

**การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิก แอสปาทาม
และแคฟเฟอีน ในเครื่องดื่ม โดยวิธีไดอไลซิสและเอชพีแอลซี**
**Method Development for Determination of Benzoic acid Aspartame
and Caffeine in Beverages by Dialysis Method and HPLC**

ยุพา ฉันทปัญญารัตน์
วีระพร แจ่มศรี
กองอาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Yupa Chantapanyarat
Veeraporn Jamsri
Division of Food
Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิก แอสปาทาม และแคฟเฟอีนในเครื่องดื่ม ด้วยเครื่อง โครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง ในระบบ isocratic ซึ่งเป็นวิธีของ Argoudelis โดยการเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไดอไลซิสก่อนการฉีดเข้าเครื่อง และมีการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้เหมาะสมกับคอลัมน์ซึ่งเป็น Partisil 10 SCX เฟสเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของ 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ และ Methanol ในอัตราส่วน 97.5 ต่อ 2.5 อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร จากนั้นเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างวิธีไดอไลซิสและวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง จากการทำ Method Validation พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ของสารทั้งสามมีค่าใกล้เคียง 1.0000 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของกรดเบนโซอิกให้ค่าร้อยละของประสิทธิภาพวิธีและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานในช่วง 90.9 ± 0.67 ถึง 101.6 ± 0.56 แอสปาทาม 88.3 ± 2.14 ถึง 105.3 ± 0.15 และแคฟเฟอีน 95.9 ± 1.72 ถึง 104.5 ± 0.75 โดยทดสอบความเข้มข้นของสารในตัวอย่างในช่วง 100-300 ไมโครกรัมต่อกรัมสำหรับกรดเบนโซอิก และช่วง 250-750 ไมโครกรัมต่อกรัมสำหรับแอสปาทาม และแคฟเฟอีน ผลการทดสอบความแม่นยำโดยวิธีไดอไลซิสและวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรงของกรดเบนโซอิก แอสปาทาม และแคฟเฟอีน ให้ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ 1.38, 0.22, 0.99 และ 2.60, 2.56, 2.55 ตามลำดับ ค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้โดยวิธีไดอไลซิสของสารทั้งสามมีค่า 20 ไมโครกรัมต่อกรัม เปรียบเทียบกับวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง จะมีค่าสูงกว่าคือ 40, 30 และ 15 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

ABSTRACT

Developed method for determination of benzoic acid, aspartame and caffeine in beverages by High Performance Liquid Chromatography in isocratic system using Argoudelis's method. Cleaned up sample before injection by dialysis and change a ratio of mobile phase for column suitability were developed. The developing conditions were Partisil 10 SCX column, mobile phase was a mixture of 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and methanol in a ratio of 97.5 and 2.5, flow rate 0.8 ml/min., detector UV 214 nanometer. After that compare the result of analysis between dialysis and direct injection. The results from method validation showed that the value of correlation coefficient of those three compounds were near 1.0000. The accuracy test showed % Recovery and standard deviation of benzoic acid in the range of $90.9 \pm 0.67 - 101.6 \pm 0.56$, aspartame $88.3 \pm 2.14 - 105.3 \pm 0.15$ and caffeine $95.9 \pm 1.72 - 104.5 \pm 0.75$ which the concentration in samples were tested in the range of 100-300 ug/gm for benzoic acid and 250-750 ug/gm for aspartame and caffeine. Percentage relative standard deviation from precision test of benzoic acid, aspartame and caffeine by dialysis and direct injection were 1.38, 0.22, 0.99 and 2.60, 2.56, 2.55 respectively. Limit of quantitation of 3 compounds by dialysis method were 20 ug/gm, whereas compared by direct injection, the limit of quantitation had more higher values which were 40, 30 and 15 ug/gm, respectively.

Key words : dialysis, benzoic acid, aspartame, caffeine, HPLC

บทนำ

การวิเคราะห์กรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคฟเฟอีน ในเครื่องต้ม สามารถทำได้หลายวิธี เช่น กรดเบนโซอิก⁽¹⁾ และ แคฟเฟอีน⁽²⁾ ใช้วิธีสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมและหาปริมาณด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองเวลามาก วิธีการยุ่งยากและยังได้รับพิษจากสารเคมีอีกด้วย อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันในปัจจุบันคือการใช้เครื่องโครมาโตกราฟชนิดของเหลวความดันสูง (HPLC) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ให้ความถูกต้องแม่นยำสูง สำหรับแอสปาเทม ซึ่งเป็นวัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาลที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในเครื่องต้มยกเว้นเครื่องต้มที่มีจุดประสงค์พิเศษเช่น เพื่อควบคุมน้ำหนัก โดยใช้ในปริมาณที่เหมาะสม ตามความเห็นชอบของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง วิเคราะห์กรดอมิโน⁽³⁾ หรือทำให้เกิดสารเรืองแสงแล้ววัดการเรืองแสงด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์⁽⁴⁾ เครื่องต้มที่มีการใช้กรดเบนโซอิก ซัคคาริน แอสปาเทม และแคฟเฟอีน สามารถตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC ในระบบ gradient ใช้คอลัมน์ C-18 reverse phase ตามวิธีของ Cross Reg⁽⁵⁾ และใน ระบบ isocratic ตามวิธีของ Argoudelis⁽⁶⁾ ซึ่งสามารถแยกสารทั้งสี่ชนิดได้พร้อมกันจากการฉีดครั้งเดียว

จากการศึกษาพบว่า วิธีของ Argoudelis สามารถหาปริมาณกรดเบนโซอิก ซัคคาริน แอสปาเทม และแคฟเฟอีนในเครื่องต้ม แต่จากการทดสอบพบว่า ซัคคาริน และอะซีซัลเฟม เค (acesulfame K) ซึ่งเป็นวัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาลที่นิยมเติมในเครื่องต้ม สามารถแยกออกมาในเวลาเดียวกัน ดังนั้นจึงศึกษาวิธีวิเคราะห์เฉพาะกรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคฟเฟอีนเท่านั้น โดยที่เครื่องต้มที่มีซัคคาริน และอะซีซัลเฟม เค จะใช้วิธีอื่นในการหาปริมาณ จากวิธีของ Argoudelis มีการเติม Adenine sulfate ซึ่งเป็น Internal standard และไม่มีวิธีการเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์ หลังจากเจือจางตัวอย่างแล้วสามารถฉีดเข้าเครื่องโดยตรง

(direct injection) ทำให้มีสารรบกวนสูง ซึ่งมีผลทำให้เกิด peak tail on initial ในกรณีที่ตัวอย่างมีสารในปริมาณน้อยๆ จะทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยวิธีไดอไลซิส (dialysis)⁽⁷⁾ ซึ่งเป็นวิธีที่ให้สารที่มีโมเลกุลเล็ก ซึมผ่านเซลลูโลสเมมเบรน และจากสภาวะเครื่องมือของวิธีดังกล่าว ไม่สามารถแยกพีคของแอสปาเทม internal standard และแคฟเฟอีนออกจากกันได้หลังจากที่มีการใช้คอลัมน์ไปแล้วหลายๆ ครั้ง และยังเกิด split peak และ tailing อีกด้วย จึงทำการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) จากวิธีของ Argoudelis เพื่อให้เหมาะสมกับคอลัมน์ จากนั้นทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีไดอไลซิสและวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง และเพื่อสามารถหาปริมาณสารดังกล่าวในเครื่องต้มหลายประเภท จึงทดสอบในตัวอย่าง น้ำอัดลม น้ำผลไม้ และเครื่องต้มจากพืช

วัตถุประสงค์และวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

Thermo Separation Products Isocratic HPLC System consists of Solvent Delivery System model CM 3200, Variable UV-VIS Detector model SM 3200, Injector Rheodyne 7125 with 20 ul loop, PC-Laser 486DX and Printer LX-300.

Column Partisil 10 SCX (cation-exchange) 4.6 mm.x 250 mm., 10 micron attached with guard column (4.6 mm.x 30 mm., 10 micron) Phenomenex USA.

Ultra sonic bath

Dialysis membrane (Cellu Sep Regenerated Cellulose Tubular Membrane, flat width 45 mm., wall thickness 20 um, MW.12,000-14,000)

Clarification kits for filter solvent and

sample

Nylon 66 membrane, Alltech. pore size 0.45 micron, diameter 47 mm. for filter solvent and diameter 13 mm. for sample.

สารมาตรฐานและสารเคมี

Standard benzoic acid purity 99.8%, aspartame purity 99.5%, caffeine purity 100.3% and adenine sulfate purity 99.8% (Sigma Chemical Company)

Methanol gradient grade for HPLC (Merck), methanol AR. (Merck), Ammonium dihydrogenphosphate AR. ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), Sodium chloride AR. (NaCl) and 85 % phosphoric acid (H_3PO_4)

วิธีเตรียมสารมาตรฐาน

Stock standard solution : สารละลายกรดเบนโซอิก แอสปาร์เทม และแคฟเฟอีน ความเข้มข้นชนิดละ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งสารมาตรฐานกรดเบนโซอิก แอสปาร์เทม และแคฟเฟอีน ชนิดละ 0.05 กรัม ละลายใน 10 % methanol AR. ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask ยกเว้นแคฟเฟอีน ละลายในน้ำกลั่น

Internal standard solution : สารละลาย adenine sulfate ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งสารมาตรฐาน adenine sulfate 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask

วิธีเตรียม mobile phase : 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ / methanol = 97.5/2.5

โดยซึ่ง $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 11.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1 ลิตร ใน volumetric flask ตวงมา 487.5 มิลลิลิตร ลงใน cylinder ที่มีจุกขนาด 500 มิลลิลิตร

ปิเปต methanol gradient grade 12.5 มิลลิลิตร เขย่า กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร โดยใช้ clarification kits degas ด้วย ultra sonic bath

วิธีเตรียม Dialysis solution

Inner solution : ซึ่ง NaCl 100 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร เติม 85 % H_3PO_4 11.8 กรัม ปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

Outer solution : ซึ่ง 85% H_3PO_4 11.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ตัวอย่าง

ตัวอย่างเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลม น้ำผลไม้ และเครื่องดื่มทำจากพืชในการทดสอบวิธีวิเคราะห์

สภาวะเครื่องมือ

Column: Partisil 10 SCX (cation exchange) 4.6 mm.X 250 mm., Phenomenex. attached with guard column, Mobile phase : 0.1 M. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ / Methanol = 97.5/2.5 , Flow rate 0.8 ml/min , Detector UV 214 nm. , Range 0.01 AUFS, Injection volume 20 ul, Chart speed 0.5 cm./min., Calculation type : Internal standard and Base on : Area

วิธีวิเคราะห์

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปต Stock standard solution ของกรดเบนโซอิก และแคฟเฟอีน จำนวน 100, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครลิตร และ แอสปาร์เทม จำนวน 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ ตามลำดับ ปิเปตสารละลาย adenine sulfate 100 ไมโครลิตร ลงใน volumetric flask ทุกใบ เพื่อเป็น internal standard ปริมาตร

ด้วย 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ที่ผ่านการกรองด้วย membrane filter แล้ว สารละลายกรดเบนโซอิก และแคฟเฟอีน มีความเข้มข้น 5,10,20,25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอสปาเทม มีความเข้มข้น 10,20,30,40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร adenine sulfate มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายผสมนี้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานแต่ละตัว กับพื้นที่ใต้พีค

การเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยวิธีไดออลซิส

ตัดแผ่นเซลลูโลสเมมเบรนให้มีความยาว 15-20 ซม. นำไปแช่ในน้ำมัดปลายให้เป็นถุงด้วยเส้นยางไม่มีสีให้แน่น ใส่ตัวอย่างประมาณ 20 กรัม เติม internal standard 2 มิลลิลิตร และ inner solution 20 มิลลิลิตร รัดปากถุงด้วยเส้นยางให้แน่น เขย่าให้เข้ากัน ใส่ลงใน cylinder ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม outer solution จนถึงขีดหมายประมาณ 190 มิลลิลิตร ปิดปาก cylinder ด้วย parafilm ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน แล้วจึงปรับปริมาตรด้วย outer solution จนครบ 200 มิลลิลิตร เขย่า นำเมมเบรนที่ใส่ตัวอย่างทิ้ง เขย่าอีกครั้งหนึ่ง กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 13 มิลลิเมตร ด้วย clarification kit ลงในขวด vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง

ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม internal standard 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน และเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 13 มิลลิลิตร ด้วย clarification kit ลงในขวด vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

ดำเนินการตามวิธีของ Sinthusarn⁽⁸⁾

โดยการ plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิก และแคฟเฟอีน

ความเข้มข้น 5,10,20,25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอสปาเทม ความเข้มข้น 10,20,30,40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่า regression line (ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์) และค่าช่วงของการวิเคราะห์จากค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

การทดสอบความถูกต้อง (Accuracy)

ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตามวิธีของ Sinthusarn⁽⁸⁾ โดยหาค่าประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์ (% recovery) เตรียมตัวอย่างเพื่อทำไดออลซิสตามวิธีที่กล่าวข้างต้น ใช้ตัวอย่างน้ำอัดลมและน้ำผลไม้ในการทดสอบ โดยที่หลังจากเติม internal standard 2 มิลลิลิตรแล้ว ก่อนเติม inner solution ให้เติมสารละลายมาตรฐาน กรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคฟเฟอีน โดยทดสอบที่ 3 ความเข้มข้นคือ 10,20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับทดสอบกรดเบนโซอิก และความเข้มข้น 25,50 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับทดสอบ แอสปาเทม และแคฟเฟอีน ทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณความเข้มข้นจากพื้นที่ใต้พีคเทียบกับกราฟมาตรฐาน หาประสิทธิภาพวิธีเปรียบเทียบวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง เตรียมตัวอย่างตามวิธีที่กล่าวข้างต้นหลังจากเติม internal standard 500 ไมโครลิตรแล้ว เติมสารละลายมาตรฐานตามวิธีไดออลซิส

การทดสอบความแม่นยำ (Precision)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ตามวิธีของ Sinthusarn⁽⁸⁾ โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีไดออลซิส โดยทำ Repeatability replicate analysis of samples ในตัวอย่างน้ำอัดลม เป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน วันละ 5 ซ้ำ และทดสอบ robustness โดยใช้วิธีเดียวกัน เครื่องมือเครื่องเดียวกัน แต่ผู้วิเคราะห์และวันทำการวิเคราะห์ ต่างกัน ทดสอบ 4 วันๆ ละ 5 ซ้ำ คำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) จากค่าเฉลี่ยในแต่ละวัน และหาค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน (relative standard deviation, RSD) เปรียบเทียบวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง ทดสอบเฉพาะ

repeatability test

การทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถรายงาน (Limit of quantitation , LOQ)

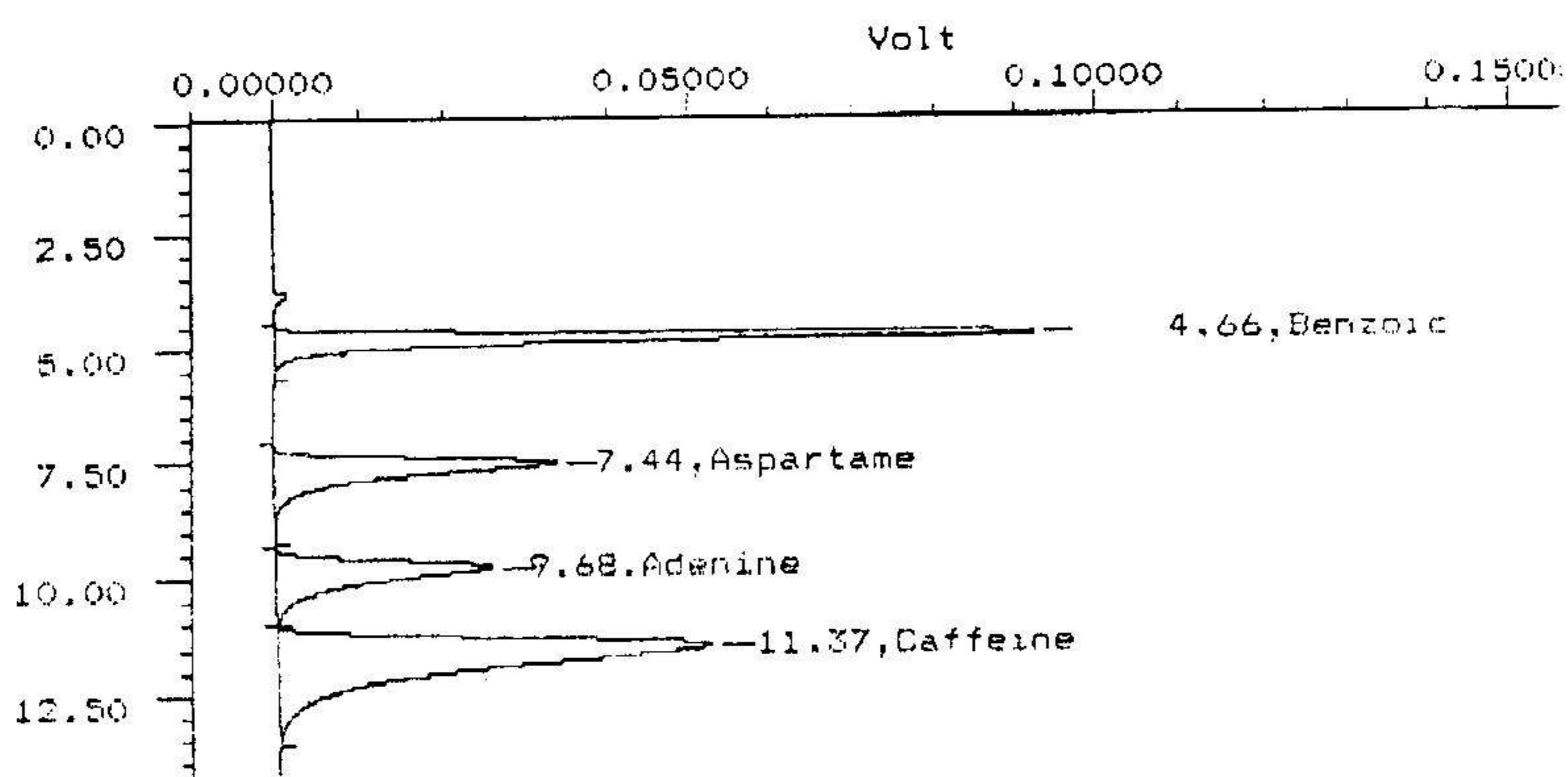
ทดสอบโดยใช้วิธีของ Sinthusarn⁽⁸⁾ ด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิก แอสปาร์เทม และแคฟเฟอีนที่ความเข้มข้นน้อยๆ ลงในตัวอย่างโดยวิธีไดออลซิส จนได้ผลเป็นที่น่าพอใจ จากนั้นทดสอบในตัวอย่าง 3 ชนิดคือ น้ำอัดลม น้ำผลไม้และเครื่องดื่มจากพืชที่ความเข้มข้นที่ต้องการ ทดสอบชนิดละ 5 ซ้ำ หาประสิทธิภาพวิธี และสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวนเปรียบเทียบกับวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง ทดสอบเฉพาะน้ำผลไม้

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

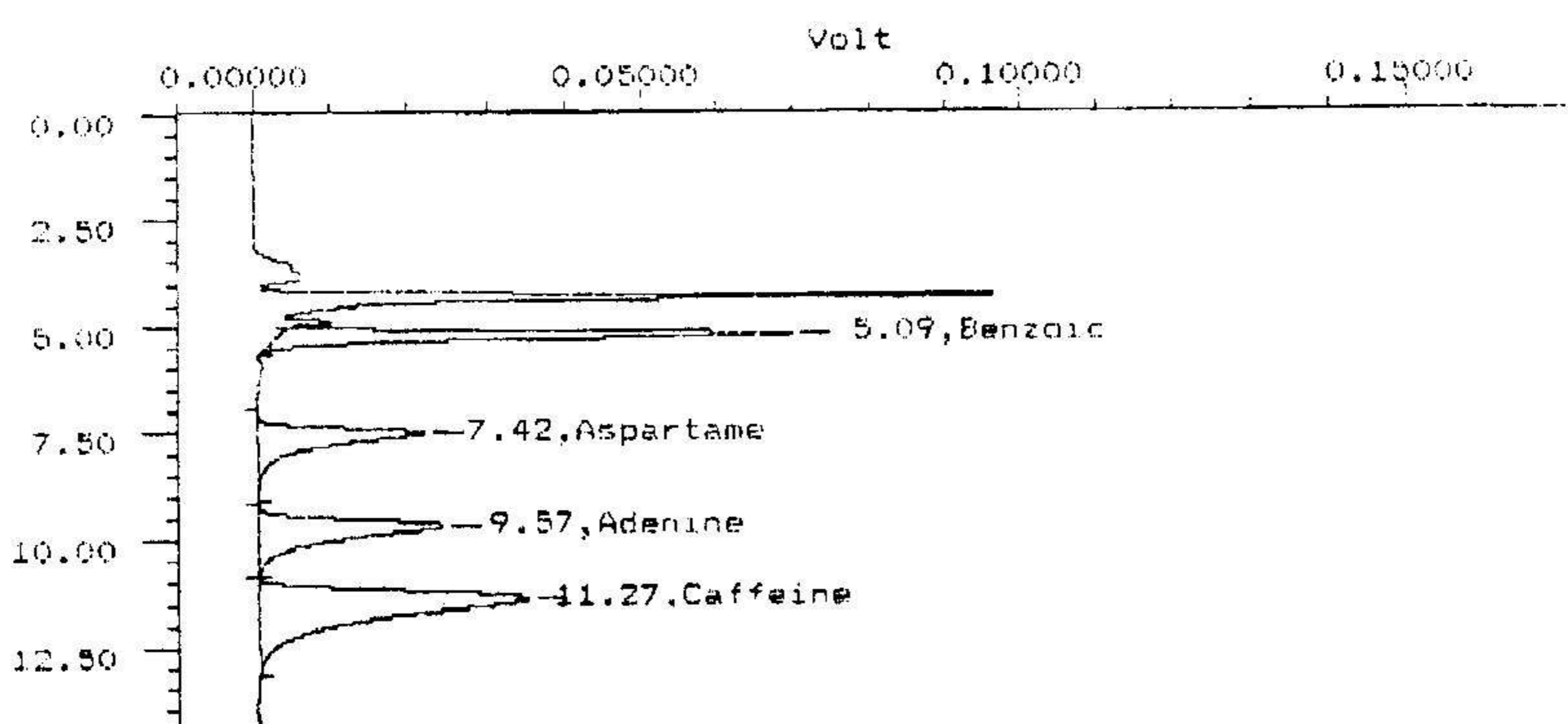
เตรียมสารละลายผสมของกรดเบนโซอิก แอสปาร์เทม แคฟเฟอีน อะดีนีนซัลเฟต กรดซอร์บิค ซัคคาริน อะซีซัลเฟม เค พาราไฮดรอกซีเบนโซเอทเอสเทอร์ของเมทิล เอทิล โพรพิล และบิวทิล ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ดูความแตกต่างของเวลาในการแยกสารออกมา (retention time) ⁽⁸⁾

ผล

จากสภาวะเครื่องมือดังกล่าว สามารถแยกสารกรดเบนโซอิก แอสปาร์เทม adenine sulfate และแคฟเฟอีน ออกจากกันได้ ดังภาพที่ 1 และ ภาพที่ 2



ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสาร 3 ชนิด และ Adenine sulfate ในเครื่องดื่มได้เอ็ทโดยวิธีไดออลซิส

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ โดย plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิก และแคฟเฟอีน ที่ความเข้มข้น 5,10,20,25 และ 30 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร แอสปาเทม ที่ความเข้มข้น 10,20,30,40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับพื้นที่ใต้พีค ค่า regression line ของกรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคฟเฟอีน มีค่า $Y(\text{area}) = -0.0203+1.13*X$, $Y(\text{area}) = -0.0305+2.51*X$ และ $Y(\text{area}) = -0.0131+0.669*X$ ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ มีค่า 0.9979,0.9970

และ 0.9976 ตามลำดับ ช่วงของการวิเคราะห์มีค่า 5-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกรดเบนโซอิก และแคฟเฟอีน 10-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับแอสปาเทม

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานของกรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคฟเฟอีน ลงในตัวอย่างน้ำอัดลมและน้ำผลไม้ ทดสอบ 3 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบวิธีไดโอสแตท และวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง ดังตารางที่ 1-3

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีของกรดเบนโซอิก โดยวิธีไดโอสแตทและวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง

ตัวอย่าง	วิธีไดโอสแตท			วิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง		
	ปริมาณที่เติม (ug/ml) n=3			ปริมาณที่เติม (ug/ml) n=3		
	10	20	30	10	20	30
น้ำอัดลม	91.5±0.64	91.7±0.24	93.1±0.40	90.9±0.67	96.2±0.38	99.1±0.36
น้ำผลไม้	94.2±3.12	92.7±1.37	95.1±1.48	90.8±0.47	95.5±0.46	101.6±0.56

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีของแอสปาเทม โดยวิธีไดโอสแตทและวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง

ตัวอย่าง	วิธีไดโอสแตท			วิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง		
	ปริมาณที่เติม (ug/ml) n=3			ปริมาณที่เติม (ug/ml) n=3		
	25	50	75	25	50	75
น้ำอัดลม	93.9±0.57	96.0±1.19	97.5±1.07	103.4±0.83	103.5±0.97	104.7±0.90
น้ำผลไม้	88.3±2.14	97.2±2.00	95.3±1.89	99.4±0.89	101.2±0.58	105.3±0.15

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีของแคฟเฟอีน โดยวิธีไดโวลซิสและวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง

ตัวอย่าง	วิธีไดโวลซิส			วิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง		
	ปริมาณที่เติม (ug/ml) n=3			ปริมาณที่เติม (ug/ml) n=3		
	10	20	30	10	20	30
น้ำอัดลม	98.9±0.80	99.4±0.50	101.6±0.62	103.4±0.22	103.7±0.33	103.9±0.36
น้ำผลไม้	96.2±3.08	95.9±1.72	98.6±0.94	98.6±0.91	100.0±0.40	104.5±0.75

ผลการทดสอบความแม่นยำ โดยวิธี repeatability test และ robustness ในตัวอย่างน้ำอัดลม ทดสอบติดต่อกัน 4 วันๆ ละ 5 ซ้ำ เปรียบเทียบวิธีไดโวลซิส และวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการทดสอบความแม่นยำ โดยวิธีไดโวลซิสและวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง

สารประกอบ	วิธีไดโวลซิส				วิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง	
	Repeatability		Robustness		Repeatability	
	SD	%RSD	SD	%RSD	SD	%RSD
กรดเบนโซอิก	1.78	1.38	1.94	1.38	3.84	2.60
แอสปาร์เทม	0.43	0.22	2.07	1.00	7.82	2.56
แคฟเฟอีน	1.27	0.99	1.72	1.35	3.15	2.55

ผลการทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ และประสิทธิภาพวิธีที่ความเข้มข้นต่ำสุดของกรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคฟเฟอีน เปรียบเทียบกับวิธีไดโวลซิสและวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่าต่ำสุดที่สามารถรายงาน โดยวิธีไดโวลซิสและวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง

ตัวอย่าง	ประสิทธิภาพวิธีโดยวิธีไดโวลซิส			ประสิทธิภาพวิธีโดยวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง		
	(ug/gm), n=5			(ug/gm), n=5		
	กรดเบนโซอิก = 20	แอสปาเทม = 20	แคฟเฟอีน = 20	กรดเบนโซอิก = 40	แอสปาเทม = 30	แคฟเฟอีน = 15
น้ำอัดลม	89.7±3.84	105.8±8.35	91.7±7.05	-	-	-
%RSD	4.28	7.89	7.69			
น้ำผลไม้	79.7±0.53	73.3±7.04	85.9±3.32	80.0±1.18	88.4±5.83	90.0±3.88
%RSD	0.67	9.61	3.87	1.47	6.59	4.31
เครื่องดื่มจากพืช	82.9±1.04	101.4±7.00	89.3±2.05	-	-	-
%RSD	1.26	6.91	2.30			

การทดสอบความจำเพาะของวิธี โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของกรดเบนโซอิก แอสปาเทม แคฟเฟอีน อะดีนีนซัลเฟต กรดซอร์บิก ซัคคาริน อะซีซัลเฟม เค และพาราไฮดรอกซีเบนโซเอทเอสเทอร์ของเมทิล เอทิล โพรพิล และบิวทิล (พาราเบน) เข้าเครื่อง HPLC พบว่า ซัคคาริน อะซีซัลเฟม เค กรดซอร์บิก และ พาราเบน สามารถแยกพีคออกมาได้ในสถานะของเครื่องมือที่ทดสอบดังกล่าวข้างต้น

วิจารณ์

ทำการศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคฟเฟอีน ในเครื่องดื่มโดยมี adenine

sulfate เป็น internal standard ตามวิธีของ Argoudelis ด้วยเครื่อง HPLC ในระบบ isocratic เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย เหมาะสมกับเครื่องมือที่มีอยู่ จากการทดสอบวิธีวิเคราะห์พบว่า เฟสเคลื่อนที่ของวิธีนี้ยังไม่เหมาะสมกับคอลัมน์ที่ใช้ หลังจากที่มีการปรับเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ใหม่ พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมกับคอลัมน์ เป็น 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ / methanol = 97.5 / 2.5 สามารถแยกสารทั้ง 4 ออกจากกันได้ดีและไม่เกิดพีคที่ไม่สมมาตร (irregular peak shape)

จากค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ ของกรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคฟเฟอีน มีค่าใกล้เคียง 1.0000 แสดงว่าความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานในช่วงที่วิเคราะห์มี linearity ดี

ผลการทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ระหว่างวิธี ไดโวลซิส และฉีดเข้าเครื่องโดยตรง ในตัวอย่างน้ำอัดลม และน้ำผลไม้ โดยเติมสารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิก ในช่วง 10-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือความเข้มข้น ในตัวอย่างอยู่ระหว่าง 100-300 ไมโครกรัมต่อกรัม เติม สารละลายมาตรฐาน แอสปาเทม แคลฟเฟอีน 25-75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือความเข้มข้นในตัวอย่างอยู่ ระหว่าง 250-750 ไมโครกรัมต่อกรัม ให้ค่าประสิทธิภาพ วิธีสูง และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำ แสดงว่าวิธีทั้งสองมีความถูกต้องสูง

ผลการทดสอบความแม่นยำโดยวิธี repeatability และ robustness ในตัวอย่างน้ำอัดลมพบว่า วิธีไดโวลซิสมีความแม่นยำสูง ให้ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานและ สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน อยู่ในช่วงที่ยอมรับดีกว่าวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรง

ผลการทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ของ กรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคลฟเฟอีนโดยวิธี ไดโวลซิส มีค่า 20 ไมโครกรัมต่อกรัม ในตัวอย่างน้ำอัดลม น้ำผลไม้ และเครื่องดื่มจากพืช โดยที่ในตัวอย่างน้ำผลไม้และเครื่องดื่มจากพืช ค่าประสิทธิภาพวิธียังต่ำ เล็กน้อยและสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนมีค่าสูง แสดงว่ามีความเบี่ยงเบนมาก เนื่องจากน้ำผลไม้และ เครื่องดื่มจากพืชมีลักษณะเป็นของเหลวข้น ประกอบ ด้วยสารธรรมชาติ มีสารรบกวนมากมายหลายชนิด ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ซึมผ่านเซลล์โลสเมมเบรนได้ ยากและไม่แน่นอน มีความแม่นยำน้อย โดยเฉพาะแอส ปาเทมมีความเบี่ยงเบนสูงเพราะเป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย การซึมผ่านเซลล์โลสเมมเบรนจึงไม่สม่ำเสมอ วิธีฉีด เข้าเครื่องโดยตรง มีค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ใน ตัวอย่างน้ำผลไม้สูงกว่าวิธีไดโวลซิสคือ 40,30 และ 15 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ และประสิทธิภาพวิธีสูงกว่า เล็กน้อยและมีความเบี่ยงเบนสูงเช่นเดียวกัน จากการหา ค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้ จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างใน ปริมาณมากเพื่อให้ความเข้มข้นสูงขึ้น จึงมีสารรบกวนสูง การเกิด peak tail on initial ทำให้ค่าที่ได้ไม่ถูกต้อง ส่วนวิธีไดโวลซิสมีการเกิดพีคลักษณะดังกล่าวเช่นกัน

สำหรับน้ำอัดลมให้ประสิทธิภาพวิธีในช่วงที่ยอมรับ และ ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนไม่สูง เนื่องจาก น้ำอัดลมเป็นเครื่องดื่มที่มีสารธรรมชาติน้อยและลักษณะ เป็นของเหลวใส ไม่มีปัญหาในการซึมผ่านเมมเบรน และไม่เกิด peak tail on initial

ความจำเพาะของวิธีทดสอบดังกล่าวยังไม่ดีนัก เนื่องจากสามารถแยกสารบางตัว เช่น กรดซอร์บิก ซัคคาริน อะซีซัลเฟม เค และพาราเบน ออกมาใน สภาวะที่ทดสอบ เนื่องจากมีสารมากมายหลายชนิดที่ สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ทดสอบคือ 214 นาโนเมตร ดังนั้นก่อนที่จะวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี HPLC ควรทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่ต้องการ หาก่อน เพื่อความถูกต้องในการรายงานผล เนื่องจากเครื่อง HPLC ที่มีอยู่ไม่สามารถตรวจเอกลักษณ์ของสารได้

สรุป

จากผลการทดสอบวิธีวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี พบว่า การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีไดโวลซิส ให้ผลดีกว่าวิธีฉีด เข้าเครื่องโดยตรง สามารถนำมาใช้ในการหาปริมาณ กรดเบนโซอิก แอสปาเทม และแคลฟเฟอีนในเครื่องดื่มที่มี ปริมาณสารน้อยๆ ได้ ระยะเวลาในการใช้งานของ คอลัมน์จะยาวนานกว่าวิธีฉีดเข้าเครื่องโดยตรงซึ่งจะมี สารรบกวนสูง ทำให้คอลัมน์สกปรก อายุการใช้งานสั้น ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเนื่องจากคอลัมน์มีราคาแพง สำหรับค่าใช้จ่ายในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีไดโวลซิส นั้นมีราคาถูกสามารถเตรียมตัวอย่างได้ในปริมาณมาก ในแต่ละครั้ง ไม่ต้องสัมผัสสารเคมีที่มีอันตราย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ Mr.Toshiyuki Kawaguchi JICA Expert under Project for Strengthening of Food Sanitation Activities. ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งในด้าน วิธีวิเคราะห์ การแก้ปัญหา ตลอดจนให้คอลัมน์เพื่อใช้ ในงานเครื่องดื่ม

เอกสารอ้างอิง

1. AOAC. 1990. Official Method of Analysis. 15 th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington. See 910.02, 960.38
2. AOAC. 1984. Official Method of Analysis. 14 th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington. : 275.
3. Ishiwata,A., and Suzuki, Y.,1975. Determination of L-aspartyl-L-phenylalanine methyl esters in foods. J.Fd hyg .Soc.Japan. 16(6) : 420-421.
4. Poctova,M., and Kakac,B. 1982. Fluorimetry in pharmaceutical analysis. III. Fluorimetric determination of L-aspartyl-L-phenylalanine methyl esters hydrochloride (aspartame). Cesk. Farm., 31(3-4) :113-115.
5. Cross,Reg., Cumico, Robert. (Varian ,Italy).1989. Determination of aspartame in beverages and beverage powders by reverse-phase HPLC. Lab 2000 (Duemila). 3(1-2) :15-17.
6. Argoudelis,C.J. 1984. Isocratic liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspartame and additives in soft drinks. J. Chromatogr. 303 : 256-262.
7. Moriyasu,T. 1991. Determination of Acesulfame K , Saccharin and Aspartame in various foods. Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health. 37(2), : 97-102.
8. Sinthusarn, C. 1995. Validation of determination method of Nonoxynol-9 by HPLC. Standard Operating Procedure No. 06 02 05 521. Department of Medical Sciences. Division of Toxicology. Section of Cosmetic Analysis. p. 1-15.