



## Research Article

# การหาปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในตัวอย่างสลัดครีมและมายองเนสโดยใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคที่เหมาะสมร่วมกับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

## Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Salad Cream and Mayonnaise Samples Using Optimized Microextraction Followed by High Performance Liquid Chromatography

พิมพ์พิมล พุกพัทธารนต์<sup>a\*</sup>, นิวรรณ แท่นมณี<sup>b</sup> และ จันทน์ผา ตันธนา<sup>b</sup>

Pimpimol Phukpattaranont<sup>a\*</sup>, Niwan Tanmanee<sup>b</sup> and Chanpa Tanthana<sup>b</sup>

<sup>a</sup> สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

<sup>a</sup> Office of Scientific Instrument and Testing, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90110, Thailand.

<sup>b</sup> คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

<sup>b</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90110, Thailand.

### ABSTRACT

#### Article history:

Received: 2023-07-25

Revised: 2024-01-09

Accepted: 2024-03-22

#### Keywords:

high performance liquid;

chromatography;

Benzoic acid;

Sorbic acid;

fat content in food matrix

This research has developed an analytical method for simultaneously determining two preservatives, namely benzoic acid and sorbic acid, in salad cream and mayonnaise by high performance liquid chromatography (HPLC). The chromatographic separation was performed on a Hypersil GOLD (5 micrometers, ID 4.6 mm, length 150 mm) column with gradient elution of 0.02 M aqueous KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5) and acetonitrile with a 1.0 mL/min flow rate and UV detection at 220 nm. For both benzoic acid and sorbic acid, the limit of quantification (LOQ) was 0.02 mg/L, whereas the limits of detection (LOD) were 0.007 and 0.006 mg/L, respectively. Excellent linearity ( $R^2 > 0.9997$ ) was obtained over the concentration range of 0.02-100 mg/L. The high accuracy of two compounds was presented by % recovery. While the % recovery of benzoic acid and sorbic acid in the salad cream sample was in the range of 89.6–99.4% and 90.6–98.3%, respectively, the % recovery of benzoic acid and sorbic acid in the mayonnaise sample was in the range of 99.4–104.3% and 101.3–103.9%, respectively. For benzoic acid and sorbic acid in salad cream samples, the repeatability (intra-day) values were 0.1%, and the intermediate precision (in 3 days) values were 0.2%. In addition, benzoic acid and sorbic acid in mayonnaise samples had repeatability (intra-day) values of 0.1% and intermediate precision (in 3 days) values of 0.2%. For the sample preparation method, the study indicates that dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) can reduce matrix interferences better than liquid-liquid extraction (LLE) does. The matrix effect evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) from DLLME was significantly different at the 95% confidence level compared with that from LLE. The advantages of DLLME also include environmental friendliness by reducing the amount of organic solvent used, simple extraction, low cost, and time efficiency.

© 2025 Phukpattaranont, P., Tanmanee, N. and Tanthana, C. Recent Science and Technology published by Rajamangala University of Technology Srivijaya

\* Corresponding author.

E-mail address: [ppimpimo@yahoo.com](mailto:ppimpimo@yahoo.com)

#### Cite this article as:

Phukpattaranont, P., Tanmanee, N. and Tanthana, C. 2025. Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Salad Cream and Mayonnaise Samples Using Optimized Microextraction Followed by High Performance Liquid Chromatography. **Recent Science and Technology** 17(1): 259873.

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการทดสอบวัตถุกันเสียสองชนิดในคราวเดียวกัน ได้แก่ กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ที่มีอยู่ในสลัตครีมและมายองเนสด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดยูวีวิชันเบิล ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร คอลัมน์รีเวิร์สเฟสที่ใช้แยกคือ Hypersil GOLD ความยาว 150 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร และขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ผสมระหว่างสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ในน้ำ (pH 5) และอะซิโตนในไตรล อัตรการไหลเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิตรต่อนาทีในสภาวะกราเดียนท์ วิธีดังกล่าวมีขีดจำกัดในการตรวจพบสำหรับกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก คือ 0.007 และ 0.006 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณสำหรับกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกมีค่าเท่ากัน คือ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงการตอบสนองความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.02-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า  $R^2$  มากกว่า 0.9997 มีความแม่นยำแสดงด้วยค่าร้อยละการคืนกลับโดยกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในตัวอย่างสลัตครีมอยู่ในช่วง 89.6-99.4% และ 90.6-98.3% และในตัวอย่างมายองเนสอยู่ในช่วง 99.4-104.3% และ 101.3-103.9% ตามลำดับ และความเที่ยงพิจารณา Repeatability (intra-day) และ Intermediate precision (in 3 days) แสดงด้วยค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยค่า Repeatability (intra-day) ของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในตัวอย่างสลัตครีม คือ 0.1 % และค่า Intermediate precision (in 3 days) ของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในตัวอย่างสลัตครีม คือ 0.2 % ค่า Repeatability (intra-day) ของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในตัวอย่างมายองเนส คือ 0.1 % และค่า Intermediate precision (in 3 days) ของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในตัวอย่างมายองเนส คือ 0.2 % การศึกษาพบว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย (DLLME) สามารถลดผลรบกวน Matrix effect ได้ดีกว่าเทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของเหลว (LLE) จากการเปรียบเทียบค่าทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % คุณสมบัติอื่น ๆ ของเทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายยังรวมถึงการมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมโดยการลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ มีขั้นตอนการสกัดง่าย ราคาถูกและใช้เวลาน้อย

**คำสำคัญ:** โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, กรดเบนโซอิก, กรดซอร์บิก, อาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ

## 1. บทนำ

วัตถุเจือปนอาหารใช้เพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต การแต่งสีอาหาร การปรุงแต่งกลิ่นรส การบรรจุ การเก็บรักษา และการขนส่ง จากประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2) (Notification of the Ministry of Public Health (No. 418), 2020) กำหนดให้ต้องใช้วัตถุเจือปนอาหาร หมดหรือชนิดอาหารและปริมาณสูงสุดที่อนุญาตตามที่กำหนดไว้ ซึ่งปริมาณดังกล่าวสอดคล้องกับปริมาณที่คณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission; Codex) อนุญาตให้นำมาใช้ในการผลิตอาหารได้ เพราะผ่านการประเมินความปลอดภัยทางพิษวิทยาแล้วว่าเป็นพิษต่ำ โดย The Joint FAO/ WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA) ได้กำหนดค่าความปลอดภัยไว้เป็นค่า Acceptable Daily Intake (ADI) ซึ่งเป็นปริมาณที่ร่างกายสามารถได้รับสารนั้นต่อวันโดยไม่ก่อให้เกิดผลกระทบใด ๆ ต่อสุขภาพ (WHO, 2000) จากประกาศกระทรวงสาธารณสุขดังกล่าวทำให้ผู้ผลิตด้านอาหารต้องตรวจสอบวัตถุกันเสีย ในส่วนการให้บริการทดสอบวัตถุกันเสียของ

สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบได้เปิดให้บริการแล้วในตัวอย่างอาหาร 3 ประเภท คือ ลูกชิ้น ชอส แป้งและเส้นก๋วยเตี๋ยว (Office of Scientific Instrument and Testing, 2023) ขณะเดียวกันมีผู้ประกอบการด้านอาหารให้ความสนใจทดสอบวัตถุกันเสียในอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบจึงเป็นที่มาของการพัฒนาวิธีการสกัดและทดสอบวัตถุกันเสียในอาหารดังกล่าว ได้แก่ สลัตครีมและมายองเนส

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาสารมาตรฐานวัตถุกันเสีย 2 ชนิด ได้แก่ กรดเบนโซอิก (Benzoic acid) กรดซอร์บิก (Sorbic acid) ในการหาปริมาณของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกด้วยวิธีการมาตรฐาน AOAC (1990) พบว่ามีความยุ่งยากในขั้นตอนของการสกัดและสันเป็ลียงสารเคมีต่าง ๆ เพราะใช้ปริมาณมาก ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคของแก๊สโครมาโทกราฟีมาใช้ ซึ่งพบว่าการหาปริมาณของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกด้วยวิธีการนี้มีความไว มีความจำเพาะเจาะจงและมีความถูกต้องสูง (Ferreira *et al.*, 2000) แต่ก็มีข้อเสียคือ ต้องใช้เวลานานในการสกัดและการเตรียมตัวอย่าง อีกทั้งจะต้องเตรียมสารอนุพันธ์ของกรดด้วย (Ferreira *et al.*, 2000) เพื่อเป็นการแก้ไขข้อเสียดังกล่าวจึงได้มีการนำเทคนิค

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมาใช้แล้วพบว่าเป็นวิธีการที่ดีกว่าในเรื่องของเวลาในการเตรียมตัวอย่างที่สั้นลง (Ali, 1985) และไม่จำเป็นต้องเตรียมสารอนุพันธ์ (Ferreira *et al.*, 2000)

ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจะต้องมีการเตรียมสารตัวอย่าง ซึ่งวิธีการดั้งเดิมมี 2 วิธี คือ วิธีการสกัดด้วยเฟสของเหลว (Liquid-liquid extraction) และวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid-phase extraction) วิธีการสกัดด้วยเฟสของเหลวเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกและการเพิ่มความเข้มข้น (Mota *et al.*, 2003) แต่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากและมีหลายขั้นตอน เช่น Gören *et al.* (2015) สกัดซอสมะเขือเทศ 20 กรัม ต้องใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตและอะซิโตนไตรล์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) เป็นระยะเวลา 5 นาทีและสกัดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิก (Ultrasonic extraction) เป็นระยะเวลา 3 นาที ขณะที่ Fuselli *et al.* (2012) ผสมเนยแข็ง 2 กรัมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่างสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์และสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์และเมทานอลปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นใช้เครื่องปั่นสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer) เป็นระยะเวลา 1 นาที สกัดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิกและปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนระยะเวลา 10 นาที ส่วนการสกัดด้วยเฟสของแข็งในอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบนั้น พบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกและการเพิ่มความเข้มข้น (Mota *et al.*, 2003) แต่เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง ต้องเลือกวัสดุเฟสของแข็งให้เหมาะสม (Techakriengkrai and Surakamkul, 2007) และมีค่าใช้จ่ายสูง (Saad *et al.*, 2005) โดยสรุปข้อเสียของเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลวต้องใช้สารเคมีปริมาณมากส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการกำจัดและข้อเสียของเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งมีค่าใช้จ่ายสูง

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักที่จะกำจัดข้อเสียเหล่านี้ โดยเทคนิคที่เลือก คือ การสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย (Dispersive liquid - liquid microextraction, DLLME) ซึ่งเป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างทางเคมีวิเคราะห์ที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมโดยการลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ มีขั้นตอนการสกัดง่ายราคาถูก (Navakhun, 2015) และใช้เวลาน้อย (Mazloomifar and Shiekhi, 2015) และจะทำการศึกษากลุ่มอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ สลัดครีมและมายองเนส โดยมีขั้นตอนการกำจัดไขมันร่วมด้วย

นอกจากนี้งานวิจัยทำการเปรียบเทียบการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายกับเทคนิคการสกัดดั้งเดิม คือ เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลว ก่อนจะทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อให้เห็นถึงข้อดีต่าง ๆ ของการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายดังที่ได้กล่าวไว้ด้วย

## 2. วิธีดำเนินการวิจัย

### 2.1 สารเคมี

สารมาตรฐานวัตถุกันเสีย 2 ชนิด ได้แก่ กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก (AR grade) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา เตรียมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิดหนัก 10 มิลลิกรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานนี้ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายที่นำไปใช้ (working standard solution) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งจะเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

สารเคมีอื่น ๆ ได้แก่ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมอะซิเตต สารประกอบซิงค์แอสซีเตต ไดไฮเดรต (Carrez I) และสารประกอบโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์ (Carrez II) เป็นประเภทสำหรับงานวิเคราะห์ทางเคมี (AR grade) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับตัวทำละลายอะซิโตนไตรล์ เมทานอล เป็นประเภทสำหรับงานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC grade) จากบริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา และใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนสำหรับการเตรียมสารละลายทุกครั้ง

### 2.2 เครื่องมือและสภาวะของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ในการวิเคราะห์ใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของบริษัท Agilent รุ่น 1200 ร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดยูวี-วิสิเบิล ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร คอลัมน์รีเวิร์สเฟสที่ใช้แยกคือ Hypersil GOLD ความยาว 150 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตรและขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เฟสเคลื่อนที่ผสม 2 ส่วน ได้แก่ เฟสเคลื่อนที่ที่ 1 คือสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ในน้ำ (pH 5) และเฟสเคลื่อนที่ที่ 2 คืออะซิโตนไตรล์

ใช้สภาวะการแยกดังนี้ เวลาเริ่มต้น สัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่ 1 สัดส่วน 85% และเฟสเคลื่อนที่ที่ 2 สัดส่วน 15% คงที่ 3 นาที เวลาที่ 7.5 นาที เฟสเคลื่อนที่ที่ 1 สัดส่วน 35% และเฟสเคลื่อนที่ที่ 2 สัดส่วน 65% คงที่ 2.5 นาที เวลาที่ 13.0 นาที เฟสเคลื่อนที่ที่ 1 สัดส่วน 85% และเฟสเคลื่อนที่ที่ 2 สัดส่วน 15% คงที่ 2 นาที รวมระยะเวลา 15 นาที ปริมาตรตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร

### 2.3 การเตรียมตัวอย่าง

#### 2.3.1 การสกัดด้วยเฟสของเหลว

ใช้กระบวนการสกัดที่ดัดแปลงมาจากงานวิจัยที่นำเสนอโดย Mota *et al.* (2003) ดังมีรายละเอียดดังนี้ นำตัวอย่างสลัดครีมหรือมายองเนสน้ำหนัก 0.1 กรัม เจือจางด้วยตัวทำละลายเฮกเซนปริมาตร 2 มิลลิลิตร สกัดด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ (pH 4.4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วจึงปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และกรองด้วยเมมเบรน 0.22 ไมโครเมตร แล้วทำการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.3.2 การสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย ประกอบด้วยรายละเอียด 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการกำจัดไขมัน นำตัวอย่างสลัดครีมหรือมายองเนสน้ำหนัก 0.1 กรัม ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมน้ำสารประกอบสารประกอบซิงค์แอสซิเตตไดไฮเดรตและสารประกอบโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์ ปรับปริมาตร

ให้ได้ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายส่วนใสด้านบน นำสารละลายส่วนใสที่ได้สกัดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 ขั้นตอนการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรปรับ pH 4 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก 0.7 โมลาร์ เติมน้ำโซเดียมคลอไรด์ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เติมน้ำทำละลายสกัด (ไดคลอโรมีเทนปริมาตร) และตัวทำละลายช่วยกระจายผสมให้เข้ากันทันทีด้วย Vortex mixer ระยะเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเฟสที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 10 นาที ขั้นตอนนี้ชั้นของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายช่วยกระจายเกิดการแยกชั้นอยู่ส่วนบนของสารสกัด (ชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์) นำเฉพาะชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่แยกชั้นส่วนบนระเหยด้วยแก๊สไนโตรเจน และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกรองด้วยเมมเบรน 0.22 ไมโครเมตร แล้วทำการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

ประสิทธิภาพการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย พิจารณาได้จากค่าการเพิ่มความเข้มข้น (enrichment factor, EF) และค่าร้อยละการคืนกลับของการสกัด (extraction recovery, ER) ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ (Rezaee *et al.*, 2006) ถ้าค่า EF และ ER มีค่าสูง แสดงว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพของการสกัดสูง

$$\text{Enrichment factor} = \frac{C_{\text{sed}}}{C_0} \quad \text{สมการ (1)}$$

$$\text{Extraction recovery} = \frac{n_{\text{sed}}}{n_0} \times 100 = \frac{C_{\text{sed}} \times V_{\text{sed}}}{C_0 \times V_{\text{aq}}} \times 100 \quad \text{สมการ (2)}$$

โดยที่  $C_{\text{sed}}$  คือ ความเข้มข้นของสารที่สนใจในเฟสสกัด  
 $C_0$  คือ ความเข้มข้นของสารที่สนใจในตัวอย่าง  
 $n_{\text{sed}}$  คือ ปริมาณสารที่สนใจในเฟสสกัด  
 $n_0$  คือ ปริมาณสารที่สนใจในตัวอย่าง  
 $V_{\text{sed}}$  คือ ปริมาตรของเฟสสกัด  
 $V_{\text{aq}}$  คือ ปริมาตรของสารละลายในตัวอย่าง

การศึกษาปัจจัยต่อประสิทธิภาพการสกัดของเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายแสดงในตารางที่ 1

**Table 1** Level values of the factors used for DLLME optimization

| Factor No. | Name                                 | Level value / Types of solvent             |
|------------|--------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1          | Amount of Carrez I (g)               | 0.45, 0.60, 0.75                           |
|            | Amount of Carrez II (g)              | 0.45, 0.60, 0.75                           |
|            | Amount of NaCl salt (g)              | 0.65, 0.75, 0.85                           |
| 2          | Dispersive solvent                   | Acetone / Methanol / Ethanol/ Acetonitrile |
| 3          | Extracting time (min)                | 5, 10, 15                                  |
|            | Extracting solvent                   | Chloroform / Dichloromethane               |
| 4          | Dispersive solvent volume (mL)       | 0.65, 0.75, 0.85, 0.95, 1.05, 1.15         |
| 5          | Extracting solvent volume ( $\mu$ L) | 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500     |

## 2.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีประกอบด้วย 2 การตรวจสอบ ได้แก่ (1) การตรวจสอบเหมาะสมของระบบ (System suitability) และ (2) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น ในส่วนของการตรวจสอบเหมาะสมของระบบ จะใช้สารมาตรฐานของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สภาวะดังที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อที่ 2 ซึ่งพารามิเตอร์ที่ศึกษาได้แก่ capacity factor ( $k'$ ), selectivity ( $\alpha$ ), resolution ( $R_s$ ), tailing factor, plate number (N), และ injection precision

ในส่วนของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นจะพิจารณา 5 คุณลักษณะเฉพาะดังนี้ (1) ขีดจำกัดในการตรวจพบ (2) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (3) ช่วงการตอบสนองความเป็นเส้นตรง (4) ความแม่นยำ และ (5) ความเที่ยงโดยทำการศึกษาทั้งค่า Repeatability (intra-day) และ Intermediate precision (in 3 days) รายละเอียดของแต่ละคุณลักษณะมีดังนี้

### 2.4.1 ขีดจำกัดในการตรวจพบ

เป็นค่าที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณจากสูตร 3.3 $\sigma$  โดย  $\sigma$  คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและ S คือ ค่าความชันของเส้นโค้งการสอบเทียบ (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005) จากนั้นเตรียมสารมาตรฐานกรดเบนโซอิก กรดซอร์บิกให้มีความเข้มข้นเท่ากับขีดจำกัดในการตรวจพบ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและวัดค่าอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนให้ได้ 3:1

### 2.4.2 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ

เป็นค่าที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณจากสูตร 10 $\sigma$ S (ICH, 2005) จากนั้นเตรียมสารมาตรฐานกรดเบนโซอิก กรดซอร์บิกให้มีความเข้มข้นเท่ากับขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและวัดค่าอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนให้ได้ 10:1

### 2.4.3 ช่วงการตอบสนองความเป็นเส้นตรง

กำหนดช่วงความเข้มข้นของกรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก ในช่วง 0.02-100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมสารมาตรฐาน 8 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0.02, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นสารมาตรฐาน โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐานต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995 (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005)

### 2.4.4 ความแม่นยำ

ความแม่นยำจะศึกษาพารามิเตอร์ของค่าร้อยละ การคืนกลับโดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นแล้ว 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ชุด ได้แก่ 10, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์เทียบกับความเข้มข้นเดิมและคิดเป็นค่าร้อยละการคืนกลับ เกณฑ์การพิจารณาอ้างอิงจาก ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005); AOAC (2019)

### 2.4.5 ความเที่ยง

ความเที่ยงศึกษา 2 พารามิเตอร์ Repeatability (intra-day) และ Intermediate precision (in 3 days) Repeatability (intra-day) ศึกษาโดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง

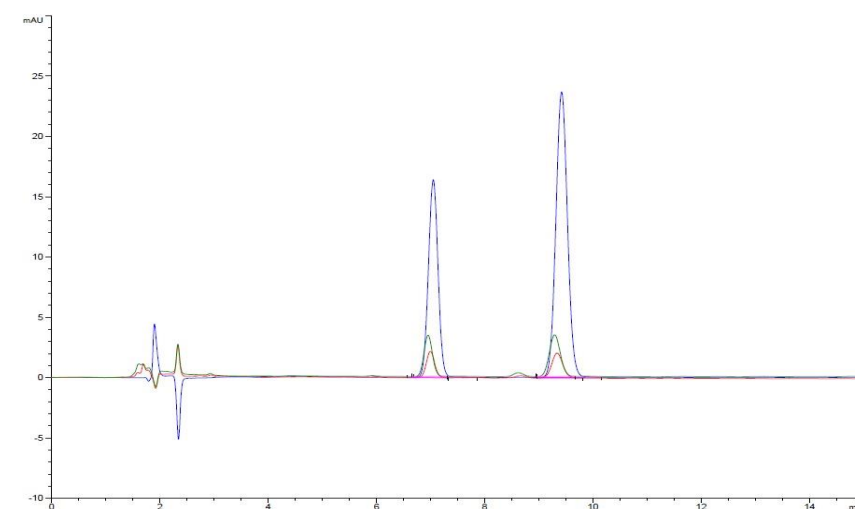
6 ชุด ภายในวันเดียวกัน และ Intermediate precision (in 3 days) ศึกษาโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันที่เวลาต่างกัน 3 วัน รายงานค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ในรูปของร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และเลือกศึกษาสารประกอบที่ตรวจพบอยู่ในตัวอย่างแล้วเท่านั้น เกณฑ์การพิจารณาอ้างอิงจาก ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005); AOAC (2019)

### 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

#### 3.1 สภาวะการแยกที่เหมาะสมของเทคนิคของเหลวโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง

เมื่อทำการศึกษาการแยกสารละลายของสารมาตรฐานทั้ง 2 ชนิดได้แก่ กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ผสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่ที่ 1 คือสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ในน้ำ (pH 5) และเฟสเคลื่อนที่ที่ 2 คืออะซิโตนไตริลใช้สภาวะการเดินที่ ดังนี้ เวลาเริ่มต้น สัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่ 1 สัดส่วน 85% และเฟสเคลื่อนที่ที่ 2 สัดส่วน 15% คงที่ 3 นาที เวลาที่ 7.5 นาที เฟสเคลื่อนที่ที่ 1 สัดส่วน 35% และเฟสเคลื่อนที่ที่ 2 สัดส่วน 65% คงที่ 2.5 นาที เวลาที่ 13.0 นาที เฟสเคลื่อนที่ที่ 1 สัดส่วน 85% และเฟสเคลื่อนที่ที่ 2 สัดส่วน 15% คงที่ 2 นาที รวมระยะเวลา 15 นาที

พบว่าสารมาตรฐานกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกแยกออกจากกันได้เป็นอย่างดี (ค่า  $R_s > 2$ ) โดยที่กรดเบนโซอิกแยกได้ลำดับที่แรกที่เวลาเรเทนชัน 7.051 นาที กรดซอร์บิกแยกได้ลำดับที่ 2 ที่เวลา 9.424 นาที ค่าการแยกระหว่างกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกเท่ากับ 4.4 ซึ่งค่า  $R_s > 2$  ตามเกณฑ์อ้างอิง (CDER, 1994) นอกจากนี้ค่าพารามิเตอร์ System suitability อื่น ๆ ที่ได้ผ่านเกณฑ์ดังนี้ ค่า Tailing factor กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก มีค่า 0.960 และ 0.831 ตามลำดับ (เกณฑ์ CDER (1994) กำหนด Tailing factor  $< 2$ ) ค่า Plates number กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก มีค่า 5164 และ 7644 ตามลำดับ (เกณฑ์ CDER (1994) กำหนด Plates number  $> 2000$ ) ค่า Capacity factor กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก มีค่า 2.1 และ 2.8 ตามลำดับ (เกณฑ์ CDER (1994) กำหนด Capacity factor  $> 2$ ) ค่า Injection repeatability กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก มีค่า 0.859 และ 0.489 ตามลำดับ (เกณฑ์ CDER (1994) กำหนด Injection repeatability  $< 1$ ) ซึ่งโครมาโทแกรมที่ได้มีความสอดคล้องกันกับการศึกษาวัตถุกันเสียในหมูยอ (Pichai, 2022) จากผลการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าสภาวะการแยกที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกได้ตามเกณฑ์ที่กำหนดสามารถนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณในตัวอย่างได้ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ดังแสดงให้เห็นตัวอย่างโครมาโทแกรมในภาพที่ 1



**Figure 1** Chromatogram of benzoic acid and sorbic acid from standard (Blue line) salad cream (Green line) and mayonnaise (Red line)

### 3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดเบนโซอิกและซอร์บิคด้วยเทคนิค DLLME

#### 3.2.1 ปริมาณที่เหมาะสมของสารประกอบซิงค์แอสซีเทตไดไฮเดรต สารประกอบโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์และโซเดียมคลอไรด์

เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายเป็นการสกัดระบบตัวทำละลาย 3 องค์ประกอบ ได้แก่ ตัวทำละลายสกัด ตัวทำละลายช่วยกระจายตัว และสารตัวอย่งที่เป็นน้ำ ซึ่งตัวทำละลายสกัดจะต้องมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำและละลายในน้ำได้เพียงเล็กน้อย ตัวทำละลายช่วยกระจายตัวจะต้องทำให้ตัวทำละลายสกัดเกิดการกระจายตัวเป็นหยดเล็ก ๆ ได้ดี และสามารถละลายได้ทั้งในตัวทำละลายสกัดและตัวอย่ง (Soisungnoen, 2018)

นอกจากนี้ การเติมเกลือจะทำให้การละลายของสารที่ต้องการวิเคราะห์และสารอินทรีย์ในน้ำลดลงเมื่อความแรงไอออนของสารละลาย (Ionic strength) เพิ่มขึ้นตามหลักของ salting out effect (Navakhun, 2015) และเนื่องด้วยตัวอย่างที่ศึกษาเป็นอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบทางที่มิวิจัยได้นำสารประกอบซิงค์แอสซีเทตไดไฮเดรตและสารประกอบโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์มาใช้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อช่วยในการกำจัดไขมัน ความขุ่นและตกตะกอนโปรตีน ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้เลือกศึกษาปริมาณสารประกอบซิงค์แอสซีเทตไดไฮเดรตและสารประกอบโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์ในช่วง

0.45 - 0.75 กรัม และผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบซิงค์แอสซีเทตไดไฮเดรตและสารประกอบโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์ที่ทำให้ปริมาณวัตถุกันเสียมีความเข้มข้นสูงสุดคือที่ 0.45 และ 0.45 กรัมตามลำดับ

จากตารางที่ 1 ที่มิวิจัยออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของปัจจัยกลุ่มที่ 1 โดยใช้การทดลองแบบลูกบาศก์ (Cubic Experimental Design) มีจำนวนชุดทดลองทั้งหมด 27 ชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่สกัดกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิคได้ประสิทธิภาพการสกัดสูงที่สุดคือชุดการทดลองที่ 2 โดยแสดงความเข้มข้นเฉลี่ยของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิคจากชุดการทดสอบที่สำคัญในตารางที่ 2 จากผลการทดสอบชุดที่ 2 ใช้สารประกอบซิงค์แอสซีเทตไดไฮเดรต 0.45 กรัม สารประกอบโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์ 0.45 กรัมและโซเดียมคลอไรด์ 0.75 กรัม เนื่องจากปริมาณสารประกอบซิงค์แอสซีเทตไดไฮเดรตและสารประกอบโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์เหมาะสมในการกำจัดไขมัน ความขุ่นและตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่าง และโซเดียมคลอไรด์ทำให้เกิดความแรงไอออนของสารละลายเพิ่มขึ้นตามหลักของ salting out effect ส่งผลให้ได้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณสารประกอบซิงค์แอสซีเทตไดไฮเดรต 0.45 กรัม สารประกอบโพแทสเซียมเพอร์โรซายาไนต์ 0.45 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 0.75 กรัมเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยกลุ่มที่ 1 และนำปริมาณดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของปัจจัยกลุ่มที่ 2

**Table 2** Result of the optimum amount from factor No. 1

| Test No. | Amount of Carrez I (g) | Amount of Carrez II (g) | Amount of NaCl (g) | Concentration (mg/g) |             |
|----------|------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|-------------|
|          |                        |                         |                    | Benzoic acid         | Sorbic acid |
| 1/27     | 0.45                   | 0.45                    | 0.65               | 0.0079               | 0.0075      |
| 2/27     | 0.45                   | 0.45                    | 0.75               | 0.0101               | 0.0088      |
| 5/27     | 0.45                   | 0.60                    | 0.75               | 0.0064               | 0.0035      |
| 6/27     | 0.45                   | 0.60                    | 0.85               | 0.0077               | 0.0045      |
| 7/27     | 0.45                   | 0.75                    | 0.65               | 0.0054               | 0.0021      |
| 8/27     | 0.45                   | 0.75                    | 0.75               | 0.0085               | 0.0058      |
| 10/27    | 0.60                   | 0.45                    | 0.65               | 0.0028               | 0.0024      |
| 11/27    | 0.60                   | 0.45                    | 0.75               | 0.0029               | 0.0035      |
| 19/27    | 0.75                   | 0.45                    | 0.65               | 0.0020               | 0.0026      |
| 20/27    | 0.75                   | 0.45                    | 0.75               | 0.0022               | 0.0031      |
| 23/27    | 0.75                   | 0.60                    | 0.75               | 0.0036               | 0.0032      |
| 25/27    | 0.75                   | 0.75                    | 0.65               | 0.0079               | 0.0078      |

3.2.2 ชนิดตัวทำละลายช่วยกระจายตัว

ตัวทำละลายช่วยกระจายตัวจะต้องละลายได้ในน้ำและในตัวทำละลายที่ใช้สกัดเพื่อให้เกิดอิมัลชันของตัวทำละลายที่ใช้สกัดในชั้นน้ำ และขนาดของหยดตัวทำละลายที่ใช้สกัด จากตารางที่ 1 ที่มีวิจัยเลือกศึกษาตัวทำละลายช่วยกระจายตัว 4 ชนิด ได้แก่ อะซิโตน / เมทานอล / เอทานอล / อะซิโตนไไตรล์ ปริมาตร 0.85 มิลลิลิตร โดยตัวทำละลายช่วยกระจายตัวแต่ละชนิดจับคู่กับตัวทำละลายสกัดคือไดคลอโรมีเทนปริมาตร 0.40 มิลลิลิตร จะได้ 4 ชุดการทดลอง พบว่าทุกคู่ของตัวทำละลายช่วยกระจายตัวและตัวทำละลายสกัดสามารถแยกเฟสตัวทำละลายออกจากกันได้ยกเว้นเมทานอลซึ่งละลายเข้ากันกับตัวอย่างทำให้ไม่สามารถศึกษาได้ และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการสกัดกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกของแต่ละชุดการทดลองดังภาพที่ 2 พบว่าชุดการทดลองที่ใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายช่วยกระจายตัวสามารถสกัดกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกได้มากที่สุด ดังนั้นตัวทำละลายช่วยกระจายตัวที่เหมาะสมที่สุดคืออะซิโตน

3.2.3 ระยะเวลาการสกัดและชนิดตัวทำละลายสกัดที่เหมาะสม

จากการออกแบบชุดทดลองแบบลูกบาศก์ของปัจจัยกลุ่มที่ 3 มีจำนวนชุดทดลองทั้งหมด 6 ชุดการทดลอง ดังแสดงตารางที่ 3 ตัวทำละลายสกัดคือไดคลอโรมีเทนและใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายช่วยกระจายตัวทำให้ได้ประสิทธิภาพการสกัดสูงที่สุด เนื่องจากอะซิโตนที่มีไดคลอโรมีเทนเกิดการกระจายตัว (ลักษณะ cloudy solution) ทัวทั้งหลอดสกัดกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกจะถูกสกัดเข้าไปในไดคลอโรมีเทนซึ่งกระจายตัวทั่วสารละลายตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยเครื่องเขย่าสารหลังจากปั่นเหวี่ยงไดคลอโรมีเทนเกิดการแยกชั้นและสามารถนำไปวิเคราะห์ต่อไป (Soisungnoen, 2018) ผลการทดลองพบว่าชุดที่ 4 คือระยะเวลาการสกัด 10 นาทีและไดคลอโรมีเทนสามารถสกัดและแยกชั้นออกจากสารละลายทั้งหมดได้ดีที่สุด จึงเป็นตัวแปรที่เหมาะสมของปัจจัยกลุ่มที่ 3 และนำมาศึกษาตัวแปรที่เหมาะสมของปัจจัยกลุ่มที่ 4

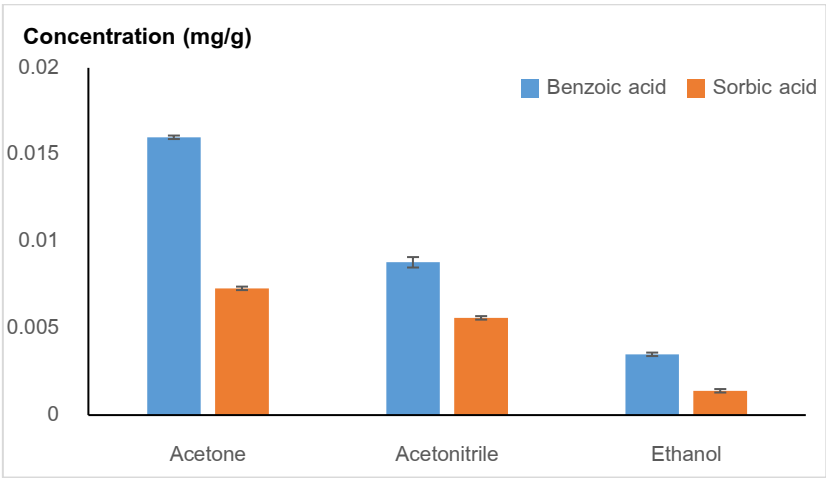


Figure 2 Effect of different dispersive solvents with the same extraction solvent (Dichloromethane) on concentrations of benzoic acid and sorbic acid

Table 3 Result of the optimum amount from factor No. 3

| Test No. | Extracting time (min) | Type of dispersive solvent and type of extracting solvent | Concentration (mg/g) |              |
|----------|-----------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|--------------|
|          |                       |                                                           | Benzoic acid         | Benzoic acid |
| 1/6      | 5                     | Acetone - Chloroform                                      | 0.0047               | 0.0011       |
| 2/6      | 5                     | Acetone - Dichloromethane                                 | 0.0202               | 0.0130       |
| 3/6      | 10                    | Acetone - Chloroform                                      | 0.0270               | 0.0194       |
| 4/6      | 10                    | Acetone - Dichloromethane                                 | 0.0527               | 0.0301       |
| 5/6      | 15                    | Acetone - Chloroform                                      | 0.0179               | 0.0071       |
| 6/6      | 15                    | Acetone - Dichloromethane                                 | 0.0091               | 0.0020       |

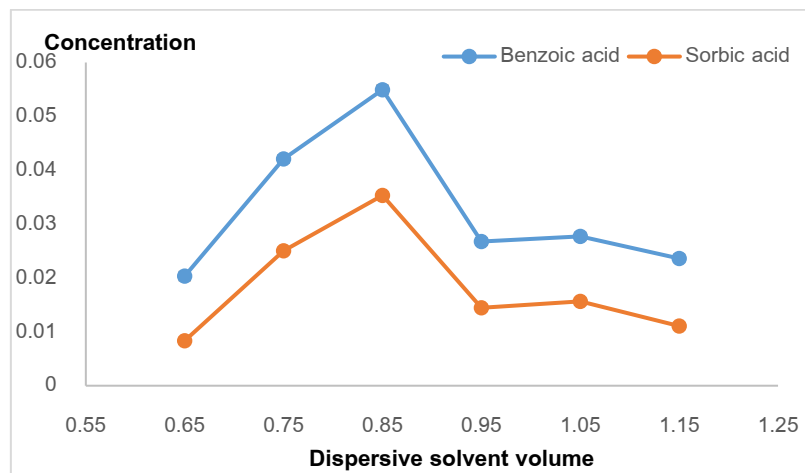
### 3.2.4 ปริมาตรตัวทำละลายช่วยกระจายตัวที่เหมาะสม

ปริมาตรของตัวทำละลายช่วยกระจายตัวมีผลโดยตรงต่อการกระจายตัวของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการสกัดจากตารางที่ 1 ที่มวิจัยศึกษาปริมาตรของอะซิโตน 0.65, 0.75, 0.85, 0.95, 1.05, 1.15 มิลลิลิตรและใช้ปริมาตรไดคลอโรมีเทน 0.40 มิลลิลิตร จะได้ 6 ชุดการทดลอง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3 พบว่าปริมาตรที่เหมาะสมของอะซิโตนที่ช่วยกระจายตัวไดคลอโรมีเทนได้ดีที่สุดและให้การสกัดกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกสูงสุด คือ 0.85 มิลลิลิตร จากกราฟจะเห็นว่าถ้าปริมาณอะซิโตนมีค่าน้อยกว่า 0.85 มิลลิลิตรจะทำให้ไดคลอโรมีเทนกระจายตัวน้อยส่งผลให้พื้นผิวของหยดไดคลอโรมีเทนน้อย ทำให้การสกัดไม่สมบูรณ์ ปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่สกัดได้จึงมีปริมาณน้อย แต่ถ้า

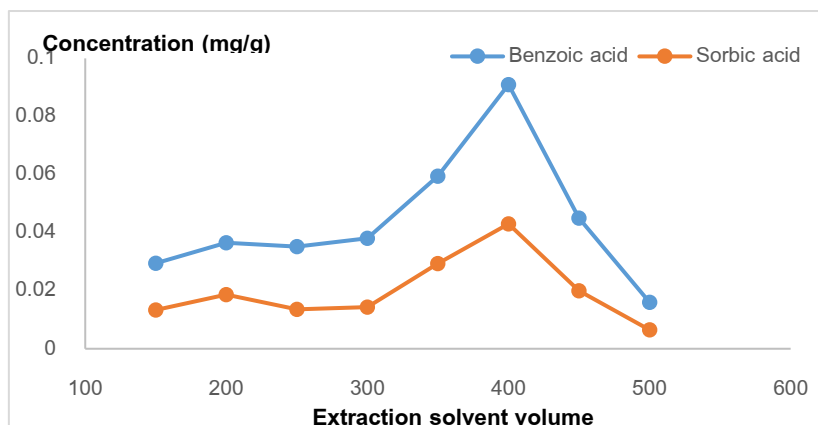
เติมอะซิโตนมากกว่า 0.85 มิลลิลิตรจะทำให้ไดคลอโรมีเทนบางส่วนละลายน้ำออกไปส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลงจึงเห็นปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกมีปริมาณน้อยลง (Soisungnoen, 2018)

### 3.2.5 ปริมาตรตัวทำละลายสกัดที่เหมาะสม

ปริมาตรของตัวทำละลายสกัดที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจ โดยจะต้องเพิ่มความเข้มข้น (enrichment factor) สูง และต้องแยกเฟสสารได้มากพอที่จะนำไปวิเคราะห์ต่อไป จากตารางที่ 1 ที่มวิจัยศึกษาปริมาตรของไดคลอโรมีเทน 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 ไมโครลิตร โดยใช้อะซิโตน 0.85 มิลลิลิตรเป็นตัวทำละลายช่วยกระจายตัว จะได้ 8 ชุดการทดลอง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4



**Figure 3** Effect of different dispersive solvent volumes with the same extraction solvent volume (Dichloromethane) on concentrations of benzoic acid and sorbic acid

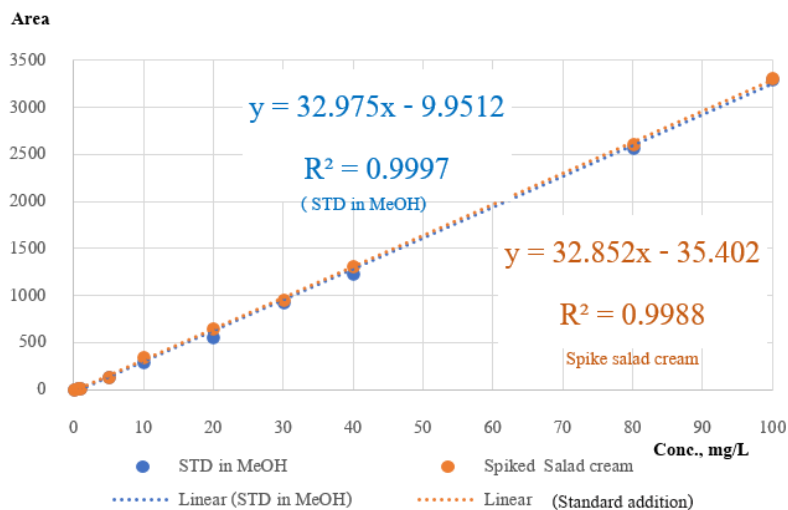


**Figure 4** Effect of different extracting solvent volumes with optimum dispersive solvent volumes (0.85 mL) on concentrations of benzoic acid and sorbic acid

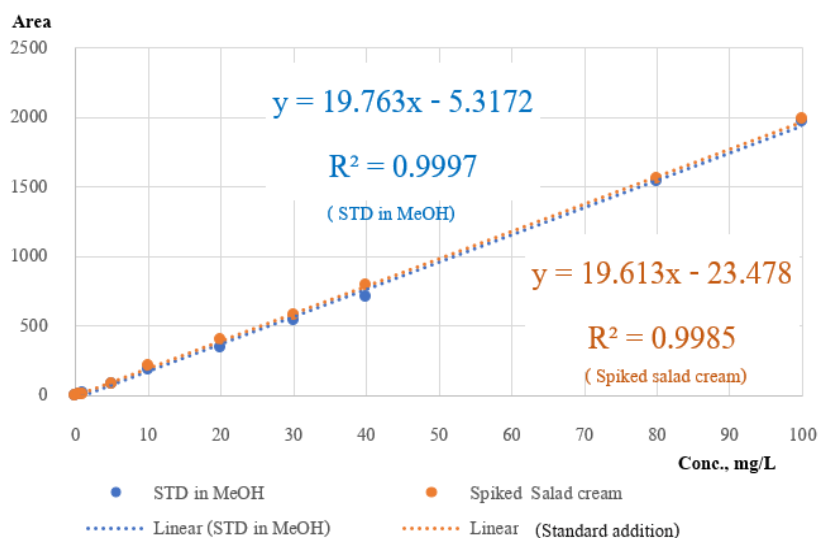
พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของไดคลอโรมีเทนที่สกัดกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกได้ปริมาณสูงสุดคือ 400 ไมโครลิตร ถ้าเติมปริมาณไดคลอโรมีเทนน้อยเกินไป จะทำให้หยดของไดคลอโรมีเทนมีปริมาณน้อย ส่งผลให้สกัดปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกได้น้อย และหากใช้ไดคลอโรมีเทนมากเกินไปจะทำให้ปริมาตรของตัวทำละลายสกัดหลังปั่นเหวี่ยงมากส่งผลให้ enrichment factor มีค่าน้อย ประสิทธิภาพการสกัดจึงน้อยลงด้วย (Soisungnoen, 2018)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดเบนโซอิกและซอร์บิกด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายที่มีวิจัยศึกษาเปรียบเทียบการสกัด

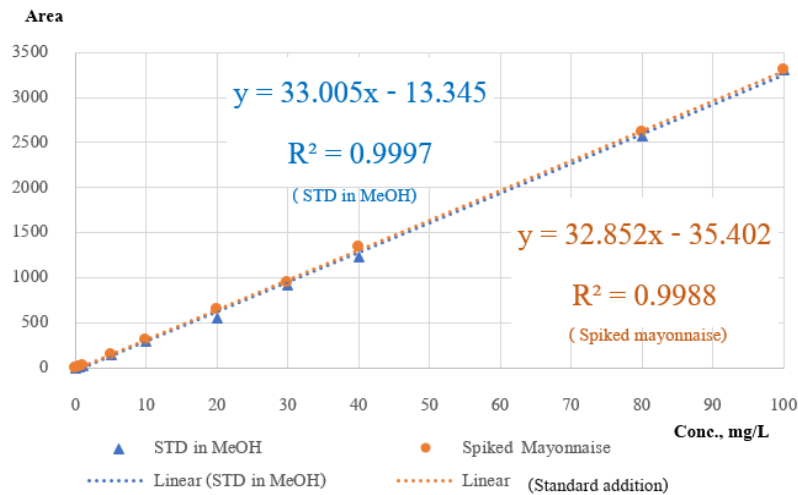
ตัวอย่าง 2 เทคนิคโดยเปรียบเทียบผลการศึกษา Matrix effect ของตัวอย่างที่สกัดจากความเข้มข้นของกราฟ External standard calibration curve และ Standard addition calibration curve (ดังภาพที่ 5 ถึงภาพที่ 8) ของส่วนสกัด 2 เทคนิคคือเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลว และเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายโดยใช้ค่า P-value ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยศึกษาในตัวอย่างอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ 2 ชนิดได้แก่ สลัดครีม และมายองเนสพบว่าเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายสามารถกำจัด matrix effect ได้ดีกว่าเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลวโดยพิจารณาจากค่า P-value ดังแสดงตารางที่ 4



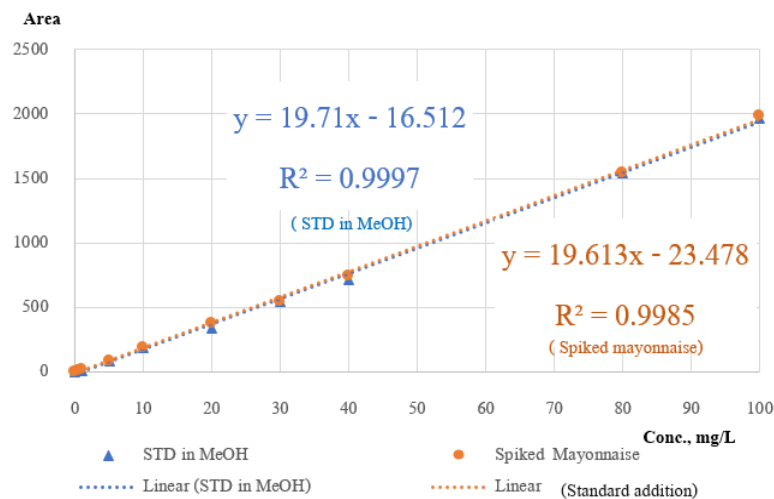
**Figure 5** External standard calibration curve of benzoic acid in methanol and standard addition calibration curve (Extraction-DLLME) of benzoic acid in salad cream.



**Figure 6** External standard calibration curve of benzoic acid in methanol and standard addition calibration curve (Extraction-DLLME) of sorbic acid in salad cream.



**Figure 7** External standard calibration curve of benzoic acid in methanol and standard addition calibration curve (Extraction-DLLME) of benzoic acid in mayonnaise.



**Figure 8** External standard calibration curve of benzoic acid in methanol and standard addition calibration curve (Extraction-DLLME) of sorbic acid in mayonnaise.

**Table 4** Result of studying the matrix effect of salad cream and mayonnaise

| Matrix - Preservative      | Extraction method 1 (LLE) |          | Extraction method 2 (DLLME) |         | F crit  |
|----------------------------|---------------------------|----------|-----------------------------|---------|---------|
|                            | F                         | P-value  | F                           | P-value |         |
| Salad cream – Benzoic acid | 534.5789                  | 2.07E-05 | 2.49763                     | 0.18917 | 7.70865 |
| Salad cream – Sorbic acid  | 523.5914                  | 2.16E-05 | 0.13379                     | 0.73306 | 7.70865 |
| Mayonnaise – Benzoic acid  | 531.7789                  | 3.07E-05 | 2.49763                     | 0.18917 | 7.70865 |
| Mayonnaise – Sorbic acid   | 521.7914                  | 3.16E-05 | 0.13379                     | 0.73306 | 7.70865 |

การสกัดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายได้ค่า P-value มากกว่า 0.05 ทั้ง 2 สารประกอบ แสดงว่าผลของ Matrix effect ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ขณะที่การสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลว ได้ค่า P-value น้อยกว่า 0.05 ทั้ง 2 สารประกอบในตัวอย่างสลัดครีมและมายองเนส

แสดงว่าการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลว มีผลของ Matrix effect อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าส่วนสกัดที่ได้จากการสกัดเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายมีลักษณะใสไม่มีตะกอนสีขาวมากกว่าส่วนสกัดที่ได้จากการสกัดเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลว ซึ่งมีลักษณะขุ่นกว่า

**Table 5** Quantitative characteristics of the proposed method in HPLC

| Preservatives | LOD, (mg/L) | LOQ, (mg/L) | Range (mg/L) | Linearity           | R <sup>2</sup> |
|---------------|-------------|-------------|--------------|---------------------|----------------|
| Benzoic acid  | 0.007       | 0.02        | 0.02 – 100.0 | y = 39554x + 1205.4 | 0.9997         |
| Sorbic acid   | 0.006       | 0.02        | 0.02 – 100.0 | y = 39093x + 4776.3 | 0.9999         |

**Table 6** Quantitative characteristics of DLLME-HPLC

| Preservatives               | Precision (%RSD) |                        | Accuracy (% Recovery) |         |         |
|-----------------------------|------------------|------------------------|-----------------------|---------|---------|
|                             | Repeatability    | Intermediate precision | Level-1               | Level-2 | Level-3 |
|                             | (n=6*)           | (n=6*3 days)           | 10 mg/L               | 20 mg/L | 30 mg/L |
| Benzoic acid in salad cream | 0.1              | 0.2                    | 99.4%                 | 89.6%   | 92.5 %  |
| Sorbic acid in salad cream  | 0.1              | 0.2                    | 98.3%                 | 90.6%   | 91.5 %  |
| Benzoic acid in mayonnaise  | 0.1              | 0.2                    | 104.3 %               | 99.6%   | 99.4%   |
| Sorbic acid in mayonnaise   | 0.1              | 0.2                    | 102.1%                | 103.9%  | 101.3%  |
| Criteria (AOAC, 2019)       | < 7.3%           | < 7.3%                 | 80-110%               | 80-110% | 80-110% |

### 3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นในตัวอย่างอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ สลัดครีมและมายองเนสอ้างอิงมาตรฐาน AOAC (2019) และมาตรฐาน ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005) ซึ่งปัจจัยที่ใช้ตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ ได้แก่ ชีตจำกัดในการตรวจพบ ชีตจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการตอบสนองความเป็นเส้นตรง ดังแสดงในตารางที่ 5 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงประกอบด้วย 2 พารามิเตอร์ ได้แก่ Repeatability และ Intermediate precision ดังแสดงในตารางที่ 6

จากผลการวิจัยพบว่า เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายให้ประสิทธิภาพการสกัดกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกได้ดีที่สุดเมื่อใช้ตัวทำละลายสกัด 400 ไมโครลิตรและตัวทำละลายช่วยกระจายตัว 0.85 มิลลิลิตร โดยสกัดด้วยเครื่องเขย่าสารระยะเวลา 10 นาที ซึ่งเป็นขั้นตอนการสกัดที่ใช้เวลาในการสกัดสั้น ขั้นตอนการสกัดง่าย ราคาถูก ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์น้อย มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Soisungnoen *et al.*, 2022) และจากการเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าผลของ Matrix effect ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

## 4. สรุป

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์กลุ่มวัตถุกันเสีย 2 ชนิดคือกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบให้วิเคราะห์คราวเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะที่พบกลุ่มสารดังกล่าวอยู่

ในอาหารต่าง ๆ ได้แก่ สลัดครีมและมายองเนสโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดยูวีวิสซิเบิล ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร คอลัมน์รีเวิร์สเฟสที่ใช้แยกคือ Hypersil GOLD ความยาว 150 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 46 มิลลิเมตร และขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ผสมระหว่างสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ในน้ำ (pH 5) และอะซิโตนไตรลีสสภาวะกราเดียนท์มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที นีตตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ 15 นาที วิธีดังกล่าวมีชีตจำกัดในการตรวจพบของสารประกอบทั้ง 2 ชนิดคือ 0.007 และ 0.006 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกตามลำดับ และชีตจำกัดในการวัดเชิงปริมาณของสารประกอบทั้ง 2 ชนิดเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงการตอบสนองความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.02-100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า R<sup>2</sup> มากกว่า 0.9997 เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายสามารถสกัดตัวอย่างอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบได้ดี ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดน้อยมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมโดยการลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เวลาในการสกัดสั้น และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรงตามวัตถุประสงค์

## 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นโครงการที่ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเทพทุนทั่วไป รหัสโครงการ EQU530121S และทีมวิจัยขอขอบคุณศูนย์บริการปฏิบัติการทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์

และสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สนับสนุนอุปกรณ์และ  
เครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการทำวิจัย

## 6. เอกสารอ้างอิง

- Ali, M.S. 1985. Rapid quantitative method for simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, and four parabens in meat and nonmeat products by liquid chromatography. **Journal - Association of Official Analytical Chemists** 68: 488-492.
- AOAC. 1990. **Official Methods of Analysis**. 15<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington DC., U.S.A.
- AOAC. 2019. **Official Methods of Analysis**. 21<sup>st</sup> ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington DC., U.S.A.
- CDER. 1994. **Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method**. Rockville, U.S.A.
- Ferreira, I., Mendes, E., Brito, P. and Ferreira, M. 2000. Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC. **Food Research International** 33: 113-117.
- Fuselli, F., Guarino, C., La Mantia, A., Longo, L., Faberi, A. and Marianella, R.M. 2012. Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B** 906: 9-18.
- Gören, A.C., Bilsel, G., Simsek, A., Bilsel, M., Akçadağ, F., Topal, K. and Ozgen, H. 2015. HPLC and LC-MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. **Food Chemistry** 175: 273-279.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), pp. 1-13. *In International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. Geneva.
- Mota, F., Ferreira, I.M., Cunha, S.C., Beatriz, M. and Oliveira, P. 2003. Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs. **Food Chemistry** 82: 469-473.
- Mazloomifar, A. and Shieghi, P. 2015. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Determination of Platinum (IV) by High Performance Liquid Chromatography. **Oriental Journal of Chemistry** 31: 1299-1305.
- Navakhun, A. 2015. Environmental friendly sample preparation method by microextraction. **Burapha Science Journal** 20(1): 227-235. (in Thai)
- Notification of the Ministry of Public Health (No. 418). 2020. **Prescribing the Principle, Conditions, Methods and Proportion of Food Additives (No.2)**. Available Source: [https://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2563/E/237\\_2/18.PDF](https://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2563/E/237_2/18.PDF), August 3, 2023. (in Thai)
- Office of Scientific Instrument and Testing. 2023. **Price rate**. Available Source: <https://osit.psu.ac.th/th/pricerate/>, December 22, 2023. (in Thai)
- Pichai, P. 2022. Method validation for determination of benzoic acid, salicylic acid and sorbic acid in Vietnamese pork sausage by high performance liquid chromatography. **The Bulletin of the Department of Medical Sciences** 61(2): 48-59. (in Thai)
- Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.R.M., Aghaee, E., Ahmadi, F. and Berijani, S. 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A** 1116: 1-9.
- Saad, B., Bari, M.F., Saleh, M.I., Ahmad, K. and Talib, M.K. 2005. Simultaneous determination of preservatives ( benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** 1073: 393-397.
- Soisungnoen, P. 2018. Dispersive liquid- liquid microextraction: Principle and development of extraction solvent. **Burapha Science Journal** 21(3): 1284-1300. (in Thai)

- Soisungnoen, P., Yokbat, S. and Nambunlue, P. 2022.  
Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons  
in grilled pork using microwave- assisted  
extraction and microextraction followed by  
high- performance liquid chromatography.  
**Journal of Science and Technology, Ubon  
Ratchathani University** 21(1): 28-36. (in Thai)
- Techakriengkrai, I. and Surakarnkul, R. 2007. Analysis  
of benzoic acid and sorbic acid in Thai rice  
wines and distillates by solid-phase sorbent  
extraction and high- performance liquid  
chromatography. **Journal of Food Composition  
and Analysis** 20: 220-225.
- WHO. 2000. **Benzoic acid and sodium benzoate  
(Concise international chemical assessment  
document 26)**. World Health Organization,  
Geneva.