บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. UV-Vis Spectrophotometer: รุ่น Lambda 20 (ประกอบด้วยโปรแกรม UV Winlab software version 2.85) ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. High performance liquid chromatography หรือ HPLC: รุ่น Waters 600E System ผลิตโดยบริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา และ รุ่น 1100 Series ผลิตโดยบริษัท Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. Analytical balance: รุ่น BS 224S ผลิตโดยบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมันนี

4. Ultrasonic bath: รุ่น S 70 H Elmasonic ผลิตโดยบริษัท Elma ประเทศเยอรมันนี

5. pH meter: รุ่น F-21 ผลิตโดยบริษัท Horiba ประเทศญี่ปุ่น

6. Quartz cell: ขนาด 1 cm ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

7. Micro pipet: ขนาด 100-1000 μL ผลิตโดยบริษัท BOECO ประเทศเยอรมันนี

8. Nylon membrane disc filter : เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 47 mm รูพรุนขนาด 0.45 μm ผลิตโดยบริษัท Gate ประเทศฮ่องกง

สารเคมี

1. Acesulfame-K ($C_4H_4KNO_4S$), 99.0%, HPLC grade ผลิตโดยบริษัท Fluka

2. Caffeine ($C_8H_{10}N_4O_2$), 99.0 %, A.R. grade ผลิตโดยบริษัท Merck

3. Citric acid ($C_6H_8O_7.H_2O$), ≥99.7%, A.R. grade ผลิตโดยบริษัท BDH

4. D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$), 99.0%, A.R. grade ผลิตโดยบริษัท Ajax Finechem

5. D(+)-Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), 99.0%, A.R. grade ผลิตโดยบริษัท Fisher Scientific

6. Methanol (CH_3OH), 99.8%, A.R. grade ผลิตโดยบริษัท Fisher Scientific

7. Phosphoric acid (H_3PO_4), 85%, A.R. grade ผลิตโดยบริษัท Merck

8. Potassium benzoate ($C_7H_5KO_2$), 99.0%, A.R. grade ผลิตโดยบริษัท Fluka

9. Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4), 99.94%, A.R. grade ผลิตโดยบริษัท Fisher Scientific

10. Sorbic acid potassium salt ($C_6H_7KO_2$), 99.0%, A.R. grade ผลิตโดยบริษัท Fluka

การเตรียมสารละลาย

สารละลายที่เตรียมตลอดการทดลองนี้ เตรียมด้วยการใช้น้ำปราศจากไอออน หรือ Deionized water (เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนรุ่น Elgastat maxima ผลิตโดยบริษัท Elga ประเทศอังกฤษ) และคิดเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์สำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐานต่างๆ ด้วย

1. **สารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค (ASK) เข้มข้น 1000 mg/L**

ชั่งเอซีซัลเฟม-เค 0.0505 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 mL ละลายด้วยน้ำจำนวน 20 mL คนจนละลาย เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำ

2. **สารละลายมาตรฐานกรดเบนโซอิก (BEN) เข้มข้น 1000 mg/L**

ชั่งโพแทสเซียมเบนโซเอต 0.0505 g ลงในบีเกอร์ขนาด 100 mL ละลายด้วยน้ำจำนวน 20 mL คนจนละลาย เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำ

3. **สารละลายมาตรฐานกรดซอร์บิก (SOR) เข้มข้น 1000 mg/L**

ชั่งโพแทสเซียมซอร์เบต 0.0505 g ลงในบีเกอร์ขนาด 100 mL ละลายด้วยน้ำจำนวน 20 mL คนจนละลาย เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำ

4. **สารละลายมาตรฐานคาเฟอีน (CAF) เข้มข้น 1000 mg/L**

ชั่งคาเฟอีน 0.0505 g ลงในบีเกอร์ขนาด 100 mL ละลายด้วยน้ำจำนวน 20 mL คนจนละลาย เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำ

5. **สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 mol/L (pH=2.3)**

ชั่ง KH_2PO_4 4.1779 g (คิดเป็น 0.0307 mol/L) ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 mL ละลายด้วยน้ำปริมาตรประมาณ 800 mL คนจนละลาย ปิเปตสารละลายกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 2 mol/L ปริมาตร 38.6 mL (คิดเป็น 0.0193 mol/L) คนให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายที่ได้ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 mL แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำ

6. **สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่ม**

สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะเป็นตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำอัดลมหรือเครื่องดื่มอัดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และเครื่องดื่มบำรุงกำลัง (ดังภาคผนวก ก) เตรียมโดยนำไปกรองภายใต้ระบบสุญญากาศด้วยกระดาษกรองชนิดไนลอน ขนาดรูพรุน 0.45 μm

จากนั้นทำการไล่ฟองอากาศโดยใช้เครื่องอัลตร้าโซนิคเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเจือจางตัวอย่างตามความเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 mol/L (pH=2.3) การเตรียมตัวอย่างประยุกต์จากวิธีของ AOAC [15] และ Demiralay [22]

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน ด้วยการใช้แอบซอร์พชันสเปกตรัม

1. การศึกษาอิทธิพลของ pH ของสารละลายที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เนื่องจากสารละลายกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก มีค่าการแตกตัว (pK_a) เท่ากับ 4.1 และ 4.7 ตามลำดับ นอกจากนี้สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ มีค่า pH อยู่ระหว่าง 2.3-4.7 ดังนั้นเพื่อควบคุมค่า pH ของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง จึงทำการศึกษาอิทธิพลของ pH ของสารละลายที่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงและตำแหน่งความยาวคลื่นสูงสุดของแอบซอร์พชันสเปกตรัมหรือสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับศูนย์ (Absorption spectrum หรือ Zero order of derivative spectrum หรือ D_0 spectrum) ของสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน เพื่อให้ได้ค่า pH ของสารละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดดังกล่าว ทำการศึกษาโดยนำสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน เข้มข้น 15, 20, 10 และ 20 mg/L ตามลำดับ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0 (น้ำปราศจากไอออน), 1.0×10^{-5}, 1.0×10^{-4}, 1.0×10^{-3}, 1.0×10^{-2} และ 1.0×10^{-1} mol/L และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 5.0×10^{-3} mol/L (pH=2.3) ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (A) และค่าความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ด้วยเครื่องอัลตร้าไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 190-330 nm เทียบกับสารละลายแบลงค์ (น้ำปราศจากไอออน) ด้วยสภาวะของเครื่องที่ใช้ในการทดลองดังตาราง 2

ตาราง 2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองของเครื่องอัลตร้าไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

พารามิเตอร์	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง
Start wavelength	330 nm
End wavelength	190 nm
Scan speed	480 nm/min
Smooth	2 nm

2. การศึกษาอิทธพลของสารรบกวน

ในตัวอย่างเครื่องดื่มที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีองค์ประกอบอื่นๆ ที่คาดว่าจะรบกวนต่อค่าการดูดกลืนแสงหรือแอบซอร์พชันสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน อาทิเช่น กรดซิตริก กลูโคส ซูโครส เป็นต้น เพราะมีสูตรโมเลกุลที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงอัลตร้าไวโอเลตได้เช่นกัน ดังนั้นจึงทำการศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนดังกล่าว ทำโดยนำสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 150, 500 และ 3,500 mg/L ของกรดซิตริก กลูโคส และซูโครส ตามลำดับ ในสารละลายที่เหมาะสมจากการทดลองในหัวข้อ 1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 190-330 nm ได้แอบซอร์พชันสเปกตรัมเทียบกับแอบซอร์พชันสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน เข้มข้น 15, 20, 10 และ 20 mg/L ตามลำดับ

3. กราฟมาตรฐาน ขีดจำกัดต่ำสุด และปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด ด้วยการใช้แอบซอร์พชันสเปกตรัม [69, 70, 71]

ทำการศึกษาโดยนำสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค (0.25, 0.5, 2.5, 5, 10 และ 20 mg/L) กรดเบนโซอิก (0.5, 1, 5, 10, 20 และ 40 mg/L) กรดซอร์บิก (0.5, 1, 2, 5, 10 และ 15 mg/L) และคาเฟอีน (0.5, 1, 5, 10, 20 และ 40 mg/L) ในสารละลายที่เหมาะสม (จากการทดลองในหัวข้อ 1) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 190-330 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งความยาวคลื่นสูงสุดของสารแต่ละตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่าขีดจำกัดต่ำสุด (Limit of detection หรือ LOD) และปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of quantitation หรือ LOQ)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีนในตัวอย่างสังเคราะห์ด้วยการใช้แอบซอร์พชันสเปกตรัม

การวิเคราะห์หาปริมาณด้วยการใช้แอบซอร์พชันสเปกตรัมของเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน ทำโดยนำตัวอย่างสังเคราะห์ที่เตรียมจากสารละลายมาตรฐานผสมแบบคู่ แบบสาม และแบบสี่ของเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง 3 ในสารละลายที่เหมาะสม (จากการทดลองในหัวข้อ 1) ตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 190-330 nm หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ดังหัวข้อ 3

ตาราง 3 ตัวอย่างสังเคราะห์ของสารละลายมาตรฐานผสมเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่างที่	สารละลายมาตรฐานผสม (mg/L)			
	เอซีซัลเฟม-เค	กรดเบนโซอิก	กรดซอร์บิก	คาเฟอีน
1	2.5	5.0	-	-
2	5.0	10.0	-	-
3	10.0	20.0	-	-
4	2.5	-	2.0	-
5	5.0	-	5.0	-
6	10.0	-	10.0	-
7	2.5	-	-	5.0
8	5.0	-	-	10.0
9	10.0	-	-	20.0
10	-	5.0	2.0	-
11	-	10.0	5.0	-
12	-	20.0	10.0	-
13	-	5.0	-	5.0
14	-	10.0	-	10.0
15	-	20.0	-	20.0
16	-	-	2.0	5.0
17	-	-	5.0	10.0
18	-	-	10.0	20.0
19	2.5	5.0	2.0	-
20	5.0	8.0	5.0	-
21	8.0	10.0	8.0	-
22	2.5	5.0	-	5.0
23	5.0	8.0	-	8.0
24	8.0	10.0	-	10.0
25	2.5	-	2.0	5.0
26	5.0	-	5.0	8.0
27	8.0	-	8.0	10.0
28	-	5.0	2.0	5.0
29	-	8.0	5.0	8.0
30	-	10.0	8.0	10.0
31	2.5	5.0	2.0	5.0
32	5.0	8.0	5.0	8.0
33	8.0	10.0	8.0	10.0

การศึกษาหาสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน

การศึกษาหาสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับหนึ่ง (First order of derivative spectrum หรือ D_1 spectrum) อันดับสอง (Second order of derivative spectrum หรือ D_2 spectrum) อันดับสาม (Third order of derivative spectrum หรือ D_3 spectrum) และอันดับสี่ (Forth order of derivative spectrum หรือ D_4 spectrum) ของสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน ตามลำดับ ทำโดยนำข้อมูลแอบซอร์พชันสเปกตรัม ในช่วงความยาวคลื่น 190-330 nm ของสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน เข้มข้น 15, 20, 10 และ 20 mg/L ตามลำดับ ในสารละลายที่เหมาะสมจากการทดลองในหัวข้อ 1 มาทำอนุพันธ์ (Differentiation) อันดับหนึ่ง สอง สาม และสี่ โดยใช้โปรแกรม UV Winlab version 2.85 ของเครื่องอัลตร้าไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (รุ่น Lambda 20 บริษัท Perkin Elmer) เมื่อใช้สภาวะการทดลองดังตาราง 4

ตาราง 4 สภาวะที่ใช้ในการศึกษาหาสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับต่าง ๆ
โดยใช้โปรแกรม UV Winlab version 2.85 (รุ่น Lambda 20 บริษัท Perkin Elmer)

อันดับของอนุพันธ์	ช่วงความยาวคลื่น (nm)	Number of point*			
		เอซีซัลเฟม-เค	กรดเบนโซอิก	กรดซอร์บิก	คาเฟอีน
D_0	190-330	-	-	-	-
D_1	190-330	21	21	21	21
D_2	190-330	21	21	21	21
D_3	190-330	25	25	25	25
D_4	190-330	25	25	25	25

* คือ ค่าสำหรับปรับสัญญาณที่วัดได้ต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio)

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน ด้วยวิธีซีโร-ครอสซิง สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์

1. การศึกษาหาจุดซีโร-ครอสซิงของสารละลายมาตรฐานแบบคู่

การศึกษาหาจุดซีโร-ครอสซิงของสารละลายมาตรฐานแบบคู่ ด้วยวิธีซีโร-ครอสซิง สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์ ทำโดยนำสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับ 1-4 (D_1-D_4 spectrum) ที่ได้จากการศึกษาหาสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับต่างๆ ของสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน เข้มข้น 10, 20, 10 และ 20 mg/L ตามลำดับ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 mol/L (pH=2.3) ในช่วงความยาวคลื่น 190-330 nm ที่ได้จากการศึกษาหาสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับต่างๆ มาทำการซ้อนทับ (Overlay) กันเป็นคู่ๆ ดังตาราง 5 เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่จุดซีโร-ครอสซิง (Zero-crossing wavelength หรือ λ_{zero}) ของสารที่สนใจวิเคราะห์ นั่นคือ ณ จุด λ_{zero} นี้ สารที่สนใจวิเคราะห์จะให้ค่าสัญญาณของอนุพันธ์ที่จุดซีโร-ครอสซิง (D_{zero} value คือค่าอนุพันธ์ที่จุดซีโร-ครอสซิง) มากกว่าศูนย์ ขณะที่สารอีกตัวหนึ่งให้เป็นสารรบกวน ซึ่งให้ค่าสัญญาณของอนุพันธ์ D_{zero} เท่ากับหรือใกล้เคียงศูนย์

ตาราง 5 การศึกษาหาจุดซีโร-ครอสซิง ของสารละลายมาตรฐานแบบคู่ ด้วยวิธีซีโร-ครอสซิง สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์ เมื่อใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับ 1-4

สารละลายมาตรฐานแบบคู่ระหว่าง							
D_1		D_2		D_3		D_4	
สารที่ 1	สารที่ 2	สารที่ 1	สารที่ 2	สารที่ 1	สารที่ 2	สารที่ 1	สารที่ 2
ASK	BEN	ASK	BEN	ASK	BEN	ASK	BEN
ASK	SOR	ASK	SOR	ASK	SOR	ASK	SOR
ASK	CAF	ASK	CAF	ASK	CAF	ASK	CAF
BEN	SOR	BEN	SOR	BEN	SOR	BEN	SOR
BEN	CAF	BEN	CAF	BEN	CAF	BEN	CAF
SOR	CAF	SOR	CAF	SOR	CAF	SOR	CAF

2. การศึกษาหาจุดซีโร-ครอสซิงของสารละลายมาตรฐานแบบสาม

การศึกษาหาจุดซีโร-ครอสซิงของสารละลายมาตรฐานแบบสาม ด้วยวิธีซีโร-ครอสซิง สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์ ทำโดยนำสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับ 1-4 (D_1-D_4 spectrum)

ของสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน เข้มข้น 10, 20, 10 และ 20 mg/L ตามลำดับ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 mol/L (pH=2.3) ในช่วงความยาวคลื่น 190-330 nm ที่ได้จากการศึกษาหาสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับต่าง ๆ มาทำการซ้อนทับ (Overlay) กันเป็นจำนวน ครั้งละ 3 สเปกตรัมดังตาราง 6 เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่จุดซีโร-ครอสซิง (λ_{zero}) ของสารที่สนใจวิเคราะห์ นั่นคือ ณ จุด λ_{zero} นี้ สารที่สนใจวิเคราะห์จะให้ค่าสัญญาณของอนุพันธ์ที่จุดซีโร-ครอสซิง (D_{zero} value คือ ค่าอนุพันธ์ที่จุดซีโร-ครอสซิง) มากกว่าศูนย์ ขณะที่สารอีกสองตัวเป็นสารรบกวน ซึ่งให้ค่าสัญญาณของอนุพันธ์ D_{zero} เท่ากับหรือใกล้เคียงศูนย์

ตาราง 6 การศึกษาหาจุดซีโร-ครอสซิง ของสารละลายมาตรฐานแบบสาม ด้วยวิธีซีโร-ครอสซิง สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์ เมื่อใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับ 1-4

สารละลายมาตรฐานแบบสามระหว่าง											
D_1			D_2			D_3			D_4		
สารที่ 1	สารที่ 2	สารที่ 3	สารที่ 1	สารที่ 2	สารที่ 3	สารที่ 1	สารที่ 2	สารที่ 3	สารที่ 1	สารที่ 2	สารที่ 3
ASK	BEN	SOR	ASK	BEN	SOR	ASK	BEN	SOR	ASK	BEN	SOR
ASK	BEN	CAF	ASK	BEN	CAF	ASK	BEN	CAF	ASK	BEN	CAF
ASK	SOR	CAF	ASK	SOR	CAF	ASK	SOR	CAF	ASK	SOR	CAF
BEN	SOR	CAF	BEN	SOR	CAF	BEN	SOR	CAF	BEN	SOR	CAF

3. การศึกษาหาจุดซีโร-ครอสซิงของสารละลายมาตรฐานแบบสี่

การศึกษาหาจุดซีโร-ครอสซิงของสารละลายมาตรฐานแบบสี่ ด้วยวิธีซีโร-ครอสซิง สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์ ทำโดยนำสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับ 1-4 (D_1-D_4 spectrum) ของสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน เข้มข้น 10, 20, 10 และ 20 mg/L ตามลำดับ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 mol/L (pH=2.3) ในช่วงความยาวคลื่น 190-330 nm ที่ได้จากการศึกษาหาสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับต่าง ๆ มาทำการซ้อนทับ (Overlay) กันเป็นจำนวนครั้งละ 4 สเปกตรัมดังตาราง 7 เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่จุดซีโร-ครอสซิง (λ_{zero}) ของสารที่สนใจวิเคราะห์ นั่นคือ ณ จุด λ_{zero} นี้ สารที่สนใจวิเคราะห์จะให้ค่าสัญญาณของอนุพันธ์ที่จุดซีโร-ครอสซิง (D_{zero} value) มากกว่าศูนย์ ขณะที่สารอีกสามตัวเป็นสารรบกวน ซึ่งให้ค่าสัญญาณของอนุพันธ์ D_{zero} เท่ากับหรือใกล้เคียงศูนย์

ตาราง 7 การศึกษาหาจุดซีโร-ครอสซิง ของสารละลายมาตรฐานแบบสี่ ด้วยวิธีซีโร-ครอสซิง สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์ เมื่อใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับ 1-4

สารละลายมาตรฐานแบบสี่ระหว่าง															
D_1				D_2				D_3				D_4			
สาร ที่ 1	สาร ที่ 2	สาร ที่ 3	สาร ที่ 4	สาร ที่ 1	สาร ที่ 2	สาร ที่ 3	สาร ที่ 4	สาร ที่ 1	สาร ที่ 2	สาร ที่ 3	สาร ที่ 4	สาร ที่ 1	สาร ที่ 2	สาร ที่ 3	สาร ที่ 4
ASK	BEN	SOR	CAF	ASK	BEN	SOR	CAF	ASK	BEN	SOR	CAF	ASK	BEN	SOR	CAF

4. การศึกษาอิทธพลของสารรบกวน

จากการศึกษาอิทธิพลของสารรบกวนในหัวข้อ 2 นำแอบซอร์พชันสเปกตรัมของสารรบกวน คือสารละลายกรดซิตริก กลูโคส และซูโครส เข้มข้น 150, 500 และ 3500 mg/L ตามลำดับ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 mol/L (pH=2.3) มาทำอนุพันธ์อันดับหนึ่ง สอง สาม และสี่ ตามลำดับ โดยใช้โปรแกรม UV Winlab version 2.85 เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน จากนั้นนำสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับ 1-4 ของสารรบกวนมาซ้อนทับ (Overlay) กับสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับเดียวกันของสารละลายมาตรฐานแบบคู่ ดังหัวข้อ 1 เพื่อหาจุด λ_{zero} ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเอซีซัลเฟม-เค (10 mg/L) กรดเบนโซอิก (20 mg/L) กรดซอร์บิก (10 mg/L) และคาเฟอีน (20 mg/L) ตามลำดับ

5. กราฟมาตรฐาน ขีดจำกัดต่ำสุด และปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด ด้วยการใช้วิธีซีโร-ครอสซิง สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์

ทำการศึกษาโดยนำค่าสัญญาณอนุพันธ์ (D_{zero} value) ของสารที่สนใจวิเคราะห์ เมื่อใช้สเปกตรัมอนุพันธ์แบบคู่ที่เหมาะสม (ที่จุด λ_{zero} ที่เหมาะสม) ของสารละลายมาตรฐานแบบคู่ระหว่าง เอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน กับความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายมาตรฐานเอซีซัลเฟม-เค (0.25, 0.5, 2.5, 5, 10 และ 20 mg/L) กรดเบนโซอิก (0.5, 1, 5, 10, 20 และ 40 mg/L) กรดซอร์บิก (0.5, 1, 2, 5, 10 และ 15 mg/L) และคาเฟอีน (0.5, 1, 5, 10, 20 และ 40 mg/L) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 mol/L (pH=2.3) มาพล็อตเป็นกราฟมาตรฐานพร้อมทั้งคำนวณหาค่าขีดจำกัดต่ำสุด และปริมาณต่ำสุดของการตรวจวัด (ดูวิธีการคำนวณดังภาคผนวก ข.1 และ ข.2 ตามลำดับ)

6. การวิเคราะห์ปริมาณเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน ในตัวอย่างสังเคราะห์และตัวอย่างเครื่องดื่ม ด้วยวิธีซีโร-ครอสซิง สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน ในตัวอย่างสังเคราะห์ที่เตรียมได้จากการผสมสารละลายมาตรฐานแบบคู่ จำนวน 6 คู่ (หรือจำนวน 24 ตัวอย่าง), ตัวอย่างสังเคราะห์ที่ทำการเติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ลงไป (Spiked หรือ added ด้วย 2, 5, 8 และ 10 mg/L เอซีซัลเฟม-เค กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และคาเฟอีน ตามลำดับ) ทีละตัวลงในตัวอย่างเครื่องดื่ม 4 ชนิด (จำนวน 20 ตัวอย่าง) และตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดต่างๆ ด้วยวิธีซีโร-ครอสซิง สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์ (DZS) ของอันดับ และ λ_{zero} ที่เหมาะสม โดยนำค่าสัญญาณของอนุพันธ์ของสารตัวอย่างที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ดังหัวข้อ 5 และเพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว ทำการเปรียบเทียบปริมาณที่ตรวจพบของสารที่สนใจทั้ง 4 ชนิดในตัวอย่าง กับวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้วิเคราะห์ดังอ้างอิงดังภาคผนวก ง) [72]