศึกษา และลักษณะของการออกแบบการศึกษาทดลอง (Influence of Age, Nutritional Status, and Health Status in the Design and Interpretation of Studies)

(3.2.4) ข้อมูลการศึกษาในมนุษย์ที่นำมาใช้ในการประเมินความปลอดภัย ดังต่อไปนี้

(ก) การศึกษาทางระบาดวิทยา (Epidemiological Studies)

(ข) อาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นจากการรับประทานอาหารที่มีวัตถุเจือปนอาหารนั้น ๆ เป็นส่วนประกอบอยู่ (Food Intolerance)

(3.2.5) การกำหนดค่าที่ปลอดภัยสำหรับมนุษย์ในการรับสัมผัสโดยการรับประทานต่อวัน (Acceptable Daily Intake: ADI) โดยกล่าวถึงข้อมูลที่นำมาใช้ในการกำหนดค่า ดังต่อไปนี้

(ก) ค่าของขนาดสูงสุดที่ให้แก่สัตว์ทดลองแล้วไม่สังเกตเห็นความผิดปกติ (No-observed-effect level; NOEL) ที่ใช้

(ข) การใช้องค์ประกอบความปลอดภัย (Safety factor) ในการคำนวณ

(ค) การพิจารณาถึงความผิดปกติและปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกาย (Toxicological versus physiological responses)

(ง) การเปรียบเทียบค่าที่ปลอดภัยสำหรับมนุษย์ในการรับสัมผัสโดยการรับประทานต่อวัน (ADI) ที่กำหนดขึ้นกับแนวโน้มที่มนุษย์จะมีโอกาสได้รับสัมผัสวัตถุเจือปนอาหารนั้น ๆ จริง

ข้อ 5 วัตถุเจือปนอาหารต้องมีวิธีการตรวจวิเคราะห์เป็นไปตามที่กำหนดไว้ใน Codex Advisory Specification for the Identity and Purity of Food Additives กรณีการใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่แตกต่างไปจากข้อกำหนดดังกล่าว ต้องเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการอาหาร

ข้อ 6 การใช้วัตถุเจือปนอาหาร ต้องใช้ตามชนิดวัตถุเจือปนอาหาร ชนิดของอาหาร และ ปริมาณสูงสุดที่ให้อาศัยได้ ตามเงื่อนไขใดเงื่อนไขหนึ่ง ดังต่อไปนี้

6.1 ตามมาตรฐานทั่วไปสำหรับการใช้วัตถุเจือปนอาหารของโคเด็กซ์ (Codex General Standard for Food Additives) ฉบับล่าสุด

6.2 ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา โดยความเห็นชอบของ คณะกรรมการอาหาร

6.3 การใช้วัตถุเจือปนอาหารนอกเหนือจากข้อ 6.1 และ 6.2 ต้องได้รับความเห็นชอบจาก สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ข้อ 7 การใช้วัตถุเจือปนอาหารที่แตกต่างไปจากที่กำหนดไว้ในข้อ 6 และได้รับความเห็นชอบ จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาไปก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ ให้ผู้ที่ได้ได้รับความเห็นชอบดังกล่าว ต้องแก้ไขปรับปรุงการใช้วัตถุเจือปนอาหารให้เป็นไปตามประกาศฉบับนี้ ภายในหนึ่งปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ ใช้บังคับ

ข้อ 8 ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าวัตถุเจือปนอาหารเพื่อจำหน่าย ต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวง สาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร

ข้อ 9 การใช้ภาชนะบรรจุวัตถุเจือปนอาหาร ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ว่าด้วยเรื่อง ภาชนะบรรจุ

ข้อ 10 การแสดงฉลากวัตถุเจือปนอาหาร ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วย เรื่อง ฉลาก

ข้อ 11 ประกาศฉบับนี้ ไม่ใช้บังคับกับวัตถุแต่งกลิ่นรส (flavoring agents) ตามประกาศ กระทรวงสาธารณสุขว่าด้วย เรื่อง วัตถุแต่งกลิ่นรส

ข้อ 12 ใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับอาหาร ฉลากอาหาร หรือเลขสารบบอาหาร ซึ่งได้ออก ไว้แล้วและไม่ขัดหรือแย้งกับประกาศนี้ให้คงใช้ต่อไปได้ กรณีที่ขัดหรือแย้งกับประกาศนี้ให้ใช้ได้ไม่เกินหนึ่งปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 13 ประกาศนี้ ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 18 สิงหาคม พ.ศ. 2547

(ลงชื่อ) สุตารัตน์ เกยุราพันธุ์

(นางสุตารัตน์ เกยุราพันธุ์)

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

(คัดจากราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 121 ตอนพิเศษ 97 ง. ลงวันที่ 6 กันยายน พ.ศ.2547)

รับรองสำเนาถูกต้อง

ศิริรัตน์ เฑาะศิลป์

(นางสาวศิริรัตน์ เฑาะศิลป์)

นักวิชาการอาหารและยา 6ว.

## ภาคผนวก ฉ.

## วิธีมาตรฐานของ AOAC ข้อ 47.3.03

## สำหรับการหาปริมาณกรดเบนโซอิก

FOOD ADDITIVES: DIRECT  
Chapter 47, p. 8

AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (1995)

progressive extraction, carefully drain as much clear  $\text{CHCl}_3$  solution as possible after each extraction, but do not drain any of emulsion with  $\text{CHCl}_3$  layer. If this precaution is taken,  $\text{CHCl}_3$  extract need not be washed.

Transfer combined  $\text{CHCl}_3$  extracts to porcelain evaporating dish, rinse container several times with few mL  $\text{CHCl}_3$ , and evaporate to dryness at room temperature in current of dry air.

Extract may also be transferred from separator to 300 mL Erlenmeyer and separator rinsed with three 5–10 mL portions  $\text{CHCl}_3$ . Distil very slowly at low temperature to ca  $\frac{1}{4}$  original volume. Transfer residue to porcelain evaporating dish, rinsing flask with three 5–10 mL portions  $\text{CHCl}_3$ , and evaporate to dryness at room temperature in current of dry air.

Dry residue overnight (or until no odor of  $\text{CH}_3\text{COOH}$  can be detected if product is catsup) in desiccator containing  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Dissolve residue of benzoic acid in 30–50 mL alcohol neutral to phenolphthalein; add ca  $\frac{1}{4}$  this volume of  $\text{H}_2\text{O}$  and 1 or 2 drops phenolphthalein; and titrate with 0.05N  $\text{NaOH}$ . 1 mL 0.05N  $\text{NaOH}$  = 0.0072 g anhydrous sodium benzoate.

References: JAOAC 46, 767(1963); 47, 68(1964).

CAS 65-85-0 (benzoic acid)

## 47.3.03

**AOAC Official Method 960.38**  
**Benzoic Acid**  
**In Non-Solid Food and Beverages**  
**Spectrophotometric Method**  
**First Action 1960**  
**Final Action 1964**

(Applicable to catsup, other tomato products, jams, jellies, beverages containing small amounts of alcohol, soft drinks, and fruit juices. Not applicable to solids.)

**A. Preparation of Standard Curve**

Prepare solution of benzoic acid in ether containing 50 mg/L. Determine *A* of this solution in tightly stoppered cell in Beckman DU or recording spectrophotometer between 265 and 280 nm in 1 nm intervals. Plot *A* against wavelength and record wavelength of minimum at ca 267.5 nm as point *B*, other minimum at ca 276.5 nm as point *D*, and highest maximum at ca 272 nm as point *C*.

Prepare solutions of benzoic acid in ether containing 20, 40, 60, 80, 100, and 120 mg/L. Determine *A* of these solutions in tightly stoppered cell in spectrophotometer at points *B*, *C*, and *D*. For each concentration, average *A* at *B* and *D* and subtract this value from *A* at *C*. Plot difference against concentration.

**B. Preparation of Sample**

Mix sample thoroughly. Transfer 10 g or 10 mL to separator and dilute to 200 mL with saturated  $\text{NaCl}$  solution. Make solution definitely acid to litmus with  $\text{HCl}$  and mix well.

**C. Determination**

Extract prepared solution with 70, 50, 40, and 30 mL portions ether, shaking well to ensure complete extraction. (Break emulsions by standing, stirring, or centrifuging.) Drain and discard aqueous phase. Wash combined ether extracts with 50, 40, and 30 mL portions  $\text{HCl}$  (1 + 1000) and discard  $\text{HCl}$  washings. (If extract requires no purification, proceed to next paragraph.) Extract ether solution with 50, 40, 30, and 20 mL portions 0.1%

$\text{NH}_4\text{OH}$  and discard ether. Neutralize combined  $\text{NH}_4\text{OH}$  extracts with  $\text{HCl}$  and add 1 mL excess. Extract acidified solution with 70, 50, 40, and 30 mL ether.

Dilute combined ether extracts to 200 mL with ether and determine *A* in tightly stoppered cell in spectrophotometer at wavelengths *B*, *C*, and *D*, diluting with ether if necessary to obtain optimum concentration of 20–120 mg/L. Average *A* at *B* and *D* and subtract this value from *A* at *C*. Determine concentration benzoic acid from standard curve, correcting for dilutions. Benzoic acid  $\times 1.18$  = sodium benzoate.

Conduct determination similarly on benzoate-free sample of product and determine *A* in region 265–280 nm at 1 nm intervals. If curve is straight line in this region, method is applicable to this product.

References: JAOAC 42, 486(1959); 43, 587(1960).

CAS-65-85-0 (benzoic acid)

## 47.3.04

**AOAC Official Method 967.15**  
**Benzoic Acid in Food**

**Thin Layer Chromatographic Method**

**First Action 1967**

**A. Apparatus and Reagents**

(a) *Steam distillation apparatus*.—See Figure 967.15. (1) Connecting tube only, with flask joint standard taper 34/45 and condenser joint standard taper 24/40 (JD 1710); (2) Kjeldahl flask, 800 mL, with outer joint standard taper 34/45 (161-8765); (3) condenser, 30 cm with outer joint standard taper 24/40 at top and drip tip at delivery end (131-3153); (4) steam generator, see 938.09A(a) (see 35.1.27); (5) variable transformers, 10 amp; and (6) Glas-Col heating mantle, 500 mL (11-472-10F). (Items 1–3 cite Lux Scientific Numbers; items 5 and 6 cite Fisher Scientific Co. Numbers.)

(b) *Ultraviolet recording spectrophotometer and accessories*.—Recording between 250 and 350 nm; with 5 cm micro cells and cell adapter (NSJ Precision Cells, 19571 Central Ave, Farmingdale, NY 11735).

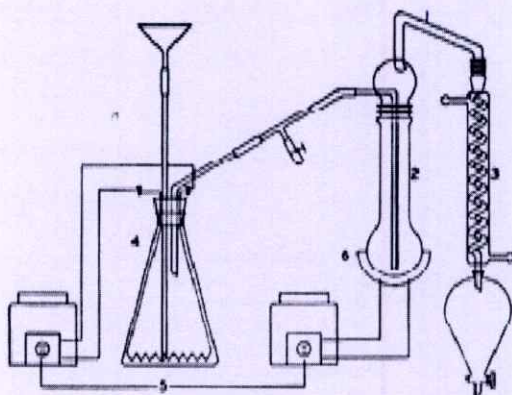


Figure 967.15—Steam distillation apparatus

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวจุฑามาศ โรจน์สัตตรัตน์
วัน เดือน ปีเกิด	2 เมษายน 2530
ที่อยู่	3/110 ถ.ศรีโสธรตัดใหม่ ต.หน้าเมือง อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา 24000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2542-2547 มัธยมศึกษาโรงเรียนคัคครุณี จังหวัดฉะเชิงเทรา พ.ศ. 2548-2551 ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต วท.บ. (เคมีอุตสาหกรรม - เครื่องมือวิเคราะห์) ภาคเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง พ.ศ. 2552-2554 ปริญญาโทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต วท.ม. (เคมีวิเคราะห์) ภาคเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

### ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

Rojsatrats J., Praditweangkum W., “ Extraction of Benzoate in Fermented Rice Noodle Based on Aqueous Two-Phase with Salt Additives ” **37th Congress on Science and Technology of Thailand 2011.**, October 10-12, 2011 at the Centara Grand and Bangkok Convention Centre at Central World, Bangkok.



เฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว  
เนื่องในโอกาสพระราชพิธีมหามงคล  
เฉลิมพระชนมพรรษา ๗ รอบ ๕ ธันวาคม ๒๕๕๔



Creative Sciences  
for Creating the Future

วิทยาศาสตร์สร้างอาชีพ  
เพื่อสร้างอนาคต

# การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37

The 37th Congress on Science and Technology (STT37)

ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และ บางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพฯ

10 - 12 ตุลาคม 2554

Premiere Keynote Lecture: 10 ต.ค. 2554

เพื่อร่วมฉลองปีเคมีสากล ค.ศ. 2011



**Professor Dr. Robert Huber**

นักวิทยาศาสตร์รางวัลโนเบล สาขาเคมี ค.ศ. 1988

Topic: Beauty and Function of Proteins,  
the Building Blocks of Life, as the Focus of  
Basic and Applied Research

ภายในงาน ขอเชิญพบกับ

นิทรรศการเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว

“พระบิดาแห่งนวัตกรรมไทย”

การแสดงผลสินค้าทางวิทยาศาสตร์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์

หนังสือ นวัตกรรมการศึกษา

นิทรรศการ “นานาชาติพันกล้วย” และกล้วยชนิดใหม่ของโลก

การประกวดโครงงานเยาวชนระดับประเทศ

และอื่นๆ อีกมากมาย



Keynote Lecture: 10 ต.ค. 2554

Medical Research in the 21st Century - Infectious Diseases as an Example  
โดย Prof. Dr. Jörg Hacker อธิการบดี German National Academy of Science

The Future of Science - Universal, Global and Local  
โดย ศาสตราจารย์ ดร. ขงยุทธ ยุทธวงศ์ นักวิทยาศาสตร์ดีเด่นสาขาเคมี พ.ศ. 2527  
และอดีตรัฐมนตรีว่าการกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Discoloration: Negative Impact on Seafood Quality  
โดย ศาสตราจารย์ ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล นักวิทยาศาสตร์ดีเด่น พ.ศ. 2554

ปาฐกถา ศาสตราจารย์สตาจค์ มงคลสุข ครั้งที่ 19: 11 ต.ค. 2554

The Tuberculosis Problem: Where will the Answer Come From?

โดย Peter Small M.D. มูลนิธิบิลล์ และเมลินดา เกตส์

และการบรรยายหลากหลายหัวข้อ อาทิ

เคมี: ศาสตร์นาโน, เซลล์กำเนิดพลังงาน, โพลีเมอร์แห่งอนาคต

คณิตศาสตร์ ไอที และสถิติ: คณิตศาสตร์กับการแพทย์

ฟิสิกส์: จากนิวตรอนถึงนิวเคลียร์

วิทยาศาสตร์การแพทย์: อีโคโลยีพันธุกรรม, การบำบัดด้วยยีน, stem cell

ชีวเคมี: แอบบองเจนซ์ใหม่, biomarker discovery

ชีววิทยา: ปิกซี มังดา วานร และมหัศจรรย์แห่งชีวิต

พฤกษศาสตร์และวิทยาการพืช: จนาคารเมล็ดพันธุ์พืช, ภูมิศาสตร์พืชพรรณ, CITES

เกษตรและวาริชศาสตร์: เทคโนโลยีชีวโมเลกุลเพื่อการผลิตกุ้ง, การย้ายฝากตัวอ่อนโคโคนม, โคลนนิ่ง

เทคโนโลยีชีวภาพ: ยานาโน, พันธุวิศวกรรม, bacteria interface oil droplet

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร: อุตสาหกรรมอาหารไทยสู่ประชาคมอาเซียน

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม: เทคโนโลยีสาหร่าย

การศึกษาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์: วิทยาศาสตร์สร้างสรรค์และนวัตกรรมการศึกษา

และการนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบการบรรยายและโปสเตอร์อีกมากกว่า 600 เรื่อง

[www.stt37.scisoc.or.th](http://www.stt37.scisoc.or.th) และ [www.sc.mahidol.ac.th/stt37](http://www.sc.mahidol.ac.th/stt37)

จัดโดย สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ร่วมกับ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
ขอรายละเอียดเพิ่มเติมที่ สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

โทร. 02-2185245, 02-2527987, 081-8147367, 089-8918044, 081-2534088 โทรสาร 02-2527987

อีเมล thararat.s@email.com, kkune.scisoc@email.com, iaksiri14@hotmail.com



## EXTRACTION OF BENZOATE IN FERMENTED RICE NOODLE BASED ON AQUEOUS TWO-PHASE WITH SALT ADDITIVES

Jutamart Rojsatrats\*, Wiboon Praditweangkum

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

\*e-mail: rojsatrats@hotmail.com

### Abstract:

A new approach has been developed for separation and spectrophotometric determination of benzoate in fermented rice noodle (Knomjeen). The extraction in this method is based on aqueous two-phase system (ATPS) of polyethylene glycol (PEG)-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with salt additives. The effect of added salt, NaCl, on the PEG4000-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous two-phase system was investigated. Phase diagrams of this aqueous two-phase system were determined by turbidimetric titration method. ATPS of sample solution 50%(w/v) PEG4000-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl (=1:2) by a volume ratio 5:8:5 was selected for extraction of benzoate and spectrophotometrically method was utilized for absorbance measurement of upper PEG-rich phase. The extraction efficiency of benzoate at 90.35±0.58% was obtained. The calibration curve was linear from 200 to 1000 mg/L ( $y = 0.000190x - 0.001679$ ;  $r^2 = 0.9989$ ). This optimized method was applied for determination of benzoate in fermented rice noodle. The recovery of 94.85 – 113.60% was observed.

### Introduction:

Food additives such as benzoic acid, sodium benzoate, potassium sorbate, and sodium metabisulphite are commonly used in food preservation. These are deliberately added to stop or delay nutritional losses due to microbiological, enzymatic or chemical changes and thus increasing its shelf life. Typically, sodium benzoate is the sodium salt of benzoic acid and works well in acidic media to inhibit yeasts, and bacterial growth. It is useful for a variety of products, such as cosmetics and pharmaceuticals, more food. Sodium benzoate is more commonly used as a food additive because benzoic acid does not dissolve well in water. Lower concentrations of benzoic acid that can inhibit the growth of microorganisms are in the range 700 -1000 µg/mL<sup>1</sup> of each species (*Saccharomyces bayanus*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula*). However, individuals may be sensitive to various preservatives, so the kinds and the concentration of the preservative must be controlled. The recommendation of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) on the safe use of food additives<sup>2-4</sup>, which can be expressed in terms of its acceptable daily intake (ADI) and represents the amount of the substances that can be daily consumed, even for a lifetime, without health hazards. The ADI is expressed in mg of the additive/kg body weight of 0–5 and 0–25 mg/kg of body weight.

A variety of analytical methods for determining benzoic acid and sodium benzoate in food or beverage and other matrices have been reported such as the reference methods (Association of Official Analytical Chemists (AOAC), procedures 963.19 and 971.15)<sup>5</sup>, thin layer chromatography<sup>6</sup>, high performance liquid chromatography<sup>7-9</sup>, gas chromatography<sup>10</sup>, capillary electrophoresis<sup>11-12</sup>, solid-phase microextraction<sup>13</sup>, stir-bar sorptive extraction<sup>14</sup>, ion chromatography<sup>15</sup>. However, all of these many methods have drawback as may require lengthy extraction, preparation or derivatization in sample, evaporation, used of toxic organic solvent and a high-cost instrument.

Liquid-Liquid extraction in aqueous two-phase system (ATPS) was first proposed in the early 1960s<sup>16</sup>. ATPS is an environment friendly, simple, convenient and low cost method for specific separation and enrichment of biological molecules. The ATPS developed method has

not been presented in the analytical chemistry research. ATPS are usually composed of two or more polymers, a polymer (polyethylene glycol, dextran) and inorganic salts (ammonium sulfate, sodium sulfate). There are many factors that affect the solute partitioning as salt additives<sup>17</sup>, solvent features and etc.

In this paper, the PEG-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ATPS with salt additives was applied to extraction of benzoate in fermented rice noodle and determined by spectrophotometer.

### Methodology:

*Materials and apparatus:* All chemicals were of analytical grade and all solution was prepared using deionized water. Polyethylene glycol-4000 (PEG4000) was purchased from Asia Pacific Specialty Chemical Limited and inorganic salts, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NaCl was supplied by Rankem. Sodium benzoate was obtained from Fluka and NaOH was provided by Carlo Erba. The absorbance was determined by Shimadzu UV-1800 UV-VIS spectrophotometer.

Stock solutions of PEG4000, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mixed salt solution (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl = 2:1 and mixed salt solution (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl = 1:2 were prepared in deionized water.

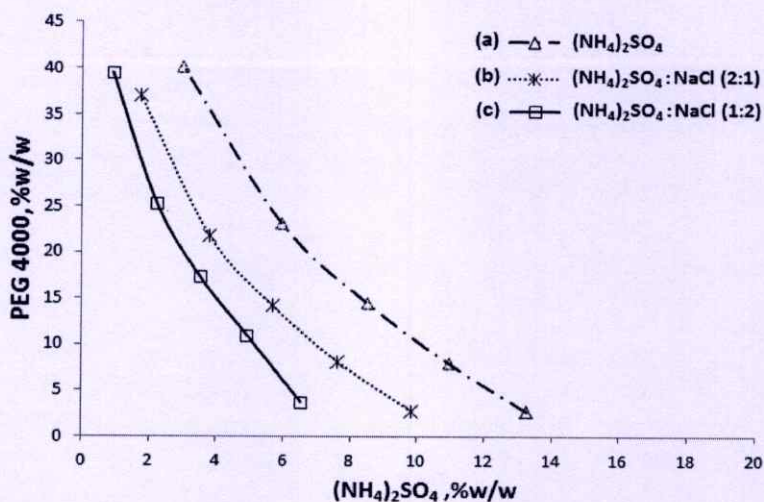
*Preparation of phase diagrams:* ATPS was formed by together mixing of PEG4000 solution and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (without and with NaCl). A polymer solution and a salt solution were exactly weighed into a test tube. After a dynamic mixing, the system was mixed for 5 min by vortex mixer, which was obtained from Scientific Industries USA, at room temperature to active phase setting. The turbidimetric titration method<sup>18</sup> was used to determine phase diagrams.

*Preparation of ATPS:* The phase system comprising standard solution (sodium benzoate 200-1000 mg/L), 50%w/w PEG4000 solution and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: NaCl stock solutions were added into a glass tube at volume ratio of 5:8:5 mixed the solutions thoroughly. The ATP systems were then vortexed in a multi-pulse vortexer. Benzoate was enriched in the top phase and salt was enriched in the bottom phase. The excluded volume of PEG-rich phase (upper phase) was spectrophotometrically determined. Baseline technique was employed to calculate the corrected absorbance,  $Abs_{269.5} - [(Abs_{266} + Abs_{275.5})/2]$ .

*Sample preparations:* Fermented rice noodle samples were purchased from the local supermarkets and then the sample were chopped into small pieces. About 20.0 g of minced sample was accurately weighed into a 100 mL beaker. A 16.70 mL of 6.0 M sodium hydroxide solution was added into this beaker and the volume was adjusted to 100.0 mL with deionized water. The glutinous solution was stirred thoroughly and left to stand for 30 min. A 25.0 mL of the cloudy solution in beaker was transferred into a volumetric flask and diluted to 50.0 mL with deionized water. Appropriate amounts of diluted sample solution, 50%w/w PEG4000 solution and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl solution at volume ratio of 5:8:5 were added into a test tube and mixed thoroughly. After phase separation was formed, the concentration of benzoate in the upper phase was analyzed by using a UV-VIS spectrophotometer.

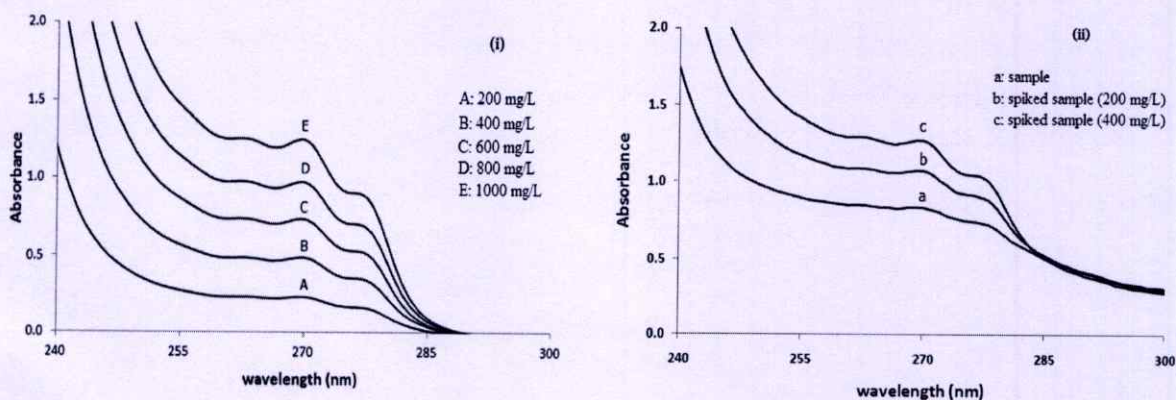
### Results and Discussions:

*Phase diagrams:* Phase separation in ATPS must depend on the nature of the intermolecular forces of the liquid phase, solute partitioning, and the effect of salt additives. In this study, NaCl was selected as salt additive because of the most widely used and the well-known effect on the water ordered around the PEG chains. The effect of NaCl salt additive was assayed and the phase diagrams can be displayed in Figure 1.



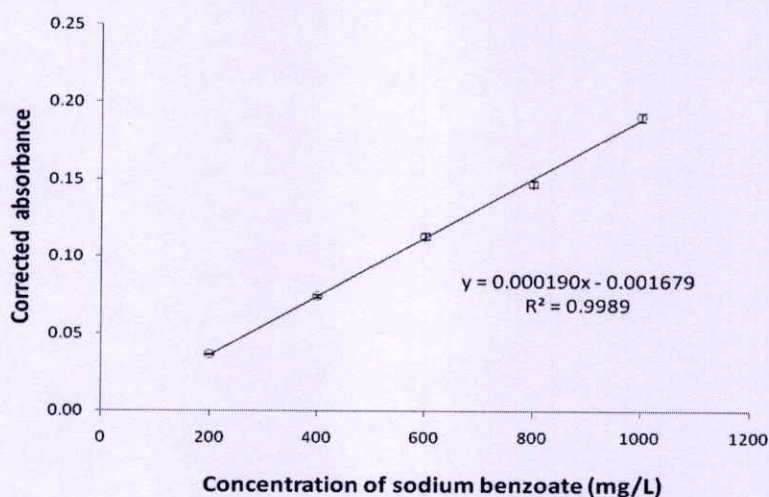
**Figure 1.** Phase diagrams of PEG4000- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ATP system without (a) and with NaCl as salt additive;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4:\text{NaCl} = 2:1$  (b) and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4:\text{NaCl} = 1:2$  (c)

The presence of NaCl as salt additive induces a modification of binodal curve in case of the position and the shape. It is possible to observe that NaCl can depress the binodal line, meaning that less polymer and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  is needed to form ATPS<sup>19</sup>. The salt also decreases of the hydrophobic interactions between solutes in water. It has been observed that the two-phase region increases with the increasing NaCl ratio due to the addition of a neutral salt, NaCl, will increase the hydrophobic difference between the phases. This add in the hydrophobicity is related to the decrease of the amount of bound water in order to keep constant the final composition of the systems and also because of the ions salvation<sup>20</sup>. On the other hand, If only NaCl used in ATPS with PEG4000, phase separation will not formed in the system. The concentrations of the phase forming components were selected throughout all experiment from the phase diagram. As a result, ATPS of 50%w/v PEG4000- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4:\text{NaCl}$  could be selected for the following study.



**Figure 2.** Absorption spectra of extracted benzoate in PEG-rich phase; (i) benzoate standard solution. A: 200, B: 400, C: 600, D: 800 and E: 1000 mg/L; (ii) Fermented rice noodle sample, a: sample, b: spiked sample (200mg/L) and c: spiked sample (400 mg/L)

*Extraction of benzoate:* ATPS of PEG4000-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl system was tested to find out the extraction efficiency of benzoate. The extraction efficiency (%E) is calculated by  $\%E = (V_u C_u / m_s) \times 100$ , where  $V_u$  is the volume of the upper phase,  $C_u$  is the concentration of benzoate in the upper phase and  $m_s$  is the amount of benzoate added. The effect of enhanced concentration of NaCl on extraction efficiency of benzoate should be noticed. The extraction efficiency of benzoate for ATPS using (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl (1:2) and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl (2:1) was  $90.35 \pm 0.58\%$  and  $80.54 \pm 2.41\%$ , respectively. The volume of upper PEG-rich phase was 14.50 mL and the bottom phase was 3.50 mL when the ATPS of the (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl (1:2) was applied.



**Figure 3.** Calibration graph of benzoate standard solution

*Analytical characteristics:* The ATPS at volume ratio 5:8:5 of sample solution 50%(w/v) PEG4000-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl (=1:2) was selected to find out the analytical characteristics. Absorption spectra of benzoate in PEG-rich phase after ATP extraction can be illustrated in Figure 2. The calibration graph was a plot of corrected absorbance vs concentration of benzoate can be shown in Figure 3. The linear equation,  $y = 0.000190x - 0.001679$ , with  $r^2 = 0.9989$  was obtained for concentration of benzoate from 200 to 1000 mg/L. Limit of determination (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 36.6 ( $y = y_B + 3S_B$ ) and 122 mg/L ( $y = y_B + 10S_B$ ), respectively. The extraction efficiency was 90.35% with 0.58%RSD (n=3). The performance of the method was summarized in Table 1.

**Table 1.** Analytical Performance of the developed method

Feature	Performance
Calibration equation	$y = 0.000190x - 0.001679$ ( $r^2 = 0.9989$ )
Linear range	200-1000 mg/L
LOD	36.6 mg/L
LOQ	122 mg/L
Extraction efficiency	90.35 %
RSD (n=3)	0.58 %

*Application to real samples:* The proposed extraction technique was applied to separate and determine benzoate in fermented rice noodle samples using the optimum condition as described above. After the ATP extraction was applied, the upper PEG-rich phase was spectrophotometrically determined. The results of sample analysis can be illustrated in Table 2. The recovery was 94.85% to 113.60% (% recovery =  $\{(C_1-C_2) \times 100\}/C_3$ ) with 0.12 - 5.99%RSD (n=3)

**Table 2.** Results of the analysis of benzoate in fermented rice noodle samples

sample	Concentration (mg/L)		Recovery (%)	RSD (%)
	added	found		
1	0	242.61	-	-
	200	446.99	102.19	1.02
	400	638.22	98.90	0.12
2	0	271.12	-	-
	200	498.13	113.60	1.40
	400	716.73	111.40	0.49
3	0	142.17	-	-
	200	338.66	98.25	1.62
	400	521.56	94.85	5.99

#### Conclusion:

ATPS formed by polyethylene glycol 4000 and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4:\text{NaCl}$  (=1:2) was successfully used to extract and determine of benzoate in fermented rice noodles with spectrophotometric method. ATPS also has many advantages, such as low toxicity, simple operation due to this extraction process can be done in one-step without filtration process, low cost and high efficiency. The developed method is convenient to be used as routine analysis.

#### Reference:

1. El-Gazzar FE, Marth EH, (1988) *J. Food Prot*, Loss of viability by *Listeria monocytogenes* in commercial calf rennet extract.
2. WHO, (1987) *Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food.*, 70, Environmental Health Criteria.
3. WHO, (1997) *Evaluation of some food additives and contaminants*, 868, Technical Report Series.
4. WHO, (2000) *Evaluation of certain food additives*, 89, Technical Report Series.
5. Association of Official Analytical Chemists (15th ed.), (1990) *Official Methods of Analysis*, sections 963.19 and 971.15, Arlington, VA
6. S.H. Khan, M.P. Murawski, J. Sherma, (1994) *J. Liq. Chromatogr.*, 17, 855.
7. Chen, B. H., & Fu, S. C., (1995) *Chromatographia*, 14(1/2), 43-50.
8. E. Bousquet, A. Spadaro, N.A. Santagati, S. Scalia, G. Ronsisvalle, (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 4, 947-954.
9. C.M. Lino, A. Pena, (2010) *Food Chem.*, 121, 503-508.
10. Zaifa Pan, Lili Wang, Weimin Mo, Chen Wang, (2005) *Analytica Chimica Acta*, 545, 218-223
11. K.C. Waldron, J. Li, (1996) *J. Chromatogr.B*, 683, 47.
12. H. Huang, Y. Lai, C. Chiu, J. Yeh, (2003) *J. Chromatogr. A*, 993, 153-164.
13. J. Jia, X. Feng, N. Fang, Y. Wang, H. Chen, W. Dan, (2002) *J. Environ. Sci. Health A*, 37, 489.

14. N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A.C. Heiden, A. Hoffmann, (2002) *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**, 56.
15. Y.T. Xie, P. Chen, W.Z. Wei, (1999) *Microchem. J.*, **61**, 59–68.
16. P.A. Albertsson, *Partitioning of Cell Particles and Macromolecules*, 1986 third ed., Wiley-Interscience, New York.
17. B.Y. Zaslavsky, (1994) *Aqueous Two-phase Partitioning: Physical Chemistry and Bio-analytical Applications*, Marcel Dekker, New York.
18. A. Kaul, in: R. Hatti-Kaul (Ed.), (2000) *Aqueous Two-phase Systems. Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, p. 11.
19. Luisa A. Ferreira, Jose´ A. Teixeira, (2011) *J. Chem. Eng. Data*, **56**, 133–137
20. R. D. Regers, A. H. Bond, C. B. Bauer, J. Zhang and S. T. Griffin, (1996) *J. Chromatogr. B.*, **680**, pp. 221.

**Acknowledgements:** This research was supported by Department of chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang

**Keywords:** Polyethyleneglycol, Binodal diagram, aqueous two-phase systems



# EXTRACTION OF BENZOATE IN FERMENTED RICE NOODLE BASED ON AQUEOUS TWO-PHASE WITH SALT ADDITIVES

Jutamart Rojsatrats<sup>1\*</sup>, Wiboon Praditweangkum<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok, Thailand 10520

\*e-mail: rojsatrats@hotmail.com

37<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING OF THE THAI CHEMICAL SOCIETY

## Abstract

A new approach has been developed for separation and spectrophotometric determination of benzoate in fermented rice noodle (Knomjeen). The extraction in this method is based on aqueous two-phase system (ATPS) of polyethylene glycol (PEG)-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with salt additives. The effect of added salt, NaCl, on the PEG4000-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous two-phase system was investigated. Phase diagrams of this aqueous two-phase system were determined by turbidimetric titration method. ATPS of sample solution 50%(w/v) PEG4000-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl (=1:2) by a volume ratio 5:8:5 was selected for extraction of benzoate and spectrophotometrically method was utilized for absorbance measurement of upper PEG-rich phase. The extraction efficiency of benzoate at 90.35 ± 0.58% was obtained. The calibration curve was linear from 200 to 1000 mg/L ( $y = 0.000190x - 0.001679$ ;  $r^2 = 0.9989$ ). This optimized method was applied for determination of benzoate in fermented rice noodle. The recovery of 94.85 – 113.60% was observed.

## Introduction



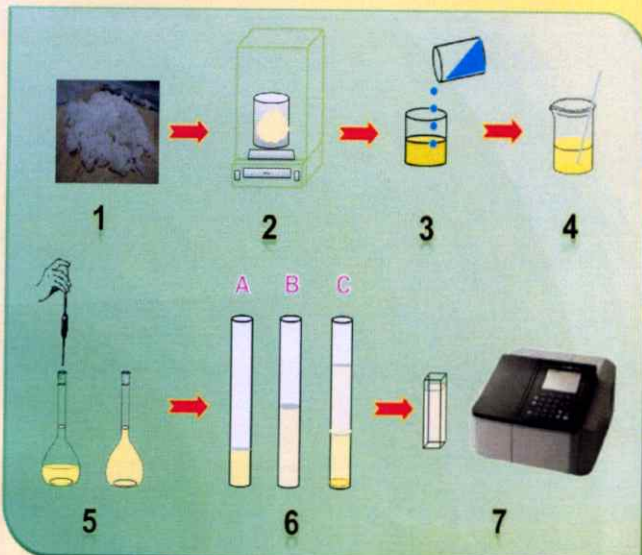
Food additives such as benzoic acid, sodium benzoate, potassium sorbate, and sodium metabisulphite are commonly used in food preservation. These are deliberately added to stop or delay nutritional losses due to microbiological, enzymatic or chemical changes and thus increasing its shelf life.

In Thailand, Ministry of Public Health has issued the legally accepted concentration of benzoate in pre-cooked noodle is 1000 mg/L (as benzoic acid).

ATPS are usually composed of two or more polymers, a polymer (polyethylene glycol, dextran) and inorganic salts (ammonium sulfate, sodium sulfate).

The proposed method based on ATPS was employed in a separation and spectrophotometric determination of benzoate in fermented rice noodle.

## Method



1. Sample was chopped into small pieces.
2. A 20.0 g of sample was accurately weighed into a 100 mL beaker.
3. A 16.70 mL of 6.0 M sodium hydroxide solution was added into this beaker and the volume was adjusted to 100.0 mL with deionized water.
4. The glutinous solution was stirred thoroughly and left to stand for 30 min.
5. A 25.0 mL of the sample solution was transferred into a volumetric flask and diluted to 50.0 mL with deionized water.
6. (A) Pipet 5 mL of diluted sample.  
(B) added 8 mL of PEG4000 (50% w/v).  
(C) added 5 mL of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl (% w/v) and mixed thoroughly.
7. After phase separation was formed, the concentration of benzoate in the upper phase was analyzed by using a UV-VIS spectrophotometer.

## Results and Discussion

### Phase diagrams

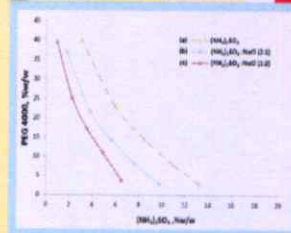


Figure 1. Phase diagrams of PEG4000-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ATP system ;  
(a) without NaCl  
(b) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl = 2:1  
(c) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:NaCl = 1:2

### Analytical characteristics

Table 1. Analytical Performance of the developed method.

Feature	Performance
Calibration equation	$y = 0.000190x - 0.001679$ ( $r^2 = 0.9989$ )
Linear range	200-1000 mg/L
LOD	36.6 mg/L
LOQ	122 mg/L
Extraction efficiency	90.35 %
RSD (n=3)	0.58 %

### Extraction of benzoate

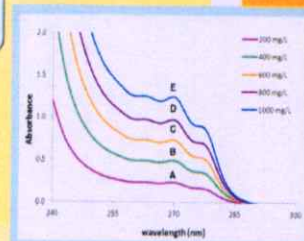


Figure 2. Absorption spectra of extracted benzoate in PEG-rich phase. Benzoate standard solution. A: 200, B: 400, C: 600, D: 800 and E: 1000 mg/L

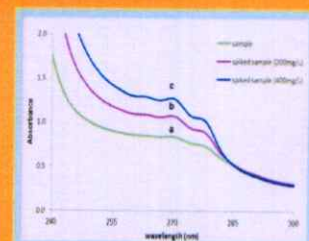


Figure 3. Absorption spectra of extracted benzoate in PEG-rich phase. Fermented rice noodle sample, a: sample, b: spiked sample (200mg/L) and c: spiked sample (400 mg/L)

### Calibration graph

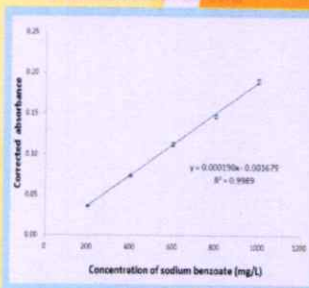


Figure 4. Calibration graph of benzoate standard solution.

### Application of method

Table 2. Results of the analysis of benzoate in fermented rice noodle samples.

sample	Concentration (mg/L)		Recovery (%)	RSD (%)
	added	found		
1	0	242.61	-	-
	200	446.99	102.19	1.02
	400	638.22	98.90	0.12
2	0	271.12	-	-
	200	498.13	113.60	1.40
	400	716.73	111.40	0.49
3	0	142.17	-	-
	200	338.66	98.25	1.62
	400	521.56	94.85	5.99

## Conclusion

The suitability for determination of benzoate in fermented rice noodle with spectrophotometric method

This method is simple and rapid than that of liquid-liquid extraction.

Low toxicity, environmentally friendly and simple operation due to this extraction process can be done in one-step without filtration process, low cost and high efficiency.

The developed method is convenient to be used as routine analysis.

## References

1. A. Kaul, in: R. Hatti-Kaul (Ed.), (2000) *Aqueous Two-phase Systems. Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, p. 11.
2. Luisa A. Ferreira, Jose A. Teixeira, (2011) *J. Chem. Eng. Data*, 56, 133–137.
3. R. D. Rogers, A. H. Bond, C. R. Brigg, J. Zhang, L. J. ...