

การหาปริมาณสารกันบูดในก๋วยเตี๋ยว ด้วยเทคนิค Capillary Zone Electrophoresis Determination of Preservatives in Noodles by Capillary Zone Electrophoresis

นฤมล วชิรปัทมา และ ชลชญา มะลิแย้ม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รังสิต ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

ก๋วยเตี๋ยวและอาหารประเภทเส้น มักทำมาจากแป้งข้าวเจ้าจึงน่าจะเสี่ยงจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ผู้ผลิตจึงนิยมเติม สารกันบูดลงไป ซึ่งจะมีผลเสียต่อการทำงานของตับและไตของผู้บริโภคหากได้รับสารกันบูดปริมาณมาก งานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาเทคนิค capillary zone electrophoresis เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารกันบูด โดยศึกษาความยาวคลื่นของการดูดแสงที่เหมาะสมของสารกันบูด 6 ชนิด (benzoic acid, sorbic acid, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben และ butyl paraben) เพื่อใช้เป็น detection wavelength รวมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารเช่น องค์ประกอบและ pH ของ background electrolyte รวมทั้ง applied voltage เพื่อให้ได้ความไวสูงสุดและใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย จากนั้นประยุกต์ใช้เทคนิค capillary zone electrophoresis ที่พัฒนาได้ในการหาปริมาณสารกันบูดในก๋วยเตี๋ยว

คำสำคัญ: ก๋วยเตี๋ยว สารกันบูด capillary electrophoresis

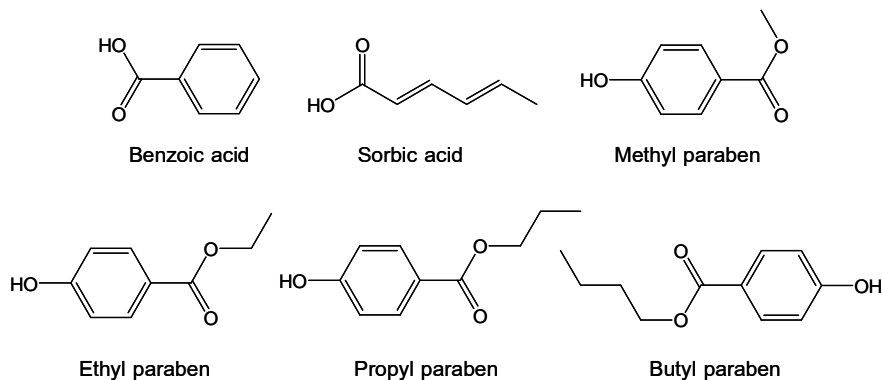
Abstract

Several noodles normally made from rice flour can spoil easily from bacteria and fungi. Therefore, preservatives are required and often added in noodle products. Large quantities of preservatives can affect to liver and kidney function. Thus the objectives of this research were to develop capillary zone electrophoresis technique for the determination of six preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben and butyl paraben). The optimum absorption wavelength of each preservative was investigated and was used as the detection wavelength. The composition and pH of background electrolyte and applied voltage were optimized to obtain the highest sensitivity and short analysis time. The developed capillary zone electrophoresis was then applied to determine preservative in noodles.

Keywords: noodle, preservative, capillary electrophoresis

1. บทนำ

นอกจากข้าวที่คนไทยนิยมรับประทานเป็นอาหารหลักแล้ว ยังมีกล้วยเตี้ยหรืออาหารประเภทเส้นต่างๆที่ทำมาจากแป้งข้าวเจ้า ซึ่งเป็นอาหารที่คนส่วนใหญ่นิยมมาก แต่พบว่าในปัจจุบันผู้ผลิตเส้นกล้วยเตี้ยบางรายจะใส่สารกันบูดลงไปด้วยเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ bacteria และเชื้อรา มีผลให้ยืดอายุการจำหน่ายได้หลายวัน โดยเส้นกล้วยเตี้ยไม่เน่าเสีย สารกันบูดมีหลายชนิดที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น benzoic acid, sorbic acid และสารในกลุ่ม paraben ซึ่งประกอบด้วย methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben และ buthyl paraben เป็นต้น (โครงสร้างสารกันบูดดังรูปที่ 1) สำหรับอาหาร นิยมใช้ benzoic acid เป็นสารกันบูดมากที่สุดหรือเป็นของผสมของ benzoic acid และ sorbic acid สำหรับ parabens ก็มีใช้ในอาหารแต่ไม่นิยมเท่ากับ benzoic acid มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับ benzoic acid ในอาหาร เช่น ในนม pasteurized และ UHT [1] ในอาหาร [2, 3] ใน wine ที่ทำจากข้าวไทย [4] ใน food dressing [5]



รูปที่ 1 โครงสร้างสารกันบูด

การหาปริมาณสารกันบูดในอาหาร โดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ methanol-buffer

ในเครื่องต้ม [6, 7] ในอาหารกระป๋อง [8] และในแฮม [9] ซึ่งพบว่าหากร่างกายได้รับสารกันบูดในปริมาณน้อย ร่างกายจะสามารถกำจัดออกได้ทางปัสสาวะ แต่ถ้าได้รับต่อเนื่องในปริมาณมากจะทำให้ตับและไตทำหน้าที่หนักขึ้น และถ้ากำจัดออกจากร่างกายไม่หมดก็จะสะสมในร่างกายส่งผลเสียต่อประสิทธิภาพการทำงานของตับและไต อาจทำให้เกิดการเจ็บป่วยด้วยอาการตับและไตพิการ ดังนั้นคณะกรรมการกำหนดมาตรฐานอาหารสากล (CODEX) ได้กำหนดปริมาณการใช้สารกันบูดไว้เช่น benzoic acid ในเส้นกล้วยเตี้ยให้ผสมได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นต้น ข้อควรระวังสำหรับอาหารที่ใช้ benzoic acid คือ benzoic acid สามารถทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid (vitamin C) แล้วให้ benzene ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่แพ้ อาจเกิดอาการเจ็บในช่องท้อง หรือเกิดอาการคลื่นเหียนอาเจียนหลังการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน benzoic acid

เป็น mobile phase เช่นการหาปริมาณ benzoic acid ในตัวอย่างนมในประเทศจีน [1] ใน wine ที่ทำจากข้าวไทย [4] ในเครื่องต้มและผลไม้กระป๋อง [8] และ

ในแอม [9] เป็นต้นซึ่งมี detection limit อยู่ในช่วง 0.2 mg/mL ถึง 25 mg/mL นอกจากนี้ยังมีเทคนิค micellar electrokinetic capillary electrophoresis (MEKC) ที่ใช้หาปริมาณ benzoic acid และ ester ของมันในยาน้ำที่ความยาวคลื่น 205 nm โดยใช้ background electrolyte ประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate ใน phosphate buffer ที่ pH 7.8 และฉีดตัวอย่างด้วยความดัน 40 mbar นาน 20 วินาที ใช้ applied potential 30 kV พบว่า detection limit อยู่ในช่วง 0.05 mg/mL ถึง 0.2 mg/mL [10] หากเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการวิเคราะห์สารกันบูดในตัวอย่างจะเห็นว่าเทคนิค capillary electrophoresis จะประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายมากกว่าเทคนิค HPLC รวมทั้งไม่ใช้ organic solvent ที่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาปริมาณสารกันบูดในกล้วยเดี่ยวประเภทต่างๆด้วยเทคนิค capillary zone electrophoresis (CZE) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก ประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ สาเหตุนี้จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ของการวิจัยที่ต้องการพัฒนาเทคนิค CZE ให้มี sensitivity สูงเพื่อใช้วิเคราะห์สารกันบูดในกล้วยเดี่ยว

2. การทดลอง

2.1 เครื่องมือ

Fused silica capillary column (Polymicro technology (Phoenix, AZ, USA) ที่ใช้ยาว 50 cm (75 μ m I.D.) โดยมีความยาวจากจุดที่ฉีดสารถึง detector 41.5 cm เครื่อง capillary electrophoresis ที่ใช้แยก analytes ออกจากกันคือ HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Bracknell, UK) และใช้ applied voltage +25 kV ที่อุณหภูมิ 25°C โดยฉีดที่ความดัน 50 mbar เป็นเวลานาน 4 วินาที Background

electrolyte ประกอบด้วย 10 mM boric acid และ 10 mM sodium tetraborate ที่ pH 9.15 Electrophoretic zone ทำการตรวจวัดที่ 227 nm, 295 nm และ 254 nm สำหรับ benzoic acid, esters ของ benzoic acid และ sorbic acid ตามลำดับ

2.2 สารเคมี

น้ำที่ใช้เป็นน้ำที่ผ่านการกลั่นและ deionised (DI water), boric acid (Ajax Finechem, Auckland, New Zealand), sodium tetraborate (carlo Erba, Lombardia, Italy), benzoic acid (carlo Erba), sorbic acid (BDH, London, England), methyl paraben (Fluka, Steinheim, Germany), ethyl paraben (Fluka), propyl paraben (Fluka) และ butyl paraben (Fluka) เป็น analytical grade

2.3 วิธีการทดลอง

การเตรียมสารตัวอย่าง ตัวอย่างกล้วยเดี่ยวได้มาจากโรงอาหาร 3 แห่งในมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิตคือโรงอาหารกลาง โรงอาหารอินเตอร์โซน และโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ โดยตัดเส้นกล้วยเดี่ยว (เส้นเล็ก เส้นใหญ่ เส้นหมีและวุ้นเส้น) ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2 g บรรจุใน beaker ขนาด 50 mL ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เติมน้ำ DI ปริมาตร 20 mL ในแต่ละตัวอย่างและนำไป sonicate นาน 30 นาที จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 25 mL ใน volumetric flask และนำสารละลายไป centrifuge นาน 10 นาทีที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที กรองสารละลายส่วนใสผ่านตัวกรอง nylon ขนาด 0.45 μ m สำหรับกล้วยเดี่ยวเส้นใหญ่ต้องเจือจางด้วยน้ำ DI 10 เท่าก่อนฉีดเข้าเครื่อง capillary electrophoresis

3. ผลและการวิจารณ์ผล

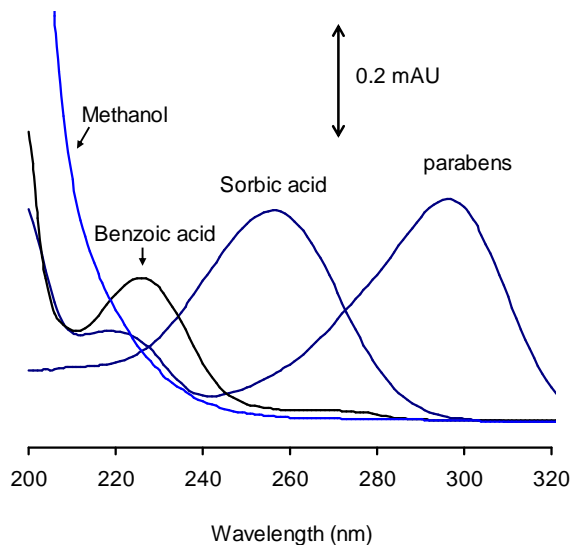
3.1 ศึกษาการดูดกลืนแสงของสารกันบูด

จากการศึกษาการดูดกลืนแสงของสารกันบูดที่ละลายใน background electrolyte พบว่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ benzoic acid, sorbic acid และ parabens อยู่ที่ 227 nm, 254 nm และ 295 nm ตามลำดับ ดังรูปที่ 2 ซึ่งความยาวคลื่นเหล่านี้เหมาะที่จะใช้เป็น detection wavelength ของสารกันบูดแต่ละประเภท

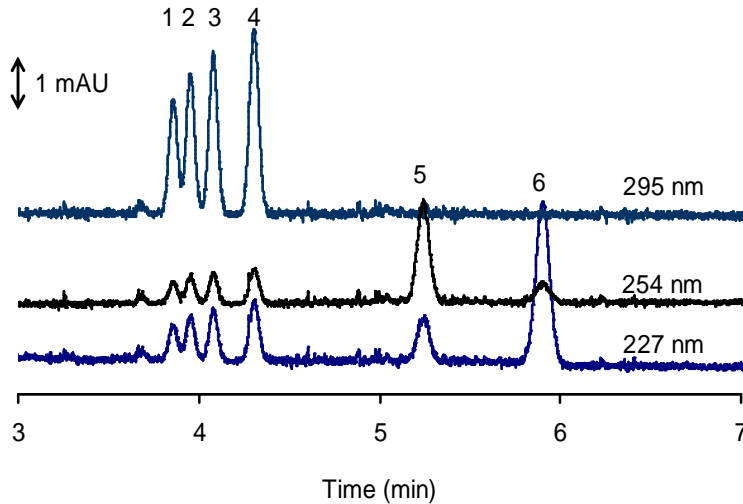
3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ capillary electrophoresis

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ buffer ที่ใช้เตรียม background electrolyte และค่า pH ที่เหมาะสม พบว่า borate buffer ที่ประกอบด้วย 10 mM boric acid และ 10 mM sodium tetraborate ที่ pH 9.15 เหมาะที่สุดเนื่องจากให้ baseline เรียบรวมทั้ง

ให้ sensitivity สูงสุดโดยพิจารณาจากค่าความสูงของ peak ที่สูงสุด สำหรับสภาวะ applied potential, injection time และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกสารกันบูดทั้ง 6 ตัวคือ benzoic acid, sorbic acid, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben และ butyl paraben ออกจากกันคือ +25 kV, ที่ความดัน 50 mbar เป็นเวลา 6 วินาที และ 25°C ตามลำดับเพราะให้ค่า retention time น้อยแต่ความสูงของ peak (peak height) มีค่าสูง รูปที่ 3 แสดง electropherogram ของ standard benzoic acid, sorbic acid, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben และ butyl paraben ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์สารกันบูดทั้ง 6 ชนิดภายใน 6 นาที โดย detection wavelength ที่เหมาะสมสำหรับ benzoic acid, sorbic acid และ parabens คือ 227 nm, 254 nm และ 295 nm ตามลำดับ



รูปที่ 2 Spectrum ของ benzoic acid, sorbic acid และ parabens ที่ละลายใน background electrolyte (10 mM boric acid และ 10 mM sodium tetraborate ที่ pH 9.15)



รูปที่ 3 Electropherogram ที่ความยาวคลื่น 227 nm, 254 nm และ 295 nm ของ standard peak: 1. butyl paraben (2 mg/mL), 2. propyl paraben (2 mg/mL), 3. ethyl paraben (2 mg/mL), 4. methyl paraben (2 mg/mL), 5. sorbic acid (1 mg/mL) และ 6. benzoic acid (4 mg/mL)

3.3 Analytical performance characteristics

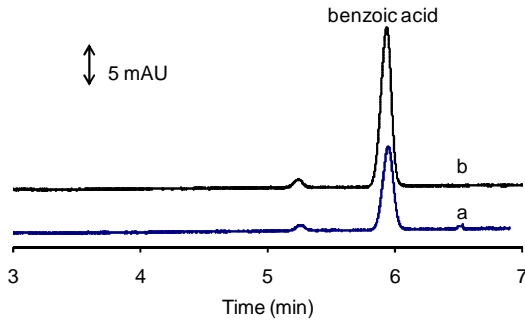
Detection limits (สัญญาณที่ signal-to-noise ratio เท่ากับ 3) ที่เกิดจากการฉีดสารละลายมาตรฐาน เป็นเวลานาน 6 วินาทีที่ความดัน 50 mbar ของ benzoic acid, sorbic acid, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben และ butyl paraben มีค่า 0.20 mg/mL , 0.09 mg/mL , 0.20 mg/mL , 0.24 mg/mL , 0.27 mg/mL และ 0.33 mg/mL ตามลำดับ จากการฉีด standard ทุกตัวซ้ำ 5 ครั้ง พบว่า percentage of relative standard deviation (% RSD) ของ retention time และ peak area ของสาร benzoic acid, sorbic acid, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben และ butyl paraben อยู่ในช่วง 0.14-0.33 และในช่วง 1.14-2.08 % ตามลำดับ external standard calibration curve ให้เส้นตรงอยู่ในช่วง 0.5 mg/mL ถึง 100 mg/mL (r^2 อยู่ในช่วง 0.9994 -0.9998) สำหรับ

benzoic acid, sorbic acid, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben และ butyl paraben

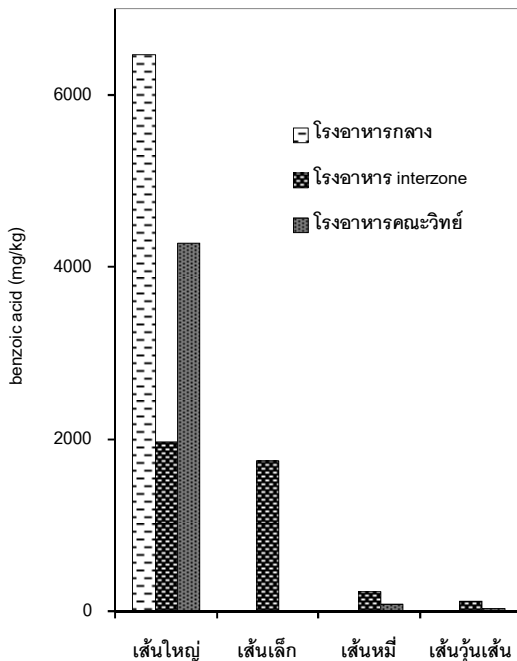
3.4 การหาปริมาณ benzoic acid ในถ้วยเตี๋ย

จากการประยุกต์ใช้ background electrolyte และ condition ที่เหมาะสมในการหาปริมาณสารกันบูดในถ้วยเตี๋ยจากโรงอาหารกลาง โรงอาหารอินเตอร์โซน และโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ พบ benzoic acid เพียงสารเดียวที่มีในถ้วยเตี๋ยเส้นใหญ่ ถ้วยเตี๋ยเส้นเล็ก เส้นหมี่และวุ้นเส้น รูปที่ 4 แสดง Electropherogram ของถ้วยเตี๋ยเส้นใหญ่ ซึ่ง peak ของ benzoic acid ไม่มี peak อื่นรบกวนและมีการ spiked ด้วย standard benzoic acid เพื่อ confirm identity ของ peak รูปที่ 5 แสดงปริมาณ benzoic acid ที่ตรวจพบในถ้วยเตี๋ยเส้นใหญ่ ถ้วยเตี๋ยเส้นเล็ก เส้นหมี่และวุ้นเส้นจากโรงอาหาร 3 แห่งในมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ซึ่งจะเห็นว่าตรวจพบ

benzoic acid ในก้วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ปริมาณสูงมาก สำหรับก้วยเตี๋ยวเส้นเล็กพบ benzoic acid ปนเปื้อนเพียงแห่งเดียว และพบ benzoic acid ในเส้นหมี่และวุ้นเส้นปริมาณน้อยมากและบางตัวอย่างก็ตรวจไม่พบ



รูปที่ 4 Electropherogram ของก้วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ (a) และก้วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ที่ spiked ด้วย benzoic acid 4 mg/mL



รูปที่ 5 ปริมาณ benzoic acid ที่ตรวจพบในก้วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ ก้วยเตี๋ยวเส้นเล็ก เส้นหมี่และวุ้นเส้นจากโรงอาหาร 3 แห่งในมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสารกันบูด 6 ชนิดประกอบด้วย benzoic acid, sorbic acid, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben และ butyl paraben โดยใช้เทคนิค capillary electrophoresis ประสบความสำเร็จโดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้นเพียง 6 นาทีและสามารถนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้หาปริมาณสารกันบูดในก้วยเตี๋ยวประเภทต่างๆ พบว่าสารกันบูดที่ใส่ในก้วยเตี๋ยวคือ benzoic acid และพบปริมาณสูงมากในก้วยเตี๋ยวเส้นใหญ่

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณแหล่งทุนจากงบประมาณของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปี 2551

6 เอกสารอ้างอิง

- [1] Qi, P., Hong, H., Liang, X. and Liu, D., Assessment of Benzoic Acid Levels in Milk in China. Food Control, Vol. 20, pp. 414-418, 2009.
- [2] Han, F., He, U-Z, Li, L., Fu, G-N., Xie, H-Y and Gan, W-E, Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Food Products Using Electrokinetic Flow Analysis–Ion Pair Solid Phase Extraction–Capillary Zone Electrophoresis, Analytica Chimica Acta, Vol. 618(1), pp. 79-85, 2008.
- [3] Mota, F.J.M., Isabel Ferreira, I.M.P.L.V.O., Cunha, S.C., Beatriz, M., and Oliveira, P.P., Optimisation of Extraction Procedures for

- Analysis of Benzoic and Sorbic Acids in Foodstuffs, *Food Chemistry*, Vol. 82(3), pp. 469-473, 2003.
- [4] Techakriengkrai, I. and Surakarnkul, R., Analysis of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Thai Rice Wines and Distillates by Solid-Phase Sorbent Extraction and High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 20(3-4), pp. 220-225, 2007.
- [5] Dong, C., Mei, Y. and Chen, L. Simultaneous Determination of Sorbic and Benzoic Acids in Food Dressing by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1117(1,2), pp. 109-114, 2006.
- [6] Dong, C. and Wang, W., Headspace Solid-Phase Microextraction Applied to the Simultaneous Determination of Sorbic and Benzoic Acids in Beverages, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 562(1,9), pp. 23-29, 2006.
- [7] García, I., Ortiz, M.C., Sarabia, L., Vilches, C. and Gredilla, E., Advances in Methodology for the Validation of Methods According to the International Organization for Standardization: Application to the Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Soft Drinks by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, Vol. 992(1-2), pp. 11-27, 2003.
- [8] Saad, B., Bari, M.F., Saleh, M.I., Ahmad, K. and Tarib, M.K.M., Simultaneous Determination of Preservatives (Benzoic Acid, Sorbic Acid, Methylparaben and Propylparaben) in Foodstuffs using High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1073(1-2), pp. 393-397, 2005.
- [9] Ferreira, I.M.P.L.V.O., Mendes, E., Brito, P. and Ferreira, M.A., Simultaneous Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Quince Jam by HPLC, *Food Research International*, Vol. 33(2), pp. 113-117, 2000.
- [10] Heo, Y.J. and Lee, K.-J., Application of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography for the Determination of Benzoic Acid and its Esters in Liquid Formular Medicines as Preservatives, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 17, pp. 1371-1379, 1998.