

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในน้ำผลไม้เข้มข้น

ขวัญตา กังวาลชिरธาดา และวีระพร แจ่มศรี

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในเครื่องดื่มนั้น เดิมใช้วิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างใช้วิธีการสกัดด้วยอีเทอร์สำหรับกรดเบนโซอิก และโดยการกลั่นสำหรับกรดซอร์บิก ขั้นตอนเหล่านี้ยุ่งยากและใช้เวลานาน ทั้งยังใช้สารเคมีที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาวิธีวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในเครื่องดื่มน้ำผลไม้เข้มข้น เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ทั้งชนิดและปริมาณของกรดทั้งสองได้ในเวลาเดียวกัน การศึกษาวิธีวิเคราะห์ประกอบด้วยการเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไดออลซิสแล้วตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ผลการศึกษาพบว่า ช่วงการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกมีความเป็นเส้นตรงและพิสัย (linearity and range) ที่ความเข้มข้น 20 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ($r^2 = 0.9995$ และ 0.9998) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของทั้งกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในน้ำผลไม้เข้มข้นมีค่า 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (% Recovery \pm SD) กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในน้ำผลไม้เข้มข้นที่ระดับความเข้มข้น 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าระหว่าง 95.8 ± 1.0 ถึง 100.3 ± 4.5 และ 93.8 ± 5.1 ถึง 96.8 ± 1.1 เปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) มีค่า 1.1 - 4.4 และ 1.5 - 5.3 ตามลำดับ นอกจากนั้นวิธีนี้ยังไม่ถูกรบกวนจากสารอื่น ๆ เช่น วิตามินบี 6 วิตามินซี อะซีลเฟม-เค ซัคคาริน กรดซิตริก แอสปาเทม และแคฟเฟอีน เมื่อนำวิธีดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดอื่น ๆ อีก 6 ชนิด พบว่า สามารถตรวจสอบกรดทั้งสองชนิดได้ผลดี ดังนั้น วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จึงเหมาะสมที่จะใช้ในงานบริการวิเคราะห์ได้รวดเร็วส่งผลให้งานคุ้มครองผู้บริโภคมีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทนำ

ในการผลิตเครื่องดื่มไม่ว่าจะเป็นน้ำผลไม้ น้ำหวาน น้ำหวานอัดแก๊ส เครื่องดื่มผสมแคฟเฟอีน และเครื่องดื่มพีชผัก ผู้ผลิตนิยมใช้วัตถุกันเสียเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ รา และเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้สามารถเก็บรักษาเครื่องดื่มได้นานไม่เสียง่าย ดังนั้น เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค สารที่ใช้เป็นวัตถุกันเสียต้องไม่เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อร่างกายมีความคงตัวและไม่ทำปฏิกิริยากับเครื่องดื่มไม่ทำให้กลิ่นหรือรสชาติเปลี่ยนแปลงไป วัตถุกันเสียที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ กรดเบนโซอิก

กรดซอร์บิก และเกลือของกรดทั้งสอง^(1, 2) โดยปกติกรดเบนโซอิกพบได้ตามธรรมชาติในผลไม้ เช่น แครนเบอร์รี่ ลูกพรุน ชินนามอน และกานพลู กรดเบนโซอิกมีคุณสมบัติในการทำลายยีสต์และแบคทีเรียได้ดีกว่าราในช่วงความเป็นกรดเบส 2.5 - 4.0 จึงนิยมใช้กรดนี้คู่กับกรดซอร์บิกหรือพาราเบนในอาหารที่มีความเป็นกรด เช่น น้ำผลไม้ เครื่องดื่มคาร์บอนेटและอาหารหมักดอง ระดับที่นิยมใช้อยู่ในช่วงร้อยละ 0.05 - 0.1 โดยน้ำหนักในการบริโภคกรดเบนโซอิก หากได้รับในปริมาณน้อยร่างกาย

Accepted for publication, 23 April 2004

จะสามารถกำจัดออกไปได้จึงทำให้ไม่เกิดการสะสมของกรดนี้ในร่างกาย⁽¹⁾ กรดซอร์บิกเป็น monocarboxylic fatty acid ชนิดหนึ่งที่นิยมใช้เป็นวัตถุกันเสียในรูปของเกลือโซเดียมและโพแทสเซียมในปริมาณไม่เกินร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนัก กรดซอร์บิกจะมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์และราในช่วงความเป็นกรดเบส 6.0 - 6.5 โดยนิยมใช้ในอาหารหลายประเภท เช่น เนยแข็ง เหล้าไวน์ อาหารหมักดอง และน้ำผลไม้ กรดซอร์บิกนี้สามารถถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยกระบวนการ metabolism ในลักษณะคล้ายกับกรดไขมันจึงมีความเป็นพิษต่ำ⁽¹⁾ อย่างไรก็ตาม หากใช้วัตถุกันเสียในปริมาณที่เกินเกณฑ์กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 214 (พ.ศ. 2543) ซึ่งกำหนดค่าปริมาณการใช้วัตถุกันเสียชนิดใดชนิดหนึ่งหรือสองชนิดรวมกันต้องไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽³⁾ กรดเบนโซอิกอาจจะเป็นพิษกับผู้บริโภคได้โดยจะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง ตา และเยื่อหู หากได้รับในปริมาณสูงจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และท้องเสียได้ ดังนั้น การวิเคราะห์หาปริมาณของวัตถุกันเสียในเครื่องดื่มเพื่อเฝ้าระวังความปลอดภัยของผู้บริโภค จึงนับว่ามีความสำคัญ

แต่เดิมการวิเคราะห์ปริมาณของวัตถุกันเสียในเครื่องดื่มจะใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี⁽⁴⁾ ซึ่งวิธีนี้มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการทำให้บริสุทธิ์ที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน อีกทั้งสารเคมีที่ใช้คืออีเทอร์เป็นตัวสกัดอาจจะมีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้วิเคราะห์ซึ่งต้องปฏิบัติงานเป็นประจำ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์วัตถุกันเสีย (กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก) โดยนำวิธีเตรียมตัวอย่าง คือ วิธีไดออลซิสของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคฟเฟอีนในน้ำอัดลม น้ำผลไม้ และเครื่องดื่มพืชผัก⁽⁵⁾ มาใช้ร่วม

กับวิธี HPLC ซึ่งใช้ในการตรวจวิเคราะห์วัตถุกันเสียในผลไม้แปรรูป⁽⁶⁾ มาศึกษาปรับใช้เข้าด้วยกันและทดสอบความแม่นยำของวิธีดังกล่าว เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในตัวอย่างชนิดเดียวกันได้โดยไม่ถูกรบกวน ทั้งสามารถนำวิธีที่ศึกษานี้ตรวจวิเคราะห์วัตถุกันเสียในเครื่องดื่มต่าง ๆ เพื่อขยายขอบข่ายของงาน อันจะส่งผลให้งานคุ้มครองผู้บริโภคมีประสิทธิภาพมากขึ้น

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

Thermo separation products isocratic high performance liquid chromatography system consists of solvent delivery system Model CM 3200, variable UV-VIS detector Model SM 3200, injector Rheodyne 7125 with 20 μ l loop, PC-Pentium III Compaq Deskpro with monitor Compaq V-500 and printer Lexmark Optra LX-300

Ultra sonic bath

Cellulose membrane (Cellu Sep regenerated cellulose tubular membrane, flat width 45 mm, wall thickness 20 μ m MW. 12,000 - 14,000)

Clarification kits for solvent and sample filtration. Membrane filter for solvent and sample (Nylon 66 membrane, Alltech) pore size 0.45 μ m, diameter 47 and 13 mm

สภาวะเครื่องมือ

Column : BDS Hypersil C 18 (4.6 \times 250 mm, 5 μ m) Thermo Quest, attached with guard column

Mobile phase 0.01 M NH_4OAc : MeOH ratio 60 : 40, flow rate : 1.2 ml/min

Detector : UV 235 nm, range 0.01 AUFS

Injection volume : 20 μ l

Chart speed : 0.5 cm/min

Calculation type : standard and base on area

สารมาตรฐาน และสารเคมี

Standard benzoic acid, purity 99.8% และ sorbic acid, purity 99.3% (Sigma Chemical Company)

Methanol (MeOH) for HPLC (Merck), sodium chloride (NaCl) AR grade, 85% phosphoric acid (H_3PO_4), ammonium acetate (NH_4OAc) AR grade and acetic acid (CH_3COOH) AR grade, ammonium dihydrogen phosphate ($NH_4H_2PO_4$) AR grade

วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- Stock standard solution ของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกความเข้มข้นชนิดละ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐานกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกชนิดละ 0.025 กรัม ละลายใน 40% methanol ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร ใน volumetric flask

- Standard solution ของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกความเข้มข้นชนิดละ 2, 5, 10, 20, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก เตรียมโดยปิเปต standard stock solution 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 และ 2.5 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

- Standard solution ของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกความเข้มข้นชนิดละ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบขีดจำกัด

ของการตรวจพบ Limit of detection (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ Limit of quantitation (LOQ) การทำ LOD และ LOQ เตรียมโดยปิเปต 10 มิลลิลิตรของ stock standard solution ลงใน volumetric flask แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม mobile phase

1. 0.01 M NH_4OAc : MeOH = 60 : 40 ซึ่ง NH_4OAc 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.5 - 4.6 ด้วย acetic acid ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ใน volumetric flask ตวงสารละลายนี้มา 300 มิลลิลิตร เทใส่ใน cylinder ที่มีความจุ 500 มิลลิลิตร แล้วเติม methanol 200 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน กรองผ่าน clarification kits ซึ่งมี membrane filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร แล้วไล่แก๊สในสารละลายผสมนี้โดยใช้ Ultra sonic bath

2. 0.1 M $NH_4H_2PO_4$: MeOH = 97.5 : 2.5 ซึ่ง $NH_4H_2PO_4$ 11.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ใน volumetric flask ตวงสารละลายนี้มา 487.5 มิลลิลิตร ผสมกับ MeOH 12.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน กรองผ่าน clarification kits ซึ่งมี membrane filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร

วิธีเตรียม Dialysis solution

Inner solution : ชั่ง NaCl 100 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร เติม 85% H_3PO_4 11.8 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

Outer solution : ชั่ง 85% H_3PO_4 11.8 กรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่น ลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

1. น้ำผลไม้เข้มข้นที่ไม่มีวัตถุกันเสีย (กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก)

2. เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว จึงนำมาทดลองใช้กับตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดอื่น ๆ 6 ชนิด คือ เครื่องดื่มพีชผัก เครื่องดื่มรสผลไม้ผสมนมเปรี้ยว เครื่องดื่มผสมกาแฟเย็น น้ำผลไม้ น้ำหวานเข้มข้น และน้ำอัดลม

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

เตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีไดออลซิสและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ C18 โดยตัดแผ่นเซลลูโลสเมมเบรนให้มีความยาว 15 - 20 เซนติเมตร แช่ในน้ำ มัดปลายหนึ่งให้เป็นถุง ซึ่งตัวอย่าง 20 กรัม ใส่ในถุง เติม inner solution 20 มิลลิลิตร รััดปากถุงด้วยเส้นยางให้แน่นเขย่าให้เข้ากัน ใส่ลงในกระบอกตวง ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม outer solution จนได้ 190 มิลลิลิตร ปิดปากกระบอกตวงด้วยพาราฟิน ทิ้งค้างคืน แล้วปรับปริมาตรด้วย outer solution จนครบ 200 มิลลิลิตร เขย่า นำเมมเบรนที่ใส่ตัวอย่างทิ้ง เขย่าอีกครั้ง กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 13 มิลลิเมตร ด้วย clarification kits ลงในขวด vial ได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 5 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร

การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC วัดพื้นที่ใต้พีค (peak area) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิกและ

กรดซอร์บิกกับพื้นที่ใต้พีคของสารดังกล่าวแต่ละชนิด และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination : r^2)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและพิสัย (Linearity and Range)

ปีเปตสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกจาก stock standard solution 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.2, 0.8, 2.0, 4.0, 8.0 และ 12 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่ไม่มีวัตถุกันเสีย 20 กรัม ให้มีความเข้มข้น 5, 20, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ตามวิธีไดออลซิส กรอง แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้นของวัตถุกันเสียทั้งสองชนิด และสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคของสารแต่ละชนิด

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

ปีเปตสารละลายผสมของกรดเบนโซอิกและซอร์บิก จาก stock standard solution 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 4.0, 8.0 และ 12.0 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยวิธีไดออลซิสและวิเคราะห์หาปริมาณของวัตถุกันเสีย ทั้ง 2 ชนิด ทดสอบ 7 ซ้ำ คำนวณหาค่าความแม่นยำ (Accuracy) ในรูปของการหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% Recovery) ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ปริมาณสารที่ได้จากการวิเคราะห์} \times 100}{\text{ปริมาณสารที่เติมจริง}}$$

สำหรับการทดสอบความเที่ยง (Precision) รายงานผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, % RSD) ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

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

SD = ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยเลขคณิตของผลการวิเคราะห์

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

เติมสารละลายผสมของกรดเบนโซอิกและซอร์บิกลงในตัวอย่าง 20 กรัม ให้มีความเข้มข้น 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 และ 20.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีไดออลซิสและวิเคราะห์หาปริมาณของกรดทั้งสอง โดยใช้ HPLC ทดสอบ 7 ซ้ำ แล้วอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานและคำนวณหาค่าความแม่นยำและเที่ยงของขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Specificity)

ใช้สารละลายมาตรฐานผสม 9 ตัว ประกอบด้วย วิตามินบี 6 วิตามินซี ซัคคาริน แอสปาเทม อะซีซัลเฟม-เค กรดซิตริก แคลฟเฟอีน กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกลงในน้ำผลไม้เข้มข้นที่ผ่านการไดออลซิสแล้ว โดยให้แต่ละสารมีความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อศึกษาผลการรบกวนของสารต่าง ๆ ที่มีในเครื่องดื่มต่อการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ

นำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบความแม่นยำของวิธีแล้วมาใช้ในการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและ

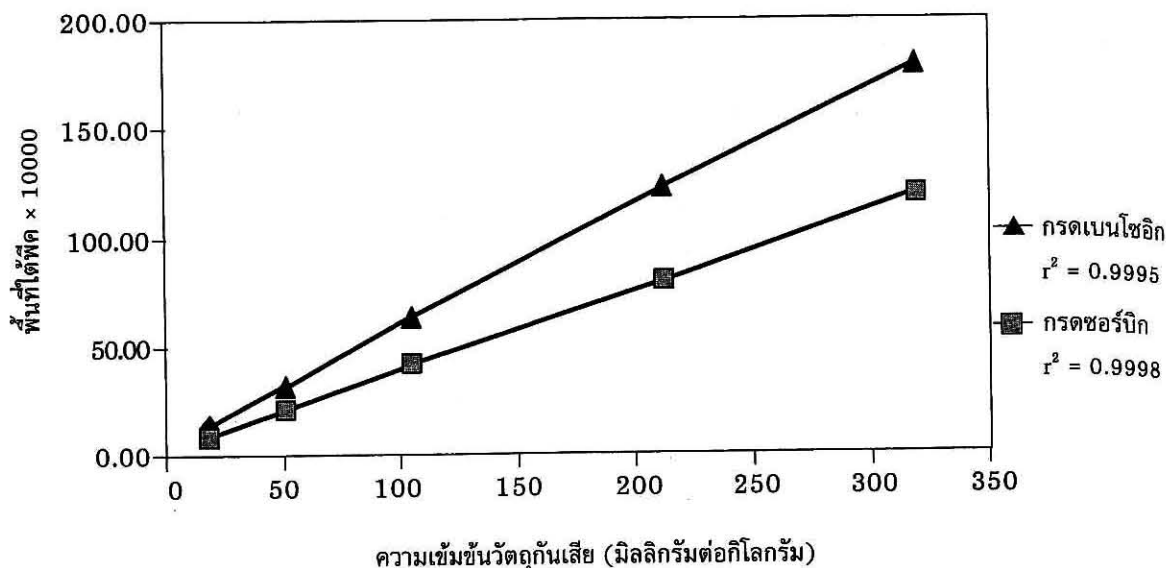
กรดซอร์บิกในเครื่องดื่มชนิดอื่น ๆ อีก 6 ชนิด คือน้ำหวานเข้มข้น น้ำผลไม้ น้ำอัดลม เครื่องดื่มพืชผัก เครื่องดื่มผสมแคลฟเฟอีน และเครื่องดื่มรสผลไม้ผสมนมเปรี้ยว โดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของกรดทั้งสองชนิด ลงในตัวอย่างเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไดออลซิส กรอง แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทดสอบ 5 ซ้ำ หาปริมาณของสารทั้งสองจากกราฟมาตรฐาน แล้วหาค่าแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ผล

วิธีวิเคราะห์ที่ทำการศึกษามีช่วงการวิเคราะห์ที่มีความเป็นเส้นตรงของกรดเบนโซอิกและซอร์บิกในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 20 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยพบสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) มีค่าเท่ากับ 0.9995 และ 0.9998 ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 1

เมื่อทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า ค่าความแม่นยำของกรดเบนโซอิกอยู่ในช่วง 95.8 ± 1.0 ถึง 100.3 ± 4.5 ส่วนของกรดซอร์บิกอยู่ในช่วง 93.8 ± 5.1 ถึง 96.8 ± 1.1 และผลการทดสอบความเที่ยงของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก พบว่า ความเที่ยงอยู่ในช่วง 1.1 - 4.4 และ 1.5 - 5.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ในการศึกษา LOD และ LOQ ของวิธีวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก พบว่า LOD ของวัตถุกันเสียทั้งสองชนิด คือ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยค่าความแม่นยำของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกเท่ากับ 100.1 ± 2.8 และ 85.5 ± 1.8 ตามลำดับ และค่าความเที่ยง (%RSD) ของกรดทั้งสองที่ระดับความ



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในน้ำผลไม้เข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค

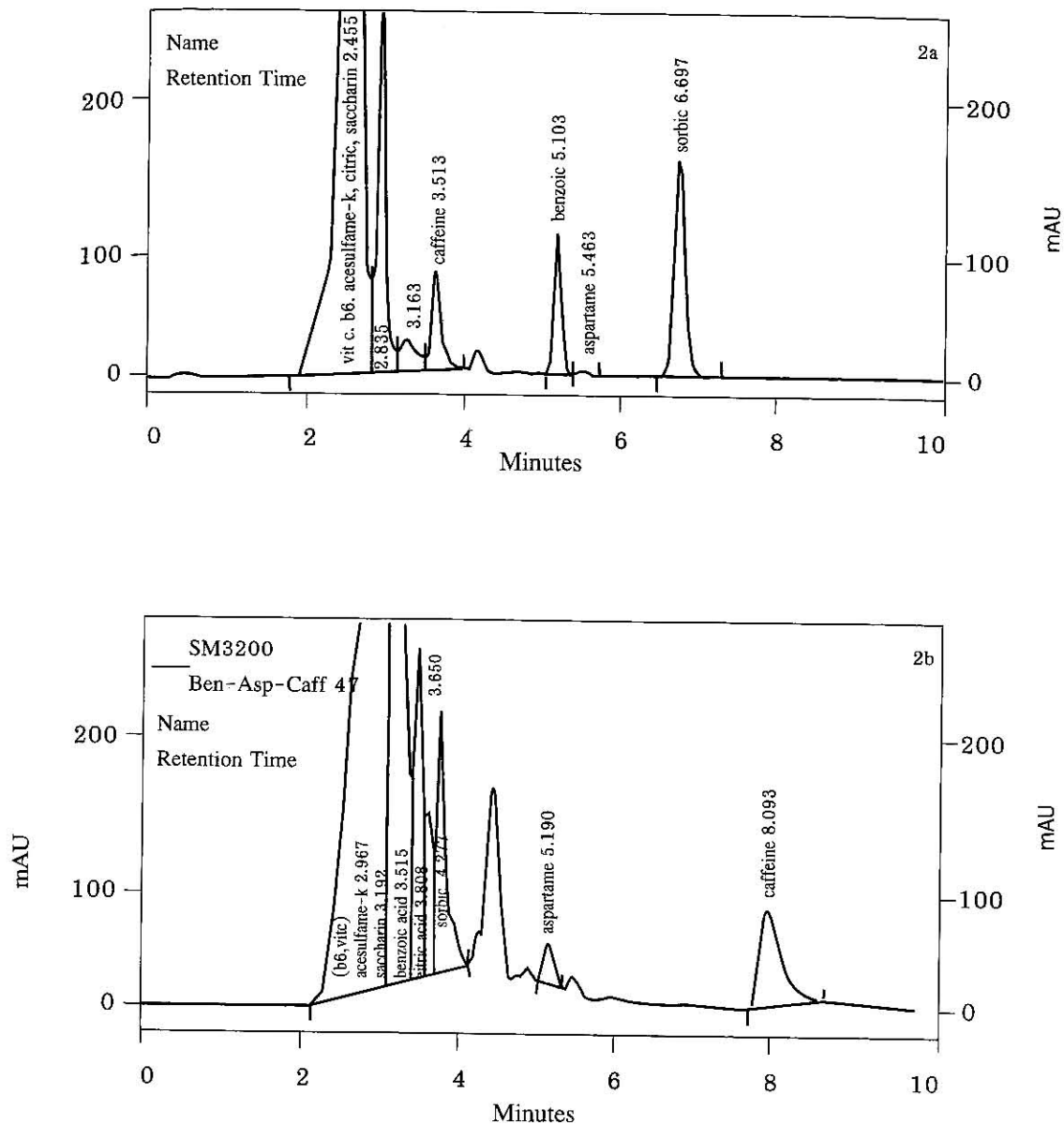
ตารางที่ 1 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกในน้ำผลไม้เข้มข้น (ทดสอบ 7 ซ้ำ)

ความเข้มข้น ของวัตถุกันเสีย (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	กรดเบนโซอิก		กรดซอร์บิก	
	ความแม่นยำ % Recovery \pm SD	ความเที่ยง % RSD	ความแม่นยำ % Recovery \pm SD	ความเที่ยง % RSD
100	100.3 \pm 4.5	4.4	93.8 \pm 5.1	5.3
200	95.8 \pm 1.0	1.1	96.8 \pm 1.1	1.5
300	99.9 \pm 2.8	2.8	96.0 \pm 2.2	2.2

เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 2.8 และ 2.2 ตามลำดับ

การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี พบว่าในการใช้คอลัมน์ C18 แยกกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกออกมาที่เวลา 5.10 และ 6.69 นาที ตามลำดับ ในขณะที่ วิตามินบี 6 วิตามินซี กรดซิตริก อะซีซัลเฟม-เค และซัคคาริน ถูกแยกออกมาก่อนในช่วงเวลา 2.46 - 2.84 นาที ส่วนแคฟเฟอีนและแอสปาเทมถูกแยกออกมาเวลา 3.51 และ 5.46

นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2a ส่วนคอลัมน์ Cationexchange พบว่าวิตามินบี 6 วิตามินซี อะซีซัลเฟม-เค ซัคคาริน และกรดซิตริกออกมาที่เวลา 2.86, 2.86, 2.97, 3.19 และ 3.81 นาที ตามลำดับ ขณะที่กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกออกมาที่เวลา 3.51 และ 4.28 นาที ตามลำดับ ส่วนแอสปาเทมและแคฟเฟอีนจะออกที่เวลา 5.19 และ 8.09 นาที ดังแสดงในภาพที่ 2b



ภาพที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมของกรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก กรดซิตริก วิตามินบี 6 วิตามินซี แอสปาทาม อะซีซัลเฟม-เค ซัคคาริน และแคฟเฟอีน ปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในน้ำผลไม้เข้มข้นภายใต้สภาวะ 2a) Column C18 (5 μ m), mobile phase : 0.01 M NH_4OAc : MeOH = 60 : 40 wavelength 235 nm 2b) Column cation exchange (10 μ m), mobile phase : 0.01 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: MeOH = 97.5 : 2.5, wavelength 214 nm

เมื่อนำวิธีที่ผ่านการทดสอบความแม่นยำของวิธีแล้วไปทำการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในเครื่องตีผสมชนิดอื่นๆ อีก 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า

ความแม่นยำมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 95.9 ± 3.2 และ 94.2 ± 5.0 ตามลำดับ และความเที่ยงของกรดทั้งสองมีค่าเท่ากับ 2.3 และ 2.5 ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างเครื่องตีผสมประเภทต่างๆ ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทดสอบ 5 ซ้ำ

ชนิดเครื่องตีผสม	กรดเบนโซอิก		กรดซอร์บิก	
	ความแม่นยำ % Recovery \pm SD	ความเที่ยง % RSD	ความแม่นยำ % Recovery \pm SD	ความเที่ยง % RSD
1. น้ำหวานเข้มข้น	97.5 ± 1.5	1.6	89.9 ± 2.7	3.0
2. น้ำผลไม้	94.3 ± 2.4	2.5	94.0 ± 1.3	1.4
3. น้ำอัดลม	93.5 ± 1.0	1.1	88.8 ± 1.0	2.1
4. เครื่องตีผสมพีชผัก	95.1 ± 1.6	1.7	96.5 ± 2.4	2.5
5. เครื่องตีผสม กาแฟอื่น	93.5 ± 1.7	1.7	93.0 ± 2.6	2.8
6. เครื่องตีผสมผลไม้ ผสมนมเปรี้ยว	101.6 ± 2.6	2.6	102.7 ± 3.5	3.4
ค่าเฉลี่ย	95.9 ± 3.2	2.3	94.2 ± 5.0	2.5

วิจารณ์

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในน้ำผลไม้เข้มข้นที่พัฒนาขึ้นโดยการเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไดออลซิสแล้ววิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography ในระบบ isocratic สามารถวิเคราะห์วัตถุกันเสียทั้งสองชนิดได้ในช่วงความเข้มข้น 20 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ภาพที่ 1) ได้อย่างมีความแม่นยำและความเที่ยง โดยเฉพาะในช่วงที่ศึกษา 3 ระดับความเข้มข้น คือ 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และให้ครอบคลุมค่ากำหนดตามประกาศกระทรวง

สาธารณสุข⁽³⁾ มีค่าความแม่นยำอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ 95 - 105% (ตารางที่ 1) และมีความเที่ยงสูงเป็นที่ยอมรับได้ โดยค่าการทวนซ้ำได้ (Repeatability : RSD_r) ที่ศึกษาสอดคล้องกับ Predicted Horwitz RSD_r⁽⁷⁾ ที่ระดับ 100 - 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าไม่เกิน 5.3 และวิธีนี้มีขีดจำกัดของการตรวจพบกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในน้ำผลไม้เข้มข้นได้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ยังพบว่า ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่ระดับ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าความแม่นยำในช่วงที่ยอมรับได้ คือ 80 - 110%⁽⁷⁾

ในการศึกษาถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีและสภาวะเครื่องมือ (ภาพที่ 2) ผู้วิจัยได้เติมสารละลายมาตรฐาน 9 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (เพื่อให้เห็นพีคได้ชัดเจนขึ้น) ได้แก่ วิตามินบี 6 กรดซิตริก และแคฟเฟอีนที่อาจมีในเครื่องดื่มผสมแคฟเฟอีน กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก กรดซิตริก และวิตามินซีที่มีในน้ำผลไม้และเครื่องดื่มพืชผัก ตลอดจนสารให้ความหวานคือ แอสปาเทม อะซีซัลเฟม-เค และซัคคาริน ลงในน้ำผลไม้เข้มข้นที่ผ่านการไดอิลซิสเพื่อศึกษาถึงการรบกวนของสารต่าง ๆ ที่อาจจะมีปนออกมากับตัวอย่างต่อการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก พบว่า ไม่มีสารใดรบกวนพีคของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกภายใต้สภาวะที่ทำการศึกษา เมื่อใช้คอลัมน์ชนิด C18 สามารถแยกได้ทั้งสารประกอบที่เป็น polar และ non-polar โดยใช้แอมโมเนียมอะซีเตตผสมกับเมทานอลเป็น mobile phase ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิตามินบี 6 วิตามินซี ซัคคาริน อะซีซัลเฟม-เค และแคฟเฟอีน มีความสามารถในการละลายใน mobile phase ได้ดีกว่า วัตถุกันเสียที่ทำการศึกษา จึงถูกแยกออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่ากรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ทำให้สารเหล่านี้ไม่รบกวนการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในเครื่องดื่ม (ภาพที่ 2a) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้คอลัมน์ที่เป็น cation exchange โดยใช้ 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: MeOH (97.5 : 2.5) เป็น mobile phase ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ซึ่งเป็นสภาวะที่ฉันทปัญญารัตน์ และแจ่มศรี⁽⁵⁾ ได้ทำไว้ พบว่า วิตามินบี 6 วิตามินซี อะซีซัลเฟม-เค และซัคคารินที่อาจมีในเครื่องดื่มผสมแคฟเฟอีนและน้ำผลไม้ รบกวนการวิเคราะห์วัตถุกันเสียโดยเฉพาะกรดเบนโซอิก สำหรับกรดเบนโซอิกและกรดซิตริก พบว่าออกมาที่เวลา

ใกล้เคียงกัน ที่เวลา 3.52 และ 3.81 นาทีตามลำดับ สำหรับกรดซอร์บิกจะออกมาที่เวลา 4.28 นาที และพีคไม่สามารถแยกได้ชัดเจนจากพีคของสารอื่นที่ไม่ต้องการซึ่งออกมาในตัวอย่างด้วย ส่วนแอสปาเทมและแคฟเฟอีนไม่มีผลรบกวนวัตถุกันเสียทั้งสองชนิด (ภาพที่ 2b) จากการศึกษาบ่งชี้ว่าคอลัมน์ C18 เหมาะสมในการใช้ตรวจวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกมากกว่าคอลัมน์ cation exchange โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่นใดในเครื่องดื่ม

ในการนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใช้กับเครื่องดื่มชนิดอื่น ๆ อีก 6 ชนิด (ตารางที่ 2) เมื่อทดสอบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์เครื่องดื่มชนิดอื่น ๆ ได้ จึงเติมสารละลายมาตรฐานผสมของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่ผู้วิจัยพบจากงานประจำว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ ผู้ผลิตจะใส่วัตถุกันเสียในช่วงนี้ และจากการศึกษาวิธีนี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกได้ดี มีความแม่นยำและความเที่ยงสูงโดยไม่ถูกรบกวนจากสารต่าง ๆ ที่อาจมีในตัวอย่าง ทั้งยังพบว่ามีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณอยู่ในระดับเดียวกับน้ำผลไม้เข้มข้น

วิธีการเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไดอิลซิสนั้น เป็นวิธีที่ดี สามารถใช้ได้กับตัวอย่างหลากหลายชนิดโดยไม่ถูกรบกวนจากเนื้ออาหารต่าง ๆ ในเครื่องดื่ม ทั้งยังใช้สารเคมีน้อย ไม่ก่อให้เกิดปัญหาในการกำจัดของเสีย และไม่พบปัญหาเกี่ยวกับ emulsion ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัดแบบวิธีเดิมที่ใช้อีเทอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้วิเคราะห์ 1 คน สามารถวิเคราะห์หาปริมาณวัตถุกันเสียทั้ง 2 ชนิด ได้พร้อมกันในเวลา 2 วัน โดยการเตรียมตัวอย่างและฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้ครั้งละประมาณ 20 ตัวอย่าง ซึ่งทำได้ง่าย สะดวก

รวดเร็วกว่า อีกทั้งยังไม่เป็นอันตรายต่อผู้ที่ต้องปฏิบัติงานประจำวันประจำ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกแบบเดิมซึ่งต้องสกัด ส่วนกรดซอร์บิก ต้องทำการกลั่นตัวอย่างและทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid⁽⁴⁾ เพื่อให้เกิดสีแล้วตรวจวิเคราะห์ ปริมาณวัตถุกันเสียด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ซึ่ง ตรวจวิเคราะห์ได้เพียง 5 - 6 ตัวอย่างในเวลา 2 วัน

สรุป

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกในน้ำผลไม้เข้มข้นด้วยวิธีไดโวลซิส และตรวจวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี HPLC เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ถูกต้อง และมีความแม่นยำ ใช้สารเคมีน้อยและไม่เป็นอันตรายต่อนักวิเคราะห์ โดยสามารถเตรียมตัวอย่างได้มากถึง 20 ตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวัตถุกันเสียให้เสร็จภายใน 2 วัน อีกทั้งไม่เป็นปัญหายุ่งยากในการกำจัดสารเคมีอย่างวิธีเดิม และวิธีนี้เหมาะสมที่จะนำไปขยายผลใช้วิเคราะห์วัตถุกันเสียในเครื่องดื่มชนิดอื่นๆ สามารถใช้ในงานบริการเพื่อเพิ่มศักยภาพงานคุ้มครองผู้บริโภคให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางยุพา ฉันทปัญญารัตน์ ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

และขอขอบคุณ นางกอบทอง ธูปหอม ที่กรุณา แนะนำและตรวจสอบความถูกต้องของบทความ

เอกสารอ้างอิง

1. ดัชนีชานิชกุล ร. เคมีอาหาร กรุงเทพฯ : กิ่งจันทร์ การพิมพ์. 2530 : 349-51.
2. Morris JB. The Chemistry and Technology of Food and Food Products, 2nd ed. London : Interscience Publishers Ltd., 1951.
3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 214 (พ.ศ. 2543) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 118 ตอนพิเศษ 6ง. ลงวันที่ 24 มกราคม 2544.
4. Burggraaf J, chapter editor. Chapter 47. Food additives : direct. In : Horwitz W, editor. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Gaithersburg, MD : AOAC International; 2000. Official method 960.38, 971.15. p. 8, 24.
5. ฉันทปัญญารัตน์ ย, แจ่มศรี ว. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ปริมาณกรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคฟเฟอีน ในเครื่องดื่ม โดยวิธีไดโวลซิสและเอชพีแอลซี. ว. กรมวิทย พ 2541 : 40(4) : 401-10.
6. ขำเลิศ ว. การวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิก กรดซอร์บิกและซัคคาริน ในผลไม้แปรรูป. ว. กรมวิทย พ 2535 : 34(1) : 31-6.
7. Garfield FM, Klesta E, Hirsch. J. Quality assurance principles for analytical laboratories, 3rd ed. USA : AOAC International; 2000. p. 113-28.