โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกโดยการสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งแบบเฮดสเปซและเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

Determination of Sorbic and Benzoic Acids by Headspace Solid Phase Microextraction and High Performance Liquid Chromatography

ชื่อนิสิต นางสาวกรรณิการ์ ธรรมาภิมุข

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกโดยการสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งแบบเฮดสเปซและเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

Determination of Sorbic and Benzoic Acids by Headspace Solid Phase Microextraction and High Performance Liquid Chromatography

โดย

นางสาวกรรณิการ์ ธรรมาภิมุข

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

โครงการ การวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกโดยการสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งแบบเฮดสเปซและเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

โดย นางสาวกรรณิการ์ ธรรมาภิมุข

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัฒนรา ธีรพิบูลย์เดช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทุกข์รักษา วรานุศุภากุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญชวัญ ไกรยา)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ ..... เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกโดยการสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งแบบเฮดสเปซและเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวกรรณิการ์ ธรรมาภิมุข เลขประจำตัว 5633053723
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พุทธรักษา วรานุศุภากุล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

กรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกนิยมใช้เป็นสารกันบูดในอาหาร เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสีย โดยหากมีสารกันบูดอยู่ในอาหารมากเกินไป อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิก โดยทำการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็ง (SPME) และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งแบบโดยตรง (DI-SPME) และการสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งแบบเฮดสเปซ (HS-SPME) โดยใช้เส้นใยชนิดพอลิอะคริเลต (df=85 ไมโครเมตร) ทำการสกัด 40 นาที และทำการชะด้วยสารละลายผสมของเมทานอล-น้ำ (อัตราส่วน 40:60) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที พบว่า การสกัดแบบ DI-SPME ที่อุณหภูมิห้อง ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการสกัดแบบ HS-SPME ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่การสกัดแบบ DI-SPME อาจเกิดการรบกวนจากเมทริกซ์ในตัวอย่างมากกว่า จากนั้นทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วย HS-SPME ได้แก่ ความเป็นกรด-เบสของสารละลายและการเติมเกลือ พบว่า การสกัดแบบ HS-SPME มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เมื่อให้สารตัวอย่างอยู่ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และเติมเกลือโซเดียมซัลเฟต 0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ: การสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็ง, เฮดสเปซ, สารกันบูด, ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

Project Title Determination of Sorbic and Benzoic Acids by Headspace Solid Phase Microextraction and High Performance Liquid Chromatography
Student Name Kannikar Thammaphimuk Student ID 5633053723
Advisor Name Assist.Prof.Dr. Puttaruksa Varanusupakul
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2016

Abstract

Sorbic and benzoic acids commonly use as a preservative in food in order to inhibit the growth of microorganisms which is the cause of food spoilage. However, exceeding use of preservatives will be harmful to the consumer. Therefore, a method for determination of sorbic and benzoic acids was developed in this research project. The extraction by solid phase microextraction (SPME) prior to the analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) was studied. Direct immersion solid phase microextraction (DI-SPME) and headspace solid phase microextraction (HS-SPME) with polyacrylate fiber (d_f=85 µm) were compared. Extraction time of 40 min, 1 mL of methanol-water (40:60) as elution solvent and elution time of 5 min were applied. As a result, DI-SPME at room temperature gave a better efficiency than HS-SPME at 50°C. Nevertheless, the sample matrix may interfere the analysis in DI-SPME. Therefore, the condition in HS-SPME was studied to improve the extraction efficiency which are solution pH and addition of salt. As a result, sample solution in 0.05 M of sulfuric acid and additional of 0.4 g/mL of sodium sulfate can enhance the extraction efficiency of HS-SPME.

Keywords: solid phase microextraction, headspace, preservative, high performance liquid chromatography

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พุทธรักษา วรานุศุภากุล อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งกรุณาสละเวลา ให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึง ความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้เงินทุนสำหรับสนับสนุนบางส่วนในการทำวิจัย รวมทั้งรุ่นพี่ในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดเวลาในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ ผู้เป็นที่รัก รวมถึงขอบคุณเพื่อนๆทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคลากรทางการศึกษา และผู้สนใจทั่วไปอยู่ไม่น้อย

กรรณิการ์ ธรรมาภิมุข

ผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ง
กิตติกรรมประกาศ จ
สารบัญ ฉ
สารบัญรูปภาพ ช
สารบัญตาราง ซ
สัญลักษณ์และคำย่อ ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ 1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย 2
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2
1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 4
1.4.1 สารกันบูด 4
1.4.2 ลิควิดโครมาโทกราฟี 4
1.4.3 การสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid phase microextraction, SPME) 5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 7
บทที่ 2 การทดลอง 8
2.1 อุปกรณ์ 8
2.2 สารเคมี 8
2.3 วิธีการทดลอง 9
2.3.1 การเตรียมสารละลายต่างๆ 9
2.3.1 การวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกด้วยเทคนิค HPLC 9
2.3.2 การสกัดด้วยเทคนิค SPME 10
2.3.4 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME 12
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 13
3.1 การวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกด้วยเทคนิค HPLC 13
3.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดแบบ DI-SPME และการสกัดแบบ HS-SPME 14
3.3 ผลของความเป็นกรดในสารละลายตัวอย่าง 15
3.4 ผลของการเติมเกลือ 16
3.5 ประสิทธิภาพการสกัด 17
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 19
บรรณานุกรม 20
ภาคผนวก 23
ประวัติผู้วิจัย 25

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูป 1.1 ส่วนประกอบของ SPME 5
รูป 1.2 ขั้นตอนการสกัดของเทคนิค SPME 6
รูป 1.3 การสกัดสารด้วยเทคนิค DI-SPME 6
รูป 1.4 การสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME 7
รูป 2.1 SPME holder แบบ manual sampling 10
รูป 2.2 การสกัดด้วยเทคนิคการสกัดแบบ DI-SPME 11
รูป 2.3 การสกัดด้วยเทคนิคการสกัดแบบ HS-SPME 11
รูป 3.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร 13
รูป 3.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดแบบ DI-SPME และการสกัดแบบ HS-SPME 14
รูป 3.3 ผลของความเป็นกรดต่อประสิทธิภาพการสกัดแบบ HS-SPME 15
รูป 3.4 ผลของเกลือต่อประสิทธิภาพการสกัดแบบ HS-SPME 16
รูป 3.5 โครมาโทแกรมจากการสกัดสารละลายมาตรฐาน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีการเติมกรดให้มีความเข้มข้น 17
รูป 3.6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างการสกัดแบบ DI-SPME ในสารละลายที่ไม่มีการเติมกรดและเกลือ กับการสกัดแบบ HS-SPME ในสารละลายที่มีการเติมกรดและเกลือ 18

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1.1 สมบัติทางเคมีของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก 4

ตาราง 2.1 สภาวะในการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกด้วยเทคนิค HPLC 10

ตาราง 2.2 การเตรียมน้ำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกต่างๆ 12

ตาราง 3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกด้วยเทคนิค HS-SPME 17

ตาราง 1 เปรียบเทียบการสกัดแบบ DI-SPME กับ HS-SPME 23

ตาราง 2 ผลการสกัดแบบ HS-SPME เมื่อมีความเข้มข้นกรดต่างๆ 23

ตาราง 3 ผลการสกัดแบบ HS-SPME เมื่อมีความเข้มข้นกรด 0.05 M และเติมเกลือปริมาณต่างๆ 24

สัญลักษณ์และคำย่อ

ชื่อเต็ม	คำย่อ
1. การสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid phase microextraction)	SPME
2. การสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งโดยตรงหรือการแช่สกัด (Direct immersion solid phase microextraction)	DI-SPME
3. การสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งแบบเฮดสเปซ (Headspace solid phase microextraction)	HS-SPME
4. ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High performance liquid chromatography)	HPLC
5. พอลิอะคริเลต (Polyacrylate)	PA

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

การถนอมอาหารมีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เพื่อช่วยในการเก็บอาหารที่ออกมามากตามฤดูกาลไม่ให้เน่าเสีย หรือช่วยให้สามารถเก็บรักษาอาหารไว้บริโภคได้เป็นเวลานาน โดยที่อาหารนั้นจะไม่สูญเสียคุณภาพ ทั้งในด้านความสะอาด สี กลิ่น รส และเนื้อสัมผัส สำหรับวิธีการถนอมอาหารในปัจจุบันนั้นมีหลากหลายวิธี เช่น การให้ความร้อน การให้ความเย็น การทำแห้ง การเติมสารเคมี และการฉายรังสี เป็นต้น ปัจจุบันการเติมสารเคมีเพื่อเพิ่มอายุของอาหารเป็นที่นิยมมาก เนื่องจากสารเคมีมีผลในการควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือทำลายส่วนต่างๆ ของเซลล์จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าบูด โดยสารเคมีที่เติมไปนั้น คือ สารกันบูด ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ สารกันบูดที่นิยมใช้มาก คือ กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแอซิตริก (Acetic acid) กรดเบนโซอิก (Benzoic acid) กรดซอร์บิก (Sorbic acid) รวมถึงเกลือของกรดชนิดต่างๆ สารประกอบไนไตรต์ (Nitrite) และไนเตรต (Nitrate)

กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกถูกใช้อย่างแพร่หลาย โดยกรดเบนโซอิกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *(1)* และประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกจะสูงสุดในช่วง pH 2.5 - 4.0 ส่วนกรดซอร์บิกสามารถป้องกันการเจริญของยีสต์ รา และแบคทีเรียได้ *(1)* โดยค่า pH ที่เหมาะสมต่อกระบวนการทำงานของกรดซอร์บิกมีค่าต่ำกว่า 6.5 ซึ่งจะเห็นว่าช่วง pH ที่ให้ประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุดของกรดสองชนิดนี้เป็นช่วง pH ที่ไม่ทำให้กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกอยู่ในรูปที่แตกตัว ดังนั้น จึงนิยมใช้กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกเป็นสารกันบูดในอาหารที่มีรสเปรี้ยว เช่น อาหารหมักดอง อย่างไรก็ตามการใส่สารกันบูดปริมาณมากเกินอาจนำไปสู่ผลเสียต่อร่างกาย เช่น การเป็นโรคลมพิษ การเกิดภาวะกรดในพลาสมาเพิ่มขึ้น โรคภูมิแพ้ การเกิดอาการชัก และอาการหอบ *(2,3)* นอกจากนี้การบริโภคอาหารหมักดองในปริมาณมาก สารกันบูดในอาหารหมักดองนั้นอาจมีผลต่อการทำลายเยื่อบุกระเพาะอาหารและลำไส้ ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ รวมถึงอาจทำให้ผู้บริโภคมีอาการอาเจียน หูอื้อ หรือมีไข้ จากอันตรายดังกล่าว ทางกฎหมายจึงมีการกำหนดปริมาณสูงสุดของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในอาหาร โดยกำหนดให้ใส่กรดเบนโซอิกในผักผลไม้ดองได้ไม่เกิน 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถใส่กรดซอร์บิกในผักผลไม้ดองได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพื่อให้แน่ใจว่าอาหารมีความปลอดภัยต่อการบริโภค จึงมีความจำเป็นอย่างมากที่จะพัฒนาประสิทธิภาพ และความน่าเชื่อถือในวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในอาหาร ซึ่งปัจจุบันมีวิธีการวิเคราะห์มากมาย เช่น เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography, TLC) *(4)* เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซีส (Capillary electrophoresis, CE) *(5,6)* แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC) *(7,8)* และไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High performance liquid chromatography, HPLC) *(9-11)* อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์หาสารที่สนใจในสารตัวอย่างที่อาจมีสารอื่นๆ เจือปนอยู่นั้นจำเป็นต้องนำสารตัวอย่างผ่านกระบวนการการสกัด โดยปัจจุบันมีวิธีการสกัดกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกมากมาย เช่น การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว (Liquid-liquid extraction, LLE) *(12)* การสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย (Dispersive liquid–liquid microextraction, DLLME) *(13)* การสกัดสารโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) *(14)* และการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid phase extraction, SPE) *(15,16)* และการสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งแบบเฮดสเปซ (Headspace solid phase microextraction, HS-SPME) (1)

ในงานวิจัยนี้สนใจพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกด้วยเทคนิค HS-SPME และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยศึกษาปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในน้ำ

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิก โดยการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC
2. ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกด้วยเทคนิค HS-SPME

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ที่หลากหลาย เช่น การวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในเครื่องดื่ม ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมนำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคที่ที่แตกต่างกัน ดังนี้

- Dong, C. และคณะ *(1)* ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์กรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกที่ผ่านเทคนิค HS-SPME โดยใช้เส้นใย 65 ไมโครเมตร PDMS–DVB ในการสกัดกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกจากเครื่องดื่ม และทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี อีกทั้งศึกษาปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ ได้แก่ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัด ผลของความแรงของไอออน ผลของความเป็นกรด รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการปล่อยสาร
- Gomaa, A.M. และคณะ *(3)* ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกโดยอาศัยเทคนิค LLE และนำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิค HPLC
- Frazier, A.R.และคณะ *(5)* ได้พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์หาสารให้ความหวานและสารกันบูด ซึ่งมีกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกรวมอยู่ด้วย ผ่านเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซีส และมีการศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์ระหว่างเทคนิคแคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซีส (Capillary zone electrophoresis, CZE) กับเทคนิคไมเซลลาร์อิเล็กโตรไคเนติกโครมาโทกราฟี (Micellar electrokinetic chromatography, MEKC)
- Wang, L. และคณะ *(10)* ได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง คู่กับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี อีกทั้งทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ ได้แก่ เวลาที่ใช้ในการสกัด ผลของความเป็นกรด และอุณหภูมิที่ใช้ในการปล่อยสาร

นอกจากเครื่องดื่ม มีการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น

- การวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในซอสถั่วเหลือง ซึ่งมีทั้งการวิเคราะห์ของ Ding, M. และคณะ *(2)* ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มแมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีและทำการสกัดผ่านเทคนิค LLE และการวิเคราะห์ของ Wei, R. และคณะ *(6)* ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE
- Dong, C. และคณะ *(11)* ได้ทำการวิเคราะห์กรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในน้ำสลัด ด้วยเทคนิค GC ที่ผ่านเทคนิค HS-SPME และศึกษาปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ ได้แก่ ชนิดของเส้นใยที่ใช้ในการสกัด อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัด ผลของความแรงของไอออน ผลของความเป็นกรด รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการปล่อยสาร
- Guarino, C. และคณะ *(12)* ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในชีส โดยทำการสกัดด้วยเทคนิค LLE และนำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีแบบย้อนกลับ (Reverse phase - High performance liquid chromatography, RP-HPLC)

- Abedi, A.S. และคณะ *(13)* ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในนม โดยทำการสกัดด้วยเทคนิค DLLME และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC และศึกษาปัจัยต่างๆที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการวิเคระห์ซึ่งได้แก่ ชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายสกัด ผลของความแรงของไอออน ผลของความเป็นกรด รวมถึงชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการทำให้เกิดการกระจายตัวของสารละลาย
- Ferreira, M.P.L.V.O.I. และคณะ *(14)* ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในแยมด้วยเทคนิค HPLC โดยทำการเปรียบเทียบเทคนิคการสกัดต่างๆ ได้แก่ เทคนิคการสกัดสารโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ เทคนิคการสกัดสารด้วยเมทานอล เทคนิคการสกัดสารด้วยเอทานอล และเทคนิค SPE
- Techakriengkrai, I. และคณะ *(16)* ได้ทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในไวน์จากข้าวไทยด้วยเทคนิค HPLC โดยผ่านการสกัดด้วยเทคนิค SPE
- Mikami, E. และคณะ *(17)* ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกในเครื่องสำอาง โดยทำการสกัดสารที่สนใจด้วยเทคนิค SPE และนำสารที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นว่า การวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกด้วยเทคนิค HS-SPME ควบคู่กับเทคนิค HPLC ยังไม่เป็นที่นิยมต่อการศึกษามากนัก ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกที่ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

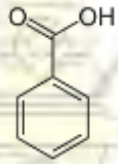
1.4 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.4.1 สารกันบูด

สารกันบูด เป็นสารเคมีที่ใช้สำหรับการถนอมอาหาร หรือยืดอายุอาหาร ทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารได้นานขึ้น โดยออกฤทธิ์ควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือทำลายส่วนใดส่วนหนึ่ง หรือทุกส่วนของเซลล์ ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าบูด สารกันบูดที่ใช้ทั่วไป เป็นสารพวกกรดอินทรีย์ พบในน้ำผลไม้ แยม ผักดอง เป็นต้น นอกจากนี้มีสารในกลุ่มเกลือของกรด สารประกอบไนไตรต์ และไนเตรต ซึ่งพบในอาหารประเภทอาหารแห้ง ไส้กรอก และแฮม ตามลำดับ โดยสารในกลุ่มกรดอินทรีย์เป็นสารกันบูดที่นิยมใช้ในอาหารมากที่สุด ได้แก่ กรดแอซิตริก กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก

กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ถูกใช้เป็นสารกันบูดในอาหารอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสารทั้งสองมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร ทำให้สามารถยืดอายุของอาหารได้ โดยสมบัติทางกายภาพของสารทั้งสองแสดงดังตาราง 1.1

ตาราง 1.1 สมบัติทางเคมีของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก

	กรดเบนโซอิก	**กรดซอร์บิก**
โครงสร้าง		
สูตรโมเลกุล	$C_7H_6O_2$	$C_6H_8O_2$
มวลโมเลกุล (กรัมต่อโมล)	122.12134	112.12652
ค่า pKa	4.202	4.76
จุดเดือด (องศาเซลเซียส)	249.2	228
ค่าการละลายในน้ำ (กรัมต่อลิตร)	3.4 (25 องศาเซลเซียส)	1.6 (20 องศาเซลเซียส)
ค่าการละลายในเมทานอล (กรัมต่อลิตร)	71.5	129
การละลาย	ไม่ชอบที่ละลายในน้ำ แต่สามารถในการละลายในน้ำร้อนสูงกว่าน้ำเย็น *(19)*	ละลายน้ำ แต่สามารถละลายในน้ำได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ และละลายได้ในแอลกอฮอล์ *(21)*

1.4.2 ลิควิดโครมาโทกราฟี

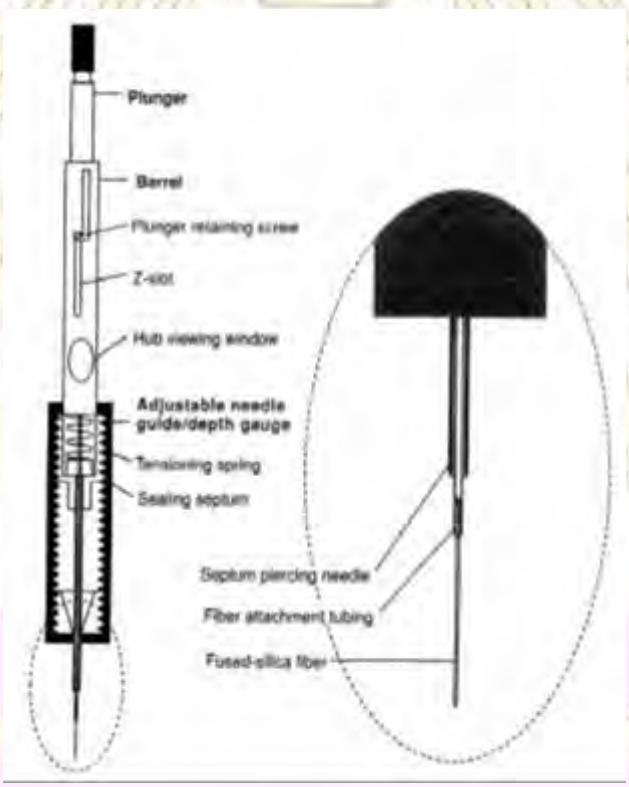
เทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟีเป็นเทคนิคการแยกสารผสม โดยอาศัยสมบัติของสาร 2 ประการคือ สารต่างชนิดกันมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายได้ต่างกันและสารต่างชนิดกันมีความสามารถในการถูกดูดซับด้วยตัวดูดซับได้ต่างกัน กระบวนการแยกสารของเทคนิคนี้ขึ้นกับความสามารถในการกระจายของสารในเฟส 2 เฟส คือ เฟสคงที่ (stationary phase) กับ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยส่วนใหญ่เฟสคงที่เป็นของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์ ส่วนเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว ทำหน้าที่ชะเอาสารออกจากเฟสคงที่ให้เคลื่อนที่ไปด้วย และเนื่องจากสารมีการกระจายตัวระหว่างเฟสคงที่กับเฟสเคลื่อนที่ต่างกัน จึงทำให้สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเฟสคงที่ได้ไม่เท่ากันและเกิดการแยกขึ้น ซึ่งในปัจจุบันเทคนิค

ลิควิดโครมาโทกราฟีได้ถูกพัฒนาให้สามารถทำงานได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพการแยกสารที่ดีขึ้น ได้แก่ ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high-performance liquid chromatography, HPLC) *(22)* อัลตร้าไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (ultrahigh-performance liquid chromatography, UPLC)

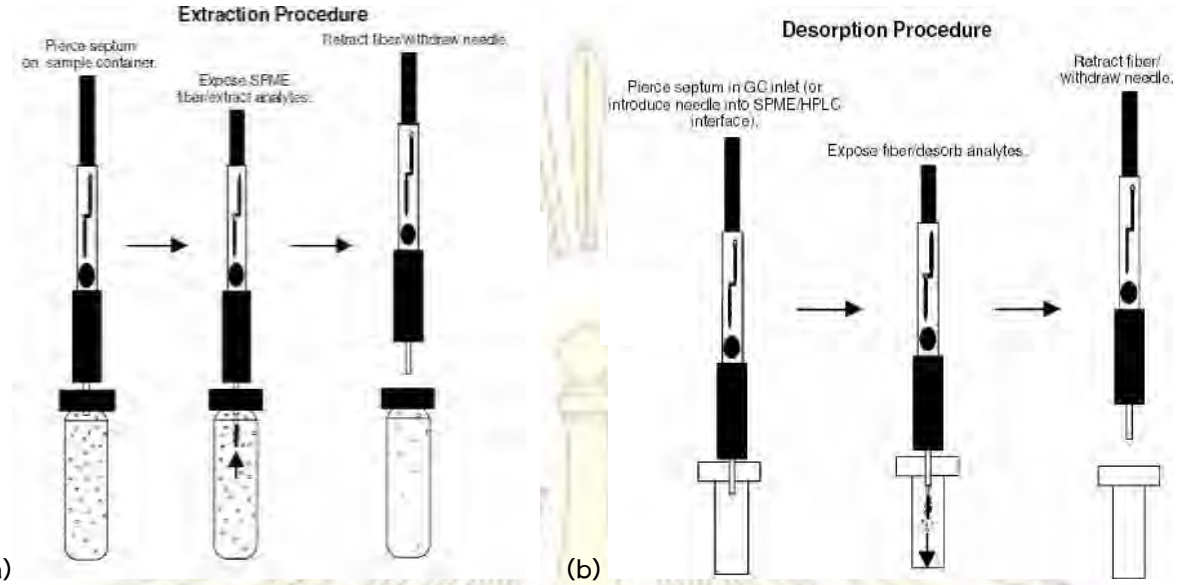
เทคนิค HPLC เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สารทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ *(23)* สามารถตรวจวัดสารในปริมาณน้อยได้ สามารถแยกสารผสมได้รวดเร็ว มีประสิทธิภาพในการแยกและความไวสูง โดยปัจจุบันมีการพัฒนาขนาดอนุภาคของเฟสคงที่ให้มีขนาดเล็กลง ทำให้ประสิทธิภาพการแยกสารดีขึ้น มีการใช้ปั๊มที่สามารถทนต่อความดันสูงได้ ทำให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่เร็วขึ้น ส่งผลให้เวลาในการวิเคราะห์ลดลง

1.4.3 การสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid phase microextraction, SPME)

หลักการพื้นฐานของการสกัดด้วยเทคนิค SPME นั้นขึ้นกับสมดุลของสารที่สนใจที่กระจายตัวอยู่ระหว่างเฟสสารละลายตัวอย่างและเฟสของตัวดูดซับที่เคลือบอยู่บน SPME fiber โดยส่วนประกอบของ SPME แสดงดังรูป 1.1 และขั้นตอนการสกัดของเทคนิค SPME ดังรูปที่ 1.2 ในขั้นตอนการสกัด สารที่สนใจจะดูดถูกซับบน SPME fiber ตามความมีขั้วไม่มีขั้ว ระหว่างสาร และตัวดูดซับบน SPME fiber ที่ใช้ นั้นคือ SPME fiber ประเภทมีขั้วจะดูดซับสารมีขั้ว และ SPME fiber ประเภทไม่มีขั้วจะดูดซับสารไม่มีขั้ว เมื่อทำการดูดซับสารที่สนใจในสภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงนำ SPME fiber ที่ได้ไปชะสารออก โดยทำการชะสารที่สนใจโดยใช้อุณหภูมิเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC และชะสารที่สนใจด้วยตัวทำละลายเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



รูป 1.1 ส่วนประกอบของ SPME *(27)*

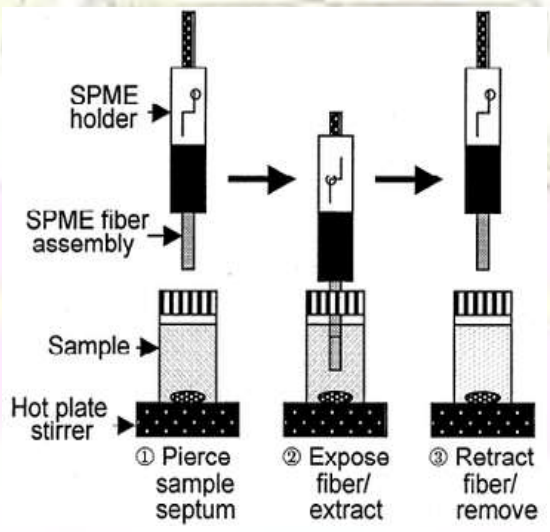


รูป 1.2 ขั้นตอนการสกัดของเทคนิค SPME *(25)*: (a) extraction procedure, (b) desorption procedure

รูปแบบการสกัดด้วยเทคนิค SPME สามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การสกัดโดยตรง (direct immersion solid phase microextraction, DI-SPME) และการสกัดแบบเฮดสเปช (headspace solid phase microextraction, HS-SPME)

1.4.3.1 การสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งโดยตรงหรือการแช่สกัด (DI-SPME)

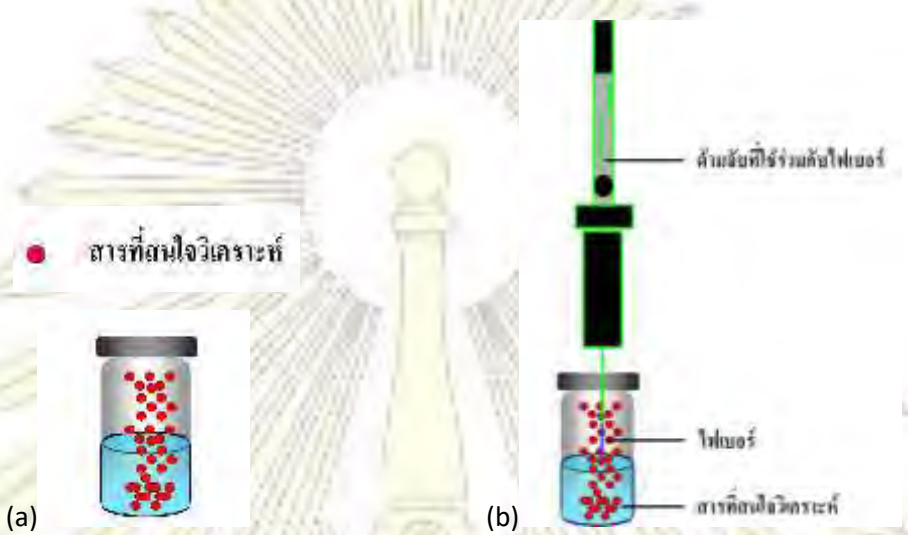
การสกัดด้วยเทคนิค SPME แบบโดยตรง เป็นการสกัดที่นำเส้นใยแช่โดยตรงในสารละลายของตัวอย่าง ดังรูป 1.3 สารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารละลายจะถูกสกัดให้อยู่บนเส้นใยโดยตรง เทคนิค DI-SPME ให้ประสิทธิภาพในการสกัดที่ดี แต่ถ้าเมทริกซ์ที่อยู่ในสารละลายตัวอย่างสามารถถูกสกัดขึ้นมาพร้อมกับสารที่สนใจได้ อาจเกิดการรบกวนการวิเคราะห์สารที่สนใจได้ (24,26)



รูป 1.3 การสกัดสารด้วยเทคนิค DI-SPME *(26)*

1.4.3.2 การสกัดระดับจุลภาคด้วยวัฏภาคของแข็งแบบเฮดสเปซ (HS-SPME)

การสกัดด้วยเทคนิค SPME แบบเฮดสเปซ จะให้สารตัวอย่างอยู่ในภาชนะปิด เช่น ขวดบรรจุสาร (vial) แล้วทำให้เกิดสมดุลของสารที่สนใจวิเคราะห์ระหว่างในสารตัวอย่างกับช่องว่างเหนือสารตัวอย่าง (headspace) ดังรูป 1.4 (a) จากนั้นทำการสกัดไอของสารตัวอย่างในบริเวณเฮดสเปซนี้ด้วยตัวดูดซับที่เคลือบบน SPME fiber *(27)* ดังรูป 1.4 (b)



รูป 1.4 การสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME *(28)* (a) Headspace equilibrium (b) HS-SPME

การสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME เป็นเทคนิคที่มีความไวและเลือกจำเพาะต่อสารที่ระเหยง่ายหรือสารกึ่งระเหย ซึ่งสามารถแพร่เข้าสู่บริเวณเฮดสเปซได้ โดยการสกัดในบริเวณเฮดสเปซจะช่วยป้องกันการสัมผัสโดยตรงระหว่างเส้นใยที่ใช้กับสารละลาย ซึ่งช่วยป้องกันการรบกวนจากเมทริกซ์ และช่วยเพิ่มอายุการใช้งานของเส้นใย *(1,28)* ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME ได้แก่ อุณหภูมิ, เวลา, ขนาด vial, อัตราส่วนเฟส และอัตราการปั่นกวน

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์สารที่สนใจด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสารประกอบที่มีลักษณะเป็นของเหลว ดังนั้น การชะสารที่สนใจที่ถูกสกัดด้วย SPME fiber จากเทคนิคการสกัด HS-SPME จึงใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยในขั้นตอนการชะสารที่สนใจออกจากเส้นใยนั้น ประสิทธิภาพการวิเคราะห์จะขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการชะสารที่สนใจด้วย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิก โดยการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

บทที่ 2
การทดลอง

2.1 อุปกรณ์

1. เครื่อง HPLC (varian-Prostar, คอลัมน์ C-18)
2. เครื่องวัดพีเอช
3. อุปกรณ์ SPME (Supelco) ซึ่งประกอบด้วย SPME holder และเส้นใยพอลิอะคริเลต (85 µm Polyacrylate, PA)
4. เครื่องกวนสารละลาย
5. แท่งแม่เหล็กกวนสาร
6. อ่างส่งคลื่นความถี่สูง
7. ชุดกรองสูญญากาศ
8. เครื่องชั่งสาร
9. เยื่อแผ่นกรองไนลอน (47 มิลลิเมตร, 0.45 ไมโครเมตร)
10. ปิเปตต์
11. ปิเปตต์ทิป
12. กระดาษฟอยล์
13. เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดสีชาสำหรับสกัด ขวดเก็บสารละลาย ขวดวัดปริมาตร บีกเกอร์ กระบอกตวง แท่งแก้วคน และหลอดหยด

2.2 สารเคมี

1. กรดเบนโซอิก (Benzoic acid)
2. กรดซอร์บิก (Sorbic acid 99%, Fluka, Germany)
3. เกลือโซเดียม ซัลเฟต แอนไฮดรัส (Sodium sulfate anhydrous, Ajax finechem, Australia)
4. แอมโมเนียมแอซิเตต (Ammonium acetate, Merck, Germany)
5. สารละลายกรดแอซิติก (Acetic acid, Merck, Germany)
6. สารละลายกรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, Merck, Germany)
7. สารละลายเมทานอล (Methano, Merck, Germany l)
8. น้ำบริสุทธิ์ (Milli-Q water)

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียมสารละลายต่างๆ

2.3.1.1 สารละลายมาตรฐานผสมกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution) ของกรดผสมที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยละลายกรดเบนโซอิก 0.2502 กรัม และกรดซอร์บิก 0.2501 กรัม ในสารละลายผสมเมทานอล-น้ำ (40:60) เพื่อเป็นสารละลายมาตรฐานเริ่มต้นในการเตรียมน้ำตัวอย่างในการศึกษาปัจจัยต่างๆ ของการสกัดด้วยเทคนิค SPME

2.3.1.2 น้ำตัวอย่าง

น้ำตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาปัจจัยต่างๆ ของการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ของกรดผสมปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ถึงขีดกำหนดปริมาตรด้วยน้ำ Milli-Q ได้น้ำตัวอย่างที่มีกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3.1.3 สารละลายแอซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.4

สารละลายแอซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.4 ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เตรียมจากการผสมสารละลายแอมโมเนียมแอซิเทตความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ กับสารละลายกรดแอซิติกความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ โดยสารละลายแอมโมเนียมแอซิเทตความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ เตรียมโดยละลายสารละลายแอมโมเนียมแอซิเทต 0.3099 กรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร และสารละลายกรดแอซิติกความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ เตรียมโดยเติมกรดแอซิติกเข้มข้น 80 ไมโครลิตร ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

นำสารละลายแอมโมเนียมแอซิเทต 0.08 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปรับ pH ให้ได้ pH 4.4 ด้วยสารละลายกรดแอซิติกความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายเป็น 400 มิลลิลิตร ด้วยน้ำบริสุทธิ์ Milli-Q

หมายเหตุ กรองสารละลายบัฟเฟอร์ด้วย Nylon membrane filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปใช้เป็น mobile phase ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

2.3.2 การวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกด้วยเทคนิค HPLC

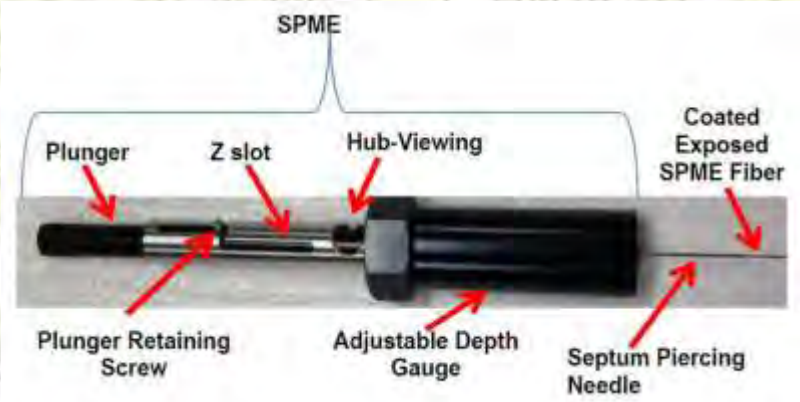
การวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME ใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยสภาวะในการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 2.1

ตาราง 2.1 สภาวะในการวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกด้วยเทคนิค HPLC

คอลัมน์	C18 Zorbax Eclipese XDB (4.6 มิลลิเมตร x 250 มิลลิเมตร i.d.), particle size 5 ไมโครเมตร
เฟสเคลื่อนที่	Isocratic, เมทานอล:acetate buffer (40:60)
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	1 มิลลิลิตรต่อนาที
Injection Volume	20 ไมโครลิตร
ตัวตรวจวัด	UV-Vis ที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร

2.3.3 การสกัดด้วยเทคนิค SPME

การสกัดด้วยเทคนิค SPME ในงานวิจัยนี้ใช้ SPME holder แบบ manual sampling (Supelco, USA) ดังรูป 2.1 และ SPME fiber ชนิด polyacrylate-coated fiber (PA), d_f 85 ไมโครเมตร



รูป 2.1 SPME holder แบบ manual sampling *(29)*

2.3.3.1 การสกัดด้วยเทคนิค DI-SPME

ปิเปตน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงขวดสีชา ทำการสกัดแบบ DI-SPME ด้วยเส้นใย 85 ไมโครเมตร PA โดยตั้งอุปกรณ์ ดังรูป 2.2 ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาในการสกัด 40 นาที จากนั้นทำการชะสารออกจาก SPME fiber โดยแช่ SPME fiber ในสารละลายผสมเมทานอล-น้ำ (40:60) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

<u>หมายเหตุ</u> กรองสารละลายด้วย Nylon membrane filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

รูป 2.2 การสกัดด้วยเทคนิคการสกัดแบบ DI-SPME

2.3.3.2 การสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME

ปิเปตน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงขวดสีชา ทำการสกัดแบบ HS-SPME ด้วยเส้นใย 85 ไมโครเมตร PA โดยตั้งอุปกรณ์ดังรูป 2.3 ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการสกัด 40 นาที จากนั้นทำการชะสารออกจาก SPME fiber โดยแช่ SPME fiber ในสารละลายผสมเมทานอล-น้ำ (40:60) ปริมาตร 1 มิลลิลตร เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

หมายเหตุ กรองสารละลายด้วย Nylon membrane filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

รูป 2.3 การสกัดด้วยเทคนิคการสกัดแบบ HS-SPME

2.3.4 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME

ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME ได้แก่ ความเป็นกรด ของสารตัวอย่างและการเติมเกลือ

2.3.4.1 ความเป็นกรดของสารตัวอย่าง

เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 10 โมลาร์ ในน้ำตัวอย่าง ตามตาราง 2.2 เพื่อให้มีความเข้มข้นของกรด 0.005, 0.015, 0.05, 0.15, 0.5, และ 1.5 โมลาร์ ในน้ำตัวอย่าง จากนั้นทำการสกัดน้ำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิค HS-SPME ตามวิธีในหัวข้อ 2.3.3.2

ตาราง 2.2 การเตรียมน้ำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกต่างๆ

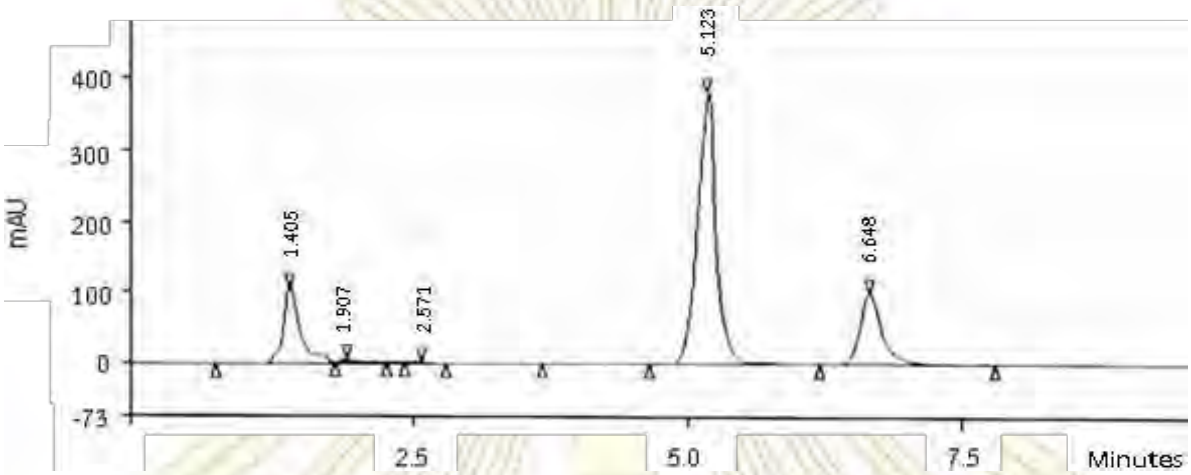
สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นกรดH_2SO_4ในน้ำตัวอย่าง (โมลาร์)	ปริมาตรสารละลายที่เติม (มิลลิลิตร)		
		stock solution กรดผสม ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร	กรดซัลฟิวริก 10 โมลาร์	น้ำ
1	0.005	5.0	0.025	45.0
2	0.015	5.0	0.075	45.0
3	0.05	5.0	0.250	45.0
4	0.15	5.0	0.750	45.0
5	0.5	5.0	2.50	45.0
6	1.5	5.0	7.50	45.0

2.3.4.2 การเติมเกลือ

เติมเกลือโซเดียมซัลเฟต 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 4.5 กรัม ในน้ำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME ตามวิธีในหัวข้อ 2.3.3.2

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

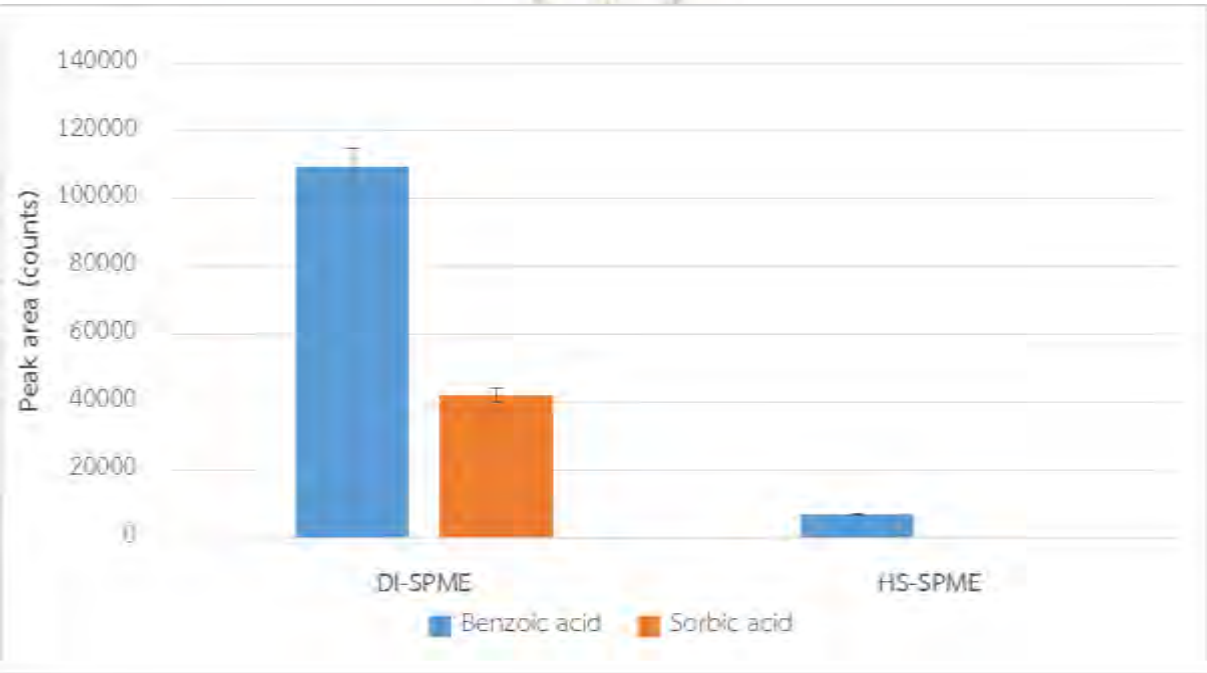
3.1 การวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกด้วยเทคนิค HPLC



รูป 3.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยเทคนิค HPLC ได้โครมาโทแกรมดังรูป 3.1 โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าพีคของกรดเบนโซอิก ขึ้นสัญญาณที่เวลา 5.123 นาที และกรดซอร์บิกขึ้นสัญญาณที่เวลา 6.648 นาที โดยพีคที่ให้สัญญาณที่เวลา 1.405 นั้น เป็นพีคของเฟสเคลื่อนที่ ทั้งนี้เนื่องจาก mobile phase ที่ใช้ คือ เมทานอล-แอมโมเนียม อะซิเตต บัฟเฟอร์ pH 4.4 (40:60) แต่ตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารคือ เมทานอล-น้ำ (40:60) จึงทำให้เกิดเป็นสัญญาณขึ้นได้

3.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดแบบ DI-SPME และการสกัดแบบ HS-SPME

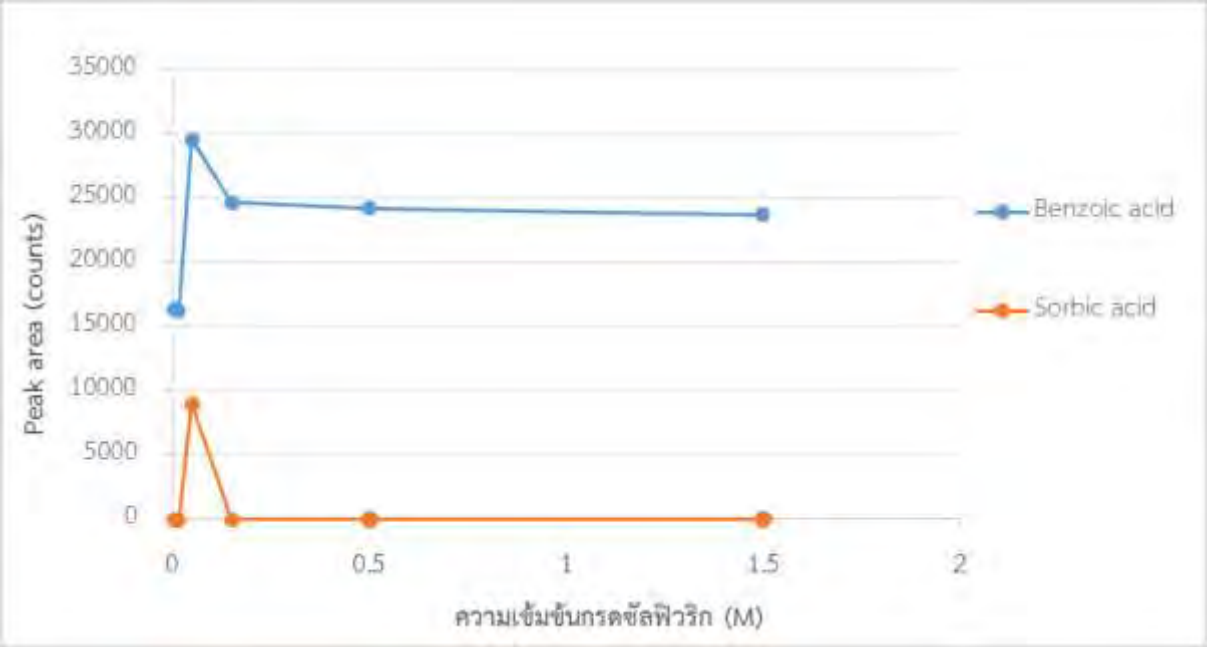


รูป 3.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดแบบ DI-SPME และการสกัดแบบ HS-SPME

รูป 3.2 เปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกจากการสกัดน้ำตัวอย่างด้วยเทคนิค DI-SPME และ HS-SPME โดยใช้เวลาในการสกัดเท่ากัน พบว่า DI-SPME สามารถสกัดทั้งกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกได้ แต่ HS-SPME สกัดกรดเบนโซอิกได้เพียงชนิดเดียว โดยพื้นที่ใต้พีคของสารโดยการสกัดแบบ DI-SPME มากกว่าการสกัดแบบ HS-SPME มาก แสดงว่าการสกัดแบบ DI-SPME มีประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่า ทั้งนี้ สารที่สนใจเป็นสารประกอบที่มีขั้วและละลายน้ำได้ดี ทำให้สารเกิดสมดุลอยู่ในชั้นน้ำมากกว่าชั้นเฮดสเปซ จึงไม่สามารถทำการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME ได้ นอกจากนี้ pH ของน้ำตัวอย่างมีค่าประมาณ 3.6 ดังนั้น สภาวะที่ใช้ในการสกัดอาจยังไม่เหมาะสม

อย่างไรก็ตามการสกัดแบบ DI-SPME เมทริกซ์ในสารละลายอาจก่อให้เกิดการรบกวนต่อการวิเคราะห์สารที่สนใจ เนื่องจาก SPME fiber สัมผัสกับสารตัวอย่างโดยตรง ดังนั้น สิ่งรบกวนสามารถถูกสกัดมาพร้อมสารที่สนใจได้ง่าย จากเหตุผลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดแบบ HS-SPME ต่อไป

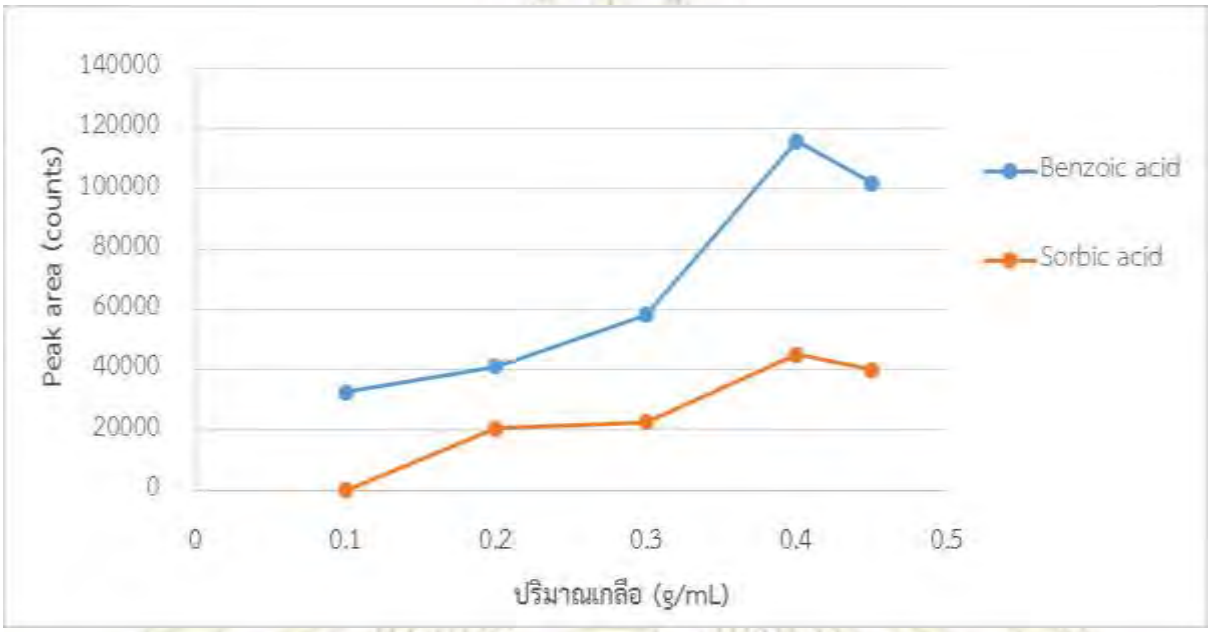
3.3 ผลของความเป็นกรดในสารละลายตัวอย่าง



รูป 3.3 ผลของความเป็นกรดต่อประสิทธิภาพการสกัดแบบ HS-SPME

จากการทดลอง สารละลายสารละลายก่อนเติมกรดซัลฟิวริก มี pH = 3.6 เมื่อมีการเติมกรดซัลฟิวริกลงในสารละลายมาตรฐาน ให้สารละลายมี pH เท่ากับ 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.0, และ -0.5 พบว่าการเติมกรด มีผลทำให้การสกัดแบบ HS-SPME มีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่เนื่องจากไม่สามารถวัดค่า pH ของสารละลายที่ต่ำกว่า pH = 0.0 ได้จึงทำการรายงานผลในรูปแบบของความเข้มข้นกรด โดยความเข้มข้นของกรดที่ทำให้ประสิทธิภาพการสกัดมีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.05 โมลาร์ หรือสารละลายมีค่า pH เท่ากับ 1 เนื่องจากในสภาวะที่สารละลายเป็นกรด ทำให้กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว ซึ่งเป็นรูปที่สารจะแสดงคุณสมบัติของสารกึ่งระเหยได้ดี ทำให้สามารถแพร่ไปสู่บริเวณเฮดสเปซได้มาก ด้วยเหตุนี้ประสิทธิภาพการสกัดจึงมีค่าเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เสถียรภาพของสารที่สนใจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ pH และแสง ดังนั้น เมื่อสารละลายมีความเป็นกรดมากเกิน อาจมีผลทำให้สารที่สนใจเกิดการออกซิไดซ์และสลายตัวเป็นสารอื่นได้ เช่น อะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde), เบต้าคาร์บอซิลอะโครลีน (β-carboxylacrolein), และ 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราโซน (2,4-dinitrophenyl hydrazones, DNPHs) (30-32) ด้วยเหตุนี้จึงอาจก่อให้เกิดการสูญเสียสารที่สนใจ ประสิทธิภาพการสกัดจึงมีค่าลดลง ดังที่แสดงในรูป 3.3 สำหรับกรดซอร์บิกนั้น จากกราฟจะเห็นว่ามีเพียงจุดเดียวที่เห็นพีคปรากฏออกมา ซึ่งเป็นความเข้มข้นกรดที่เหมาะสมในการใช้สกัด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเส้นใยที่ใช้นั้นเป็นเส้นใยประเภทมีขั้ว ซึ่งซอร์บิกเป็นสารประกอบที่มีขั้วต่ำ และต่ำกว่ากรดเบนโซอิก ดังนั้นเส้นใยที่ใช้อาจเหมาะกับการสกัดกรดเบนโซอิกมากกว่ากรดซอร์บิก

3.4 ผลของการเติมเกลือ



รูป 3.4 ผลของเกลือต่อประสิทธิภาพการสกัดแบบ HS-SPME

จากการทดลองพบว่าเมื่อมีการเติมเกลือโซเดียมซัลเฟตลงในสารละลายตัวอย่าง มีผลทำให้การสกัดแบบ HS-SPME มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยปริมาณเกลือที่ทำให้ประสิทธิภาพการสกัดมีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากการเติมเกลือมีผลทำให้ค่า ionic strength ของน้ำมีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้สารที่สนใจละลายในน้ำได้น้อยลงและแพร่มาอยู่ในชั้นเฮดสเปซเพิ่มขึ้น จึงสามารถสกัดสารได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการเติมเกลือมากเกินไป จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง เนื่องจากสารละลายเกิดการอิ่มตัว ทำให้เกลือที่เติมลงไปนั้นละลายได้ไม่หมด ซึ่งอาจมีผลในการขัดขวางการแพร่ของสารที่สนใจจากสารละลายไปสู่บริเวณเฮดสเปซ *(8)*

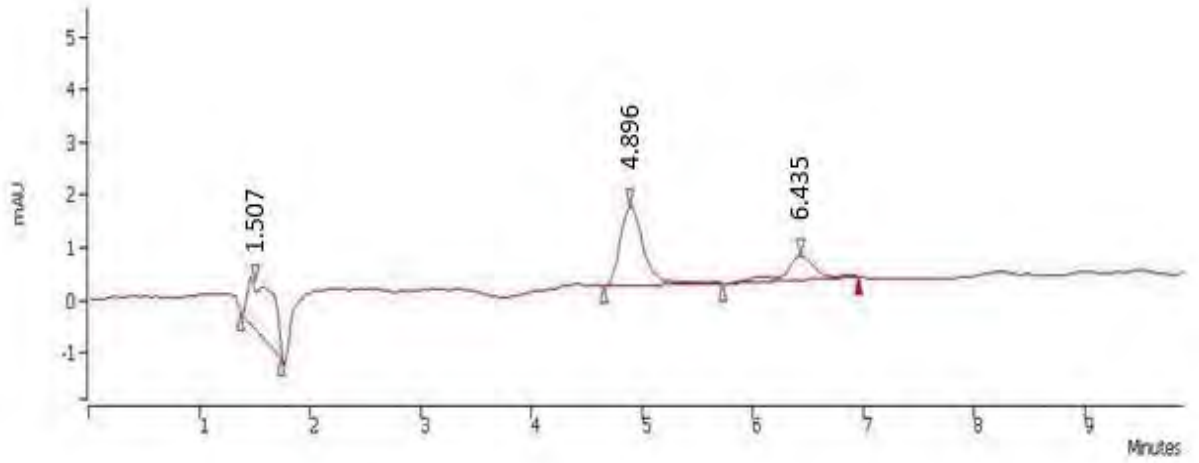
3.5 ประสิทธิภาพการสกัด

จากการศึกษาสภาวะการสกัดแบบ HS-SPME พบว่าสภาวะการสกัดกรดซอร์บิก และกรดเบนโซอิก ที่ให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สูงสุด เป็นดังตาราง 3.1

ตาราง 3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดซอร์บิกและกรดเบนโซอิกด้วยเทคนิค HS-SPME

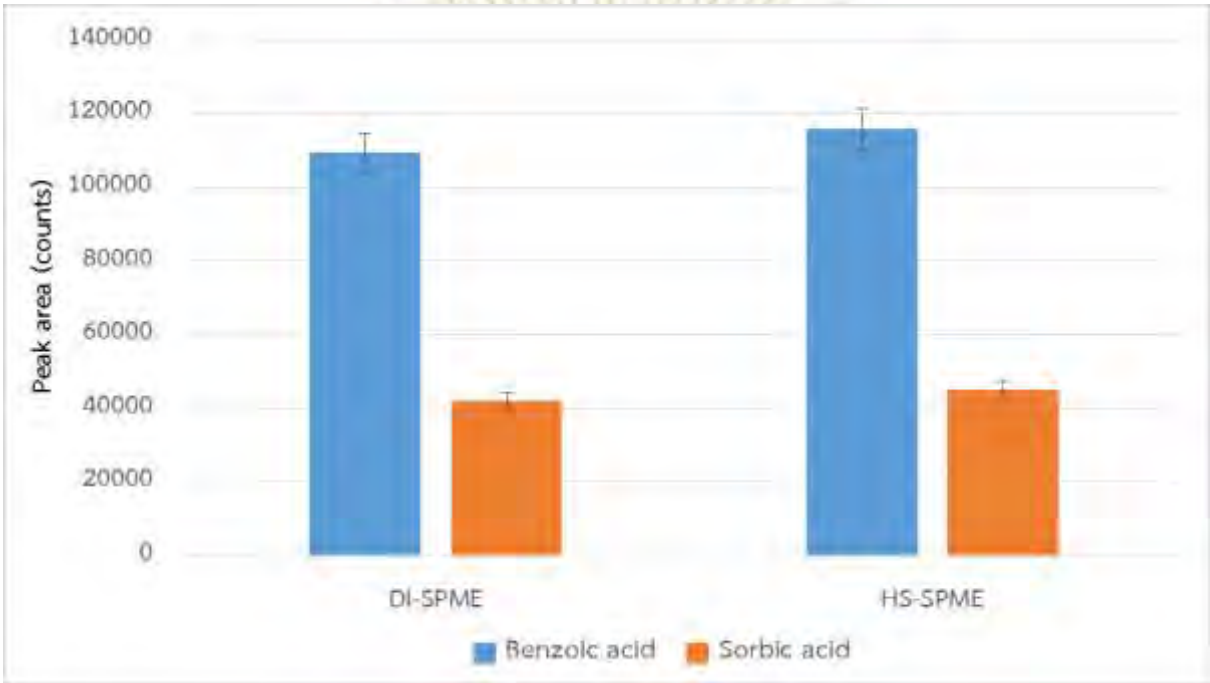
ปริมาตรสารตัวอย่าง	10 มิลลิลิตร
ความเป็นกรด-เบสของสารตัวอย่าง	ใน 0.05 โมลาร์ H_2SO_4
ปริมาณเกลือ Na_2SO_4 ที่เติม	0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร
อุณหภูมิในการสกัด	50 องศาเซลเซียส
เวลาที่ใช้ในการสกัด	40 นาที
ตัวทำละลายสำหรับชะ	เมทานอล-น้ำ (40:60)
ปริมาตรตัวชะ	1 มิลลิลิตร

จากสภาวะการสกัดข้างต้น เมื่อทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าพีคของกรดเบนโซอิก ขึ้นสัญญาณที่เวลา 4.896 นาที และกรดซอร์บิกขึ้นสัญญาณที่เวลา 6.435 นาที ดังรูป 3.5



รูป 3.5 โครมาโทแกรมจากการสกัดสารละลายมาตรฐาน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีการเติมกรดให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และเติมเกลือ 0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค HS-SPME

เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้พีคจากการสกัดของสารละลายมาตรฐาน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีการเติมกรดให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และเติมเกลือ 0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค HS-SPME มาเปรียบเทียบกับเทคนิคการสกัดแบบ DI-SPME พบว่าการสกัดทั้ง 2 เทคนิค ให้ประสิทธิภาพการสกัดใกล้เคียงกัน ดังรูป 3.6



รูป 3.6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างการสกัดแบบ DI-SPME ในสารละลายที่ไม่มีการเติมกรดและเกลือ กับการสกัดแบบ HS-SPME ในสารละลายที่มีการเติมกรดและเกลือ

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์กรดซอร์บิก และกรดเบนโซอิก โดยทำการสกัดกรดทั้งสองผ่านเทคนิค SPME และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เมื่อเปรียบเทียบเทคนิคการสกัดแบบ DI-SPME และ HS-SPME พบว่า เมื่อทำการสกัดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร 10 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคการสกัดแบบ DI-SPME ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที ชะด้วยสารละลายผสมเมทานอล-น้ำ (40:60) 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าการสกัดผ่านเทคนิค HS-SPME ที่อุณหภูมิ 50 องศาสเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ชะด้วยสารละลายผสมเมทานอล-น้ำ (40:60) 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที อย่างไรก็ตามการนำเทคนิคการสกัดแบบ DI-SPME ไปสกัดสารตัวอย่างจริง อาจทำให้การวิเคราะห์ถูกรบกวนจากสิ่งเจือปนสูง ดังนั้นจึงทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดด้วยเทคนิค HS-SPME โดยปัจจัยที่ศึกษา คือ การเติมกรดซัลฟิวริก *(1)* เนื่องจากการเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นสูงลงในสารละลาย จะเกิดการดูดซับน้ำทำให้สารที่สนใจเป็นอิสระจากน้ำได้ง่ายขึ้นเมื่อเทียบกับกรดชนิดอื่น และการเติมเกลือโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส *(1)* เนื่องจากมีค่าความแรงของไอออนิกมาก เมื่อเทียบกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่นิยมใช้ในการทดลอง จึงมีโอกาสที่จะทำให้สารที่สนใจแยกเป็นอิสระจากน้ำได้มากขึ้น จากการศึกษาพบว่าปัจจัยทั้งสองมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด เมื่อสารละลายถูกปรับให้มีความเข้มข้นกรดสุดท้าย เท่ากับ 0.05 โมลาร์ และมีการเติมเกลือ 0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด โดยให้ค่าพื้นที่ใต้พีคของกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก เท่ากับ 115,775.0 และ 45,134.0 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการสกัดด้วยเทคนิค DI-SPME ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สภาวะการสกัดกรดซอร์บิก และกรดเบนโซอิก ด้วยเทคนิค HS-SPME ที่ให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สูงสุด เป็นดังตาราง 3.1

เนื่องด้วยระยะเวลาในการทำวิจัย รวมถึงปัญหาต่างๆที่เกิดในขึ้นระหว่างการทดลอง ทั้งในเรื่องของเครื่องมือ สารเคมี และการทดลองที่ผิดพลาด จึงทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดแบบ HS-SPME ได้ครบ รวมถึงไม่สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ที่ได้ไปใช้กับสารตัวอย่างจริง เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดเพิ่มเติม เช่น เส้นใยที่ใช้ในการสกัด อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด เวลาที่ใช้ในการสกัด ปริมาณสารละลายที่ใช้ชะ และเวลาในการชะสารที่สนใจ เป็นต้น คสรมีการใช้อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด เพื่อควบคุมหรือลดความผิดพลาดในกระบวนการเตรียม และการทดสอบ นอกจากนี้ควรมีการนำสภาวะการสกัดที่เหมาะสมไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิก และกรดเบนโซอิกในสารตัวอย่าง เพื่อยืนยันว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้หาปริมาณสารที่สนใจได้จริง รวมถึงทำการศึกษาสิ่งเจือปนที่อาจปนอยู่ตัวอย่างจริงซึ่งอาจรบกวนการวิเคราะห์

บรรณานุกรม

1. Dong, C.; Wang, W., Headspace Solid-Phase Microextraction Applied to the Simultaneous Determination of Sorbic and Benzoic Acids in Beverages. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *562*, 23-29.
2. Ding, M.; Peng, J.; Ma S.; Zhang Y., An Environment-Friendly Procedure for the High Performance Liquid Chromatography Determination of Benzoic acid and Sorbic Acid in Soy Sauce. *Food Chem.* **2015**, *183*, 26-29.
3. Gomaa, A.M.; Amer, M.E.; Attallah, E.R.; Elhassan, A.F.A., Validation of Analytical Method for Determination of Sorbic Acid and Benzoic Acid in Juices and Carbonated Beverages. *J*. appl. sci. res. **2013**, *9(3)*, 1472-1476.
4. Thomassin, M.; Cavalli, E.; Guillaume, Y.; Guinchard C., Comparison of Quantitative High Performance Thin Layer Chromatography and the High Performance Liquid Chromatography of Parabens. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **1997**, *15*, 831-838.
5. Frazier, A.R.; Inns, L.E.; Dossi, N.; Ames M.J.; Nursten E.H., Development of A Capillary Electrophoresis Eethod for the Simultaneous Analysis of Artificial Sweeteners, Preservatives and Colours in Soft Drinks. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *876*, 213-220.
6. Wei, R.; Li, W.; Yang,L.; Jiang, Y.; Xie, T., Online Preconcentration in Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection for Sensitive Determination of Sorbic and Benzoic Acids in Soy Sauce *Talanta*. **2011**, *83*, 1487-1490.
7. Wang, L.; Zhang, X.; Wang, Y.; Wang, W., Simultaneous Determination of Preservatives in Soft Drinks, Yogurts and Sauces by A Novel Solid-Phase Extraction Element and Thermal Desorption-Gas Chromatography. *Anal. Chim. Acta*. **2006**, *577*, 62-67.
8. Dong, C.; Mei, Y.; Chen, L., Simultaneous Determination of Sorbic and Benzoic Acids in Food Dressing by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography. *J. Chromatogr. A*. **2006**, *1117*, 109-114.
9. Saad, B.; Bari, Md.F.; Saleh, M.I.; Ahmad, K.; Talib, M.K.M., Simultaneous Determination of Preservatives (Benzoic Acid, Sorbic Acid, Methylparaben and Propylparaben) in Foodstuffs Using High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*. **2005**, *1073*, 393-397.
10. Faraji, M.; Rahbarzare, F., Simultaneous Determination of Four Preservatives in Foodstuffs by High Performance Liquid Chromatography. *Nutr. Food Sci. Res*. **2016**, *3*, 43-50.
11. Mota, J.M.F.; Ferreira, M.P.L.V.O.I.; Cunha C.S.; Beatriz, M.; Oliveira, P.P., Optimisation of Extraction Procedures for Analysis of Benzoic and Sorbic Acids in Foodstuffs. *Food Chem*. **2003**, *82*, 469-473.

12. Guarino, C.; Fuselli, F.; Mantia, A.L.; Longo, L., Development of an RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Benzoic Acid, Sorbic Acid, Natamycin and Lysozyme in Hard and Pasta Filata Cheeses. *Food Chem*. **2011**, *127*, 1294-1299.

13. Abedi, A.S.; Mohammadi, A.; Azadniya, E.; Mortazavian, A.M.; Khaksar R., Simultaneous Determination of Sorbic and Benzoic Acids in Milk Products Using an Optimized Microextraction Technique Followed by Gas Chromatography. *Food Addit. Contam*. **2014**, *31*, 21-28.

14. Ferreira, M.P.L.V.O.I.; Mendes, E.; Brito, P.; Ferreira A.M., Simultaneous Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Quince Jam by HPLC. *Food Res. Int*. **2000**, *33*, 113-117.

15. Gonzalez, M.; Gallego, M.; Valcarcel M., Simultaneous Gas Chromatographic Determination of Food Preservatives Following Solid-Phase Extraction. *J. Chromatogr. A.* **1998**, *823*, 321-329.

16. Techakriengkrai, I.; Surakarnkul, R., Analysis of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Thai Rice Wines and Distillates by Solid-Phase Sorbent Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *J. Food Comp. Anal*. **2007**, *20*, 220-225.

17. Mikami, E.; Goto, T.; Ohno, T.; Matsumoto, H.; Nishida M., Simultaneous Analysis of Dehydroacetic Acid, Benzoic Acid, Sorbic Acid and Salicylic Acid in Cosmetic Products by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2002**, *28*, 261-267.

18. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzoic_acid#section=CERCLA-Reportable-Quantities (accessed Nov 16, 2004).

19. http://www.benzoicacid.net/benzoic-acid-polarity.html/ (accessed Aug 14, 2012).

20. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sorbic_acid#section=Regulatory-Information (accessed Mar 25, 2005).

21. Dharmadhikari, M. Sorbic Acid. Vineyard & Winery Management Magazine; E St.; Santa Rosa: USA, 1992; Vol. 7(6); p 1-5.

22. http://www.scimath.org/socialnetwork/groups/viewbulletin/217-13?groupid=35 (accessed Mar 12, 2011)

23. http://share.psu.ac.th/blog/science-equipment/14704 (accessed Dec 3, 2009)

24. http://www.sigmaaldrich.com/video/analytical/spme-direct-immersion-sampling.html (accessed Oct 23, 2014)

25 Santa, J.R.; Serrano, M.; Stashenko, Y,E. Analysis Comparativo de Diferentes Methodos de Extraccion de Hidrocarburos Presentes en Aguas Residuales Industraiales. C.T.F Cienc. Tecnol. Futuro. **2002**, *2*, 49-60

26. Vas, G.; Vekey, K. Solid-Phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis. *J. Mass Spectrom*. **2004**, *39*, 233–254.

27. Zhang, Q.H.; Zhou, L.D.; Chena, H.; Wang, C.Z.; Xia, Z.N.; Yuan, C.S., Solid-Phase Microextraction Technology for In Vitro and In Vivo Metabolite Analysis. *TrAC, Trends Anal. Chem*. **2016**, *80*, 57-65.

28. http://share.psu.ac.th/blog/sci-discus/17227 (accessed Aug 23, 2010)

29 Soso, S.B.; Koziel, J.A; Johnson, A. Lee, Y.J.; Fairbanks, W.S. Analytical Methods for Chemical and Sensory Characterization of Scent-Markings in Large Wild Mammals: A Review. *Sensors* **2014**, *14*, 4428-4465.

30. Naidu, A.S. Natural Food Antimicrobial Systems.; Boca Raton London New York Washington, D.C., 2000; p 640.

31. Arya, S.S.; Thakur, B.R. Degradation Products of Sorbic Acid in Aqueous Solutions. *Food Chem*. **1988**, *29*, 41-49.

32. Thakur, B.R.; Singh, R.K.; Arya, S.S. Chemistry of Sorbates - A bBasic Perspective. *FOOD REV INT*. **1994**, *10*, 71-91.

ภาคผนวก

ตาราง 1 เปรียบเทียบการสกัดแบบ DI-SPME กับ HS-SPME

รูปแบบการสกัด	พื้นที่ใต้พีก (counts)							
	กรดเบนโซอิก				กรดซอร์บิก			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
DI-SPME*	153,515	100,6720	73,904	109,363.7	66,306	42,0480	17,9760	42,110.0
HS-SPME**	0	0	20,555	6,851.7	0	0	0	0.0

* เส้นใยที่ใช้สกัด PA ที่อุณหภูมิห้อง, เวลาในการสกัด 40 นาที, ปริมาตรสารละลายสำหรับชะ (40% เมทานอล : น้ำ) 1 มิลลิลิตร, เวลาที่ใช้ในการชะ 5 นาที

** เส้นใยที่ใช้สกัด PA, อุณหภูมิการสกัด 50 องศาเซลเซียส, เวลาในการสกัด 40 นาที, ปริมาตรสารละลายสำหรับชะ: (40 เมทานอล 60 น้ำ) 1 มิลลิลิตร, เวลาที่ใช้ในการชะ 5 นาที

หมายเหตุ

สภาวะการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC : mobile phase คือ 40% เมทานอล : 60% น้ำ, อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที, ความยาวคลื่น = 235 นาโนเมตร, เวลา = 10 นาที

ตาราง 2 ผลการสกัดแบบ HS-SPME เมื่อมีความเข้มข้นกรดต่างๆ

ความเข้มข้นกรด (โมลาร์)	พื้นที่ใต้พีก (counts)							
	กรดเบนโซอิก				กรดซอร์บิก			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0.005	24,137	11,399	13,608	16381.3	0	0	0	0.0
0.015	24,282	0	24,446	16242.7	0	0	0	0.0
0.05	20,156	31,329	37,259	29581.3	7497	19382	0	8959.7
0.15	25,142	25,307	23,473	24640.7	0	0	0	0.0
0.5	24,770	24,209	23,617	24198.7	0	0	0	0.0
1.5	24,723	20,643	25,833	23733.0	0	0	0	0.0

หมายเหตุ

สภาวะการสกัด : เส้นใยที่ใช้สกัด PA, เติมกรดซัลฟิวริกให้ได้กรดเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิการสกัด 50 °C, เวลาในการสกัด 40 นาที, ปริมาตรสารละลายสำหรับชะ (40% เมทานอล : 60% น้ำ) 1 1,มิลลิลิตร, เวลาที่ใช้ในการชะ 5 นาที

สภาวะการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC : mobile phase คือ 40% เมทานอล : 60% น้ำ, อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที, ความยาวคลื่น = 235 นาโนเมตร, เวลา = 10 นาที

ตาราง 3 ผลการสกัดแบบ HS-SPME เมื่อมีความเข้มข้นกรด 0.05 M และเติมเกลือปริมาณต่างๆ

ปริมาณ Na_2SO_4 (กรัมต่อมิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้พีก (counts)							
	กรดเบนโซอิก				กรดซอร์บิก			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0.1	34,746	36,181	27,057	32,661.3	0	0	0	0.0
0.2	34,437	39,314	49,926	41,225.7	13,350	20,074	27,937	20,453.7
0.3	45,735	60,659	68,254	58,216.0	20,315	22,306	25,275	22,632.0
0.4	112,218	120,115	114,992	115,775.0	42,222	49,738	43,442	45,134.0
0.45	100,658	93,181	111.974	101,937.7	38,944	43,675	37,042	39,887.0

หมายเหตุ

สภาวะการสกัด : เส้นใยที่ใช้สกัด PA, เติมกรดซัลฟิวริกให้ได้กรดเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิการสกัด 50 °C, เวลาในการสกัด 40 นาที, ปริมาตรสารละลายสำหรับชะ (40% เมทานอล : 60% น้ำ) 1 1,มิลลิตร, เวลาที่ใช้ในการชะ 5 นาที

สภาวะการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC : mobile phase คือ 40% เมทานอล : 60% น้ำ, อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที, ความยาวคลื่น = 235 นาโนเมตร, เวลา = 10 นาที

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวกรรณิการ์ ธรรมาภิมุข เกิดเมื่อวันที่ 11 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดสมุทรสงคราม สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนถาวรานุกูล จังหวัดสมุทรสงคราม เมื่อปีการศึกษา 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 149/7 ตำบลแม่กลอง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม รหัสไปรษณีย์ 75000 อีเมล th.kannikar@gmail.com