

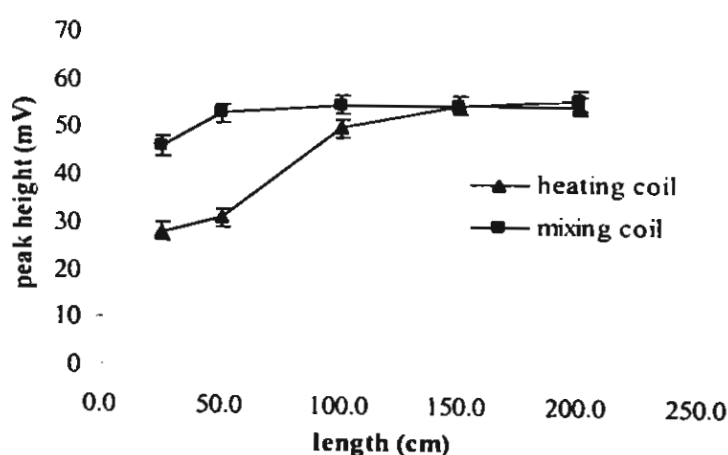
5. ความยาวของ heating coil และ mixing coil

ได้ทำการศึกษาผลของความยาวของ heating coil และ mixing coil ในช่วง 25-200 cm ที่มีต่อการวิเคราะห์กรดซอร์บิก ในระบบโพลินเจกชัน-โพเทนชิอเมตรีที่ได้สร้างขึ้น โดยการฉีดสารละลายกรดซอร์บิก เข้มข้น 50 mg L^{-1} ปรากฏว่า ความยาวของ heating coil และ mixing coil 150 และ 100 cm ให้สัญญาณสูงที่สุด ตามลำดับ ซึ่งหลังจากนั้นสัญญาณจะลดลงเล็กน้อย ดังตารางที่ 7 และภาพที่ 20

ตารางที่ 7 ผลของอุณหภูมิของ heating coil และ mixing coil ที่มีต่อผลการวิเคราะห์กรดซอร์บิก

ความยาว (cm)	ความสูงพีค (mV)*	
	heating coil	mixing coil
25	28	46
50	31	53
100	50	55
150	55	55
200	55	56

หมายเหตุ * ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 20 ผลของอุณหภูมิของ heating coil และ mixing coil ที่มีต่อผลการวิเคราะห์กรดซอร์บิก

6. อัตราการไหลของ NBS และ KI

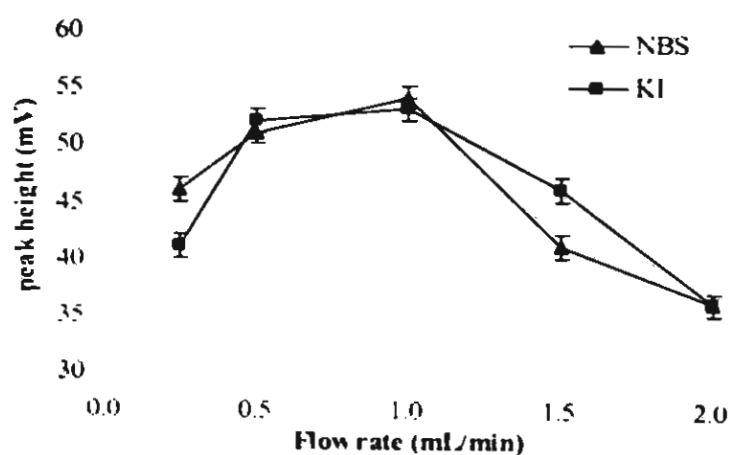
ได้ทำการศึกษาผลของอัตราการไหลของ NBS และ KI

ในช่วง $0.25\text{--}2.0\text{ mL min}^{-1}$ ที่มีต่อการวิเคราะห์กรดซอร์บิก ในระบบโพลีอินเจกชัน-โพเทนชิอเมตรี ที่ได้สร้างขึ้น โดยการฉีดสารละลายกรดซอร์บิก เข้มข้น 50 mg L^{-1} ปรากฏว่า อัตราการไหลของ NBS และ KI ในช่วง 1.0 mL min^{-1} ให้สัญญาณสูงที่สุดเท่ากันพอดี ซึ่งหลังจากนั้นสัญญาณจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน ดังตารางที่ 8 และภาพที่ 21

ตารางที่ 8 ผลของอัตราการไหลของ NBS และ KI ที่มีต่อผลการวิเคราะห์กรดซอร์บิก

อัตราการไหล (mL min^{-1})	ความสูงพีค (mV)*	
	NBS	KI
0.25	46	41
0.5	51	52
1.0	54	53
1.5	41	46
2.0	36	36

หมายเหตุ * ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 21 ผลของอัตราการไหลของ NBS และ KI ที่มีต่อผลการวิเคราะห์กรดซอร์บิก

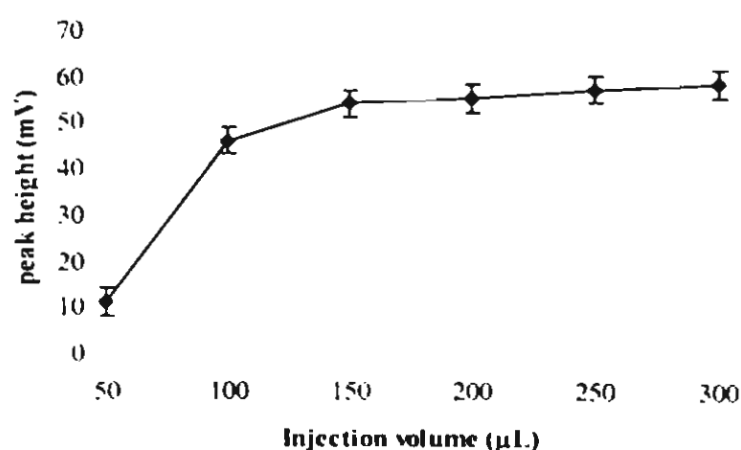
7. ปริมาณการฉีดสาร

ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณการฉีดสารในช่วง 50-300 μL ที่มีต่อการวิเคราะห์กรดซอร์บิก ในระบบฟลูออโรเจน-โพเทนชิอเมตริกที่ได้สร้างขึ้น โดยการฉีดสารละลายกรดซอร์บิกเข้มข้น 50 mg L^{-1} ปรากฏว่า ปริมาณการฉีดสาร 150 μL ให้สัญญาณสูงที่สุด ซึ่งหลังจากนั้นสัญญาณจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังตารางที่ 8 และภาพที่ 22

ตารางที่ 9 ผลของปริมาณการฉีดสารที่มีต่อผลการวิเคราะห์กรดซอร์บิก

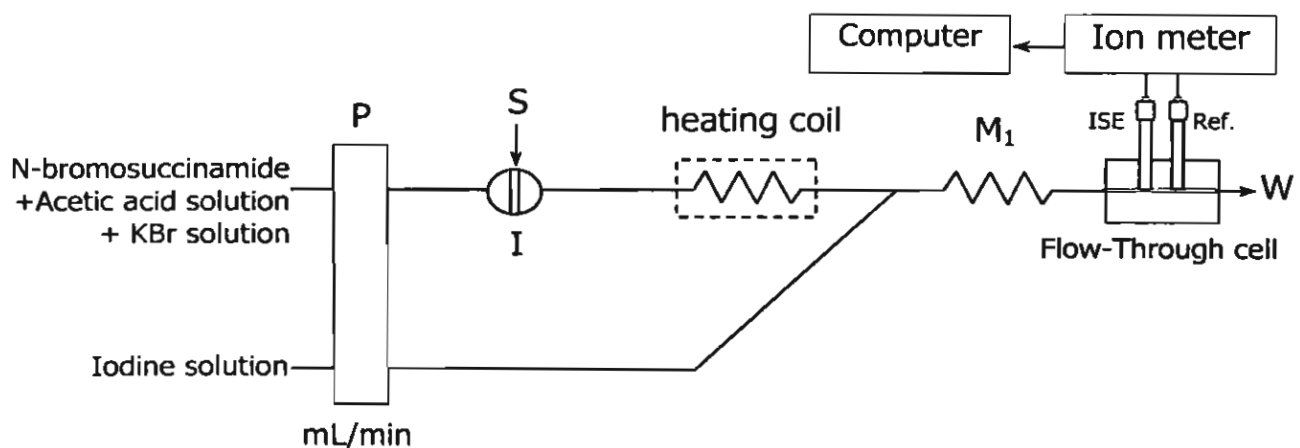
ปริมาณการฉีดสาร (μL)	ความสูงพีค (mV)*
50	11
100	46
150	54
200	55
250	57
300	58

หมายเหตุ * ทำการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพที่ 22 ผลของปริมาณการฉีดสารที่มีต่อผลการวิเคราะห์กรดซอร์บิก

สรุปผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส สำหรับการหาปริมาณกรดซอร์บิก โดยเครื่องตรวจวัด อาศัยหลักการทางไฟฟ้าเคมีวิเคราะห์ หรือ โปเทนชิอเมตรี (potentiometry) โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง n-bromosuccinamide กับ sorbic acid โดยใช้ manifold ข้างล่างนี้ ได้สภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ดังตารางที่ 10



ตารางที่ 10 สภาวะที่ต่างๆ ที่ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม

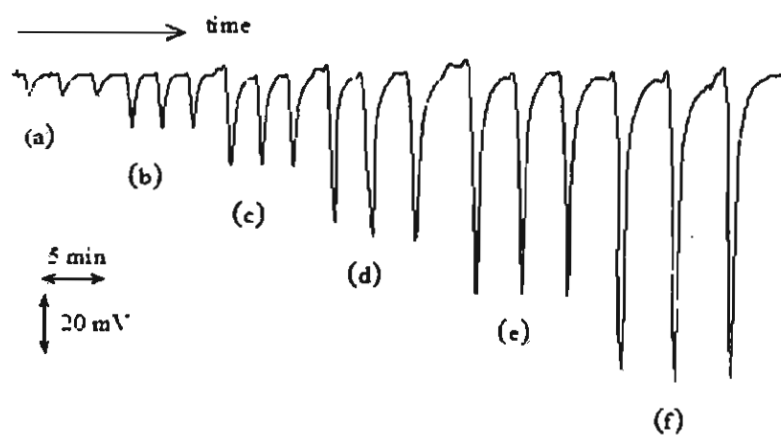
สภาวะของระบบ	ช่วงที่ศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
ความเข้มข้นของสารละลาย NBS (mM)	0-25	5
ความเข้มข้นของสารละลาย KI (mM)	0-25	7.5
ความเข้มข้นของสารละลาย KBr (%)	0-1%	0.1
อุณหภูมิของ Heating coil (°C)	25-40	35
ความยาวของ heating coil (cm)	25-200	150
ความยาวของ mixing coil (cm)	25-200	100
อัตราการไหลของ NBS (mL min ⁻¹)	0.25-2.0	1.0
อัตราการไหลของ KI (mL min ⁻¹)	0.25-2.0	1.0
ปริมาตรการฉีดสาร (μL)	50-300	150

8. การสร้างกราฟมาตรฐาน

สัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดซอร์บิก ระหว่างความเข้มข้น 5-200 mg L^{-1} ด้วยเทคนิคโพเทนชิอเมตริก-โพลินเจกชันอะนาลิซิส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แสดงดังภาพที่ โดยเขียนกราฟเส้นระหว่างความเข้มข้นของกรดซอร์บิก กับ ความสูงของพีค จะได้กราฟมาตรฐานที่เป็นกราฟเส้นตรงตั้งแต่ 0-250 mg L^{-1} โดยมีสมการกราฟเส้นตรง เท่ากับ $Y = 0.497X$, ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.996 ที่ค่าความชัน (slope) เท่ากับ 0.497 ดังนี้

$$Y = 0.497 X \quad (r^2 = 0.996)$$

และจากการคำนวณหาค่าขีดจำกัดต่ำสุด (detection limit) ในการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีการวัดอัตราส่วนสัญญาณของสารต่อสัญญาณรบกวน เท่ากับ 3 เท่า ($S/N = 3$) มีค่าเท่ากับ 0.1 mg L^{-1}

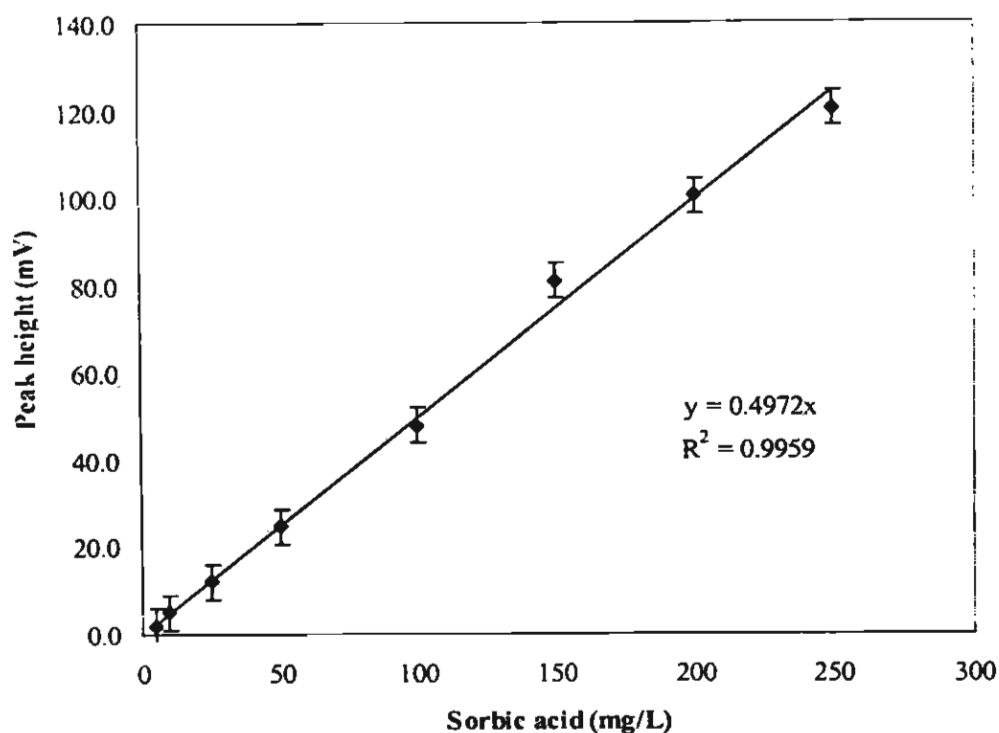


ภาพที่ 23 สัญญาณของกรดซอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (a) 10 (b) 25 (c) 50 (d) 100 (e) 150 (f) 200 mg L^{-1}

ตารางที่ 11 ความสูงของพีคของกรดซอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

กรดซอร์บิก (mg L^{-1})	ความสูงของพีค (mV)*
5	2.1
10	5.1
25	12.2
50	24.8
100	48.0
150	81.0
200	100.5
250	120.3

หมายเหตุ * ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 24 กราฟมาตรฐานของกรดซอร์บิก

9. การหาค่าร้อยละการนำกลับ

ได้ทำการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิกโดยการเติมกรดซอร์บิกมาตรฐาน จำนวน 100 mg L^{-1} ลงไปในสารตัวอย่างแล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณแท้จริงของกรดซอร์บิกมาตรฐานที่เติมลงไป หลังจากนั้นมาคำนวณหาค่าร้อยละการนำกลับ โดยใช้สูตรการคำนวณดังต่อไปนี้

$$\text{ค่าร้อยละของการนำกลับ} = \frac{\text{ปริมาณกรดซอร์บิกที่ตรวจพบ}}{\text{ปริมาณกรดซอร์บิกที่เติมลงไป}} \times 100$$

ปรากฏได้ค่าร้อยละการนำกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 97-102 ดังผลการทดลองใน

ตารางที่

ตารางที่ 12 ผลการศึกษาค่าร้อยละของการนำกลับของกรดซอร์บิก

สารตัวอย่างที่	ปริมาณกรดซอร์บิก (mg/L)*				ร้อยละการนำกลับ
	ที่เติม	สารตัวอย่าง	สารตัวอย่าง + ที่เติม	ที่ตรวจพบ	
1	100	20	117.4	97.4	97.4
15	100	34	132.5	98.5	98.5
16	100	80	182.2	102.2	102.2

หมายเหตุ * ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

10. การหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ได้ทำการทดลองหาค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิก โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานกรดซอร์บิก เข้มข้น 100 mg L^{-1} จำนวน 10 ครั้ง ได้ผลการทดลองและผลการคำนวณดังตารางที่

$$\% \text{ R.S.D.} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์กรดซอร์บิก}}{\text{ค่าเฉลี่ยของกรดซอร์บิก}} \times 100$$

ตารางที่ 13 ผลการหาร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์กรดซอร์บิก

การทดลองครั้งที่	ความเข้มข้นของกรดซอร์บิก (mg/L)
1	99
2	101
3	100
4	99
5	100
6	98
7	100
8	100
9	97
10	100
11	102
ค่าเฉลี่ย	99.64
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	1.36
%R.S.D.	1.37

11. การศึกษาสารรบกวนการวิเคราะห์

ได้ทำการศึกษาความจำเพาะในการวิเคราะห์ (selectivity) ของเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการเติมสารที่คาดว่าจะจะเป็นสารรบกวนในการวิเคราะห์กรดซอร์บิกในเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบ โดยเติมสารดังกล่าว จำนวน 50 และ 150 mg L⁻¹ ลงในสารมาตรฐานกรดซอร์บิกที่มีความเข้มข้น 50 mg L⁻¹ แล้วทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ปราศจากสารรบกวน โดยสมการการหาอัตราส่วนสัญญาณ (signal ratio) ดังนี้

$$\text{อัตราส่วนสัญญาณ (Signal ratios)} = \frac{\text{สัญญาณของสารมาตรฐาน+สารรบกวน}}{\text{สัญญาณของสารมาตรฐาน}}$$

ซึ่งได้ผลการศึกษาดังตารางที่

ตารางที่ 14 ผลการศึกษาสารรบกวนการวิเคราะห์กรดซอร์บิก

สารที่เติม	ปริมาณที่เติม (mg l ⁻¹)	อัตราส่วนสัญญาณ ^a
Aspartame	150	0.9
Benzoic acid	150	0.9
Caffeine	150	1.2
Caramel	150	0.8
Citric acid	150	0.8
Ethanol	150	0.8
Sacharin	150	0.9
Sucrose	150	0.9
Pectin	150	0.8
Sodium salicylate	50	2.2
2-tert-Butyl-methoxyphenol	50	1.5

^a Ratio of signal for mixture of 50 mg L⁻¹ sorbic acid and additives compared with 50 mg L⁻¹ sorbic acid alone.

12. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิกในสารตัวอย่างสุราพื้นเมือง

ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิกในสารตัวอย่างสุราพื้นเมือง จำนวน 3 ตัวอย่าง ใช้เทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ตามวิธีของ AOAC ผลการวิเคราะห์ดังตาราง และยังพบว่าผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธี แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ t -test

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิกในตัวอย่างสุราพื้นเมือง

สารตัวอย่างที่	ปริมาณกรดซอร์บิก (mg/L)*	
	วิธี Potentiometric -FIA	วิธี HPLC
1	21.4	21.5
2	2.7	2.8
3	7.8	8.0

หมายเหตุ * หมายถึง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

สรุปผลการวิจัย

ระบบโพเทนชิอเมตริก-โฟลอินเจกชันสำหรับการหาปริมาณกรดซอร์บิก ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ ที่มีราคาถูก สามารถทำการออกแบบและสร้างได้ง่าย โดยวิธีไอโอโอเมตริก ใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการหาปริมาณกรดซอร์บิก นอร์มอล-โบรโมซัคซินาไมด์ที่มากเกินไปจะทำปฏิกิริยากับไอโอไดค์อออน กลายเป็นไอโออิน ซึ่งสามารถวัดปริมาณโดยใช้วิธีโพเทนชิอเมตริก โดยเทคนิคที่เสนอขึ้นนี้ มีความเป็นไปได้มากที่จะนำไปใช้ในงานประจำเพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณกรดซอร์บิกในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

- Aluoch-Orwa, J. , Quintens, I. , Roets, E. & Hoogmartens J. (1997). Quantitative analysis of sorbic acid in pharmaceutical cream formulations by liquid chromatography on poly (styrene divinylbenzene). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5, 155-161.
- Dollimore, D. , O'Connell, C. (1998). A comparison of the thermal decomposition of preservatives, using thermogravimetry & rising temperature kinetics, *Thermochimica Acta*, 324, 33-48.

- Ferreira, I.O. , Mendes, E. , Brito, P. & Ferreira, M.A. (2000). Simultaneous determination of benzoic & sorbic acids in quince jam by HPLC. **Food Research International**, 33, 113-117.
- Gonzalez, M. , Gallego, M. & Valcarcel M. (1999). Gas chromatographic flow method for the preconcentration & simultaneous determination of antioxidant & preservative additives in fatty foods. **J. Chromato A**, 848, 529-536.
- Gonzalez, M. , Gallego, M. & Valcarcel, M.(1998). Simultaneous gas chromatographic determination of food preservatives following solid-phase extraction. **J. Chromato A**, 823, 321-329.
- Mihyar, G.F. , Yousif, A.K. & Yamani, M.I.(1999). Determination of Benzoic & Sorbic Acids in Labanah by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Food Composi**, 12, 53-61.
- Mikami, F. , Goto, T. , Ohno, T. , Matsumoto, H. & Nishida M. (2002). Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid & salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction & high-performance liquid chromatography. **J.Pharmaceu & Biomed**, 28, 261-267.
- Miller, J.C. & Miller, J.N. (1993). **Statistics for analytical chemistry** (3rd ed.) New York: Prentice Hall.
- Mont, I. & Trenerry, V.C. (1995). The determination of sorbic acid & benzoic acid in a variety of beverages & foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Food Chem**, 53, 219-226.
- Renner, T. , Baer-Koetzle, M. & Scherer, G. (1999). Determination of sorbic acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromato A**, 847, 127-133.
- Skoog, D.A. , Holler, F.J. & Nieman, T.A. (1998). **Principle of Instrumental Analysis** (5th ed.). USA: Harcourt Brace.
- Tfouni, S.A.V. & Toledo M.C.F. (2002). Determination of benzoic & sorbic acids in Brazilian food. **Food Control**, 13, 117-123.
- Tfouni, S.A.V. & Toledo, M.C.F. (2002). Estimates of the mean per capita daily intake of benzoic & sorbic acids in Brazil. **Food Addit Contam**, 19, 647-654.
- William, H. (2000). **Official Methods of Analysis of AOAC International** (17th ed.). USA,

< Output > (อยู่ในระหว่างแก้ไขและส่งตีพิมพ์)

Potentiometric-Flow Injection Analysis System for the Determination of Sorbic acid

Prasit Purachat^a, Saisunee Liawruangrath^{b,*}

^a Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thepsatri Rajabhat University, Lophuri 15000, Thailand

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai 50002, Thailand

Abstract

The flow injection-potentiometric system for the determination of sorbic acid is proposed with simple design, ease of construction and low cost. An iodometric method for the determination of sorbic acid was described. The method was based on the quantitative reaction between sorbic acid and N-bromosuccinamide (NBS). A known excess of NBS was mixed to brominate sorbic acid, and the excess of NBS was then allowed to react with iodide to liberate iodine, which was subsequently measured with potentiometric method. The flow injection-potentiometric system consisting of a commercial ion selective electrode (ISE) and Ag/AgCl reference electrode was equipped with the computer for data processing. It was found that the potentiometric response exhibits an almost linear of calibration up to 250 mg L⁻¹ with a detection limit ($S/N=3$) of 0.1 mg L⁻¹ and a relative standard deviation (RSD) of 1.4% ($n=10$). The proposed method is very feasible and simple and is therefore suitable for routine analysis of sorbic acid in beverage.

Keywords : Flow injection analysis ; Potentiometry; Sorbic acid ; Wine, Bromosuccinamide

* Corresponding author. Tel.: +66-53-943396/Ext. 327; fax: +66-53-892277.

E-mail address: scislwrn@chiangmai.ac.th (S. Liawruangrath).

1. Introduction

Food preservation has always been of great importance. Nowadays Chemical preservation has become an increasingly important practice in modern food technology with increase in production of processed and convenience food. These preservative are generally used to stop or delay nutritional losses due to microbiological, enzymatic or chemical changes and thus increasing its shelf life. Sorbic acid, benzoic acid and their respective sodium, potassium and calcium salts, are generally effective to control mold and inhibit yeast growth and against a wide range of bacteria attack.[1, 2]. Despite the widespread use of these antimicrobial agents, adverse effects such as metabolic acidosis, convulsions and hyperpnoea were observed in experimental animals and humans given very high doses. Some weak clastogenic activity was note in invitro assays [3].

The analytical determination of these preservatives is not only important for quality assurance purpose but also for consumer interest and protection. The most common analytical method for the determination of sorbic acid in food were either titration [4, 5] , spectrophotometric [6, 7], HPLC [8, 9], TLC [10, 11], capillary electrophoresis [12, 13], and gas chromatographic methogs [14, 15]. They were described by several authors as requiring extensive sample preparation and relatively long analysis time.

The first [16] utilised the oxidation of sorbic acid to malonaldehyde, which reacts with thiobarbituric acid to form a colored compound. The second [17] involves the measurement of absorbance at 250 nm. The first method is time consuming and alcohol is known to interfere, while many substances absorbing in the UV region, e.g., benzoic acid, saccharin and caffeine, interfere with the second method. A number of titrimetric methods have been reported in which sorbic acid is allowed to react with a halogenating agent and the excess of the reagent is determined iodimetrically [18].

Spanyar and Sandor [19] used bromine (added as KBrO_3) to react with sorbic acid, but the reaction had to be carried out in darkness and salicylic acid interfered. Spacu and Dumitrescu [4] used sodium chloride to clotinate sorbic acid in acidic medium at the 2- and 5- portions. The experimental condition needed to be carefully controlled and the relative error was never less than 6%. Bromine in carbon tetrachloride was also proposed as a brominating reagent, but this method requires special precuation to prepare standard bromine solution.

Shukla et al.[20] reported that sorbic acid reacts quantitatively with N-bromosuccinamide (NBS) at 50-60°C, and this provide a basis for setting up a titrimetric method for the determination of sorbic acid. The advantages of using NBS are that it is cheap, readily available and easy to handle.

The use of flow injection methodology to extend the capabilities of ion-selective electrodes has been reviewed [21]. Compared to manual potentiometry, flow injection potentiometry (FIP) has several advantage including the reproducibility of the analytical signal and the reproducible use of small sample volume. Simplicity of system design, low cost, easy automation and feasibility of wide-range determinations with minimum sample manipulation are some of the favourable characteristic resulting in the combination of flow-injection system with potentiometry [22].

The main purpose of the present work was then to develop a low-cost automated flow injection procedure with potentiometric detection for determination of sorbic acid in soft drink. An iodometric method for the determination of sorbic acid was described. The method was based on the quantitative reaction between sorbic acid and bromosuccinamide. A known excess of bromosuccinamide was mixed to brominate sorbic acid, and the excess of bromosuccinamide was then allowed to react with iodide to liberate iodine, which was subsequently measured with potentiometric method. The proposed method can be used successfully for the determination of sorbic acid and sorbate in soft drink samples. Whilst retaining the accuracy of other method, the proposed method is superior in term of simplicity and convenience, and is therefore suitable for routine analysis.

2. Experimental

2.1 Apparatus

Potentiometric-FIA measurement were performed using an ion meter model (Metrohm, Herisau, Switzerland) consisting of an iodide ion-selective electrode as working electrode and Ag/AgCl (3M KCl) as reference electrode (double-junction system with sleeve ceramic diaphragm). For the data processing, the ion meter has equipped with a notebook computer via RS232 port using in-house computer software for data transference.

A home-made flow through electrochemical cell had been constructed from Perspex plastics (PEEK) with 3 x3 x 5 cm size. The working electrode and reference electrode had been inserted in each hole of flow through cell using o-ring rubber for protection of liquid leaking.

A wall-jet flow cell, providing low dead volume, fast response, good wash characteristics, ease of construction and compatibility with electrode of various shapes and size, was used in flow measurement where a Perspex cup with axially positioned inlet polypropylene tubing is mounted at the sensing surface of the electrode body. The optimized distance between nozzle and the sensing surface of the electrode was 5 mm, this provides the minimum thickness of the diffusion layer and consequently, a fast response.

A single-channel EYELA(Tokyo, Japan) model MP-3 peristaltic pump supplied with Tygon pump tubing was used for the propulsion of the fluids. The manifold was assembled with PTFE tubing (0.8 mm id.) and stainless tubing (0.8 mm id.) has been used as heating coil for temperature controlling via water bath. The six-port injection valve was a Upchurch Scientific (V.450). The instrumental set-up was depicted in Fig.1.

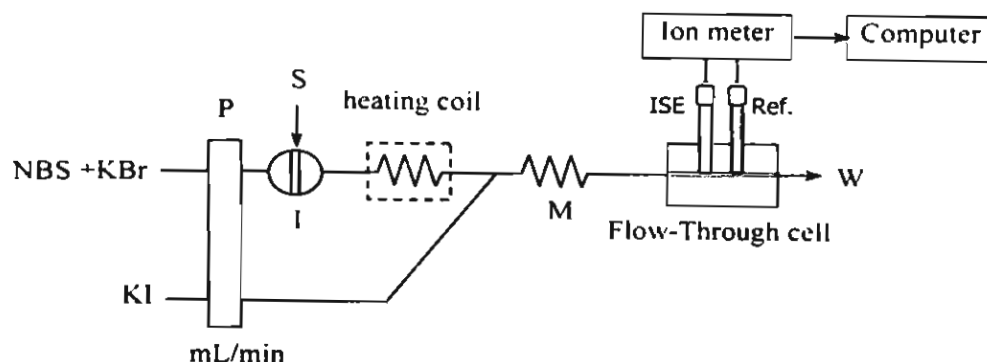


Fig. 1 Manifold of potentiometric-flow injection analysis system for sorbic acid determination (P = Pump, I = Injection valve, S = Sample, M = Mixing coil, W = Waste)

2.2 Reagents

Sorbic acid standard solution, $1,000 \text{ mg L}^{-1}$. Prepared by dissolved 0.1000 g of the acid (Merck) in 50 ml of deionized water containing 1 pellet of sodium hydroxide and diluting to 100 mL in a calibrated flask.

N-bromosuccinamide (NBS) solution, 0.025 M . Freshly prepared by dissolved 0.45 g of the compound in the minimum of hot water and diluting to 100 mL .

Chemicals for interference studies were purchased from Fluka, Ajax and Merck. All chemicals were of analytical grade and used without further purification. All solutions were prepared with de-ionized water prepared by passing distilled water through a Milli-Q system (Millipore Corp.).

2.3 Flow injection procedures

All potentiometric flow injection measurements were performed at ambient temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) by injections of aliquots of stock sorbic acid solutions into the flowing stream of carrier, a injection valve, heating coil, 3-way connector, mixing coil and potentiometric detector. The solution of NBS and KBr as carried solution was pumped through the flow-through cell, which consisting of working electrode and reference electrode, with a constant flow rate of 1.0 mL min^{-1} until a stable baseline was established. The sample was then injected into the FI system *via* an injection valve equipped with a fixed sample loop of $150 \mu\text{L}$. The resulting peak was then recorded. The peak height (ΔE) was used for subsequent interpretation of the data.

3. Results and discussions

3.1 Influent of concentration of Reagents

The effect of NBS concentration on the potentiometric sorbic acid determination is shown in Fig.2 . It was seen the response of sorbic acid increase with increase in NBS concentration up to 5.0 mM and decreased with increase in NBS concentration above 5.0 mM .

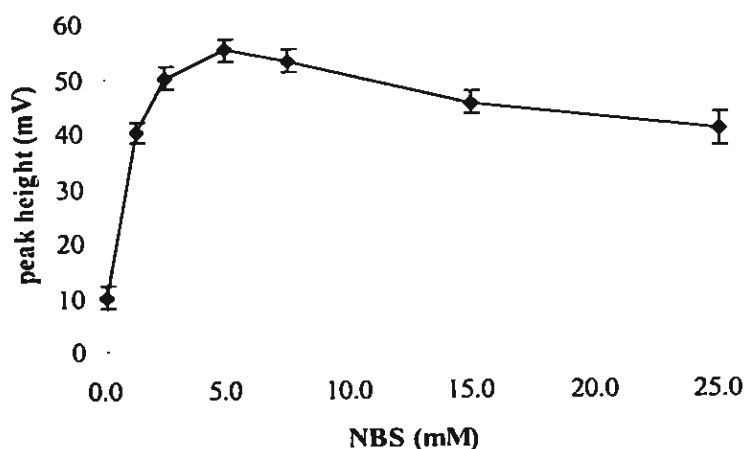


Fig.2 Influent of concentration of NBS

The dependence of KI concentration over the concentration rang 0.0 to 25.0 mM is illustrated in Fig.3 . The resulting peak-shaped concentration profile showed maximum responds of the sorbic acid at 7.5 mM.

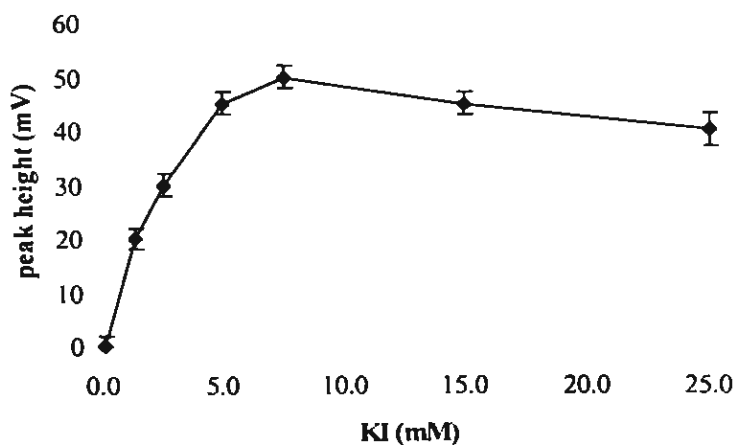


Fig.3 The effect of KI concentration

The concentration of KBr has a profound effect upon sorbic acid response. Increasing the concentration of KBr from 0.0 to 0.2% resulted with increase in the sorbic acid response. It can be concluded that KBr could speed up the reaction between NBS and sorbic acid. [23] However, the potentiometric response dramatically decreased with increase in amount of KBr above 0.2%. From the experimental result, it was found that increasing of amount of KBr caused electrode fouling.

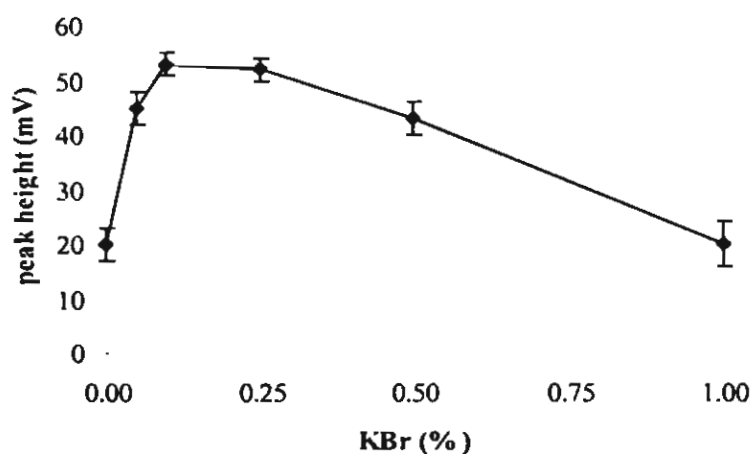


Fig.4 The effect of KBr concentration

3.2 Influent of temperature of heating coil

The reaction of NBS with sorbic acid was obtained at 25-40°C by heating the reaction coil via water bath. The effect of temperature was shown in Fig. where it can be seen that the potentiometric response increase with increase in the temperature of heating coil. The reaction was about 74% complete when the bromination was carried out at 30°C[7].

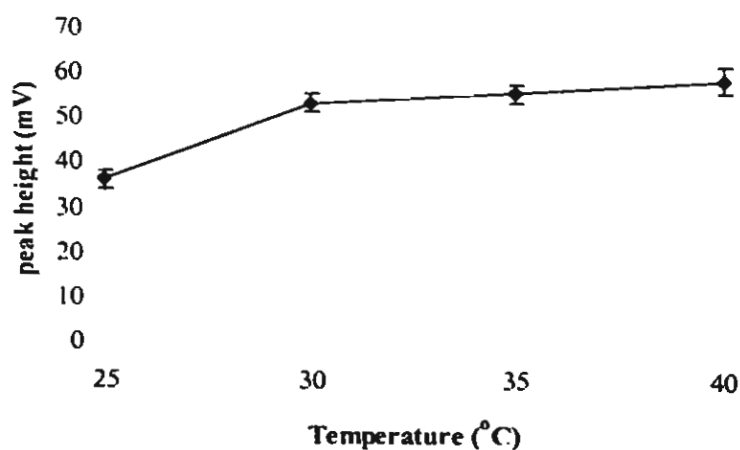


Fig.5 The effect of temperature of heating coil

3.3 Influent of length of heating coil and mixing coil

The effect of length of heating coil and mixing coil were pursued by varying the length of heating coil and mixing coil from 25 to 200 cm. The results was illustrated in Fig.6 It was found that the potentiometric response increased when the length of heating coil and mixing coil were increased up to 150 and 100 cm, respectively and then started to level off. Based on the results, the length of heating coil and mixing coil of 150 and 100 cm, respectively were employed.

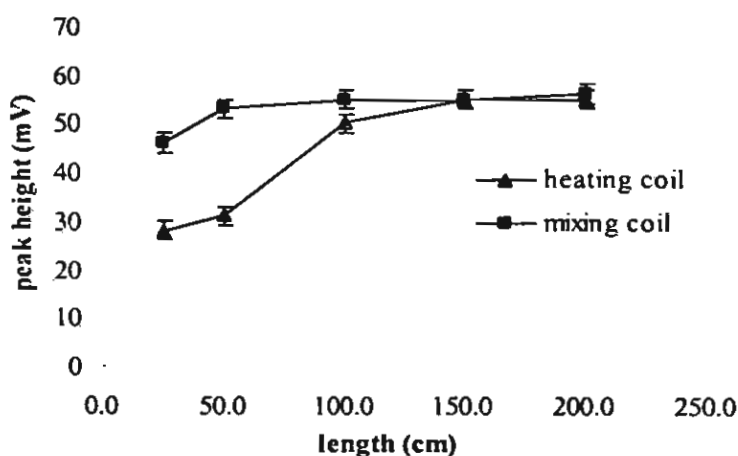


Fig.6 The effect of length of heating coil and mixing coil

3.4 Influent of flow rate of NBS and KI

The effect of flow rate of NBS and KI on potentiometric response were studied by varying the flow rate from 0.25 to 2.0 mL min⁻¹. The results are illustrated in Fig.7 It was found that the maximum response was obtained at 1.0 mL min⁻¹ and then decreased when the flow rate was greater than 1.0 mL min⁻¹. However, it was found that the noise level gradually increased with increasing flow rate.

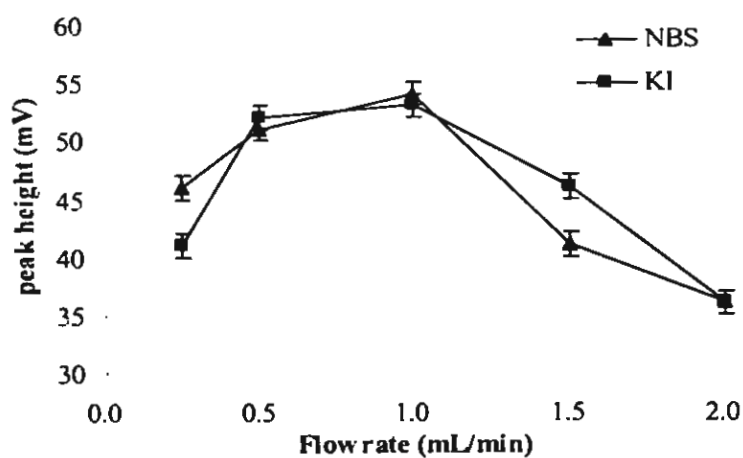


Fig.7 The effect of flow rate of NBS and KI

3.5 Influent of injection volume

Fig.8 shows the dependent of injection volume on the potentiometric response. It was found that the response increased when the injection volume was increased from 50 to 150 μl and then started to level off. Based on the results, the sample volume of 150 μl was employed.

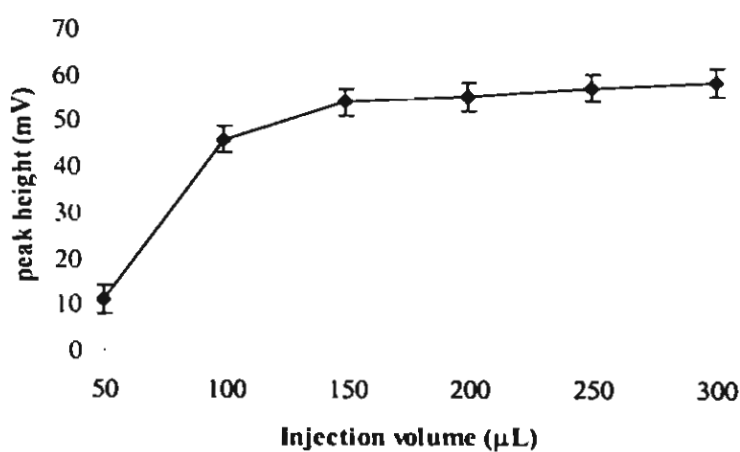


Fig.8 Influent of injection volume

3.6 Analytical characteristics

Fig. 9 displays the typical responses of sorbic acid under the optimized experimental conditions of calibration at the concentration range 10-200 mg L⁻¹. The linearity of potentiometric responses were examined under the optimum experimental conditions. A calibration graph for sorbic acid over the concentration range of 0.0 to 500.0 mg L⁻¹ was obtained. It was found that the potentiometric response exhibits an almost linear of calibration up to 250 mg L⁻¹. The correlation coefficients of the linear regression of the standard curves were consistently greater than 0.99. The signal-to-noise characteristics (S/N) = 3 indicates a detection limit of 0.1 mg L⁻¹ sorbic acid. Recovery tests with the proposed method were performed using sorbic acid solutions with different concentrations in the range 25-100 mg L⁻¹, which covers the usual concentration range of sorbic acid in commercial soft drinks. The recovery of sorbic acid was found to range from 97 to 102 %

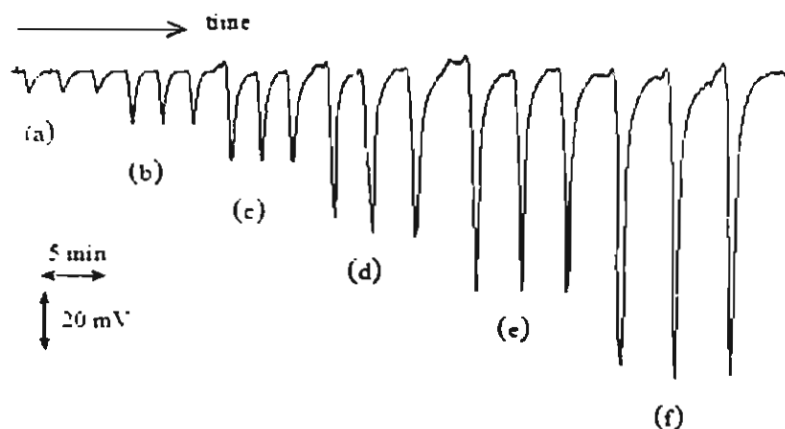


Fig.9 typical response of sorbic acid at (a) 10 (b) 25 (c) 50 (d) 100 (e) 150 (f) 200 mg L⁻¹

The precision of the method was checked by calculating the relative standard deviation (RSD) of 11 replicate determinations on a synthetic sample containing 50 mg L⁻¹ of sorbic acid. The relative standard deviation was 1.4%. The half peak-widths of potentiometric response were found to be 90 sec. These allow injection rates of 30 samples per hours to be achieved. The high sample throughput reflects the inherent advantage of the FIA technique.

3.7 Selectivity

A number of common additives in soft drinks were studied for their possible interference effects in the determination of sorbic acid by the proposed method. The signal obtained for each potential interference at 150 mg L⁻¹ (except as otherwise stated) in the presence of sorbic acid at a concentration of 50 mg L⁻¹ was used as an indicator for selectivity in comparison with the sorbic acid reading alone. These results are listed in Table 1. It is evident that the proposed method is quite selective for sorbic acid. Of these substance studied, only sodium salicylate interferes seriously whereas 2-*tert*-Butyl-methoxyphenol and caffeine interferes various extents.

Table.1 Effect of some common food additives

Substances	concentration added (mg l ⁻¹)	signal ratios ^a
Aspartame	150	0.9
Benzoic acid	150	0.9
Caffeine	150	1.2
Caramel	150	0.8
Citric acid	150	0.8
Ethanol	150	0.8
Sacharin	150	0.9
Sucrose	150	0.9
Pectin	150	0.8
Sodium salicylate	50	2.2
2- <i>tert</i> -Butyl-methoxyphenol	50	1.5

^a Ratio of signal for mixture of 50 mg L⁻¹ sorbic acid and additives compared with 50 mg L⁻¹ sorbic acid alone.

3.8 Application

Some of beverage samples such as white wine, red wine, orange juice and soft drink were analyzed by the present method and the results were compared with HPLC method. A satisfactory agreement between the results was found with mean relative differences in the range 0.0 – 1.0%. Moreover, the validation of the proposed FI method was also performed by comparative determination of sorbic acid by HPLC using t-test. The results obtained by the proposed method are excellent agreement with those determined by HPLC.

Conclusion

The proposed method can be used successfully for the determination of sorbic acid in beverage samples with simple design, ease of construction and low cost.. Whilst retaining the accuracy of other method, the proposed method is superior in term of simplicity and convenience, and is therefore suitable for routine analysis.

Acknowledgment

The authors are grateful to the Thailand Research Fund (TRF) for financial support. We also express our sincere thank to the Science Center of Thepsatri Rajabhat University, Thailand for allowing this research to be under taken in the institute.

References

- [1] S.A.V. Tfouni, M.C.F. Toledo. *Food Control*. 13 (2002) 117.
- [2] F.J.M. Mota, I.M.P.L.V.O. Ferreira, S.C. Cunha, M. Beatrix, P.P. Oviveira, *Food Chem*. 82 (2003) 469.
- [3] WHO, Evaluation of some food additive and contaminants. *Technical Report Series*, (1997) 868.
- [4] P. Spacu, H. Dumitrescu, *Talanta*, 14 (1967) 981.
- [5] P. Spanyar, A. Sandor, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 108 (1958) 402: *Anal. Abstr.*, 6 (1959) 2339.
- [6] A. Caputi, K. Slinkars, *J. Assoc. Off. Anal. Chem*. 58 (1975) 133.
- [7] O.W. Lau, S.F. Luk, R.K.M. Larm, *Analyst*, 114 (1989) 217.
- [8] R. Hajkova, P. Solich, M. Pospisilova, J. Sicha, *Anal. Chim. Acta*. 467 (2002) 91.
- [9] T.Y. Chu, C.L. Chen, H.F. Wang, *J. Food Drug Anal*. 11 (2003) 246.

- [10] M. Thomassin, E. Cavalli, C. Guinchard, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 831.
- [11] B. Mandrou, F. Bresolle, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (1980) 675.
- [12] K.L. Kno, Y.Z. Hsieh, *J. Chromatogr. A.* 768 (1997) 334.
- [13] L. Labat, E. Kummer, P. Dallet, J.P. Dubost, *J. Pharm Biomed. Anal.* 23 (2000) 763.
- [14] W. Horwitz (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC Inter.*, vol.2, AOAC Inter., Gaithersburg, Maryland, 2002, p.9.
- [15] T. Renner, M. Baer-Koetzle, G. Scherer, *J. Chromatogr. A.* 847 (1999) 133.
- [16] W. Horwitz, (Ed.), 'Official Methodes of Analsis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, VA, 1980, Section 20.101.
- [17] W. Horwitz, (Ed.), 'Official Methodes of Analsis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, VA, 1980, Section 20.104.
- [18] Spacu, P. and Dumitrescu, H., *Talanta*, 1967,14, 981.
- [19] P. Spanyar, A. Sandor, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 108 (1958) 402 :
Anal. Abstr., 6 (1959) 2339.
- [20] V.K.S., Shukla, U.C. Pande, J.P. Sharma, , *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 260 (1972) 359.
- [21] L. K. Shpigun, *Reviews on Analytical Chemistry*, Royal Society of Chemistry, London, 1994. pp. 246-272.
- [22] J. F. Van Staden, *Anal. Proc.* , 24, (1987) 331.
- [23] O.W. Lau, S.F. Luk, *Analyst*, 112 (1987) 1269.

ภาคผนวก

การหาปริมาณและแก้ปัญหากรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในสุราพื้นเมือง

(Determination and Problem solving of Benzoic acid and Sorbic acid in Native Spirit)

ผู้เขียน : ดร.ประสิทธิ์ บุรุษชาติ
รองศาสตราจารย์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์

บทคัดย่อ :

กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในสุราพื้นเมืองถูกหาปริมาณโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งสารตัวอย่างสุราพื้นเมืองจำนวน 18 ตัวอย่างถูกเก็บตัวอย่างภายในจังหวัดลพบุรี ทำการแยกและวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีกระทำโดยใช้คอลัมน์ ชนิด C-18 มีอะซีโตไนไตรต์ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ของฟอสเฟต (ค่าความเป็นกรด 2.3) อัตราส่วนผสม ร้อยละ 30 ต่อ 70 โดยปริมาตร เป็นกระแสของตัวพา ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นในการตรวจวัด คือ 230 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการหาปริมาณกรดทั้งสองอย่างต่อเนื่อง พบว่าความเข้มข้นของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในสุราพื้นเมืองอยู่ระหว่าง 0.0 ถึง 58.1 และ 0.0 ถึง 21.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละของการนำกลับของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก อยู่ระหว่างร้อยละ 97.0-105.5% และ 98.35-106.25 ตามลำดับ ปริมาณของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในสุราพื้นเมืองทั้ง 18 ตัวอย่าง ถูกนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกกับเกณฑ์มาตรฐานของกรมสรรพสามิต กระทรวงการคลัง ของประเทศไทย พบว่าปริมาณของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในสุราพื้นเมืองทั้ง 18 ตัวอย่าง อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของกรมสรรพสามิต จากผลการวิเคราะห์ที่น่าพอใจนี้ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสุราพื้นเมืองที่ผลิตในจังหวัดลพบุรี ไม่มีปัญหาของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ดังนั้น เกษตรกรหรือผู้ผลิตสุราพื้นเมืองจึงได้รับเกียรติบัตรจากมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์

ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย :

ทั้ง กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก เป็นสารกันบูดที่นิยมของประชาชนเป็นอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากราคาถูก หาซื้อได้ง่าย และสามารถป้องกันการบูดของอาหารได้ โดยที่ชาวบ้านส่วนใหญ่ไม่ทราบว่าการใส่สารกันบูดลงไปให้อาหารเกินข้อกำหนด เป็นการผิดกฎหมาย และยังเป็นอันตรายร้ายแรงต่อผู้บริโภคอีกด้วย สุราพื้นเมืองที่กำลังเป็นที่สนใจกันอยู่ในปัจจุบันนี้ หากใช้วัตถุดิบที่ไม่เหมาะสม กระบวนการผลิตที่ไม่ถูกต้อง การบรรจุหรือการเก็บรักษาที่ไม่ระมัดระวังแล้ว จะทำให้คุณภาพต่ำลงและอายุของสุราพื้นเมืองสั้น เก็บไว้จำหน่ายได้ไม่นาน ด้วยเหตุนี้เองชาวบ้านที่ขาดความรู้ความเข้าใจ

หรือรู้เท่าไม่ถึงการณ์ จำเป็นจะต้องใส่สารกันบูดลงไปในสุราพื้นเมือง โดยที่ไม่มีความสามารถที่จะทำการตรวจวัดปริมาณสารกันบูดในสุราพื้นเมืองที่ตนเองผลิตได้ ดังนั้น มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี ในฐานะเป็นสถาบันการศึกษาขอชุมชนสมควรอย่างยิ่งที่จะต้องเข้าไปให้การช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และช่วยแก้ปัญหาการใช้กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในสุราพื้นเมือง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย :

- 1) เพื่อทำการเก็บตัวอย่างสุราพื้นเมืองที่ผลิตและจำหน่ายในเขตจังหวัดลพบุรีและจังหวัดใกล้เคียง
- 2) เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของกรดซอร์บิกในสุราพื้นเมือง ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)
- 3) เพื่อทำการประเมินคุณภาพของสุราพื้นเมืองจากผลการวิเคราะห์ที่ได้

ขอบเขตของการวิจัย :

สารกันบูดในสุราพื้นเมือง ได้แก่ กรดเบนโซอิก (Benzoic acid) และกรดซอร์บิก (Sorbic acid)

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ ได้แก่ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ สุราพื้นเมือง หรือสุราแช่ หมายถึง สุราที่ทำขึ้นจากผลไม้ น้ำตาลจากพืช ผลผลิตธัญพืช หรือแป้งจากพืชและผลิตภัณฑ์จากผลผลิตทางการเกษตร ใช้วิธีการผลิตด้วยกระบวนการหมัก โดยไม่ผ่านการกลั่น เช่น ไวน์ผลไม้ สาโท กระแช่ อู สาเก น้ำขาว น้ำตาลเมา เป็นต้น จำนวนไม่น้อยกว่า 10 ตัวอย่าง

สถานที่หรือแหล่งผลิต ได้แก่ ชุมชน หรือร้านค้าที่ผลิตหรือจำหน่ายสุราพื้นเมืองในเขตจังหวัดลพบุรีและใกล้เคียง เช่น สระบุรี สิงห์บุรี อ่างทอง พระนครศรีอยุธยา และนครสวรรค์ เป็นต้น

ช่วงเวลาในการดำเนินงานวิจัย ระหว่างเดือนตุลาคม

2545 - เมษายน 2546

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ :

- 1) ได้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของสุราพื้นเมืองที่ผลิตและจำหน่ายในจังหวัดลพบุรีและจังหวัดใกล้เคียง
- 2) ได้ทราบถึงปริมาณสารกันบูด ได้แก่ กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในสุราพื้นเมือง โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) เพื่อทำการวิเคราะห์
- 3) ได้ทราบถึงคุณภาพของสุราพื้นเมืองที่ผลิตและจำหน่ายในจังหวัดลพบุรีและจังหวัดใกล้เคียง จากการประเมินคุณภาพของสุราพื้นเมืองจากผลการวิเคราะห์ที่ได้

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับวัตถุเจือปนในอาหาร

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization : WHO) และองค์การอาหารและการเกษตร (Food and Agriculture Organization of United Nations : FAO) ได้ให้ความสำคัญต่อความ "วัตถุเจือปนในอาหาร" ไว้ว่า "เป็นสารที่ไม่มีคุณค่าทางอาหารที่ถูกเติมเข้าไปในอาหารอย่างตั้งใจ ในปริมาณที่น้อยมาก เพื่อปรุงแต่งลักษณะภายนอก กลิ่น รส ตลอดจนช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษา"

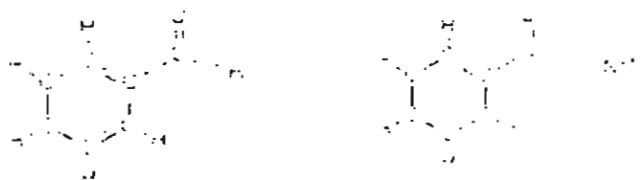
แต่ปัจจุบัน ความหมายของวัตถุเจือปนในอาหารได้ถูกขยายความให้กว้างขึ้นโดยวัตถุเจือปนในอาหารปัจจุบัน หมายถึง "สารประกอบหรือส่วนผสมของสารประกอบที่ไม่ใช่อาหาร แต่ถูกใส่เข้าไปในอาหารในระหว่างกระบวนการผลิต การเก็บรักษา หรือการบรรจุหีบห่อ ทั้งนี้ไม่รวมถึงวัตถุดิบเบื้องต้น" ดังนั้นวัตถุเจือปนในอาหารจึงอาจเป็นสารที่มีหรือไม่มีคุณค่าทางอาหารก็ได้ เช่น

- 1) กรดเบนโซอิก และโซเดียมเบนโซเอต พบในน้ำหวาน น้ำอัดลม น้ำผลไม้ ปลาเค็ม เยลลี่ แยม เป็นต้น โดยจะต้องมีปริมาณเจือปนไม่เกิน 0.05 - 0.1%
- 2) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์และเกลือซัลไฟต์ พบในเครื่องดื่มหลายชนิดและป้องกันรอยตัดพืชผักไม่ให้เปลี่ยนสีน้ำตาล จะต้อง มีปริมาณเจือปนไม่เกิน 100 - 3000 mg/Kg
- 3) กรดซอร์บิก พบในน้ำผลไม้ ขนมะปราง เนย นมข้นจืด ไม่เกิน 1000 - 2000 mg/kg ในไส้กรอกรมควัน จะต้อง มีปริมาณเจือปนไม่เกิน 5000 mg/Kg (มีความปลอดภัยสูง)

4) สารอื่น ๆ เช่น กรดบอริกซ์ บอแรกซ์ เฮกซะเมทิลีนเตตระมีน พบในพวกปลา แคลเซียมโพรฟิโนเอต พบในขนมปัง อาหารกรอบ ซ็อกโกเลต เค้ก เป็นต้น

กรดเบนโซอิก (Benzoic acid)

กรดเบนโซอิก (Benzoic acid : $C_6H_5CO_2H$) หรือ Phenylformic acid หรือ Benzene carboxylic acid และเกลือโซเดียมเบนโซเอต มีน้ำหนักโมเลกุล 122.11 กรัมต่อโมล ลักษณะทั่วไปเป็นผลึกขนาดเล็ก สีขาว จุดหลอมเหลว $121^\circ C$ และจุดเดือด $250^\circ C$ ใช้เป็นวัตถุกันเสียมานานแล้ว เพราะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ของแบคทีเรียได้ดี แต่ไม่ดีนักในการยับยั้งเชื้อรา ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับ pH ของอาหารด้วยคือ ช่วงที่กรดเบนโซอิกและเกลือโซเดียมเบนโซเอต ยับยั้งได้ผลดีที่สุด คือ pH ระหว่าง 2.5 - 4.0 ซึ่งจะเห็นได้ว่าใช้ได้กับอาหารที่มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น เครื่องดื่มอัดลม อาหารหมักดอง แยม เยลลี่ เป็นต้น



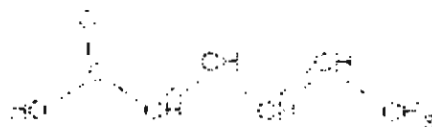
กรดเบนโซอิก เป็นอันตรายต่อร่างกาย ถ้าใช้ในปริมาณน้อยมักจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดย คอนจูเกตกับไกลซีน (glycine) กลายเป็น กรดฮิปปูริก (hippuric acid) หรือ เบนโซอิลไกลซีน (benzoyl glycine) วิธีนี้จะช่วยให้มีการสะสมกรดเบนโซอิกในร่างกาย แต่ถ้าหากใช้ในปริมาณมาก ก็จะทำให้ได้รับอันตรายอาจถึงชีวิตได้

กรดเบนโซอิก สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในพืชบางชนิด เช่น แครนเบอร์รี่ (cranberries) ลูกพรุน (prunes) ซินนามอน (cinnamon) และกานพลู (cloves) กรดนี้ในรูปแบบที่ไม่แตกตัวจะมีฤทธิ์ในการต้านทานเชื้อ และมีฤทธิ์สูงสุดเมื่อ pH อยู่ในช่วง 2.5 - 4.0 กรดนี้จะใช้ได้ดีในอาหารที่มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น น้ำผลไม้ เครื่องดื่มคาร์บอนเนต (carbonated beverages) ของหมักดอง และกระหล่ำปลีดองของเยอรมัน เกลือของกรดเบนโซอิก มักจะใช้ควบคู่กับกรดซอร์บิก หรือพาราเบน (parabens) และระดับที่ใช้ มักจะอยู่ในช่วง 0.05 - 0.10% โดยน้ำหนัก

ปฏิกิริยาของกรดเบนโซอิก ถูกค้นพบในปี พ.ศ. 2418 เพื่อทดแทนการใช้กรดซาลิซิลิก การค้นพบของกรดเบนโซอิกครั้งนั้น ยังไม่มีการนำมาผสมในอาหาร จนกระทั่งมีการผลิตขึ้นเป็นจำนวนมาก จึงเริ่มใช้ผสมในอาหารมากขึ้นจนแพร่หลายในปัจจุบัน นอกจากกรดเบนโซอิกสามารถพบได้ในธรรมชาติ โดยเฉพาะในพืชบางชนิด เช่น ผลลูกพรุน แครนเบอร์รี่ อบเชย และกานพลูแล้ว กรดเบนโซอิกยังสามารถผลิตได้โดยปฏิกิริยาคะตะลิติกออกซิเดชัน หรือออกซิเดชันของโทลูอิน ในสถานะที่มีอากาศด้วย นอกจากนี้ยังผลิตได้โดยไฮโดรลิซิสของเบนโซไตรคลอไรด์ กับ กรดเพทาสิกแห้ง ด้วยไอน้ำที่มีสังกะสีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

กรดซอร์บิก (Sorbic acid)

กรดซอร์บิก ($C_6H_8O_2$) หรือเกลือของกรดซอร์บิก หรือมีชื่อว่า 2,4-hexadienic acid มวลโมเลกุล 112.13 กรัมต่อโมล ลักษณะทั่วไปเป็นของแข็ง ไม่มีสี ความสามารถในการละลายน้ำ 1.6 กรัมต่อลิตร จุดหลอมเหลว $127^\circ C$ และจุดเดือด $228^\circ C$



กรดซอร์บิกนี้ถูกเผาผลาญในร่างกายกลายเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ นิยมใช้เป็นสารกันเสียของอาหาร เพราะว่ามีผลในการชะขวางการเจริญของยีสต์ รา และจุลินทรีย์หลายชนิด กรดนี้จะมีความเสถียรมาก ถึงแม้ว่าจะมีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุล ดังนั้น จึงใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้โดยไม่มีผลต่อกลิ่น รสชาติ หรือโครงสร้างอาหาร ซึ่งปฏิกิริยาการชะขวางเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากโมเลกุลไม่แตกตัว จึงทำให้นิยมใช้สารนี้เป็นสารกันเสียในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด

การใช้กรดซอร์บิกนั้นจะมีความปลอดภัยต่อร่างกาย เพราะขบวนการเมแทบอลิซึมของมนุษย์จะไปทำลายคล้ายกับไขมันที่รับประทานเข้าไป ดังนั้นกรดซอร์บิก และเกลือโซเดียมโพแทสเซียม และเกลือแคลเซียม จึงใช้กันอย่างกว้างขวางในการป้องกันและยับยั้งเชื้อราและยีสต์ ความเข้มข้นของกรดซอร์บิกที่อนุญาตให้ใช้ในประเทศไทย คือ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

วิธีดำเนินการวิจัย :

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ของ Shimadzu ประกอบด้วย

- ระบบควบคุม (System controller) รุ่น SCL

10A

- เครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometric detector) รุ่น SPD-10A ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

- ปั๊ม (HPLC pump) รุ่น LC-10A อัตราการไหลของกระแสตัวพา (flow rate) 1.0 mL/min แบบ Isocratic elution

- คอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC column) รุ่น Inertsil ODS-3 , ขนาดอนุภาค 5 μm . 4.6 i.d.x250 mm, บริษัท GL Science Inc., Tokyo, Japan พร้อมด้วย guard column, ODS-3 , 5 μm , 4x10 mm.

- Injection valve ของ Rheodyne ปริมาตรการฉีดสารตัวอย่าง (Injection volume) 20 μL

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย :

การเก็บตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยเป็น สุราแช่ ได้แก่ ไวน์ และสาโท ที่ผลิตและจำหน่ายอยู่ในเขตจังหวัดลพบุรีเป็นหลักและจังหวัดใกล้เคียง ซึ่งช่วงเวลาในการเก็บอยู่ระหว่างเดือนพฤศจิกายน - ธันวาคม พ.ศ. 2545 มีจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 18 ตัวอย่าง ทำการติดฉลากเพื่อกำหนดหมายเลข วันเดือนปีที่เก็บ สถานที่เก็บ ฯลฯ ของตัวอย่างแต่ละขวด

การรักษาตัวอย่าง

นำตัวอย่างทั้งหมดห่อหุ้มขวดตัวอย่าง ด้วยถุงพลาสติก รัดปากให้แน่น แล้วเก็บตัวอย่างทั้งหมดในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ โดยมีอายุไม่เกิน 1 เดือน

การชักตัวอย่าง

นำขวดตัวอย่างออกจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ เมื่อมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ให้เขย่าขวดตัวอย่าง ประมาณ 15 วินาที ใช้ปิเปตดูดสุราพื้นเมืองขึ้นจากขวดบรรจุ บริเวณส่วนกลางของขวด ปริมาตรประมาณ 50 mL ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 mL ที่ล้างสะอาด

การเตรียมสารตัวอย่าง

นำตัวอย่างของสุราพื้นเมือง 50 mL ใส่ลงไปในบีกเกอร์ขนาด 100 mL นำไปกำจัดแก๊ส (De-gasses) ด้วย Ultrasonic bath นาน 15 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 3 นาที เพื่อกำจัดสารแขวนลอยออก จากนั้นใช้ syringe ดูดสารละลายส่วนบนที่ใส นำมากรองผ่านเมมเบรนโพลีเอไมด์ ขนาดรูพรุน 0.45 μm ให้มีปริมาตรประมาณ 3 - 4 mL ลงในขวด vial ขนาด 5 mL ปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในไวน์ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) ตามวิธีของ AOAC (The Association of Official Analytical Chemists) โดยกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ที่อยู่ในตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ จะเกิดการแพร่กระจายและการถูกดูดซับที่แตกต่างกัน ทำให้แยกออกจากกันและเดินทางออกจากคอลัมน์ได้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 230 nm และหาปริมาณวิเคราะห์โดยใช้วิธี External standard



สภาวะของระบบ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ มีดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	C18 ขนาด 250 x 4.1 mm id, 5 µm พร้อมด้วย guard column
ปริมาณการฉีดสารตัวอย่าง	20 µL
ความยาวคลื่น	230 นาโนเมตร
ชนิดของกระแสตัวพา	30% อะซิโตนไนไตรล์ + 70% ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 2.3) โดยปริมาตร
อัตราการไหลของกระแสตัวพา	1.0 mL/min แบบ Isocratic elution

การทำกราฟมาตรฐาน (Calibration graph) ของสารละลายมาตรฐานของกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก โดยการเตรียมสารละลายกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่ความเข้มข้น 0 - 120 mg/L แล้วนำไปฉีดเข้าไปในคอลัมน์เพื่อทำให้เกิดการแยก แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-VIS spectrometric detector ที่ความยาวคลื่น 230 nm

การวัดปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในสารตัวอย่างสุราพื้นเมืองโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การประเมินคุณภาพของสุราพื้นเมือง

นำผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกในสารตัวอย่างสุราพื้นเมือง เปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานของกรมสรรพสามิต แล้วแยกสารตัวอย่างสุราพื้นเมืองเป็นกลุ่มที่มีปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกน้อยกว่าเกณฑ์มาตรฐาน (ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน) และกลุ่มที่มีปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน (ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน)

ผลการวิจัย :

สุราพื้นเมือง จำนวนทั้งสิ้น 18 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง ซึ่งผลิตและวางจำหน่ายในเขตจังหวัดลพบุรีเป็นหลัก และจังหวัดใกล้เคียง ในช่วงเดือนพฤศจิกายน - ธันวาคม พ.ศ.2545 ได้ทำการสังเกต การสอบถาม/สัมภาษณ์ผู้จำหน่ายและผู้ผลิตโดยตรง และได้ข้อมูลจากฉลากที่ติดอยู่ที่ข้างขวด ทำให้ทราบลักษณะทั่วไปของตัวอย่างสุราพื้นบ้านแต่ละตัวอย่าง ซึ่งพอจะสรุปได้ในตาราง

ตาราง ลักษณะทั่วไปของตัวอย่างสุราพื้นเมือง

ที่	ผู้ผลิต	ชนิดสุรา	วัตถุดิบ
1	"วินทัย ไวน์มะกอก" โดย หจก. ภูนาพร	ไวน์	มะกอก (<i>Spondias pinnata</i>)
2	"ไวน์ไร่กบตัน" โดย ไร่กบตัน	ไวน์	องุ่น
3	"ไวน์เชิง" โดย หจก. ลพบุรีชลสิทธิ์	ไวน์	ชิง
4	"ไวน์กระเจียน" โดย หจก. ลพบุรีชลสิทธิ์	ไวน์	กระเจียน
5	"ไวน์ผลไม้รวม" โดย หจก. ลพบุรีชลสิทธิ์	ไวน์	ผลไม้รวม
6	"สาโท" โดย กลุ่มเกษตรกรทำไร่ออนสารเดช	สาโท	ข้าวเหนียวดำ
7	"สาโทเมืองละโว้" โดย หจก. ลพบุรีชนนาถ	สาโท	ข้าวเหนียว
8	"สุราพื้นเมืองโทสาโท" โดย หจก. อนุรักษ์รักษา	สาโท	มะยม
9	"Monkey Wine" โดย หจก. งามอาจสุราไทย	ไวน์	มะเฟือง

ที่	ผู้ผลิต	ชนิดสุรา	วัตถุดิบ
10	"Monkey Wine" โดย หจก.องอาจสุราไทย	ไวน์	กล้วยหอม
11	"สาโทไทย บ้านวัดมะค่า" หจก.ชวนเจริญกิจ	สาโท	ข้าวเหนียว
12	"ลำสนธิไวน์ผลไม้รวม" โดย หจก.ถาวรสาโท	ไวน์	ผลไม้ป่า+มะเฟือง+มะยม +สับปะรด+กระเจี๊ยบแดง
13	"สาโทข้าวกล้อง น้ำข้าวแม่กุหลาบโดยกลุ่มเกษตรกรบ้านหนองบัว"	สาโท	ข้าวกล้อง
14	"ไวน์ไทย" หจก.ชวนเจริญกิจ	ไวน์	ข้าวเหนียวดำ
15	"สาโท กลุ่มเกษตรกรทำนายนิมชัย"	สาโท	ข้าวเหนียว
16	"สาโทกระชายดำ" โดยกลุ่มทำสวนบางคู	สาโท	กระชายดำ
17	"เหล้าดองสมุนไพรจิ้งหรีด" โดยชมรมหารายได้ระหว่างเรียน ร.ร.ช่องแคพิทยาคม	ไวน์	กำลังเสือโคร่ง+เหล้าโรง +ข้างงาเอก+ น้ำผึ้ง+อ้อยสามสวน+กล้วยตาก+จิ้งหรีด +เครือไม้ช้าง+ม้ากระเทียมโรง+ฝางแดง
18	ป่าไม้ชุมชนเขาพระพุทธรูปน้อย ต.สองคอน อ.แก่งคอย จ.สระบุรี	ไวน์	องุ่นป่า ชื่อพื้นเมืองคือ "อีโก้ย"

ผลการหาปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในสารตัวอย่างสุราพื้นเมืองจำนวน 18 ตัวอย่าง ได้ผลการวิเคราะห์และผลการประเมินคุณภาพแสดงในตาราง

ตาราง ผลการหาปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกในสารตัวอย่างสุราพื้นเมืองและการประเมินคุณภาพ

สารตัวอย่างที่	กรดเบนโซอิก (mg/L)	กรดซอร์บิก (mg/L)	ผลการประเมิน
1	1.6	21.5	ดี , ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน
2	1.3	ตรวจไม่พบ	ดี , ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน
3	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน
4	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน
5	ตรวจไม่พบ	2.5	ดี , ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน
6	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน
7	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน
8	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน
9	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดี , ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

สารตัวอย่างที่	กรดเบนโซอิก (mg/L)	กรดซอร์บิก (mg/L)	ผลการประเมิน
10	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฯ
11	6.3	ตรวจไม่พบ	ดี , ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฯ
12	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฯ
13	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฯ
14	3.2	ตรวจไม่พบ	ดี , ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฯ
15	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฯ
16	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฯ
17	58.1	ตรวจไม่พบ	ดี , ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฯ
18	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ดีเยี่ยม , ผ่านเกณฑ์มาตรฐานฯ

สรุปผลการวิจัย :

จากการประเมินคุณภาพของตัวอย่างสุรพืชมเมือง ทั้ง 18 ตัวอย่าง โดยพิจารณาเฉพาะปริมาณสารที่เจือปน ได้แก่ กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก เท่านั้น และใช้เกณฑ์มาตรฐานของกรมสรรพสามิต ซึ่งกำหนดไว้ว่า ปริมาณกรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก จะมีได้ไม่เกิน 200 mg/L ดังนั้น เมื่อใช้เกณฑ์มาตรฐานดังกล่าวเป็นเกณฑ์ในการประเมินคุณภาพของตัวอย่างสุรพืชมเมือง จึงสามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างสุรพืชมเมืองทั้งหมด 18 ตัวอย่าง เป็นสุรพืชมเมืองที่มีคุณภาพ ได้เกณฑ์มาตรฐานของกรมสรรพสามิต

ปริมาณกรดเบนโซอิกหรือกรดซอร์บิก ที่วิเคราะห์พบอยู่ในสุรพืชมเมืองนี้ อาจจะมาจากสาเหตุ 3 ประการคือ

- 1) กรดเบนโซอิกหรือกรดซอร์บิกที่ผู้ผลิตได้เติมลงไป ในสุรพืชมเมืองเพื่อยืดอายุของสุรพืชมเมืองให้เก็บไว้จำหน่ายหรือบริโภคได้นานขึ้น
- 2) กรดเบนโซอิกหรือกรดซอร์บิกที่มาจากพืชที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตสุรพืชมเมือง เช่น กรดเบนโซอิก สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติในพืชหรือผลไม้บางชนิด เช่น แครนเบอร์รี่ (cranberries) ซินนามอน (cinnamon) ลูกพรุน (prunes) กานพลู (cloves) และพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งเป็นธัญพืชที่ผู้ผลิตหรือเกษตรกรได้ทดลองนำมาเป็นวัตถุดิบในหมักสุรา

พื้นเมือง เช่น ผลไม้ป่าต่าง ๆ กำลังเลื้อยไคร่ง เหล้าโรง ช้างงาเอก น้ำผึ้ง อ้อยสามสวน กล้วยตาก เครือไล่ช้าง ม้ากระเทียมโรง ผางแดง องุ่นป่า "อีโก้" กระชายดำ มะเฟือง มะยม สับปะรด กระเจี๊ยบแดง เป็นต้น

3) กรดเบนโซอิกหรือกรดซอร์บิกที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี เช่น จากปฏิกิริยาอะซิติกออกซิเดชันหรือออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ ในสภาวะที่มีอากาศ

ข้อเสนอแนะของงานวิจัย :

1) การหาปริมาณกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก ในสุรพืชมเมือง โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในงานวิจัยนี้ เป็นวิธีที่เหมาะสม สะดวก รวดเร็ว วิธีหนึ่งโดยไม่มีปัญหาจากตัวรบกวน (interference) ซึ่งเป็นสารต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ในสุรพืชมเมือง เช่น แอลกอฮอล์ น้ำตาล สี เป็นต้น แต่หากพบปัญหาการรบกวนจากตัวรบกวนดังกล่าว อาจจะมีวิธีการกำจัดตัวรบกวนได้โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Liquid-liquid extraction) โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม หรือการสกัดด้วยวิธี Solid phase extraction (SPE)

2) การวิเคราะห์กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกอย่างต่อเนื่อง โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในงานวิจัยนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์อาหารหรือเครื่องดื่ม

ได้อีกหลายชนิด

3) การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกอย่างต่อเนื่อง ได้อย่างประหยัด รวดเร็วและใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่ราคาถูก นับเป็นสิ่งที่ควรกระทำเป็นอย่างยิ่ง เช่น การวิเคราะห์อย่างต่อเนื่องโดยเทคนิคโฟลอินเจกชันอะนาลิซิส (Flow injection analysis : FIA)

บรรณานุกรม

- กุลยา จันทรอรุณ (2533), เคมีอาหาร, หน่วยศึกษานิติน กรมผักสดครุ, โรงพิมพ์ศาสนา, กรุงเทพมหานคร.
- แก่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม (2535), *Principle and Techniques of Instrumental Analysis* พิมพ์ครั้งที่ 1, ห้างหุ้นส่วนจำกัด ชวนพิมพ์, กรุงเทพมหานคร.
- Ferreira I.M.P.L.V.O.; Mendes E.; Brito P.; Ferreira M.A. (2000), *Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC*, Food Research International, March , vol. 33, no. 2, pp. 113-117
- Gonzalez M.; Gallego M.; Valcarcel M. (1999), *Gas chromatographic flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods*, Journal of Chromatography A, vol. 848, no. 1, pp. 529-536
- Gonzalez M.; Gallego M.; Valcarcel M. (1998) , *Simultaneous gas chromatographic determination of food preservatives following solid-phase extraction*, Journal of Chromatography A, vol. 823, no. 1, pp. 321-329
- Mikami E.; Goto T.; Ohno T.; Matsumoto H.; Nishida M. (2002), *Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 28, no. 2, pp. 261-267
- Mihyar G.F.; Yousif A.K.; Yamani M.I. (1999) , *Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Labanah by High-Performance Liquid Chromatography*, Journal of Food Composition and Analysis, vol. 12, no. 1, pp. 53-61
- Miller, J.C. and Miller, J.N. (1993) , *Statistics for analytical chemistry* , 3rd ed., Ellis Horwood PTR Prentice Hall, New York.
- Renner T.; Baer-Koetzle M.; Scherer G. (1999), *Determination of sorbic acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, vol. 847, no 1, p 127-133
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A (1998). *Principle of Instrumental Analysis*, 5th ed Harcourt Brace & Company, USA.
- William H. (2000), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed , USA