

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โฟลอินเจชันโครมาโทกราฟีสำหรับการตรวจวัดสารให้ความหวานและ
คาเฟอีนแบบพร้อมกัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสกลนครราชภัฏ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2559

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โฟลอินเจกชันโครมาโทกราฟีสำหรับการตรวจวัดสารให้ความหวานและ
คาเฟอีนแบบพร้อมกัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โฟลอินเจคชันโครมาโทกราฟีสำหรับการตรวจวัดสารให้ความหวานและ
คาเฟอีนแบบพร้อมกัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสกลนครราชภัฏ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2559

ภัทรพร สิงห์ภิรมย์. (2559). การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โพลีอินजेชันโครมาโทกราฟีสำหรับการตรวจวัดสารให้ความหวานและคาเฟอีนแบบพร้อมกัน. ปริญญาานิพนธ์ วท.ม.(เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ.

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารให้ความหวาน (อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน และแอสพาร์แทม) และคาเฟอีนแบบพร้อมกันในตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำตาล น้ำหวานกลิ่นผลไม้ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ด้วยการใช้เทคนิคโพลีอินजेชันโครมาโทกราฟี การเตรียมตัวอย่างทำได้ง่ายเพียงแค่เจือจาง กรอง และฉีดเข้าสู่ระบบการวิเคราะห์ได้โดยตรง สภาวะการแยกใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 x 3.0 mm i.d., 3 μ m) และระบบเกรเดียนต์ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือ สารละลายผสมระหว่างแอสซิโตนไตริลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.49 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกสารให้ความหวานและคาเฟอีนได้เป็นอย่างดีภายในเวลา 6.00 นาที มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 1.00-200, 0.50-60, 1.00-180 และ 0.10-20 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีนตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดี ($R^2 > 0.998$) ค่าความเที่ยงของวิธีแสดงในรูปของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) มีค่าน้อยกว่า 2.00% ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน มีค่าเท่ากับ 0.30, 0.09, 0.20 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าร้อยละการคืนกลับของสารให้ความหวานและคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มอยู่ในช่วง 93.52-106.79 วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างเครื่องดื่มได้เป็นผลสำเร็จ โดยให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องอย่างดีกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จึงเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวและความเที่ยงสูง มีประสิทธิภาพที่ดี รวดเร็ว ราคาคูถูก และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

DEVELOPMENT OF A FLOW INJECTION CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR
SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SWEETENERS AND CAFFEINE



Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master of Science Degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University

July 2016

Pattaraporn Singpirom. (2016). *Development of a flow injection chromatographic method for simultaneous determination of sweeteners and caffeine*. Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee. Assistant Professor Dr. Piyada Jittangprasert.

In this research, a flow injection chromatographic method was developed through the simultaneous determination of sweeteners (acesulfame-K, saccharin and aspartame) and caffeine used in carbonated soft drinks, fruit nectars and dietary supplements. All of the samples were diluted, filtered and then directly injected into the chromatographic system. The chromatographic separation was performed on a mini C18 column (8.0 x 3.0 mm i.d., 3 μ m) with gradient elution using a mobile phase A consisting of 5 mM ammonium acetate buffer (pH 4.0) and mobile phase B consisting of acetonitrile and 5 mM ammonium acetate buffer (pH 4.0) in ratio 6:94 (v/v) at flow rate of 0.49 mL/min. Direct UV absorptions at wavelength of 210 nm was used for the detection of sweeteners and caffeine. The results showed that sweeteners and caffeine were well separated in 6.00 min using optimum condition. The linear calibration curves were obtained over the concentration range of 1.00-200, 0.50-60, 1.00-180 and 0.1-20 mg/L for acesulfame-K, saccharin, aspartame and caffeine, respectively with good correlation coefficients ($R^2 > 0.998$). Precision was measured in terms of a relative standard deviation (RSD) value. The RSDs of the method were less than 2.00%. The limits of detections (LODs) of acesulfame-K, saccharin, aspartame and caffeine were 0.30, 0.09, 0.20 and 0.03 mg/L, respectively. The percentage recoveries of sweeteners and caffeine were obtained in the range of 93.52-106.79. The developed method was successfully applied for analysis in real beverage samples. The results of comparing between the developed method and a HPLC reference method were well correlated. Therefore, it can be concluded that this method has advantages, such as high sensitivity and precision, effectiveness, rapidity, low cost and environmental friendliness.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โฟลอินเจคชันโครมาโทกราฟีสำหรับการตรวจวัดสารให้ความหวานและ

คาเฟอีนแบบพร้อมกัน

ของ

ภัทราพร สิงห์ภิรมย์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

วันที่..... เดือน.....พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษาหลัก

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา เพชรกระจำง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ ช่วยแก้ไขปัญหาในการทำงานวิจัย ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์นี้แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ ได้เรียนรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา เพชรกระจ่าง ประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์ กรรมการควบคุมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่อง เพื่อให้ปริญญานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ให้ความเมตตา เอาใจใส่และให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่คอยให้การสนับสนุนทางด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษาและการทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

คุณค่าของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณต่อครอบครัวของผู้วิจัย ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดาและญาติสนิททุกท่าน ที่มอบความรัก กำลังใจ ความเอาใจใส่ และสนับสนุนในทุกๆด้าน ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในครั้งนี้

ภัทราพร สิงห์ภิรมย์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ.....	1
	ภูมิหลัง.....	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
	ความสำคัญของการวิจัย.....	3
	ขอบเขตของการวิจัย.....	4
	ขั้นตอนดำเนินการวิจัย.....	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
	สารให้ความหวาน.....	6
	อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม.....	7
	แอสพาร์แทม.....	8
	แซคคาริน.....	10
	คาเฟอีน.....	11
	เทคนิคโพลินเจคชันอะนาลิซิส.....	12
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
	เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	24
	วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
	ตอนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการแยกสารให้ความหวานและ	
	คาเฟอีนแบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโพลินเจคชันโครมาโทกราฟีร่วมกับ	
	การใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก.....	26
	ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น.....	29

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีน ในตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	31
4 ผลการทดลอง.....	33
ตอนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการแยกสารให้ความหวานและคาเฟอีน แบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโพลินเจชันโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้ คอลัมน์ขนาดเล็ก.....	33
การศึกษาและออกแบบระบบโพลินเจชันโครมาโทกราฟีที่ใช้คอลัมน์ ขนาดเล็ก.....	33
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารให้ความหวาน 3 ชนิด และ คาเฟอีนแบบพร้อมกัน.....	36
ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น.....	46
ช่วงความเป็นเส้นตรง.....	46
ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้	47
ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์.....	47
ร้อยละของการคืนกลับ.....	49
ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีน ในตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วย เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	50
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	54
บรรณานุกรม.....	57

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก.....	62
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	66



บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง.....	47
2 ผลการศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น.....	47
3 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น.....	48
4 ผลการศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับ.....	49
5 ชนิดและปริมาณของสารให้ความหวานและคาเฟอีนที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้น ในงานวิจัยนี้และวิธีอ้างอิง (Demiralay; Özkan; & Guzel-Seydim. 2006: 91-96...	53
6 การเปรียบเทียบผลการวิจัยที่ได้จากงานวิจัยที่พัฒนาขึ้น และงานวิจัยที่เคยรายงาน ก่อนหน้านี้สำหรับการวิเคราะห์สารให้ความหวานและคาเฟอีนในผลิตภัณฑ์เครื่อง ดื่มการเปรียบเทียบผลการวิจัยที่ได้จากงานวิจัยและงานวิจัยที่เคยรายงานก่อน หน้านี้.....	55

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างทางเคมีของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม.....	7
2 โครงสร้างทางเคมีของแอสพาร์แทม.....	9
3 โครงสร้างทางเคมีของแซคคาริน หรือซันทอสกร.....	10
4 โครงสร้างทางเคมีของคาเฟอีน.....	11
5 ส่วนประกอบที่สำคัญในระบบโพลินเจกชันโครมาโทกราฟี.....	13
6 ระบบการขับเคลื่อนสารละลายของเพอร์ิสตาลติกปั๊ม.....	14
7 ทิศทางการไหลของสารละลายที่ตำแหน่ง Load และ Inject.....	15
8 ระบบโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีสำหรับระบบไอโซเครติก.....	26
9 ระบบโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีสำหรับระบบเกรเดียนต์.....	27
10 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอสพาร์แทมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 × 3.0 mm i.d., 3 µm) และใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ด้วยอัตราการไหล 0.48 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ 210 นาโนเมตร.....	34
11 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอสพาร์แทมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารละลายผสมระหว่างแอซีโตไนไตรล์ต่อสารละลาย บัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) อัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่.....	34
12 ภาพของระบบโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้.....	35
13 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคา ริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	37

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ

หน้า

- 14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต (pH 4.0) ในช่วงความเข้มข้น 2-10 มิลลิโมลาร์ และเวลาของการคงอยู่ของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน และแอสพาร์แทม เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ B คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลต่อสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต (pH 4.0) อัตราส่วนร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที..... 38
- 15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในช่วง pH 4-7 และเวลาของการคงอยู่ของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน และแอสพาร์แทม เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ B คือ สารละลายผสมระหว่างเมทานอลต่อสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต อัตราส่วนร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร..... 39
- 16 โครมาโทแกรมของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีน เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (ก) 6:94 โดยปริมาตร (ข) 8:92 โดยปริมาตร (ค) 10:90 โดยปริมาตร (ง) 12:88 โดยปริมาตร (จ) 14:86 โดยปริมาตร และ (ฉ) 16:84 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที..... 40
- 17 โครมาโทแกรมของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีน เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (ก) 2:98 โดยปริมาตร (ข) 4:96 โดยปริมาตร (ค) 6:94 โดยปริมาตร (ง) 8:92 โดยปริมาตร และ (จ) 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที..... 41

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ

หน้า

18	โครมาโทแกรมของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีน เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตेटเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ B คือสารละลายผสมระหว่างแอสิตอนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตेटความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (ก) 4:96 โดยปริมาตร (ข) 6:94 โดยปริมาตร (ค) 8:92 โดยปริมาตร และ (ง) 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที.....	43
19	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่และเวลาของการคงอยู่ของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน และแอสพาร์แทม เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตेटเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ B คือสารละลายผสมระหว่างแอสิตอนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตेटความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตร.....	44
20	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอสพาร์แทมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 × 3.0 mm i.d., 3 µm) และสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 2.....	46
21	ตัวอย่างโครมาโทแกรมของการแยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ในตัวอย่างเครื่องดื่มประเภทต่างๆ (ก) น้ำอัดลมตัวอย่างที่ 1 (ข) น้ำอัดลมตัวอย่างที่ 2 (ค) น้ำหวานกลิ่นผลไม้ตัวอย่างที่ 5 และ (ง) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารตัวอย่างที่ 8.....	52
22	เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น HPLC-1260.....	63
23	เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-2450.....	63
24	เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-1000.....	64
25	เปรียบเทียบขนาดของความยาวคอลัมน์.....	64
26	เครื่องแปลงสัญญาณ รุ่น PC710.....	65

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบันคนไทยส่วนใหญ่ประสบปัญหาโรคอ้วน โรคเบาหวาน และโรคเรื้อรังต่างๆ มากขึ้น เนื่องด้วยการบริโภคอาหารที่มีรสหวานเป็นหลัก ทำให้ผู้บริโภคหันมาให้ความสนใจกับเรื่องสุขภาพเพิ่มมากขึ้น โดยการลดการบริโภคน้ำตาลหรือการนำสารให้ความหวาน (sweetener) หรือน้ำตาลเทียมมาใช้แทนน้ำตาล โดยสารให้ความหวานสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สารให้ความหวานชนิดที่ให้พลังงานและชนิดที่ไม่ให้พลังงาน สำหรับกลุ่มสารให้ความหวานที่ไม่ให้พลังงานพบว่าทั้งหมด 5 ชนิดที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration; FDA) และกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยได้รับรองและอนุญาตให้ใช้ได้อย่างปลอดภัย ได้แก่ แอสพาร์แทม (aspartame) แซคคาริน (saccharin) อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม (acesulfame-K) ซูคราโลส (sucralose) และนีโอแทม (neotame) (วรรณกุล เชื้ออมงคล. 2551: 161-168) สารให้ความหวานกลุ่มนี้จัดเป็นกลุ่มสารที่มีคุณค่าทางการแพทย์ เนื่องจากเป็นสารให้ความหวานกลุ่มที่ไม่ให้พลังงานจึงนิยมนำมาใช้ทดแทนน้ำตาลสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานเพื่อควบคุมพลังงานที่ร่างกายควรได้รับโดยไม่มีผลกระทบต่อระดับน้ำตาลในเลือด นอกจากนั้นสารกลุ่มนี้ยังนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรสอาหารสำหรับผู้เป็นโรคอ้วน เพื่อการควบคุมน้ำหนัก และยังนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ เช่น น้ำอัดลม เป็นต้น เพื่อลดต้นทุนการผลิตและเหมาะกับผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก ซึ่งในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มดังกล่าวนี้ นอกจากจะพบสารให้ความหวานแล้วยังพบคาเฟอีนเป็นองค์ประกอบอีกด้วย โดยคาเฟอีนเป็นสารกลุ่มแซนทีนอัลคาลอยด์ มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางทำให้สมองตื่นตัว มีส่วนช่วยให้อารมณ์ดีและมีความสุขจึงมีประโยชน์ในทางการแพทย์สามารถช่วยกระตุ้นให้ฟื้นได้ (โชติช่วง ชุตินธร. 2528: ออนไลน์)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าสารให้ความหวานและคาเฟอีนจะถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน แต่การรับประทานสารเหล่านี้ต้องบริโภคไม่เกินค่า Acceptable daily intake levels (ADI) ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดต่อวันที่สามารถรับประทานได้อย่างปลอดภัย โดยค่า ADI ของแอสพาร์แทม แซคคาริน อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม ซูคราโลส และนีโอแทม เท่ากับ 40-50, 5, 15, 15 และ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ตามลำดับ (วรรณกุล เชื้ออมงคล. 2551: 161) สำหรับคาเฟอีนนั้นกฎหมายกำหนดให้เครื่องดื่มน้ำอัดลมมีคาเฟอีนได้ไม่เกิน 15 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (ปรุพห์ รุจนธำรงค์. 2554: ออนไลน์) หากบริโภคมากเกินไปเกินปริมาณที่กำหนดอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพได้ เช่น การบริโภคแอสพาร์แทมมากเกินไปเกินกำหนด อาจพบอาการข้างเคียงทำให้ปวดศีรษะ และจากการศึกษาในหนูพบว่า

แซคคารินสามารถทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ (วรรณกุล เชื้อมงคล. 2551: 161-168) และผลเสียจากการบริโภคคาเฟอีนเกินขนาดทำให้รู้สึกกระสับกระส่าย นอนไม่หลับ ปวดศีรษะ ความดันโลหิตสูง และทำให้หัวใจเต้นเร็ว เป็นต้น ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวานและคาเฟอีนในผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ สร้างความน่าเชื่อถือให้กับผู้บริโภค และช่วยยกระดับมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ให้มีความปลอดภัยและเป็นไปตามมาตรฐานสากล โดยวิธีการวิเคราะห์ที่นำมาใช้ต้องมีประสิทธิภาพ ความถูกต้อง และความแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีนในตัวอย่างที่มีปริมาณสารเหล่านี้ในปริมาณต่ำๆ ได้

สำหรับเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน (Zygler; Wasik; & Namiesnik. 2009: 1082-1102) รวมทั้งคาเฟอีน มีหลากหลายเทคนิค เช่น เทคนิคสเปกโทรสโกปี (Mazurek; & Szostak. 2011: 1051-1057) เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Bergamo; Fracassi da Silva; & de Jesus. 2011: 1714-1717) และเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (Demiralay; Özkan; & Guzel-Seydim. 2006: 91-96) เป็นต้น อย่างไรก็ตามเทคนิคที่กล่าวมานี้ยังมีข้อจำกัด อาทิ เช่น เทคนิคสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่ไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์สารให้ความหวานและคาเฟอีนแบบพร้อมกันได้ ส่วนเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสและเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี ถึงแม้ว่าจะเป็นเทคนิคการแยกที่มีประสิทธิภาพสูง และได้รับความยอมรับอย่างกว้างขวาง แต่ก็ยังเป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ ราคาแพง ไม่สามารถนำไปใช้งานในการวิเคราะห์ภาคสนามได้ อีกทั้งยังใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และต้องใช้ทักษะความชำนาญของผู้ทำการทดลองอีกด้วย ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 ได้มีรายงานวิจัยที่นำเทคนิคโพลินิเจชันโครมาโทกราฟีมาใช้ร่วมกับคอลัมน์ขนาดเล็กชนิดมอโนลิติกสำหรับการแยกแอสพาร์แทม แซคคาริน อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม กลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระ และกลุ่มวัตถุกันเสีย (García-Jiménez; Valencia; & Capitán-Vallvey. 2007: 226-233) ผลการทดลองพบว่าสามารถลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ลงได้ โดยสามารถแยกสารทั้งหมด 9 ชนิดได้พร้อมกันภายในเวลา 7 นาที และยังคงมีประสิทธิภาพการแยกที่ดีไม่แตกต่างจากการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง อีกทั้งยังใช้สารเคมีในปริมาณที่น้อยกว่า ทำให้เทคนิคโพลินิเจชันโครมาโทกราฟีจัดได้ว่าเป็นหนึ่งในเทคนิคการแยกสารที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามในงานวิจัยดังกล่าวนี้ยังคงไม่สามารถแยกแซคคารินและอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียมออกจากกันได้ ซึ่งจากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้มักนิยมใส่พร้อมกันในเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลมปราศจากน้ำตาล (Sik. 2012: 1450) และโทนิควอเตอร์ (tonic water) (Ordoñez; et al. 2015: 162-168) อีกทั้งระบบการแยกยังใช้คอลัมน์ชนิดมอโนลิติกซึ่งมีราคาแพง (ราคาประมาณ 16,500 บาท)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจนำเทคนิคโฟลอินเจกชันโครมาโทกราฟีมาพัฒนาร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก ขนาดความยาวไม่เกิน 1.0 เซนติเมตร ชนิดอนุภาคทรงกลม (particle packed column) ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่นิยมใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการและมีราคาถูกกว่า (ราคาประมาณ 1,500 บาท) คอลัมน์ชนิดมอโนลิธิกมาก โดยกลไกการแยกเกิดขึ้นที่บริเวณคอลัมน์ขนาดเล็กดังกล่าว ซึ่งอาศัยหลักการเดียวกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แต่มีขนาดของเครื่องมือที่เล็กกว่า ราคาถูกกว่า สะดวก รวดเร็ว และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่า สำหรับใช้ในการวิเคราะห์คาเฟอีนและสารให้ความหวานชนิดที่ไม่ให้พลังงาน 3 ชนิด ได้แก่ อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แอสพาร์แตม แซคคารินแบบพร้อมกัน โดยสารกลุ่มดังกล่าวนี้ มักนิยมนำมาเติมลงในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ ร่วมกัน เช่น น้ำอัดลม ชาและกาแฟสำเร็จรูป และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นต้น สำหรับแซคคารินถึงแม้ในประเทศไทยจะมีประกาศห้ามใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มทั่วไป (กระทรวงสาธารณสุข. 2544: ออนไลน์) แต่ยังคงได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นสารให้ความหวานสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานและโรคอ้วนได้ จากนั้นนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างเครื่องดื่มประเภทต่างๆ ได้แก่ น้ำอัดลม น้ำหวานกลั่นผลไม้ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีการระบุข้างผลิตภัณฑ์ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ปราศจากน้ำตาล

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารให้ความหวานชนิดที่ไม่ให้พลังงาน และคาเฟอีนแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโฟลอินเจกชันโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก
2. เพื่อประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์สารให้ความหวานชนิดที่ไม่ให้พลังงาน และคาเฟอีนแบบพร้อมกัน ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ

ความสำคัญของการวิจัย

1. ได้วิธีการวิเคราะห์วิธีใหม่ สำหรับการตรวจวัดปริมาณสารให้ความหวานชนิดที่ไม่ให้พลังงาน และคาเฟอีนแบบพร้อมกัน ด้วยเทคนิคโฟลอินเจกชันโครมาโทกราฟี
2. ได้เทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้งานง่าย สะดวก รวดเร็ว ราคาถูกและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อให้ได้ชุดเครื่องมือขนาดเล็กที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภาคสนามได้
3. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณของสารให้ความหวาน และคาเฟอีนที่พบในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ ที่จำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด เพื่อใช้ในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้ปลอดภัยและเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด

ขอบเขตของการวิจัย

สำหรับขอบเขตของงานวิจัยนี้ เน้นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่สำหรับการตรวจวัดปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีนแบบพร้อมกันในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ ด้วยการใช้เทคนิคโพลินเจนชันโครมาโทกราฟีร่วมกับคอลัมน์ขนาดเล็กซึ่งมีขอบเขตการวิจัยดังนี้

1. การศึกษาและออกแบบระบบโพลินเจนชันโครมาโทกราฟี
2. การศึกษาสภาวะการแยกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารให้ความหวาน และคาเฟอีนแบบพร้อมกัน
3. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น
4. การประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีวางจำหน่ายในประเทศไทย
5. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคที่ได้รับการยอมรับโดยทั่วไปคือ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

สำหรับขั้นตอนดำเนินงานวิจัย มีดังนี้

1. การศึกษาและออกแบบระบบโพลินเจนชันโครมาโทกราฟีที่ใช้คอลัมน์ขนาดเล็กในการแยกสาร ประกอบด้วย 2 ระบบ ได้แก่ ระบบการแยกแบบไอโซเครติก และระบบการแยกแบบเกรเดียนต์
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารให้ความหวาน 3 ชนิด (อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แอสพาร์แทม แซคคาริน) และคาเฟอีนแบบพร้อมกัน
 - 2.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัด
 - 2.2 ความเข้มข้นและค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่
 - 2.3 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่
 - 2.4 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่
3. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น
 - 3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range)
 - 3.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of quantitation; LOQ)
 - 3.3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (precision)
 - 3.4 ร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

4. การประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ได้แก่ น้ำอัดลม น้ำหวานกลั่นผลไม้ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีนในตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคที่ได้รับการยอมรับโดยทั่วไป คือ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พร้อมทั้งเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับผลการวิเคราะห์จากเทคนิคที่พัฒนาขึ้น



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และนำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. สารให้ความหวาน
2. คาเฟอีน
3. เทคนิคโพลินเจกชันอะนาไลซิส
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. สารให้ความหวาน

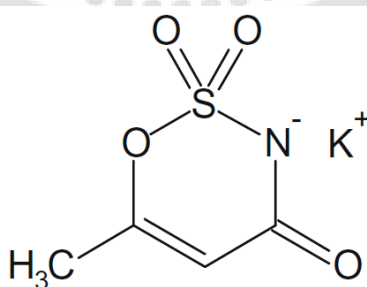
สารให้ความหวานหมายถึง กลุ่มของสารที่มีรสหวานสามารถใช้ปรุงอาหารแทนน้ำตาลได้ จัดเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (Food additives) ในหมวดอาหารควบคุมเฉพาะตามพระราชบัญญัติอาหาร ปี พ.ศ. 2522 (จันทนา อึ้งชูศักดิ์. 2555: 83) ปัจจุบันพบว่าสารให้ความหวานเข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและเครื่องดื่มประเภทต่างๆ มากมาย อาทิเช่น น้ำอัดลม ชา กาแฟปรุงแต่งสำเร็จรูปหรือเครื่องดื่มสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก ลูกอมลูกกวาด น้ำตาลสำหรับโรยหน้าขนม เป็นต้น โดยสารให้ความหวานสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สารให้ความหวานชนิดที่ให้พลังงาน ได้แก่ ซูโครส (sucrose) ฟรุคโตส (fructose) กลูโคส (glucose) และซูการ์แอลกอฮอล์ (sugar alcohol) เช่น ซอร์บิทอล (sorbitol) ไกลทอล (xylitol) มาลิตอล (malitol) เป็นต้น ซึ่งสารกลุ่มนี้ให้พลังงานประมาณ 2-4 กิโลแคลอรีต่อกรัม และสารให้ความหวานชนิดที่ไม่ให้พลังงานหรือเรียกว่า สารให้ความหวานเทียม (artificial sweetening agent) เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้น เพื่อนำมาใช้แทนน้ำตาล แต่ไม่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ แอสพาร์แทม แซคคาริน อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม ซูคราโลส และนีโอแทม สารกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีคุณค่าทางการแพทย์ เนื่องจากถูกนำมาใช้แทนน้ำตาลสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ป่วยโรคอ้วน (จันทนา อึ้งชูศักดิ์. 2555: 1-2) อย่างไรก็ตามการรับประทานสารให้ความหวานนั้นต้องบริโภคไม่เกินค่า Acceptable daily intake levels (ADI) ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดต่อวันที่สามารถรับประทานได้อย่างปลอดภัย เพื่อไม่ให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวานเหล่านี้ เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดและเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

โดยในงานวิจัยครั้งนี้สนใจศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวานกลุ่มที่ไม่ให้พลังงานจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แอสพาร์แทม และแซคคาริน ซึ่งเป็นสารให้ความหวานที่นิยมนำมาเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มประเภทต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมถูกนำมาใช้มากในน้ำอัดลม เครื่องดื่มผง ชาและกาแฟสำเร็จรูป น้ำเชื่อม ซอสรสหวานต่างๆ หมากฝรั่ง ลูกอมลูกกวาด เครื่องปรุงรสอาหารที่บรรจุในถุงเล็ก น้ำตาลสำหรับโรยหน้าขนมปัง และเป็นสารกลบรสของตัวยาบางชนิดทางด้านเวชภัณฑ์ยา สำหรับแอสพาร์แทมมักนิยมใส่ในน้ำอัดลม เครื่องปรุงรสอาหารที่บรรจุในถุงเล็ก หมากฝรั่งและธัญพืชต่างๆ ส่วนแซคคารินถึงแม้ว่าจะมีประกาศห้ามใช้ในอาหารและเครื่องดื่ม เนื่องจากพบว่าสามารถทำให้เกิดมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะของสัตว์ทดลอง แต่ยังคงสามารถใช้เป็นสารให้ความหวานประจำโต๊ะอาหาร (tabletop sweeteners) สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานและโรคอ้วนได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงขอกล่าวถึงรายละเอียดเฉพาะสารให้ความหวาน 3 ชนิดดังนี้

1.1 อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม

1.1.1 คุณสมบัติ

อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม ($C_4H_4KNO_4S$) เป็นเกลือโพแทสเซียมสังเคราะห์ลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีโครงสร้างคล้ายกับแซคคาริน ดังภาพประกอบ 1 มีค่าคงที่การแตกตัว (pK_a) เท่ากับ 2.2 สามารถละลายในน้ำได้ดี มีความเสถียรในช่วงค่า pH 3-7 ทนความร้อนสูง และให้ความหวานเป็น 200 เท่าของน้ำตาลซูโครส มีรสขมติดลิ้นเล็กน้อย จึงมักใช้ร่วมกับสารให้ความหวานตัวอื่น เช่น แอสพาร์แทม เพื่อลดรสขม และเสริมฤทธิ์ให้มีความหวานเพิ่มขึ้นด้วย (กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2542: 89-90)



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทางเคมีของอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม

ที่มา: Zygler; Wasik; & Namiesnik. (2009: 1084).

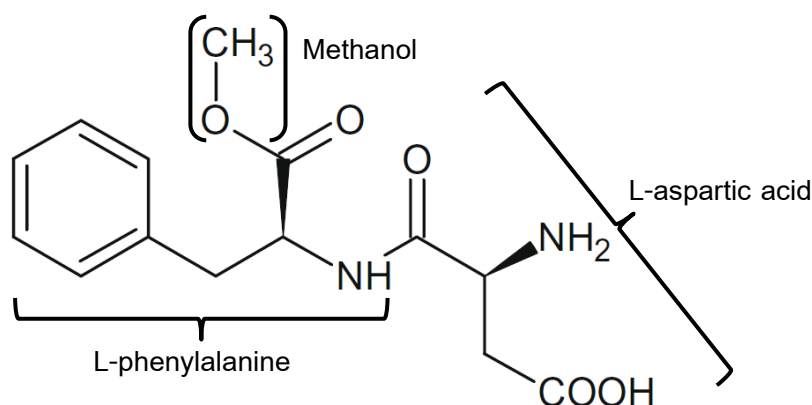
1.1.2 ความเป็นพิษ

อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมไม่เกิดการสะสมในร่างกาย เนื่องจากหลังจากบริโภคอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมแล้วร่างกายสามารถดูดซึมอย่างรวดเร็ว และกำจัดออกในรูปเดิม จากข้อมูลสรุปขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา การใช้สารให้ความหวานชนิดนี้ในคนยังไม่พบอันตรายใดๆ รวมทั้งสามารถใช้ได้ในสตรีมีครรภ์ สตรีให้นมบุตร ผู้ป่วยเบาหวาน และผู้ป่วยภาวะฟีนิลคีโตนูเรีย (phenylketonuria) ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาได้กำหนดปริมาณการรับประทานอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมไม่เกินค่า ADI ซึ่งเท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน

1.2 แอสพาร์แทม

1.2.1 คุณสมบัติ

แอสพาร์แทม ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) มีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาวและไม่มีกลิ่น เป็นสารประกอบไดเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน 2 ชนิดคือ กรดแอสพาร์ติก (L-aspartic acid) และฟีนิลอะลานิน (L-phenylalanine) มีโครงสร้างทางเคมีดังภาพประกอบ 2 ค่าคงที่การแตกตัว (pK_a) เท่ากับ 3.01 และ 7.37 ความสามารถในการละลายขึ้นอยู่กับค่า pH และอุณหภูมิ โดยสามารถละลายได้ดีที่สุดที่ pH 2.2 และละลายได้น้อยที่สุดที่จุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) คือ pH 5.2 มีจุดหลอมเหลว 246 องศาเซลเซียส ความเสถียรของสารละลายแอสพาร์แทม ขึ้นกับอุณหภูมิ pH และเวลา โดยพบว่าค่า pH ในช่วง 3-5 จะมีความเสถียรที่สุด ซึ่งเป็นช่วง pH ที่พบในอาหารส่วนใหญ่อยู่แล้ว (กล้านรงค์ ศรีวรรต. 2542: 73-77) สามารถสลายตัวเมื่อสัมผัสความร้อนสูงทำให้มีรสขม จึงไม่สามารถใช้ในการปรุงอาหารขณะร้อนบนเตาได้ แอสพาร์แทมให้พลังงานเท่ากับน้ำตาลคือ 4 กิโลแคลอรีต่อกรัม แต่เนื่องจากให้ความหวานเป็น 180-200 เท่าของน้ำตาลซูโครส จึงใช้ในปริมาณน้อยมากจนถือว่าเป็นปริมาณที่ไม่ให้พลังงานกับร่างกาย ดังนั้นแอสพาร์แทมจึงถูกจัดเป็นวัตถุเจือปนอาหารชนิดที่ไม่ให้พลังงานเช่นเดียวกับอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างทางเคมีของแอสพาร์แทม

ที่มา: ดัดแปลงจาก Zyglar; Wasik; & Namiesnik. (2009: 1085).

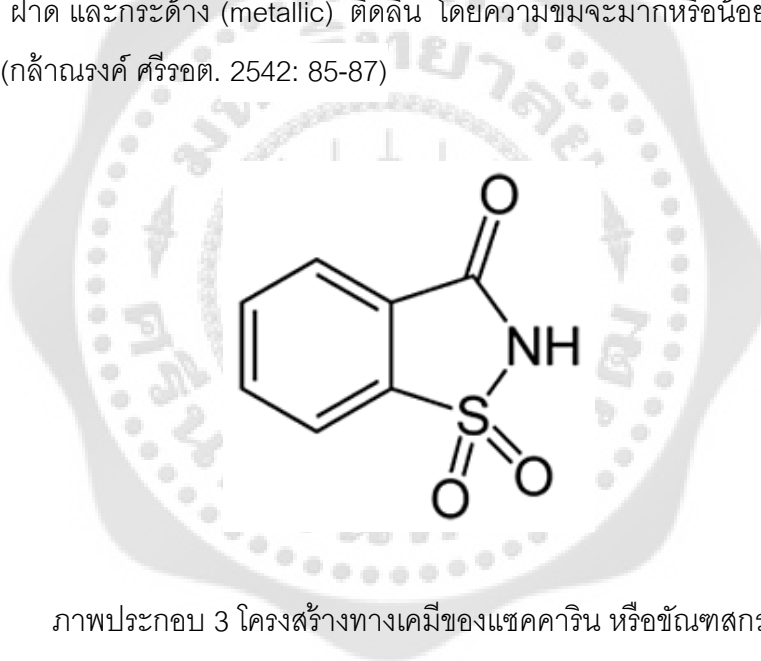
1.2.2 ความเป็นพิษ

แอสพาร์แทมมีความอันตรายเฉพาะผู้ป่วยภาวะฟีนิลคีโตนูเรียเท่านั้น เนื่องจากเมื่อรับประทานแอสพาร์แทมเข้าไปร่างกายจะย่อยสลายได้เป็น 3 โมเลกุลคือ กรดแอสพาร์ติก ฟีนิลอะลานิน และเมทานอล ซึ่งกรดแอสพาร์ติกและเมทานอลร่างกายสามารถกำจัดได้ จึงไม่เกิดการสะสมในร่างกาย (Kaufman. 1999: 3160) แต่ฟีนิลอะลานินนั้นในผู้ป่วยภาวะฟีนิลคีโตนูเรียจะไม่มีเอนไซม์ที่ช่วยย่อยฟีนิลอะลานิน ทำให้ระดับฟีนิลอะลานินในเลือดสูงกว่าปกติ ส่งผลยับยั้งการขนส่งของกรดอะมิโนผ่านผนังเซลล์ประสาท ทำให้ระดับกรดอะมิโนในเซลล์ประสาทลดลง ทำให้เกิดความผิดปกติทางสมองหรือเกิดภาวะ Mental retardation ซึ่งเป็นภาวะที่สมองหยุดพัฒนาหรือพัฒนาไม่สมบูรณ์ได้ ดังนั้นจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของแอสพาร์แทม ต้องมีการแสดงข้อความบนฉลากว่า “มีฟีนิลอะลานิน” และแสดงคำเตือนว่า “ห้ามใช้ในผู้ที่มีการภาวะฟีนิลคีโตนูเรีย” (วรรณกุล เชื้อมงคล. 2551: 162) อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าแอสพาร์แทมจะไม่เป็นอันตรายต่อคนทั่วไป แต่มีการรายงานว่าเมื่อรับประทานเป็นเวลานานๆ อาจพบอาการข้างเคียงเล็กน้อยในบางคน เช่น ปวดศีรษะ ดังนั้นองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาจึงได้กำหนดปริมาณ ADI ของแอสพาร์แทมอยู่ในช่วง 40-50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน (วรรณกุล เชื้อมงคล. 2551: 162)

1.3 แซคคาริน

1.3.1 คุณสมบัติ

แซคคารินหรือซันทอสกร ($C_7H_5NO_3S$) เป็นสารให้ความหวานที่ใช้กันมานาน เดิมใช้เป็นสารเคมีสำหรับทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (antiseptic) และใช้ในการถนอมอาหาร แซคคารินมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว โครงสร้างทางเคมีดังภาพประกอบ 3 มีค่าคงที่การแตกตัว (pK_a) เท่ากับ 1.8 ความสามารถในการละลายเมื่ออยู่ในรูปเกล็ดเท่ากับ 6.67 กรัมในน้ำ 100 กรัม (ที่ 25 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้ยังสามารถละลายในตัวทำละลายชนิดอื่น เช่น โพรพิลีนไกลคอล แอลกอฮอล์ และกลีเซอรอล เป็นต้น แต่เมื่ออยู่ในรูปของกรดจะละลายได้น้อย แซคคารินมีจุดหลอมเหลว 228.8-229.7 องศาเซลเซียส สามารถทนความร้อนสูงได้ แซคคารินมีความหวานเป็น 300-400 เท่าของน้ำตาลซูโครส โดยจะให้ความหวานเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิเย็นสูงสุด แล้วจะคงความหวานอยู่นานจนรู้สึกขม ฝาด และกระด้าง (metallic) ติดลิ้น โดยความขมจะมากหรือน้อยขึ้นกับความเข้มข้นของแซคคาริน (กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2542: 85-87)



ที่มา: Riera; et al. (2007: 627).

1.3.2 ความเป็นพิษ

มีการศึกษาพบว่าแซคคารินทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในหนูเมื่อใช้ในปริมาณสูงมาก ส่งผลให้บางประเทศประกาศห้ามใช้สารนี้ผสมอาหาร แต่ต่อมาเมื่อผลการศึกษาวิจัยจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกาพบว่า การเกิดเนื้องอกจากการใช้แซคคารินในหนูทดลองนั้นยังไม่มีหลักฐานว่าจะทำให้เกิดมะเร็งในคนได้ ทำให้มีการนำแซคคารินกลับมาใช้อีกครั้ง โดยปริมาณที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้รับประทานได้โดยไม่มีรายงานการเกิด

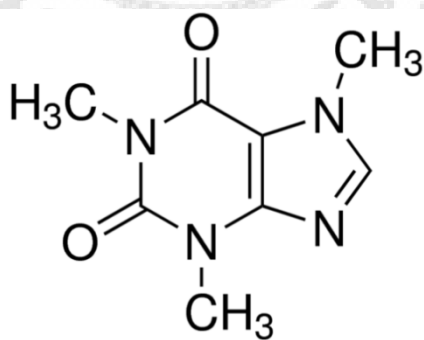
ผิดปกติใดๆคือที่ระดับ ADI ไม่เกิน 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน และไม่แนะนำให้ใช้ในสตรีมีครรภ์เนื่องจากมีบางการศึกษาพบว่า แซคคารินสามารถซึมผ่านรกเข้าไปในเนื้อเยื่อของทารกในครรภ์ได้ สำหรับในประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้เป็นวัตถุที่ให้ความหวานสำหรับเฉพาะผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ป่วยโรคอ้วนที่ต้องจำกัดปริมาณน้ำตาลเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ใช้แซคคารินในเครื่องดื่มและอาหารทั่วไป (กระทรวงสาธารณสุข, 2544: ออนไลน์)

2. คาเฟอีน

ในปัจจุบันคาเฟอีนถูกใช้เป็นส่วนผสมของอาหารและเครื่องดื่มมากมาย (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, 2558: ออนไลน์) โดยเฉพาะน้ำอัดลม ซึ่งเครื่องดื่มนี้มักเติมสารให้ความหวานลงไปด้วย ทำให้พบว่าเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวานนั้นมักจะพบปริมาณคาเฟอีนรวมอยู่ด้วยเช่นกัน

2.1 คุณสมบัติ

คาเฟอีน ($C_8H_{10}N_4O_2$) เป็นกลุ่มสารอัลคาลอยด์ อยู่ในตระกูลเมทิลแซนทีน (methylxanthine) มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีรสขม ไม่มีกลิ่น โครงสร้างทางเคมีดังภาพประกอบ 4 มีฤทธิ์เป็นสารกระตุ้นที่พบตามธรรมชาติโดยพบได้ในเมล็ดและใบ หรือผลของพืชมากกว่า 63 ชนิด เช่น ใบชา เมล็ดกาแฟ เมล็ดโกโก้ เมล็ดโคล่า มีค่าคงที่การแตกตัว (pK_a) เท่ากับ 8.30 ละลายได้ดีในน้ำร้อน และละลายได้เล็กน้อยในน้ำเย็น



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างทางเคมีของคาเฟอีน

ที่มา: Earley. (2008: ออนไลน์).

2.2 ความเป็นพิษ

คาเฟอีนมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง โดยการออกฤทธิ์จะแปรตามปริมาณของคาเฟอีนที่ร่างกายได้รับ โดยคาเฟอีน 50-200 มิลลิกรัมต่อวัน จะกระตุ้นให้ร่างกายไม่ง่วง ตื่นตัว กระปรี้กระเปร่า สดชื่น มีความรู้สึกร่าเริง แต่ถ้ามากถึงระดับ 200-500 มิลลิกรัม อาจทำให้ปวดศีรษะ เครียด กระวนกระวาย มือสั่น และนอนไม่หลับ และถ้ามากเกินไป 1,000 มิลลิกรัม จะทำให้มีอาการกระสับกระส่าย กระวนกระวาย หัวใจเต้นเร็ว คลื่นไส้ เบื่ออาหารหรือที่เรียกว่า Caffeinism ซึ่งเป็นภาวะเสพติดคาเฟอีนนั่นเอง ดังนั้นกฎหมายจึงมีการกำหนดปริมาณคาเฟอีนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแต่ละชนิด เช่น กาแฟพร้อมบริโภคกำหนดให้มีปริมาณคาเฟอีนสูงสุดได้ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อกาแฟ 100 มิลลิลิตร เครื่องดื่มชูกำลังมีปริมาณคาเฟอีนได้ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อภาชนะบรรจุ น้ำอัดลมกำหนดปริมาณคาเฟอีนไม่เกิน 15 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในขณะที่ชาปรุงสำเร็จพร้อมบริโภคไม่ได้มีการกำหนดปริมาณคาเฟอีนสูงสุดไว้ (ปรุพท์ รุจนธำรงค์. 2554: ออนไลน์)

การได้รับปริมาณคาเฟอีนเกินขนาดที่กำหนดจะส่งผลเสียต่อสุขภาพ (ช่อทิพวรรณ พันธุ์แก้ว. 2537: 101-107) เนื่องด้วยคาเฟอีนเป็นตัวกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ส่งผลให้ต่อมหมวกไตหลั่งฮอร์โมนอะดรีนาลีน (adrenaline) ซึ่งส่งผลเสียต่อการเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ การหายใจ และความดันโลหิต นอกจากนี้คาเฟอีนยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดอย่างรุนแรง เพิ่มการคัดหลั่งของกรดในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้คาเฟอีนยังส่งผลให้เกิดโรคกระดูกพรุนหลังวัยหมดประจำเดือน อีกทั้งเป็นยาขับปัสสาวะอ่อนๆ ที่เพิ่มการขับปัสสาวะ อาจทำให้ร่างกายสูญเสียน้ำและเกลือแร่ได้

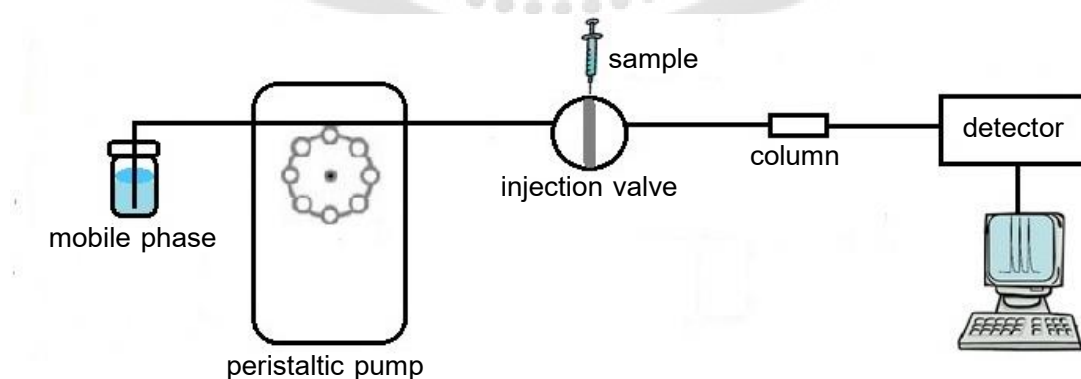
3. เทคนิคโฟลอินเจกชันอะนาลิซิส (Flow Injection Analysis: FIA)

เทคนิคโฟลอินเจกชันอะนาลิซิสได้รับการพัฒนาโดยรูซicka (Ruzicka) และแฮนเซน (Hansen) ในปี ค.ศ. 1974 เป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่มีหลักการพื้นฐานคือการฉีดสารตัวอย่างปริมาณน้อยๆ เข้าไปในกระแสตัวพา (carrier) ซึ่งอาจเป็นรีเอเจนต์หรือตัวทำละลายที่ไหลอย่างต่อเนื่องภายในระบบท่อพลาสติก ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาดเล็ก ด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมและคงที่ตลอดการทดลองซึ่งถูกควบคุมโดยใช้เครื่องเพอริสตาติกปั๊ม (peristaltic pump) สารตัวอย่างจะเข้าผสมกับกระแสตัวพาด้วยการแพร่กระจายแล้วเกิดเป็นท่อนตัวอย่าง (sample zone) ถูกพาไปยังบริเวณที่เกิดการผสม (mixing coil) ทำให้สารตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี การเปลี่ยน pH และกระแสไฟฟ้า เป็นต้น จากนั้นกระแสตัวพาจะพาเอาผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแพร่ไหลเข้าสู่เครื่องตรวจวัด โดยปริมาณของสารละลายตัวอย่างสามารถตรวจวัดได้จากสัญญาณความสูงของพีคและพื้นที่ใต้พีค (แม้น อมรสิทธิ์; และคนอื่นๆ. 2555: 565-566)

เทคนิคการไหลแบบอัตโนมัติเริ่มเป็นที่นิยมมากขึ้นเรื่อยๆ จนในปัจจุบันมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรม การแพทย์ เกษตรกรรม เป็นต้น อันเนื่องมาจากมีความหลากหลายและสามารถนำไปดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์ได้หลายรูปแบบ จึงทำให้เป็นที่ยอมรับจากนักเคมีวิเคราะห์ว่าเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง ให้ข้อมูลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ และสามารถพัฒนาให้เป็นแบบอัตโนมัติได้ง่ายโดยอาศัยการควบคุมผ่านคอมพิวเตอร์

จากหลักการที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าเทคนิคโฟลอินเจกชันอะนาไลซิสมีความคล้ายคลึงกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แต่ด้วยการใช้สารเคมีที่มีปริมาณน้อยกว่าจึงทำให้เทคนิคโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส เป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์เชิงสะอาด (green analytical chemistry) ที่ลดการใช้สารเคมีและสารตัวอย่าง ทำให้เกิดของเสียน้อย มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันจึงได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส ร่วมกับเทคนิคอื่นๆ มากมาย โดยเฉพาะเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว (แม่น้ำ อมรสิทธิ์; และคนอื่นๆ. 2555: 571) โดยในงานวิจัยนี้มีความสนใจศึกษาและออกแบบระบบโฟลอินเจกชันโครมาโทกราฟีซึ่งเป็นระบบที่นำเอาเทคนิคโฟลอินเจกชันอะนาไลซิสมาประยุกต์ใช้ร่วมกับคอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 สำหรับการแยกสารที่สนใจทำให้ระบบดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แต่มีขนาดของเครื่องมือที่เล็กกว่า ราคาถูกกว่า สะดวก รวดเร็ว และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่า โดยในระบบจะประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่พาสารละลายตัวอย่างไปทำการแยกภายในคอลัมน์ที่บรรจุวัฏภาคคงที่ชนิด C18 แล้วตรวจวิเคราะห์สารที่แยกออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัด (detector) ส่วนประกอบที่สำคัญในระบบโฟลอินเจกชันโครมาโทกราฟีแสดงดังภาพประกอบ

5



ภาพประกอบ 5 ส่วนประกอบที่สำคัญในระบบโฟลอินเจกชันโครมาโทกราฟี

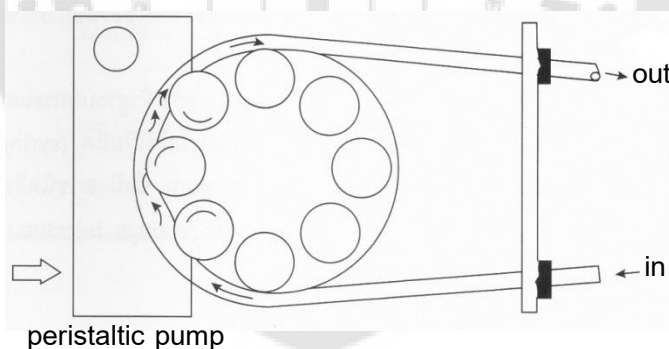
สำหรับอุปกรณ์ที่นำมาประกอบเป็นระบบโพลินเจกชันโครมาโทกราฟี (แม่น้ำ อมรสิทธิ์; และคนอื่น ๆ. 2555: 583-592) มีรายละเอียดดังนี้

3.1 ท่อขนาดเล็ก

ทำหน้าที่เป็นทางเดินของสารละลาย ซึ่งอาจมีการดัดแปลงให้เหมาะสมกับปฏิกิริยาของระบบที่ต้องการวิเคราะห์ โดยจะต้องทำจากวัสดุที่ทนทานต่อสารเคมี โดยเฉพาะตัวทำละลายอินทรีย์ โดยทั่วไปนิยมใช้ท่อพลาสติกชนิดไทกอน (Tygon) และชนิดเทฟลอน (Teflon) หรือ PTFE (Polytetrafluoroethylene)

3.2 ระบบขับเคลื่อนของเหลว

เป็นอุปกรณ์ที่มีความสำคัญมากที่สุดในระบบการไหลแบบความดันต่ำ นิยมใช้เพอร์ิสตาติกปั๊มในการขับเคลื่อนของเหลวหรือสารละลายสามารถควบคุมให้มีอัตราการไหลของสารละลายที่คงที่ อุปกรณ์ประกอบด้วยชุดลูกกลิ้งทำหน้าที่เป็นตัวขับเคลื่อนสารละลาย โดยการบีบรัดสายยาง แสดงดังภาพประกอบ 6 ทำให้สารละลายถูกลำเลียงไปตามทิศทางการหมุน ในขณะที่ลูกกลิ้งหมุนความเร็วรอบในการหมุนของลูกกลิ้งจะกำหนดอัตราการไหลของสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ ให้คงที่ตลอดการวิเคราะห์ได้

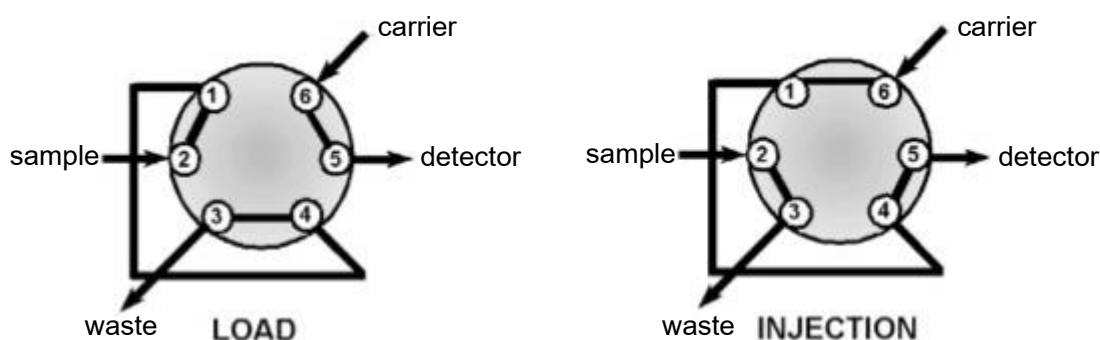


ภาพประกอบ 6 ระบบการขับเคลื่อนสารละลายของเพอร์ิสตาติกปั๊ม

ที่มา: แม่น อมรสิทธิ์; และคนอื่น ๆ. (2555: 585).

3.3 ชุดอุปกรณ์ฉีดตัวอย่าง (injection valve)

เป็นอุปกรณ์สำหรับฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าสู่ระบบ ที่สามารถควบคุมปริมาณของสารตัวอย่างที่ฉีดให้คงที่ ซึ่งนิยมใช้เป็นแบบ 6-ports valve แสดงการทำงานดังภาพประกอบ 7 ตำแหน่ง load คือการเก็บสารตัวอย่าง และตำแหน่ง inject คือการฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในกระแสของตัวพา



ภาพประกอบ 7 ทิศทางการไหลของสารละลายที่ตำแหน่ง Load และ Inject

ที่มา: ดัดแปลงจาก Yebra-Biurrun. (2009: ออนไลน์).

3.4 คอลัมน์

เป็นอุปกรณ์ที่เพิ่มเติมเข้าไปในระบบเพื่อใช้สำหรับการแยกสารที่สนใจจะวิเคราะห์ โดยทั่วไปคอลัมน์แบบลักษณะอนุภาคขนาดความยาวในช่วง 10-25 เซนติเมตรมักนิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เนื่องจากคอลัมน์ชนิดนี้จะมีแรงดันย้อนกลับที่ค่อนข้างสูง จึงต้องใช้ปั๊มชนิดแรงดันสูงในการขับเคลื่อนพาหะเคลื่อนที่และสารตัวอย่างให้ไหลเข้าสู่คอลัมน์ได้ แต่ในเทคนิคโฟลอินเจชันอะนาลิซิสมักนิยมใช้ปั๊มแรงดันต่ำ จึงเหมาะกับการนำคอลัมน์ขนาดเล็ก (ความยาว < 5 เซนติเมตร) มาประยุกต์ใช้ในการแยกสารสำคัญ ซึ่งคอลัมน์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือคอลัมน์อนุภาคทรงกลมชนิด C18 ที่มีความยาวไม่เกิน 1 เซนติเมตร จึงทำให้มีแรงดันย้อนกลับต่ำสามารถใช้เพอร์ิสตาติกปั๊มซึ่งเป็นปั๊มแรงดันต่ำในการขับเคลื่อนพาหะเคลื่อนที่และสารตัวอย่างในระบบได้ (แม่น อมรสิทธิ์; และคนอื่นๆ. 2555: 425)

3.5 เครื่องตรวจวัด

เครื่องมือที่ใช้ในการวัดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือทางเคมีที่เกิดขึ้น สามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสม ขึ้นกับลักษณะของสารที่สนใจวิเคราะห์ เช่น เครื่องตรวจวัดชนิดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ อะตอมมิกแอฟซอร์ปชันสเปกโตรมิเตอร์ และโพเทนชิโอมิเตอร์ เป็นต้น ในงานวิจัยนี้สารให้ความหวานและคาเฟอีนสามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 200-280 นาโนเมตร จึงทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้เครื่องยูวี วิชibelสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และบันทึกสัญญาณด้วยระบบคอมพิวเตอร์

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสารให้ความหวานและคาเฟอีนมีด้วยกันหลากหลายเทคนิค มีทั้งเทคนิคที่นิยมวิเคราะห์ครั้งละ 1 ชนิด เช่น เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี และเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้หลายชนิดพร้อมกัน เช่น เทคนิคทางโครมาโทกราฟี เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส และเทคนิคฟลูออโรอิมเมจชันอะนาลิซิส เป็นต้น โดยในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นเฉพาะเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารพร้อมกันหลายชนิดเท่านั้น รายละเอียดดังนี้

4.1 เทคนิคโครมาโทกราฟี

4.1.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ในปี ค.ศ. 2006 ดีมีราเล และคณะ (Demiralay; Özkan; & Guzel-Seydim. 2006: 91-96) ทำการวิเคราะห์ปริมาณวัตถุเจือปนในอาหารแบบพร้อมกัน 6 ชนิด ประกอบด้วยสารให้ความหวาน ได้แก่ แอสพาร์แทม อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน และวัตถุกันเสีย ได้แก่ กรดซอร์บิก (sorbic acid) กรดเบนโซอิก (benzoic acid) และสารแต่งกลิ่น ได้แก่ วานิลลิน (vanillin) ในตัวอย่างเครื่องดื่มโคล่าและเครื่องดื่มผงด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) และสารละลายผสมระหว่างแอซีโตไนไตรล์กับสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.005 โมลาร์ (pH 4.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 15:85 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองส่วนของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดคือ แอสพาร์แทม อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม และแซคคาริน ได้ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 203, 230 และ 220 นาโนเมตรตามลำดับพบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 40 นาที มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1.5-75.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 0.2-3.1 ไมโครกรัมต่อกรัม และสามารถนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มโคล่าและเครื่องดื่มผงได้จริง โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-105

ปี ค.ศ. 2006 ดอสสิ และคณะ (Dossi; et al. 2006: 557-562) ทำการวิเคราะห์กลุ่มสารให้ความหวาน ได้แก่ อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แอสพาร์แทม แซคคาริน วัตถุกันเสีย ได้แก่ โซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) กรดซอร์บิก และสีผสมอาหาร ได้แก่ ปองโซ 4 อาร์ (ponceau 4R) ซันเซต เยลโลว์ (sunset yellow) ทาร์ทราซีน (tartrazine) ในตัวอย่างเครื่องดื่มด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ในระบบเกรเดียนต์ โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 10 μm) และใช้สารละลายผสมระหว่างเมทานอลต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 4.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 5:95 และ 40:60 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยในส่วนของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดคือ อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แอสพาร์แทม แซคคาริน ได้ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 235, 210 และ 210 นาโนเมตรตามลำดับ พบว่าวิธีนี้ใช้เวลา

ในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 20 นาที มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 0.1-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 96.9-103.2 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในตรวจวัดปริมาณสารให้ความหวาน วัตถุกันเสีย และสีผสมอาหาร ในตัวอย่างเครื่องดื่มได้จริง

งานวิจัยของ วาสิก และคณะ (Wasik; McCourt; & Buchgraber. 2007: 187-196) ในปี ค.ศ. 2007 ทำการวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสารให้ความหวาน 9 ชนิด ได้แก่ อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แอสพาร์แทม แซคคาริน อะลิเทม (alitame) กรดไซคลามิก (cyclamic acid) ดัลซิน (dulcin) นีโอแทม นีโอเฮสเปอริดีนไดไฮโดรชัลโซน (neohesperidine dihydrochalcone) และซูคราโลส ในตัวอย่างประเภทต่างๆ ได้แก่ น้ำอัดลม เครื่องดื่มไร้คาร์บอนेट น้ำผลไม้กระป๋อง น้ำผลไม้บรรจุขวด และโยเกิร์ต ทำการเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (solid-phase extraction) และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 3 mm, 5 μm) ทำการวิเคราะห์ในระบบเกรเดียนต์ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ไตรเอตทิลามีนฟอสเฟต (pH 4.5) ผสมกับเมทานอลและอะซิโตน ในอัตราส่วนร้อยละ 24:69:7 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1 และอัตราส่วนร้อยละ 82:11:7 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดการกระเจิงแสง (evaporative light scattering detector) พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 25 นาที มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 12.5-2000 ไมโครกรัมต่อกรัม ($R > 0.98$) มีร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 93-109 และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ 15 ไมโครกรัมต่อกรัม

ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 หยาง และเฉิน (Yang; & Chen. 2009: 3022-3027) ได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสารให้ความหวาน 8 ชนิด ได้แก่ แอสพาร์แทม แซคคาริน อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม นีโอแทม ซูคราโลส อะลิเทม ไซคลาเมต (cyclamate) และสตีวิโอไซด์ (stevioside) แบบพร้อมกันหลายชนิด ในตัวอย่างประเภทต่างๆ ได้แก่ ไวน์ เบียร์ น้ำส้ม น้ำแอปเปิ้ล น้ำชาสมุนไพร ผลไม้กระป๋อง และเค้ก โดยมีคอลัมน์ C18 (250 mm × 4.5 mm, 5 μm) เป็นวัฏภาคคงที่ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารผสมที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ไตรเอตทิลามีนฟอสเฟตผสมกับเมทานอลและอะซิโตน ในอัตราส่วนร้อยละ 24:69:7 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1 และอัตราส่วนร้อยละ 82:11:7 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี ผลการทดลองพบว่ามีความร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 95.4-104.3 เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงของแอสพาร์แทม แซคคาริน อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม นีโอแทม ซูคราโลส อะลิเทม ไซคลาเมต และสตีวิโอไซด์อยู่ในช่วง 0.20-20.0, 0.05-5.00, 0.10-5.0, 0.10-10.0, 0.30-30.0, 0.08-8.00, 0.05-5.00 และ

0.50-15.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ($R^2 > 0.998$) และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดสารให้ความหวานทั้ง 8 ชนิดได้น้อยกว่า 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปี ค.ศ. 2011 กฤตสุนันท์กุล และจักรมณี (Kritsunankul; & Jakmune. 2011: 1342-1349) ได้ทำการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติด้วยการแยกสารผ่านเยื่อ (dialysis) และใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับวิเคราะห์ปริมาณวัตถุเจือปนในอาหาร 5 ชนิดแบบพร้อมกัน ได้แก่ อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก ในตัวอย่างเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์และอาหารเหลว โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระบบไอโซครีติกโดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ สารละลายผสมระหว่างแอซีโตไนไตรล์ เมทานอล และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.025 โมลาร์ (pH 3.75) ในอัตราส่วนร้อยละ 5:30:65 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร จากผลการทดลองพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 14 นาที อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียมและแซคคารินมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10-100 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดเบนโซอิกมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10-250 มิลลิกรัมต่อลิตร คาเฟอีนและกรดซอร์บิกมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ($R^2 \geq 0.9979$) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกเท่ากับ 0.1, 0.1, 0.3, 1.8 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ วิธีนี้มีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 80-138 และมีค่าความเที่ยงที่ดีแสดงในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) น้อยกว่า 5 วิธีการวิเคราะห์นี้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างจริง และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น

ในปี ค.ศ. 2012 ซิค (Sik. 2012: 1443-1452) ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ในตัวอย่างเครื่องดื่ม โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเคมีสีเขียว (green chemistry) ด้วยการใช้ตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ เอทานอล ในวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งประกอบด้วยสารละลายผสมระหว่างเอทานอลกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.0125 โมลาร์ (pH 3.5) ในอัตราส่วนร้อยละ 20:80 โดยปริมาตร และใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 225, 217, 217 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ วิธีการเตรียมตัวอย่างคือนำตัวอย่างมาทำการซินเคท และเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.0125 โมลาร์ (pH 3.5) ก่อนนำไปวิเคราะห์ จากผลการทดลองพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 15 นาที สารทั้ง 4 ชนิดมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงเดียวกันคือ 1.5-24 มิลลิกรัมต่อลิตร ($R^2 \geq 0.999$) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 0.011-0.024 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีนี้มีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.40-100.25 และมีค่าความเที่ยงแสดงในรูปของร้อยละ

ของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) อยู่ในช่วง 0.44-1.61 เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ในตัวอย่างเครื่องดื่มพบว่าปริมาณสารให้ความหวานที่พบในตัวอย่างอยู่ในช่วง 25.47-409.92 มิลลิกรัมต่อลิตรและปริมาณคาเฟอีนที่พบในตัวอย่างอยู่ในช่วง 63.57-127.72 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีเดิมซึ่งใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดแอซีโตไนไตรล์ในวัฏภาคเคลื่อนที่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผู้วิจัยจึงสรุปว่าสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มได้จริง และเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว และปลอดภัยอีกด้วย

ในปี 2012 เกรมเบคก้า และซีเฟอร์ (Grembecka; & Szefer. 2012: 1010-1017) ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนและแอสพาร์แทมแบบพร้อมกันในตัวอย่างอาหารเสริมและเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลต-ไดโอดอาร์เรย์ (ultraviolet-diode array detector: UV-DAD) ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ชนิด C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างแอซีโตไนไตรล์กับน้ำ ในอัตราส่วนร้อยละ 15:85 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที คาเฟอีนมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 62 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และแอสพาร์แทมมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 43 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีนี้มีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.3-100.0 และมีค่าความเที่ยงแสดงในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) อยู่ในช่วง 0.09-1.12 วิธีการวิเคราะห์นี้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างจริงได้ง่าย และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น

ในปี ค.ศ. 2015 ออร์โดเนซ และคณะ (Ordoñez; et al. 2015: 162-168) ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวานพร้อมกัน 9 ชนิด ได้แก่ อะซิซัลเฟม อะลิเทม แอสพาร์แทม ไซคลาเมต นิโอเทม นิโอเอสเปอริดีน ไดไฮโดรซาลิไซน แซคคาริน ซูคราโลส และสตีวียอไซด์ ในตัวอย่างเครื่องดื่ม โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเคมีสีเขียว ด้วยการใช่วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ น้ำและเอทานอล และตรวจวัดด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ กระบวนการแยกเกิดขึ้นในคอลัมน์ชนิด Shodex C18 ขนาด 150 mm × 3.0 mm, 4 μm (100 Å) ทำการวิเคราะห์ในระบบเกรเดียนท์ ใช้สารละลายผสมระหว่างน้ำและแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1 และใช้สารละลายผสมระหว่างเอทานอลและแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 ที่อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการแยกสารผสม 23 นาที มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 86-110 มีค่าความเที่ยงแสดงในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) น้อยกว่า 12 และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ 0.05-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.1.2 เทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี

ในปี ค.ศ. 2001 เฉิน และหวาง (Chen; & Wang. 2001: 57–64) ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน ได้แก่ แซคคาริน แอสพาร์แทม อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม วัตถุกันเสีย ได้แก่ กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก พร้อมกันกับสารจำพวกคาเฟอีน ทีโอโบรมีน และทีโอฟีลลีน ในตัวอย่างอาหาร ได้แก่ น้ำอัดลมโคล่า น้ำผลไม้ นมเปรี้ยว ผลไม้หมักดอง และยาเม็ด ด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ชนิดที่มีการแลกเปลี่ยนไอออนลบ (ยี่ห้อ Shim-pack IC-A3, 150 mm × 4.6 mm, 5 μ m) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 8.20) ต่อแอซีโตนไตรล์ ในอัตราส่วนร้อยละ 96:4 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 205 และ 227 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่า ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 45 นาที โดยแซคคารินมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแอสพาร์แทม อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิกมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 1-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คาเฟอีน ทีโอโบรมีน และทีโอฟีลลีนมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.25-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2 > 0.9982$) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในตรวจวัดในตัวอย่างได้จริงโดยมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 85-104

ในปี ค.ศ. 2005 จู และคณะ (Zhu; et al. 2005: 143-146) ทำการพัฒนาเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟีสำหรับการแยกและตรวจวิเคราะห์หาสารให้ความหวาน 4 ชนิด ได้แก่ แอสพาร์แทม ไซคลาเมต อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม และแซคคาริน ในตัวอย่างเครื่องดื่มและผลไม้ดอง โดยตรวจวัดด้วยการวัดการนำไฟฟ้า (conductivity detection) ใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่อัตราการไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการชะสารที่ต้องการวิเคราะห์ ออกจากคอลัมน์ชนิดที่มีการแลกเปลี่ยนไอออนลบ (ยี่ห้อ Ionpac AS11, 250 mm × 2 mm) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเนื่องจากโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ให้สัญญาณการนำไฟฟ้าต่ำ จึงทำให้สามารถเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์หาสารให้ความหวานเหล่านี้ได้ อีกทั้งยังสามารถตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างจริงได้ โดยพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 11 นาที ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของแอสพาร์แทม ไซคลาเมต อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม และแซคคาริน เท่ากับ 0.87, 0.032, 0.019 และ 0.045 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.23-105.42, 99.48-103.57, 97.96-103.23 และ 98.46-102.40 ตามลำดับ

4.2 เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ในปี ค.ศ. 2000 หลิน และคณะ (Lin; et al. 2000: 345-352) ทำการพัฒนานิววิธีวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน 4 ชนิด ได้แก่ ดัลซิน แอสพาร์แทม แซคคาริน อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม และวัตกุกันเสียบ 9 ชนิด ได้แก่ กรดซอร์บิก กรดเบนโซอิก โซเดียมดีไฮโดรอะซิเตต (sodium dehydroacetate) เมทิลพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอต (methyl-*p*-hydroxybenzoate) เอทิลพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอต (ethyl-*p*-hydroxybenzoate) โพรพิลพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอต (propyl-*p*-hydroxybenzoate) ไอโซโพรพิลพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอต (isopropyl-*p*-hydroxybenzoate) บิวทิลพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอต (butyl-*p*-hydroxybenzoate) และไอโซบิวทิลพารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอต (isobutyl-*p*-hydroxybenzoate) แบบพร้อมกันในตัวอย่างผลไม้หมักดอง โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไมเซลล์ลารีอิเล็กโทรโครมาโทกราฟี (micellar electrokinetic capillary chromatography: MEKC) ใช้คอลัมน์แคปิลลารีความยาว 57 เซนติเมตร และใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมดีออกซีโคเลตเข้มข้น 0.05 โมลาร์, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์, โซเดียมเตตระโบเรตเข้มข้น 0.01 โมลาร์ (pH 8.6) และ 5% แอซีโตไนไตรล์ เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร จากผลการทดลองพบว่ามีความไวต่อการคืนกลับประมาณ 90 และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 10-25 ไมโครกรัมต่อกรัม

ในปี ค.ศ. 2011 เบร์กาโม และคณะ (Bergamo; Fracassi da Silva; & de Jesus. 2011: 1714-1717) ทำการวิเคราะห์ปริมาณแอสพาร์แทม ไซคลาเมต แซคคาริน และอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม ในตัวอย่างเครื่องดื่มประเภทที่ไม่มีแอลกอฮอล์และผลิตภัณฑ์สารให้ความหวานปรุงรสบนโต๊ะอาหาร ด้วยเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ตรวจวัดด้วยการวัดการนำไฟฟ้าแบบไม่สัมผัส (contactless conductivity detection: C⁴D) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน (tris(hydroxymethyl) aminomethane) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์และสารละลายฮิสทิดีนเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ การแยกเกิดขึ้นภายในคอลัมน์แคปิลลารียาว 70 เซนติเมตรที่ศักย์ไฟฟ้า 30 กิโลโวลต์ จากผลการทดลองพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 6 นาที โดยให้ความเป็นเส้นตรงของแอสพาร์แทม ไซคลาเมต แซคคาริน และอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียมในช่วง 20-100, 40-200, 20-60 และ 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ($R^2 > 0.994$) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดในตัวอย่างได้จริงโดยมีความไวต่อการคืนกลับอยู่ในช่วง 94-108 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 1.4-4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าความเที่ยงแสดงในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) เท่ากับ 1.5-6.5

4.3 เทคนิคโพลินเจกชันโครมาโทกราฟี

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำเทคนิคโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีมาใช้ในการวิเคราะห์แยกกลุ่มสารให้ความหวานและคาเฟอีนแบบพร้อมกัน มีเพียง 2 งานวิจัยเท่านั้น รายละเอียดดังนี้

ในปี ค.ศ. 2007 การ์เซีย-จีเมเนซ และคณะ (García-Jiménez; Valencia; & Capitán-Vallvey. 2007: 226-233) ได้พัฒนาเทคนิคโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีที่มีมอดโนลิทิกคอลัมน์ชนิด C18 (5 mm × 4.6 mm i.d.) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ โพรพิลแกลเลต (propylgallate) บิวทิลไฮดรอกซีอะนิโซล (butylhydroxyanisole) วัตถุกันเสีย ได้แก่ เมทิลพาราเบน (methylparaben) เอทิลพาราเบน (ethylparaben) โพรพิลพาราเบน (propylparaben) บิวทิลพาราเบน (butylparaben) และกลุ่มสารให้ความหวาน ได้แก่ แอสพาร์แทม อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน ในตัวอย่างอาหารและเครื่องสำอาง การแยกทำภายใต้ระบบเกรเดียนต์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ชนิดคือ สารละลายผสมระหว่างแอซีโตไนโตริลต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 6.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 4 ต่อ 96 โดยปริมาตร และสารละลายผสมระหว่างเมทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วนร้อยละ 30 ต่อ 70 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 3.5 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร จากผลการทดลองพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 7 นาที มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.94-45.0, 0.03-45.0 และ 2.43-80.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับ แอสพาร์แทม อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม และแซคคาริน ตามลำดับ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของแอสพาร์แทม อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม และแซคคารินเท่ากับ 0.32, 0.01 และ 0.73 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยวิธีนี้มีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 86.5-105.5 เมื่อนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำอัดลม พบสารให้ความหวานอยู่ในช่วง 66.0-253.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ยังคงไม่สามารถแยกสารให้ความหวานชนิดอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม และแซคคารินออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์

ในปี ค.ศ. 2012 ซานโตส และเรนเจล (Santos; & Rangel. 2012: 57-63) ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเมทิลแซนทีน (methylxanthines) ได้แก่ ทีโอโบรมีน (theobromine) ทีโอฟีลลีน (theophylline) และคาเฟอีนในตัวอย่างกาแฟ ด้วยเทคนิคโพลินเจกชันโครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ชนิดมอดโนลิทิก ขนาด 10 mm × 4.6 mm วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ สารละลายผสมระหว่างแอซีโตไนโตริลต่อน้ำในอัตราส่วนร้อยละ 2:98 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.85 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 273 นาโนเมตร พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 7 นาที โดยสามารถแยกสารทั้ง 3 ชนิด ออกจากกันได้สมบูรณ์ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 10^{-6}

10^{-5} โมลาร์ สามารถตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างจริงได้และมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 94.7-102.0 และเมื่อเปรียบเทียบผลจากการวิเคราะห์กับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาเทคนิคโฟลอินเจคชันโครมาโทกราฟี ที่มีการใช้คอลัมน์ขนาดเล็กที่ภายในบรรจุวัสดุภาคคงที่ชนิดที่เป็นอนุภาคทรงกลม ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่มีอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ และมีราคาถูกกว่าคอลัมน์ชนิดมอโนลิธิกมาก สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวานชนิดที่ไม่ให้พลังงานและคาเฟอีนแบบพร้อมกันในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มอัดลม น้ำหวานกลิ่นผลไม้ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยมุ่งเน้นการแก้ปัญหาจากงานวิจัยของการีเซีย-จีเมเนส และคณะที่ยังไม่สามารถแยกอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมและแซคคารินออกจากกันได้ เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่แยกสารให้ความหวานแบบพร้อมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งสามารถตรวจวิเคราะห์คาเฟอีนพร้อมกันได้อีกด้วย ซึ่งยังไม่พบการรายงานวิธีวิเคราะห์สารให้ความหวาน และคาเฟอีนแบบพร้อมกันในระบบโฟลอินเจคชันโครมาโทกราฟี อีกทั้งยังได้เทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้เครื่องมือขนาดเล็ก ราคาถูก สามารถวิเคราะห์สารได้รวดเร็ว ใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อย มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ โดยยังคงความแม่นยำ และถูกต้อง ประสิทธิภาพการแยกที่ดี ไม่แตกต่างจากการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งเป็นเทคนิคที่ค่าใช้จ่ายสูง โดยเฉพาะราคาของคอลัมน์ อีกทั้งยังใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในปริมาณมาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เครื่องมือมีขนาดใหญ่ ทำให้ไม่เหมาะกับการนำไปตรวจวิเคราะห์ภาคสนามอีกด้วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการแยกสารให้ความหวานและคาเฟอีนแบบพร้อมกัน ด้วยเทคนิคโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก
3. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น
4. การวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีน ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ (Diode array) พร้อมด้วย sample loop ขนาด 20 ไมโครลิตร รุ่น HPLC-1260 จากบริษัท Agilent
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-2450 จากบริษัท Shimadzu
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-1000 จากบริษัท Thermo separation
- เครื่องแปลงสัญญาณ รุ่น PC710 และซอฟต์แวร์ รุ่น 1.11 จากบริษัท Sanwa
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน รุ่น Labostar จากบริษัท Siemens
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น MS204S จากบริษัท Mettler Toledo
- เครื่องวัด pH รุ่น MP 220 pH meter จากบริษัท Mettler Toledo
- เครื่องอัลตราโซนิก รุ่น ME 5.5S จากบริษัท Mettler Electronics corp.
- คอลัมน์ชนิด C18 (Security Guard Cartridge, 8.0 × 3.0 mm i.d., 3 µm) จากบริษัท Phenomenex
- คอลัมน์ชนิด C18 (VertiSep™ GES C18, 150 × 4.6 mm i.d., 5 µm) จากบริษัท Vertical และการ์ดคอลัมน์ชนิด C18 (Analytical Guard Column, 12.5 × 4.6 mm i.d., 5 µm) จากบริษัท Agilent
- เข็มฉีดยาสารตัวอย่าง ขนาด 100 ไมโครลิตร จากบริษัท Exmire Microsyringe
- หลอดฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร จากบริษัท Nipro
- อุปกรณ์กรองสารตัวอย่าง ชนิดไนลอน ขนาด 0.22 ไมครอน จากบริษัท Lubitech

- ชุดกรองวิทยาศาสตร์เคลื่อนที่ จากบริษัท Kimble Chase
- แผ่นกรองวิทยาศาสตร์เคลื่อนที่ ชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท Vertical
- เพอริสตาลติกปั๊ม จากบริษัท Ismatec
- วาล์วสำหรับเชื่อมต่อระบบแบบ 6 ทาง จากบริษัท Upchurch scientific
- วาล์วสำหรับเชื่อมต่อระบบแบบ 4 ทาง จากบริษัท Upchurch scientific
- ท่อพลาสติก ชนิดไทกอน (Tygon) ขนาด 0.95 mm จากบริษัท Ismatec
- ท่อพลาสติก ชนิดเทฟลอน (Teflon) ขนาด 1.0 mm จากบริษัท VICI

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- กรดแอสติก (99.8%) จากบริษัท QRèC
- คาเฟอีน จากบริษัท Sigma-Aldrich
- แซคคาริน จากบริษัท Sigma-Aldrich
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากบริษัท Carlo Erba
- ไทโอยูเรีย จากบริษัท Carlo Erba
- เมทานอล (HPLC grade) จากบริษัท Merck
- อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม จากบริษัท Sigma-Aldrich
- เอทานอล (AR grade) จากบริษัท QRèC
- แอซีโตไนไตรล์ (HPLC grade) จากบริษัท Merck
- แอมโมเนียมแอซีเตต จากบริษัท Ajax Finechem
- แอสพาร์แทม จากบริษัท Sigma-Aldrich

1.3 ผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

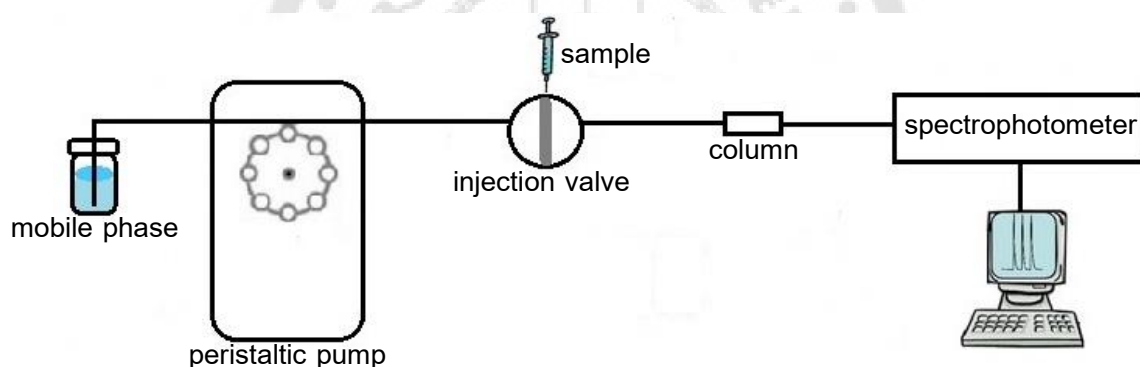
ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆที่มีวางจำหน่ายทั่วไป ตามท้องตลาด ประกอบด้วยน้ำอัดลม น้ำหวานกลิ่นผลไม้ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

2. วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการแยกสารให้ความหวานและคาเฟอีนแบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโพลินเจกซ์โครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก

1. การศึกษาและออกแบบระบบโพลินเจกซ์โครมาโทกราฟีที่ใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก

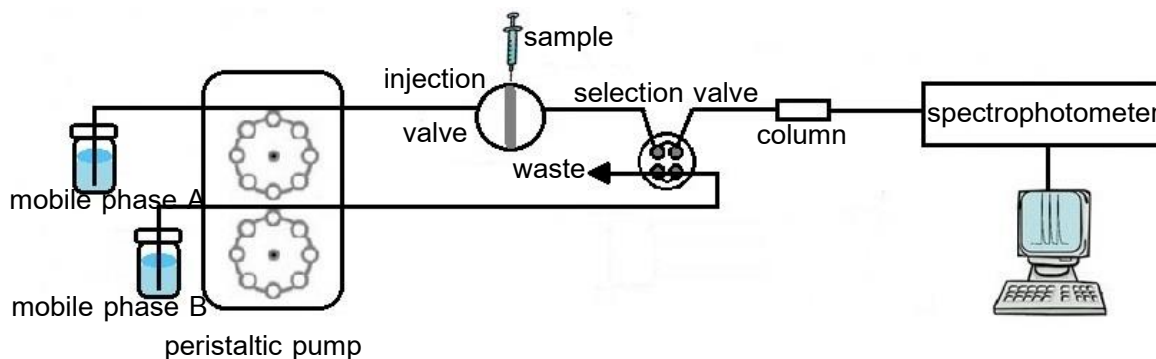
1.1 สร้างระบบโพลินเจกซ์โครมาโทกราฟีอย่างง่าย สำหรับใช้ในการแยกสารด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 ชนิด หรือระบบไอโซครติก ดังภาพประกอบ 8 ประกอบด้วยเพอร์ิสตาติคปั๊ม วาล์วสำหรับเชื่อมต่อระบบแบบ 6 ทาง (injection valve) สำหรับฉีดสารตัวอย่าง คอลัมน์ขนาดเล็ก ชนิด C18 (8.0×3.0 mm i.d., $3 \mu\text{m}$) สำหรับใช้ในการแยกสาร และเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สำหรับใช้ในการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง อุปกรณ์ในระบบทั้งหมดเชื่อมต่อด้วยท่อพลาสติกชนิด เทฟลอน โดยการทำงานของระบบนี้ใช้เพอร์ิสตาติคปั๊มเป็นตัวขับเคลื่อนพาวัฏภาคเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบผ่าน injection valve เพื่อพาที่อนตัวอย่างเข้าไปทำการแยกในคอลัมน์ และชะสารออกจากคอลัมน์เพื่อเข้าสู่ตัวตรวจวัด



ภาพประกอบ 8 ระบบโพลินเจกซ์โครมาโทกราฟีสำหรับระบบไอโซครติก

1.2 สร้างระบบโพลินเจกซ์โครมาโทกราฟี สำหรับใช้ในการแยกสารด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ชนิด หรือระบบเกรเดียนต์ ดังภาพประกอบ 9 ประกอบด้วยเพอร์ิสตาติคปั๊ม วาล์วสำหรับฉีดสารตัวอย่าง และวาล์วสำหรับเชื่อมต่อระบบแบบ 4 ทาง (selection valve) คอลัมน์ขนาดเล็ก ชนิด C18 (8.0×3.0 mm i.d., $3 \mu\text{m}$) และเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยอุปกรณ์ในระบบทั้งหมดเชื่อมต่อด้วยท่อพลาสติกชนิด เทฟลอน การทำงานของระบบนี้ เพอร์ิสตาติคปั๊มทำหน้าที่ในการขับเคลื่อนพาวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A เข้าสู่ระบบผ่าน injection valve เพื่อพาที่อนตัวอย่างเข้าไปทำการแยกในคอลัมน์ และชะสารกลุ่มแรกออกจากคอลัมน์เข้าสู่ตัวตรวจวัด จากนั้นที่เวลาที่เหมาะสมจึงหมุน

selection valve เพื่อเปลี่ยนทิศทางการไหลให้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B เข้าสู่คอลัมน์เพื่อชะสารที่เหลือออกจากคอลัมน์แล้วเข้าสู่ตัวตรวจวัด



ภาพประกอบ 9 ระบบฟลูอิดอินเจคชันโครมาโทกราฟีสำหรับระบบเกรเดียนต์

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารให้ความหวาน 3 ชนิด และคาเฟอีนแบบพร้อมกัน

2.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัด

2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ตัวทำละลายคือน้ำปราศจากไอออน

2.1.2 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 190 - 800 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานในข้อ 2.1.1 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และบันทึกสเปกตรัม

2.1.3 เลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวัดสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีนแบบพร้อมกัน

2.2 ความเข้มข้นและค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแอสพาร์แทมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ตัวทำละลายคือสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต

2.2.2 ศึกษาความเข้มข้นและค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตซึ่งใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับการแยกสารมาตรฐานผสมในข้อ 2.2.1 โดยศึกษาในช่วงความเข้มข้น 2-50 มิลลิโมลาร์ และค่า pH 4-7 บนระบบการแยกแบบเกรเดียนต์ โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือ สารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตที่อัตราส่วนร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร

ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที วัฏภาคคงที่คือ คอลัมน์ชนิด C18 (8.0×3.0 mm i.d., 3 μ m) และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

2.2.3 บันทึกโครมาโทแกรมและเปรียบเทียบผลการแยกที่ได้ในแต่ละสภาวะ แล้วเลือกความเข้มข้นและค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตต ที่สามารถใช้แยกสาร ทั้ง 4 ชนิดแบบพร้อมกันได้

2.3 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแอสพาร์แทม ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็นตัวทำละลาย

2.3.2 เตรียมสารละลายผสมชนิดต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B ดังนี้

- สารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ในช่วงอัตราส่วนร้อยละ 6:94 ถึงร้อยละ 16:84 โดยปริมาตร
- สารละลายผสมระหว่างเอทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ในช่วงอัตราส่วนร้อยละ 2:98 ถึงร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร
- สารละลายผสมระหว่างเอซิโตไนโตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ในช่วงอัตราส่วนร้อยละ 4:96 ถึงร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร

2.3.3 นำวัฏภาคเคลื่อนที่ทั้งหมดมาศึกษาการแยกสารให้ความหวานและคาเฟอีน โดยใช้วัฏภาคคงที่คือ คอลัมน์ชนิด C18 (8.0×3.0 mm i.d., 3 μ m) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือสารละลายในข้อ 2.3.2 ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

2.3.4 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B ชนิดต่างๆ เปรียบเทียบผลการแยกที่ได้ในแต่ละสภาวะ แล้วเลือกองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่สามารถแยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน พร้อมกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยพิจารณาจากค่าความสามารถในการแยก (resolution; R_s) ซึ่งคำนวณได้ดังสมการ 3.1

$$R_s = \frac{R_{t2} - R_{t1}}{1/2(W_1 + W_2)} \quad \dots\dots\dots (3.1)$$

เมื่อ R_{t2} และ R_{t1} คือ เวลาการคงอยู่ของพีคหลังและพีคหน้า

W_1 และ W_2 คือ ความกว้างพื้นฐานของพีคหน้าและพีคหลัง

2.4 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอะซีลฟีล-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแอสพาร์แทม ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0)

2.4.2 เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ชนิด ประกอบด้วย

- วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0)

- วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือสารละลายผสมระหว่างแอสซีไนด์ไนโตรลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตร

2.4.3 ทำการแยกสารมาตรฐานผสมของอะซีลฟีล-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ที่อัตราการไหลในช่วง 0.20-0.70 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ระบบเกรเดียนต์ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A และ B และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

2.4.4 บันทึกโครมาโทแกรมที่แต่ละอัตราการไหล และเลือกอัตราการไหลที่สามารถวิเคราะห์ได้เร็วที่สุด โดยยังคงประสิทธิภาพการแยกที่ดีและไม่ส่งผลเสียต่ออุปกรณ์ในระบบ

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

1. ช่วงความเป็นเส้นตรง

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอะซีลฟีล-โพแทสเซียมในช่วงความเข้มข้น 0.50-200 มิลลิกรัมต่อลิตร แซคคารินในช่วงความเข้มข้น 0.10-80 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสพาร์แทมในช่วงความเข้มข้น 0.50-220 มิลลิกรัมต่อลิตร และคาเฟอีนในช่วงความเข้มข้น 0.10-25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็นตัวทำละลาย

1.2 นำสารละลายมาตรฐานผสมของอะซีลเฟม-โพแทสเซียม แอสพาร์แทม แซคคาริน และคาเฟอีน ในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา มาทำการแยกในสภาวะที่เหมาะสม พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม โดยทำการฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

1.3 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

2. ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานอะซีลเฟม-โพแทสเซียม แอสพาร์แทม แซคคาริน และคาเฟอีน ที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในขวดวัดปริมาตรโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็นตัวทำละลาย

2.2 นำสารละลายข้อ 2.1 มาเจือจางและทดลองฉีดที่ความเข้มข้นต่างๆ พร้อมบันทึกโครมาโทแกรมโดยฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ทำการวิเคราะห์จนได้ความเข้มข้นที่มีสัดส่วนของสัญญาณความสูงต่อสัญญาณรบกวน (noise) เท่ากับ 3 และ 10 ซึ่งเป็นค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ตามลำดับ

3. ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

3.1 ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intraday precision)

3.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของสารทั้ง 4 ชนิดที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ความเข้มข้นของอะซีลเฟม-โพแทสเซียมเท่ากับ 1.00, 20.0 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของแซคคารินเท่ากับ 0.5, 5.0 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของแอสพาร์แทมเท่ากับ 1.00, 50.0 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของคาเฟอีนเท่ากับ 0.10, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0)

3.1.2 ฉีดสารมาตรฐานผสมที่แต่ละความเข้มข้น พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง

3.1.3 คำนวณค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation; %RSD) ของสัญญาณพื้นที่ใต้พีคและเวลาของการคงอยู่ (retention time; R_t) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

3.2 ความเที่ยงระหว่างวัน (interday precision)

3.2.1 เตรียมสารละลายตามข้อ 3.1.1 แล้วฉีดสารมาตรฐานพร้อมบันทึกโครมาโทแกรม เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่ทุกวัน

3.2.2 คำนวณค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสัญญาณพื้นที่ใต้พีคและเวลาของการคงอยู่ในระยะเวลา 5 วัน

4. ร้อยละของการคืนกลับ

4.1 นำตัวอย่างน้ำอัดลม น้ำหวานกลืนผลไม้ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแต่ละชนิด ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายมาตรฐานผสมอะซีลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 นำตัวอย่างน้ำอัดลมและน้ำหวานกลืนผลไม้ในข้อ 4.1 มาโซนิกเป็นระยะเวลา 10-20 นาที เพื่อไล่ฟองแก๊ส แล้วนำมาเจือจาง 100 เท่า ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) สำหรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในข้อ 4.1 นำมาเจือจาง 100 เท่า โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างทั้งหมดไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.22 ไมครอน

4.3 ฉีดสารตัวอย่าง พร้อมบันทึกโครมาโทแกรมและสัญญาณพื้นที่ใต้พีค ทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

4.4 คำนวณความเข้มข้นของสารมาตรฐานอะซีลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ที่เติมในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในวันเดียวกัน และคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีน ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1. นำตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำอัดลม และน้ำหวานกลืนผลไม้แต่ละชนิดปริมาณ 2.00 มิลลิลิตร มาโซนิกเป็นระยะเวลา 10-20 นาที

2. นำตัวอย่างเครื่องดื่มที่ผ่านการโซนิกแล้ว และตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมาเจือจาง 100 เท่า ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) แล้วนำไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.22 ไมครอน

3. ฉีดสารตัวอย่างโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นพร้อมบันทึกโครมาโทแกรมและสัญญาณพื้นที่ที่ได้พีค โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีนในแต่ละตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

4. นำสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2. มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้วิธีที่อ้างอิงดัดแปลงจากงานวิจัยของดีมีราเล และคณะ (Demiralay; Özkan; & Guzel-Seydim. 2006: 91-96) ซึ่งมีสภาวะการแยกดังต่อไปนี้

- วัฏภาคคงที่ คือ คอลัมน์ชนิด C18 (VertiSep™ GES C18, 150 × 4.6 mm i.d., 5 µm) จากบริษัท Vertical และการัดคอลัมน์ชนิด C18 (Analytical Guard Column, 12.5 × 4.6 mm i.d., 5 µm) จากบริษัท Agilent

- วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ สารละลายผสมระหว่างแอซีโตไนไตรล์กับสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 15:85 โดยปริมาตร

- อัตราการไหล คือ 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที

- ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของแอสพาร์แทม แซคคาริน และอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม ที่ความยาวคลื่น 203, 220 และ 230 นาโนเมตรตามลำดับ และตรวจวัดคาเฟอีนที่ความยาวคลื่น 273 นาโนเมตร

โดยฉีดแต่ละตัวอย่างพร้อมบันทึกโครมาโทแกรมและสัญญาณพื้นที่ที่ได้พีค โดยทำการทดลองซ้ำจำนวน 5 ครั้ง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีนในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

5. เปรียบเทียบปริมาณของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีนที่วิเคราะห์ได้จากการใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น (ข้อ 3.) และวิธีวิเคราะห์อ้างอิง (ข้อ 4.) โดยใช้สถิติ paired *t*-test

บทที่ 4

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีนแบบพร้อมกัน ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม ด้วยการใช้เทคนิคโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก โดยผู้วิจัยขอเสนอผลการวิจัยดังหัวข้อต่อไปนี้

ตอนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการแยกสารให้ความหวานและคาเฟอีนแบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

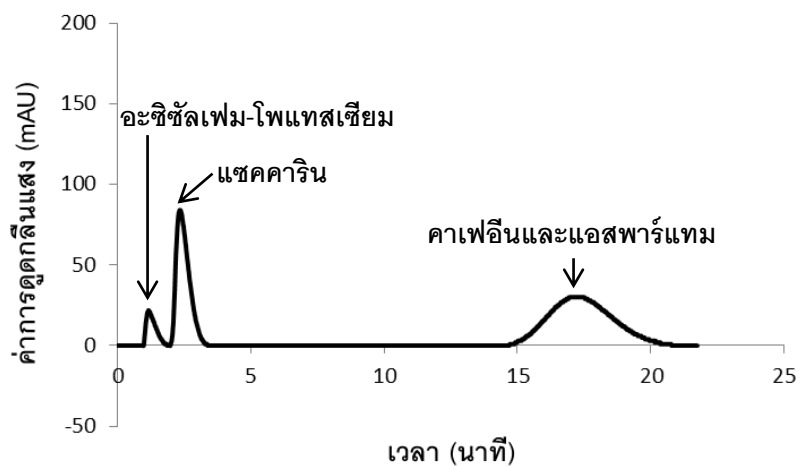
ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีน ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ตอนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการแยกสารให้ความหวานและคาเฟอีนแบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก

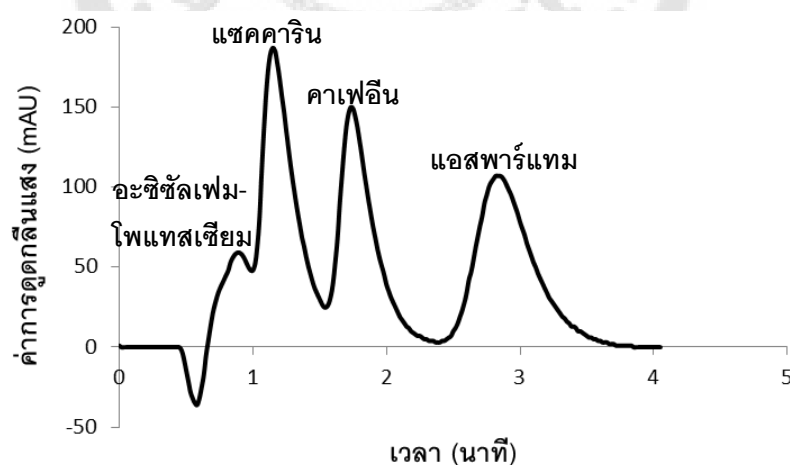
1. การศึกษาและออกแบบระบบโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีที่ใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก

จากการศึกษาเบื้องต้น เมื่อทดลองใช้ระบบไอโซครีติก (ภาพประกอบ 8) ในการแยกสารมาตรฐานผสมของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แตม และคาเฟอีน โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.48 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสามารถแยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม ($R_f = 1.11$ นาที) และแซคคาริน ($R_f = 2.31$ นาที) ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ แต่ไม่สามารถแยกคาเฟอีนและแอสพาร์แตม ($R_f = 16.97$ นาที) ได้ (ภาพประกอบ 10) อีกทั้งยังใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า 20 นาที เมื่อทำการเพิ่มความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยการเพิ่มปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์เข้าไปในระบบ เป็นสารละลายผสมระหว่างแอสโตไนโตรลต่อสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) อัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตร ซึ่งเป็นสภาวะที่ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของดีมีราเล และคณะ (Demiralay; Özkan; & Guzel-Seydim. 2006: 91-96) ได้โครมาโทแกรมแสดงดังภาพประกอบ 11 พบว่าเวลาที่ใช้ในการแยกสารทั้ง 4 ชนิดลดลง และสามารถแยกคาเฟอีน ($R_f = 1.69$ นาที) และแอสพาร์แตม ($R_f = 2.81$ นาที) ออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถแยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม ($R_f = 0.83$ นาที) และแซคคาริน ($R_f = 1.10$ นาที) ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ จึงเห็นได้ว่าระบบไอ

โครเมตที่ใช่วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดเดียวไม่เหมาะสำหรับการแยกสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีนแบบพร้อมกัน



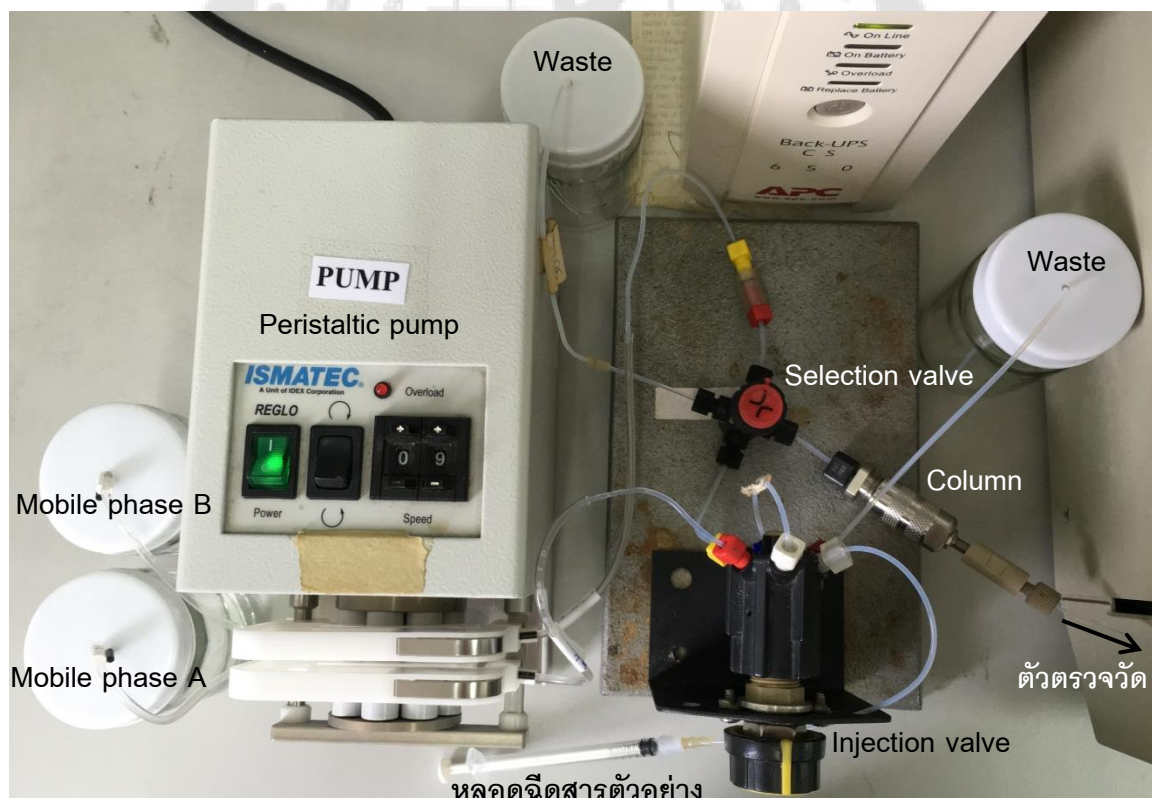
ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมของอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอสพาร์แทมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 × 3.0 mm i.d., 3 μ m) และใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ด้วยอัตราการไหล 0.48 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ 210 นาโนเมตร



ภาพประกอบ 11 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมของอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอสพาร์แทมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารละลายผสมระหว่างแอซีโตไนไตรล์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) อัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

ดังนั้นเพื่อให้สามารถวิเคราะห์สารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีนพร้อมกันได้ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ระบบการแยกเป็นระบบแบบเกรเดียนต์ที่มีการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ชนิด โดยระบบโพลินเจคชันโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็กที่ออกแบบและพัฒนาขึ้น แสดงดังภาพประกอบ 12 ประกอบด้วยอุปกรณ์ต่างๆ ดังนี้

- เพอร์ิสตาติคปั๊ม เป็นตัวขับเคลื่อนพาวัฏภาคเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ โดยต่อกับท่อพลาสติกชนิดไทกอนที่มีความยืดหยุ่น
- วาล์วสำหรับเชื่อมต่อระบบแบบ 6 ทาง ทำหน้าที่เป็น injection valve สำหรับฉีดสารตัวอย่าง โดยต่อกับ sample loop ปริมาตร 80 ไมโครลิตร
- วาล์วสำหรับเชื่อมต่อระบบแบบ 4 ทาง ทำหน้าที่เป็น selection valve ใช้สำหรับควบคุมทิศทางการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A และ B
- คอลัมน์ขนาดเล็ก ชนิด C18 (8.0×3.0 mm i.d., 3 μ m) สำหรับใช้ในการแยกสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีน
- สเปกโตรโฟโตมิเตอร์สำหรับการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง



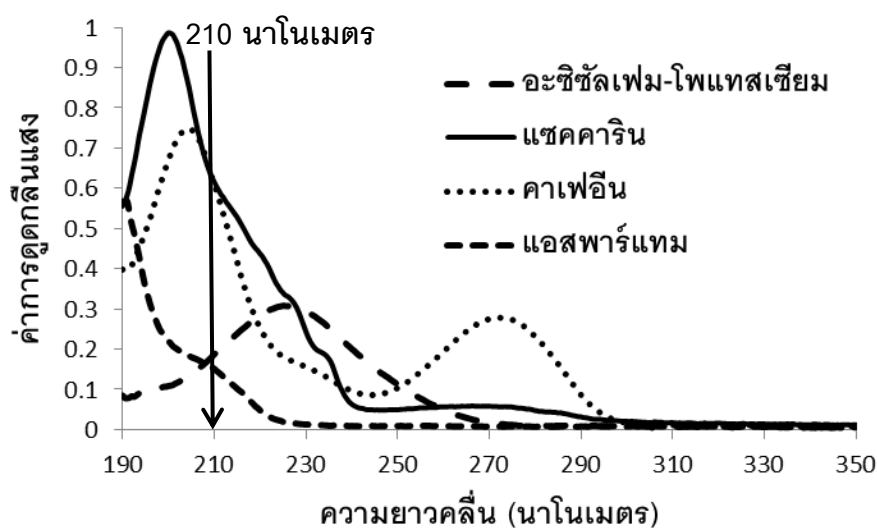
ภาพประกอบ 12 ภาพของระบบโพลินเจคชันโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้

อุปกรณ์ทั้งหมดที่ใช้ในระบบเชื่อมต่อด้วยท่อพลาสติกชนิดเทฟลอนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร โดยการทำงานของระบบเกรเดียนต์ที่พัฒนาขึ้นนี้ เริ่มต้นเพอริสตาติกปั๊มจะขับเคลื่อนพลาสมาเคลื่อนที่ชนิด A เข้าสู่ระบบผ่าน injection valve เพื่อพาพลาสมาตัวอย่างจาก sample loop เข้าไปทำการแยกสารกลุ่มแรกในคอลัมน์และผ่านเข้าสู่ตัวตรวจวัด จากนั้นจึงหมุน selection valve เพื่อให้พลาสมาเคลื่อนที่ชนิด B ขับเคลื่อนผ่าน selection valve เข้าสู่คอลัมน์เพื่อชะสารที่เหลือออกมาจากคอลัมน์แล้วเข้าสู่ตัวตรวจวัด โดยจากการทดสอบพบว่าระบบโฟลอินเจคชันโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถใช้งานได้จริง จึงนำระบบที่พัฒนาขึ้นมาศึกษาในลำดับต่อไป

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารให้ความหวาน 3 ชนิด และคาเฟอีนแบบพร้อมกัน

2.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัด

จากการทดลองนำสารมาตรฐานสารให้ความหวาน 3 ชนิด ได้แก่ อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน และแอสพาร์แทม รวมทั้งคาเฟอีน มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปีเพื่อเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีนแบบพร้อมกัน แสดงผลสเปกตรัมของสารทั้ง 4 ชนิด ดังภาพประกอบ 13 พบว่าอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียมมีความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด 225 นาโนเมตร แอสพาร์แทมมีความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด 200 นาโนเมตร แซคคารินมีความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด 200 นาโนเมตร และคาเฟอีนมีความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด 204 นาโนเมตร แต่เนื่องจากตัวตรวจวัดที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถตรวจวัดได้เพียงที่ละความยาวคลื่นเท่านั้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกความยาวคลื่นที่ 210 นาโนเมตร สำหรับใช้ในการตรวจวัดสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีนได้พร้อมกัน

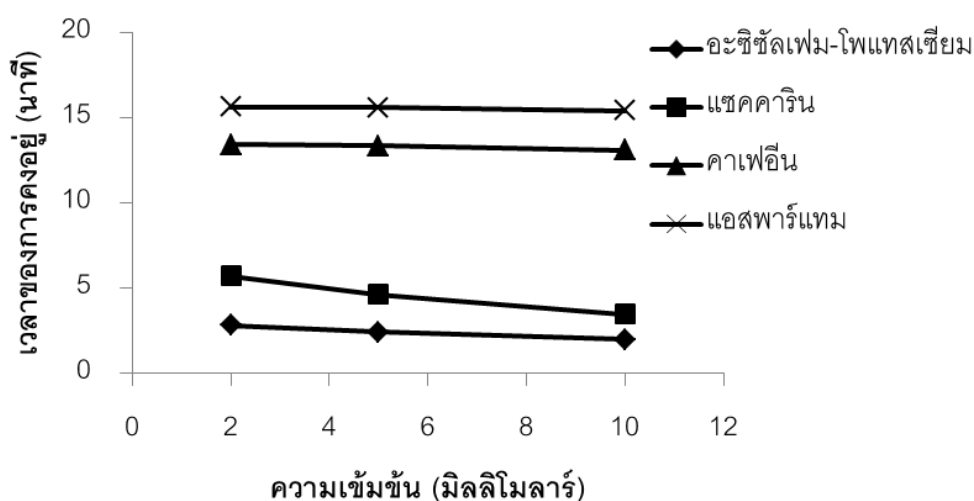


ภาพประกอบ 13 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน ริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 ความเข้มข้นและค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่

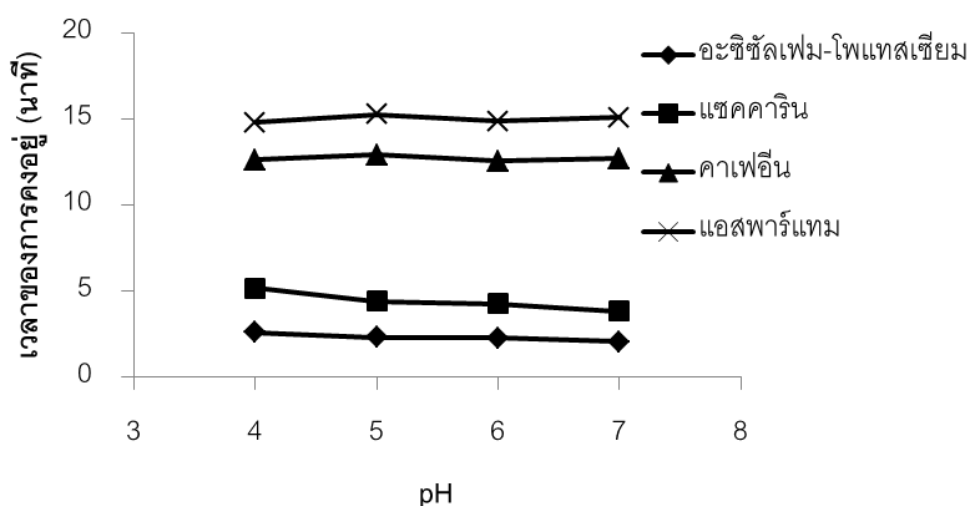
เมื่อนำระบบโพลินเจกชันโครมาโทกราฟีแบบเกรเดียนต์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการศึกษาความเข้มข้นและค่า pH ที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต สำหรับการแยกสารมาตรฐานผสมของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน โดยมีคอลัมน์ชนิด C18 (8.0 × 3.0 mm i.d., 3 μm) เป็นวัฏภาคคงที่ และมีวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือ สารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตที่อัตราส่วนร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 2-50 มิลลิโมลาร์ และช่วง pH เท่ากับ 4-7 ซึ่งอ้างอิงข้อมูลจากสภาวะการแยกที่เคยมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Demiralay; Özkan; & Guzel-Seydim. 2006: 91-96) ผลการทดลองในภาพประกอบ 14 แสดงผลของการแยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน และแอสพาร์แทมเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต (pH 4.0) ในช่วงความเข้มข้น 2-10 มิลลิโมลาร์ เห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวไม่ส่งผลต่อค่าเวลาการคงอยู่ของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม คาเฟอีน และแอสพาร์แทม แต่ส่งผลต่อค่าเวลาการคงอยู่ของแซคคารินเล็กน้อย โดยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ในขณะที่การใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ อะซิ

ซัลเฟม-โพแทสเซียมและแซคคารินจะออกมาในเวลาใกล้เคียงกัน ทำให้การแยกเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ และเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 10 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป พบว่าสัญญาณ baseline เกิดการ drift ตลอดเวลา ส่งผลให้ไม่สามารถแยกสารทั้ง 4 ชนิดออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เนื่องจากเป็นสภาวะที่สามารถแยกสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีนได้อย่างสมบูรณ์ โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็วที่สุด



ภาพประกอบ 14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต (pH 4.0) ในช่วงความเข้มข้น 2-10 มิลลิโมลาร์ และเวลาของการคงอยู่ของอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน และแอสพาร์แทม เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ B คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลต่อสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต (pH 4.0) อัตราส่วนร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที

เมื่อทำการศึกษาค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ สำหรับการแยกสารมาตรฐานผสม โดยศึกษาค่า pH ในช่วง 4-7 พบว่าค่า pH ที่ทำการศึกษาทุกค่า สามารถแยกอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ การเพิ่มค่า pH มากขึ้น ไม่ได้ส่งผลต่อค่าเวลาการคงอยู่ของสารให้ความหวานและคาเฟอีน (ภาพประกอบ 15) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกทำการวิเคราะห์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตต pH 4

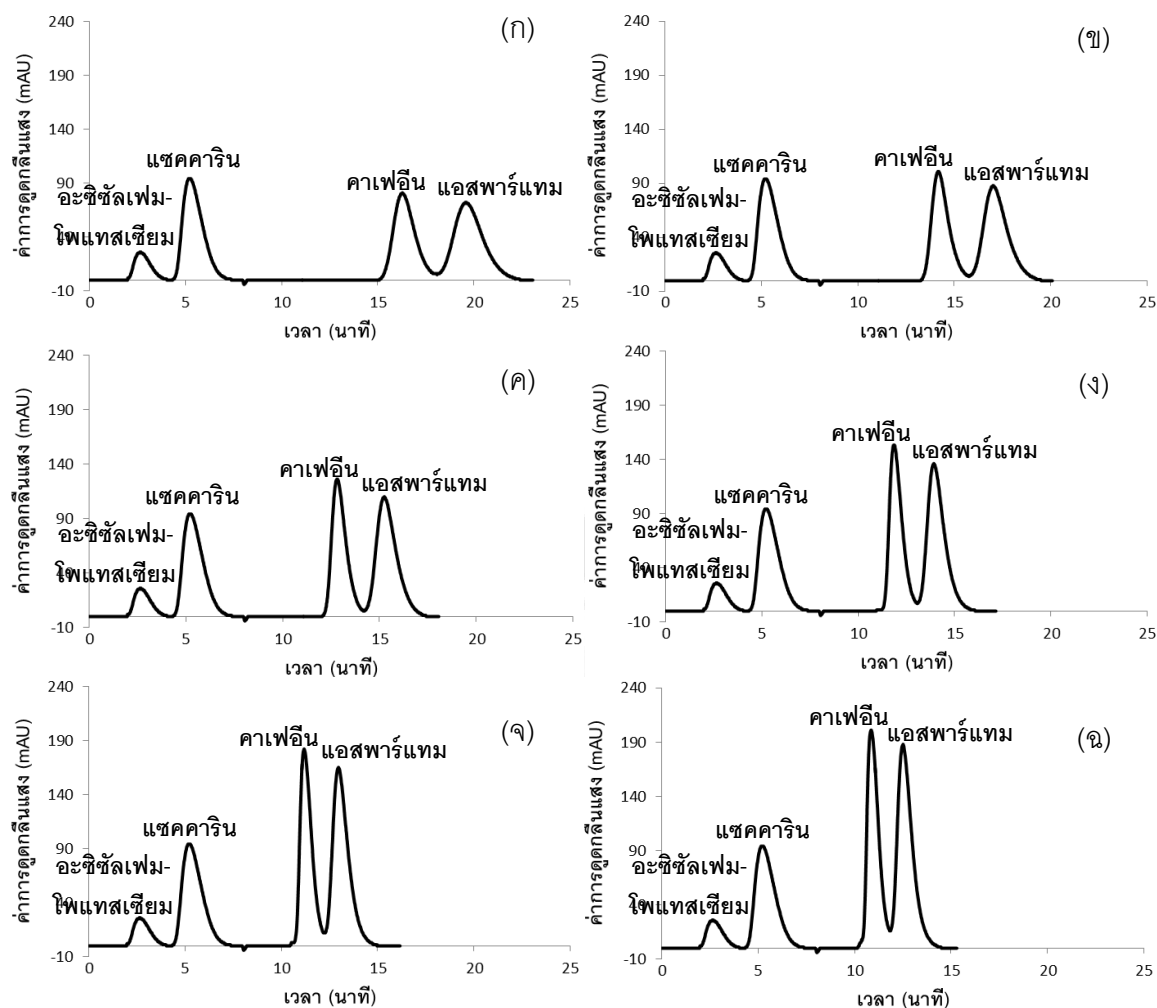


ภาพประกอบ 15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในช่วง pH 4-7 และเวลาของการคงอยู่ของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน และแอสพาร์แทม เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตต และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ B คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลต่อสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตต อัตราส่วนร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร

2.3 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าสามารถใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A เป็นสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ร้อยละ 100 โดยปริมาตร สำหรับแยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียมและแซคคารินได้ แต่ยังไม่สามารถแยกคาเฟอีนและแอสพาร์แทมออกจากกันได้ ดังภาพประกอบ 10 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาคู่ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B เพื่อใช้ในการแยกคาเฟอีนและแอสพาร์แทม โดยทำการศึกษาคู่ของตัวทำละลายอินทรีย์เปรียบเทียบกับ 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และแอสิตโตไนโตรล ที่อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์กับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) อัตราส่วนต่างๆ

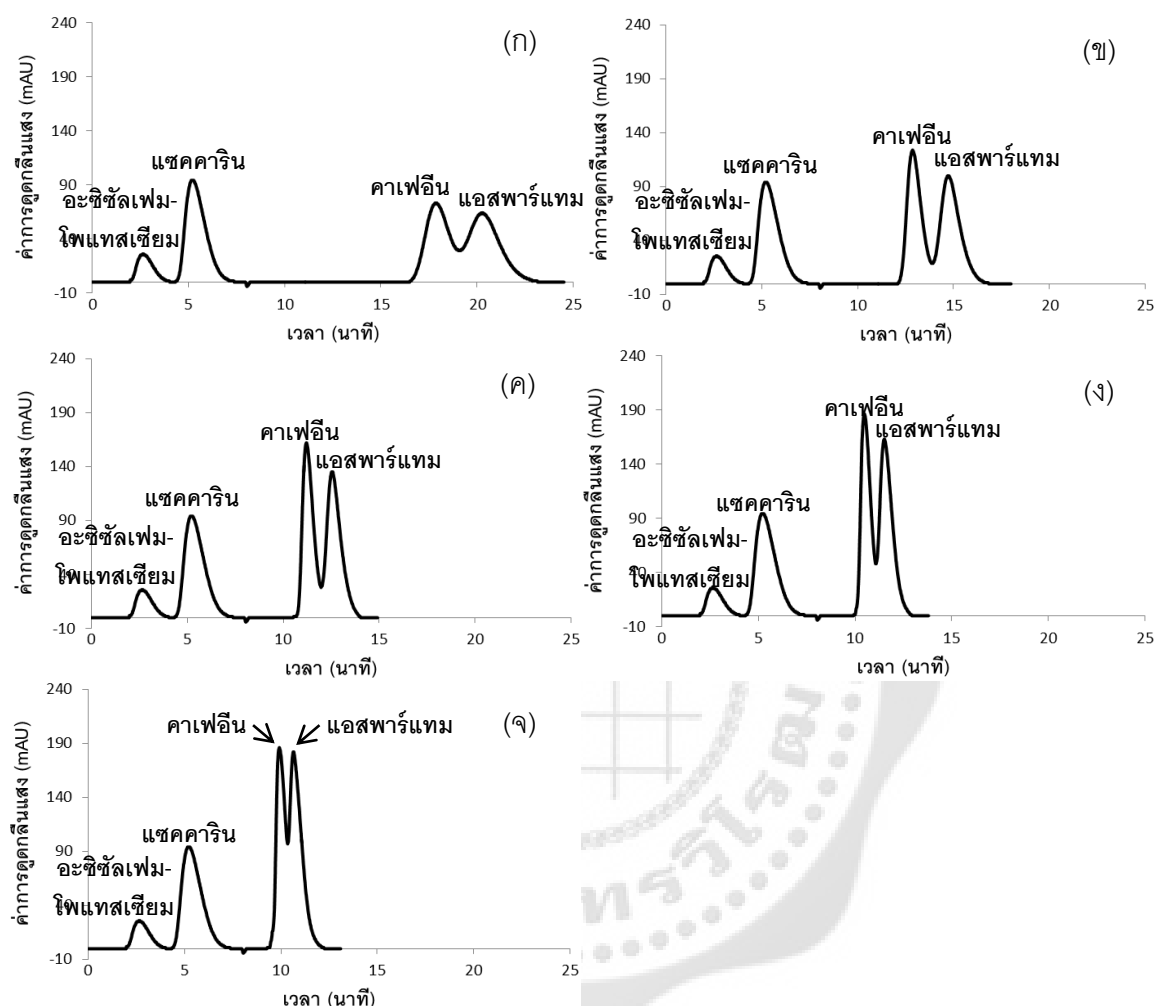
ผลการศึกษาเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ในช่วงอัตราส่วนร้อยละ 6:94 ถึงร้อยละ 16:84 โดยปริมาตร แสดงดังภาพประกอบ 16 พบว่าเมื่ออัตราส่วนของเมทานอลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เวลาการคงอยู่ของคาเฟอีนและแอสพาร์แทมมีค่าลดลง และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเมทานอลมากกว่าร้อยละ 10 โดยปริมาตร (ภาพประกอบ 16 ง-จ) พบว่าพีคของคาเฟอีนและแอสพาร์แทมเริ่มเกิดการซ้อนทับกันมากขึ้น (ค่า $R_s < 1.5$) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการแยกของคาเฟอีนและแอสพาร์แทมลดลง



ภาพประกอบ 16 โครมาโทแกรมของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีน เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอกซีเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอกซีเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (ก) 6:94 โดยปริมาตร (ข) 8:92 โดยปริมาตร (ค) 10:90 โดยปริมาตร (ง) 12:88 โดยปริมาตร (จ) 14:86 โดยปริมาตร และ (ฉ) 16:84 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที

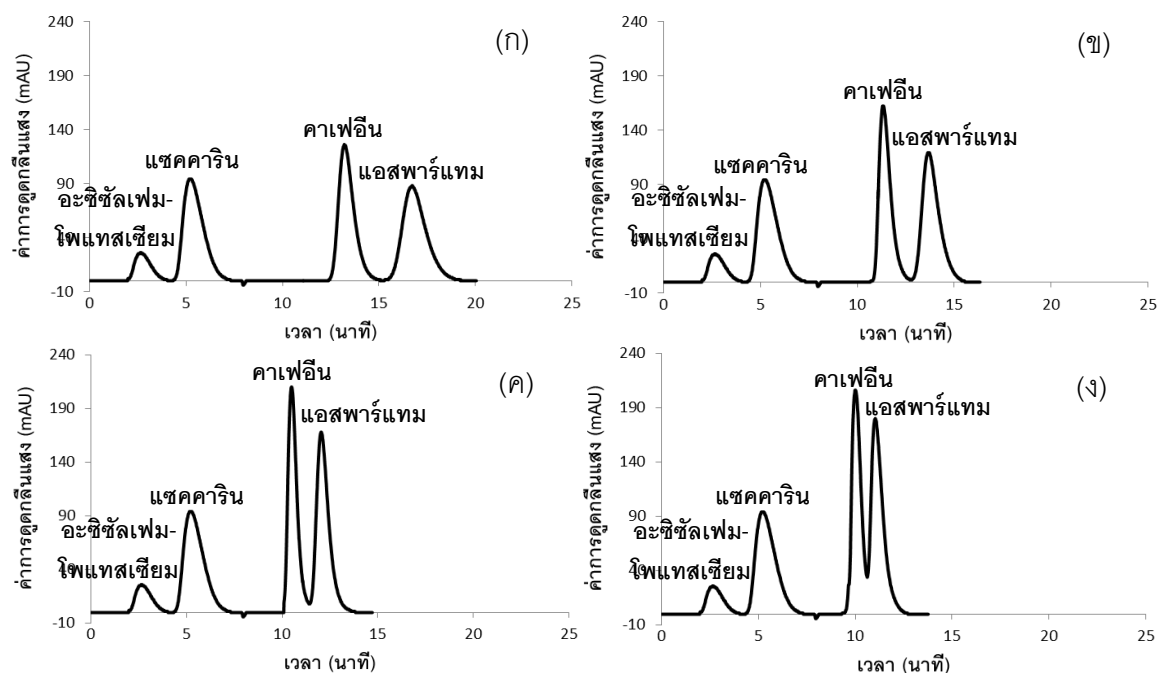
ผลการทดลองในภาพประกอบ 17 เป็นการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B โดยการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากเอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษต่ำ จึงนิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อให้ระบบการวิเคราะห์เป็นระบบเคมีสีเขียวมากขึ้น (Sik. 2012: 1443-1452) โดยทำการศึกษา ในช่วงอัตราส่วนร้อยละ 2:98 ถึงร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร ซึ่งพบว่าผลการแยกในทุกอัตราส่วนของเอทานอลที่ทำการศึกษา ไม่สามารถแยก

คาเฟอีนและแอสพาร์แทมได้ พีคของคาเฟอีนและแอสพาร์แทมเกิดการซ้อนทับกัน แม้ว่าจะใช้อัตราส่วนของเอทานอลเพียงร้อยละ 2 โดยปริมาตรเท่านั้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงไม่เลือกใช้เอทานอลในระบบของวิทยาการเคลื่อนที่ชนิด B



ภาพประกอบ 17 โครมาโทแกรมของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีน เมื่อใช้วิทยาการเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวิทยาการเคลื่อนที่ชนิด B คือสารละลายผสมระหว่างเอทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (ก) 2:98 โดยปริมาตร (ข) 4:96 โดยปริมาตร (ค) 6:94 โดยปริมาตร (ง) 8:92 โดยปริมาตร และ (จ) 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที

สำหรับการศึกษาองค์ประกอบของภูมิภาคเคลื่อนที่ชนิด B เมื่อใช้สารละลายผสมระหว่างแอสिटไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสिटเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ในช่วงอัตราส่วนร้อยละ 4:96 ถึงร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร แสดงดังภาพประกอบ 18 พบว่า เวลาของการคงอยู่ของคาเฟอีนและแอสพาร์แทมมีค่าลดลง เมื่ออัตราส่วนของแอสिटไนไตรล์เพิ่มขึ้น เนื่องจากความแรงของภูมิภาคเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนของแอสिटไนไตรล์มากกว่าร้อยละ 6 โดยปริมาตร (ภาพประกอบ 18 ค และ ง) ส่งผลให้ความสามารถในการแยกคาเฟอีนและแอสพาร์แทมลดลง (ค่า R_s น้อยกว่า 1.5) ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากโครมาโทแกรม จะเห็นได้ว่าสภาวะที่สามารถแยกสารทั้งสองได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาอันรวดเร็วที่สุดคืออัตราส่วนร้อยละ 6 ของแอสिटไนไตรล์ (ภาพประกอบ 18ข) ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเมทานอลที่อัตราส่วนร้อยละ 10 (ภาพประกอบ 16ค) ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดพบว่าลักษณะพีคของคาเฟอีนและแอสพาร์แทม เมื่อใช้แอสिटไนไตรล์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในภูมิภาคเคลื่อนที่ให้ลักษณะพีคที่แคบกว่าการใช้ตัวทำละลายเมทานอล อีกทั้งยังใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในอัตราส่วนที่น้อยกว่า ดังนั้นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการแยกที่ดี ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และลดปริมาณการใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ให้น้อยลง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายผสมระหว่างแอสिटไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสिटเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตร เป็นภูมิภาคเคลื่อนที่ B สำหรับใช้ในการแยกคาเฟอีนและแอสพาร์แทม โดยมีภูมิภาคเคลื่อนที่ A คือสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสिटเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) สำหรับแยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียมและแซคคาริน

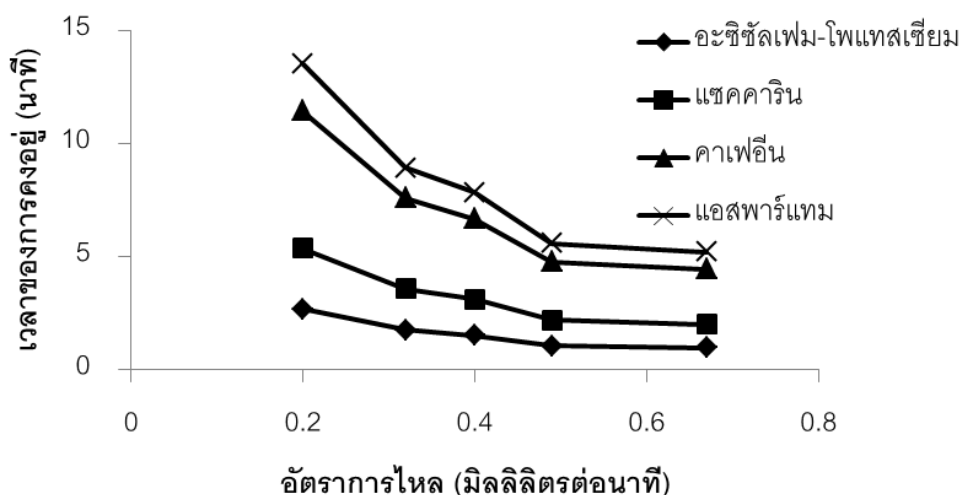


ภาพประกอบ 18 โครมาโทแกรมของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีน เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ B คือสารละลายผสมระหว่างแอสิตโดไนโตรลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (ก) 4:96 โดยปริมาตร (ข) 6:94 โดยปริมาตร (ค) 8:92 โดยปริมาตร และ (ง) 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที

2.4 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในระบบเกรเดียนต์ในช่วง 0.20 ถึง 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมของไซซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอสพาร์แทมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ B คือสารละลายผสมระหว่างแอสิตโดไนโตรลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตร สามารถรายงานผลในรูปความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่และเวลาของการคงอยู่ของสารทั้ง 4 ชนิด แสดงดังภาพประกอบ 19 จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ทำให้ระยะเวลาที่ไซซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน และแอสพาร์แทม อยู่ภายในคอลัมน์ลดลง ส่งผลให้เวลาของการคงอยู่ของสารเหล่านี้มีค่าลดลงตามลำดับ เมื่อพิจารณา

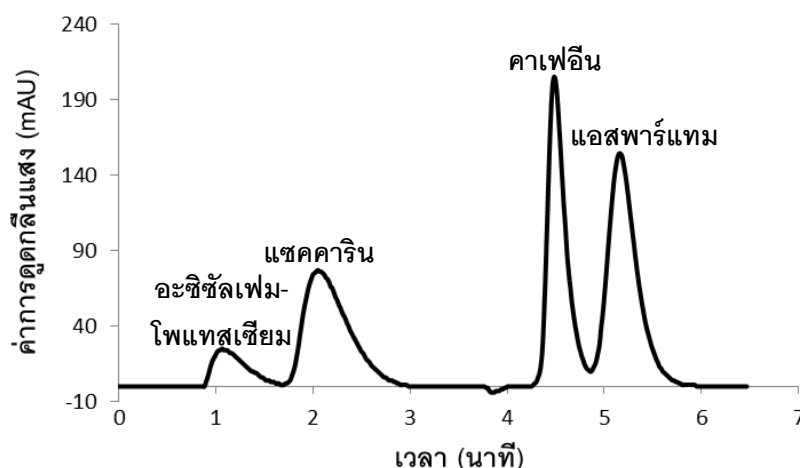
จากกราฟ เห็นได้ว่าที่อัตราการไหลมากกว่า 0.49 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาของการคงอยู่ของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีนมีค่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพในการแยกที่ดี และใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ที่อัตราการไหล 0.49 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับการวิเคราะห์สารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีนแบบพร้อมกัน โดยใช้เวลาในการแยกเพียง 6.00 นาทีต่อครั้งเท่านั้น



ภาพประกอบ 19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่และเวลาของการคงอยู่ของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แคลคาริน คาเฟอีน และแอสพาร์แทม เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือ สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ B คือสารละลายผสมระหว่างแอสิตไนด์ไนโตรลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตร

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีนแบบพร้อมกันด้วยระบบโฟลอินเจคชันโครมาโทกราฟีที่มีการใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 × 3.0 mm i.d., 3 μm) ที่พัฒนาขึ้น พบว่าระบบการแยกที่เหมาะสมคือการใช้ระบบเกรเดียนต์ โดยสามารถแยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียมและแคลคารินได้ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด A คือสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็นเวลา 3.2 นาที จากนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือสารละลายผสมระหว่างแอสิตไนด์ไนโตรลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตร เพื่อแยกคาเฟอีนและแอสพาร์แทม โดยควบคุมอัตราการไหลที่ 0.49 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ซึ่งได้แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมการวิเคราะห์สารมาตรฐานผสมของอะซิ

ซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอสพาร์แทมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังภาพประกอบ 20 พบว่าภายใต้สภาวะการแยกที่เหมาะสมดังกล่าว สามารถแยกอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม ($R_f = 1.02$ นาที) แซคคาริน ($R_f = 2.00$ นาที) คาเฟอีน ($R_f = 4.43$ นาที) และแอสพาร์แทม ($R_f = 5.11$ นาที) ออกจากกันได้เป็นอย่างดี โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 6.00 นาที มีค่า R_s ระหว่างอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมและแซคคาริน เท่ากับ 1.26 ค่า R_s ระหว่างคาเฟอีนและแอสพาร์แทมเท่ากับ 1.43 อีกทั้งยังคงมีประสิทธิภาพการแยกที่ดี เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, 1994) โดยมีค่า capacity factor ของอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีนเท่ากับ 0.69, 2.33, 7.03 และ 5.97 ตามลำดับ และค่า tailing factor เท่ากับ 1.75, 1.67, 0.92 และ 1.00 สำหรับพีคของอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีนตามลำดับ สำหรับสัญญาณที่ปรากฏด้านหน้าพีคของคาเฟอีนเป็นสัญญาณที่เกิดจากการสับ selection valve เพื่อเปลี่ยนมาใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด B ซึ่งไม่มีผลต่อความสามารถในการแยกสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีน และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้ระบบโฟลอินเจคชันโครมาโทกราฟีที่มีมอดูลิกคอลลัมน์ (ความยาว 5 มิลลิเมตร) เป็นวัฏภาคคงที่ (García-Jiménez; Valencia; & Capitán-Vallvey. 2007: 226-233) จะเห็นได้ว่าในงานวิจัยดังกล่าวใช้คอลลัมน์ที่มีราคาแพง และยังคงไม่สามารถแยกอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมและแซคคารินออกจากกันได้ ในขณะที่ระบบการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ สามารถแยกสารให้ความหวานทั้ง 2 ชนิดได้เป็นอย่างดี และใช้คอลลัมน์ที่มีราคาถูกกว่ามาก และถึงแม้ว่าจะมีรายงานวิจัยที่สามารถวิเคราะห์อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีน และแอสพาร์แทมได้ แต่ก็พบว่าเป็นระบบการวิเคราะห์ที่ต้องใช้คอลลัมน์ขนาดมาตรฐาน (ความยาว 25 เซนติเมตร) และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า 15 นาที อีกทั้งยังใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในระบบการวิเคราะห์มากกว่า (Sik. 2012: 1443-1452) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ให้น้อยลง สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำ อีกทั้งการใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ต่ำนี้สามารถช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ส่งผลให้ปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์ลดลง จึงเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้นอีกด้วย



ภาพประกอบ 20 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน คาเฟอีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอสพาร์แทมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0×3.0 mm i.d., 3 μ m) และสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 2

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

1. ช่วงความเป็นเส้นตรง

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์สารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีน โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียมในช่วงความเข้มข้น 0.50-200 มิลลิกรัมต่อลิตร แซคคารินในช่วงความเข้มข้น 0.10-80 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสพาร์แทมในช่วงความเข้มข้น 0.50-220 มิลลิกรัมต่อลิตร และคาเฟอีนในช่วงความเข้มข้น 0.10-25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากราฟมาตรฐานของสารทั้ง 4 ชนิด มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มากกว่า 0.998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (R^2 มากกว่า 0.995) ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

สารที่วิเคราะห์	ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์ สหสัมพันธ์ (R^2)
อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม	1.00 – 200	$y = 301.88x - 62.334$	0.9999
แซคคาริน	0.50 – 60	$y = 1348.3x + 159.86$	0.9995
แอสพาร์แทม	1.00 – 180	$y = 429.46x + 181.2$	0.9987
คาเฟอีน	0.10 – 20	$y = 1334.1x + 41.005$	0.9998

2. ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) โดยเลือกจากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่มีสัดส่วนสัญญาณของสารละลายมาตรฐานต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความไวที่ดี โดยมีค่า LOD และ LOQ ของสารทั้ง 4 ชนิดอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.03-0.30 และ 0.10-0.90 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตาราง 2)

ตาราง 2 ผลการศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

สารที่วิเคราะห์	LOD ^a (มิลลิกรัมต่อลิตร)	LOQ ^b (มิลลิกรัมต่อลิตร)
อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม	0.30	0.90
แซคคาริน	0.09	0.30
แอสพาร์แทม	0.20	0.70
คาเฟอีน	0.03	0.10

^aค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้

^bค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้

3. ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

จากการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ทั้งความเที่ยงภายในวันเดียวกันซึ่งทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 5 ครั้ง และความเที่ยงระหว่างวันซึ่งทำการวิเคราะห์ซ้ำเป็นระยะเวลา 5 วัน ต่อเนื่องกัน โดยทำการวิเคราะห์กับสารละลายมาตรฐานผสมของอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน

แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ของช่วงความเป็นเส้นตรง ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตาราง 3 ซึ่งรายงานเป็นค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงที่ดี มีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีคและเวลาของการคงอยู่ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของสารทั้ง 4 ชนิดน้อยกว่า 2.00% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (%RSD น้อยกว่า 5%) (เสาวณีย์ กาญจนชุมพล; ดวงกมล วิรุฬห์อุดมผล; และไพศาล จิตธรรม, 2556: ออนไลน์) โดยมีค่า %RSD ของสัญญาณพื้นที่ใต้พีคและเวลาของการคงอยู่ของสารทั้ง 4 ชนิด ภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 0.23 - 1.91 และ 0.07 - 0.75 ตามลำดับ และระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.22 - 1.96 และ 0.65 - 1.98 ตามลำดับ

ตาราง 3 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

สารที่วิเคราะห์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	%RSD ในวันเดียวกัน (n=5)		%RSD ระหว่างวัน (n=5)	
		พื้นที่ใต้ พีค	เวลาของ การคงอยู่	พื้นที่ใต้ พีค	เวลาของ การคงอยู่
อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม	1.0	1.64	0.73	1.96	1.43
	20.0	0.32	0.60	1.07	0.73
	200.0	0.45	0.46	0.84	1.66
แซคคาริน	0.5	1.13	0.33	1.10	1.98
	5.0	0.54	0.55	1.33	0.68
	50.0	0.23	0.75	1.81	0.65
แอสพาร์แทม	1.0	1.49	0.56	0.22	1.93
	50.0	1.91	0.07	1.86	1.41
	150.0	1.53	0.18	0.67	1.56
คาเฟอีน	0.1	1.90	0.17	1.80	1.40
	10.0	0.25	0.17	1.83	1.49
	20.0	0.41	0.17	1.75	1.36

4. ร้อยละของการคืนกลับ

จากการศึกษาค่าร้อยละของการคืนกลับ โดยการเติมสารมาตรฐานผสมอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แแซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ให้มีความเข้มข้น 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวอย่างเครื่องดื่มต่างๆ ได้แก่ น้ำอัดลม น้ำหวานกลิ่นผลไม้ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น ผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 93.52 – 106.79 โดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างทุกชนิดมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เป็นที่น่าพอใจ (อยู่ในช่วงร้อยละ 0.30 - 3.20) แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้วิเคราะห์สารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิดและคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มประเภทต่างๆได้เป็นอย่างดี โดยแสดงผลการทดลองดังตาราง 4

ตาราง 4 ผลการศึกษาค่าร้อยละของการคืนกลับ

ตัวอย่าง	ค่าร้อยละของการคืนกลับ (%RSD ^a) ของสารที่วิเคราะห์			
	อะซิซัลเฟม- โพแทสเซียม	แซคคาริน	แอสพาร์แทม	คาเฟอีน
น้ำอัดลม				
ตัวอย่างที่ 1	106.50 (2.25)	96.09 (0.58)	106.79 (1.70)	96.93 (2.28)
ตัวอย่างที่ 2	101.24 (1.55)	96.20 (2.23)	100.41 (3.13)	96.71 (2.06)
ตัวอย่างที่ 3	98.63 (0.30)	104.93 (2.70)	99.44 (2.59)	98.49 (2.98)
น้ำหวานกลิ่นผลไม้				
ตัวอย่างที่ 4	103.57 (2.50)	102.19 (2.45)	96.51 (1.36)	98.27 (0.89)
ตัวอย่างที่ 5	101.93 (1.07)	106.35 (1.87)	102.85 (0.50)	97.30 (0.92)
ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร				
ตัวอย่างที่ 6	99.14 (2.84)	103.84 (0.78)	93.52 (2.23)	105.10 (3.12)
ตัวอย่างที่ 7	99.25 (3.15)	106.54 (1.21)	97.98 (1.17)	101.39 (3.20)
ตัวอย่างที่ 8	101.41 (1.52)	105.15 (1.54)	97.39 (2.85)	93.69 (1.68)

^aค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

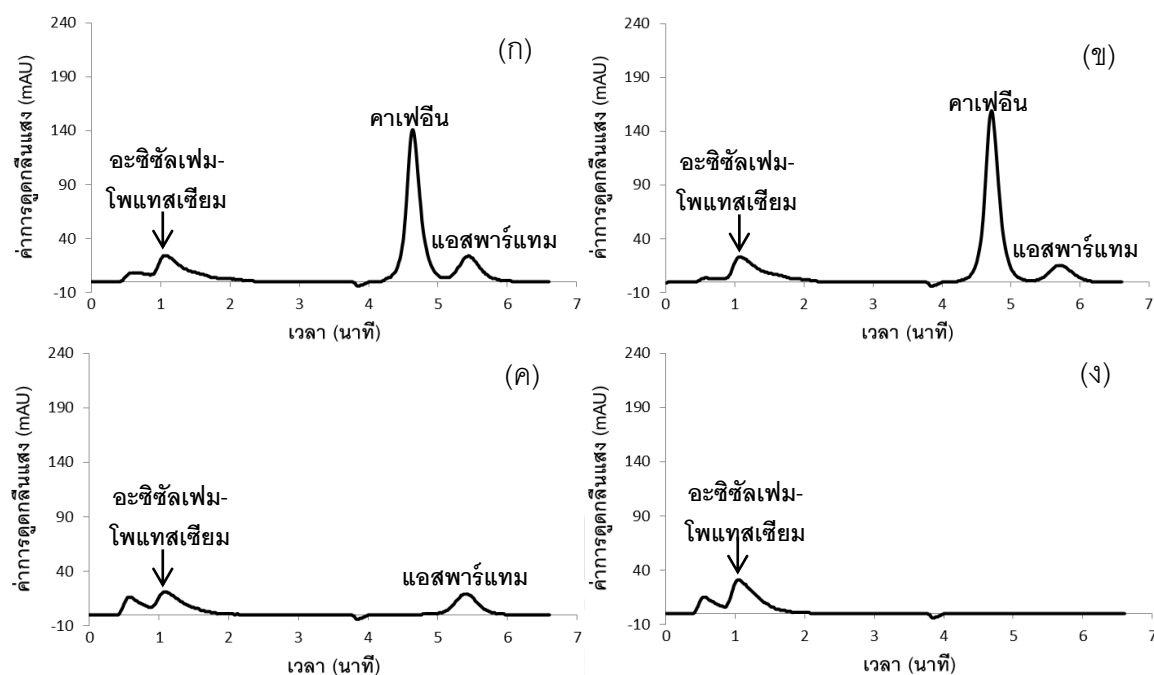
ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวาน และคาเฟอีน ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคโพลินเจนชันโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารให้ความหวาน 3 ชนิด ได้แก่ อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน และแอสพาร์แทม รวมทั้งคาเฟอีน ในตัวอย่างเครื่องดื่มต่างๆ จำนวน 8 ตัวอย่าง แบ่งเป็น น้ำอัดลม 3 ตัวอย่าง น้ำหวานกลิ่นผลไม้ 2 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 3 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างทั้งหมดมาทำการเจือจางในสัดส่วนที่เหมาะสมก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ผลการทดลองในตาราง 5 แสดงปริมาณสารให้ความหวานและคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มต่างๆ ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไป จำนวน 8 ตัวอย่าง เห็นได้ว่าในตัวอย่างน้ำอัดลมและน้ำหวานกลิ่นผลไม้มีการใช้อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมและแอสพาร์แทมเป็นสารให้ความหวานร่วมกัน เนื่องจากอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมมีรสชาติขมติดลิ้น จึงมักใช้ร่วมกับแอสพาร์แทมเพื่อลดรสขม และเสริมฤทธิ์ให้มีความหวานเพิ่มขึ้น (กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2542: 85) โดยตรวจพบในปริมาณที่แตกต่างกัน ในขณะที่ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีการใช้อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมเป็นสารให้ความหวานเพียงชนิดเดียว สำหรับคาเฟอีนสามารถตรวจพบในตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำอัดลมเท่านั้น โดยพบคาเฟอีนในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ตัวอย่างเครื่องดื่มทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจวิเคราะห์ไม่พบแซคคารินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานข้อกำหนดของกระทรวงสาธารณสุขในการห้ามใช้แซคคารินในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มและอาหารทั่วไป (กระทรวงสาธารณสุข. 2544: ออนไลน์) จากผลการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่นำมาศึกษามีปริมาณอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมและแอสพาร์แทม อยู่ในช่วงความเข้มข้น 119.75 - 229.91 และ 29.45 - 166.61 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณคาเฟอีนที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำอัดลมอยู่ในช่วงความเข้มข้น 105.50 - 136.74 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารให้ความหวานกับเกณฑ์มาตรฐานตามข้อกำหนดขององค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกาที่อนุญาตให้บริโภคอะซีซัลเฟม-โพแทสเซียมและแอสพาร์แทม ไม่เกิน 15 และ 40-50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน (วรรณกุล เชื้อมงคล. 2551: 161) ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากบุคคลทั่วไปที่มีน้ำหนักตัว 60 กิโลกรัม จะเห็นได้ว่าตัวอย่างเครื่องดื่มทั้ง 8 ตัวอย่างที่ผู้วิจัยนำมาศึกษานี้สามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัย โดยไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ และเมื่อพิจารณาปริมาณของคาเฟอีนนั้นกฎหมายกำหนดให้เครื่องดื่มน้ำอัดลมมีคาเฟอีนได้ไม่เกิน 15 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (ปรุพท์ รุจนธำรงค์. 2554: ออนไลน์) ซึ่งตัวอย่างน้ำอัดลมทั้ง 3 ตัวอย่างก็มีปริมาณคาเฟอีนอยู่ในเกณฑ์ตามที่กำหนดไว้เช่นเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของอะซิอัลเฟม-โพแทสเซียม แอสพาร์แทม และคาเฟอีนที่พบในตัวอย่างเครื่องดื่มทั้งหมด โดยใช้เทคนิคโฟลอินเจกชันโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีอ้างอิงซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคที่ได้รับการยอมรับอย่างเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์ และใช้คอลัมน์ขนาดมาตรฐานความยาว 150 มิลลิเมตรในการแยก (Demiralay; Özkan; & Guzel-Seydim. 2006: 91-96) ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตาราง 5 เมื่อทดสอบความแตกต่างของปริมาณสารให้ความหวานทั้ง 2 ชนิดและคาเฟอีนในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้จากทั้ง 2 วิธี โดยใช้สถิติแบบ paired *t*-test พบว่าได้ค่า *t* stat น้อยกว่าค่า *t* critical two-tail จึงสามารถสรุปได้ว่าปริมาณของสารให้ความหวานทั้ง 2 ชนิดและคาเฟอีนที่วิเคราะห์ได้จากทั้ง 2 วิธีนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำของเทคนิคโฟลอินเจกชันโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ที่สามารถใช้คอลัมน์ขนาดเล็กแบบอนุภาคทรงกลม (8.0×3.0 mm i.d., $3 \mu\text{m}$) แทนการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีตามที่เคยมีการรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ (García-Jiménez; Valencia; & Capitán-Vallvey. 2007: 226-233)

ตัวอย่างโครมาโทแกรมการแยกสารให้ความหวานและคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด แสดงดังภาพประกอบ 21 จะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์อะซิอัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีนแบบพร้อมกันในตัวอย่างเครื่องดื่มจริงได้ โดยใช้การเตรียมตัวอย่างเพียงแค่การเจือจางด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ก่อนนำไปวิเคราะห์เท่านั้น ซึ่งจากโครมาโทแกรมจะเห็นได้ว่าด้านหน้าของพีคอะซิอัลเฟม-โพแทสเซียมมีสิ่งเจือปนอยู่เพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการแยก ทำให้สามารถแยกสัญญาณของสารให้ความหวานทั้ง 3 ชนิด และคาเฟอีนออกจากสารรบกวนที่อยู่ในตัวอย่างได้เป็นอย่างดี ให้ผลการแยกที่มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจ และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น



ภาพประกอบ 21 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของการแยกอะซีลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน ในตัวอย่างเครื่องดื่มประเภทต่างๆ (ก) น้ำอัดลมตัวอย่างที่ 1 (ข) น้ำอัดลมตัวอย่างที่ 2 (ค) น้ำหวานกลิ่นผลไม้ตัวอย่างที่ 5 และ (ง) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารตัวอย่างที่ 8

ตาราง 5 ชนิดและปริมาณของสารให้ความหวานและคาเฟอีนที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้และวิธีอ้างอิง (Demiralay; Özkan; & Guzel-Seydim. 2006: 91-96)

ตัวอย่าง	ปริมาณของสารให้ความหวานและคาเฟอีน (มิลลิกรัมต่อลิตร) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน					
	อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม		แอสพาร์แทม		คาเฟอีน	
	วิธีที่พัฒนาขึ้น	วิธีอ้างอิง	วิธีที่พัฒนาขึ้น	วิธีอ้างอิง	วิธีที่พัฒนาขึ้น	วิธีอ้างอิง
น้ำอัดลม						
ตัวอย่างที่ 1	193.95 $\pm$ 0.07	194.88 $\pm$ 0.57	166.61 $\pm$ 4.67	162.81 $\pm$ 0.28	113.80 $\pm$ 0.38	112.14 $\pm$ 0.93
ตัวอย่างที่ 2	180.03 $\pm$ 0.27	180.97 $\pm$ 1.42	31.68 $\pm$ 0.14	29.72 $\pm$ 0.73	136.74 $\pm$ 0.17	138.18 $\pm$ 0.38
ตัวอย่างที่ 3	145.17 $\pm$ 1.18	143.92 $\pm$ 0.57	64.66 $\pm$ 0.97	63.59 $\pm$ 4.88	105.50 $\pm$ 0.76	106.07 $\pm$ 0.55
น้ำหวานกลั่นผลไม้						
ตัวอย่างที่ 4	119.75 $\pm$ 0.26	118.28 $\pm$ 0.47	29.51 $\pm$ 1.27	29.62 $\pm$ 4.18	-	-
ตัวอย่างที่ 5	133.72 $\pm$ 3.22	132.94 $\pm$ 0.12	29.45 $\pm$ 1.33	29.14 $\pm$ 0.20	-	-
ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร						
ตัวอย่างที่ 6	214.33 $\pm$ 0.33	213.61 $\pm$ 0.11	-	-	-	-
ตัวอย่างที่ 7	229.91 $\pm$ 1.53	227.75 $\pm$ 0.08	-	-	-	-
ตัวอย่างที่ 8	201.64 $\pm$ 1.93	201.63 $\pm$ 1.88	-	-	-	-
t stat	1.8823		1.5735		-0.7150	
t critical two-tail	2.0739		2.1604		2.3646	



บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคโพลินเจชันโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็กสำหรับการวิเคราะห์สารให้ความหวาน 3 ชนิด ได้แก่ อะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แอสพาร์แทม และแซคคาริน รวมทั้งคาเฟอีนแบบพร้อมกันในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทต่างๆ ที่มีจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด โดยสามารถสรุป อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะดังนี้

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารให้ความหวานและคาเฟอีนแบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโพลินเจชันโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก (ความยาวน้อยกว่า 1.0 เซนติเมตร) จึงทำให้ได้วิธีวิเคราะห์แนวทางใหม่ที่สะดวก รวดเร็ว และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น เนื่องจากใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่และตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อยกว่า อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีราคาถูกกว่า เมื่อเทียบกับอุปกรณ์ของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จึงเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีต้นทุนต่ำกว่า จากผลการวิจัยพบว่าเมื่อใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 ขนาด 8.0×3.0 mm i.d., 3 μ m (SecurityGuard™ C18 cartridge) ร่วมกับการใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตดความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ชนิด A และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ชนิด B คือ สารละลายผสมระหว่างแอสซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตดความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 6:94 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.49 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบว่าสามารถแยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีนได้พร้อมกัน ภายในเวลาเพียง 6.00 นาทีเท่านั้น และให้ผลความเป็นเส้นตรงที่ดี (R^2 มากกว่า 0.998) ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการวิเคราะห์ มีความเที่ยงที่ดีเป็นที่น่าพอใจ ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน โดยมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีค และเวลาการคงอยู่น้อยกว่า 2.00 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 0.30, 0.09, 0.20 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีนตามลำดับ มีค่าร้อยละการคืนกลับของสารทั้ง 4 ชนิดในตัวอย่างเครื่องดื่มอยู่ในช่วงร้อยละ 93.52 – 106.79 แสดงให้เห็นว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างเพียงแค่การเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ก่อนนำไปวิเคราะห์ ก็สามารถแยกสารที่วิเคราะห์ออกจากสิ่งรบกวนในตัวอย่างได้เป็นอย่างดี สำหรับการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวานและคาเฟอีนในตัวอย่างเครื่องดื่มต่างๆ ได้แก่ น้ำอัดลม น้ำหวานกลั่นผลไม้ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร พบว่ามีการใช้สารให้ความหวานและคาเฟอีนในปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์ โดยปริมาณที่พบไม่เกินข้อกำหนดมาตรฐาน และไม่พบการเติมแซคคารินลงในเครื่องดื่มทุกชนิดที่นำมาศึกษา ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดในการห้ามเติม

แซคคารินลงในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม เมื่อนำผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มาเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง พบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ยังให้ผลการวิจัยที่มีข้อดีกว่างานวิจัยอื่นๆที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้ ซึ่งใช้เทคนิคโพลินเจคชันโครมาโทกราฟีเช่นเดียวกัน (García-Jiménez; Valencia; & Capitán-Vallvey. 2007: 226-233; Santos; & Rangel. 2012: 57-63) สรุปผลการเปรียบเทียบดังตาราง 6

ตาราง 6 การเปรียบเทียบผลการวิจัยที่ได้จากงานวิจัยที่พัฒนาขึ้น และงานวิจัยที่เคยรายงานก่อนหน้านี้ สำหรับการวิเคราะห์สารให้ความหวาน และคาเฟอีนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มด้วยเทคนิคโพลินเจคชันโครมาโทกราฟี

พารามิเตอร์	วิธีที่พัฒนาขึ้น	งานวิจัยอ้างอิง
วิธีการเตรียมตัวอย่าง	การเจือจาง	การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง ^a
เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (นาที/ตัวอย่าง)	7.0	10.0 ^a 15.0 ^b
ชนิดของวัสดุภาชนะที่	อนุภาคนกทรงกลมชนิด C18	มอนอลิธิกคอลัมน์ชนิด C18 ^{a,b}
ปริมาตรของวัสดุเคลื่อนที่ (มิลลิลิตร/การวิเคราะห์)	3.0	4.4 ^a 5.1 ^b
การแยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียม แซคคาริน แอสพาร์แทม และคาเฟอีน	แยกสารทั้ง 4 ชนิดได้สมบูรณ์	แยกอะซิซัลเฟม-โพแทสเซียมและแซคคารินออกจากกันไม่ได้ ^a

ตาราง 6 (ต่อ)

พารามิเตอร์	วิธีที่พัฒนาขึ้น	งานวิจัยอ้างอิง
ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม: 1.00-200 ^a แซคคาริน : 0.50-60 ^a แอสพาร์แทม : 1.00 -180 ^a คาเฟอีน : 0.10-20 ^b	อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม: 0.03- 45.0 ^a แซคคาริน : 2.43-80.0 ^a แอสพาร์แทม : 0.94-45.0 ^a คาเฟอีน : 3.88-194.19 ^b
ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม : 0.30 ^a แซคคาริน : 0.09 ^a แอสพาร์แทม : 0.20 ^a คาเฟอีน : 0.03 ^b	อะซีซัลเฟม-โพแทสเซียม : 0.01 ^a แซคคาริน : 0.73 ^a แอสพาร์แทม : 0.32 ^a คาเฟอีน : 1.94 ^b
ราคาของคอลัมน์ (บาท/คอลัมน์)	1,500 (8.0 mm)	> 10,000 ^{a,b} (5.0 - 10 mm)

^aงานวิจัยของการีเซีย-จีเมเนซ และคณะ (García-Jiménez; Valencia; & Capitán-Vallvey. 2007: 226-233)

^bงานวิจัยของซานโตส และเรนเจล (Santos; & Rangel. 2012: 57-63)

จากความมุ่งหวังในงานวิจัยนี้ที่ต้องการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารให้ความหวานและคาเฟอีนแบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโพลินเจนชันโครมาโทกราฟีร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิดอนุภาคทรงกลม จึงได้วิธีวิเคราะห์ใหม่ที่สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ และมีการใช้ปริมาณของวัสดุภาคเคลื่อนที่น้อยกว่างานวิจัยที่เคยมีรายงานมาก่อน ทำให้มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น อีกทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในระบบการวิเคราะห์มีราคาถูก ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย ซึ่งอาจมีการนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่หลากหลายมากขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์และเป็นทางเลือกสำหรับผู้บริโภคในการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มต่างๆ ให้ความปลอดภัย และอาจนำวิธีวิเคราะห์เหล่านี้ไปพัฒนาต่อยอดสำหรับการวิเคราะห์ในภาคสนามและการวิเคราะห์สารสำคัญชนิดอื่นๆต่อไป



บรรณานุกรม

- กระทรวงสาธารณสุข. (2544). *วัตถุเจือปนที่ใช้ให้ความหวานแทนน้ำตาล*. สืบค้นเมื่อ 8 มิถุนายน 2559, จาก http://elib.fda.moph.go.th/library/default.asp?page2=subdetail&id_L1=27&id_L2=15566&id_L3=561
- กล้าณรงค์ ศิริรอด. (2542). *สารให้ความหวาน sweeteners*. กรุงเทพฯ: จาร์พา เทคโนโลยีเตอร์.
- จันทนา อึ้งชูศักดิ์. (2555). *น้ำตาล สุขภาพ และการจัดการด้านการบริโภคที่เหมาะสม*. กรุงเทพฯ: องค์การส่งเสริมการค้าผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์.
- โชติช่วง ชูตินธร. (2528, ธันวาคม). คาเฟอีน ให้ประโยชน์หรือโทษ. *นิตยสารหมอชาวบ้าน*. (80). สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2558, จาก <http://www.doctor.or.th/article/detail/6065>
- ช่อทิพย์วรรณ พันธุ์แก้ว. (2537). *กาแฟเพื่อสุขภาพ เหมาะมากสำหรับคอกาแฟ*. กรุงเทพฯ: ต้นธรรมสำนักพิมพ์.
- ปรุพท์ รุจนธำรงค์. (2554). *ปริมาณ Caffeine ที่กำหนดตามกฎหมาย*. สืบค้นเมื่อ 24 พฤษภาคม 2558, จาก <http://rparun.blogspot.com/2011/04/caffeine.html>
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2558). *caffeine/กาแฟอื่น*. สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2558, จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/4088/caffeine-กาแฟอื่น>
- แมน อมรสิทธิ์; และคนอื่นๆ. (2555). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์ 50.
- วรรณคล เขื่องมค. (2551, มกราคม-เมษายน). สารให้ความหวาน: การใช้และความปลอดภัย. *วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ*. 3(1): 161-168.
- เสาวณีย์ กาญจนชุมพล; ดวงกมล วิรุฬห์อุดมผล; และไพศาล จิตธรรม. (2556). *การประเมินวิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ*. สืบค้นเมื่อ 8 มิถุนายน 2559, จาก http://old.nimt.or.th/nimt/upload/contentfile/attach-lab_article-516-443.pdf
- Bergamo, A.B.; Fracassi da Silva, J.A.; & de Jesus, D.P. (2011). Simultaneous Determination of Aspartame, Cyclamate, Saccharin and Acesulfame-K in Soft Drinks and Tabletop Sweetener Formulations by Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. *Food Chemistry*. 124: 1714-1717.

- Chen, Q.-C.; & Wang, J. (2001). Simultaneous Determination of Artificial Sweeteners, Preservatives, Caffeine, Theobromine and Theophylline in Food and Pharmaceutical Preparations by Ion Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 937: 57–64.
- Demiralay, E.Ç.; Özkan, G.; & Guzel-Seydim, Z. (2006). Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia*. 63: 91-96.
- Dossi, N.; et al. (2006). Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks. *Chromatographia*. 63: 557-562.
- Earley, C. (2008). *Structure of Caffeine and Related Compounds*. Retrieved June 6, 2015, from <http://www.personal.kent.edu/~cearley/ChemWrld/jmol/caffeine.htm>
- Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. (1994). *Validation of Chromatographic Methods*. Retrieved June 8, 2016, from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>
- García-Jiménez, J.F.; Valencia, M.C.; & Capitán-Vallvey, L.F. (2007). Simultaneous Determination of Antioxidants, Preservatives and Sweetener Additives in Food and Cosmetics by Flow Injection Analysis Coupled to a Monolithic Column. *Analytica Chimica Acta*. 594: 226-233.
- Grembecka, M.; & Szefer, P. (2012). Simultaneous Determination of Caffeine and Aspartame in Diet Supplements and Non-alcoholic Beverages using Liquid-chromatography Coupled to Corona CAD and UV-DAD Detectors. *Food Analytical Methods*. 5: 1010-1017.
- Kaufman, S. (1999). A Model of Human Phenylalanine Metabolism in Normal Subjects and in Phenylketonuric Patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 3160-3164.
- Kritsunankul, O.; & Jakmunee, J. (2011). Simultaneous Determination of Some Food Additives in Soft Drinks and other Liquid Foods by Flow Injection On-line Dialysis Coupled to High Performance Liquid Chromatography. *Talanta*. 84: 1342-1349.

- Lin, Y.H.; et al. (2000). Simultaneous Determination of Sweeteners and Preservatives in Preserved Fruits by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 38: 345-352.
- Mazurek, S.; & Szostak, R. (2011). Quantification of Aspartame in Commercial Sweeteners by FT-Raman Spectroscopy. *Food Chemistry*. 125: 1051-1057.
- Ordoñez, E.Y.; et al. (2015). Determination of Artificial Sweeteners in Beverages with Green Mobile Phases and High Temperature Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Chemistry*. 169: 162–168.
- Riera, C.E.; et al. (2007). Artificial Sweeteners and Salts Producing a Metallic Taste Sensation Activate TRPV1 Receptors. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 293: 626-634.
- Santos, J.R.; & Rangel, A.O.S.S. (2012). Development of a Chromatographic Low Pressure Flow Injection System: Application to the Analysis of Methylxanthines in Coffee. *Analytica Chimica Acta*. 715: 57-63.
- Sik, B. (2012). Development and Validation of a Green High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Some Artificial Sweeteners and Caffeine in Soft Drinks. *Food Analytical Methods*. 5: 1443-1452.
- Wasik, A.; McCourt, J.; & Buchgraber, M. (2007). Simultaneous Determination of Nine Intense Sweeteners in Foodstuffs by High Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light Scattering Detection – Development and Single-laboratory Validation. *Journal of Chromatography A*. 1157: 187-196.
- Yang, D.-J.; & Chen, B. (2009). Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 3022-3027.
- Yebra-Biurrun, M.C. (2009). *Flow Injection: Past, Present and Future*. New York: Nova Science Publishers. Retrieved June 11, 2015, from <http://www.slideshare.net/RonaldTalvat/flow-injection-analysis-of-marine-samples>
- Zhu, Y.; et al. (2005). Separation and Simultaneous Determination of Four Artificial Sweeteners in Food and Beverages by Ion Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1085: 143-146.

Zygler, A.; Wasik, A.; & Namiesnik, J. (2009). Analytical Methodologies for Determination of Artificial Sweeteners in Foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*. 28: 1082-1102.







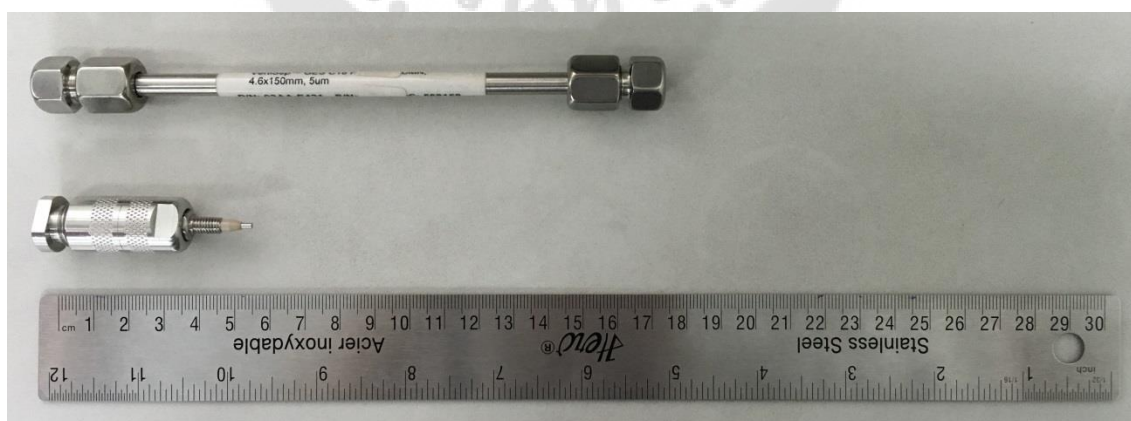
ภาพประกอบ 22 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น HPLC-1260



ภาพประกอบ 23 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-2450



ภาพประกอบ 24 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-1000



ภาพประกอบ 25 เปรียบเทียบขนาดของความยาวคอลัมน์



ภาพประกอบ 26 เครื่องแปลงสัญญาณ รุ่น PC710



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวภัทราพร สิงห์ภิรมย์
วันเดือนปีเกิด	26 กุมภาพันธ์ 2534
สถานที่เกิด	บ้านเลขที่ 15/16 ถนนบรมราชชนนี แขวงฉิมพลี เขตตลิ่งชัน จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10170
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2552	มัธยมศึกษา 1 - 6 จาก โรงเรียนโพธิสารพิทยากร จังหวัดกรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2555	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2559	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

