การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

ปริญญานิพนธ์

ของ

จารุวรรณ แดงชาติ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

เมษายน 2558

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

ปริญญานิพนธ์

ของ

จารุวรรณ แดงชาติ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

เมษายน 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

บทคัดย่อ

ของ

จารุวรรณ แดงชาติ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

เมษายน 2558

จารุวรรณ แดงชาติ. (2558). *การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์: รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย.

กรดเฟอร์รูริกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติ พบได้ในเปลือก เมล็ด และซังข้าวโพด ซึ่งกรดเฟอร์รูริกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ สามารถป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง และลดผลกระทบจากรังสีอัลตราไวโอเลตแก่ผิวหนัง ในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด โดยใช้เทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ในการสกัดกรดเฟอร์รูริกจากตัวอย่างที่ผ่านการทำอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิครีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทั้งนี้งานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ จากการศึกษาการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชันในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด พบว่าในการเตรียมตัวอย่างจะใช้ตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย ที่เหมาะสมคือ ไดคลอโรมีเทน และอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 1.2:12 (v/v) ทำการสกัด เป็นเวลา 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 4000 rpm นาน 5 นาที และให้ความร้อนแก่ตัวอย่างข้าวโพดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิครีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) : เมทานอล ในอัตราส่วน (1:1) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณ เท่ากับ 0.02 และ 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 80.63±1.12 - 105.39±1.08 การศึกษาผลของสารรบกวนในตัวอย่าง ได้แก่ กรดแกลลิค กรดแทนนิค คาเทชิน กรดแอล-กลูตามิค กรดไลซีน และกรดทริปโตเฟน พบว่าในระบบการทดลองด้วยสภาวะที่เหมาะสมนี้ไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก ทั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างด้วยเทคนิคข้างต้น พบว่ากรดเฟอร์รูริกในข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดมีค่าอยู่ในช่วง 0.37±0.21 - 6.50±0.63 mg/g

DEVELOPMENT OF PREPARATION METHOD FOR FERULIC ACID ANALYSIS BY DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION TECHNIQUE IN CORN AND PROCESSED CORN

AN ABSTRACT

BY

JARUWAN DAENGCHAT

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

April 2015

Jaruwan Daengchat. (2015). *Development of preparation method for ferulic acid analysis by dispersive liquid-liquid microextraction technique in corn and processed corn.* Master Thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Thesis Advisor: Associate Professor Dr. Pornpimol Muangthai.

Ferulic acid is an antioxidant, naturally found in the husk, kernel and corn cob. Such the powerful antioxidant of ferulic acid, it protects cells from cancer and reduces the effects of ultraviolet radiation to the skin. The aim of this work was to develop sample preparation method for ferulic analysis in corn and processed corn products by dispersive liquid-liquid microextraction technique for preparation of ferulic acid from alkaline hydrolysis samples by organic solvent before analysis ferulic acid using reverse phase high performance liquid chromatography. The optimized method was studied and validated. The results obtained from optimization study in the preparation method by dispersive liquid-liquid microextraction technique showed that the extraction solvent and dispersive solvent was dichloromethane: acetonitrile (1.2: 12) (v/v), 5 minutes of extraction time, 5 minutes of centrifuge at 4000 rpm and heating at 100 ^{o}C for 60 minutes. The optimal condition for ferulic acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography technique was found to be 1% (v/v) acetic acid: methanol (1:1) used as mobile phase solvent which and flow rate was controlled at 1.0 mL/min. For the validation method studies found that the limit of detection and limit of quantitation of the analysis method were 0.02 and 0.06 µg/mL, respectively. The recoveries percentages were in the range of 80.63±1.12 - 105.39±1.08. There were not the effects for ferulic acid analysis from the interference including tannic acid, gallic acid catechin, L- glutamic, lysine acid and tryptophan acid. The ferulic acid contents in corn and processed corn were in the range of 0.37±0.21 - 6.50±0.63 mg/g.

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษา
จากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2557

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ ความช่วยเหลือ ความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจากคณาจารย์ในภาควิชาเคมีหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ

รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำชี้แนะ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการแก้ปัญหาทุกขั้นตอนอันเกิดจากการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.วินัย อวงพิพัฒน์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วีณา เสียงเพราะ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัย และขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี ที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกๆ ท่านเป็นอย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และญาติสนิททุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดู ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัย ขอบพระคุณอาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทุกๆ ท่านที่มิได้กล่าวรายนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

จารุวรรณ แดงชาติ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	ขั้นตอนของการวิจัย	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	ข้าวโพดและส่วนประกอบของข้าวโพด	5
	อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและกรดเฟอร์รูริก	8
	การเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิธีวิเคราะห์	12
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	21
	อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	21
	วิธีดำเนินการวิจัย	23
	การศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก	23
	การศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก	25
	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	26
	การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์	27
	การศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่างจริง	29
	การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพด และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด	29
4	**ผลการทดลอง**	32
	ตอนที่ 1 การศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก	32

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
ศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย……..	32
ศึกษาผลของปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย….....	33
ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการสกัด……..……..…….	34
ศึกษาผลของเวลาในการหมุนเหวี่ยง…….……	35
ตอนที่ 2 การศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณ กรดเฟอร์รูริก……..	36
ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลา…….	36
ศึกษาผลของการแปรรูปตัวอย่าง…….	37
ตอนที่ 3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง……..……..	39
ศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่……..……..	39
ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่……...	41
ตอนที่ 4 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์……..	42
การสร้างกราฟมาตรฐานกรดกรดเฟอร์รูริก……..……...	42
ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)…..……...	43
ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)..…….……	43
ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)..…….……	44
ตอนที่ 5 การศึกษาผลของสารรบกวนในตัวอย่าง……	45
ศึกษาผลของกรดอะมิโน…….……	45
ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก…….	45
ตอนที่ 6 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพด และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด……...……	47
การเตรียมตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วย วิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส……	47
การเตรียมตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน…….	47
การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพด และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด..……	47

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	49
บรรณานุกรม	52
ภาคผนวก	58
ประวัติย่อผู้วิจัย	68

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 ส่วนประกอบทางเคมีของข้าวโพด..... 7
2 แหล่งที่มาของตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด..... 30
3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี
ของเหลวสมรรถนะสูง..... 42
4 ร้อยละการได้กลับคืน (%recovery±SD) ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูป
จากข้าวโพดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง..... 44
5 ระยะเวลารีเทนชันของพีคโครมาแกรมของกรดเฟอร์รูริก กรดแกลลิค
กรดแทนนิค คาเทชิน กรดแอล-กลูตามิค กรดไลซีน และกรดทริปโตเฟน..... 45
6 ปริมาณกรดเฟอร์รูริก (mg/g±SD) ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูป
จากข้าวโพดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง..... 47

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับเป้าหมาย..... 8
2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดเฟอร์รูริก..... 10
3 หมวดหมู่ของสารไฟโตเคมีคอล..... 11
4 กระบวนการสกัดด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน..... 13
5 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC..... 14
6 ร้อยละการได้กลับคืนของการใช้สารละลายผสมของตัวทำละลายสกัด ไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายอะซิโตไรไตรล์ อะซิโตนและเอทานอล... 33
7 ร้อยละการได้กลับคืนของการใช้สารละลายผสมของตัวทำละลายสกัด ไตรคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายอะซิโตไรไตรล์ อะซิโตน และเอทานอล..... 33
8 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (μg/mL) ที่ได้จากการสกัด ด้วยวิธี DLLME โดยสกัดด้วยสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิด ไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน (0.8:8 1:10 1.2:12 และ 1.4:14 (v/v))..... 34
9 ผลของความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (μg/mL) ที่ได้จากการสกัดด้วย วิธี DLLME โดยสกัดด้วยสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิด ไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 1.2:12 (v/v) ในช่วงเวลา 0.0-10.0 นาที..... 35
10 ผลของความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (μg/mL) ที่ได้จากการสกัดด้วย วิธี DLLME โดยสกัดด้วยสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิด ไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 1.2:12 (v/v) เป็นเวลา 5 นาที และทำการหมุนเหวี่ยงในช่วงเวลา 2.5-10.0 นาที..... 36
11 ผลของความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (μg/mL) ที่ได้จากผลของการ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 20-60 นาที..... 37
12 ผลของความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (μg/mL) ที่ได้จากผลของการ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 20-60 นาที..... 37

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

13 โครมาโทแกรมการเปรียบเทียบวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วน 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30 (v/v) ของกรดเฟอร์รูริกเข้มข้น 10 µg/mL..... 39

14 ตัวอย่างโครมาโทแกรมการเปรียบเทียบวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติก เข้มข้น 1% (v/v) และตัวทำละลายอินทรีย์ (ทั้ง (1) เมทานอล (2) อะซิโตไนไตรล์) ของกรดเฟอร์รูริกเข้มข้น 10 µg/mL..... 40

15 ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ส่งผลต่อเวลารีเทนชัน..... 41

16 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีค (mAU/s) กับช่วงความเข้มข้น ของกรดเฟอร์รูริก (µg/mL)..... 43

17 ผลการศึกษาของสารละลายมาตรฐานผสม ได้แก่ กรดเฟอร์รูริก กรดแกลลิค กรดแทนนิค กรดแทนนิค คาเทชิน กรดแอล-กลูตามิค กรดไลซีน และกรดทริปโตเฟน ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 46

18 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างข้าวโพดหวานต้ม..... 60

19 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียวขาวต้ม..... 60

20 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียวดำต้ม..... 61

21 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างข้าวโพดอ่อนต้ม..... 61

22 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์..... 62

23 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด..... 62

24 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์น..... 63

25 ตัวอย่างข้าวโพด..... 65

26 ตัวอย่างข้าวโพด (ต่อ)..... 65

27 สารละลายตัวอย่างที่จากการเตรียมด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส..... 66

28 สารละลายตัวอย่างที่จากการเตรียมด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน..... 66

29 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง..... 67

30 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ..... 67

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

อนุมูลอิสระ (free radical) มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเกิดโรค ทั้งเป็นต้นเหตุของการเกิดโรคและเป็นปัจจัยทำให้โรคมีพัฒนาการอย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงยิ่งขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมและความบกพร่องของเซลล์ประสาทและเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบของร่างกาย (วัชระคุปต์ และคณะ 2549: 27-43) ร่างกายของมนุษย์จะถูกออกซิไดซ์หรือภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งสามารถนำไปสู่การทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ โดยทั่วไปการสร้างอนุมูลอิสระเกิดขึ้นตลอดเวลา แต่ร่างกายมีระบบในการป้องกันตัวเองและสามารถช่วยลดความรุนแรงจากพิษของอนุมูลอิสระได้โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้โดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่

ดังนั้นร่างกายจึงต้องมีการกำจัดอนุมูลอิสระที่มีมากเกินไปภายในร่างกายโดยปรับสมดุลปฏิกิริยารีดอกซ์ กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระประกอบด้วยการกำจัดหรือลดการสร้างอนุมูลออกซิเจนอิสระ (reactive oxygen species, ROS) โดยการทำงานของเอนไซม์และวิตามินภายในร่างกาย และนอกจากนี้ยังได้จากสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic) ที่มีอยู่ในอาหารที่บริโภค ซึ่งสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการเกิดเครียดออกซิเดชัน (B. Halliwell. 2009: 531-542)

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด คือ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น โพรพิล แกลเลต (propyl gallate) และบิวทิเลเทต ไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene, BHT) เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acid) ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น (J. Pokorny; et al. 2001) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผักและผลไม้ของไทยหลายชนิดมีสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นองค์ประกอบ ทำให้การบริโภคผักและผลไม้เป็นที่นิยมเป็นอย่างมาก

สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติที่สำคัญที่พบในผักและผลไม้ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี มะเขือเทศ กะหล่ำปลี และหน่อไม้ฝรั่ง คือสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) ซึ่งในข้าวโพดจะพบสารในกลุ่มกรดฟีนอลิก (phenolic acid) ที่สำคัญ คือ กรดเฟอร์รูริก (ferulic acid) เป็นสารที่พบในเปลือก เมล็ดและซังของข้าวโพด ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยให้ผนังเซลล์ของพืชมี

ความแข็งแรง กรดเฟอร์รูริกในข้าวโพดดิบจะแฝงตัวอยู่ในผนังเซลล์ของพืชซึ่งอยู่ในรูปของกลูโคไซด์ (glucoside) คือ สารที่น้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบที่ทำให้ข้าวโพดหวาน ซึ่งกรดเฟอร์รูริกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ ถูกใช้สำหรับต่อต้านการแก่ (aging) ป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง โรคหัวใจ ไข้หวัด และต่อต้านผลกระทบจากรังสีอัลตราไวโอเลตแก่ผิวหนังได้

ปัจจุบันผู้คนให้ความสำคัญและหันมาบริโภคผักและผลไม้มากขึ้น ซึ่งข้าวโพดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากมีแป้ง น้ำตาล ไขมันและไฟเบอร์เป็นส่วนประกอบ นิยมนำมาบริโภคและนิยมนำมาแปรรูปเป็นอาหารประเภทต่างๆ เช่น ข้าวโพดต้ม ข้าวโพดอบกรอบ ข้าวโพดคั่ว และน้ำนมข้าวโพด ซึ่งในอดีตและปัจจุบันได้มีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกด้วยวิธีการสกัด เช่น วิธีไฮโดรไลซิสด้วยด่าง (alkaline hydrolysis) และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (M.F. Andreasen; et al. 2000: 2837-2842) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด ซึ่งกรดเฟอร์รูริกนี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่ง จากสารที่สกัดได้จากเมล็ดของข้าวโพด ซึ่งเป็นส่วนที่นิยมนำมารับประทาน นอกจากจะช่วยเพิ่มคุณค่าของข้าวโพดให้มีมูลค่ามากขึ้นแล้วยังเป็นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวโพด และนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก
3. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริกในข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบวิธีการเตรียมตัวอย่างกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด
2. ทำให้ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก
3. ทำให้ทราบปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก
    1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย
    1.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย
    1.3 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัด
    1.4 ศึกษาเวลาในการหมุนเหวี่ยง
2. ศึกษาตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก
    2.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลา
    2.2 ศึกษาผลของการแปรรูปตัวอย่าง
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
    3.1 ศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่
    3.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่
4. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์
    4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดกรดเฟอร์รูริก
    4.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)
    4.3 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)
    4.4 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)
5. ศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง
    5.1 ศึกษาผลของกรดอะมิโน
    5.2 ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก
6. วิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด
    6.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส
    6.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด มีดังนี้

6.3.1 ข้าวโพดหวาน

6.3.2 ข้าวโพดข้าวเหนียวขาว

6.3.3 ข้าวโพดข้าวเหนียวดำ

6.3.4 ข้าวโพดอ่อน

6.3.5 ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์หรือข้าวโพดอบกรอบแห้ง

6.3.6 ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด

6.3.7 ผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์นหรือข้าวโพดคั่ว

ขั้นตอนของการวิจัย

1. ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก
2. ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
4. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์
5. ศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง
6. วิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด โดยผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและนำเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

- ข้าวโพดและส่วนประกอบของข้าวโพด
- อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและกรดเฟอร์รูริก
- การเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิธีวิเคราะห์
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าวโพดและส่วนประกอบของข้าวโพด

ข้าวโพด เป็นพืชจำพวกหญ้า มีลำต้นตั้งตรงแข็งแรง เนื้อภายในคล้ายฟองน้ำ สูงประมาณ 1.4 เมตร ใบจะเป็นเส้นตรงปลายแหลม ยาวประมาณ 30-100 เซนติเมตร เส้นกลางของใบจะเห็นได้ชัด ตรงขอบใบมีขนอ่อนๆ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในต้นเดียวกัน ช่อดอกตัวผู้อยู่ส่วนยอดของลำต้น ช่อดอกตัวเมียอยู่ต่ำลงมาอยู่ระหว่างกาบของใบ และลำต้นฝักเกิดจากดอกตัวเมียที่เจริญเติบโตแล้ว ฝักอ่อนจะมีสีเขียว พอแก่จะเป็นสีนวล

ข้าวโพด (ศรีพิจิตต์. 2527)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Zea mays* L.
การจำแนกทางพฤกษศาสตร์	
Class	Angiospermae
Subclass	Monocotyledonae
Family	Gramineae
Genus	*Zea*
Species	*mays*

ชนิดของข้าวโพด

ข้าวโพดอาจจำแนกทางพฤกษศาสตร์ โดยถือเอาลักษณะของแป้งและเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นหลัก จำแนกออกเป็น 7 ชนิด ดังนี้

1) ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หรือข้าวโพดไร่ (field corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays indentata* ข้าวโพดชนิดนี้เมื่อเมล็ดแห้งแล้วตรงส่วนหัวบนสุดจะมีรอยบุ๋มลงไป ซึ่งเป็นส่วนของแป้งสีขาว ข้าวโพดชนิดนี้มีหลายสายพันธุมีโปรตีนน้อยกว่าพวกข้าวโพดหัวแข็ง

2) ข้าวโพดหัวแข็ง (fint corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays indurate* ข้าวโพดชนิดนี้ส่วนบนสุดของเมล็ดมักมีสีเหลืองจัดและเมื่อแห้งจะแข็งมาก ภายในเมล็ดมีสารที่ทำให้ข้าวโพดมีสีเหลืองเป็นสารให้สีที่ชื่อ คริปโตแซนทีน (cruptoxanthin) สารนี้เมื่อสัตว์ได้รับร่างกายสัตว์จะเปลี่ยนสารนี้ให้เป็นวิตามินเอ

3) ข้าวโพดหวาน (sweet corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays saccharata* เป็นข้าวโพดที่ใช้รับประทาน ไม่มีการแปรรูป เมล็ดมักจะใสและเหี่ยวเมื่อแก่เต็มที่ เพราะมีน้ำตาลมากก่อนที่จะสุกจะมีรสหวานมากกว่าชนิดอื่น ๆ จึงเรียกข้าวโพดหวาน มีหลายสายพันธุ์

4) ข้าวโพดคั่ว (pop corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays everta* เป็นข้าวโพดที่ใช้รับประทาน เมล็ดค่อนข้างแข็ง ถ้าเมล็ดมีลักษณะแหลมเรียกว่า ข้าวโพดข้าว (rice corn) ถ้าเมล็ดกลม เรียกว่า ข้าวโพดไข่มุก (pearl corn)

5) ข้าวโพดแป้ง (flour corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays amylocea* เมล็ดมีสีหลายชนิด เช่น ขาว (ขุ่นๆ หรือปนเหลืองนิดๆ) หรือสีน้ำเงินคล้ำ หรือมีทั้งสีขาวและสีน้ำเงินคล้ำในฝักเดียวกัน ข้าวโพดสีคล้ำนี้จะมีไนอาซีน สูงกว่าข้าวโพดที่มีแป้งสีขาว

6) ข้าวโพดเทียน (waxy corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays ceratina* เป็นข้าวโพดที่ใช้รับประทาน จะมีแป้งที่มีลักษณะเฉพาะคือ นุ่มเหนียว เพราะในเนื้อแป้งจะประกอบด้วยแป้งพวกอะไมโลเปคติน (amylopectin) ส่วนข้าวโพดอื่นๆ มีแป้งอะไมโลส (amylose) ประกอบอยู่ด้วย จึงทำให้แป้งค่อนข้างแข็ง

7) ข้าวโพดป่า (pod corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays tunica* มีลักษณะใกล้เคียงข้าวโพดพันธุ์ป่า มีลำต้นและฝักเล็กกว่าข้าวโพดธรรมดา ขนาดเมล็ดค่อนข้างเล็กเท่าๆ กับเมล็ดข้าวโพด มีขั้วเปลือกหุ้มทุกเมล็ด และยังมีเปลือกหุ้มฝักอีกชั้นหนึ่ง เหมือนข้าวโพดธรรมดาทั่ว ๆ ไป เมล็ดมีลักษณะต่างๆ กัน ข้าวโพดชนิดนี้ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปลูกไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น

ข้าวโพด นอกจากจะเป็นพืชที่สำคัญต่อเศรษฐกิจในประเทศไทยเรา ที่ให้คุณค่าต่างๆ มากมาย ทั้งการบริโภค การแปรรูป และใช้สร้างรายได้เพิ่ม เนื่องจากข้าวโพดเป็นพืชที่ปลูกง่ายและการดูแลที่ไม่ซับซ้อนมากนัก ออกผลผลิตได้ทีละมาก อีกทั้งยังมีส่วนประกอบทางเคมีที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ส่วนประกอบทางเคมีของข้าวโพด

ส่วนประกอบทางเคมี	**ปริมาณ (กรัม/100 กรัม)**
คาร์โบไฮเดรต	75.32
โปรตีน	9.78
ไขมัน	4.58
เส้นใย	1.32
เหล็ก	1.98
ทองแดง	0.30
แมกนีเซียม	0.16
สังกะสี	1.23
ความชื้น	7.74
เถ้า	1.30

ที่มา: P. Guria. (2006).

นอกจากข้าวโพดจะมีคุณค่าทางสารอาหารสูงแล้ว ยังอาจมีการปนเปื้อนของสารพิษหลายชนิด โดยเฉพาะที่สำคัญ คือ อะฟลาท็อกซิน (aflatoxin) ที่มีอันตรายต่อคนและสัตว์ ก่อนที่เราจะนำข้าวโพดมารับประทาน โดยเฉพาะข้าวโพดแห้งหรือผลิตภัณฑ์จากข้าวโพด ควรตรวจดูให้แน่ใจก่อน เพราะข้าวโพดมีความชื้นสูง และจะขึ้นราได้ง่าย

ปัจจุบันผู้บริโภคเริ่มให้ความสำคัญกับสุขภาพ มีแนวโน้มที่จะบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้น จึงได้มีการนำข้าวโพดมารับประทานในรูปแบบอาหารคาวหวาน นิยมนำมาเป็นอาหารว่างระหว่างมื้ออาหาร โดยการนำมาต้ม ปิ้ง คั่ว คลุกเนยทอด หรือการใช้ประโยชน์จากการนำข้าวโพดมาแปรรูป เช่น แป้งข้าวโพด น้ำนมข้าวโพด กาแฟข้าวโพด ข้าวเกรียบข้าวโพด น้ำพริกเผาข้าวโพด น้ำตาลผง น้ำเชื่อม น้ำหวาน น้ำสลัด เนยเทียม มายองเนส เครื่องสำอาง น้ำมันใส่ผม น้ำหอม สบู่ น้ำยาทำความสะอาด กระดาษ ยา ผ้า เป็นต้น เป็นต้น สิ่งหนึ่งที่ทำให้ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่นิยม

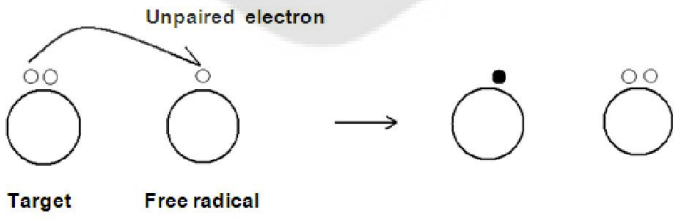
นำมาแปรรูปเป็นอาหารนานาชนิดก็เนื่องจากเป็นพืชที่ให้พลังงานสูง เพราะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบหลัก อีกทั้งยังมีโปรตีน ไขมัน เกลือแร่ และวิตามินที่มีประโยชน์อีกมากมาย

ซึ่งการแปรรูปข้าวโพด เช่น น้ำนมข้าวโพด เป็นเครื่องดื่มชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความนิยมในการบริโภคอย่างแพร่หลาย สำหรับเป็นอาหารว่างใช้รับประทานเสริมอาหารเช้าหรือเป็นเครื่องดื่มบรรจุในภาชนะปิดมิดชิด มีรสชาติดี มีกลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นเฉพาะของข้าวโพดหวานและมีสีเหลืองทองคล้ายสีของเมล็ดข้าวโพดหวาน และสารอาหารในน้ำนมข้าวโพด มีดังนี้ โปรตีน 0.89 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.23 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 0.38 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 90.33 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาล 8 บริกซ์ สารอาหารที่เป็นประโยชน์อื่นๆ ได้แก่ วิตามิน และเส้นใย (ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ. 2544)

สำหรับการแปรรูปข้าวโพดสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมบรรจุกระป๋อง สามารถแปรรูปได้หลายรูปแบบ เช่น ในรูปปรุงแต่งไม่แช่เย็นจนแข็ง หรือแช่แข็งเป็นข้าวโพดแช่แข็งทั้งฝัก (frozen corn on cob) และเมล็ดข้าวโพดแช่แข็ง (frozen whole kernel) ในรูปของเมล็ดข้าวโพด (whole kernel corn) ครีมข้าวโพด (cream style corn) และข้าวโพดหวานบรรจุถุงสุญญากาศ

อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและกรดเฟอร์รูริก

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ อะตอมหรือโมเลกุลของออกซิเจนที่มีอิเล็กตรอนเป็นจำนวนคี่ (unpaired electron) อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด และชอบจับคู่กับโมเลกุลอื่น โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (T. Yoshikawa; et al. 2000; G.R. Buettner. 2001; & M. Valko; et al. 2007) ดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับเป้าหมาย

ที่มา: ดัดแปลงจาก นามโชติ. (2555).

ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น ไฮดรอกซิลแรดิคัล (hydroxyl radical, $OH^{\bullet}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, $O_2^{\bullet-}$) ไฮโดรเปอร์ออกซิลแรดิคัล (hydroperoxyl radical, $HOO^{\bullet}$) และอัลคอกซิลแรดิคัล (alkoxyl radical, $RO^{\bullet}$) เป็นต้น (B. Halliwell. 2009) ซึ่งสามารถพบอนุมูลอิสระของออกซิเจนชนิดต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต โดยมีสาเหตุและปัจจัยทั้งจากภายในและภายนอกร่างกาย ดังนี้

1) ปัจจัยภายในร่างกาย ได้แก่

1.1) ปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน (autooxidation) เป็นกระบวนการทางธรรมชาติที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลออกซิเจนกับไขมันไม่อิ่มตัว เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (M. Chaijan. 2008)

1.2) ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ได้แก่ เอนไซม์ แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase, XO) และเอนไซม์ไลโพออกซีจีเนส (lipoxygenase, LOX) (B. Halliwell; et al. 1995)

2) ปัจจัยภายนอกร่างกาย ได้แก่ รังสี ควันบุหรี่ และยารักษาโรค

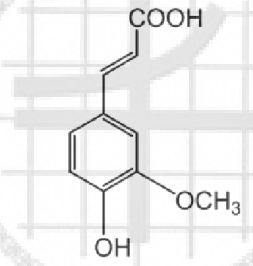
สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นสารที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้พวกอนุมูลอิสระก่อตัวขึ้น โดยจะทำการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระและหยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระที่ไปทำลายเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย รวมทั้งช่วยกำจัดและแทนที่โมเลกุลที่ถูกทำลาย ซึ่งกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (G. valacchi; et al. 2004 and D.A. Scott; et al. 2005) ซึ่งอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญก่อให้เกิดโรค จึงมีการป้องกันอันตรายจากสารนี้โดยทดลองใช้สารต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบต่างๆ เพื่อชะลอความชราและการเกิดโรค

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ มี 2 ประเภทได้แก่

1) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่นสีและรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้ เช่น โพรพิลแกลเลต (propyl gallate) 2-บิวทิเลเตดไฮดรอกซีแอนิโซล (2-butylated hydroxyanisole) บิวทิเลเตดไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene) (J. Pokorny; et al. 2001 and H.S. Yim; et al. 2013)

2) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้จากแหล่งธรรมชาติทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีหลายชนิด เช่น วิตามินต่างๆ ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโทน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอล ที่มีโครงสร้างของออร์โธไดไฮดรอกซิลฟีนอล (ortho-dihydroxyl phenol) อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\cdot}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (C.S. Moreno; et al. 2000 and H. Sies; et al. 1992)

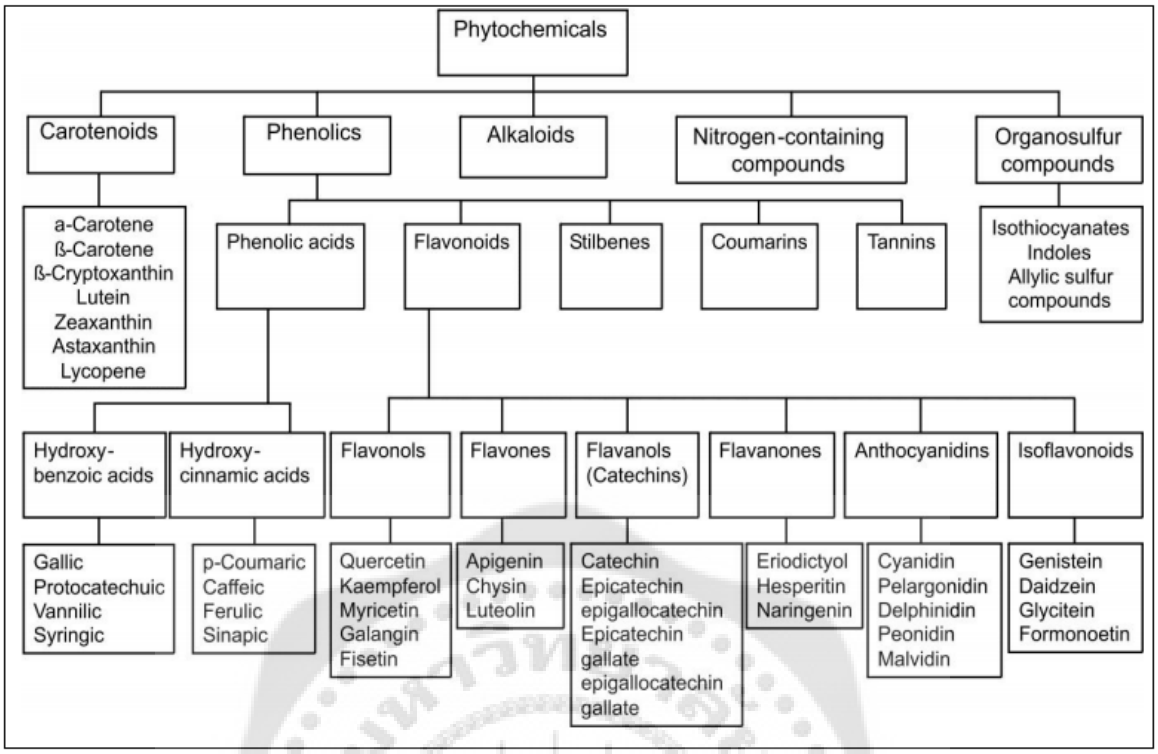
กรดเฟอร์รูริก หรือ (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) มีชื่อเรียกตามระบบ IUPAC คือ (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) prop-2-enoic acid มีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังภาพประกอบ 2 มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{10}H_{10}O_4$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 194.18 กรัม/โมล มีลักษณะทางกายภาพเป็น ผงผลึก มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 168-172 °C



ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดเฟอร์รูริก

ที่มา: ดัดแปลงจาก D. Boskou; et al. (2006).

กรดนี้เป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นโดยพืช ซึ่งกรดเฟอร์รูริกจัดว่าเป็นสารในกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) ดังภาพประกอบ 3 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดที่พบได้ทั่วไปในพืช โดยปกติจะเกิดขึ้นจากหลายๆ รูปแบบ เช่น เกิดจากการย่อยของเอนไซม์หรือการเชื่อมกันของเอสเทอร์ของกรดไฮดรอกซี (hydroxy acids) (Oryza Oil & Fat Chemical Ver. 1.1M.)



ภาพประกอบ 3 หมวดหมู่ของสารไฟโตเคมีคอล (phytochemical)

ที่มา: R.H. Liu. (2011).

กรดเฟอร์รูริก เป็นสารที่พบในใบและเมล็ดของพืชหลายชนิด มีคุณสมบัติช่วยให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรง แหล่งที่พบมากที่สุดคือในธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต เมล็ดกาแฟ แอปเปิล อาติโช๊ค ถั่วลิสง ส้มและสับปะรด นอกจากนี้ยังสามารถสกัดได้จากรำข้าวสาลีและข้าวโพด และยังมีประโยชน์ต่อร่ายกายอีกมากมายซึ่งช่วยในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย เช่น ป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง โรคหัวใจ ไข้หวัด รักษาสุขภาพของกล้ามเนื้อ ต่อต้านผลกระทบจากรังสีอัลตราไวโอเลต จึงช่วยป้องกันมะเร็งผิวหนังได้ (S. Zhao; et al. 2013) นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางอีกด้วย (C. Rossi; et al. 2005) กรดเฟอร์รูริกจะทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิโพออกซีจีเนส (lipoxygenase) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (R. Puerta. 1999)

จะเห็นว่า กรดเฟอร์รูริกซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟีโนลิกที่มีคุณสมบัติสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง ที่มีรายงานการพบได้ในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในข้าวโพด (L.Y. Liangli; et al. 2012)

การเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิธีวิเคราะห์

การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีการแยกและการทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยอาศัยหลักการของการกระจายตัว (distribution) ของตัวถูกละลายในตัวทำละลาย 2 ชนิด ที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อตัวถูกละลายแพร่กระจายในตัวทำละลายทั้งสองจนถึงสมดุล อัตราส่วนของความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายทั้งสองจะมีค่าคงที่ หลักการของการสกัด คือ การใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสม การสกัดสามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธี ดังนี้

1) การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวออกจากของแข็ง (solid-liquid extraction) เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของแข็ง ซึ่งการสกัดวิธีนี้ทำได้โดยนำของแข็งสกัดในตัวทำละลายที่ต้องการ

2) การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวออกจากของเหลว (liquid-liquid extraction) เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของเหลว ซึ่งตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดควรมีสมบัติเดียวกับตัวทำละลายที่เลือก

3) การสกัดโดยใช้กรดหรือเบส (acid-base extraction) เป็นการใช้ปฏิกิริยากรดเบสเพื่อแยกสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นกรดแก่ กรดอ่อน กลาง และเบสออกจากกัน โดยหลักการของการสกัดวิธีนี้คือ สารเหล่านี้อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดหรือเบสที่เหมาะสมก็จะเกิดเป็นเกลือ ซึ่งอยู่ในรูปของไอออนจึงละลายน้ำได้ดี ทำให้สามารถแยกออกจากสารที่ไม่แตกตัวอื่นๆ ได้โดยง่าย

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้วิเคราะห์ทางเคมี

ตามปกติสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์ มีสิ่งเจือปนหรือสารรบกวนต่างๆ รวมอยู่ด้วย ดังนั้นจึงต้องทำการแยกสารที่สนใจออกจากจากสิ่งเจือปน เพื่อป้องกันไม่ให้มีผลรบกวนการวิเคราะห์สารที่สนใจตรวจสอบในตัวอย่าง ดังนั้น วิธีการการเตรียมตัวอย่างจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมากสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี

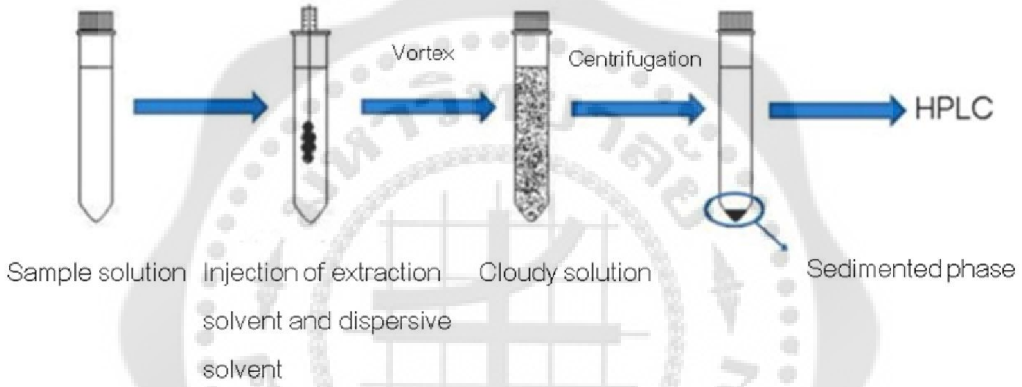
การสกัดสารให้บริสุทธิ์และการสกัดสารเพื่อเพิ่มความเข้มข้น

1) วิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส (alkaline hydrolysis method)

วิธีนี้เป็นการนำตัวอย่างไปทำปฏิกิริยากับด่างในสภาวะที่เหมาะสม เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งจะช่วยให้สารที่สกัดมีความบริสุทธิ์และสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการ อีกทั้งเป็นกระบวนการที่ลดการสูญเสียสารกลุ่มไฟโตนิวเทรียนต์ให้น้อยที่สุด

2) วิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน (dispersive liquid-liquid microextraction method, DLLME)

วิธีนี้เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลายปริมาณน้อย โดยในขั้นตอนการสกัดนั้นจะใช้สารละลาย 2 ชนิด คือ ตัวทำละลายสกัด (extraction solvent) ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ (water immiscible solvent) และตัวทำละลายกระจาย (dispersive solvent) ที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ (water miscible solvent) ส่งผลให้สารละลายที่สกัดได้จากการสกัดวิธีนี้มีลักษณะขุ่น (cloudy state) เนื่องจากการเกิดหยดของตัวทำละลายอินทรีย์เล็กๆ ลอยอยู่ในเฟสน้ำ โดยรวมจึงเรียกว่า cloudy solution ซึ่งการเกิดนี้จะทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายมวล (mass transfer) ของสารละลายที่ถูกสกัดซึ่งอยู่ในสารละลายตัวอย่าง ไปสู่ตัวทำละลายสกัด ดังนั้นการเกิด cloudy solution จึงเป็นผลจากการฉีดตัวทำละลายกระจายอย่างรุนแรงเพื่อให้เฟส 2 เฟส สามารถเคลื่อนที่เข้าหากันได้อย่างดี เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด ดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 กระบวนการสกัดด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Y. Zhang & H.K. Lee. (2012).

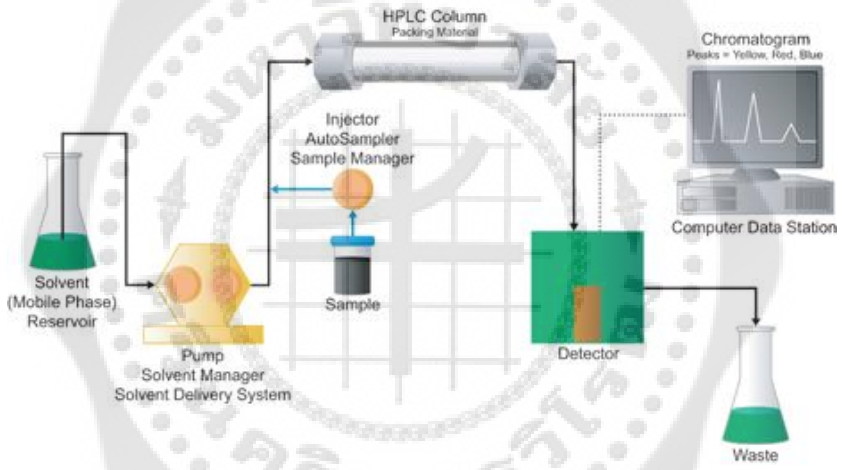
การเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย ดังกล่าวข้างต้นพบว่า การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน เป็นวิธีการสกัดแบบใหม่ที่ใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อยมาก และมีความเหมาะสมกับการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบระหว่างเฟส

2 เฟส คือ เฟสคงที่ (stationary phase) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวพาไป ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสเคลื่อนที่หรือเฟสคงที่ สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็ว สารนั้นจะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสเคลื่อนที่หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสคงที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้า ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้ จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด (detector) สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งเรียกว่า โครมาโทแกรม โดยเทคนิคนี้จะสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งส่วนใหญ่นิยมนำมาทดสอบสารประกอบที่ระเหยได้ยาก (low volatile substation) หรือสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight compounds) โดยมีส่วนประกอบของเครื่อง HPLC ดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 ส่วนประกอบของเครื่อง High Performance Liquid Chromatography, HPLC

ที่มา: ชัยวาฤทธิ์. (2012).

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1995 เอส เคอมาชา และคณะ (S. Kermasha; et al. 1995: 245-252) ได้ทำการวิเคราะห์กรดฟีนอลิก และสารประกอบเฟอร์ฟูรัลในตัวอย่างน้ำแอปเปิ้ล ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นไดโอดอาร์เรย์ และอิเล็กโตรเคมิคอล นำตัวอย่างที่ซื้อจากแหล่งต่างๆ มากรองแล้วทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ Econosil C_{18} ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นอะซิโตไนไตรล์ (phase A) ต่อ 0.75% กรดไตรคลอโรอะซิติก (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบเกรเดียนต์ (gradient) ควบคุมอัตราการไหล ที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 320 นาโนเมตร และค่าศักย์ไฟฟ้า 600 มิลลิโวลต์ จากการศึกษาพบว่าได้มีการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกและสารประกอบเฟอร์ฟูรัลในตัวอย่างน้ำแอปเปิ้ล มีค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) ที่ความยาวคลื่น 280 และ 320 นาโนเมตร และค่าศักย์ไฟฟ้า 600 มิลลิโวลต์ เท่ากับ 0.100, 0.050 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 1996 โอ เนกิชิ และที โอซาวา (O. Negishi; & T. Ozawa. 1996: 129-136) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ไฮดรอกซีเบนซาลดีไฮด์ ไฮดรอกซีเบนซิลแอลกอฮอล์ และกลูโคไซด์ จากสารสกัดที่ได้จาก Vanilla planifolia green beans ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นยูวีวิสิเบิล สเปกโทรสโกปี โดยนำตัวอย่างมาทำให้สารแขวนลอยในเมทานอล และทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาสกัดอีกครั้งด้วยเมทานอล และระเหยให้เหลือปริมาตรน้อยกว่า 1 มิลลิลิตร ภายใต้ความดันและอุณหภูมิ หลังจากนั้นเติมน้ำปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดด้วยนอร์มอล-เพนเทน (n-pantane) และนำมาสกัดต่อด้วยสารละลายอีเทอร์ ซึ่งในส่วนนี้จะเปลี่ยนรูปเป็นอะไกลโคน (aglycones) จากนั้นนำไประเหยแห้งและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล แล้วทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ TSK-gel C_{18} ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ระบบ ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าวิธีดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ไฮดรอกซีเบนซาลดีไฮด์ ไฮดรอกซี เบนซิลแอลกอฮอล์ และกลูโคไซด์ จากสารสกัดที่ได้จาก Vanilla planifolia green beans

ในปี ค.ศ. 2000 เอ็ม เอฟ แอนด์ดรีเซน และคณะ (M.F. Andreasen; et al. 2000: 2837-2842) ได้ทำการศึกษาปริมาณกรดฟีนอลิก และกรดเฟอร์รูริกดีไฮโดรไดเมอร์ (ferulic acid dehydrodimers) ในตัวอย่างข้าวไรน์ (*Secale cereal* L.) 17 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส โดยนำตัวอย่างไปทำปฏิกิริยากับเมทานอล ที่อุณหภูมิง 25 °C (ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนและในที่มืด) จากนั้นปรับ pH ให้น้อยกว่า 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) แล้วนำไปเหวี่ยงแยก จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเหวี่ยงแยกอีกครั้ง จากนั้นนำชั้นของสารอินทรีย์มาระเหยภายใต้ความดันและอุณหภูมิ 30 °C และนำมาละลายด้วย เมทานอล และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ LiCroCART C_{18} วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์, pH 2.15 (phase A) และเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (40:60, v/v), pH 2.15 (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

จากการศึกษาพบว่าในข้าวไรน์สายพันธุ์ *Ponsi* และ *Nikita* มีปริมาณกรดกรดฟีนอลิก และกรดเฟอร์รูริกดีไฮโดรไดเมอร์สูงที่สุด

ในปี ค.ศ. 2001 ดี เฮอแมนซ์ และคณะ (D. Hernanz; et al. 2001: 4884-4888) ได้ทำการศึกษาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก และกรดเฟอร์รูริกดีไฮโดรไดเมอร์ ในตัวอย่างข้าวบาร์เลย์ 11 ชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นโฟโตไดโอดอาร์เรย์ เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วยเอทานอล และสกัดต่อด้วยเฮกเซนด้วยเครื่องอัลตราโซนิค แล้วนำไปเหวี่ยงแยก จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่สกัดไปทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (บ่มภายใต้แก๊สไนโตรเจน) จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยก นำส่วนใสมาเติมกรดไฮโดรคลอริก และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำมาระเหยแห้งและนำมาละลายด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและน้ำ แล้วทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ Nova-pack C_{18} ขนาด 30 เซนติเมตร x 3.9 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำต่อกรดอะซิติก ในอัตราส่วน 98:2, v/v (phase A) และน้ำต่ออะซิโตไนไตรล์ต่อกรดอะซิติก ในอัตราส่วน 78:20:2, v/v/v (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการศึกษาด้วยวิธีการดังกล่าวพบว่าสามารถนำมาหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก และกรดเฟอร์รูริกดีไฮโดรไดเมอร์ในข้าวบาร์เลย์ ทั้ง 11 ชนิด ได้

ในปี ค.ศ. 2002 เค เค อาดัม และอาร์ เอส ลิว (K. K. Adam; & R.H. Liu. 2002: 6182-6187) ได้ทำการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของธัญพืช ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต และข้าว โดยทำการทดสอบวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ด้วยการทำปฏิกิริยากับ Folin–Ciocalteu's reagent และหาปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยให้อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนฟลาโวนอยด์-อะลูมินัม พร้อมกับทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร และหาปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส โดยนำตัวอย่างไปทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และระเหยภายใต้แก๊สไนโตรเจนและอุณหภูมิ 35°C แล้วทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ Supelcosil LC-18-DB C_{18} ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นอะซิโตไนไตรล์ 20% (phase A) และกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (triflouroacetic acid) (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบไอโซเครติค (isocratic) ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าข้าวโพดมีสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ตามด้วยข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต และข้าว ตามลำดับ และให้ค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 105.13±5.23

ในปี ค.ศ. 2004 เอ็ม นาร์ดินี และเอ กิเซลลี (M. Nardini; & A. Ghiselli. 2004: 137-143) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระ (free phenolic compounds) และสารประกอบฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic compounds) ในตัวอย่างเบียร์ 3 ชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นอิเล็กโตรเคมิคอลคูลอมเมตริก โดยเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างระหว่างวิธีที่ไม่ทำไฮโดรไลซิสกับวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส โดยทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ Supelcosil LC-18 C_{18} ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดอะซิติก 1.25% (phase A) และเมทานอล (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ค่าศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ +600 มิลลิโวลต์ จากการศึกษาพบว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิสทำให้ปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระ และกรดฟีนอลิกยึดเหนี่ยวในเบียร์ทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าวิธีที่ไม่ทำไฮโดรไลซิส

ในปี ค.ศ. 2006 จี ออสคาน และเอ็น จี เบดาร์ (G. Ozkan; & N. G. Baydar. 2006: 229-234) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในตัวอย่างไวน์แดง 4 ชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นไดโอดอาร์เรย์ โดยทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ C_{18} ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดอะซิติกต่อน้ำ ในอัตราส่วน 2:98, v/v (phase A) และเมทานอล (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในไวน์แดงทั้ง 4 ชนิด โดยสามารถแยกสารประกอบฟีนอลิกได้ภายในระยะเวลา 60 นาที

ในปี ค.ศ. 2007 เอส ไอ มัสซาต์โต และคณะ (S.I. Mussatto; et al. 2007: 231-237) ได้ทำการศึกษาปริมาณกรดเฟอร์รูริก และกรดพารา-คูมาริก ในตัวอย่างกากเบียร์ 11 ชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส แล้วทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ Waters Resolve C_{18} ขนาด 3.9 x 300 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นอะซิโตไนไตรล์ (phase A) และน้ำ (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบไอโซเครติค ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 276 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) และพบว่ามีปริมาณกรดเฟอร์รูริก และกรดพี-คูมาริก ในกากเบียร์ ทั้ง 11 ชนิด สูงที่สุดเท่ากับ 145.3 และ 138.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2008 พี ทอร์เร และคณะ (P. Torre; et al. 2008: 500-506) ได้ทำการศึกษากรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างซังข้าวโพด โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส และหาปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี โดยทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ Vydac 201TP54 C_{18} วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 1% กรดอะซิติก (phase A) และกรดอะซิติกต่อน้ำต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 1:9:10%, v/v (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบ เกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ และพบว่ามีปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างซังข้าวโพด เท่ากับ 1171.0±34.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2009 เอช ฟาราจิ และคณะ (H. Faraji; et al. 2009: 8569-8574) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก ในตัวอย่างน้ำ โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีลิควิด-ลิควิดไมโครเอ็กแทรคชัน (liquid-liquid microextraction, LLME) โดยนำตัวอย่างใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมโพแทสเซียมคาร์บอเนต และอะซิติกแอนไฮดรายด์ แล้วเขย่า และเติม 1-อันเดคานอล (1-undecanol) แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า และนำสารสกัดที่ได้ไปหาปริมาณด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมทรี แล้วทำการแยกสารด้วยคอลัมน์แคพิลลารี่ HP-5 MS ขนาด 30 x 0.25 มิลลิเมตร ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีลิควิด-ลิควิดไมโครเอ็กแทรคชัน คือ โพแทสเซียมคาร์บอเนต และอะซิติกแอนไฮดรายด์ ใช้เป็นรีเอเจนต์ในการทำอนุพันธุ์ และ 1-อันเดคานอล ใช้เป็นตัวทำละลายที่ช่วยในการสกัด จากการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมพบว่าสารประกอบฟีนอลิกในน้ำ ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ เท่ากับ 0.005-0.68 ไมโครกรัมต่อลิตร และให้ค่าร้อยละการกลับคืนมากกว่า 84 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก มีความรวดเร็ว ง่าย และสะดวกในการวิเคราะห์ อีกทั้งยังมีราคาไม่แพง

ในปี ค.ศ. 2012 พี ไบพาร์วา และคณะ (P. Biparva; et al. 2012: 87-94) ได้ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ บิวทิเลเตดไฮดรอกซีอะนีโซล และบิวทิเลเตดไฮดรอกซีโทลูอีน ในตัวอย่างน้ำผลไม้ โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ด้วยตัวทำละลายที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่เบากว่าน้ำ โดยนำสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน ใส่ลงในหลอดทดลองที่ประดิษฐ์ขึ้นมาใหม่ จากนั้นฉีดโซเดียมคลอไรด์ และสารผสมของ 2-เอทิล-1-เฮกซานอล และอะซิโตน ลงไปอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า แล้วนำไปเหวี่ยงแยก จากนั้นนำชั้นของสารอินทรีย์ที่ลอยอยู่ชั้นบนเพื่อไว้วิเคราะห์ และหาปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี แล้วทำการแยกสารด้วยคอลัมน์

C_{18} ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลต่อน้ำต่อกรดอะซิติก ในอัตราส่วน 75:24:1, v/v/v ใช้ระบบการไหลแบบไอโซเครติค ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน คือ 2-เอทิล-1-เฮกซานอล ใช้เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และอะซิโตน ใช้เป็นตัวทำละลายที่ช่วยในการกระจาย จากการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมพบว่า บิวทิเลเตดไฮดรอกซีอะนีโซล และบิวทิเลเตดไฮดรอกซีโทลูอีน ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ เท่ากับ 2.5 และ 0.9 ไมโครกรัมต่อลิตร และให้ค่าความสามารถในการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจ (enrichment factors) เท่ากับ 208 และ 203 ตามลำดับ และให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 94.0-99.8 ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นและสามารถนำไปประยุกต์เพื่อหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ในตัวอย่างน้ำผลไม้ชนิดอื่นๆ ได้

ในปี ค.ศ. 2013 บี ชามมุกัสซามี่ และคณะ (B. Shammugasamy; et al. 2013: 31-37) ได้ทำการศึกษาโทโคฟีรอล (tocopherols) และโทโคไตรอีนอล (tocotrienols) ในตัวอย่างธัญพืช ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นฟลูออเรสเซนต์ โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีซาพอนนิฟิเคชัน และวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน โดยนำตัวอย่างใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว จากนั้นเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เอทานอล โซเดียมคลอไรด์ อะซิติกแอนไฮดรายด์ และโพแทสเซียมคาร์บอเนต จากนั้นนำสารละลายผสมที่ได้ไปบ่มด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมกับการกวนสาร จากนั้นนำมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า และนำไปเหวี่ยงแยก จากนั้นนำสารละลายส่วนใสไปสกัดต่อด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน โดยนำสารละลายที่ได้จากการสกัดดังกล่าวลงในขวดปริมาตรทรงกรวย จากนั้นเติมสารผสมของเตตระคลอโรมีเทน และอะซิโตไนไตรล์ แล้วฉีดน้ำที่ปราศจากไอออนลงไปอย่างรวดเร็ว แล้วเขย่าเบาๆ และตั้งทิ้งไว้ แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า แล้วนำไปเหวี่ยงแยก และจากนั้นเก็บสารละลายที่สกัดได้เพื่อไว้วิเคราะห์ แล้วทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ COSMOSIL π-NAP C_{18} ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำต่อเมทานอลต่ออะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 13:80:7, v/v/v ใช้ระบบการไหลแบบไอโซเครติค ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น Ex/Em = 295/330 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี DLLME คือ เตตระคลอโรมีเทน ใช้เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และอะซิโตไนไตรล์ ใช้เป็นตัวทำละลายที่ช่วยในการกระจาย จากการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมพบว่าให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และให้ค่าความสามารถในการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจ อยู่ในช่วง 0.01-0.11 และ 50-73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 85.5-116.6 ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว ง่าย และสะดวกในการวิเคราะห์ อีกทั้งยังมีราคาไม่แพง

ในปี ค.ศ. 2013 เอ็ม พี โกดอย คาเบลเลโร และคณะ (M.P. Godoy-Caballero; et al. 2013: 291-301) ได้ทำการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในตัวอย่างน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นไดโอดอาร์เรย์และแมสสเปกโทรเมทรี โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีรีเวิร์สเฟส ดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิดไมโครเอ็กแทรคชัน (reversed phase dispersive liquid–liquid microextraction, RP-DLLME) โดยนำตัวอย่างใส่ลงในหลอดทดลองที่มีเอทานอล และน้ำ จากนั้นฉีดเติม 1,4-ไดออกเซน ลงไปอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า และนำไปเหวี่ยงแยก จากนั้นทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB C_{18} ขนาด 50 x 4.6 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำกับกรดอะซิติก 0.5 % และอะซิโตไนไตรล์ 1% (phase A) และอะซิโตไนไตรล์กับกรดอะซิติก 0.5% (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีรีเวิร์สเฟส ดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิดไมโครเอ็กแทรคชัน คือ เอทานอล และน้ำ ใช้เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และ 1,4-ไดออกเซน (1,4-dioxane) ใช้เป็นตัวทำละลายที่ช่วยในการกระจาย จากการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมพบว่าให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ที่ได้จากตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นไดโอดอาร์เรย์และแมสสเปกโทรเมทรีอยู่ในช่วง 10-400 และ 1-200 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องจากตัวตรวจวัดชนิดแมสสเปกโทรเมทรีที่ให้ความไวในการตรวจวัดสูง แต่มีราคาแพง จึงสามารถใช้ตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์แทนได้ซึ่งก็ให้ช่วงของการตรวจวัดที่กว้างและให้ค่าความถูกต้องได้เช่นเดียวกัน

เนื่องจากยังไม่พบรายงานสำหรับการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน จากตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด แต่จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่ามีการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ในตัวอย่างที่แตกต่างกันไปโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้การสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส และวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาและวิจัยเพื่อพัฒนาให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างชนิดอื่นๆ ต่อไปได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์ (diode array detector) จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100
- คอลัมน์ C_{18} (SphereClone 5 µm ODS, ขนาด 250 x 4.60 mm) จากบริษัท Phenomenex
- เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโทรโฟโทมิเตอร์ รุ่น UV-2401 PC จากบริษัท Shimadzu
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (Mettier Toledo รุ่น AB104-S) จากบริษัท Mettler
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนรุ่น LaboStar จากบริษัท Siemens
- เครื่องเขย่า (vortex) รุ่น Vortex-genie 2 จากบริษัท Scientific Industries
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Zentrifugen EBA 8S จากบริษัท Hettich
- เครื่องอัลตราโซนิค (ultrasonic) จากบริษัท Mettler electronic
- เครื่องให้ความร้อน (hotplate) จากบริษัท Scientific
- เครื่อง pH meter จากบริษัท Mettier Toledo
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จากบริษัท Memmert
- ไมโครปิเปตขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร จากบริษัท Socorex
- ชุดกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากบริษัท Alltech
- ไซรินจ์ฟิลเตอร์ (syringe filters) ชนิด PTFE (polytetrafluoroethylene) ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท International Scientific

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- กรดอะซิติก (acetic acid, AR grade) จากบริษัท Merck
- โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, AR grade) จากบริษัท RCI Lab San
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, AR grade) จากบริษัท RCI Lab San
- ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- ไตรคลอโรมีเทน (trichloromethane, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate, AR grade) จากบริษัท RCI Lab San

- โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (patassium hydroxide, AR grade) จากบริษัท RCI Lab San
- เมทานอล (methanol, HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- สารมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก (standard ferulic acid) จากปริษัท Sigma-Aldrich
- อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile, HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- อะซิโตน (acetone, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- เอทานอล (ethanol, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents

3. ตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

3.1 ข้าวโพดหวาน
3.2 ข้าวโพดข้าวเหนียวขาว
3.3 ข้าวโพดข้าวเหนียวดำ
3.4 ข้าวโพดอ่อน
3.5 ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์หรือข้าวโพดอบกรอบแห้ง
3.6 ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด
3.7 ผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์นหรือข้าวโพดคั่ว

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก

ทำการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ได้แก่ การศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย ปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย เวลาที่ใช้ในการสกัด และเวลาในการหมุนเหวี่ยง

1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย

1.1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัด

โดยทำการทดลองดังนี้

1.1.1.1 นำสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส

1.1.1.2 จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดไดคลอโรมีเทน และตัวทำละลายกระจายอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน (1:10 v/v)

1.1.1.3 ฉีดน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว แล้วเขย่าเบาๆ และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที

1.1.1.4 แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 10 วินาทีและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จะแยกออกเป็นสองชั้น

1.1.1.5 นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากชั้นล่าง ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร

1.1.1.6 ทำนองเดียวกัน ทำการศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัด โดยเปลี่ยนเป็นใช้ตัวทำละลายสกัดไตรคลอโรมีเทน แล้วทำการทดลองด้วยวิธีข้างต้น

1.1.2 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายกระจาย

โดยทำการทดลองดังนี้

1.1.2.1 นำสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส

1.1.2.2 จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดไดคลอโรมีเทน และตัวทำละลายกระจายอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน (1:10 v/v)

1.1.2.3 ฉีดน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว แล้วเขย่าเบาๆ และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที

1.1.2.4 แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 10 วินาทีและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จะแยกออกเป็นสองชั้น

1.1.2.5 นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากชั้นล่าง ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร

1.1.2.6 ทำนองเดียวกัน ทำการศึกษาชนิดของตัวทำละลายกระจาย โดยเปลี่ยนเป็นใช้ตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตน และเอทานอล แล้วทำการทดลองด้วยวิธีข้างต้น

1.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย

โดยทำการทดลองดังนี้

1.2.1 นำสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส

1.2.2 จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน (1:10 v/v) ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 1.1 มา 80 100 120 และ 140 ไมโครลิตร และ 0.80 1.00 1.20 และ 1.40 มิลลิลิตร ตามลำดับ

1.2.3 ฉีดน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว แล้วเขย่าเบาๆ และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที

1.2.4 แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 10 วินาทีและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จะแยกออกเป็นสองชั้น

1.2.5 นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากชั้นล่าง ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร

1.3 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัด

โดยทำการทดลองดังนี้

1.3.1 นำสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส

1.3.2 จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน (1:10 v/v) ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 1.1 ด้วยปริมาตรที่ได้จากการทดลองข้อที่ 1.2

1.3.3 ฉีดน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว แล้วเขย่าเบาๆ และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 0.0 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 นาที

1.3.4 แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 10 วินาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จะแยกออกเป็นสองชั้น

1.3.5 นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากชั้นล่าง ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร

1.4 ศึกษาเวลาในการหมุนเหวี่ยง

โดยทำการทดลองดังนี้

1.4.1 นำสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส

1.4.2 จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน (1:10 v/v) ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 1.1 ด้วยปริมาตรที่ได้จากการทดลองข้อที่ 1.2

1.4.3 ฉีดน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว แล้วเขย่าเบาๆ และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาที่ได้จากการทดลองข้อที่ 1.3

1.4.4 แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 10 วินาทีและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 นาที สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จะแยกออกเป็นสองชั้น

1.4.5 นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากชั้นล่าง ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร

ตอนที่ 2 การศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก

ทำการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ได้แก่ การศึกษาผลอุณหภูมิและเวลา และทำการศึกษาผลของการเปรียบเทียบผลระหว่างตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ความร้อนและตัวอย่างข้าวโพดที่ไม่ให้ความร้อน โดยทำการทดลองดังนี้

2.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลา

โดยทำการทดลองดังนี้

2.1.1 นำตัวอย่างข้าวโพดมาต้มที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 20 นาที มา 1.000 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส

2.1.2 แล้วนำไปสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1 จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร

2.1.3 ทำนองเดียวกัน ทำการศึกษาอุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนเป็นระยะเวลา 30 40 50 และ 60 นาที ตามลำดับ และทำการทดลองด้วยวิธีข้างต้น

2.2 ศึกษาผลของการแปรรูปตัวอย่าง

โดยทำการทดลองดังนี้

2.2.1 นำตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ความร้อนและตัวอย่างข้าวโพดที่ไม่ให้ความร้อน มา 1.00 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส

2.2.2 แล้วนำไปสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1 จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร

2.2.3 จากนั้นเปรียบเทียบผลระหว่างตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ความร้อนและตัวอย่างข้าวโพดที่ไม่ให้ความร้อน

ตอนที่ 3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.1 ศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

ทำการศึกษาโดยกำหนดสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

- ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อัตราการไหลของวัฏภาคเลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- คอลัมน์ C_{18} ขนาด 5 µm (250 mm x 4.6 mm)
- อุณหภูมิห้อง (ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)
- ทำการศึกษากรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วน 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30
- ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)

ทำการศึกษาเช่นเดิม แต่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และอะซิโตไนไตรล์ ที่แปรผัน อัตราส่วน 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)

3.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

ทำการศึกษาโดยกำหนดสภาวะต่างๆ ดังนี้

- ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ทำการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเลื่อนที่ที่ 0.7 0.8 0.9 และ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที
- คอลัมน์ C_{18} ขนาด 5 µm (250 mm x 4.6 mm)
- อุณหภูมิห้อง (ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)
- วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 3.1
- ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)

ตอนที่ 4 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดกรดเฟอร์รูริก

การเตรียมสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก ทำการทดลองโดยใช้สารมาตรฐานกรดเฟอร์รูริกที่ 6 ความเข้มข้น คือ 0.5 2.0 10.0 25.0 50.0 และ 100.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก เท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

4.1.2 เจือจางสารละลายมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานตั้งต้น ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 5.0 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ครบ 50 มิลลิลิตร (สารละลาย ก.)

4.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริกที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 2.0 10.0 25.0 และ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปิเปตสารละลาย ก. มา 0.125 0.50 2.50 6.25 และ 12.50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ครบ 25 มิลลิลิตร และกรองสารละลายมาตรฐานที่ได้ด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์ PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน

4.1.5 และนำสารละลายมาตรฐานไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บันทึกโครมาโทแกรมที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 320 นาโนเมตร

4.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทำการศึกษาโดยใช้สารมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก (spiked sample blank) ที่ความเข้มข้น 0.02-0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลองดังนี้

4.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริกที่ความเข้มข้น 0.02 0.05 0.10 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2.2 ฉีดเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริกเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 10 ซ้ำ (n=10) บันทึกโครมาโทแกรมที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด 320 นาโนเมตร

4.2.3 คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหาค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น เขียนกราฟระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับความเข้มข้นเฉลี่ยแต่ละจุด คำนวณหาค่า LOD และ LOQ โดยค่า LOD ให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของสัญญาณ noise (S/N) และ LOQ ให้สัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณ noise (S/N)

จากนั้นคำนวณหาค่า LOD และ LOQ ดังสมการที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

- LOD = 3S/N ..... (1)
- LOQ = 10S/N ..... (2)

4.3 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

โดยการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืน (% recovery) ทำการทดลองโดยนำตัวอย่างข้าวโพด มา 1.00 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดลองตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1-3 ทำการทดลอง 5 ซ้ำ (n=5) จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืนดังสมการที่ 3

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{((C_{\text{in sample}} + C_{\text{added}}) - C_{\text{in sample}})}{C_{\text{added}}} \times 100 \quad \text{..... (3)}$$

เมื่อ $C_{\text{in sample}}$ คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์

C_{added} คือ ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง

4.4 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

ในการศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และความแม่นยำระหว่างวัน (inter-day precision) ทำการทดลองโดยนำตัวอย่างข้าวโพด มา 1.00 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิสมา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วทำการทดลองตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1-3 ทำการทดลอง 5 ซ้ำ (n=5) จากนั้นคำนวณหาค่า %RSD (% relative standard deviation)

ตอนที่ 5 การศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง

5.1 ศึกษาผลของกรดอะมิโน

ศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง โดยศึกษาผลของกรดอะมิโน ได้แก่ กรดแอล-กลูตามิค (L-glutamic acid) กรดไลซีน (lysine acid) กรดทริปโตเฟน (tryptophan acid)

5.2 ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก

ศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง โดยศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิค (gallic acid) กรดแทนนิค (tannic acid) คาเทชิน (catechin)

ทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของกรดเฟอร์รูริก กรดแกลลิค กรดแทนนิค คาเทชิน กรดแอล-กลูตามิค กรดไลซีน และกรดทริปโตเฟน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง

ตอนที่ 6 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

6.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส

(ดัดแปลงจาก B. Shammugasamy *et al*., 2013) โดยทำการทดลองดังนี้

6.1.1 ชั่งตัวอย่าง ปริมาณ 1.00 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.06 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเอทานอล 95% ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.06 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร อะซิติกแอนไฮดรายด์ 0.5% (w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โพแทสเซียมคาร์บอเนต 0.5% (w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเอทานอล 95% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายผสมที่ได้ไปต้มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 45 นาที ด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

6.1.2 จากนั้นนำไปทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 10 วินาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6.1.3 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปสกัดต่อด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน

6.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน

6.2.1 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการทดลองข้อที่ 6.1 มา 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดไดคลอโรมีเทน และตัวทำละลายกระจายอะซิโตไนไตรล์

6.2.2 จากนั้นฉีดน้ำที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว แล้วเขย่าเบาๆ และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที

6.2.3 แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 10 วินาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จะแยกออกเป็นสองชั้น

6.2.4 นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากชั้นล่าง ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

ตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด จัดซื้อจากตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร ดังตารางที่ 2 โดยทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยถุงพลาสติกที่มีซิปปิด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3) จากนั้นบันทึกพื้นที่ใต้พีคของโครมาโทแกรมกรดเฟอร์รูริก เพื่อนำไปเทียบกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ แล้วคำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

ตาราง 2 แหล่งที่มาหรือยี่ห้อการค้าของตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

ลำดับ	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา
S1	ข้าวโพดหวานดิบ	ตลาดสด กทม.
S2	ข้าวโพดข้าวเหนียวขาวดิบ	ตลาดสด กทม.
S3	ข้าวโพดข้าวเหนียวดำดิบ	ตลาดสด กทม.
S4	ข้าวโพดอ่อนดิบ	ตลาดสด กทม.
B1	ข้าวโพดหวานต้ม	ตลาดสด กทม.
B2	ข้าวโพดข้าวเหนียวขาวต้ม	ตลาดสด กทม.
B3	ข้าวโพดข้าวเหนียวดำต้ม	ตลาดสด กทม.

ตาราง 2 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา
B4	ข้าวโพดอ่อนต้ม	ตลาดสด กทม.
P1	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม
P2	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม
P3	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม
P4	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม
P5	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม
P6	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม
P7	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม
P8	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม
P9	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม
P10	ผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์น	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม
P11	ผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์น	ซุปเปอร์มาร์เก็ต กทม

บทที่ 4
ผลการทดลอง

สำหรับการศึกษาการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอผลการวิจัยตามลำดับดังนี้

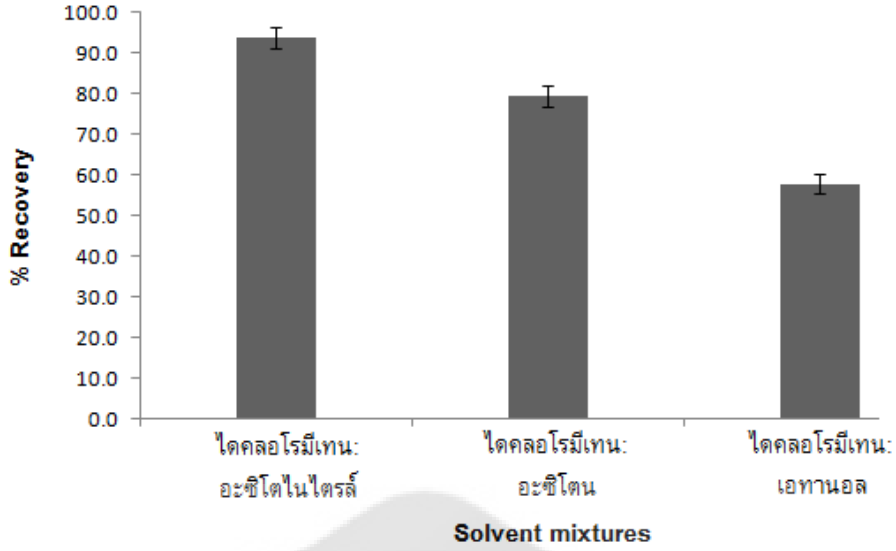
1. ผลการศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก
2. ผลการศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก
3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
4. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์
5. ผลการศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง
6. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

ตอนที่ 1 ผลการศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก

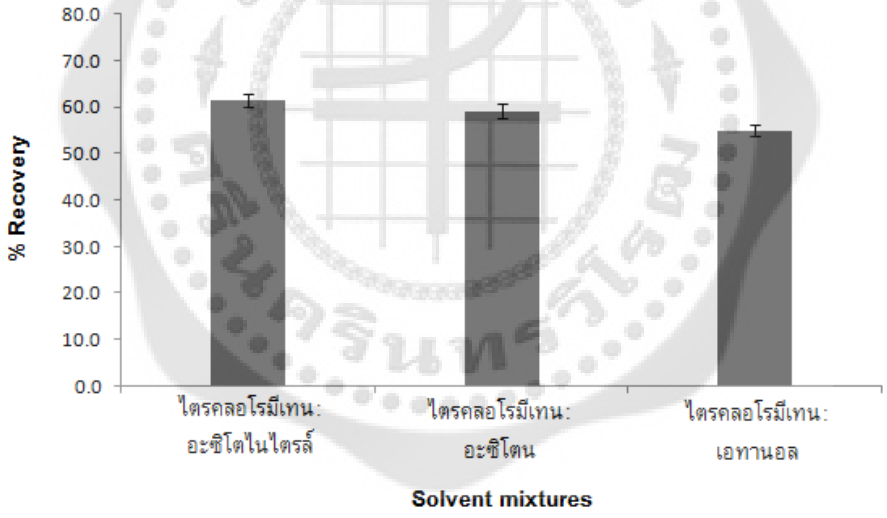
ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย ปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย และเวลาที่ใช้ในการสกัด

1.1 ศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย

การเลือกชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย พบว่า ตัวแปรนี้เป็นตัวแปรที่สำคัญสำหรับการศึกษาวิจัยอย่างมาก เพราะสามารถเป็นตัวกำหนดปริมาณของสารที่เราสนใจสกัด ซึ่งตัวทำละลายสกัดอินทรีย์ที่เลือกพิจารณา 2 ชนิด ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน และไตรคลอโรมีเทน และตัวทำละลายกระจายอินทรีย์ที่เลือกพิจารณา 3 ชนิด ได้แก่ อะซิโตไนไตรล์ อะซิโตน และเอทานอล โดยจากภาพประกอบ 6 และ 7 นั้นเป็นการแสดงผลการทดลองการสกัดโดยการใช้สารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายอินทรีย์ในอัตราส่วน (1:10, v/v) โดยนำสารละลายตัวอย่างข้าวโพดที่ผ่านการทำอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิสมา 1.00 มิลลิลิตร แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี DLLME พบว่าสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ให้ประสิทธิภาพร้อยละการได้กลับคืนดีกว่าตัวทำละลายชนิดไตรคลอโรมีเทน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ตัวทำละลายสกัดชนิดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ในการสกัดกรดเฟอร์รูริก



ภาพประกอบ 6 ร้อยละการได้กลับคืนของการใช้สารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดไดคลอโรมีเทน และตัวทำละลายกระจายอะซิโตไรไตรล์ อะซิโตน และเอทานอล

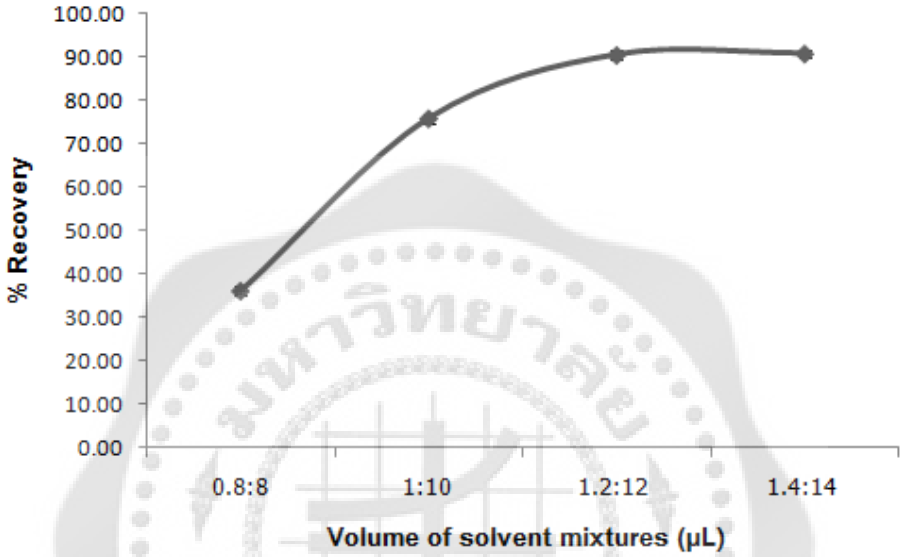


ภาพประกอบ 7 ร้อยละการได้กลับคืนของการใช้สารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดไตรคลอโรมีเทน และตัวทำละลายกระจายอะซิโตไรไตรล์ อะซิโตน และเอทานอล

1.2 ศึกษาผลของปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย

ปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายที่ใช้ในการสกัดกรดเฟอร์รูริก ได้ใช้สารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายอะซิโตไนไตรล์ที่ปริมาตร 80-140 ไมโครลิตร และ 800-1400 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยนำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิสมา 1.00 มิลลิลิตร แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี DLLME พบว่าสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ ใน

อัตราส่วน 1.2:12 (v/v) ให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีกว่าตัวทำละลายในอัตราส่วน 0.8:8 และ 1:10 (v/v) และตัวทำละลายในอัตราส่วน 1.4:14 (v/v) ให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีและคงที่เท่ากับตัวทำละลายในอัตราส่วน 1.2:12 (v/v) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้สารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 1.2:12 (v/v) เพื่อใช้สกัดกรดเฟอร์รูริก ดังแสดงในภาพประกอบ 8

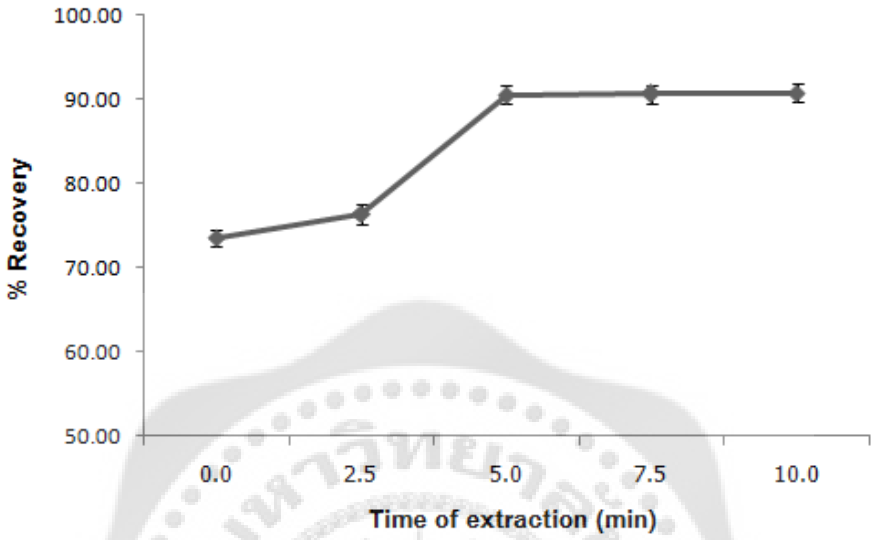


ภาพประกอบ 8 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (µg/mL) ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี DLLME โดยสกัดด้วยสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน (0.8:8 1:10 1.2:12 และ 1.4:14 (v/v))

1.3 ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการสกัด

เวลาในการสกัดเป็นอีกหนึ่งตัวแปรหลักสำคัญ ไม่ว่าจะใช้เวลาสั้นหรือนานก็ตาม (B. Lopornik; et al. 2005) จากการศึกษาในครั้งนี้ (ภาพประกอบ 9) พบว่า การสกัดกรดเฟอร์รูริกที่ใช้สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิสมา 1.00 มิลลิลิตร แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี DLLME โดยสกัดด้วยสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 1.2:12 (v/v) ซึ่งศึกษาการสกัดในช่วงเวลา (0.0 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 นาที) พบว่าที่เวลา 5.0 นาที ให้ผลการสกัดที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการสกัดที่เวลา 0.0 และ 2.5 นาที อย่างมีนัยสำคัญ และในเวลา 7.5 และ 10.0 นาที ได้ผลการสกัดที่ใกล้เคียงกันกับการสกัดที่เวลา 5.0 นาที ดังนั้นเพื่อเป็นการลดเวลาในการสกัดลง จึงได้เลือกเวลาในการสกัดที่ 5 นาที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (E.M. Silva; et al. 2007) ที่ กล่าวว่า ถ้าเวลาในการสกัดมากเกินไปก็ไม่ได้ช่วยให้สกัดสารได้มากขึ้น และเมื่ออธิบายจากกฎการแพร่ข้อที่ 2 ของฟิกค์ (Fick's second law) ที่ว่า เมื่อถึงความเข้มข้นที่สมดุลสุดท้ายระหว่างของเหลวและของเหลว ก็จะเป็นการ

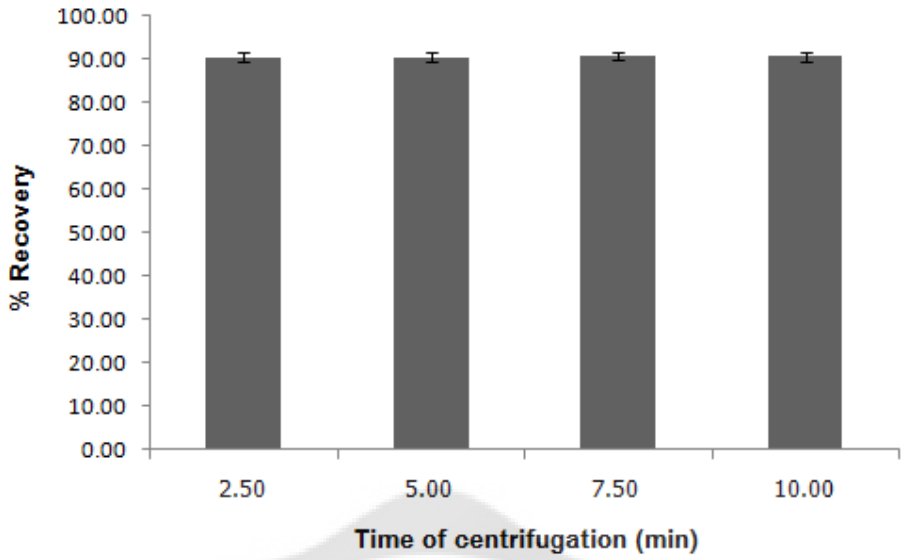
แพร่ที่สมบูรณ์ นอกจากนั้นการใช้เวลาในการสกัดที่นานอาจเกิดการออกซิเดชันของสารเนื่องจากแสงและออกซิเจนได้อีกด้วย (M. Nazck; & F.Shahidi. 2004; S.W. Chan; et al. 2009; D.B. Uma; et al. 2010; & I. Hismath; et al. 2011)



ภาพประกอบ 9 ผลของความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (µg/mL) ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี DLLME โดยสกัดด้วยสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 1.2:12 (v/v) ในช่วงเวลา 0.0-10.0 นาที

1.4 ศึกษาผลของเวลาในการหมุนเหวี่ยง

การหมุนเป็นอีกหนึ่งปัจจัย จากการศึกษาในครั้งนี้ (ภาพประกอบที่ 10) พบว่า การสกัดกรดเฟอร์รูริกที่ใช้สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิสมา 1.00 มิลลิลิตร แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี DLLME โดยสกัดด้วยสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 1.2:12 (v/v) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 4000 รอบต่อนาที (rpm) ซึ่งได้ศึกษาเวลาในการหมุนเหวี่ยงในช่วงเวลา (2.5 5.0 7.5 และ 10.0 นาที) พบว่าที่เวลา 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 นาที ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพและมีปริมาณความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริกที่ใกล้เคียงกันมาก ดังแสดงในภาพประกอบ 10 ดังนั้นเพื่อความรวดเร็วในการวิเคราะห์ จึงได้เลือกเวลาในการหมุนเหวี่ยงที่ 5.0 นาที



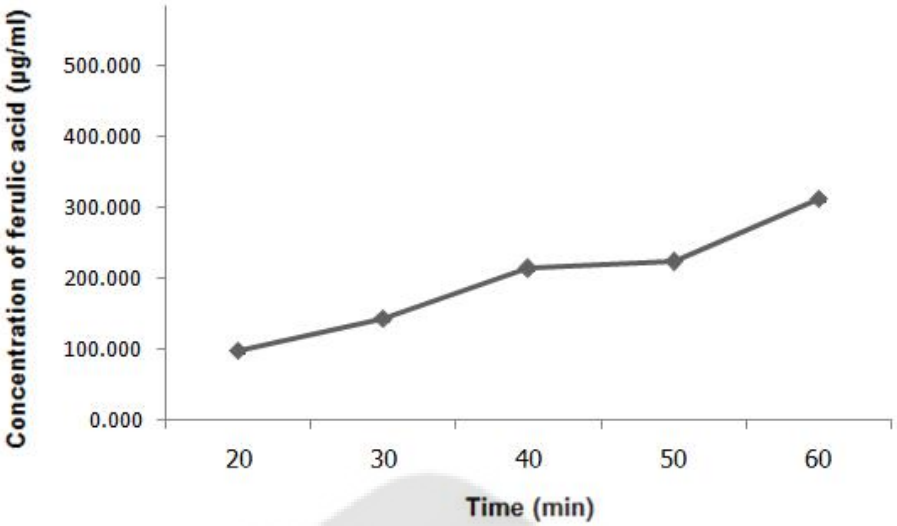
ภาพประกอบ 10 ผลของความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (µg/mL) ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี DLLME โดยสกัดด้วยสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 1.2:12 (v/v) เป็นเวลา 5 นาที และทำการหมุนเหวี่ยงในช่วงเวลา (2.5-10.0 นาที)

ตอนที่ 2 ผลการศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก

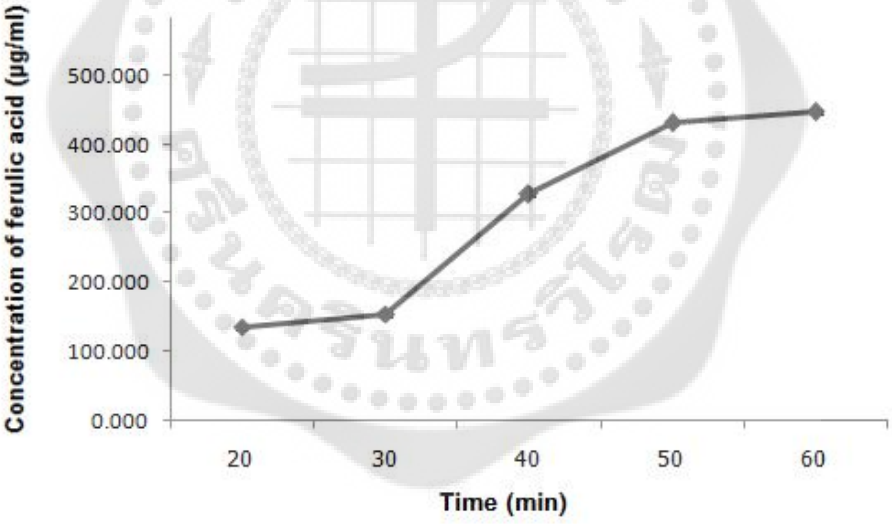
ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก ได้แก่ การศึกษาผลอุณหภูมิและเวลา และทำการศึกษาผลของการเปรียบเทียบผลระหว่างตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ความร้อนและตัวอย่างข้าวโพดที่ไม่ให้ความร้อน

2.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลา

การศึกษาผลของอุณหภูมิ และเวลา เป็นส่วนสำคัญมากที่ช่วยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริกจากตัวอย่างข้าวโพด โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา (20 30 40 50 และ 60 นาที) พบว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ให้ปริมาณความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริกมากที่สุดและมีประสิทธิภาพดีที่สุด ดังแสดงในภาพประกอบ 11 และ 12 ดังนั้นจึงเลือกให้ความร้อนแก่ตัวอย่างข้าวโพดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที มาใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งสอดคล้องกับผลวิจัยของ (V. Dewanto; et al. 2002) ที่ได้ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากข้าวโพดหวานที่ผ่านขบวนการแปรรูป



ภาพประกอบ 11 ผลของความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (µg/ml) ที่ได้จากผลของการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 20-60 นาที



ภาพประกอบ 12 ผลของความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (µg/ml) ที่ได้จากผลของการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 20-60 นาที

2.2 ศึกษาผลของการแปรรูปตัวอย่าง

การศึกษาผลของการแปรรูป โดยเปรียบเทียบผลระหว่างการให้ความร้อนแก่ตัวอย่างและตัวอย่างที่ไม่ผ่านความร้อน ทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบผลของปริมาณความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริกที่วิเคราะห์ได้จากการตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ความร้อนกับตัวอย่างข้าวโพดที่ไม่ให้ความร้อน จากการทดลองพบว่าตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ความร้อนให้ปริมาณของกรดเฟอร์รูริกสูง

กว่าตัวอย่างตัวอย่างข้าวโพดที่ไม่ให้ความร้อน ซึ่งก็สอดคล้องกับผลวิจัยของ (V. Dewanto; et al. 2002) ที่ได้ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากข้าวโพดหวาน

ตอนที่ 3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ในการศึกษาทางโครมาโทกราฟีจะเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์ในเทอมของ H (Height equivalent to a theoretical plate) ที่เรียกว่า ทฤษฎีเพลต (plate theory) ได้อธิบายไว้ว่า อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับความสูงของเพลต ถ้ามีจำนวนเพลตที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์มากประสิทธิภาพการแยกก็จะดี ซึ่งจำนวนเพลตจะแปรผันตรงกับความยาวของคอลัมน์ โดยทฤษฎีดังกล่าวไม่สามารถอธิบายได้ครอบคลุม ดังนั้นจึงต้องอาศัยทฤษฎีอัตรา (rate theory) ที่สามารถอธิบายพฤติกรรมทางโครมาโทกราฟีได้ ซึ่งทำเกิดแบนด์กว้างในกระบวนการชะสาร ซึ่งในกระบวนการชะสารนั้นจะมีกลไกของการเกิดการแพร่กระจาย ได้แก่ การแพร่กระจายแบบเอ็ดดี้ (eddy diffusion) การแพร่กระจายแบบลองจิทูดินอล (longitudinal diffusion) และ การเคลื่อนมวลโดยการส่งผ่าน (mass transfer effect) ซึ่งกลไกดังกล่าวจะอธิบายผลของตัวแปรทั้ง 3 ออกเป็นเทอมต่างๆ ทั้งสิ้น 3 เทอม ที่มีความสัมพันธ์กับค่า H ตามสมการของ Van Deemter ในสมการที่ 4

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C.\mu \qquad \text{..... (4)}$$

H = HETP

A = eddy diffusion

B = longitudinal diffusion

C = mass transfer effect

μ = linear velocity

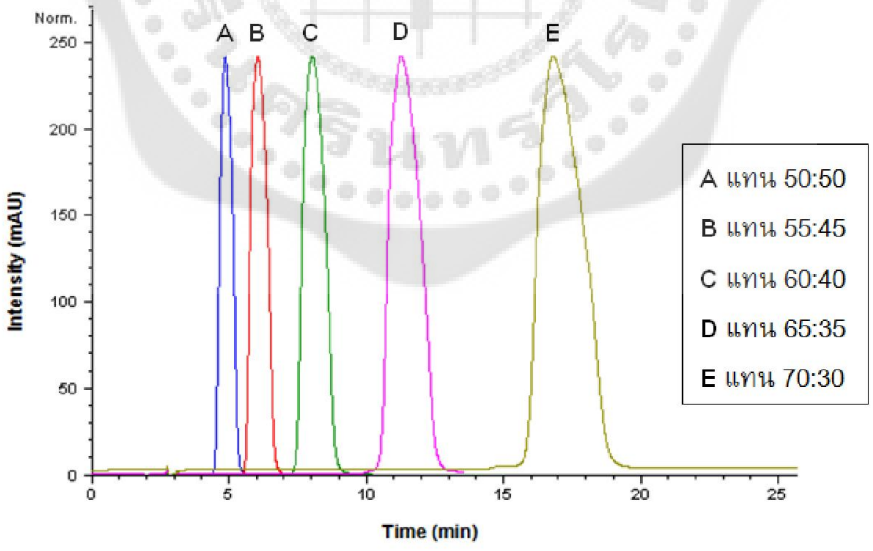
จากสมการ Van Deemter จะเห็นว่า ถ้าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (μ) มีค่าน้อยจะทำให้เทอม B มีค่ามาก ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการแยกต่ำ เพราะตัวถูกละลายแพร่กระจายอยู่ในคอลัมน์ได้นานมากขึ้น ดังนั้นจึงควรเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มากขึ้น เพื่อลดเทอม B แต่ในทางกลับกันถ้าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (μ) มีค่ามากขึ้น จะทำให้เทอม C มากขึ้นด้วย เนื่องจากตัวถูกละลายมีการแพร่ยังไม่ถึงสมดุลระหว่างเฟสอยู่กับที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ H มากตาม ประสิทธิการแยกเลยลดลง ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาค

เคลื่อนที่ (μ) และประสิทธิภาพของคอลัมน์ (H) ในทางโครมาโทกราฟี จะทำให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริกด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ เมทานอล และอะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการแยกกรดเฟอร์รูริก

3.1 ศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

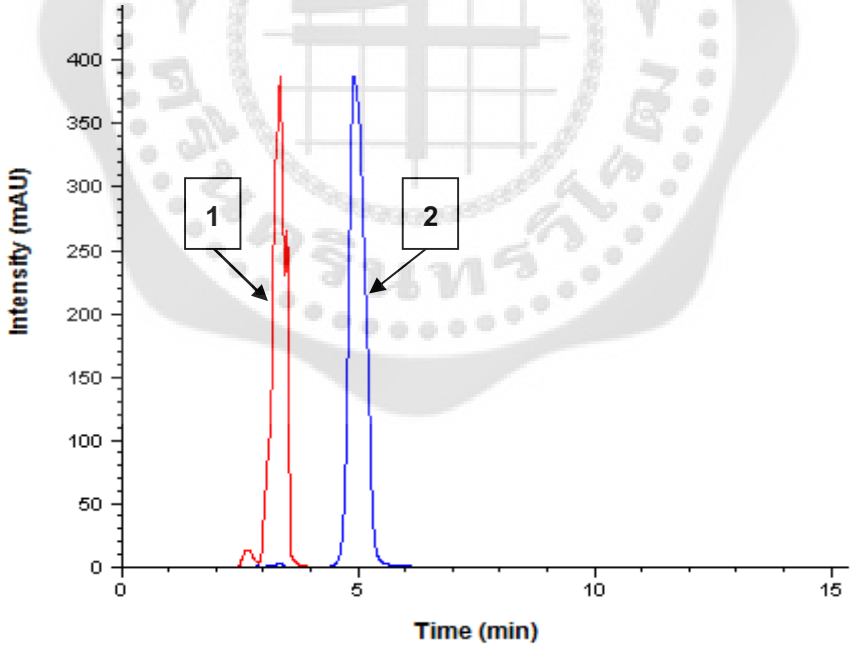
การศึกษาการแยกกรดเฟอร์รูริกโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วน 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30 (v/v) ที่ความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริกเท่ากับ 10 μg/mL ซึ่งผลจากการศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วนดังกล่าวพบว่าให้ผลการทดลองดังแสดงในภาพประกอบ 13 และพบว่าที่อัตราส่วน 50:50 ให้พีคที่มีความสมมาตร เกิดการแยกได้ดี ซึ่งกรดเฟอร์รูริกจะถูกหน่วงในคอลัมน์ไม่นาน และใช้เวลา 4.9 นาที และเมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล เป็น 55:45 60:40 65:35 และ 70:30 (v/v) พบว่าพีคที่ได้มีลักษณะเป็นแถบกว้าง (band broadening) ดังนั้นจึงเลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วน 50:50 ดังทฤษฎีที่เมื่อการแพร่กระจายถึงจุดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง คือเฟสที่อยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ทำให้มีประสิทธิภาพการแยกที่ดี



ภาพประกอบ 13 โครมาโทแกรมการเปรียบเทียบวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วน 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30 (v/v) ของกรดเฟอร์รูริกเข้มข้น 10 μg/mL

ผลการศึกษาการแยกกรดเฟอร์รูริกโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และอะซิโตไนไตรล์ ที่อัตราส่วน 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30 (v/v) ที่ความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริกเท่ากับ 10 µg/mL ซึ่งผลจากการศึกษาอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และอะซิโตไนไตรล์ ที่อัตราส่วน 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30 (v/v) พบว่าพีคที่ได้ไม่มีความสมมาตร เกิดแถบกว้าง ดังนั้นจึงไม่เลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และซิโตไนไตรล์

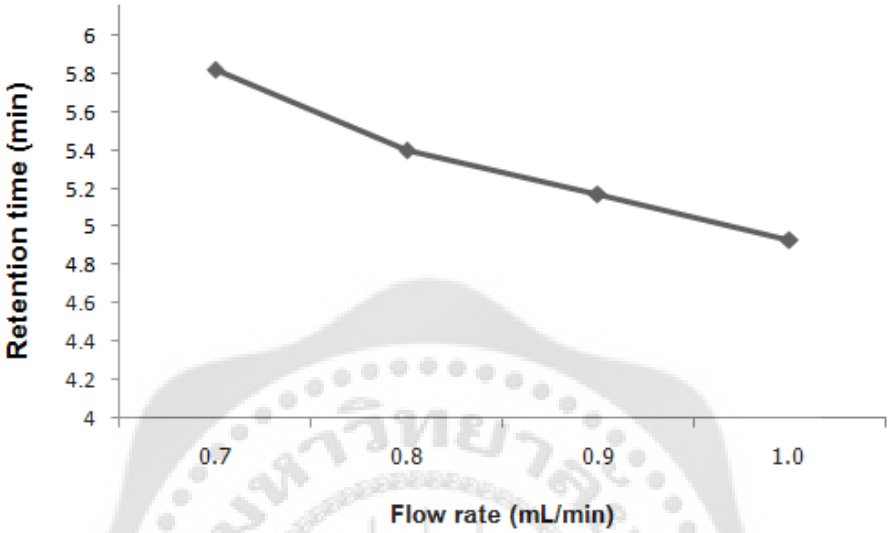
จากการศึกษาการแยกกรดเฟอร์รูริกด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ เมทานอล และอะซิโตไนไตรล์ ที่ความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริกเท่ากับ 10 µg/mL ดังแสดงในภาพประกอบ 14 จะเห็นว่าการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ให้พีคที่มีความสมมาตร เกิดการแยกได้ดีมากกว่าการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และอะซิโตไนไตรล์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วน 50:50 มาใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริก



ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างโครมาโทแกรมการเปรียบเทียบวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และตัวทำละลายอินทรีย์ (ทั้ง (1) อะซิโตไนไตรล์ (2) เมทานอล) ของกรดเฟอร์รูริกเข้มข้น 10 µg/mL

3.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

การศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ดังนี้ 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยพิจารณาระยะเวลารีเทนชันของกรดเฟอร์รูริก ดังแสดงในภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ส่งผลต่อเวลารีเทนชัน

อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่มีผลผลต่อระยะเวลารีเทนชันของสาร เนื่องจากการเพิ่มอัตราการไหลจะทำให้สารถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น ซึ่งเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ โดยทำการทดลองด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วน 50:50 (v/v) โดยใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 0.7 mL/min พบว่าสารถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ระยะเวลา 5.8 นาที จากนั้นเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 0.8 0.9 และ 1.0 mL/min พบว่าสารถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ระยะเวลา 5.4 5.1 และ 4.9 นาที ตามลำดับ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 mL/min เพราะเป็นอัตราการไหลที่มีความเหมาะสมต่อการแยกและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร และเนื่องจากที่อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.9 0.8 และ 0.7 mL/min นั้นใช้เวลาของการถูกชะของสารออกจากคอลัมน์นานกว่าการใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 mL/min และการใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มากกว่า 1.0 mL/min อาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณ ซึ่งในตัวอย่างนั้นอาจจะมีสารรบกวนการวิเคราะห์ เช่น สารในกลุ่มฟิโนลิกชนิดอื่นๆ ปะปน และอาจจะเกิดการซ้อนทับระหว่างพีคของกรดเฟอร์รูริกกับสารรบกวนอื่นๆ อีกด้วย

จากการศึกษาการแยกกรดเฟอร์รูริกด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ เมทานอล และอะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการแยกกรดเฟอร์รูริก พบว่าสภาวะที่

เหมาะสมต่อการแยกกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สามารถสรุปได้ตารางที่ 3

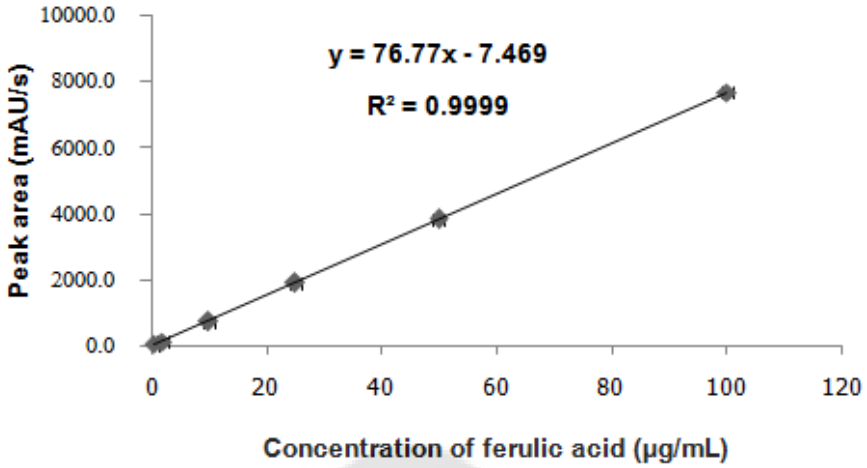
ตาราง 3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ตัวแปร	**สภาวะที่ใช้ในการทดลอง**
ระบบการแยก	ไอโซเครติก
คอลัมน์	C_{18} ขนาด 5 µm (250 mm x 4.6 mm)
วัฏภาคเคลื่อนที่	กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล
อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่	50:50 (v/v)
อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่	1.0 mL/min
เครื่องตรวจวัด	ไดโอดอาร์เรย์
ความยาวคลื่น	320 nm.

ตอนที่ 4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดกรดเฟอร์รูริก

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สามารถนำสภาวะดังกล่าวนั้นมาใช้วิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด ในการวิเคราะห์ปริมาณในสารตัวอย่างนิยมใช้วิธีเทียบกับกราฟมาตรฐานเพราะมีความสะดวกและให้ความถูกต้อง โดยจะทำเปรียบเทียบสัญญาณที่วัดได้จากตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5 - 100 µg/mL หลังจากทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดเฟอร์รูริกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น µg/mL (แกนนอน) กับพื้นที่พีค mAU/s (แกนตั้ง) ได้กราฟเส้นตรงแสดงดังภาพประกอบ 16 จากกราฟมาตรฐานกรดเฟอร์รูริกเข้มข้น 0.5 - 100 µg/mL ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 1.00



ภาพประกอบ 16 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีค (mAU/s) กับช่วงความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูริก (µg/mL)

4.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

การศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ทำโดยเตรียมสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูริกเข้มข้น 0.02 - 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ (n=10) แล้วคำนวณหาค่า LOD และ LOQ โดยค่า LOD ให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของสัญญาณ noise (S/N) และ LOQ ให้สัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณ noise (S/N)

จากผลการศึกษาหาประสิทธิภาพของระบบที่ทดลองโดยหาค่า LOD และ LOQ พบว่าให้ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.02 และ 0.06 ตามลำดับ

4.3 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืน (% recovery) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองโดยนำตัวอย่างมา 1.00 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริก ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดลองตามสภาวะที่เหมาะสม โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ (n=5) จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืนดังสมการที่ 3

จากผลการวิเคราะห์หาร้อยละการได้กลับคืนของปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ดังแสดงในตาราง 4 จะพบว่าให้ผลการวิเคราะห์หาร้อยละการได้กลับคืนของกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยสภาวะที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 80.63±1.12 - 105.39±1.08 ซึ่งสอดคล้องกับ (AOAC. 2002) ซึ่งมีค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 80 - 115

ตาราง 4 ร้อยละการได้กลับคืน (%recovery±SD) ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ลำดับ	ตัวอย่าง	ร้อยละการได้กลับคืน (%Recovery±SD)
S1	ข้าวโพดหวานดิบ	87.12±1.55
S2	ข้าวโพดข้าวเหนียวขาวดิบ	88.22±1.03
S3	ข้าวโพดข้าวเหนียวดำดิบ	82.77±1.57
S4	ข้าวโพดอ่อนดิบ	84.46±1.19
B1	ข้าวโพดหวานต้ม	96.17±1.39
B2	ข้าวโพดข้าวเหนียวขาวต้ม	92.04±1.29
B3	ข้าวโพดข้าวเหนียวดำต้ม	95.36±1.03
B4	ข้าวโพดอ่อนต้ม	105.36±1.77
P1	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	95.23±1.06
P2	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	81.40±1.70
P3	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	81.27±1.52
P4	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	93.16±1.31
P5	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	105.39±1.08
P6	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	81.49±1.57
P7	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	94.74±1.60
P8	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	97.06±1.42
P9	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	80.63±1.12
P10	ผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์น	93.74±1.11
P11	ผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์น	81.33±1.60

4.4 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยการศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และความแม่นยำระหว่างวัน (inter-day precision) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองโดยนำตัวอย่างข้าวโพดมา 1.00 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วทำการทดลองตามสภาวะที่เหมาะสม โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ (n=5) จากนั้นคำนวณหาค่า %RSD (% relative standard deviation)

จากการศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียวกัน และความแม่นยำระหว่างวัน ในตัวอย่างข้าวโพด พบว่าให้ค่า %RSD เท่ากับ 1.10 และ 1.16 ตามลำดับ

ตอนที่ 5 ผลการศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง

การศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด โดยผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของกรดอะมิโน และผลของสารประกอบฟีนอลิก ที่อาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

5.1 ศึกษาผลของชนิดกรดอะมิโน

การศึกษาผลของกรดอะมิโน ได้แก่ กรดแอล-กลูตามิค กรดไลซีน และกรดทริปโตเฟน ซึ่งทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

5.2 ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก

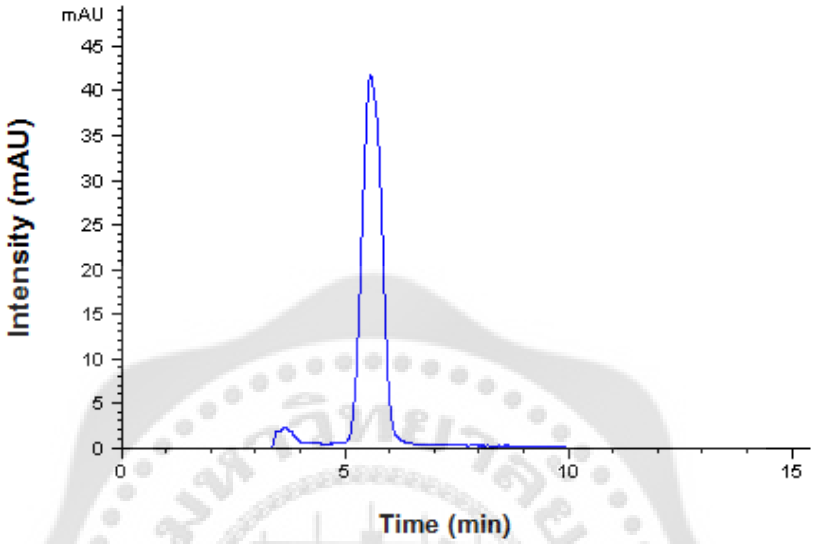
การศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิค กรดแทนนิค คาเทชิน ซึ่งทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยให้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ระยะเวลารีเทนชันของพีคโครมาแกรมของกรดเฟอร์รูริก กรดแกลลิค กรดแทนนิค คาเทชิน กรดแอล-กลูตามิค กรดไลซีน และกรดทริปโตเฟน

ชนิดของสารรบกวน	สารรบกวน	เวลารีเทนชัน (นาที)
กรดอะมิโน	กรดแกลลิค	3.238
	กรดแทนนิค	4.424
	คาเทชิน	ไม่พบ
สารประกอบฟีนอลิก	กรดแอล-กลูตามิค	ไม่พบ
	กรดไลซีน	ไม่พบ
	กรดทริปโตเฟน	ไม่พบ
สารที่วิเคราะห์	กรดเฟอร์รูริก	4.923

จากตารางที่ 5 จะเห็นว่าพีคโครมาแกรมของกรดแกลลิค กรดแทนนิค คาเทชิน กรดแอล-กลูตามิค กรดไลซีน และกรดทริปโตเฟน ให้ระยะเวลารีเทนชันที่ต่างจากพีคโครมาแกรมของกรดเฟอร์รูริก ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่าสารรบกวนเหล่านี้ไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรด

เฟอร์รูริก เนื่องจากสารรบกวนเหล่านี้ไม่ได้เกิดการซ้อนทับกันกับพีคโครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก และสัญญาณของกรดเฟอร์รูริกที่ได้จากการวิเคราะห์นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในภาพประกอบ 17



ภาพประกอบ 17 ผลการศึกษาของสารละลายมาตรฐานผสม ได้แก่ กรดเฟอร์รูริกกรดแกลลิค กรดแทนนิค คาเทชิน กรดแอล-กลูตามิค กรดไลซีน และกรดทริปโตเฟน ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL

ตอนที่ 6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

ขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างมีความจำเป็นอย่างมากเพื่อความเหมาะสมต่อวิธีการวิเคราะห์ ซึ่งมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่นิยมใช้กันทั่วไป เช่น วิธีการตกตะกอน และวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นต้น โดยตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดที่จะมาวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริกนั้นจะต้องมีการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้ตัวอย่างมีความสะอาด เนื่องจากในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดนั้นอยู่ในสถานะของแข็งและของเหลว และมีสารรบกวนอื่นๆ ปะปนอยู่ เช่น ไขมัน กรดอะมิโน และอื่นๆ จึงไม่เหมาะที่จะทำการวิเคราะห์โดยตรงด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการเตรียมตัวอย่างทั้งหมด 2 ขั้นตอน คือ การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส และการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ซึ่งในขั้นตอนที่ 1 เป็นขั้นตอนของการสกัดและกำจัดสารรบกวนอื่นๆ ส่วนในขั้นตอนที่ 2 เป็นการเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

6.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส

จากงานวิจัยของ (B. Shammugasamy; et al. 2013) ได้ทำการศึกษาโทโคฟีรอล และโทโคไตรอีนอล ในตัวอย่างธัญพืช ด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิสและเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผู้วิจัยจึงได้นำงานวิจัยดังกล่าวนี้มาดัดแปลงและใช้กับการเตรียมตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด โดยชั่งตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดปริมาณ 1.00 กรัม ทำการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส จะได้สารละลายตัวอย่างเพื่อนำไปสกัดต่อด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน

6.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน

เมื่อได้สารละลายตัวอย่างจากการสกัดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิสแล้ว จากนั้นนำสารละลายที่ได้ มา 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ด้วยสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นสารสกัดที่ได้จะแยกชั้นเป็น 2 ชั้น แล้วนำสารละลายชั้นล่าง ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

ในวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ดังแสดงในตาราง 6 จะพบว่าให้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยสภาวะที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.50±0.63 - 0.37±0.21 mg/g ซึ่งพบได้มากที่สุดในตัวอย่างข้าวโพดหวานต้ม (B1) และพบน้อยที่สุดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์ (P1)

ตาราง 6 ปริมาณกรดเฟอร์รูริก (mg/g±SD) ในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปริมาณกรดเฟอร์รูริก (mg/g±SD)
S1	ข้าวโพดหวานดิบ	5.03±0.72
S2	ข้าวโพดข้าวเหนียวขาวดิบ	3.56±0.70
S3	ข้าวโพดข้าวเหนียวดำดิบ	3.17±0.06

ตาราง 6 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปริมาณกรดเฟอร์รูริก (mg/g±SD)
S4	ข้าวโพดอ่อนดิบ	0.95±0.31
B1	ข้าวโพดหวานต้ม	6.50±0.63
B2	ข้าวโพดข้าวเหนียวขาวต้ม	4.30±0.65
B3	ข้าวโพดข้าวเหนียวดำต้ม	3.46±0.79
B4	ข้าวโพดอ่อนต้ม	1.79±0.37
P1	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	0.37±0.21
P2	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	0.67±0.23
P3	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	0.66±0.06
P4	ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์	0.71±0.16
P5	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	3.51±0.19
P6	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	4.61±0.17
P7	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	0.62±0.02
P8	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	0.51±0.06
P9	ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด	0.43±0.20
P10	ผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์น	0.44±0.04
P11	ผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์น	0.58±0.19

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด พบว่าเมื่อนำตัวอย่างข้าวโพดมาแปรรูปด้วยการนำมาต้มสุกให้ปริมาณกรดเฟอร์รูริกเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลวิจัยของ (V. Dewanto; et al. 2002) ที่ได้ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากข้าวโพดหวานที่ผ่านขบวนการแปรรูปโดยการให้ความร้อน

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างกรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน จากตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด ได้แก่ ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดข้าวเหนียวขาว ข้าวโพดข้าวเหนียวดำ ข้าวโพดอ่อน ผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์หรือข้าวโพดอบกรอบแห้ง ผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด ผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์นหรือข้าวโพดคั่ว โดยทำการศึกษาผลของ ตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน และศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก ตลอดจนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาการวิจัย สรุปผลได้ดังนี้

1. การศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก ดังนี้

1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย

1.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย

1.3 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัด

1.4 ศึกษาเวลาในการหมุนเหวี่ยง

จากตัวแปรดังกล่าวข้างต้น พบว่าชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย เวลาที่ใช้ในการสกัด และเวลาในการหมุนเหวี่ยง ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก คือ ตัวทำละลายสกัดชนิดไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายกระจายชนิดอะซิโตไนไตรล์ ด้วยปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายในอัตราส่วน 1.2:12 (v/v) ใช้เวลาในการสกัด 5 นาที และใช้เวลาในการหมุนเหวี่ยงที่ 4000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ

2. การศึกษาผลตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก ดังนี้

2.1 ศึกษาอุณหภูมิและเวลา

2.2 ศึกษาการแปรรูปตัวอย่าง

จากตัวแปรดังกล่าวข้างต้น พบว่าอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก คือ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และเมื่อศึกษาการแปรรูปตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบผลระหว่างตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ความร้อนและตัวอย่างข้าวโพดที่ไม่ให้ความร้อน พบว่าตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ความร้อนให้ปริมาณของกรดเฟอร์รูริกสูงกว่าตัวอย่างตัวอย่างข้าวโพดที่ไม่ให้ความร้อน

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ดังนี้

3.1 ศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

3.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากสภาวะดังกล่าวข้างต้น พบว่าวัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ เมทานอล และอะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการแยกกรดเฟอร์รูริก ที่ได้ คือ วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วน (1:1) ที่อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 mL/min ตามลำดับ โดยที่กรดเฟอร์รูริกถูกชะออกมาจากคอลัมน์ที่ระยะเวลา 4.9 นาที

4. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ ดังนี้

4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดกรดเฟอร์รูริก

4.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

4.3 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

4.4 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ พบว่ากราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูริกเข้มข้นในช่วง 0.5 - 100 µg/mL ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 1.00ให้ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.02 และ 0.06 ตามลำดับ และให้ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของตัวอย่างข้าวโพด อยู่ในช่วง 80.63±1.12 - 105.39±1.08

5. การศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง ดังนี้

5.1 ศึกษาผลของกรดอะมิโน

5.2 ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก

จากการศึกษาผลของกรดอะมิโน และสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิค กรดแทนนิค คาเทชิน กรดแอล-กลูตามิค กรดไลซีน และกรดทริปโตเฟน ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

พบว่าในระบบการทดลองด้วยสภาวะที่เหมาะสมนี้ไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูริก เนื่องจากสารรบกวนเหล่านี้ไม่ได้เกิดการซ้อนทับกันกับพีคโครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก และสัญญาณของกรดเฟอร์รูริกที่ได้จากการวิเคราะห์นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง

6. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด ดังนี้

6.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด ด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส

6.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน

6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด

จากการศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์ แปรรูปจากข้าวโพดโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส และวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน พบว่าให้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพดด้วยสภาวะที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.37±0.21 - 6.50±0.63 mg/g พบได้มากที่สุดในตัวอย่างข้าวโพดหวานต้ม (B1) และพบน้อยที่สุดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์ (P1)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่อื่นๆ เพื่อเป็นการลดการใช้ตัวทำลายโดยสิ้นเปลือง ซึ่งวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษาอยู่ คือ กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วน (1:1)

2. การวิเคราะห์ปริมาณปริมาณกรดเฟอร์รูริก สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารชนิดอื่นๆ ได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จันทิมา นามโชติ. (2555). *ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตรศึกษา). พระนครศรีอยุธยา: มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์. ถ่ายเอกสาร.

จีรนันท์ ชัยวาฤทธิ์. (2012). High performance liquid chromatography (HPLC) from http://www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/chemical-analysis-instrument-menu/item/126-high-performance-liquid-chromatography-hplc.html.

ประภา ศรีพิจิตต์. (2527). ข้าวโพด. ในพฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โอภา วัชระคุปต์; และคณะ. (2549) สารต้านอนุมูลอิสระ = Radical Scavenging Agents. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พริ้นท์.

ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ. (2544). โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตข้าวโพดหวานและการผลิตน้ำนมข้าวโพดเพื่อการค้าอย่างยั่งยืน. ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

Adam K. K.; & Liu R.H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6182-6187.

Andreasen M.F.; et al. (2000). Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 rye (*Secale cereal* L.) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 2837-2842.

AOAC International. (2002). AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Arlington VA. Available from http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf.

Biparva P.; et al. (2012). Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. *Journal of Food Composition and Analysis*. 27: 87-94.

Boskou D.; et al. (2006). *Polar phenolic compounds*. Laboratory of Food Chemistry and Technology University Campus. AOCS Press.

Buettner G.R. (2001). Free radical and radiation biology. *Peroxidases in Biology and Medicine*. (16-19): 1-27.

Chaijan M. (2008). Review: Lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. *Science Technology*. 30(1): 47-53.

Chan S.W.; et al. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut, Citrus hystrix) peels. *International Food Research Journal*. 16: 203-21.

Dewanto V.; et al. (2002). Processed Sweet Corn Has Higher Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(17): 4959-4964.

Faraji H.; et al. (2009). Pre-concentration of phenolic compounds in water samples by novel Liquid-liquid microextraction and determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216: 8569-8574.

Godoy-Caballero M.P.; et al. (2013). New reversed phase dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil by rapid resolution liquid chromathography with ultraviolet-visible and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 1313: 291-301.

Guria. P. (2006). *Physico-chemical properties (Zea mays L.)*. Thesis submitted to the University of Agricultural Sciences Ms.C. (Home science). Dharwad: Department of Food Science and Nutrition College of Rural Home Science. University of Agricultural Sciences.

Halliwell B.; et al. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 33: 601-617.

Halliwell B. (2009). The wonderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*. 46: 531-542.

Hernanz D.; et al. (2001). Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4884-4888.

Hismath I.; et al. (2011). Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem, Azadirachta indica leaves. *International Food Research Journal*. 18(3): 931-939.

Kermasha.; et al. (1995). Analyses of phenolic and furfural compounds in concentrated and non-concentrated apple juices. *Food Research International*. 28: 245-252.

Liangli L.Y.; et al. (2012). *Cereals and Pulses: Nutraceutical Properties and Health Benefits*. Oxford: Wiley-Blackwell.

Liu R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of Action. *Journal of Nutrition*. 134: 3479-3485.

Lopornik B.; et al. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*. 71: 214-222.

Moreno C.S.; et al. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutntion Research*. 20: 941-953.

Mussatto S.I.; et al. (2007). Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*. 25: 231-237.

Naczk M.; & Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 1054: 95-111.

Negishi; & Ozawa. (1996). Determination of hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids, hydroxybenzaldehydes, hydroxybenzyl alcohols and their glucosides by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 756: 129-136.

Nardini M.; & Ghiselli A. (2004). Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*. 84: 137-143.

Oryza Oil and Fat Chemical Co., Ltd. ferulic acid (Beauty antioxidant brain function enhancing effect food & cosmetic material). *Ferulic acid catalog*. Ver. 1.1M.

Ozkan G.; & Baydar N.G. (2006). A direct RP-HPLC determination of phenolic compound in Turkish red wines. *Department of Food Engineering Suleyman Demirel University Turkish*. 19: 229-234.

Pokorny J. *et al*., (2001). *Antioxidants in food: practical applications*. New York: CRC Press.

Puerta R. de la.; et al. (1999). Inhibition of leukocytes lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 57: 445-449.

Rossi C.; et al. (2005). Intercalation of the radical scavenger ferulic acid in hydrotalcite-like anionic clays. *International Journal of Pharmaceutics*. 295: 47-55.

Scott D.A.; et al. (2005). The influence of vitamin C on systemic markers of endothelial and inflammatory cell activation in smokers and non- smokers. *Inflammation Research*. 5: 138-144.

Sies H.; et al. (1992). Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, betacarotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 368: 165- 171.

Silva E.M.; et al. (2007). Optimization of extraction of phenolics from Inga edulis leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*. 55: 381-387.

Shammugasamy B.; et al. (2013). Combination of saponification and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1300: 31-37.

Torre P.; et al. (2008). Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*. 40: 500-506.

Uma D.B.; et al. (2010). Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolic Compounds from Henna, (Lawsonia inermis Leaves). *Sains Malaysiana*. 39(1): 119-128.

Valacchi G.; et al. (2004). In vivo ozone exposure induces antioxidant stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radical Biology and Medicine*. 36: 673-681.

Valko M.; et al. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39: 44-84.

Yim H.S.; et al. (2013). Antioxidant potential of Pleurotus porrigens extract and application in sunflower oil during accelerated storage. *Chiang Mai Journal of Science*. 40: 34-48.

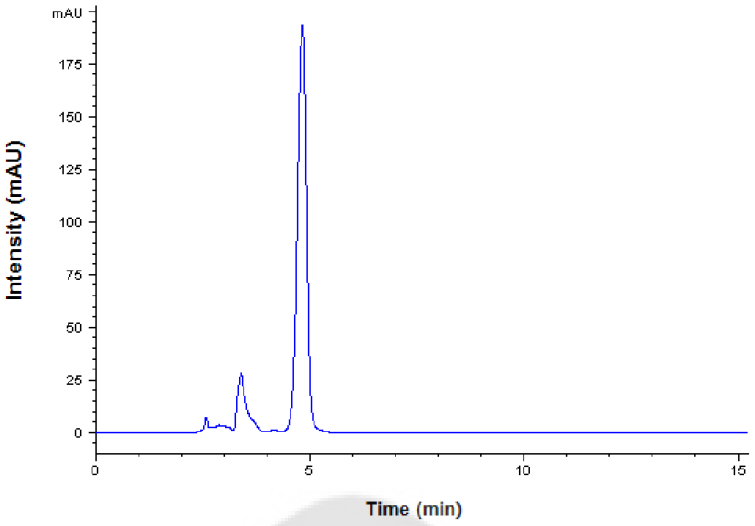
Yoshikawa T.; et al. (2000). *Free radicals in chemistry biology and medicine*. London: OICA International.

Zhang Y.; & Lee H.K. (2012). Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*. 750: 120-126.

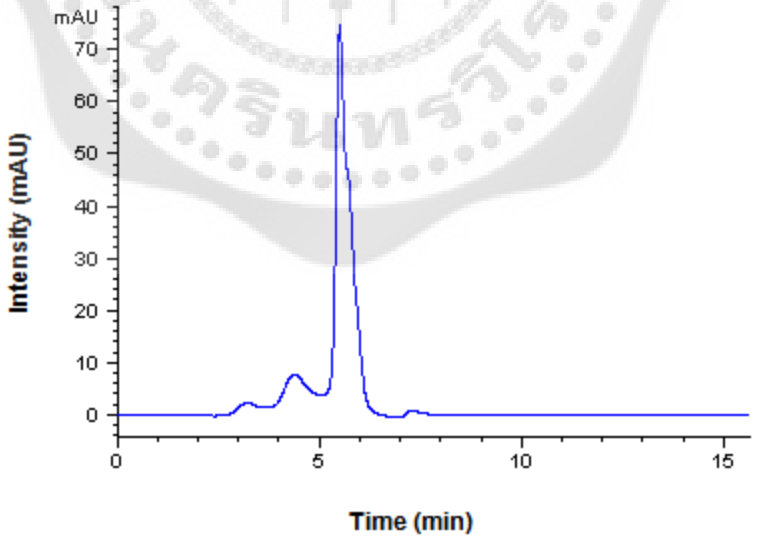
Zhao S.; et al. (2013). Preparation of ferulic acid from corn bran: Its improved extraction and purification by membrane separation. *Food and bioproducts processing*. 92: 439-443.

ภาคผนวก

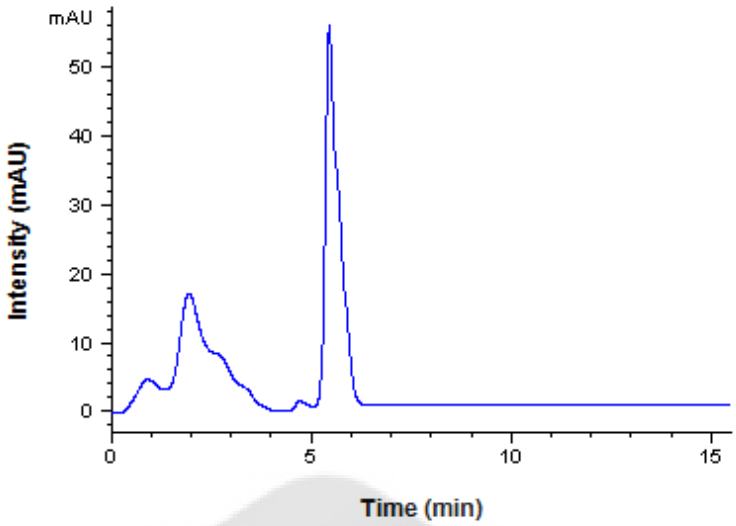
ภาคผนวก ก
โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริกในสารตัวอย่าง



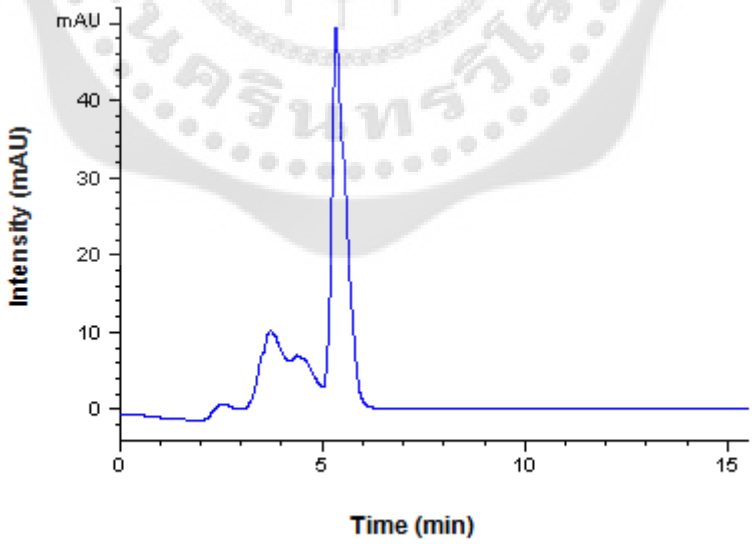
ภาพประกอบ 18 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างข้าวโพดหวานต้ม



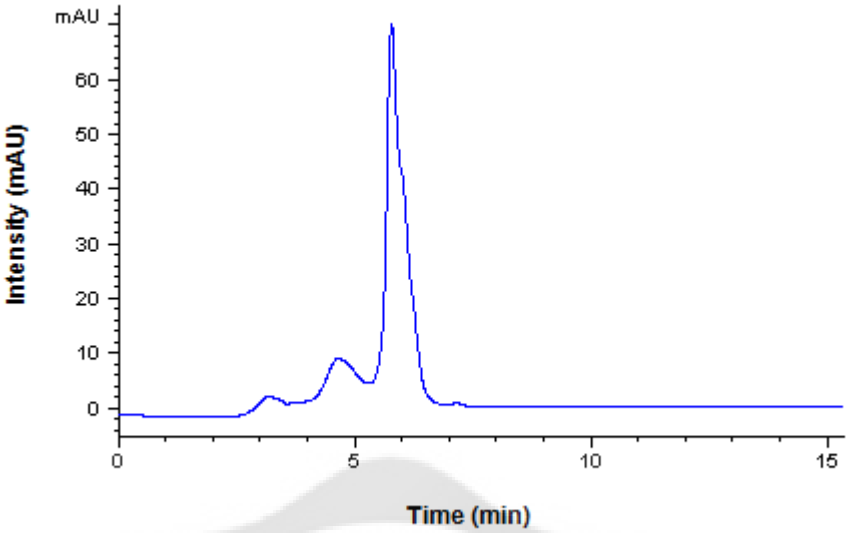
ภาพประกอบ 19 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียวขาวต้ม



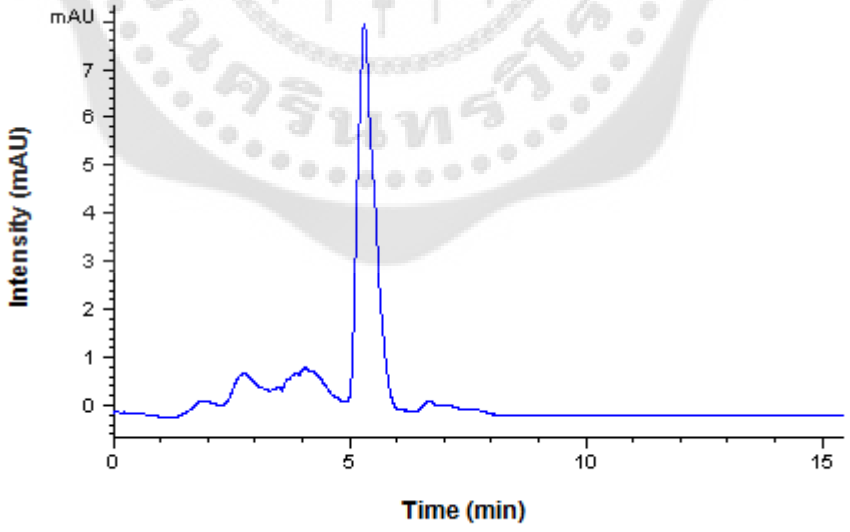
ภาพประกอบ 20 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียวดำต้ม



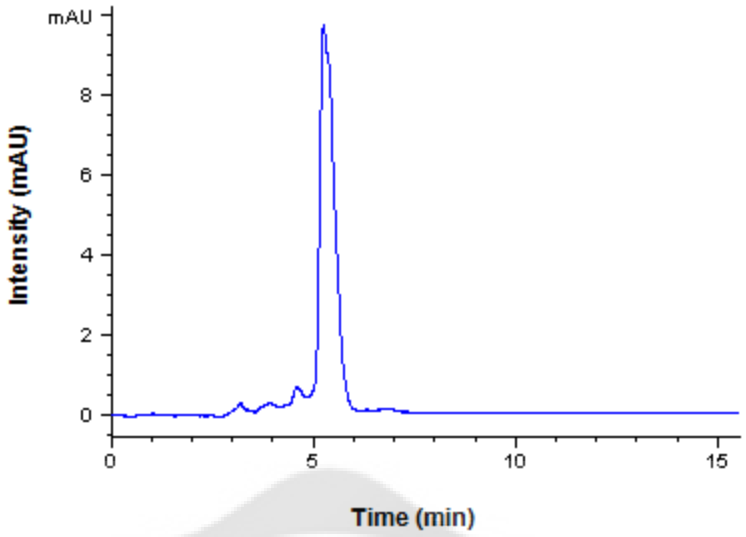
ภาพประกอบ 21 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างข้าวโพดอ่อนต้ม



ภาพประกอบ 22 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์



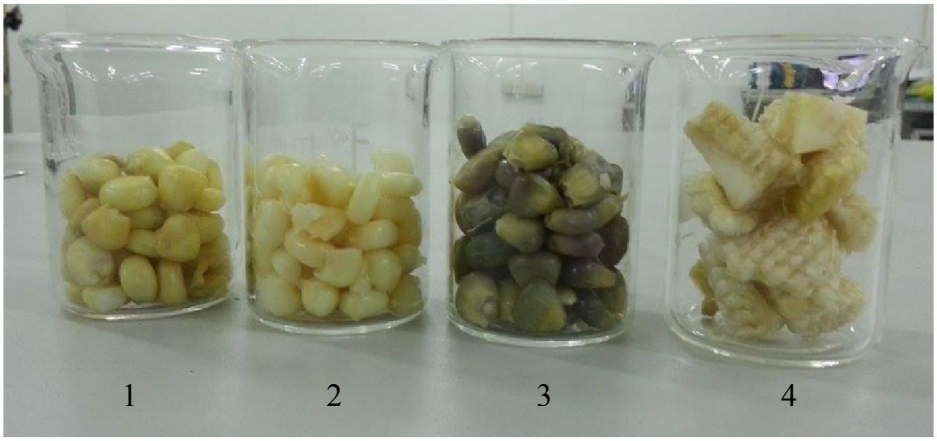
ภาพประกอบ 23 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด



ภาพประกอบ 24 โครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูริก ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์น

ภาคผนวก ข

รูปตัวอย่าง สารละลายตัวอย่าง เครื่องมือ และอุปกรณ์



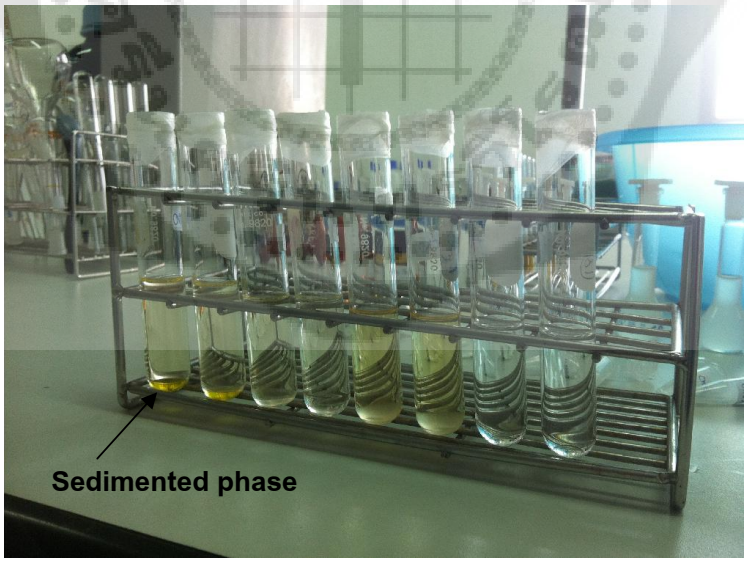
ภาพประกอบ 25 ตัวอย่างข้าวโพด

1 แทน ตัวอย่างข้าวโพดหวาน
2 แทน ตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียวขาว
3 แทน ตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียวดำ
4 แทน ตัวอย่างข้าวโพดอ่อน

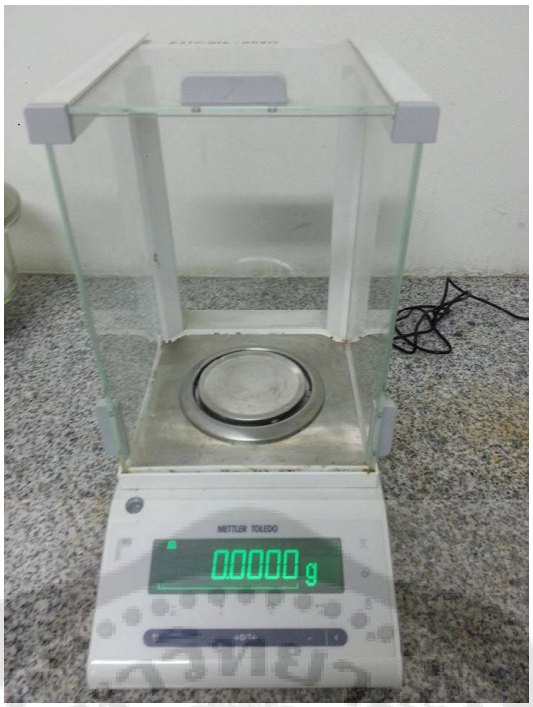
ภาพประกอบ 26 ตัวอย่างข้าวโพด (ต่อ)

5 แทน ตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอร์นเฟลกส์หรือข้าวโพดอบกรอบแห้ง
6 แทน ตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด
7 แทน ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ป๊อปคอร์นหรือข้าวโพดคั่ว

ภาพประกอบ 27 สารละลายตัวอย่างที่จากการเตรียมด้วยวิธีซาพอนนิฟิเคชัน



ภาพประกอบ 28 สารละลายตัวอย่างที่จากการเตรียมด้วยวิธี DLLME



ภาพประกอบ 29 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

ภาพประกอบ 30 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวจารุวรรณ แดงชาติ
วัน เดือน ปี เกิด	21 สิงหาคม 2531
สถานที่เกิด	จังหวัดบุรีรัมย์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 133 ตำบลตาเป๊ก อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดบุรีรัมย์ 31110

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2549	มัธยมปลาย โรงเรียนนางรอง จังหวัดบุรีรัมย์
พ.ศ. 2547	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2558	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพมหานคร