

**การสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคเพื่อหาปริมาณเบนโซเอท
ในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี**
**Aqueous Two-phase Extraction for Determination of Benzoate
in Rice Noodle by Spectrophotometry**

วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ* และ สิริพร มิตรโกสุม

Wiboon Praditweangkum and Siriporn Mitkosum

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์หลักเพื่อพัฒนาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous two-phase systems:ATPS) ที่มีองค์ประกอบของโพลิเอททิลีนไกลคอล (PEG) กับเกลืออนินทรีย์ เพื่อสกัดเบนโซเอทจากผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวและตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี ทำการศึกษาแผนภาพวัฏภาค (phase diagram) ด้วยวิธีการไทเทรตแบบ turbidometry ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ เช่น น้ำหนักโมเลกุลของ PEG และชนิดของเกลืออนินทรีย์ที่มีผลต่อลักษณะของแผนภาพวัฏภาค สัดส่วนเชิงปริมาตรดีที่สุดของการสกัดคือ 1:1:1 (สารละลายตัวอย่าง : สารละลาย PEG1000 (50%w/v) : สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต (50%w/v)) โดยให้ประสิทธิภาพการสกัดในช่วง 94.36–103.21% เติรียมตัวอย่างในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ และสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค โดยใช้สารละลายตัวอย่าง 5.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย PEG (50% w/v) 5.0 มิลลิลิตร และสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต (50%w/v) 5.0 มิลลิลิตร เมื่อเกิดการแยกสมบูรณ์แล้วได้สารละลายใสสองวัฏภาคและมีตะกอนสีขาวอยู่ระหว่างชั้นวัฏภาค วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายวัฏภาคบน แล้วคำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทโดยอาศัย baseline technique จากสมการ $A = \text{Abs}_{269.5} - [(\text{Abs}_{265.5} + \text{Abs}_{275.5})/2]$ ได้กราฟมาตรฐานของเบนโซเอท (ในรูปโซเดียมเบนโซเอท) มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 25 – 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ($r^2 = 0.9999$) ขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) มีค่า 8.80 และ 29.34 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในช่วง 0.09-0.94% และค่าร้อยละการกลับคืนในช่วง 96.21-103.76% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานของ

AOAC 47.3.03 ด้วยวิธีทางสถิติ paired t-test พบว่าผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($t_{\text{observed}} = -0.14$, $t_{\text{critical}} = 2.57$, $n = 6$) วิธีการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวได้ โดยให้ความรวดเร็วในการวิเคราะห์และไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยง่ายที่เป็นพิษต่อผู้ทำการวิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ : การสกัด, สารละลายน้ำสองวัฏภาค, เบนโซเอท, ผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว, สเปกโตรโฟโตเมทรี

Abstract

The aim of this research was to develop a system of aqueous two-phase system (ATPS) of polyethylene glycol (PEG) and inorganic salt for the extraction and spectrophotometric determination of benzoate in rice noodle. The phase diagrams of aqueous two-phase system were determined by turbidometric titration method. Factors influencing the phase diagram such as molecular weight of PEG and type of inorganic salt were studied. It was found that the best volume ratio of 1:1:1 (sample solution: PEG1000 solution (50%w/v): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (50%w/v)) gave 94.36-103.21% extraction efficiency, and this ratio was selected in the method development. Rice noodle sample was soaked in 1.0 M NaOH solution and extracted in aqueous two-phase system using 5.0 mL of slurry sample solution, 5.0 mL of PEG1000 solution (50%w/v) and 5.0 mL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution (50%w/v). Two clear phases and a layer of white precipitate between the phases were formed. The absorbance of upper phase solution was measured and corrected absorbance, $\text{Abs}_{269.5} - [(\text{Abs}_{265.5} + \text{Abs}_{275.5})/2]$, was calculated using baseline technique. The calibration graph of benzoate (as sodium benzoate) was linear in the range of 25 to 600 mg/L with coefficient of determination (r^2) of 0.9999. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for sodium benzoate were 8.80 mg/L and 29.34 mg/L, respectively. The percent relative standard deviation and recovery of this developed method were 0.09-0.94% and 96.21-103.76%, respectively. The paired-samples t-test results for differences between this method and AOAC method (47.3.03) showed no significant difference at 95% confidence level ($t_{\text{observed}} = -0.14$, $t_{\text{critical}} = 2.57$, $n = 6$). The developed aqueous two-phase extraction method can be applied for determination of benzoate in rice noodle with rapid and environmentally friendly procedure using non-toxic organic solvent.

Keywords: Extraction, Aqueous two-phase system, Benzoate, Rice noodle, Spectrophotometry

1. บทนำ

กล้วยเตี่ยวและขนมจีนเป็นผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวซึ่งนิยมบริโภคทั่วไปในประเทศไทย ในกระบวนการผลิตเส้นกล้วยเตี่ยวจะมีการเติมวัตถุกันเสียเพื่อให้เก็บได้นาน ไม่เสียง่ายก่อนบริโภค สารเคมีที่ใช้เป็นวัตถุกันเสีย เช่น กรดเบนโซอิก โซเดียมเบนโซเอท และโซเดียมหรือโพแทสเซียมเมทาไบซัลไฟต์ [1] ซึ่งกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทจะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหาร [2] ถ้าร่างกายได้รับโซเดียมเบนโซเอท 5-10 กรัม เป็นเวลาหลายวันจะยังไม่พบความเป็นพิษ กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทจะถูกกำจัดออกจากร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยรวมตัวกับไคโลซีนในตับอยู่ในรูปกรดฮิพิวริกและถูกขับออกทางปัสสาวะ [2-3] การที่โซเดียมเบนโซเอทมีความเป็นพิษน้อยและละลายน้ำได้ดีกว่ากรดเบนโซอิกมาก ทำให้นิยมนำโซเดียมเบนโซเอทมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารหลากหลายชนิด [3] การใช้วัตถุกันเสียในอาหารมีข้อจำกัดซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของกระทรวงสาธารณสุข โดยข้อกำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 พ.ศ.2547 เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร ข้อ 6 อนุญาตให้มีการใช้กรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอทในอาหารได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [4]

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทในอาหารตามวิธีมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ปี ค.ศ.1995 ข้อที่ 47.3.03 เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีหลายขั้นตอนและต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมากในการสกัด [5] ทำให้มีผู้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ต่าง ๆ เช่น วิธีทางสเปกโทรโฟโตเมทรี [6-8] วิธีแก๊สโครมาโทกราฟี [9-13] และวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง [14-18] เป็นต้น เพื่อปรับปรุงการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอทให้ดีขึ้น

การสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous two-phase systems : ATPS) เป็นเทคนิคการสกัดที่มีประโยชน์ ระบบนี้เกิดจากการผสมสารละลายพอลิเมอร์ต่างชนิดกันสองสารละลาย หรือผสมสารละลายพอลิเมอร์กับเกลือ [19] สามารถใช้แยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ และเพิ่มความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ได้ในขั้นตอนเดียว [20] ข้อดีที่สำคัญของระบบนี้ คือ มีความจุสูง วัฏภาคมีแรงดึงผิวต่ำ ร้อยละการกลับคืนสูง ใช้เวลาน้อย ประหยัด ไม่เป็นพิษ ไม่ไวไฟ [20-21] เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างวิธีการสกัดแบบเดิมที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์กับระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค พบว่าระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เนื่องจากไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic solvents: VOCs) มีการนำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมาประยุกต์ใช้งานในการแยกสารชีวเคมีตั้งแต่ปี ค.ศ. 1956 [22-23] ส่วนใหญ่แล้วระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะใช้ในการเพิ่ม

ความเข้มข้นและการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ สกัดเอนไซม์ต่าง ๆ รวมทั้งกรดนิวคลีอิก จุลินทรีย์ เซลล์สัตว์ และเซลล์พืช [23] ปัจจุบันระบบนี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในส่วนอื่น ๆ เช่น นำมาใช้ในการกำจัดสีจากของเสียในอุตสาหกรรมสิ่งทอ [24] สกัดโลหะไอออน [24-26] สีข้อม [27] สารอินทรีย์ที่เป็นพิษจากสิ่งแวดล้อม [28] สารอะโรมาติกจากน้ำมันดิบ [24] แยกสเตรอยด์ในปัสสาวะมนุษย์ [29-30] และสกัดยาชนิดที่เป็นไฮโดรฟิลิกจากเลือด [31] เป็นต้น

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการนำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมาใช้ในการสกัดกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอท งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อการพัฒนากระบวนการละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีโพลีเอททิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol; PEG) กับกลีโอดินทรีย์เป็นองค์ประกอบ เพื่อใช้ในการสกัดเบนโซเอทจากผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวและตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี

2. การทดลอง

2.1 สารเคมี

โซเดียมเบนโซเอท ($\text{NaC}_6\text{H}_5\text{CO}_2$ ความบริสุทธิ์ 99% ของบริษัท Fluka) เตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 10,000 mg/L

โพลีเอททิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol; PEG) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 400, 1000 และ 4000 (PEG 400, 1000 และ 4000 ของบริษัท Fluka, Panreac Sintesis และ Asia Pacific Specialty Chemical Limited ตามลำดับ) เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 50% w/w และ 50% w/v

กลีโอดินทรีย์ชนิดต่าง ๆ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) และโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ของบริษัท Rankem, Fisher Scientific, J.T. Baker และ Rankem ตามลำดับ เตรียมเป็นสารละลายเกลือเข้มข้น 30% w/w และ 50% w/v

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Carlo Erba เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 6.0 M และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) รุ่น Jasco V-630 ของบริษัท Analytical lab science

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

ซึ่งสารละลายเกลือความเข้มข้น 30% w/w และซึ่งสารละลาย PEG ความเข้มข้น 50% w/w ใส่ลงในหลอดทดลองเดียวกัน ให้มีน้ำหนักของสารละลายแต่ละชนิดตามที่แสดงในตารางที่ 1 แต่ละหลอดทดลองมีสารละลายผสมที่มีน้ำหนักรวม 5.0 g ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีลักษณะขุ่น ถ้าตั้งทิ้งไว้จะแยกเป็นสารละลายใสสองวัฏภาค นำไปไทเทรตกับน้ำ DI จนได้สารละลายวัฏภาคเดียวที่มีลักษณะใส นำหลอดทดลองไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อหาน้ำหนักของน้ำ DI ที่เติมลงไป แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของ PEG และเกลือที่มีในสารละลายนั้น เพื่อเป็นค่าของจุดหนึ่งที่พลอตบนเส้นแบ่งวัฏภาค ในแต่ละชุดการทดลองจะทำจนครบทั้ง 5 หลอดทดลอง จากนั้นทำการทดลองตามขั้นตอนเดิมโดยเปลี่ยนชนิดของสารละลายเกลือและสารละลาย PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างแผนภาพวัฏภาค

ตารางที่ 1. น้ำหนักของสารละลายเกลือและสารละลาย PEG สำหรับการทดลองสร้างแผนภาพวัฏภาค

หลอดที่	น้ำหนัก (g)		น้ำหนักรวม (g)
	สารละลายเกลือ	สารละลาย PEG	
1	0.5	4.5	5.0
2	1.5	3.5	5.0
3	2.5	2.5	5.0
4	3.5	1.5	5.0
5	4.5	0.5	5.0

2.3.2 การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เบนโซเอท

ปิเปต 5.0 mL ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 mg/L ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด และปิเปต 5.0 mL ของสารละลาย PEG 1000 เข้มข้น 50% w/v กับ 5.0 mL ของสารละลายเกลือเข้มข้น 50% w/v เติมนลงในแต่ละหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้กระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายวัฏภาคบนซึ่งมีเบนโซเอทที่ถูกสกัดได้ ไปสแกนสเปกตรัมเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ในช่วงความยาวคลื่น 250-300 nm และเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม โดยอาศัย baseline technique

2.3.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

การศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PEG และชนิดของเกลือ

ทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการใช้สารละลาย PEG 1000 กับ PEG 4000 และสารละลายเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ กับเกลือ K_2HPO_4 โดยปิเปต 5.0 mL ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 200 และ 400 mg/L ใส่ลงในกระบอกตวงแต่ละอัน และปิเปต 5.0 mL ของสารละลาย PEG เข้มข้น 50% w/v และ 5.0 mL ของสารละลายเกลือเข้มข้น 50% w/v เติมนลงในแต่ละกระบอกตวง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้กระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทที่ความยาวคลื่น 265.5, 269.5 และ 275.5 nm คำนวณหาประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency, %E) จากสมการ

$$\%E = (V_i c_i / m_s) \times 100$$

โดย V_i = ปริมาตรของสารละลายวัฏภาคบน (mL)

c_i = ความเข้มข้นของโซเดียมเบนโซเอทในสารละลายวัฏภาคบน (mg/L)

m_s = ปริมาณของโซเดียมเบนโซเอทที่เติมลงไป ((mg/L)*mL)

การศึกษาผลของปริมาณ PEG และปริมาณของเกลือ

การศึกษาผลของปริมาณ PEG ทำโดยปิเปต 5.0 mL ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 200 mg/L ใส่ลงในหลอดทดลอง จำนวน 5 หลอด แล้วปิเปตสารละลาย PEG 1000 เข้มข้น 50% w/v โดยแปรค่าปริมาตรเป็น 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 mL ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด และปิเปต 5.0 mL ของสารละลายเกลือเข้มข้น 50% w/v ใส่ลงในทุกหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้กระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 265.5, 269.5 และ 275.5 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัด ส่วนการศึกษาผลของปริมาณเกลือให้ทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาผลของปริมาณ PEG โดยใช้ปริมาตรของสารละลาย PEG 1000 คงที่ 5.0 mL และแปรค่าปริมาตรของสารละลายเกลือเข้มข้น 50% w/v เป็น 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 mL ตามลำดับ

การศึกษาผลความเข้มข้นกรด-ด่างในสารละลายมาตรฐานที่มีต่อการสกัดเบนโซเอท

เตรียมสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 200 mg/L ในสารละลายกรด HCl หรือในสารละลาย NaOH โดยมีความเข้มข้นของกรดหรือเบสเป็น 0.02, 0.04, 0.06, 0.5 และ 1.0 M จากนั้นปิเปต 5.0 mL ของสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด จากนั้น ปิเปต 5.0 mL ของสารละลาย PEG 1000 เข้มข้น 50% w/v และปิเปต 5.0 mL ของสารละลายเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เข้มข้น 50% w/v ใส่ตามลงไป เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 265.5, 269.5 และ 275.5 เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทที่สกัดได้จากสารละลายมาตรฐานที่อยู่ในสภาวะของความเข้มข้นกรด-ด่าง ต่าง ๆ กัน

2.3.4 การศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายสำหรับการเตรียมตัวอย่าง

หัตถ์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว ได้แก่ ก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็ก ก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ และเส้นขนมจีน ให้มีขนาดเล็ก ๆ ซึ่งตัวอย่างละ 20.0 กรัม ใส่ลงในกระบอกตวง เติมสารละลายกรด HCl หรือสารละลาย NaOH ที่มีความเข้มข้นในช่วง 1.0 - 6.0 M จนครบปริมาตร 100 mL สังเกตการละลายของตัวอย่างและระยะเวลาที่ใช้ในการละลายตัวอย่าง ปิเปต 25.0 mL ของสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จากนั้นปิเปต 5.0 mL ของสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วนี้ใส่ลงในหลอดทดลอง และปิเปต 5.0 mL ของสารละลาย PEG 1000 เข้มข้น 50% w/v กับ 5.0 mL ของสารละลายเกลือเข้มข้น 50% w/v ใส่ตามลงไป ในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ สังเกตลักษณะของการแยกวัฏภาค

2.3.5 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปต 5.0 mL ของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 mg/L ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด และปิเปต 5.0 mL ของสารละลาย PEG 1000 เข้มข้น 50% w/v กับ 5.0 mL ของสารละลายเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เข้มข้น 50% w/v เติมน้ำในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกวัฏภาคอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 265.5, 269.5 และ 275.5 nm หาค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทที่สกัดได้ในชั้น PEG จากสมการ $A = \text{Abs}_{269.5} - [(\text{Abs}_{265.5} + \text{Abs}_{275.5})/2]$ ทำการทดลองสกัด 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้แต่ละระดับความเข้มข้น พล็อต กราฟ

มาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเบนโซเอท (ในรูปโซเดียมเบนโซเอท) กับค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, r^2)

การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น

หั่นตัวอย่างผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว ได้แก่ ก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็ก ก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ และเส้นขนมจีน ให้มีขนาดเล็ก ๆ ชั่งตัวอย่างละ 20.0 g ใส่ในกระบอกตวง เติมน้ำละลาย NaOH เข้มข้น 1.0 M ให้ได้ปริมาตร 100 mL ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้ตัวอย่างละลาย ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 25.0 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางนี้ 5.0 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง และปิเปต 5.0 mL ของสารละลาย PEG 1000 เข้มข้น 50% w/v กับ 5.0 mL ของสารละลายเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เข้มข้น 50% w/v ผสมลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกตัวอย่างสมบูรณ์ นำสารละลายวัฏภาคบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 265.5, 269.5 และ 275.5 nm และหาปริมาณเบนโซเอทโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การทดลองหาร้อยละการกลับคืนของการวิเคราะห์เบนโซเอททำโดยการเติมน้ำละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทผสมลงในขั้นตอนการแช่ตัวอย่าง 20.0 g ในสารละลาย NaOH เข้มข้น 1.0 M และทดลองขั้นตอนต่อไปตามวิธีในหัวข้อการวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น

การวิเคราะห์ปริมาณเบนโซเอทโดยวิธีมาตรฐาน AOAC 47.3.03

สร้างกราฟมาตรฐานของกรดเบนโซอิกโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิก (Stock standard solution) เข้มข้น 1000 mg/L ในตัวทำละลายอีเทอร์ ปิเปต 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 mL ของสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิกเข้มข้น 1000 mg/L ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรแต่ละใบ แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 mL ด้วยอีเทอร์ จะได้สารละลายกรดเบนโซอิกเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 mg/L ตามลำดับ นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้นี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 267.5, 272 และ 276.5 nm และคำนวณหาปริมาณการดูดกลืนแสงโดยอาศัย Baseline technique จากสมการ $A = \text{Abs}_{272} - [(\text{Abs}_{267.5} + \text{Abs}_{276.5})/2]$ พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกรดเบนโซอิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้

เตรียมตัวอย่างโดยหั่นผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งตัวอย่าง 10.0 g ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำละลายอิ่มตัวของ NaCl ปริมาตร 200 mL ซึ่งจะช่วยตกตะกอนสารอาหารที่ไม่ต้องการออกไป สำหรับกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอทยังคงละลายอยู่

ในสารละลาย ทำสารละลายตัวอย่างให้เป็นกรดด้วยกรด HCl เข้มข้น ทดสอบความเป็นกรดด้วยกระดาษลิตมัส สกัดสารละลายตัวอย่างด้วยอีเทอร์ 4 ครั้งโดยใช้ปริมาตร 70, 50, 40 และ 30 mL ตามลำดับ นำส่วนอีเทอร์ที่สกัดได้ทั้งหมดรวมกัน ล้างด้วยสารละลายกรด HCl เข้มข้น 1:1000 จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ปริมาตร 50, 40 และ 30 mL ตามลำดับ และทิ้งสารละลายกรดที่ใช้ล้างไป นำส่วนอีเทอร์ที่ล้างด้วยกรดแล้วไปลงในขวดวัดปริมาตร แล้วปรับปริมาตรครบ 200 mL ด้วยอีเทอร์ นำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 267.5, 272 และ 276.5 nm และคำนวณหาปริมาณการดูดกลืนแสงจากสมการ $A = \text{Abs}_{272} - [(\text{Abs}_{267.5} + \text{Abs}_{276.5})/2]$ หาปริมาณกรด เบนโซอิกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน หากต้องการคำนวณให้อยู่ในรูปโซเดียมเบนโซเอทให้คูณด้วย 1.18

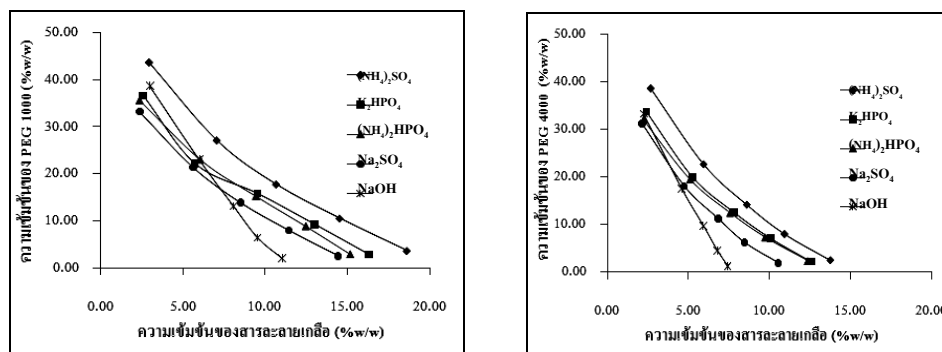
การศึกษาผลการรบกวนจากโพแทสเซียมซอร์เบทและโซเดียมซัลไฟต์

เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 200 mg/L ให้มีส่วนผสมของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบทเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 mg/L หรือมีส่วนผสมของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์เข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mg/L ทำการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคตามวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ แล้วเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับค่าการดูดกลืนแสงของส่วนที่สกัดได้จากสารละลายมาตรฐานเบนโซเอทเข้มข้น 200 mg/L ที่ไม่ได้เติมสารรบกวนใด ๆ

3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

การศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG กลีออลินทรีซ และน้ำ ด้วยวิธีการไทเทรตแบบ turbidometry โดยเติมน้ำลงในสารละลายที่มีลักษณะขุ่น จนกระทั่งได้สารละลายวัฏภาคเดียวที่มีลักษณะใส ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะทำการหาจุดที่อยู่บนเส้นแบ่งวัฏภาค (binodal curve) ทั้งหมด 5 จุด ทดลองโดยแปรเปลี่ยนชนิดของกลีออลและน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1



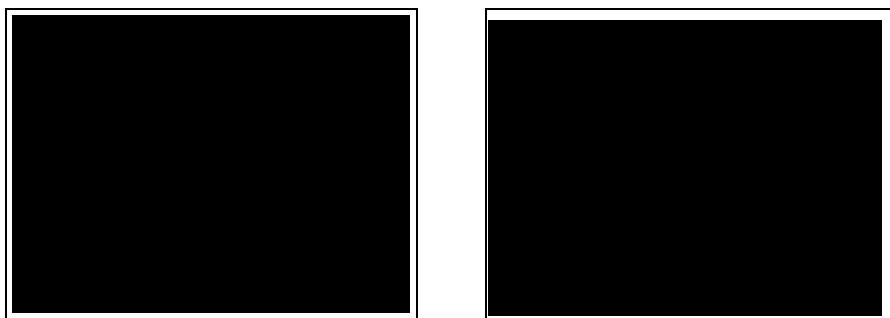
รูปที่ 1. แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG 1000-เกลืออนินทรีย์-น้ำ (ก)
และแผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG 4000-เกลืออนินทรีย์-น้ำ (ข)

จากการศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค พบว่าในวัฏภาคบนจะมีองค์ประกอบของ PEG อยู่มาก ในขณะที่วัฏภาคล่างจะมีองค์ประกอบของเกลืออนินทรีย์อยู่มาก PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 400 ไม่สามารถทำให้เกิดการแยกวัฏภาคได้ในสภาวะการทดลองเดียวกันนี้ เนื่องจาก PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีโครงสร้างโมเลกุลขนาดเล็กและมีสภาพขั้วที่สามารถมีแรงกระทำกับโมเลกุลของน้ำได้ดีกว่า PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่มีผลต่อการเกิดวัฏภาค พบว่าเมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นจะใช้ความเข้มข้นของเกลือลดลงเพื่อทำให้เกิดการแยกวัฏภาค [32] และเส้นแบ่งวัฏภาคที่ได้จะไม่สมมาตร

แผนภาพวัฏภาคของระบบที่ประกอบด้วย PEG และเกลืออนินทรีย์ที่ทำการทดลองนี้ พบว่าความสามารถของเกลืออนินทรีย์ต่อการแยกวัฏภาคมีลำดับดังนี้ $\text{Na}_2\text{SO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \approx \text{K}_2\text{HPO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ [33] เมื่อเปรียบเทียบเกลือที่มีประจุบวกเป็น NH_4^+ เหมือนกัน พบว่าเมื่อเกลือมีไอออนลบเป็น HPO_4^{2-} ให้ประสิทธิภาพของการเกิดการแยกเป็นสองวัฏภาคดีกว่าเมื่อไอออนลบเป็น SO_4^{2-} เมื่อเปรียบเทียบเกลือที่มีไอออนลบเป็น HPO_4^{2-} เหมือนกัน พบว่าเกลือที่มีประจุบวกเป็น NH_4^+ และ K^+ จะให้ประสิทธิภาพของการเกิดการแยกเป็นสองวัฏภาคใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบเกลือที่มีไอออนลบเป็น SO_4^{2-} เหมือนกัน พบว่าเกลือที่มีประจุบวกเป็น Na^+ จะให้ประสิทธิภาพของการเกิดการแยกเป็นสองวัฏภาคดีกว่าเกลือที่มีประจุบวกเป็น NH_4^+ โดยที่เกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ เกิดการไฮโดรไลซิสง่ายและได้แก๊สแอมโมเนียออกมา ส่วนเกลือ Na_2SO_4 ละลายน้ำได้น้อย (19.5 g ต่อ น้ำ 100 g ที่อุณหภูมิ 20°C) และ NaOH ไม่เหมาะต่อการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เพราะมีตะกอนสีขาวเกิดขึ้นในขณะที่เกิดการแยกวัฏภาค ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ประกอบด้วย PEG น้ำหนักโมเลกุล 1000 และ 4000 กับเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และเกลือ K_2HPO_4 เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.2 การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เบนโซเอท

สเปกตรัมของเบนโซเอทที่สกัดได้ในวัฏภาคบนซึ่งเป็นชั้นของ PEG สแกนเทียบกับสารละลายแบบลงค์ คือ น้ำ DI ที่ผ่านกระบวนการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค แสดงดังรูปที่ 2 จากสเปกตรัมที่ได้แสดงให้เห็นว่าเบนโซเอทที่สกัดได้ในชั้นของ PEG ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นพีคในช่วงความยาวคลื่น 265.5 ถึง 275.5 nm โดยมียอดพีคที่ความยาวคลื่น 269.5 nm ในการทดลองนี้ใช้ baseline technique เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทในชั้น PEG โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นไปตามสมการ $A = \text{Abs}_{269.5} - [(\text{Abs}_{265.5} + \text{Abs}_{275.5})/2]$



รูปที่ 2. สเปกตรัมของเบนโซเอทที่สกัดได้ในชั้นของ PEG1000 โดยในระบบ

สารละลายน้ำสองวัฏภาคใช้สารละลายเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ก) และสารละลายเกลือ K_2HPO_4 (ข) (ความเข้มข้นโซเดียมเบนโซเอทเพิ่มขึ้นจากล่างขึ้นบน)

3.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

พฤติกรรมของการแยกของตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะขึ้นอยู่กับลักษณะของระบบ เช่น ความเข้มข้นของเกลือ ชนิดของเกลือ น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ และขึ้นอยู่กับคุณสมบัติการไฮโดรชันของตัวถูกละลาย ซึ่งประสิทธิภาพการสกัดของตัวถูกละลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อการไฮโดรชันของตัวถูกละลายลดลง [34-37] ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาค้นคว้าปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเบนโซเอท ดังต่อไปนี้

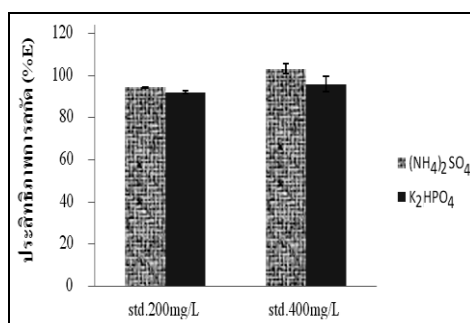
3.3.1 ผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PEG และชนิดของเกลือ

ทำการสกัดสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอท ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคระหว่างสารละลาย PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กับสารละลายเกลือต่างชนิดกัน ได้ผลการทดลองเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. ผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PEG และชนิดเกลือที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอท (n = 6)

น้ำหนักโมเลกุล ของ PEG	ชนิด สารละลาย เกลือ	ประสิทธิภาพการสกัด (%E)	
		ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท	
		200 mg/L	400 mg/L
1000	(NH ₄) ₂ SO ₄	94.36 ± 0.26	103.21 ± 0.78
4000	(NH ₄) ₂ SO ₄	68.87 ± 1.32	95.14 ± 0.31
1000	K ₂ HPO ₄	92.04 ± 2.32	92.04 ± 3.79
4000	K ₂ HPO ₄	82.42 ± 0.98	82.42 ± 1.58

จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า PEG 1000 ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่า PEG 4000 ในสารละลายเกลือ (NH₄)₂SO₄ ซึ่งเป็นเกลือที่เกิดจากเบสอ่อนกับกรดแก่จะมีสภาวะสารละลายเป็นกรด (pH ≈ 5) ทำให้เบนโซเอทอยู่ในรูปโมเลกุลกรดเบนโซอิกที่สามารถเกิดเป็นไดเมอร์ซึ่งมีทั้งส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิกและส่วนที่เป็นไฮโดรฟิลิกที่น่าจะมีสภาพขั้วใกล้เคียงกับ PEG 1000 มากกว่า PEG 4000 โดยที่ PEG 4000 มีส่วนของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนซึ่งเป็นส่วนของไฮโดรโฟบิกยาวมากกว่า PEG 1000 ทำให้ PEG 4000 มีสภาพขั้วน้อยกว่า PEG 1000 ดังนั้นในวัฏภาคบนของ PEG 1000 ที่มีสภาพขั้วมากกว่าจะมีปริมาณน้ำมากกว่าซึ่งสามารถละลายเบนโซเอทได้อ่อนได้ดีกว่า ทำให้การสกัดเบนโซเอทด้วย PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีประสิทธิภาพสูงกว่า ส่วนสารละลายเกลือ K₂HPO₄ ซึ่งเป็นเกลือที่เกิดจากเบสแก่กับกรดอ่อนจะมีสภาวะของสารละลายเป็นเบส (pH ≈ 9) เบนโซเอทจะอยู่ในรูปของเบนโซเอทไอออนที่ถูกสกัดเข้าสู่ชั้นของสารละลาย PEG ได้เช่นกัน ดังนั้นไม่ว่าจะใช้เกลือ (NH₄)₂SO₄ หรือเกลือ K₂HPO₄ ก็จะทำให้ผลการทดลองเหมือนกัน คือการใช้ PEG 1000 ในการสกัดจะให้ประสิทธิภาพการสกัดดีกว่าการใช้ PEG 4000 โดยที่เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของ PEG เพิ่มขึ้นจะทำให้แนวโน้มความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น ซึ่งความหนืดที่เพิ่มขึ้นนี้อาจจะมีผลทำให้เบนโซเอทถูกสกัดเข้าไปในชั้นของสารละลายพอลิเมอร์ได้ยากขึ้น จากผลทดลองนี้จึงเลือกใช้ PEG 1000 เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

รูปที่ 3. ประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอท เปรียบเทียบผลการใช้ (NH₄)₂SO₄ กับ K₂HPO₄ เมื่อใช้สารละลาย PEG 1000

ประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอทในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้สารละลาย PEG 1000 เปรียบเทียบระหว่างการใส่สารละลายเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ กับ K_2HPO_4 แสดงดังรูปที่ 3 ปรากฏว่าการใส่สารละลายเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ให้ประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอทสูงกว่าและมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่าการใช้สารละลายเกลือ K_2HPO_4

3.3.2 ผลของปริมาณ PEG

ผลการทดลองที่ใช้สารละลายเกลือทั้งสองชนิดกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทมีปริมาตรคงที่ 5.0 mL แปรค่าปริมาตรของสารละลาย PEG 1000 ในช่วง 4.0 – 10.0 mL ได้ประสิทธิภาพการสกัดแสดงในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ปริมาตรของสารละลาย PEG 4.0 mL ทำให้ได้ประสิทธิภาพการสกัดต่ำกว่าการใช้ปริมาตรของสารละลาย PEG 5.0 mL เนื่องจากวัฏภาคบนซึ่งเป็นชั้นของ PEG มีปริมาตรน้อย อาจทำให้มีปริมาตรไม่เพียงพอที่จะสกัดเบนโซเอทเข้าไปอยู่ในชั้นของ PEG ได้ทั้งหมด และเมื่อใช้ปริมาตรสารละลาย PEG ในช่วง 6.0-10.0 mL ทำให้ได้ประสิทธิภาพการสกัดต่ำเช่นกัน เมื่อใช้ปริมาตรของสารละลาย PEG เป็น 5.0 mL จะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด จึงเลือกใช้ปริมาตรนี้สำหรับการสกัดเบนโซเอทต่อไป โดยอัตราส่วนเชิงปริมาตรของสารละลาย PEG : สารละลายเกลือ : สารละลายตัวอย่าง เป็น 1:1:1

ตารางที่ 3. ผลของปริมาณ PEG ที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอท (n = 6)

ปริมาตรของสารละลาย (mL)		ประสิทธิภาพการสกัด (%E)	
สารละลาย	สารละลาย	สารละลายเกลือ	สารละลายเกลือ
PEG 1000	เกลือ	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	K_2HPO_4
4.0	5.0	65.25 ± 0.38	98.39 ± 0.31
5.0	5.0	103.18 ± 0.42	103.76 ± 0.22
6.0	5.0	91.99 ± 0.34	83.37 ± 0.20
8.0	5.0	76.33 ± 0.34	83.37 ± 0.25
10.0	5.0	88.15 ± 0.34	81.66 ± 3.60

3.3.3 ผลของปริมาณเกลือ

เมื่อทดลองโดยให้สารละลาย PEG 1000 กับสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทมีปริมาตรคงที่ 5.0 mL แปรค่าปริมาตรของสารละลายเกลือในช่วง 4.0 – 10.0 mL ได้ผลประสิทธิภาพการสกัดแสดงดังตารางที่ 4 พบว่าประสิทธิภาพการสกัดจะต่ำเมื่อใช้เกลือปริมาณน้อย และเมื่อใช้ปริมาณของเกลือมากขึ้นในช่วงปริมาตรของสารละลายเกลือเป็น 5.0-10.0 mL จะทำให้ได้ประสิทธิภาพการสกัด

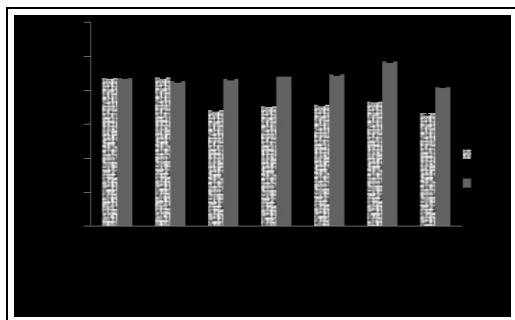
เพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน ถึงแม้ว่าปริมาณเกลือจะเพิ่มสูงขึ้นแต่ประสิทธิภาพการสกัดก็ไม่แตกต่างกันนัก จึงเลือกใช้ปริมาตรของสารละลายเกลือเป็น 5.0 mL สำหรับทดลองต่อไป

ตารางที่ 4. ผลของปริมาณเกลือที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดเบนโซเอท (n = 6)

ปริมาตรของสารละลาย (mL)		ประสิทธิภาพการสกัด (%E)	
สารละลาย	สารละลาย	สารละลายเกลือ	สารละลายเกลือ
PEG 1000	เกลือ	(NH ₄) ₂ SO ₄	K ₂ HPO ₄
5.0	4.0	96.69 ± 0.37	75.06 ± 0.02
5.0	5.0	103.18 ± 0.16	103.76 ± 0.22
5.0	6.0	108.08 ± 0.43	109.18 ± 0.67
5.0	8.0	109.23 ± 0.42	100.85 ± 0.75
5.0	10.0	108.39 ± 0.32	103.82 ± 0.12

3.3.4 ผลความเข้มข้นกรด-ด่างในสารละลายมาตรฐานที่มีต่อการสกัดเบนโซเอท

การสกัดสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทความเข้มข้น 200 mg/L ที่เตรียมในสารละลายกรด HCl หรือสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.5 และ 1.0 M โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ประกอบด้วยสารละลาย PEG 1000 และสารละลายเกลือ (NH₄)₂SO₄ เมื่อนำสารละลายวัฏภาคส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอท ได้ผลการทดลองเปรียบเทียบได้ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทที่ได้จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานในสารละลาย HCl ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าที่เตรียมในสารละลาย NaOH ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัดเบนโซเอทในสภาวะที่เป็นกรดอยู่ในรูปเบนโซเอทไอออนจะมีประสิทธิภาพมากกว่าการสกัดที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดซึ่งอยู่ในรูปโมเลกุลของกรดเบนโซอิก จะเห็นได้ว่าสภาวะความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการสกัด ในการทดลองนี้เลือกทำการสกัดเบนโซเอทในสภาวะที่เป็นเบส โดยจะทดลองผลของการเตรียมสารตัวอย่างในสารละลาย NaOH ต่อไป



รูปที่ 4. ค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทเข้มข้น 200 mg/L ที่สกัดได้จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานในสารละลายกรด HCl หรือสารละลาย NaOH ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายสำหรับการเตรียมตัวอย่าง

จากการทดลองใช้สารละลายกรด HCl หรือสารละลาย NaOH เข้มข้นในช่วง 1.0 - 6.0 M เพื่อเตรียมตัวอย่างก่อนนำมาทำการสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค พบว่าสารละลายกรด HCl เข้มข้น 6.0 M สามารถละลายตัวอย่างได้หมดในเวลา 20 นาที ได้ลักษณะของตัวอย่างเป็นคอลลอยด์สีขาวขุ่น และสารละลาย NaOH เข้มข้น 1.0 M สามารถละลายตัวอย่างได้หมดในเวลา 20 นาที ได้ลักษณะของตัวอย่างเป็นคอลลอยด์สีขาวขุ่นมีตะกอนนอนก้นอยู่ลักษณะเหมือนแป้งเปียกสีเหลือง ส่วนสารละลายกรด HCl เข้มข้น 1.0-5.0 M และสารละลาย NaOH เข้มข้น 2.0-6.0 M ไม่สามารถละลายตัวอย่างได้ เมื่อนำตัวอย่างที่เตรียมได้มาผ่านขั้นตอนการกรองแยกด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าการใช้สำลี กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เยื่อกรอง (membrane) ความละเอียด 0.45 μm และการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ไม่สามารถใช้กรองแยกคอลลอยด์ออกจากตัวอย่างได้ หลังจากการกรองแล้วยังคงได้ตัวอย่างที่มีลักษณะขุ่น จากนั้นทดลองนำตัวอย่างที่เตรียมได้โดยไม่ผ่านขั้นตอนการกรองแยกมาทำการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาค พบว่าสารตัวอย่างที่เตรียมในสารละลายกรด HCl ไม่สามารถเกิดการแยกวัฏภาคได้ เนื่องจากสารละลายกรด HCl เข้มข้น 6.0 M เป็นกรดแก่ที่มีความเข้มข้นกรดมากเกินไปซึ่งส่งผลต่อลักษณะของการแยกวัฏภาคที่ขึ้นกับค่า pH ด้วย ส่วนสารตัวอย่างที่เตรียมในสารละลาย NaOH เข้มข้น 1.0 M สามารถเกิดการแยกวัฏภาคได้และเกิดตะกอนมีลักษณะเป็นแผ่นสีขาวเกิดขึ้นตรงผิวระหว่างวัฏภาค (interface layer) ดังแสดงในรูปที่ 5 การเกิดแผ่นตะกอนสีขาวนี้ทำให้ได้วัฏภาคบนมีลักษณะเป็นสารละลายใสและมีปริมาณเพียงพอที่จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ ในการทดลองนี้จึงได้เลือกสารละลาย NaOH เข้มข้น 1.0 M สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว



(ก) (ข) (ค)

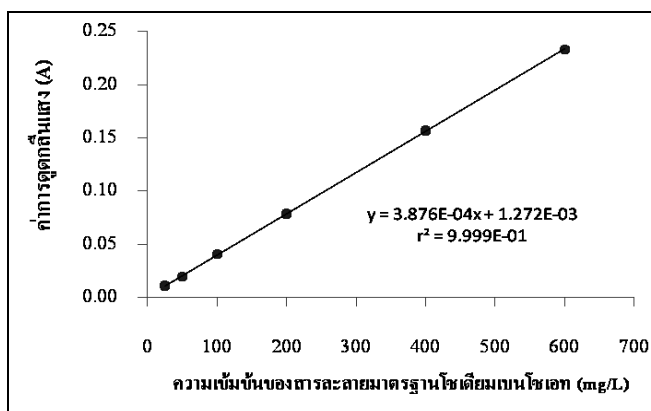
รูปที่ 5. ลักษณะของสารตัวอย่างที่เตรียมได้โดยใช้สารละลาย NaOH เข้มข้น 1.0 M (ก)

และเติมสารละลาย PEG 1000 (ข) ตามด้วยสารละลายเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ค) ตามลำดับ

3.5 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

3.5.1 กราฟมาตรฐาน

การสกัดสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอตด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ประกอบด้วยสารละลาย PEG 1000 และสารละลายเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ให้ค่าการดูดกลืนแสงซึ่งนำไปพลอตกราฟมาตรฐานของสารละลายโซเดียมเบนโซเอตได้ดังรูปที่ 6 พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 25-600 mg/L ได้สมการเส้นตรงคือ $y = (3.876 \times 10^{-4})x + (1.272 \times 10^{-3})$ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.9999 จากกราฟมาตรฐานนี้สามารถคำนวณหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD; $y = y_B + 3S_B$) ได้เท่ากับ 8.80 mg/L และคำนวณหาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantification, LOQ; $y = y_B + 10S_B$) ได้เท่ากับ 29.34 mg/L



รูปที่ 6. กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมเบนโซเอตในช่วงความเข้มข้น 25-600 mg/L

3.5.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมเบนโซเอตในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอต (ในรูปโซเดียมเบนโซเอต) เปรียบเทียบกันระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน AOAC 47.3.03 แสดงดังตารางที่ 5 ได้ค่าทางสถิติ paired t-test ที่แสดงให้เห็นว่าผลการวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($t_{\text{observed}} = -0.14$, $t_{\text{critical}} = 2.57$) วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงที่แสดงด้วยค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าในช่วง 0.09-0.94% ส่วนความแม่นยำแสดงด้วยค่าร้อยละการกลับคืนมีค่าในช่วง 96.21-103.76% ดังผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทในตัวอย่างเส้นแปรรูปจากข้าว ($\bar{X} \pm SD$, n = 3)

ชนิดของตัวอย่าง	วิธีที่พัฒนาขึ้น		วิธีมาตรฐาน AOAC	
	ปริมาณเบนโซเอท ที่วิเคราะห์ได้ (mg/kg)	%RSD	ปริมาณเบนโซเอท ที่วิเคราะห์ได้ (mg/kg)	%RSD
ขนมจีน 1	516.41 $\pm$ 1.36	0.26	513.28 $\pm$ 4.29	0.84
ขนมจีน 2	580.59 $\pm$ 0.49	0.09	577.27 $\pm$ 2.53	0.44
ก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็ก 1	440.57 $\pm$ 4.10	0.94	437.27 $\pm$ 4.51	1.01
ก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็ก 2	ND	-	ND	-
ก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ 1	721.37 $\pm$ 4.58	0.64	726.13 $\pm$ 4.03	0.56
ก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ 2	822.80 $\pm$ 4.69	0.57	826.52 $\pm$ 1.50	0.18

หมายเหตุ ND = Not detected

ตารางที่ 6. ค่าร้อยละการกลับคืนของการวิเคราะห์เบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น เบนโซเอท ที่เติม (mg/L)	วิธีที่พัฒนาขึ้น		วิธีมาตรฐาน AOAC	
		ความเข้มข้น เบนโซเอทที่พบ (mg/L)	ร้อยละ การกลับคืน	ความเข้มข้น เบนโซเอทที่พบ (mg/L)	ร้อยละ การกลับคืน
ขนมจีน 1	-	51.75	-	51.42	-
	200	252.12	100.35	250.02	99.30
	300	345.72	98.10	347.53	98.70
ขนมจีน 2	-	58.12	-	57.74	-
	200	253.53	97.70	254.01	98.14
	300	362.82	101.57	352.56	98.27
ก๋วยเตี๋ยว เส้นเล็ก 1	-	44.14	-	43.80	-
	200	240.60	98.61	242.08	99.14
	300	350.27	102.30	340.93	99.04
ก๋วยเตี๋ยว เส้นเล็ก 2	-	ND	-	ND	-
	200	204.39	102.20	204.07	102.04
	300	311.28	103.76	309.09	103.03
ก๋วยเตี๋ยว เส้นใหญ่ 1	-	72.31	-	72.84	-
	200	276.36	102.02	270.83	99.00
	300	360.94	96.21	367.38	98.18
ก๋วยเตี๋ยว เส้นใหญ่ 2	-	82.46	-	83.00	-
	200	286.75	102.15	282.11	99.55
	300	384.96	100.83	380.62	99.21

3.5.3 ผลการรบกวนจากโพแทสเซียมซอร์เบทและโซเดียมซัลไฟด์

โซเดียมเบนโซเอทซึ่งอยู่ในสภาพเกลือสามารถละลายน้ำได้ดีกว่ากรดเบนโซอิก จึงนิยมใช้โซเดียมเบนโซเอทเป็นวัตถุกันเสียในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว ช่วยป้องกันการเน่าเสียโดยขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย แต่มีข้อเสียคือจะทำให้สีของอาหารเปลี่ยนแปลงเร็วขึ้น การใช้โซเดียมหรือโพแทสเซียมเมทาไบซัลไฟด์จะช่วยคงสีของอาหารได้โดยซัลเฟอร์จะมีผลต่อสปอร์เชื้อราและแบคทีเรียมากกว่ายีสต์ ดังนั้นการใช้ร่วมกับโซเดียมเบนโซเอทซึ่งมีผลต่อยีสต์จึงทำหน้าที่เป็นวัตถุกันเสียได้ดี โดยทั่วไปซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะระเหยไปกับไอน้ำถึงร้อยละ 90 ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่อนุญาตให้มีได้ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [1] โพแทสเซียมซอร์เบทใช้เป็นวัตถุกันเสียด้วยเช่นกันแต่ไม่ค่อยนิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลกระทบที่อาจจะมีต่อวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นจากการรบกวนของวัตถุกันเสียชนิดอื่นคือโพแทสเซียมซอร์เบทและโซเดียมซัลไฟด์ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของโซเดียมเมทาไบซัลไฟด์ โดยทั้งซัลไฟด์ไอออนและเมทาไบซัลไฟด์ไอออนเป็นอนุพันธ์ของซัลเฟอร์ไดออกไซด์เหมือนกัน ทำการทดลองโดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทที่สกัดได้จากสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 200 mg/L กับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการสกัดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นเดียวกันซึ่งเดิมสารที่อาจเป็นสารรบกวนลงไป เพื่อหาระดับปริมาณของสารรบกวนที่สามารถปนอยู่ในสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท 200 mg/L ได้โดยไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้เปลี่ยนแปลงไป (Tolerance limit) อยู่ในช่วงสามเท่าของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\pm 3SD$) ของค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 200 mg/L ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าระดับปริมาณของสารรบกวนที่สามารถปนอยู่ในสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอทเข้มข้น 200 mg/L ได้โดยไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้เปลี่ยนแปลงไป คือความเข้มข้นของโพแทสเซียมซอร์เบทเท่ากับ 100 mg/L และความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟด์เท่ากับ 10 mg/L

ตารางที่ 7. ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาผลรบกวนการสกัดสารละลายมาตรฐานโซเดียมเบนโซเอท เข้มข้น 200 mg/L

สารละลายที่ใช้สกัด	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	การประเมิน ค่าการดูดกลืนแสง
โซเดียมเบนโซเอท	$\bar{X} \pm 3SD$ (n = 10) = 0.0822 $\pm$ 0.0042	ช่วง limit = 0.0780 ถึง 0.0864
โซเดียมเบนโซเอท + โพแทสเซียมซอร์เบต 50 mg/L	0.0834 (n = 3)	อยู่ในช่วง limit
โซเดียมเบนโซเอท + โพแทสเซียมซอร์เบต 100 mg/L	0.0856 (n = 3)	อยู่ในช่วง limit
โซเดียมเบนโซเอท + โพแทสเซียมซอร์เบต 200 mg/L	0.0877 (n = 3)	เกิน limit
โซเดียมเบนโซเอท + โพแทสเซียมซอร์เบต 400 mg/L	0.0897 (n = 3)	เกิน limit
โซเดียมเบนโซเอท + โซเดียมซัลไฟด์ 5 mg/L	0.0803 (n = 3)	อยู่ในช่วง limit
โซเดียมเบนโซเอท + โซเดียมซัลไฟด์ 10 mg/L	0.0796 (n = 3)	อยู่ในช่วง limit
โซเดียมเบนโซเอท + โซเดียมซัลไฟด์ 15 mg/L	0.0756 (n = 3)	เกิน limit
โซเดียมเบนโซเอท + โซเดียมซัลไฟด์ 20 mg/L	0.0725 (n = 3)	เกิน limit

4. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาการใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG กับเกลืออนินทรีย์ เพื่อใช้สกัดเบนโซเอทจากผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าว และตรวจวัดด้วยเทคนิค สเปกโตรโฟโตเมทรี ซึ่งการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับสกัดเบนโซเอท พบว่าการใช้ระบบที่มีสัดส่วนเชิงปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง : สารละลาย PEG 1000 เข้มข้น 50% w/v : สารละลายเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ เข้มข้น 50% w/v เป็น 1:1:1 มีความเหมาะสมมากที่สุด ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงและมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่มากนัก สเปกตรัมที่สแกนได้จากสารละลาย PEG ซึ่งเป็นวัฏภาคส่วนบนที่มีลักษณะใส ปรากฏพีการดูดกลืนแสงของเบนโซเอทในช่วงความยาวคลื่น 265.5 ถึง 275.5 nm โดยมียอดพีคที่ความยาวคลื่น 269.5 nm ในการทดลองนี้เลือกใช้ baseline technique เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโซเดียมเบนโซเอทในชั้น PEG โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็นไปตามสมการ $A = Abs_{269.5} - [(Abs_{265.5} + Abs_{275.5})/2]$ ทำการเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวโดยแช่ในในสารละลาย NaOH เข้มข้น 1.0 M วิธีการสกัดเบนโซเอทด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์โซเดียมเบนโซเอทในผลิตภัณฑ์เส้นแปรรูปจากข้าวได้ โดยมีคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์สรุปได้ดังตารางที่ 8 และมีข้อดีกว่าวิธีมาตรฐาน AOAC 47.3.03 คือมีขั้นตอนการทดลองที่ไม่ยุ่งยากและไม่ต้องใช้ไอเทอร์ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยง่าย เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 8. คุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเบนโซเอทโดยสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

พารามิเตอร์	ค่า
สมการเส้นตรง	$y = (3.876 \times 10^{-4})x + (1.272 \times 10^{-3})$
สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2)	0.9999
ช่วงความเป็นเส้นตรง	25-600 mg/L
ขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD)	8.80 mg/L
ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ)	29.34 mg/L
ร้อยละการกลับคืน (%Recovery)	96.21-103.76%
%RSD	0.09-0.94%

เอกสารอ้างอิง

- [1] ศจี สุวรรณศรี และ ปุณขริกา รัตนธัญวงศ์, 2549. การผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยวและขนมจีนจากข้าว, คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- [2] Branen, A.L., Davidson, P.M. and Salminen, S., 1990. Food Additives, Marcel Dekker, New York.
- [3] Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. and Thorngate III, J.H., 2002. Food Additives, Marcel Dekker, New York.
- [4] กระทรวงสาธารณสุข, 2547. วัตถุเจือปนอาหาร, ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281.
- [5] AOAC International, 1995. Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed., Arlington VA, Volume 2 Chapter 47 p.8.
- [6] Kompany-Zareh, M. and Mirzaei, S., 2004. Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of pseudoephedrine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, and sodium benzoate in syrups using wavelength selection by net analyte signals calculated with hybrid linear analysis. *Anal. Chim. Acta*, 526, 83-94.
- [7] Ahmad, I. and Vaid, F.H., 2009. Determination of benzoic acid and salicylic acid in commercial benzoic and salicylic acids ointments by spectrophotometric method. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22 (1), 18-22.
- [8] Chen, Y.Q. and Ni, Y.N., 2009. Simultaneous spectrophotometric determination of four preservatives in foodstuffs by multivariate calibration and artificial neural networks. *Chin. Chem. Lett.*, 20 (5), 615-619.

- [9] Guerra, R.M., Marín, M.L., Sánchez, A. and Jiménez, A., 2002. Analysis of citrates and benzoates used in poly(vinyl chloride) by supercritical fluid extraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 950, 31-39.
- [10] González, M., Gallego, M. and Valcárcel, M., 1999. Gas chromatographic flow method for preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods. *J. Chromatogr. A*, 848, 529-536.
- [11] Pan, Z., Wang, L., Mo, W., Wang, C., Hu, W. and Zhang, J., 2005. Determination of benzoic acid in soft drinks by gas chromatography with on-line pyrolytic methylation technique. *Anal. Chim. Acta*, 545, 218-223.
- [12] Dong, C. and Wang, W., 2006. Headspace solid-phase microextraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in beverages. *Anal. Chim. Acta*, 562, 23-29.
- [13] Wang, L., Zhang, X., Wang, Y. and Wang, W., 2006. 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*, 577, 62-67.
- [14] Pylypiw Jr., H.M. and Grether, M.T., 2000. Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *J. Chromatogr. A*, 883, 299-304.
- [15] Ferreira, I.M.P.L.V.O., Mendes, E., Brito, P. and Ferreira, M.A., 2000. Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC. *Food Research International*, 33, 113-117.
- [16] Tfouni, S.A.V. and Toledo, M.C.F., 2002. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food Control*, 13, 117-123.
- [17] Abe-Onishi, Y., Yomota, C., Sugimoto, N., Kubota, H. and Tanamoto, K., 2004. Determination of benzoyl peroxide and benzoic acid in wheat flour by high-performance liquid chromatography and its identification by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1040, 209-214.

- [18] Saad, B., Bari, Md. F., Saleh, M.I., Ahmad, K. and Talib, M.K.M., 2005. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1073, 393-397.
- [19] Diamond, A.D. and Hsu, J.T., 1992. Aqueous Two-Phase Systems for Biomolecule Separation, in *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, Volume 47, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [20] Chethana, S., Nayak, C.A. and Raghavarao, K.S.M.S., 2007. Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *J. Food Engineering*, 81, 679-687.
- [21] Albertsson, P., 1986. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 3rd ed., Wiley, New York.
- [22] Walter, H., Brooks, D.E. and Fisher, D., 1985. *Partitioning in Aqueous Two Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology*, Academic Press, Orlando, FL.
- [23] Huddleston, J.G., Willauer, H.D., Boaz, K.R. and Rogers, R.D., 1998. Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins. *J. Chromatogr. B*, 711, 237-244.
- [24] Hatti-Kaul, R., 2000. *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa NJ.
- [25] Akama, Y. and Sali, A., 2002. Extraction mechanism of Cr(VI) on the aqueous two-phase system of tetrabutylammonium bromide and (NH₄)₂SO₄ mixture. *Talanta*, 57, 681-686.
- [26] Yoshikuni, N., Baba, T., Tsunoda, N. and Oguma, K., 2005. Aqueous two-phase extraction of nickel dimethylglyoximate complex and its application to spectrophotometric determination of nickel in stainless steel. *Talanta*, 66, 40-44.
- [27] Tong, A.J., Dong, J.J. and Li, L.D., 1999. Aqueous two-phase extraction system of sodium perfluorooctanoate and dodecyltriethylammonium bromide mixture and its application to porphyrins and dyes. *Anal. Chim. Acta*, 390, 125-131.
- [28] Rogers, R.D., Willauer, H.D., Griffin, S.T. and Huddleston, J.G., 1998. Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic systems. *J. Chromatogr. B*, 711, 255-263.
- [29] He, C., Li, S., Liu, H., Li, K. and Liu, F., 2005. Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. *J. Chromatogr. A*, 1082, 143-149.

- [30] Liu, H., He, C., Wen, D., Liu, H., Liu, F. and Li, K., 2006. Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using 2-propanol-salt-H₂O system. *Anal. Chim. Acta*, 557, 329-336.
- [31] Agasøster, T., 1998. Aqueous two-phase partitioning sample preparation prior to liquid chromatography of hydrophilic drugs in blood. *J. Chromatogr. B*, 716, 293-298.
- [32] Albertsson, P., 1960. Partition of Cell Particles and Macromolecules, Almqvist & Wiksells, Stockholm.
- [33] Li, S., He, C., Gao, F., Li, D., Chen, Z., Liu, H., Li, K. and Liu, F., 2007. Extraction and determination of morphine in compound liquorice using an aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol)/K₂HPO₄ coupled with HPLC. *Talanta*, 71, 784-789.
- [34] Visser, A.E., Griffin, S.T., Ingenito, C.C., Hartman, D.H., Huddleston, J.G. and Rogers, R.D., 2000. Aqueous biphasic systems as a novel environmentally benign separation technology for metal ion removal. *Metal Sep. Technol. Beyond*, 119-130.
- [35] Rogers, R.D., Bond, A.H., Bauer, C.B., Zhang, J. and Griffin, S.T., 1996. Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems: correlation of partitioning behavior with available thermodynamic hydration data. *J. Chromatogr. B*, 680, 221-229.
- [36] Zaslavsky, B.Y., Gulaeva, N.D., Djafarov, S., Masimov, E.A. and Miheeva, L.M., 1990. Phase separation in aqueous poly(ethylene glycol)-(NH₄)₂SO₄ systems and some physicochemical properties of the phases. *J. Colloid Interface Sci.*, 137, 147-156.
- [37] Gupta, V., Nath, S. and Chand, S., 2002. Role of water structure on phase separation in polyelectrolyte-polyethyleneglycol based aqueous two-phase systems. *Polymer*, 43, 3387-3390.