

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว
สมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก



ปริญญาานิพนธ์
ของ
กมลรัตน์ เลียบศิริ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ธันวาคม 2558

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว
สมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ธันวาคม 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว
สมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ธันวาคม 2558

กมลรัตน์ เลียบศิริ. (2558). การพัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก. วิทยานิพนธ์ วท.ม.(เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ.

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่สะดวก รวดเร็ว และ นำเชื่อถือสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกัน ในตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มประเภทต่างๆ ได้แก่ นมสดยูเอชที นมสดพาสเจอร์ไรส์ และนมปรุงแต่งกลิ่นรส โดยนำตัวอย่างมาตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วนำไปสกัด ต่อด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) และทำการชะวิตามินบีทั้งสองชนิดด้วย สารละลายกรดฟอร์มิกในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร จากนั้นทำการแยกโดยใช้คอลัมน์ ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 x 3.0 mm, i.d.) ในระบบไอโซครอติกที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสม ระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 232 และ 266 นาโนเมตร สำหรับวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดได้พร้อมกันภายในระยะเวลาไม่เกิน 7.00 นาที โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ให้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.10-100 มิลลิกรัม ต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้นดี ($R^2 > 0.999$) ค่าความเที่ยงของวิธีแสดงในรูปของค่า ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) มีค่าน้อยกว่า 2.40 และมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 80.07-102.70 วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์วิตามินบีทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นม พร้อมดื่มได้เป็นผลสำเร็จ โดยให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องอย่างดีกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโคร มาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ เห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ มีประสิทธิภาพดี รวดเร็ว ราคาถูก อีกทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

DEVELOPMENT OF METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF VITAMIN B1
AND VITAMIN B2 BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY USING
MINI-COLUMN



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

December 2015

Kamonrat Liabsiri. (2015). *Development of method for simultaneous determination of vitamin B1 and vitamin B2 by high performance liquid chromatography using mini-column*. Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee. Assistant Professor Dr. Piyada Jittangprasert.

A simple, fast and reliable high-performance liquid chromatographic method was developed in this work for the simultaneous analysis of vitamin B1 and vitamin B2 in milk samples including ultra high temperature milks, pasteurized milks and flavoured milks. Samples were mixed with 1 M trifluoroacetic acid to precipitate proteins, followed by solid phase extraction (SPE). Elution of both vitamins was carried out with 2% (v/v) formic acid in methanol. The chromatographic separation was performed on a mini column C18 column (8.0 x 3.0 mm, i.d.) under isocratic conditions with a mobile phase consisting of acetonitrile and 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 7.0) in ratio 7:93 (v/v) at flow rate of 0.10 mL/min. Direct UV absorptions at wavelengths of 232 and 266 nm were used for detection of vitamin B1 and vitamin B2, respectively. The result showed that both vitamins were separated within 7.00 min. The linear calibration curves were obtained over the concentration range of 0.10-100 mg/L for both vitamins with high correlation coefficients ($R^2 > 0.999$). The precisions were measured in terms of relative standard deviation (RSD) value. The RSDs of the developed method were less than 2.40%. The percentage recoveries of both vitamins were obtained in the range 80.07-102.70. The contents of both vitamins in milk samples were successfully determined by using the developed method. The results obtained from the developed method compared with HPLC method using fluorescence detection were well correlated. Therefore, the developed method was effective, rapid, low cost and environmentally friendly.

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว
สมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก

ของ

กมลรัตน์ เลียบศิริ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....รักษาราชการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษฎี โยเหลา)

วันที่..... เดือน.....พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ที่ปรึกษาหลัก

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา เพชรกระจำง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ ช่วยแก้ไขปัญหาในการทำงานวิจัย ให้ความช่วยเหลือในการ ดำเนินงานวิจัยและการเขียนปริญญาานิพนธ์นี้แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับ ประสพการณ์ ได้เรียนรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง และขอกราบขอบพระคุณเป็น อย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา เพชรกระจำว ประธานกรรมกรในการสอบ ปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ สงศรีโรจน์ กรรมการควบคุมการ สอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่อง เพื่อให้ปริญญาานิพนธ์นี้มี ความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ให้ความเมตตา เอาใจใส่และให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

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

คุณค่าของปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณต่อครอบครัวของผู้วิจัย ที่ มอบความรัก ความเอาใจใส่ และสนับสนุนในทุกๆด้าน ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในครั้งนี้

กมลรัตน์ เลียบศิริ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ.....	1
	ภูมิหลัง.....	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
	ความสำคัญของการวิจัย.....	3
	ขอบเขตของการวิจัย.....	3
	ขั้นตอนดำเนินการวิจัย.....	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
	นม.....	5
	ประเภทของนม.....	5
	องค์ประกอบในน้ำนม.....	7
	วิตามิน.....	8
	ประเภทของวิตามิน.....	8
	วิตามินบี 1 (ไทเอมีน).....	9
	วิตามินบี 2 (ไรโบฟลาวิน).....	11
	เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	13
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
	อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	24
	วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
	ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะการแยกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันโดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก.....	25

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น.....	27
ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มรสจืดและนมปรุงแต่งกลิ่นรส.....	29
4 ผลการทดลอง.....	31
ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะการแยกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันโดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก.....	31
การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัดวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2.....	31
การศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	32
การศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	36
ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น.....	37
ช่วงความเป็นเส้นตรง.....	37
ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ).....	37
ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์.....	38
ร้อยละของการคืนกลับ.....	39
ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มรสจืดและนมปรุงแต่งกลิ่นรส.....	40
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	44
บรรณานุกรม.....	47
ภาคผนวก.....	52
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	55

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง.....	38
2 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น.....	39
3 ผลการศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับ.....	40
4 ชนิดและปริมาณของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้และวิธีอ้างอิง.....	41
5 การเปรียบเทียบผลการวิจัยที่ได้จากงานวิจัยและงานวิจัยที่เคยรายงานก่อนหน้านี้สำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม.....	45



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างของวิตามินบี 1 หรือไทเอมีน.....	9
2 โครงสร้างวิตามินบี 1 สังเคราะห์ที่มีการผลิตและจำหน่ายตามท้องตลาด.....	10
3 โครงสร้างโมเลกุลของวิตามินบี 2 หรือไรโบฟลาวิน.....	11
4 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	13
5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 และสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2.....	32
6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (4.0 x 3.0 mm, i.d.) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอกซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 20:80 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที.....	34
7 โครมาโทแกรมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอกซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (a) 5:95 โดยปริมาตร (b) 10:90 โดยปริมาตร (c) 15:85 โดยปริมาตร และ (d) 20:80 โดยปริมาตร.....	34
8 โครมาโทแกรมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างแอกซิโตไนโตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอกซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (a) 5:95 โดยปริมาตร (b) 7:93 โดยปริมาตร และ (c) 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที....	35
9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่และเวลาของการคงอยู่ของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่อัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร ของสารละลายผสมระหว่างแอกซิโตไนโตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอกซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0).....	36
10 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มรสจืด (a) ตัวอย่างที่ 3 และ (b) ตัวอย่างที่ 5.....	43
11 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มปรุงแต่งกลิ่นรสตัวอย่างที่ 9.....	43

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
12 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น LC-20A.....	53
13 เปรียบเทียบขนาดของความยาวคอลัมน์.....	53
14 การประกอบอุปกรณ์การสกัด Solid Phase Extraction.....	54



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

วิตามินเป็นหนึ่งในสารอาหารหลักที่มีความจำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ แม้ว่าในแต่ละวันร่างกายจะต้องการวิตามินในปริมาณไม่มากนัก (ระดับไมโครกรัม) แต่ก็ไม่สามารถขาดได้ เนื่องจากวิตามินเป็นสารประกอบที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเคมีในกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย โดยที่ร่างกายไม่สามารถผลิตหรือสังเคราะห์วิตามินขึ้นมาเองได้ จึงต้องได้รับจากการรับประทานเข้าสู่ร่างกายเท่านั้น ถ้าร่างกายเกิดภาวะขาดวิตามินจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพในด้านต่างๆได้ เช่น การขาดวิตามินบี 1 ทำให้เกิดโรคเหน็บชา การขาดวิตามินบี 2 ทำให้เกิดเป็นโรคปากนกกระจอก โดยเฉพาะการขาดวิตามินบี 2 ในเด็กจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย เป็นต้น (วิตามินและแร่ธาตุ. ม.ป.ป.: ออนไลน์) วิตามินสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค และกลุ่มวิตามินที่ละลายในน้ำ ได้แก่ วิตามินบีรวม และวิตามินซี (Yin; et al. 2008: 172-177) ถึงแม้ว่าวิตามินเหล่านี้จะสามารถพบในอาหารประเภทต่างๆอยู่แล้ว แต่ปัจจุบันพฤติกรรมของผู้บริโภคในสภาวะเร่งรีบทำให้มีพฤติกรรมการบริโภคที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นอุตสาหกรรมด้านอาหารและเครื่องดื่มจึงมีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมวิตามินเหล่านี้ลงไป เพื่อให้สอดคล้องกับพฤติกรรมของผู้บริโภค โดยผลิตภัณฑ์หนึ่งที่เกิดจากอุตสาหกรรมให้ความสนใจเป็นอย่างมากคือ ผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มซึ่งมีจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีคุณค่าทางสารอาหารครบถ้วนตามความต้องการของผู้บริโภคทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ โดยในผลิตภัณฑ์นมสามารถพบวิตามินเอและวิตามินบีในปริมาณสูง ซึ่งวิตามินบีที่พบในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มส่วนใหญ่ คือ วิตามินบี 1 (ไทเอมีน) และวิตามินบี 2 (ไรโบฟลาวิน) (ณัชชยา สฐิติญาพัทธ์. 2552: 14) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการวิเคราะห์ปริมาณของวิตามินที่เติมลงไปผลิตภัณฑ์นมประเภทต่างๆ เพื่อเป็นการรับรองคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้เป็นที่ยอมรับและน่าเชื่อถือจากผู้บริโภค อีกทั้งเป็นการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด โดยวิธีวิเคราะห์ที่เลือกใช้ต้องมีประสิทธิภาพความถูกต้องและความแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในปริมาณน้อยๆระดับไมโครกรัมได้ โดยเฉพาะการเลือกวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ซึ่งเป็นสารที่ไม่ค่อยเสถียร มีความไวต่อแสง เกิดการสลายตัวได้ง่าย และเป็นกลุ่มวิตามินที่ไม่สามารถสะสมไว้ในร่างกาย จำเป็นต้องได้รับการรับประทานทุกวัน (ผิวสวยและสุขภาพแข็งแรงด้วยวิตามิน. ม.ป.ป.: ออนไลน์)

สำหรับเทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจวัดวิตามินมีหลากหลายเทคนิค เช่น เทคนิคยูวีวิชิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี (Liu; et al. 2002: 685-694) เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรโฟโตเมตรี (Wu; et al. 2003: 95-99) และเทคนิคทางจุลชีววิทยา (Tanner; & Barnett. 1986: 777-785) เป็นต้น ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ไม่สามารถวิเคราะห์วิตามินแบบพร้อมกันหลายชนิดได้ ต่อมาจึงมีการนำเทคนิคการแยกสารประเภทต่างๆมาพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์วิตามินได้พร้อมกันหลายชนิด โดยหนึ่งในเทคนิคการแยกสารที่มีความเหมาะสมและเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากลสำหรับการวิเคราะห์วิตามินในกลุ่มที่ละลายในน้ำ ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความถูกต้อง ความแม่นยำ และมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์สูง สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้หลากหลาย โดยอาศัยหลักการกระจายตัวของสารในสองวัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) การแยกสารจะเกิดขึ้นโดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดกับวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นสารชนิดใดสามารถกระจายตัวในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ดีกว่าวัฏภาคคงที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ในทางกลับกันถ้าสารชนิดใดสามารถกระจายตัวในวัฏภาคคงที่ได้ดีกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยทั่วไปการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมักนิยมใช้คอลัมน์ที่มีขนาดความยาวคอลัมน์อยู่ในช่วง 10-25 เซนติเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวที่ทำให้เกิดการแยกของสารแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามการใช้คอลัมน์ในขนาดช่วงความยาวดังกล่าวยังมีข้อเสีย คือ คอลัมน์มีราคาสูง ($\geq 10,000$ บาทต่อคอลัมน์) มีความดันย้อนกลับที่ค่อนข้างสูง ทำให้ไม่สามารถใช้อัตราการไหลที่สูงได้ ซึ่งการใช้อัตราการไหลต่ำ (อัตราการไหล 1.0-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที) จะส่งผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ทำให้ใช้เวลานาน อีกทั้งเมื่อทำการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งยังใช้ปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่และตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากก่อให้เกิดเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก (ความยาวน้อยกว่า 1.0 เซนติเมตร) สำหรับประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินบีทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างนมพร้อมดื่มที่มีจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด โดยเน้นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่ได้สะดวก รวดเร็ว ราคาถูก โดยยังคงประสิทธิภาพการวิเคราะห์ที่ดี และเป็นวิธีที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือเหมาะสำหรับการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่พบในตัวอย่างนมพร้อมดื่มที่มีจำหน่ายและได้รับความนิยมในประเทศไทย

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยการใช้อัลลีเมนต์ขนาดเล็กสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. เพื่อประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มรสจืดและปรุงแต่งกลิ่นรส

ความสำคัญของการวิจัย

1. ได้วิธีวิเคราะห์วิธีใหม่สำหรับการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกัน โดยใช้อัลลีเมนต์ขนาดเล็ก (ความยาวน้อยกว่า 1.0 เซนติเมตร) ที่มีประสิทธิภาพการแยกสูง
2. ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ลดการใช้น้ำทำละลายอินทรีย์ และลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2
3. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่พบในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มประเภทต่างๆที่จำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด เพื่อใช้ในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด

ขอบเขตของการวิจัย

สำหรับขอบเขตของงานวิจัยนี้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่สำหรับตรวจวัดวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ในตัวอย่างนมพร้อมดื่ม โดยมีขอบเขตการวิจัย ดังนี้

1. การศึกษาสภาวะการแยกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินทั้ง 2 ชนิดแบบพร้อมกัน โดยใช้อัลลีเมนต์ขนาดเล็ก
2. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น
3. การประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มรสจืดและปรุงแต่งกลิ่นรส

ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

สำหรับขั้นตอนดำเนินงานวิจัย มีดังนี้

1. การศึกษาสภาวะการแยกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินทั้ง 2 ชนิดแบบพร้อมกัน โดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก

1.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2

1.2 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.2.1 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ในวัฏภาคเคลื่อนที่

1.2.2 อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.3 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

2. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

2.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range)

2.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of quantitation; LOQ)

2.3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (precision)

2.4 ร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

3. การประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มประเภทต่างๆที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ได้แก่ นมสดยูเอชที นมสดพาสเจอร์ไรส์ และนมปรุงแต่งกลิ่นรส พร้อมทั้งเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้คอลัมน์ขนาดความยาวมาตรฐาน และตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์

บทที่ 2

เอกสารและวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้ทำวิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และนำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. นม
2. วิตามิน
3. เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. นม

นมหรือน้ำนม หมายถึง ของเหลวบริสุทธิ์ที่ผลิตได้จากเต้านมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางอาหารและมีความจำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ เนื่องจากช่วยในการเจริญเติบโต การซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย และทำให้สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง โดยส่วนใหญ่ผลิตภัณฑ์นมที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดมีส่วนประกอบหลักๆ คือ นมวัวดิบซึ่งเป็นน้ำนมบริสุทธิ์ และส่วนประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่น้ำ ซึ่งเรียกว่า ของแข็งทั้งหมด (total solid) เมื่อหักปริมาณไขมันออก ส่วนที่เหลือจึงเรียกว่า ของแข็งปราศจากไขมัน (milk solid not fat; MSNF)(นิตยา รัตนปนนท์. 2557: 1) ดังนั้นการจะได้นมสดที่มีคุณค่าของสารอาหารครบถ้วน จึงขึ้นอยู่กับวิธีการคัดสรรน้ำนมดิบที่มีคุณภาพจากแหล่งที่ได้มาตรฐาน และผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อโรคด้วยความร้อนเพื่อนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มที่มีสารอาหารครบถ้วนและมีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค

1.1 ประเภทของนม

นมพร้อมดื่มที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไปสามารถจำแนกออกเป็นประเภทต่างๆ ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรส์ (pasteurized milk) นมสเตอริไลส์ (sterilized milk) นมยูเอชที (ultra high temperature milk) นมปรุงแต่งกลิ่นรส (flavoured milk) และนมเปรี้ยวหรือโยเกิร์ต (cultured milk or yogurt) (ณิชชยา จิตติชญาพัทธ์. 2552: 17-26) โดยมีรายละเอียดของนมแต่ละประเภท ดังนี้

- นมพาสเจอร์ไรส์ คือ นมสดที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิในช่วง 60-72 °C เป็นระยะเวลา 15-30 วินาที แล้วทำให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิ 4.4 °C ก่อนบรรจุลงในขวดพลาสติกขุ่นหรือกล่องกระดาษลามิเนต นมประเภทนี้มีคุณค่าทางอาหารครบถ้วน มีความสดใหม่ และมีกลิ่นหอม

กรรมวิธีพาสเจอร์ไรส์นี้สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ทำให้เกิดโรคต่างๆในคนได้ แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารบูดเน่าได้ จึงมีอายุในการเก็บรักษาไม่นาน อยู่ในช่วง 7-14 วัน

- นมสเตอริไลส์ คือ นมสดที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูง อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 100 °C เป็นระยะเวลา 20-30 นาที ซึ่งจะทำให้สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ทุกชนิด เนื่องจากกรรมวิธีนี้ใช้ความร้อนสูงมาก ทำให้ในขั้นตอนการบรรจุจึงจำเป็นต้องใช้ภาชนะระบ่องปิดสนิทที่ทำจากโลหะในสภาวะปลอดเชื้อ นมประเภทนี้มีคุณค่าทางอาหารน้อยกว่าประเภทพาสเจอร์ไรส์ และมีสี กลิ่น และรสชาติเปลี่ยนไป แต่สามารถเก็บได้นานกว่าโดยมีอายุการเก็บรักษาได้ประมาณ 1 ปี อย่างไรก็ตามวิธีการผลิตวิธีนี้จะทำให้นมมีการสูญเสียปริมาณวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และวิตามินซีในระหว่างกรรมวิธีการผลิต ดังนั้นผู้ผลิตจึงอาจต้องมีการเติมวิตามินเหล่านี้ลงไปก่อนนำมาวางจำหน่าย เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์นมที่ยังคงคุณค่าของสารอาหารครบถ้วน

- นมยูเอชที คือ นมสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูงประมาณ 140 °C เป็นระยะเวลา 3 วินาทีเท่านั้น หลังจากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 20 °C ก่อนบรรจุลงในภาชนะปลอดเชื้อ ซึ่งมีลักษณะเป็นกล่องที่สามารถป้องกันอากาศผ่านเข้าไปในผลิตภัณฑ์ นมประเภทนี้มีกลิ่นและรสชาติดีกว่านมสเตอริไลส์ มีอายุในการเก็บรักษาประมาณ 6-9 เดือน อย่างไรก็ตามการผลิตด้วยวิธีนี้ก็ส่งผลให้วิตามินบี 1 และวิตามินซี ในผลิตภัณฑ์นมสูญเสียไป เนื่องจากถูกทำลายด้วยความร้อน ดังนั้นผู้ผลิตจึงอาจต้องมีการเติมวิตามินเหล่านี้ลงไปก่อนนำมาวางจำหน่าย เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์นมที่ยังคงคุณค่าของสารอาหารครบถ้วน

- นมปรุงแต่งกลิ่นรส นมประเภทนี้ คือ นมพาสเจอร์ไรส์หรือนมยูเอชทีซึ่งผ่านกรรมวิธีการให้ความร้อนวิธีเดียวกัน แต่มีการแต่งกลิ่นและรสชาติต่างๆลงไปร่วมกับการเติมน้ำตาล เช่น นมปรุงแต่งรสหวาน รสช็อกโกแลต รสกาแฟ เป็นต้น จึงทำให้มีปริมาณนมสดลดลง คุณค่าทางโภชนาการลดลง อย่างไรก็ตามนมประเภทนี้ยังคงได้รับความนิยมในหมู่ผู้บริโภคทั้งเด็กและผู้ใหญ่

- นมเปรี้ยวหรือโยเกิร์ต คือ นมหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนมที่นำมาผ่านกรรมวิธีการหมักกับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น แลคโตบาซิลลัส เอซิโดฟิลลัส (*Lactobacillus acidophilus*) แลคโตบาซิลลัส บัลการิคัส (*Lactobacillus bulgaricus*) และสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลลัส (*Streptococcus thermophilus*) เป็นต้น (โยเกิร์ต นมเปรี้ยวหมักจอร์จ. ม.ป.ป.: ออนไลน์) ส่งผลให้น้ำตาลแลคโตสในนมถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก จึงทำให้นมมีรสเปรี้ยว ซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยย่อยอาหาร นอกจากนี้สารบางชนิดที่สร้างโดยจุลินทรีย์ชนิดนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้อีกด้วย โดยนมเปรี้ยวสามารถจำแนกได้ 2 ประเภท คือ นมเปรี้ยวที่มีลักษณะเป็นน้ำคล้ายเครื่องดื่ม และนมเปรี้ยวที่มีลักษณะเหลวข้นที่เรียกว่า โยเกิร์ต

1.2 องค์ประกอบในน้ำนม

องค์ประกอบที่สำคัญในผลิตภัณฑ์นม (ณิชชยา วุฒิชญาพัทธ์. 2552: 11-15) มีดังนี้

- โปรตีน

โปรตีนในน้ำนมประกอบด้วยโปรตีนเคซีน (casein) โกลบูลิน (globulin) และอัลบูมิน (albumin) โปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่ช่วยซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ และเสริมสร้างเนื้อเยื่อภายในร่างกาย เช่น เลือด ไชกระดูก ผิวหนัง และเส้นผม เป็นต้น โดยโปรตีนนมจะมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย เช่น วาลีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน ฟีนอลอะลานีน เมทไธโอนีน ทริปโตเฟน อาร์จินีน ฮีสติดีน ไลซีน และทรีโอนีน เป็นต้น ซึ่งต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ ดังนั้นจึงนิยมเรียกโปรตีนนมว่า “โปรตีนที่สมบูรณ์”

- คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตในน้ำนม คือ น้ำตาลแลคโตส (lactose) เป็นน้ำตาลชนิดเดียวที่มีในนม ซึ่งเป็นอาหารประเภทที่ให้พลังงาน อีกทั้งยังมีประโยชน์สำคัญต่อร่างกาย คือ ช่วยควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กของมนุษย์ จึงทำให้ระบบขับถ่ายเป็นปกติ สำหรับทารกน้ำตาลแลคโตสมีคุณค่าสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ เพราะช่วยดูดซึมแร่ธาตุฟอสฟอรัสและแคลเซียม

- เกลือแร่

น้ำนมเป็นแหล่งของเกลือแร่แคลเซียมและฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในการสร้างกระดูกและฟันให้แข็งแรง รวมทั้งยังป้องกันโรคกระดูกพรุน และช่วยในการสร้างน้ำนมของมารดา นอกจากนี้ในน้ำนมยังมีแร่ธาตุที่สำคัญชนิดอื่นๆ ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม คลอไรด์ กำมะถัน เหล็ก ทองแดง แมงกานีส ไอโอดีน สังกะสี โคบอลต์ และเกลือซีเตรตอีกด้วย

- วิตามิน

วิตามินเป็นสารที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในร่างกายให้ทำงานได้อย่างปกติ ในนมสามารถพบได้ทั้งวิตามินกลุ่มที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามินเอ และวิตามินกลุ่มที่ละลายในน้ำ ได้แก่ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และวิตามินซี ซึ่งวิตามินเหล่านี้สามารถช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย อีกทั้งยังช่วยให้ระบบการทำงานของร่างกายเป็นปกติ

จากองค์ประกอบที่พบในนมตามที่กล่าวมานั้น จะเห็นได้ว่าวิตามินเป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักที่สำคัญ ดังนั้นในปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มประเภทต่างๆ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม จึงได้มีการเติมวิตามินเหล่านี้ลงไป ในผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ผู้บริโภคไม่ว่าทั้งเด็กหรือผู้ใหญ่ ได้รับปริมาณวิตามินในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันและระบบการทำงานของร่างกายให้เป็นปกติ

2. วิตามิน

วิตามินเป็นหนึ่งในสารอาหารหลักที่มีความสำคัญกับร่างกายมนุษย์ เนื่องจากวิตามินมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเคมีในกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์หรือผลิตวิตามินขึ้นมาเองได้จึงจำเป็นต้องได้รับจากอาหารหรือเครื่องดื่มนั้น

2.1 ประเภทของวิตามิน

ประเภทของวิตามินสามารถจำแนกได้ตามความสามารถในการละลาย ทำให้สามารถจำแนกประเภทของวิตามินได้เป็น 2 ประเภทหลัก ดังนี้

2.1.1 วิตามินชนิดที่ละลายในน้ำมันหรือไขมัน ได้แก่ วิตามินเอ ดี อี และเค (vitamin A, D, E, K) วิตามินเหล่านี้สามารถถูกกักเก็บไว้ที่กล้ามเนื้อหรือไขมันตามส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ภายหลังจากที่รับประทานเข้าไป ดังนั้น ร่างกายไม่จำเป็นต้องรับประทานวิตามินกลุ่มนี้ทุกวันเพราะมีสะสมอยู่ตามกล้ามเนื้อส่วนต่างๆ อย่างไรก็ตามถ้ามีการรับประทานวิตามินเหล่านี้ในปริมาณมากเกินไป จะเกิดการสะสมในส่วนต่างๆ ทำให้เป็นพิษจากวิตามินได้ (ผิวสวยและสุขภาพแข็งแรงด้วยวิตามิน. ม.ป.ป.: ออนไลน์) โดยเฉพาะวิตามินเอหากได้รับในปริมาณมากหรือสะสมอยู่ในร่างกายมากเกินไปอาจทำให้เสียชีวิตได้ (อารีกุล ปญญาวัฒน์. 2551: 17-19)

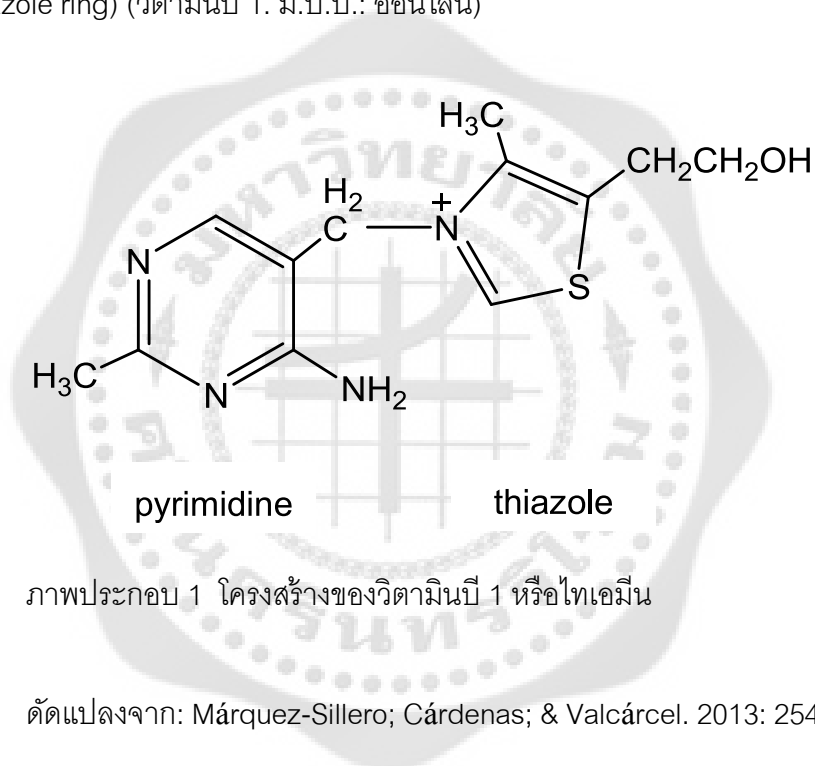
2.1.2 วิตามินชนิดที่ละลายในน้ำ ได้แก่ วิตามินบีรวม และวิตามินซี (vitamin B complex, vitamin C) วิตามินกลุ่มนี้ไม่สามารถสะสมหรือกักเก็บไว้ภายในร่างกายได้นาน เนื่องจากมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีทำให้ถูกกำจัดออกทางปัสสาวะหรือเหงื่อตลอดเวลา ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องได้รับวิตามินกลุ่มนี้ทุกวันจากการรับประทานอาหาร ถ้าหากร่างกายได้รับวิตามินกลุ่มนี้ในปริมาณมากเกินไป ส่วนเกินของวิตามินเหล่านี้ก็สามารถถูกขับออกโดยไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย (ผิวสวยและสุขภาพแข็งแรงด้วยวิตามิน. ม.ป.ป.: ออนไลน์)

ถึงแม้ว่าร่างกายมนุษย์จะมีความต้องการวิตามินในปริมาณน้อย (ระดับมิลลิกรัมต่อวัน) เมื่อเทียบกับสารอาหารหลักในกลุ่มอื่นๆ เนื่องจากวิตามินเป็นสารอาหารที่ไม่มีแคลอรี และไม่สามารถให้พลังงานโดยตรงกับร่างกายได้ แต่ถ้าหากร่างกายได้รับปริมาณวิตามินไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายอาจทำให้ร่างกายเกิดสภาวะขาดแคลนวิตามิน ซึ่งมีผลต่อความผิดปกติของระบบต่างๆ ในร่างกาย หรือทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น ถ้าขาดวิตามินเอ จะส่งผลกับระบบสายตาทำให้มองเห็นได้ยากในเวลากลางคืน การขาดวิตามินบี 1 ทำให้เกิดโรคเหน็บชา การขาดวิตามินบี 2 ทำให้เกิดเป็นปากโรคนกกระจอก และถ้าขาดวิตามินซี ทำให้เกิดเลือดออกตามไรฟัน เป็นต้น (ผิวสวยและสุขภาพแข็งแรงด้วยวิตามิน. ม.ป.ป.: ออนไลน์) โดยในงานวิจัยครั้งนี้สนใจศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินชนิดที่ละลายในน้ำ ได้แก่ วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ซึ่งเป็นวิตามินที่พบปริมาณมากในนมและเป็น

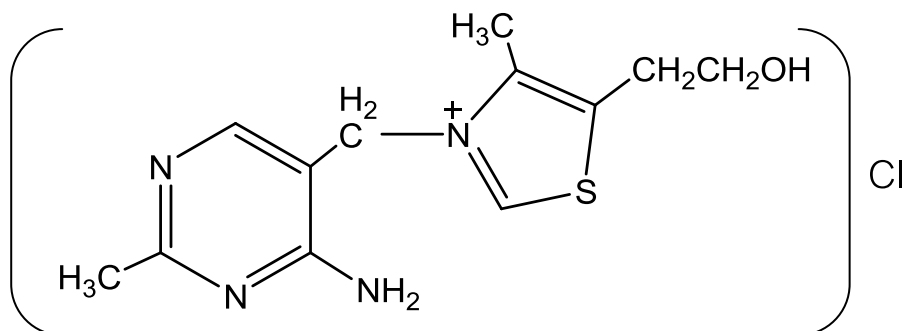
กลุ่มวิตามินที่ต้องรับประทานเข้าไปทุกวัน เพื่อให้ร่างกายได้รับปริมาณวิตามินที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย สำหรับการนำไปใช้สร้างเนื้อเยื่อและการทำงานของระบบอวัยวะต่างๆ เช่น การมองเห็น และการทำงานของระบบประสาท เป็นต้น (ปรีญา หมาตหลู; และคณะ. 2549: 10-11)

2.2 วิตามินบี 1

วิตามินบี 1 หรือไทเอมีน จัดอยู่ในวิตามินประเภทที่ละลายได้ในน้ำ มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวสามารถละลายในน้ำได้ดี และละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ ลักษณะโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพประกอบ 1 ประกอบด้วยวงแหวน 2 วง คือ วงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) และวงแหวนไทอะโซล (thiazole ring) (วิตามินบี 1. ม.ป.ป.: ออนไลน์)



โดยทั่วไปวิตามินบี 1 ที่ใช้เสริมลงในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ที่จำหน่ายตามท้องตลาดมักอยู่ในรูปวิตามินบี 1 สังกะหร่า หรือที่เรียกว่า ไทเอมีนไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine hydrochloride) มีโครงสร้างแสดงดังภาพประกอบ 2 ซึ่งสามารถสกัดได้จากเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ลักษณะเป็นผลึกใส ไม่มีสี มีกลิ่นเหมือนยีสต์ มีรสเค็ม ละลายน้ำได้ดี หากวิตามินนี้อยู่ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างจะสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน แต่ถ้าอยู่ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรดวิตามินนี้จะค่อนข้างเสถียรและทนความร้อนได้ดี (วิตามินและแร่ธาตุ. ม.ป.ป.: ออนไลน์)



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างวิตามินบี 1 สังเคราะห์ที่มีการผลิตและจำหน่ายตามท้องตลาด

ดัดแปลงจาก: Márquez-Sillero; Cárdenas; & Valcárcel. 2013: 254

2.2.1 หน้าที่ของวิตามินบี 1

หน้าที่ของวิตามินบี 1 สามารถสรุปได้ (รักษิตา บุญพันธ์. 2550: 12-13) ดังนี้

1. ช่วยในการทำงานของระบบทางเดินอาหาร กระตุ้นความอยากรับประทานอาหาร จึงทำให้ระบบการย่อยอาหารและระบบการขับถ่ายดีขึ้น
2. เป็นส่วนประกอบของไทเอมีนไพโรฟอสเฟต (TPP) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในการเผาผลาญสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาล
3. ช่วยในการทำงานของระบบประสาทและหัวใจ เพราะวิตามินนี้จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารพวอะซิทิลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งควบคุมการทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อต่างๆของร่างกายให้เป็นปกติ เพื่อไม่ให้เกิดเป็นโรคเหน็บชาหรือเป็นอัมพาต

2.2.2 ผลของการขาดวิตามินบี 1

การขาดวิตามินบี 1 จะส่งผลโดยตรงต่อการทำงานของระบบต่างๆ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท และระบบหัวใจ (ปรียา หมดหลู; และคณะ. 2549: 64-66) ดังนี้

- ระบบทางเดินอาหาร หากร่างกายขาดวิตามินบี 1 จะทำให้เกิดอาการเบื่ออาหาร (anorexia) เนื่องจากระบบการย่อยอาหารผิดปกติ จึงทำให้การย่อยคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้ได้กลูโคสแก่ร่างกายลดลง
- ระบบประสาท หากร่างกายขาดวิตามินบี 1 จะทำให้ระบบประสาทส่วนกลางทำงานผิดปกติ เนื่องจากได้ปริมาณกลูโคสไม่เพียงพอต่อร่างกาย ส่งผลทำให้มีปฏิกิริยาการตอบสนองลดลง

เซื่องซึม เหนื่อยล้า และถ้าขาดวิตามินบี 1 ในระยะเวลานาน จะทำให้สารสื่อประสาทถูกทำลายหรือเสื่อมไป ซึ่งก่อให้เกิดอาการปวด หรือมีความรู้สึกชา ถ้าขั้นรุนแรงอาจทำให้เกิดเป็นอัมพาตได้

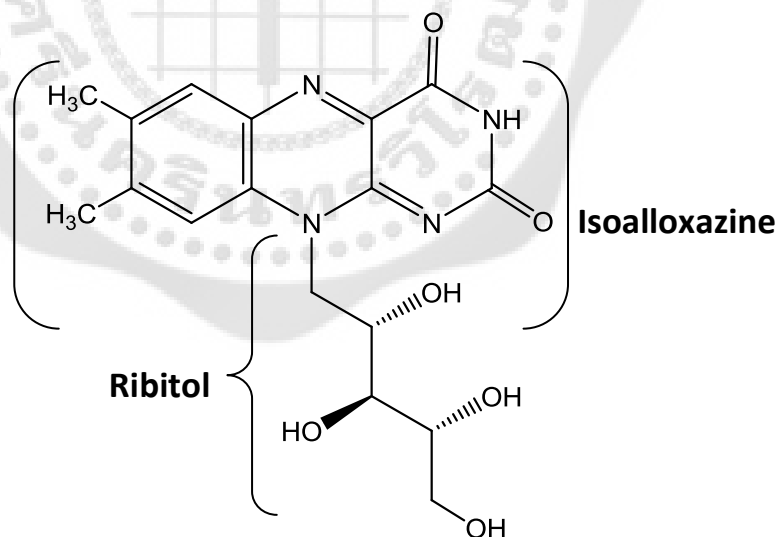
- ระบบหัวใจ การขาดวิตามินบี 1 ทำให้การทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจอ่อนลง มีอาการบวมตามแขน ขา และอาจส่งผลให้เป็นโรคหัวใจวายได้

2.2.3 แหล่งอาหารที่พบวิตามินบี 1

วิตามินบี 1 ส่วนมากพบในธัญพืช เช่น ข้าวและข้าวสาลีที่ไม่ผ่านการขัดสี โดยพบในส่วนเนื้อเยื่อของเปลือกหุ้มเมล็ด (seed husk) นอกจากนี้ยังพบใน เนื้อหมู ยีสต์ และในนมสด เป็นต้น (วิตามินบี 1. ม.ป.ป.: ออนไลน์)

2.3 วิตามินบี 2

วิตามินบี 2 หรือไรโบฟลาวิน พบครั้งแรกในรูปรงควัตถุเรืองแสงสีเหลือง ซึ่งสกัดได้จากนม เรียกรงควัตถุชนิดนี้ว่า ฟลาวิน (flavin) โครงสร้างของวิตามินบี 2 ประกอบไปด้วยสายคาร์บอน 5 คาร์บอนของหมู่ไรบิทอล (ribitol) ที่เกิดจากการรีดิวซ์ของน้ำตาลไรโบส (ribose) เชื่อมกับอะตอมไนโตรเจนในโมเลกุลวงแหวนไอโซอัลลอกซาซีน (isalloxazine ring) โครงสร้างแสดงดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างโมเลกุลของวิตามินบี 2 หรือไรโบฟลาวิน

ดัดแปลงจาก: Nishizawa; et al. 2006: 134

วิตามินบี 2 หรือไรโบฟลาวิน เป็นวิตามินที่ถูกทำลายทันทีเมื่อถูกแสง และมีความเสถียรต่อความร้อนในสถานะที่เป็นกรดเท่านั้น

2.3.1 หน้าที่ของวิตามินบี 2

บทบาทของวิตามินบี 2 ที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย (อารีกุล ปุญญาวัฒน์. 2551: 42) สามารถสรุปได้ ดังนี้

1. เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในโมเลกุลของโคเอนไซม์ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ (FMN) และฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (FAD) ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน และกรดไขมันในกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อให้เกิดพลังงานแก่ร่างกาย
2. ช่วยในกระบวนการสร้างการเจริญเติบโตและสืบพันธุ์
3. เพิ่มประสิทธิภาพในการมองเห็น ช่วยบรรเทาอาการอ่อนล้าของสายตา
4. ป้องกันอาการเจ็บแสบในปาก ริมฝีปากและลิ้น
5. ช่วยส่งออกซิเจนให้กับเซลล์ทุกเซลล์ภายในร่างกาย ให้มีระบบการทำงานเป็นไปตามปกติ และทำหน้าที่ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ

2.3.2 ผลของการขาดวิตามินบี 2

การขาดวิตามินบี 2 มีอาการที่สามารถสังเกตได้ (ปรียา หมายาดใหญ่; และคณะ. 2549: 48-49) ดังนี้

1. ในเด็กการขาดวิตามินบี 2 จะทำให้การเจริญเติบโตของร่างกายหยุดชะงัก
2. ทำให้เกิดแผลที่มุมปาก (angular stomatitis) หรือโรคปากนกกระจอก
3. เกิดเส้นเลือดขึ้นในดวงตา ถ้าเป็นขั้นรุนแรงอาจทำให้กระจกตาได้รับความเสียหาย เพราะได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอ เนื่องจากร่างกายจะสร้างเส้นเลือดขึ้นบริเวณรอบดวงตา เพื่อทดแทนการนำพาออกซิเจนจากวิตามินบี 2 หรือไรโบฟลาวิน
4. ผิวหนังอักเสบ มีผื่นแดงขึ้นตามผิวหนัง
5. เกิดภาวะโรคโลหิตจาง

2.3.3 แหล่งอาหารที่พบวิตามินบี 2

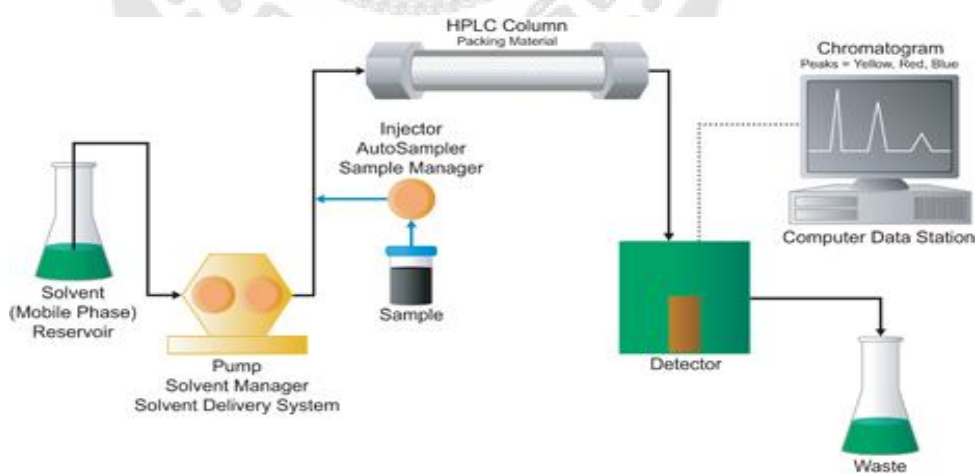
วิตามินบี 2 พบมากในเนื้อวัว ปลา ไก่ เครื่องในสัตว์ โดยเฉพาะตับและไต รวมทั้งพืชใบเขียวและนํ้านม เนื่องจากวิตามินชนิดนี้ไวต่อแสงจึงมักถูกทำลายหรือสูญเสียไปขณะแปรรูปผลิตภัณฑ์

ดังนั้นบรรจุภัณฑ์ของอาหารที่มีวิตามินบี 2 จำเป็นต้องทำการบรรจุในภาชนะที่บดแสง (วิตามินบี 2. ม.ป.ป.: ออนไลน์)

ถึงแม้ว่าวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดจะสามารถพบในอาหารประเภทต่างๆอยู่แล้ว แต่ด้วยพฤติกรรมของผู้บริโภคในสภาวะเร่งรีบในปัจจุบันจึงทำให้ผลิตภัณฑ์มากมายที่จำหน่ายตามท้องตลาดมีการเสริมวิตามินเหล่านี้ลงไป เช่น เครื่องดื่มประเภทต่างๆ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม เป็นต้น ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์ประเภทต่างๆ จึงมีความสำคัญเพื่อเป็นการรับรองคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้เป็นที่ยอมรับและน่าเชื่อถือจากผู้บริโภค อีกทั้งยังเป็นการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดอีกด้วย

3. เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นเทคนิคการวิเคราะห์เทคนิคหนึ่งที่ได้รับการยอมรับเป็นมาตรฐานสากลใช้สำหรับการแยกองค์ประกอบของสารโดยอาศัยหลักการกระจายตัวของสารในสองวัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยวัฏภาคคงที่เป็นของแข็งหรือของเหลวเคลือบอยู่บนตัวค้ำจุนของแข็งซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลวซึ่งอาจเรียกว่า สารละลายตัวชะ (eluent) ที่ไหลผ่านวัฏภาคคงที่โดยอาศัยบีบแรงดันสูงเป็นตัวพา ทำให้โมเลกุลของสารละลายตัวอย่างมีการกระจายตัวระหว่างสองวัฏภาคที่แตกต่างกัน จึงสามารถทำให้สารแต่ละชนิดแยกออกจากกันได้ (พัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2554: 1-3) โดยส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแสดงดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ที่มา: High Performance Liquid Chromatography. ม.ป.ป.: ออนไลน์

การจำแนกเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสามารถแบ่งออกตามกลไกการแยก เช่น นอร์มอลเฟสโครมาโทกราฟี (normal phase chromatography) รีเวอร์สเฟสโครมาโทกราฟี (reverse phase chromatography) อีออนแพร์โครมาโทกราฟี (ion-pair chromatography) และอีออนเอ็กซ์เชنجโครมาโทกราฟี (ion-exchange chromatography) เป็นต้น (พัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2554: 17-28) โดยงานวิจัยส่วนใหญ่มักนิยมใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้กลไกการแยกแบบรีเวอร์สเฟสโครมาโทกราฟี ซึ่งมีกลไกในการแยกที่อาศัยความแตกต่างของความมีขั้วระหว่างวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยวัฏภาคคงที่ที่ใช้เป็นสารที่ไม่มีขั้ว (non-polar substrate) ซึ่งเคลือบอยู่บนผิววนอกของตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุชนิดเม็ดทรงกลมขนาดเล็กที่ไม่มีรูพรุน (non-porous core) ซึ่งปกติจะให้เป็นเมดิซิลิกา ในขณะที่วัฏภาคเคลื่อนที่จะเป็นสารที่มีขั้ว (polar substrate) ดังนั้นสารชนิดใดสามารถกระจายตัวในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ดีกว่าวัฏภาคคงที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ในทางกลับกันถ้าสารชนิดใดสามารถกระจายตัวใน วัฏภาคคงที่ได้ดีกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยประสิทธิภาพการแยก (Resolution; R_s) ของคอลัมน์จะพิจารณาได้ (Snyder; Kirkland; & Glajch. 1999: 27-31) ดังสมการ

$$R_s = 1/4 \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) N^{1/2} \left(\frac{k}{1+k} \right)$$

โดยที่ α (selectivity) คือ ค่าที่บอกถึงลักษณะการแยกของสารผสมที่ปรากฏในโครมาโทแกรม โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัฏภาคคงที่และชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งถ้าค่า α สูง แสดงว่าประสิทธิภาพการแยกของพีคสองพีคที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันได้ดี

N (theoretical plate number) คือ จำนวนเพลททางทฤษฎี มีผลกับค่าความกว้างของพีค โดยค่า N จะขึ้นกับความยาวของคอลัมน์และอัตราการไหล ถ้าคอลัมน์มีความยาวเพิ่มขึ้นหรืออัตราการไหลลดลงจะส่งผลให้จำนวนเพลททางทฤษฎีเพิ่มขึ้น จึงทำให้ประสิทธิภาพการแยกของสารผสมดีขึ้น

k (retention) คือ ค่าการคงอยู่ของสารภายในคอลัมน์ หรือเรียกว่าค่าแฟคเตอร์ความจุ (capacity factor; k') โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่และลักษณะการบรรจุของอนุภาคภายในคอลัมน์ (packing) ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการคงอยู่ของสารภายในคอลัมน์ โดยถ้าค่าการคงอยู่ของสารภายในคอลัมน์มาก ประสิทธิภาพการแยกของสารละลายจะเพิ่มมากขึ้นด้วย

โดยทั่วไปการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมักนิยมใช้คอลัมน์ที่มีขนาดความยาวคอลัมน์อยู่ในช่วง 5-25 เซนติเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวที่ทำให้มีประสิทธิภาพการแยก

ที่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามการใช้คอลัมน์ในขนาดช่วงความยาวดังกล่าวยังมีข้อเสีย คือ คอลัมน์มีราคาสูง มีความดันย้อนกลับที่ค่อนข้างสูง และยังใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ต่อมาจึงได้มีงานวิจัยที่นำคอลัมน์ขนาดเล็กซึ่งมีขนาดสั้นกว่ามาประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อให้ได้ระยะเวลาการวิเคราะห์ที่รวดเร็วกว่าขึ้น โดยยังคงประสิทธิภาพการแยกที่ดี จากการศึกษาค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่ามีงานวิจัยที่นำคอลัมน์ขนาดเล็กมาประยุกต์ใช้ในการแยกสารประเภทต่างๆ ดังเช่นงานวิจัยของ Le และ Ma (Le; & Ma. 1998: 1926-1933) ได้ทำการวิเคราะห์ฮาเซไนท์ ฮาเซเนต กรดมอนอเมทิลฮาซีนิก และกรดไดเมทิลฮาซีนิก ด้วยคอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (30 mm x 4.6 mm, 5 μ m) ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้นเพียง 3 นาทีเท่านั้น ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 Youngvises และคณะ (Youngvises; et al. 2003: 629-638) ทำการวิเคราะห์สารโทลเพอริซิน และลิโดเคอิน ในตัวอย่างยา โดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (12.5 mm x 4.6 mm, 5 μ m) ร่วมกับเทคนิคไมเซลล์ลาริลควิดโครมาโทกราฟี (Micellar liquid chromatography; MLC) ซึ่งสามารถวิเคราะห์แยกสารทั้ง 2 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์ และในปี ค.ศ. 2013 กลุ่มงานวิจัยเดียวกันได้มีการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์โดยนำคอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (12.5 mm x 4.6 mm, 5 μ m) มาใช้ร่วมกับเทคนิคไมเซลล์ลาริลควิดโครมาโทกราฟี (Youngvises; et al. 2013: 350-359) สำหรับการวิเคราะห์วัตถุกันเสียกลุ่มพาราเบน ได้แก่ เมทิลพาราเบน เอทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน และบิวทิลพาราเบน ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 7 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่าเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1-100 ไมโครโมลต่อลิตร ($R^2 > 0.999$) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 0.04-0.10 ไมโครโมลต่อลิตร ค่าความเที่ยงแสดงในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าน้อยกว่า 3 และมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 92.4-109.2 จากการวิเคราะห์ในตัวอย่างพบว่าวิธีการวิเคราะห์นี้สามารถทำได้ง่าย วิเคราะห์ได้รวดเร็ว และยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจนำคอลัมน์ขนาดเล็ก (ความยาวน้อยกว่า 1.0 เซนติเมตร) มาพัฒนาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มประเภทต่างๆ เพื่อให้ได้วิธีการวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็วมากขึ้น ประหยัดค่าใช้จ่าย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยยังคงประสิทธิภาพการแยกที่ดีเทียบเท่ากับการใช้คอลัมน์ขนาดยาว

4.งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

4.1 การวิเคราะห์สารกลุ่มวิตามินที่ละลายในน้ำด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินและสามารถทำได้ง่ายคือ เทคนิคทางสเปกโทรโฟโตเมตรี เช่น เทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี (UV-Visible spectrophotometry) และเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรี (Spectrofluorimetry) โดยนำวิตามินที่สนใจมาทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีหรือวาวแสงได้ แล้วทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงหรือค่าการวาวแสง ดังเช่นงานวิจัยของ Liu และ คณะ (Liu; et al. 2002: 685-694) ทำการวิเคราะห์วิตามินบี 1 ในตัวอย่างยาด้วยเทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยนำมาทำปฏิกิริยากับสีย้อมชนิดกรดไตรฟีนิลมีเทนทั้ง 6 ชนิดได้แก่ โบรโมไทมอลบลู ไทมอลบลู โบรโมฟีนอลบลู โบรโมครีซอลกรีน ฟีนอลเรด และครีซอลเรด เมื่อวิตามินบี 1 ทำปฏิกิริยากับสีย้อมชนิดโบรโมไทมอลบลู ไทมอลบลู โบรโมฟีนอลบลู และโบรโมครีซอลกรีน ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีภายในเวลา 2 นาที โดยสารประกอบเชิงซ้อนจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และเมื่อนำวิตามินบี 1 ทำปฏิกิริยากับสีย้อมชนิดฟีนอลเรด และครีซอลเรด ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีภายในเวลา 10 นาที โดยสารประกอบเชิงซ้อนจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีส้ม จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 420-450 นาโนเมตร เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่าเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.36-0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ($R^2 > 0.993$) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของวิตามินบี 1 อยู่ในช่วง 24.0-70.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.8-101.4 สำหรับตัวอย่างงานวิจัยที่ทำการวิเคราะห์วิตามินด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรี ดังเช่นงานวิจัยของ Wu และคณะ (Wu; et al. 2003: 95-99) ได้ทำการวิเคราะห์วิตามินซี โดยนำมาทำปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยออร์โทฟีนอลไดอะมิน เกิดเป็นสารอนุพันธ์ที่วาวแสง และสามารถทำการตรวจวัดค่าการวาวแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร เมื่อใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น 360 นาโนเมตร ผลการวิเคราะห์พบว่า เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่าเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.05-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2 > 0.995$) เมื่อนำไปวิเคราะห์วิตามินซีในตัวอย่างเม็ดยา พบว่าให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.006 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

อย่างไรก็ตามการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริยังมีข้อเสีย คือ ต้องหาสารเคมีที่สามารถทำปฏิกิริยากับวิตามินเพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีหรือเกิดอนุพันธ์ที่วาวแสง อีกทั้งยังไม่สามารถทำการวิเคราะห์สารแบบพร้อมกันหลายชนิดได้ แต่ในการวิเคราะห์วิตามินส่วนใหญ่นิยมทำการวิเคราะห์แบบพร้อมกัน เพื่อประหยัดระยะเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ โดยยังคงมีความแม่นยำ และมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์สูง ดังนั้นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์วิตามินต่างๆแบบพร้อมกันอีกเทคนิคหนึ่งที่มีความนิยมเป็นอย่างมาก คือ เทคนิคโครมาโทกราฟี

ของเหลวสมรรถนะสูง และเทคนิคที่ควมละเอียดอินเจคชันอะนาลิซิส (Sequential Injection Analysis; SIA)

4.2 การวิเคราะห์สารกลุ่มวิตามินที่ละลายในน้ำด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

4.2.1 การวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหาร

ในปี ค.ศ. 1997 Argoudelis (Argoudelis, 1997: 83-89) ทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 6 ทั้ง 7 รูปแบบ ได้แก่ ไพริดอกซีน ไพริดอกซาล ไพริดอกซามีน ไพริดอกซีน 5'-ฟอสเฟต ไพริดอกซาล 5'-ฟอสเฟต ไพริดอกซามีน 5'-ฟอสเฟต และ 4-ไพริดอกซิกแอซิก ในตัวอย่างนม ยีสต์ และไข่แดง โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้คือสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ (pH 2.5) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดค่าการวางแสงที่ความยาวคลื่น 389 นาโนเมตร เมื่อใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 290 นาโนเมตร โดยมีการใช้ไอโซไพริดอกซาลเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 20 นาที และสามารถนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างนม ยีสต์ และไข่แดงได้จริง โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 85.1-101.8

และในปีเดียวกันกลุ่มงานวิจัยของ Hurtado และคณะ (Hurtado; et al. 1997: 247-253) ได้ทำการวิเคราะห์วิตามินที่ละลายในน้ำจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ นิโคตินาไมด์ ไทเอมีน ไรโบฟลาวิน ไพริดอกซีน ไพริดอกซาล ไพริดอกซามีน ไชยานิโคบาลามีน และกรดฟอริก ในตัวอย่างนมเด็กทารก โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สารละลายผสมระหว่างกรดออกเทนซัลโฟนิกที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มี 0.5% ไตรเอทิลเอมีน (pH 3.6) กับเมทานอลในอัตราส่วนร้อยละ 85:15 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่วิตามินแต่ละชนิดดูดกลืนแสงได้สูงสุด พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 55 นาที มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของวิตามินทั้ง 8 ชนิดอยู่ในช่วง 0.02-0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างนมผงเด็กทารกและนมทารกชนิดของเหลวได้จริง โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 76-96

ในปี ค.ศ. 2003 Viñas และคณะ (Viñas; et al. 2003: 77-84) ได้ทำการวิเคราะห์วิตามินที่ละลายในน้ำ ได้แก่ ไทเอมีน ไรโบฟลาวิน นิโคตินาไมด์ กรดนิโคตินิก ไพริดอกซีน ไพริดอกซาล กรดฟอริก ไชยานิโคบาลามีน และอินโนซีน ในตัวอย่างอาหารเด็กประเภทต่างๆ ได้แก่ นมผง ซีเรียล และผลไม้ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ชนิด AmideC16 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) เป็นวัฏภาคคงที่ ทำการวิเคราะห์ในระบบเกรเดียนต์ที่มีสารละลาย

บัพเฟอร์โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 และสารละลายผสมระหว่างอะซิโตนไตริลและสารละลายบัพเฟอร์โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 2 ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่วัดตามินแต่ละชนิดดูคณิกแสงได้สูงสุด โดยนำตัวอย่างมาทำการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ร่วมกับการใช้เอนไซม์ taka-diastase ก่อนวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 30 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.02-1.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2 > 0.999$) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดวิตามินทั้ง 9 ชนิดอยู่ในช่วง 0.009-0.038 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับในช่วง 96.7-99.7 และมีค่าความเที่ยงแสดงในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) น้อยกว่า 4.1 จากการวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหารเด็กพบว่าสามารถทำการวิเคราะห์วิตามินทั้ง 9 ชนิดได้และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณวิตามินในตัวอย่างอาหารอื่นได้อีกด้วย

ในปีเดียวกัน Kall (Kall, 2003: 315-327) ทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 6 ทั้ง 3 รูปแบบ ได้แก่ ไพริดอกซีน ไพริดอกซาล และไพริดอกซามีน ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ ผักสด ขนมปัง และโยเกิร์ต ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ สารละลายผสมระหว่างอะซิโตนไตริลกับสารละลายกรดออกเทนซัลโฟนิคความเข้มข้น 2.2 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 81 มิลลิโมลาร์ กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 19 มิลลิโมลาร์ และไตรเอทิลเอมีนความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ (pH 2.75) ในอัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดค่าการวาวแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร เมื่อใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น 333 นาโนเมตร โดยนำตัวอย่างมาทำการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ก่อนวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 12 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10-500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2 > 0.999$) ค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับในช่วง 90-110 และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณวิตามินในตัวอย่างอาหารได้จริง

ในปี ค.ศ. 2005 Gatti และ Gioia (Gatti; & Gioia, 2005: 135-141) ได้ทำการวิเคราะห์วิตามินที่ละลายในน้ำจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ไบโอฟลาเวิน ไพริดอกซีน ไพริดอกซาล ไพริดอกซามีน ไพริดอกซาล 5'-ฟอสเฟต และ 4-ไพริดอกซิกแอซิก ในตัวอย่างนมและยา ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ชนิด C8 (250 mm × 3.0 mm, 5 μm) เป็นวัฏภาคคงที่ ทำการวิเคราะห์ในระบบเกรเดียนต์ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 คือสารละลายโซเดียมเพนเทนซัลโฟเนต

ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในสารละลายกรดแอสซิติคความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร และมีสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับสารละลายเตตระไฮโดรฟิวเรนที่อัตราส่วนร้อยละ 98:2 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 2 ที่อัตราการไหล 0.40 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดค่าการวาวแสงที่ความยาวคลื่น 524 นาโนเมตร เมื่อใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น 370 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 50 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.3-1109.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2 > 0.999$) มีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 88-102 และมีค่าความเที่ยงแสดงในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) น้อยกว่า 4.4

ในปี ค.ศ. 2007 Lebedzińska และคณะ (Lebedzińska; et al. 2007: 71-80) ได้ทำการวิเคราะห์วิตามินที่ละลายในน้ำจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ โทเอมีน ไพริดอกซีน ไพริดอกซาล ไพริดอกซามีน และโคบาลามีน ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และผักต่างๆ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมกับการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าและการดูดกลืนแสง โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ สารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีไตรเมทิลลามีนความเข้มข้น 0.018 โมลาร์ (pH 3.55) ในอัตราส่วนร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดโทเอมีนที่ความยาวคลื่นที่ 283 นาโนเมตร และตรวจวัดไพริดอกซีน ไพริดอกซาล ไพริดอกซามีน และโคบาลามีนที่ศักย์ไฟฟ้า 0.85 โวลต์ พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 17 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.1-260 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2 > 0.998$) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดวิตามินทั้ง 5 ชนิดอยู่ในช่วง 0.0021-9.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 92.3-101.3 และมีค่าความเที่ยงแสดงในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) น้อยกว่า 3.4 อีกทั้งวิธีการนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์วิตามินทั้ง 5 ชนิดนี้แบบพร้อมกันในตัวอย่างน้ำผลไม้และอาหารทะเลได้จริง

ในปี ค.ศ. 2010 Engel และคณะ (Engel; et al. 2010: 1069-1074) ทำการวิเคราะห์วิตามินที่ละลายได้ในน้ำจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก โทเอมีน ไบโอฟลาวิน นิโคตินาไมด์ กรดนิโคตินิก ไพริดอกซีน และกรดฟอลิก ในตัวอย่างน้ำผลไม้ ซีเรียล และผงโกโก้ โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (150 mm × 3.2 mm, 5 μ m) ทำการวิเคราะห์ในระบบเกรเดียนต์ โดยใช้สารละลายกรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 และสารละลายกรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรในเมทานอล เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 2 ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดกรดแอสคอร์บิก โทเอมีน ไบโอฟลาวิน นิโคตินาไมด์ กรดนิโคตินิก และกรดฟอลิกที่ความยาวคลื่น 266 นาโนเมตร สำหรับไพริดอกซีนตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 18 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็น

เส้นตรงอยู่ในช่วง 0.002-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ($R^2 > 0.999$) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 2.0-9.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 90-110 และมีค่าความเที่ยงแสดงในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่ในช่วง 0.2-1.9

ในปี ค.ศ. 2011 Ciulu และคณะ (Ciulu; et al. 2011: 924-929) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายในน้ำจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ไรโบฟลาวิน กรดนิโคตินิก กรดแพนโทเทนิค กรดฟอริก และกรดแอสคอร์บิก ในตัวอย่างน้ำผึ้ง 28 ชนิด โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) ทำการวิเคราะห์ในระบบเกรเดียนต์ โดยใช้สารละลายอะซิโตนไทรล์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 และสารละลายกรดไตรฟลูออโรอะซิติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.025 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 2 ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดกรดนิโคตินิก และกรดแอสคอร์บิกที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ส่วนไรโบฟลาวิน กรดแพนโทเทนิค และกรดฟอริกทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 20 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.01-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-104 และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 0.10-0.58 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2012 Rodriguez และคณะ (Rodriguez; et al. 2012: 293-299) ทำการวิเคราะห์ปริมาณไทเอมีน และไรโบฟลาวิน ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเสริมธัญพืช โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สารละลายผสมระหว่างโซเดียมอะซิเตตที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลายโซเดียมเฮปแทนซัลโฟเนตความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ กับเมทานอลในอัตราส่วนร้อยละ 75:25 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 268 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 20 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.05-75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 85.9-109.4 และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้สำหรับไทเอมีน และไรโบฟลาวินเท่ากับ 6.28 และ 2.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 León-Ruiz และคณะ (León-Ruiz; et al. 2013: 488-496) ทำการวิเคราะห์วิตามินที่ละลายได้ในน้ำทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก ไทเอมีน นิโคตินาไมด์ กรดนิโคตินิก กรดแพนโทเทนิค และไพริดอกซิน ในตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็นคอลัมน์ชนิด C18 (150 mm × 3.9 mm, 10 μ m) วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ที่มีเฮกซะเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ (pH 2.8) ในอัตราส่วนร้อยละ 2:98 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 15 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

พบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.11-276.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2 > 0.998$) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของกรดแอสคอร์บิก ไทเอมีน นิโคตินาไมด์ กรดนิโคตินิก กรดเพนโทเทนิค และไพริดอกซีน เท่ากับ 0.64, 0.055, 0.63, 0.38, 0.037 และ 0.063 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

และในปีเดียวกัน Márquez-Sillero และคณะ (Márquez-Sillero; Cárdenas; & Valcárcel. 2013: 253-258) ได้ทำการวิเคราะห์วิตามินที่ละลายในน้ำแบบพร้อมกัน 7 ชนิด ได้แก่ ไทเอมีน กรดฟอริก กรดนิโคตินิก กรดแอสคอร์บิก กรดเพนโทเทนิค ไพริดอกซีน และไบโอติน ในตัวอย่างนมผง และอาหารเสริม โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่อัตราส่วนร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจจับชนิดละอองสารที่มีประจุ (Charged aerosol detector: CAD) พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 15 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.50-200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของไทเอมีน กรดฟอริก กรดนิโคตินิก กรดเพนโทเทนิค ไพริดอกซีน และไบโอตินในตัวอย่างนม เท่ากับ 2.20, 5.80, 6.50, 1.70, 3.00 และ 4.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของไทเอมีน กรดฟอริก กรดนิโคตินิก กรดแอสคอร์บิก กรดเพนโทเทนิค ไพริดอกซีน และไบโอตินในตัวอย่างอาหารเสริม เท่ากับ 0.26, 0.54, 0.62, 0.17, 0.21, 0.33 และ 0.45 ตามลำดับ

4.2.2 การวิเคราะห์ในตัวอย่างยา

ในปี ค.ศ. 2000 Cho และคณะ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินที่ละลายในน้ำแบบพร้อมกัน 4 ชนิด ได้แก่ ไทเอมีน ไรโบฟลาวิน ไพริดอกซีน และกรดแอสคอร์บิก ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่รับประทานยาวิตามินเกินขนาด (Cho; Ko; & Cheong et al. 2000: 799-806) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) ทำการวิเคราะห์ในระบบเกรเดียนต์ ที่มีสารละลายกรดไตรฟลูออโรโรอะซิติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 และสารละลายผสมระหว่างกรดไตรฟลูออโรโรอะซิติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยปริมาตรกับเมทานอลในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 2 ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 15 นาที มีค่าร้อยละการคืนกลับมากกว่า 90 และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของไทเอมีน ไรโบฟลาวิน กรดแอสคอร์บิก และไพริดอกซีน เท่ากับ 0.18, 0.022, 0.042 และ 0.67 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2003 Höller และคณะ (Höller; et al. 2003: 151-158) ทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายในน้ำจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ กรดฟอริก นิโคตินาไมด์ กรดนิโคตินิก ไรโบฟลาวิน ไรโบฟลาวิน -5'- ฟอสเฟต ไพริดอกซีน และไทเอมีน ในตัวอย่างเม็ดยาวิตามิน โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) เป็นวัฏภาคคงที่ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 2.8) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดไทเอมีนที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร สำหรับนิโคตินาไมด์ กรดนิโคตินิก และไรโบฟลาวิน -5'- ฟอสเฟต ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร ส่วนกรดฟอริก ไรโบฟลาวิน และไพริดอกซีนตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 20 นาที มีค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 95.2-103.9

ในปี ค.ศ. 2005 Heudi และคณะ (Heudi; et al. 2005: 49-56) ทำการแยกวิตามินที่ละลายในน้ำจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ ไทเอมีน นิโคตินาไมด์ ไพริดอกซีน กรดแอสคอร์บิก แคลเซียมเพนโทเทนิก ไชยานิโคบอล์เอมีน ไรโบฟลาวิน ไบโอติน และกรดฟอริก ในตัวอย่างเม็ดยาวิตามิน โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) ทำการวิเคราะห์ในระบบเกรเดียนต์ที่มีกรดไตรฟลูออโรโรแอสติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.025 โดยปริมาตร (pH 2.6) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 และแอสिटโนไตรลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 2 ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดไทเอมีน นิโคตินาไมด์ ไพริดอกซีน และกรดแอสคอร์บิกที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ส่วนไบโอติน ไชยานิโคบอล์เอมีน และแคลเซียมเพนโทเทนิกตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 210 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 17 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.125-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2 > 0.995$) และสามารถนำวิธีนี้ไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างยาวิตามินได้จริง

ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 Jin และคณะ (Jin; et al. 2012: 151-157) ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินที่ละลายในน้ำจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ ไทเอมีน นิโคตินาไมด์ ไพริดอกซีน กรดแอสคอร์บิก กรดเพนโทเทนิก ไรโบฟลาวิน และกรดฟอริก ในตัวอย่างเม็ดยาวิตามิน โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) เป็นวัฏภาคคงที่ ทำการวิเคราะห์ในระบบเกรเดียนต์ที่มีสารละลายอะซิโนไตรล เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดที่ 2 ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดไทเอมีน นิโคตินาไมด์ ไพริดอกซีน และกรดแอสคอร์บิกที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ส่วนกรดเพนโทเทนิกตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และไรโบฟลาวินกับกรดฟอริกตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 282 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 20 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.4102-128.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ในช่วง 0.010-0.181 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.8-100.8

4.3 การวิเคราะห์สารกลุ่มวิตามินที่ละลายน้ำด้วยเทคนิคซีเควินเซียลอินเจคชันอะนาไลซิส

จากการค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่ามีงานวิจัยเดียวที่นำเทคนิคซีเควินเซียลอินเจคชันอะนาไลซิส มาใช้ควบคู่กับโมโนลิทิกคอลัมน์ (monolithic column) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไทเอมีน ไพริดอกซีน และไซยาโนโคบาลามินในตัวอย่างเม็ดยา (Fernandez; et al. 2008: 817-825) โดยใช้โมโนลิทิกคอลัมน์ชนิด C18 (25 mm x 4.6 mm, 5 μ m) ส่วนวัสดุภาคเคลื่อนที่ใช้สารละลายผสมระหว่างเมทานอลต่อสารละลายแอมโมเนียมแอสซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 20:80 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 280, 325 และ 360 นาโนเมตรสำหรับไทเอมีน ไพริดอกซีน และไซยาโนโคบาลามิน ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 9 นาที เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.01-0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($R^2 > 0.999$) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 1.3-2.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเที่ยงแสดงในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่ในช่วง 0.3-1.8 และมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 92.8-103.5 จากการวิเคราะห์ในตัวอย่างยาพบว่าสามารถทำการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำทั้ง 3 ชนิดได้และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ในตัวอย่างยาตามท้องตลาดได้จริง

จะเห็นได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินแบบพร้อมกันหลายชนิดในงานวิจัยที่ผ่านมาทั้งหมดยังมีข้อเสียคือ ต้องใช้คอลัมน์ที่มีราคาค่อนข้างสูง (>10,000 บาท) และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ในปริมาณมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจพัฒนาวิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ด้วยคอลัมน์ขนาดเล็ก และใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อย ซึ่งยังไม่พบการรายงานวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันด้วยคอลัมน์ขนาดเล็ก (ความยาวน้อยกว่า 1.0 เซนติเมตร) ร่วมกับการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมาก่อน และนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด เพื่อให้ได้วิธีการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างชนิดอื่นๆได้อีกด้วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
2. การศึกษาสภาวะการแยกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 โดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก
3. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น
4. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มรสจืดและปรุงแต่งกลิ่นรส

1. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รุ่น LC-20A ที่มีตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอร์เรย์ (diode array) และตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) พร้อมด้วย sample loop ขนาด 20 ไมโครลิตร จากบริษัท Shimadzu
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-2401PC จากบริษัท Shimadzu
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน (deionized water) รุ่น Labostar จากบริษัท Siemens
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น MS204S จากบริษัท Mettler Toledo
- เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น MP 220 pH meter จากบริษัท Mettler Toledo
- เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น Zentrifugen EBA 8S จากบริษัท Hettich
- เครื่องล้างอัลตราโซนิก รุ่น ME 5.5S จากบริษัท Mettler Electronics crop.
- เครื่องเขย่าสาร รุ่น Vortex-genie 2 จากบริษัท Scientific Industries
- การ์ดคอลัมน์ชนิด C18 (Security Guard Cartridge, 8.0 x 3.0 mm, i.d.) จากบริษัท Phenomenex
- เข็มฉีดสารตัวอย่างขนาด 100 ไมโครลิตร จากบริษัท Exmire Microsyringe
- ชุดกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ จากบริษัท Kimble Chase
- แผ่นกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ ชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท Vertical

- อุปกรณ์กรองสารตัวอย่างชนิดไนลอน (nylon) ขนาด 0.22 ไมครอน จากบริษัท Lubitech
- ตัวดูดซับของแข็ง (Oasis WCX cartridge, 6 mL-150 mg) จากบริษัท Water Corporation

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- กรดไตรฟลูออโรแอซิดิก จากบริษัท Sigma-Aldrich
- กรดแอสซิดิก (99.8%) จากบริษัท QRèC
- โซเดียมคาร์บอเนต จากบริษัท QRèC
- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมอนไฮเดรต จากบริษัท Ajax Finechem
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากบริษัท Carlo Erba
- ไทเอมีนไฮโดรคลอไรด์ (วิตามินบี 1) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- ไทโอยูเรีย จากบริษัท Carlo Erba
- เมทานอล (HPLC grade) จากบริษัท Lichrosolv[®], Merck KGaA
- ไรบิโพลาวิน (วิตามินบี 2) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- แอซีโตไนไตรล์ (HPLC grade) จากบริษัท Lichrosolv[®], Merck KGaA
- แอมโมเนียมแอซีเตต จากบริษัท Ajax Finechem

1.3 ผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยเป็นตัวอย่างนมพร้อมดื่มประเภทต่างๆ ได้แก่ นมสดยูเอชที นมสดพาสเจอร์ไรส์ และปรุงแต่งกลิ่นรสที่วางจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะการแยกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันโดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก

2.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัดวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2

2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0)

2.1.2 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานทั้งสองชนิดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และบันทึกสเปกตรัม

1.1.3 เลือกความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด (λ_{max}) สำหรับนำมาใช้วิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกัน

1.2 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0)

1.2.2 ศึกษาการใช้สารละลายชนิดต่างๆเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับการแยกสารมาตรฐานผสมของวิตามินบีทั้ง 2 ชนิด ดังนี้

- สารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วน 5:95, 10:90, 15:85 และ 20:80 โดยปริมาตร

- สารละลายผสมระหว่างเอซีโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วน 5:95, 7:93 และ 10:90 โดยปริมาตร

โดยใช้วัฏภาคคงที่ คือ คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 x 3.0 mm, i.d.) ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่ความยาวคลื่น 232 และ 266 นาโนเมตร ตามลำดับ

1.2.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่างๆ และเปรียบเทียบผลการแยกที่ได้ในแต่ละสภาวะ แล้วเลือกองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่สามารถแยกวิตามินทั้ง 2 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์

1.3 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0)

1.3.2 ทำการแยกสารมาตรฐานผสมวิตามินทั้ง 2 ชนิด ที่อัตราการไหลในช่วง 0.10-0.20 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้วัฏภาคคงที่ คือ คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 x 3.0 mm, i.d.) วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ สารละลายผสมระหว่างเอซีโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วน 7:93 โดยปริมาตร และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่ความยาวคลื่น 232 และ 266 นาโนเมตร ตามลำดับ

1.3.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่แต่ละอัตราการไหล และเลือกอัตราการไหลที่สามารถวิเคราะห์ผลได้เร็วที่สุดโดยยังคงประสิทธิภาพการแยกที่ดี

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

2.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง

2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในช่วงความเข้มข้น 0.10-200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายแอสซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) เป็นตัวทำละลาย

2.1.2 นำสารละลายมาตรฐานผสมของวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา มาทำการแยกในสภาวะที่เหมาะสม พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม โดยทำการฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

2.1.3 สร้างกราฟเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานวิตามินแต่ละชนิด

2.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ)

2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในขวดวัดปริมาตรด้วยสารละลายแอสซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0)

2.2.2 นำสารละลายข้อ 2.2.1 มาเจือจางแล้วนำไปผ่านกระบวนการสกัดด้วยวิธีเดียวกันกับตัวอย่าง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยระบบโครมาโทกราฟี โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งจนได้ความเข้มข้นที่มีสัดส่วนของสัญญาณความสูงต่อสัญญาณรบกวน (noise) เท่ากับ 3 และ 10 ซึ่งเป็นค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ตามลำดับ

2.3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

2.3.1 ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intraday precision)

2.3.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 1.0, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรด้วยสารละลายแอสซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0)

2.3.1.2 ฉีดสารมาตรฐานผสมที่แต่ละความเข้มข้น พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง

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

2.3.2 ความเที่ยงระหว่างวัน (interday precision)

2.3.2.1 เตรียมสารละลายตามข้อ 2.3.1.1 แล้วฉีดสารมาตรฐานพร้อมบันทึกโครมาโทแกรม เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่ทุกวัน

2.3.2.2 คำนวณค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสัญญาณพื้นที่ที่ได้พีคและเวลาของการคงอยู่ในระยะเวลา 5 วัน

2.4 ร้อยละของการคืนกลับ

ในงานวิจัยนี้ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาค่าร้อยละของการคืนกลับดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Gatti และ Gratacós-Cubarší (Gatti; & Gioia. 2005: 135-141; Gratacós-Cubarší et al. 2011: 234-283) โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.4.1 นำตัวอย่างนมปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายมาตรฐานผสมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ให้มีความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.4.2 นำตัวอย่างข้อ 2.4.1 มาเติมกรดไตรฟลูออโรแอซีติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนสารละลายใสมาปรับ pH เป็นกลาง ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 5

2.4.3 นำสารละลายตัวอย่างมาสกัดอีกครั้งด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction) โดยใช้ตัวดูดซับชนิด Oasis WCX cartridge ก่อนทำการสกัดให้ทำการเตรียมตัวดูดซับด้วยสารละลายเมทานอลและน้ำกลั่นปราศจากไอออนอย่างละ 5.00 มิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นใส่สารละลายตัวอย่างปริมาตร 6.00 มิลลิลิตร แล้วทำการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 5 อย่างละ 4.00 มิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นทำการชะสารวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดออกจากตัวดูดซับด้วยสารละลายกรดฟอริกในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร

2.4.4 นำสารละลายที่ชะได้มาระเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.22 ไมครอน

2.4.5 ฉีดสารตัวอย่างแต่ละตัวอย่างเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีพร้อมบันทึกโครมาโทแกรมและสัญญาณพื้นที่ที่ได้พีค โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง

2.4.6 คำนวณความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดที่เติมในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในวันเดียวกัน แล้วนำไปคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มรสจืดและปรุงแต่งกลิ่นรส

ในการวิเคราะห์ที่ใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มประเภทต่างๆ ได้แก่ นมยูเอชที นมพาสเจอร์ไรซ์ และนมปรุงแต่งกลิ่นรส ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไปจำนวน 9 ตัวอย่าง มาผ่านกระบวนการสกัดที่ดัดแปลงมาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Gatti & Gioia, 2005; Gratacós-CubarSÍ *et al.*, 2011) ดังนี้

3.1 นำตัวอย่างนมพร้อมดื่มปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร มาผสมกับกรดไตรฟลูออโรแอสติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3.2 นำสารละลายส่วนใสมาปรับ pH ให้เป็นกลาง ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 5

3.3 นำสารละลายตัวอย่างมาสกัดอีกครั้งด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง ตามวิธีในข้อ 2.4.3 - 2.4.4

3.4 ฉีดสารตัวอย่างแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นพร้อมบันทึกโครมาโทแกรมและสัญญาณพื้นที่ใต้พีค โดยทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในแต่ละตัวอย่าง

3.5 นำตัวอย่างนมทั้ง 9 ตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้วิธีอ้างอิงจากงานวิจัยของ Gatti และคณะ (Gatti; & Gioia. 2005: 135-141) ซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้

3.5.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างนมปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร มาเติมกรดไตรฟลูออโรแอสติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 5.00 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างลง 5 เท่า โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลาย ก่อนนำไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน

3.5.2 สภาวะของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

- วัฏภาคคงที่ คือ คอลัมน์ชนิด C8 (Phenomenex Luna 250 x 3.0 mm, i.d., 5 µm)
- วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ สารละลายผสมระหว่าง A:B

เมื่อ A คือ สารละลายโซเดียมเพนเทนซัลโฟเนตความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในสารละลายกรดแอสติกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร

B คือ สารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายเตตระไฮโดรฟิวเรนที่อัตราส่วนร้อยละ 98:2 โดยปริมาตร

- อัตราการไหล 0.40 มิลลิลิตรต่อนาที

- ตรวจวัดค่าการวางแสงที่ความยาวคลื่น 524 นาโนเมตร เมื่อใช้ความยาวคลื่นในการกระตุ้นเท่ากับ 370 นาโนเมตร

โดยฉีดสารตัวอย่างแต่ละตัวอย่างพร้อมบันทึกโครมาโทแกรมและสัญญาณพื้นที่ใต้พีค โดยฉีดซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในแต่ละตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

3.6 เปรียบเทียบปริมาณของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่วิเคราะห์ได้จากการใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ (ข้อ 3.4) และวิธีวิเคราะห์อ้างอิง (ข้อ 3.5) โดยใช้สถิติ paired *t*-test



บทที่ 4

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก โดยผู้วิจัยขอเสนอผลการวิจัยดังหัวข้อต่อไปนี้

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะการแยกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันโดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก

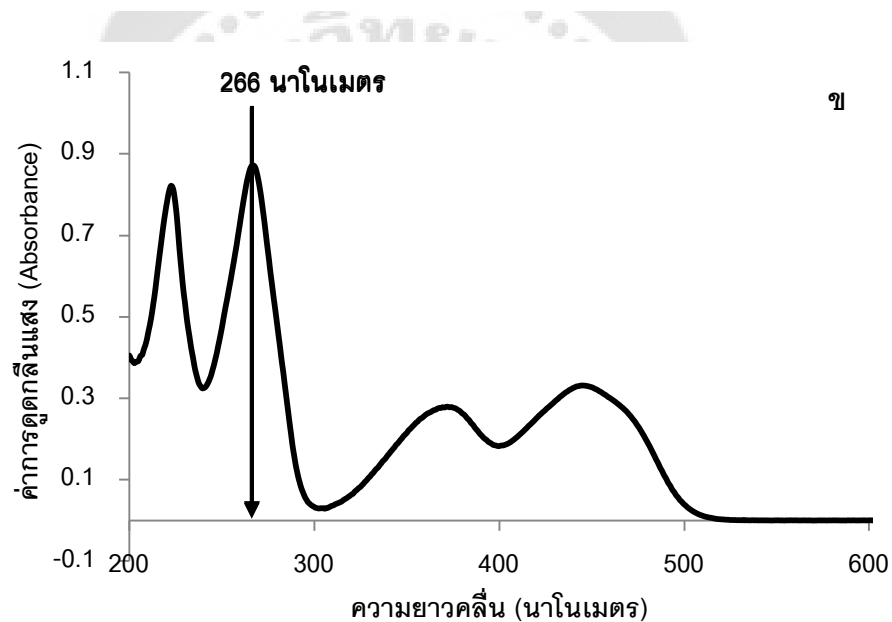
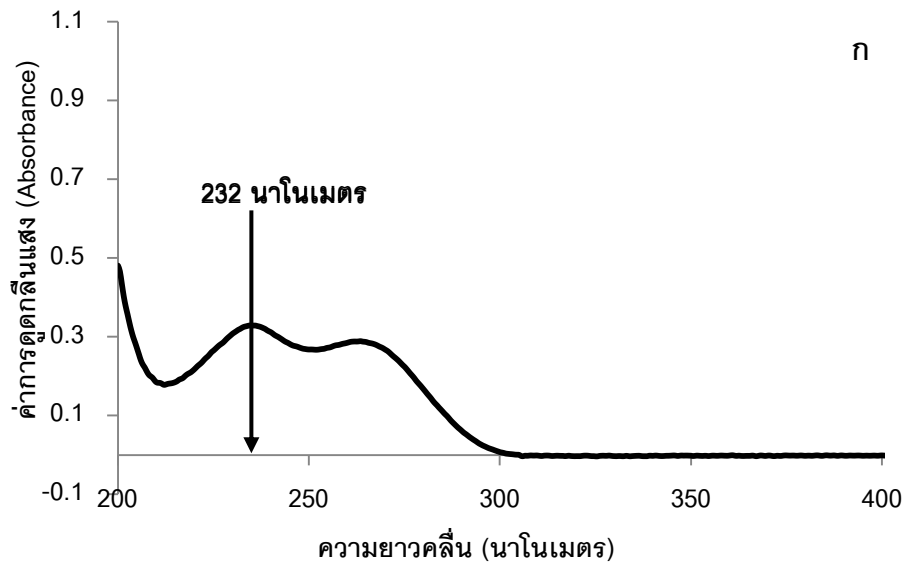
ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มรสจืด และปรุงแต่งกลิ่นรส

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะการแยกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันโดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก

1. การศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัดวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2

จากการทดลองนำสารมาตรฐานวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิซิเบิลสเปกโทรสโกปีเพื่อเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัด สเปกตรัมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แสดงดังภาพประกอบ 5 พบว่าความยาวคลื่นของวิตามินบี 1 ที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 232 นาโนเมตร และวิตามินบี 2 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 266 นาโนเมตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความยาวคลื่น 232 และ 266 นาโนเมตร สำหรับการตรวจวัดวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ตามลำดับ

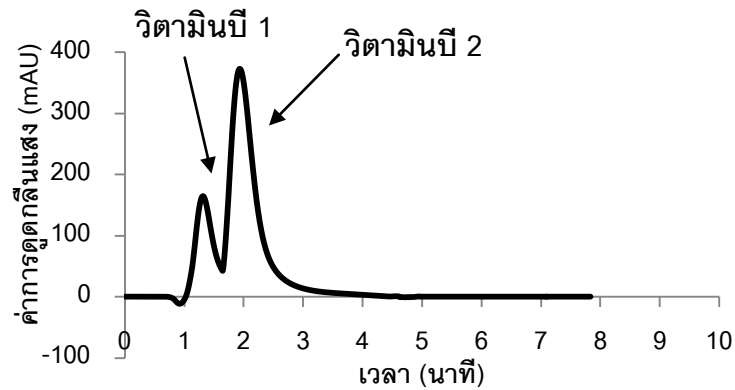


ภาพประกอบ 5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ (ก) สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ(ข) สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร

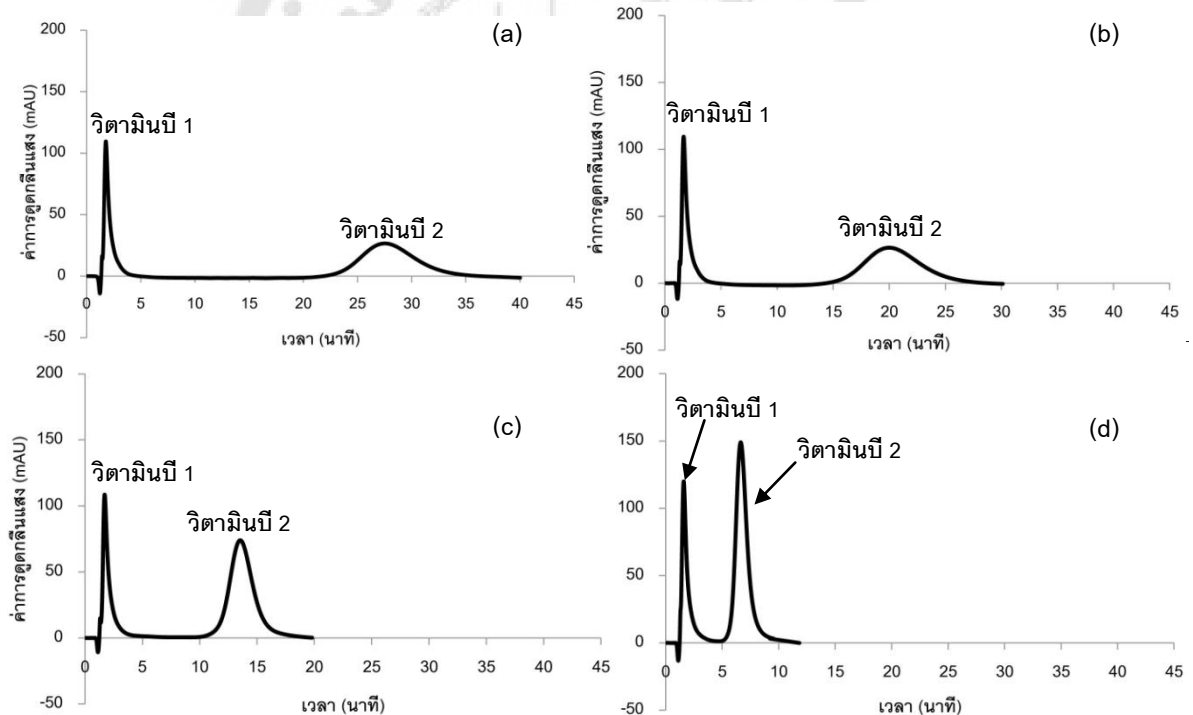
2. การศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาเบื้องต้นเมื่อนำคอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 ขนาด 4.0 x 3.0 mm, i.d. มาใช้ในการแยกสารมาตรฐานผสมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 โดยมีสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 80:20 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลอง

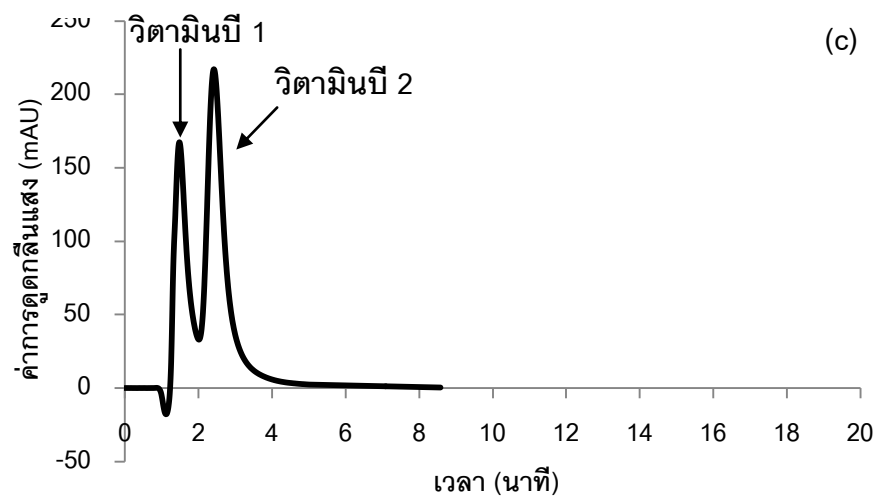
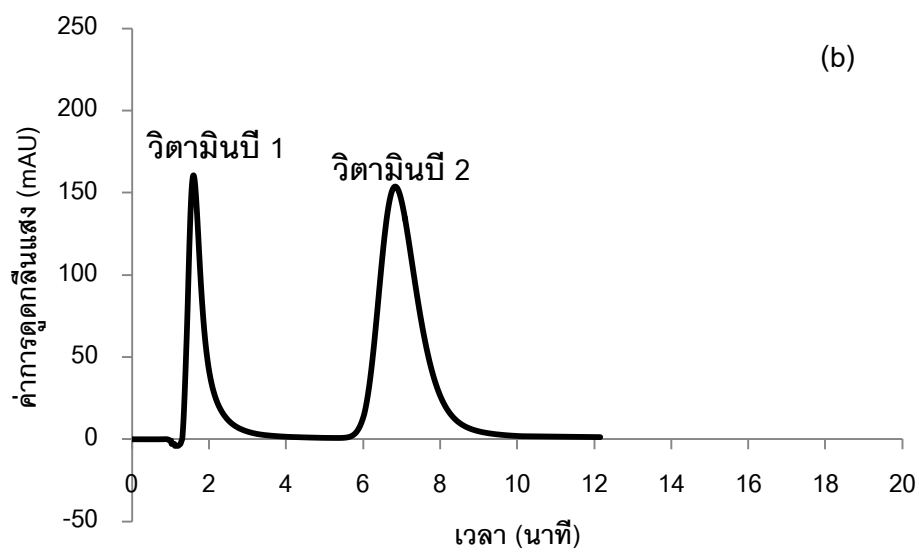
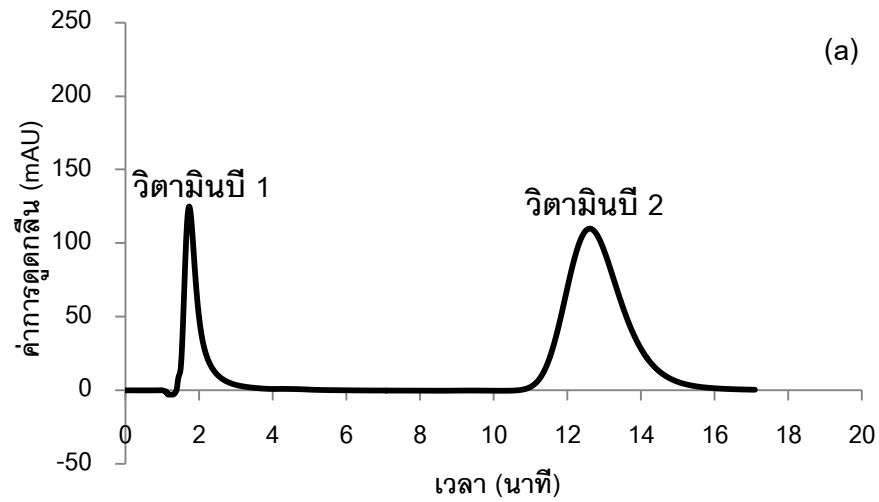
แสดงดังภาพประกอบ 6 จะเห็นได้ว่าไม่สามารถแยกวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ออกจากกันได้ เมื่อทำการปรับอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้ความเข้มข้นของเมทานอลลดลง ก็ยังคงไม่สามารถแยกวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดออกจากกันได้สมบูรณ์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 ขนาด 8.0 x 3.0 mm, i.d. เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับการแยกวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดแบบพร้อมกัน โดยได้ทำการศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์เปรียบเทียบกับระหว่างเมทานอล และแอสซิโตไนโตรลที่อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์กับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) อัตราส่วนต่างๆ จากผลการแยกเมื่อใช้องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตที่อัตราส่วนร้อยละ 5:95, 10:90, 15:85 และ 20:80 โดยปริมาตร (ภาพประกอบ 7) พบว่าในทุกอัตราส่วนที่ทำการศึกษา วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 สามารถแยกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยเวลาการคงอยู่ (R_f) ของสารทั้งสองชนิดมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอล เนื่องจากความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น สำหรับผลการศึกษาอัตราส่วนของสารละลายผสมระหว่างแอสซิโตไนโตรลกับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตที่ร้อยละ 5:95, 7:93 และ 10:90 โดยปริมาตร ให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน แสดงดังภาพประกอบ 8 คือเมื่อเพิ่มสัดส่วนของแอสซิโตไนโตรล ส่งผลให้เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ลดลง เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ร้อยละ 5:95 และร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร (ภาพประกอบ 8a-b) การแยกระหว่างวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 เกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์และลักษณะของพีคมีความสมมาตรกัน โดยเวลาการคงอยู่ ของสารทั้งสองชนิดมีค่าลดลงตามความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่การใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราส่วนร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร ไม่สามารถแยกพีคของวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดออกจากกันได้ เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต่างชนิดกัน จะเห็นได้ว่าการใช้สารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตที่อัตราส่วนร้อยละ 20:80 โดยปริมาตร ใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่เกิน 10 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นสารละลายผสมระหว่างแอสซิโตไนโตรลกับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตที่อัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร (ภาพประกอบ 7d และ 8b) ดังนั้นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการแยกที่ดี ลักษณะพีคมีความสมมาตร ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และลดปริมาณการใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ให้น้อยลง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างสารละลายแอสซิโตไนโตรลกับสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร



ภาพประกอบ 6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (4.0 x 3.0 mm, i.d.) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซิเตต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 20:80 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที



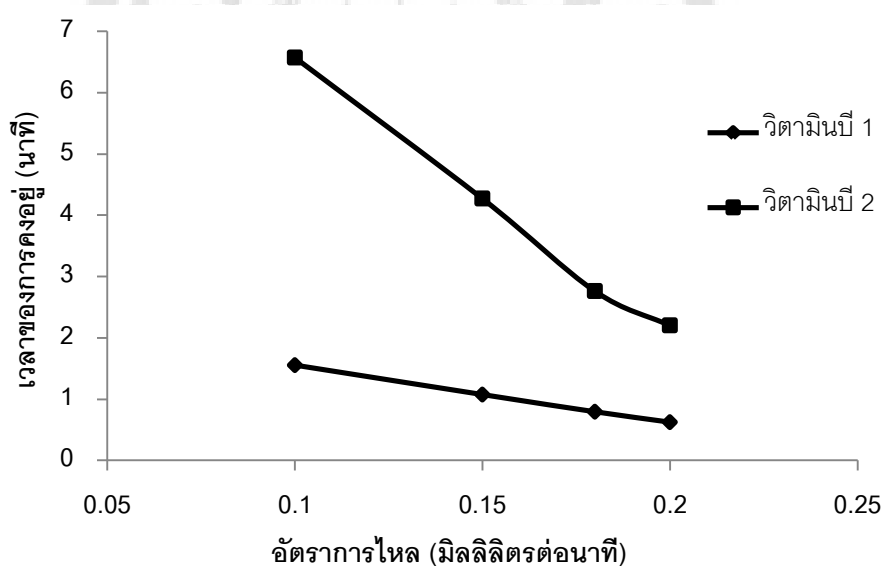
ภาพประกอบ 7 โครมาโทแกรมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (a) 5:95 โดยปริมาตร (b) 10:90 โดยปริมาตร (c) 15:85 โดยปริมาตรและ (d) 20:80 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพประกอบ 8 โครมาโมแกรมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างเอซีโตนไตรีตและสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (a) 5:95 โดยปริมาตร (b) 7:93 โดยปริมาตร และ (c) 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที

3. การศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในระบบไอโซครติกในช่วง 0.10-0.20 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร โดยรายงานผลในรูปความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่และเวลาของการคงอยู่ของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แสดงดังภาพประกอบ 9 จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ทำให้ระยะเวลาที่สารทั้งสองชนิดอยู่ภายในคอลัมน์ได้ลดลง ส่งผลให้ค่าเวลาการคงอยู่ของสารทั้งสองชนิดมีค่าลดลงตามลำดับ โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกัน เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมสามารถแยกวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ออกจากสารรบกวนต่างๆที่อยู่ในผลิตภัณฑ์นมได้เป็นอย่างดี โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ภายใน 7.00 นาที



ภาพประกอบ 9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่และเวลาของการคงอยู่ของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่อัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร ของสารละลายผสมระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันโดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 x 3.0 mm, i.d.) ในระบบไอโซครติกที่พัฒนาขึ้น พบว่าวัฏ

ภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ สารละลายผสมระหว่างแอสิตไนไตรด์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอสิตเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตรที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 232 และ 266 นาโนเมตร สำหรับวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ตามลำดับ ซึ่งได้ลักษณะโครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานผสมของวิตามินบีทั้ง 2 ชนิด ดังภาพประกอบ 8b จะเห็นได้ว่าภายใต้สภาวะการแยกดังกล่าวสามารถแยกวิตามินบี 1 ($R_f = 1.59$ นาที) และวิตามินบี 2 ($R_f = 6.76$ นาที) ออกจากกันได้เป็นอย่างดี โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 7.00 นาที ในขณะที่งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้คอลัมน์ขนาดมาตรฐาน (ความยาว 25 เซนติเมตร) สำหรับการวิเคราะห์วิตามินทั้งสองชนิดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า 20 นาที (Hurtado; et al. 1997: 247-253) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ช่วยลดระยะเวลาการวิเคราะห์ให้น้อยลง สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้ของวัสดุภาคเคลื่อนที่และตัวทำละลายอินทรีย์ จึงเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้นอีกด้วย

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

2.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์วิตามินทั้ง 2 ชนิด โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างวิตามินบี 1 และสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ช่วงความเข้มข้น 0.10 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากราฟมาตรฐานของสารทั้งสองชนิดมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มากกว่า 0.999 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (R^2 มากกว่า 0.995) ดังแสดงในตาราง 1

2.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ โดยเลือกจากความเข้มข้นของของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่มีสัดส่วนสัญญาณของสารละลายมาตรฐานต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีค่า LOD ของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 เท่ากับ 50.0 และ 0.10 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับค่า LOQ ของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 มีค่าเท่ากับ 0.10 และ 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตาราง 1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

วิตามิน	ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง	R ² *
วิตามินบี 1	0.10 – 100	$y=422.02x+2117.2$	0.9992
วิตามินบี 2	0.10 – 100	$y=1101.3x+146.73$	0.9998

*ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

2.3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาทั้งในเทอมของความเที่ยงภายในวันเดียวกันซึ่งทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 5 ครั้ง และความเที่ยงระหว่างวันซึ่งทำการวิเคราะห์ซ้ำเป็นระยะเวลา 5 วันต่อเนื่องกัน โดยใช้สารละลายมาตรฐานผสมของวิตามินบี 1 และสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ความเข้มข้น 1.00, 50.0 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาแสดงดังตาราง 2 พบว่าค่า %RSD ของสัญญาณพื้นที่ได้พีคสำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 0.43 – 1.82 และสำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.34 – 1.90 สำหรับค่า %RSD ของเวลาการคงอยู่ในการวิเคราะห์วันเดียวกันอยู่ในช่วง 0.09 – 2.40 และสำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.23 – 1.26 จะเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวให้ความเที่ยงของการวิเคราะห์เป็นที่น่าพอใจ มีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของพื้นที่ได้พีคและเวลาของการคงอยู่สำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี ทั้ง 2 ชนิดทั้งภายในวันเดียวกัน และการวิเคราะห์ระหว่างวันน้อยกว่า 2.50%

ตาราง 2 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

วิตามิน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	%RSD ในวันเดียวกัน ^a		%RSD ระหว่างวัน ^a	
		พื้นที่ใต้พีค	เวลาของการ คงอยู่	พื้นที่ใต้พีค	เวลาของการ คงอยู่
วิตามินบี 1	1.00	1.72	0.10	1.79	0.23
	50.0	1.03	0.20	1.01	0.25
	100.0	0.43	0.09	0.34	0.26
วิตามินบี 2	1.00	1.82	2.40	1.90	1.26
	50.0	0.97	1.18	1.01	1.02
	100.0	0.56	0.38	0.68	0.37

^a ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (n = 5)

2.4 ร้อยละของการคืนกลับ

จากการศึกษาค่าร้อยละของการคืนกลับโดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มรสจืดและนมปรุงแต่งกลิ่นรส แล้วนำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น ผลการทดลองแสดงดังตาราง 3 พบว่าสำหรับตัวอย่างนมจืดพร้อมดื่มวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 88.06-102.70 สำหรับวิตามินบี 1 และอยู่ในช่วงร้อยละ 80.07-99.39 สำหรับวิตามินบี 2 สำหรับตัวอย่างนมปรุงแต่งกลิ่นรสพร้อมดื่มมีค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 96.06-97.41 และ 83.37-87.95 สำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ตามลำดับ โดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างทั้งหมดมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 0.43-4.07 แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในตัวอย่างที่มีสิ่งเจือปนมากได้

ตาราง 3 ผลการศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับ

ตัวอย่าง	ค่าร้อยละของการคืนกลับ (%RSD ^a) ของวิตามินบีที่วิเคราะห์	
	วิตามินบี 1	วิตามินบี 2
นมเจ็ดยูเอชที		
ตัวอย่างที่ 1	98.84 (2.05)	99.39 (1.19)
ตัวอย่างที่ 2	91.87 (1.76)	97.26 (1.61)
ตัวอย่างที่ 3	98.57 (1.55)	82.73 (1.13)
ตัวอย่างที่ 4	97.93 (0.48)	80.07 (1.38)
นมเจ็ดพาสเจอร์ไรส์		
ตัวอย่างที่ 5	102.70 (2.48)	90.68 (0.66)
ตัวอย่างที่ 6	88.06 (2.24)	81.83 (1.20)
นมปรุงแต่งกลิ่นรส		
ตัวอย่างที่ 7	96.25 (0.43)	83.37 (1.33)
ตัวอย่างที่ 8	97.41 (1.30)	86.06 (2.21)
ตัวอย่างที่ 9	96.06 (2.48)	87.95 (4.07)

^aค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มรสจืดและปรุงแต่งกลิ่นรส

ในงานวิจัยนี้ได้นำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มรสจืด 6 ตัวอย่าง และนมพร้อมดื่มปรุงแต่งกลิ่นรส 3 ตัวอย่าง ทั้งแบบนมยูเอชทีและนมพาสเจอร์ไรส์ ที่ผลิตจากคนละบริษัท โดยนำตัวอย่างมาทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดจากนั้นนำมาผ่านกระบวนการสกัดแบบตัวดูดซับของแข็งในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อทำการลดปริมาณสารรบกวน และช่วยเพิ่มความเข้มข้นของวิตามินบีทั้งสองชนิด ผลการทดลองในตาราง 4 แสดงปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มประเภทต่างๆที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไป จำนวน 9 ตัวอย่าง เห็นได้ว่าในแต่ละตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ต่างกัน โดยมีตัวอย่างนมพร้อมดื่มรสจืดยูเอชทีตัวอย่างที่ 3 เท่านั้นที่ตรวจพบเฉพาะวิตามินบี 2 เพียงชนิดเดียว โดยพบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มที่นำมาวิเคราะห์มีปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.12-0.85 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.65-1.62 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณวิตามินบีที่พบในตัวอย่างนมแต่ละประเภทจะมีปริมาณ

แตกต่างกัน เนื่องจากนมแต่ละประเภทจะมีกรรมวิธีการให้ความร้อนในการฆ่าเชื้อโรคที่ต่างกัน (ณิชชยา จิตติขญาพัทธ์. 2552: 17-26)

ตาราง 4 ชนิดและปริมาณของวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้และวิธีอ้างอิง (Gatti; & Gioia. 2005: 135-141)

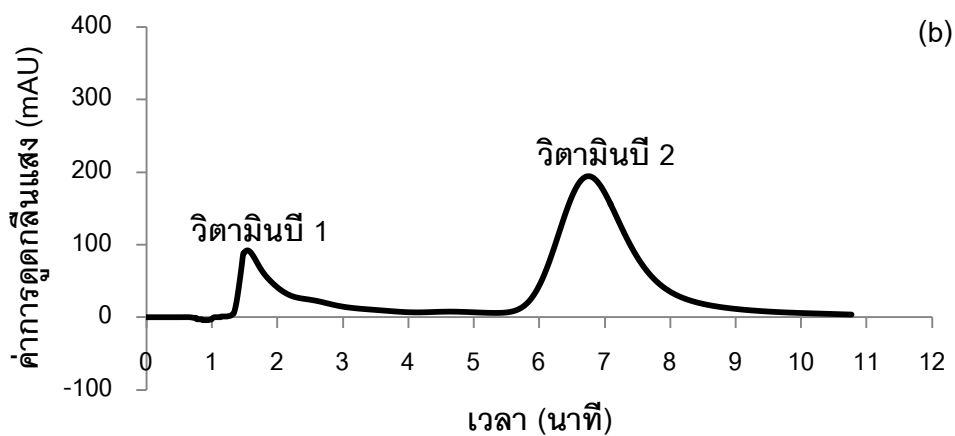
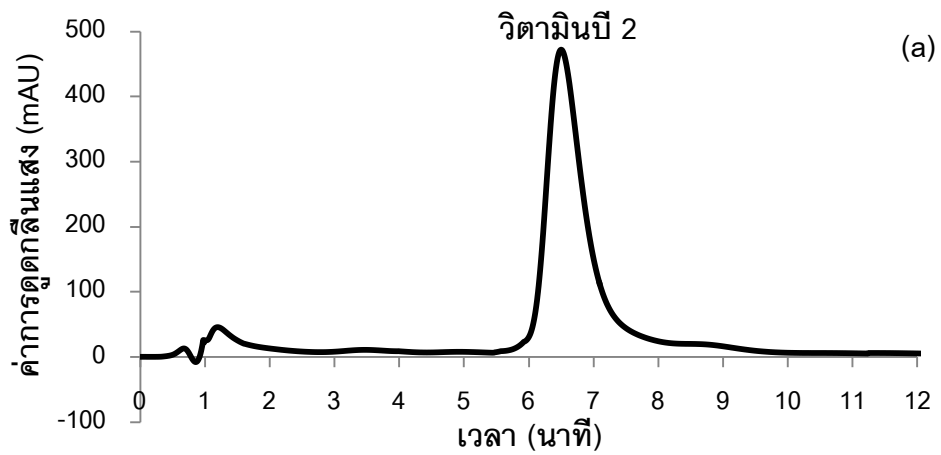
ตัวอย่าง	ปริมาณของวิตามินบีแต่ละชนิด (มิลลิกรัมต่อลิตร) \pm SD ^a			
	วิตามินบี 1		วิตามินบี 2	
	วิธีที่พัฒนาขึ้น	วิธีอ้างอิง	วิธีที่พัฒนาขึ้น	วิธีอ้างอิง
นมเจ็ดยูเอชที				
ตัวอย่างที่ 1	0.51 \pm 0.07	0.52 \pm 0.05	0.85 \pm 0.01	0.87 \pm 0.05
ตัวอย่างที่ 2	0.85 \pm 0.04	0.82 \pm 0.05	0.91 \pm 0.06	0.91 \pm 0.05
ตัวอย่างที่ 3	-	-	1.62 \pm 0.15	1.60 \pm 0.05
ตัวอย่างที่ 4	0.12 \pm 0.01	0.11 \pm 0.05	1.01 \pm 0.01	1.02 \pm 0.05
นมเจ็ดพาสเจอร์ไรส์				
ตัวอย่างที่ 5	0.13 \pm 0.02	0.15 \pm 0.05	1.03 \pm 0.10	1.06 \pm 0.05
ตัวอย่างที่ 6	n.d ^b	0.03 \pm 0.05	0.87 \pm 0.01	0.85 \pm 0.05
นมปรุงแต่งกลิ่นรส				
ตัวอย่างที่ 7	0.14 \pm 0.02	0.15 \pm 0.05	0.65 \pm 0.06	0.61 \pm 0.05
ตัวอย่างที่ 8	0.49 \pm 0.05	0.52 \pm 0.05	0.67 \pm 0.02	0.69 \pm 0.05
ตัวอย่างที่ 9	0.30 \pm 0.05	0.29 \pm 0.05	1.15 \pm 0.14	1.20 \pm 0.05
t stat	-1.2127		-0.4810	
t critical two-tail	2.0739		2.0595	

^aค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

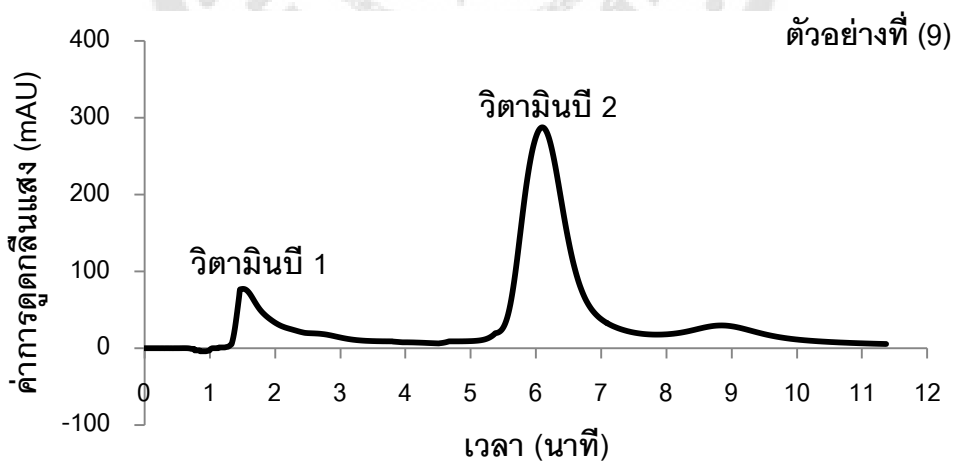
^bNot detectable

และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างนมพร้อมดื่มโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีอ้างอิงซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์และใช้คอลัมน์ขนาดมาตรฐานความยาว 250 mm ในการแยก (Gatti; & Gioia. 2005: 135-141) ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตาราง 4 เมื่อทดสอบความแตกต่างของปริมาณวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้จากทั้ง 2 วิธี โดยใช้ทางสถิติแบบ paired t-test พบว่าได้ค่า t stat น้อยกว่าค่า t critical two-tail จึงสามารถสรุปได้ว่าปริมาณของวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดที่วิเคราะห์ได้จากทั้ง 2 วิธีนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ที่สามารถใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก (8.0 x 3.0 mm, i.d.) แทนการใช้คอลัมน์ขนาด 150 – 250 mm ตามที่เคยมีการรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้

ตัวอย่างโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มรสจืด และนมปรุงแต่งกลิ่นรสที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด แสดงดังภาพประกอบ 10 และ 11 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้วิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันในตัวอย่างจริงที่มีสิ่งเจือปนอยู่มากได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถแยกสัญญาณของสารทั้งสองชนิดออกจากสารรบกวนที่อยู่ในตัวอย่างได้ดี ให้ผลการแยกเป็นที่น่าพอใจ และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น



ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มรสจืด (a) ตัวอย่างที่ 3 และ (b) ตัวอย่างที่ 5



ภาพประกอบ 11 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มปรุงแต่งกลิ่นรสตัวอย่างที่ 9

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็กสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันในตัวอย่างนมพร้อมดื่มประเภทต่างๆ ที่มีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด โดยสามารถสรุป อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะดังนี้

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 แบบพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก (ความยาวน้อยกว่า 1.0 เซนติเมตร) จึงทำให้ได้วิธีวิเคราะห์แนวทางใหม่ที่สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็วเนื่องจากช่วยลดระยะเวลาการวิเคราะห์ให้น้อยลงเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา และมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้นเนื่องจากช่วยลดปริมาณการใช้ของวัสดุภาคเคลื่อนที่และตัวทำละลายอินทรีย์ จากผลการวิจัยพบว่าเมื่อใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 ขนาด 8.0 x 3.0 mm, i.d. (SecurityGuard™ C18 cartridge) ร่วมกับการใช้สารละลายผสมระหว่างแอซิโตไนโตรลและสารละลายแอมโมเนียมแอซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตรเป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถแยกวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ออกจากสิ่งรบกวนในตัวอย่างได้ภายในเวลาเพียง 7.00 นาทีเท่านั้น โดยให้ความเป็นเส้นตรงที่ดี (R^2 มากกว่า 0.999) ในช่วงความเข้มข้น 0.10-100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเที่ยงที่ดีเป็นที่น่าพอใจทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวันโดยมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีคและเวลาการคงอยู่น้อยกว่า 1.90 และ 2.40 ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 50.0 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับวิตามินบี 1 และ 0.10 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับวิตามินบี 2 เมื่อใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยการตกตะกอนโปรตีนและการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) พบว่าให้ค่าร้อยละการคืนกลับของวิตามินทั้งสองชนิดอยู่ในช่วง 80.07-102.70 สำหรับการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างนมพร้อมดื่มประเภทต่างๆ ได้แก่ นมสดยูเอชที นมสดพาสเจอร์ไรส์ และนมปรุงแต่งกลิ่นรส พบปริมาณวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดมีค่าแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์ โดยส่วนใหญ่ตรวจพบปริมาณวิตามินบี 1 น้อยกว่าวิตามินบี 2 ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลโภชนาการที่ระบุข้างผลิตภัณฑ์ และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้กับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าได้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ นอกจากนี้วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ยังให้ผลการวิจัยที่ดีกว่างานวิจัยอื่นๆที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้ (Hurtado; et al. 1997: 247-253; Viñas; et al. 2003: 77-84; Gatti; & Gioia. 2005:

135-141; Márquez-Sillero; Cárdenas; & Valcárcel. 2013: 253-258) แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ดังตาราง 5

ตาราง 5 การเปรียบเทียบผลการวิจัยที่ได้จากงานวิจัยและงานวิจัยที่เคยรายงานก่อนหน้าสำหรับการวิเคราะห์วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม

พารามิเตอร์	วิธีที่พัฒนาขึ้น	งานวิจัยอ้างอิง	เอกสารอ้างอิง
เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (นาที/ตัวอย่าง)	15.0	10.0-60.0	Hurtado; et al. 1997: 247-253. Viñas; et al. 2003: 77-84. Gatti; & Gioia. 2005: 135-141. Márquez-Sillero; Cárdenas; & Valcárcel. 2013: 253-258.
ปริมาตรของภูมิภาคเคลื่อนที่ (มิลลิเมตร/การวิเคราะห์)	0.70	5.00-60.0	Hurtado; et al. 1997: 247-253. Viñas; et al. 2003: 77-84. Gatti; & Gioia. 2005: 135-141. Márquez-Sillero; Cárdenas; & Valcárcel. 2013: 253-258.
ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	B1 : 0.10-100 B2 : 0.10-100	B1 : 0.05-5.0 B2 : 0.02-5.0	Hurtado; et al. 1997: 247-253. Viñas; et al. 2003: 77-84.
ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (ไมโครกรัมต่อลิตร)	B1 : 50.0 B2 : 0.10	B1 : 10-2.20 B2 : 3.0	Viñas; et al. 2003: 77-84. Márquez-Sillero; Cárdenas; & Valcárcel. 2013: 253-258.
ราคาของคอลัมน์ (บาท/คอลัมน์)	1,500 (8.0 mm)	> 10,000 (150-250 mm)	

จากความมุ่งหวังในงานวิจัยนี้และจากการเปรียบเทียบผลการวิจัยกับงานวิจัยที่เคยรายงานมาก่อนพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ วิเคราะห์สูง และประหยัด อีกทั้งยังเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ซึ่งอาจนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ประเภทต่างๆได้มากขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางด้านโภชนาการสำหรับผู้บริโภค

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากวิตามินบีทั้ง 2 ชนิดเป็นสารที่ไม่ค่อยเสถียร มีความไวต่อแสง สลายตัวได้ง่าย ดังนั้นการเตรียมสารละลายวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 ต้องเก็บรักษาสารละลายมาตรฐานที่อุณหภูมิ 4°C และไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 สัปดาห์ เพราะอาจทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้
2. ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 อาจทำการปรับสภาวะการแยกภายในระบบ HPLC โดยการวิเคราะห์ในระบบเกรดเดียนต์ ในช่วงการแยกวิตามินบี 2 เพื่อทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์รวดเร็วมากยิ่งขึ้น



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ณิชชยา ฐิติชญาพัทธ์. ดร. (2552). *นม! ยิ่งดื่ม ยิ่งดี เพียงรู้วิธีก็เห็นผล*. พิมพ์ครั้งที่ 1.

กรุงเทพฯ: มายิก.

นิตยา รัตนปนนท์. รองศาสตราจารย์. (2557). *เคมีนมและผลิตภัณฑ์*. พิมพ์ครั้งที่ 1.

กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ปรียา หมาดหลู; นิตศักดิ์ อัครโชคอนันท์; และนพพร ศุภพิพัฒน์. (2549). *วิตามินที่ (ร่างกาย)*

คุณต้องการ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ไกล้มอ.

ผิวสวย และสุขภาพแข็งแรงด้วยวิตามิน. สืบค้นเมื่อ 13 พฤศจิกายน 2557, จาก

<http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0167.pdf>.

พัฒนา เหล่าไพบูลย์. รองศาสตราจารย์. (2554). *โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหลักการและการประยุกต์ใช้*. พิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น: หจก. ขอนแก่นการพิมพ์.

โยเกิร์ต นมเปรี้ยวมหัศจรรย์. สืบค้นเมื่อ 3 ธันวาคม 2557, จาก

<http://seashore.buu.ac.th/~54030242/HW/brochure.doc>.

รักษิตา บุญพันธ์. เกสัชกรหญิง. (2550). *วิตามิน (Vitamins)*. บรรณาธิการโดย นภัสนันท์ พุ่มสุโข.

กรุงเทพฯ: บ้านหนังสือ 19.

วิตามินและแร่ธาตุ. สืบค้นเมื่อ 12 พฤศจิกายน 2557, จาก

<http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning50/FT320/pdf/07.pdf>.

วิตามินบี 1. สืบค้นเมื่อ 11 พฤศจิกายน 2557, จาก

<http://www.scimath.org/socialnetwork/groups/viewbulletin/1662-วิตามินบีหนึ่ง>.

วิตามินบี 2. สืบค้นเมื่อ 11 พฤศจิกายน 2557, จาก

<http://www.scimath.org/socialnetwork/groups/viewbulletin/1663-วิตามินบีสอง>.

อารีกุล บุญญาวัฒน์. บรรณาธิการ. (2551). *A-Zinc วิตามินเพื่อสุขภาพ*. พิมพ์ครั้งที่ 1.

กรุงเทพฯ: ฟิลกูด.

Cho, C.M.; Ko, J.H.; & Cheong, W.J. (2000). Simultaneous determination of water-soluble

vitamins excreted in human urine after eating an overdose of vitamin pills by a

HPLC method coupled with a solid phase extraction. *Talanta*. 51: 799–806.

- Cho, J. (1997). Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of all seven vitamin B6-related compound. *Journal of Chromatography A*. 790: 83-91.
- Ciulu, M.; Solinas, S.; Floris, I.; Panzanelli, A.; Pilo, M.I.; Piu, P.C.; Spano, N.; & Sanna, G. (2011). RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*. 83: 924-929.
- Engel, R.; Stefanovit-Bányai, E.; & Abrankó, L. (2010). LC Simultaneous Determination of the Free Forms of B Group Vitamins and Vitamin C in Various Fortified Food Products. *Chomatographia*. 71: 1069–1074.
- Fernández, M.; Miró, M.; González, H.M.; & Cerdá, V. (2008). Modulation of mobile phase composition in flow-injection/sequential-injection chromatography exploiting multi-syringe flow analysis. *Anal Bioanal Chem*. 391: 817-825.
- Gatti, R., Gioia, M.G. (2005). Liquid Chromatography Determination with Fluorescence Detection of B₆ Vitamers and Riboflavin in Milk and Pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta*. 538: 135-141.
- Gratacós-Cubarší, M., Sárraga, C., Clariana, M., GarCía Regueiro, J.A., Castellari, M. (2011). Analysis of Vitamin B1 in Dry-Cured Sausages by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Array Detection. *Meat Science*. 87: 234-238.
- Heudi, O.; Kiliñç, T.; & Fontannaz, P. (2005). Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. *Journal of Chromatography A*. 1070: 49–56.
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Retrieved December 23, 2014, from <http://www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/chemical-analysis-instrument-menu/item/126-high-performance-liquid-chromatography-hplc.html>
- Höller, U.; Brodhag, C.; Knöbel, A.; & Hofmann, P. (2003). Automated determination of selected water soluble vitamins in tablets using a bench-top robotic system coupled to reversed phase (RP-18) HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 31: 151-158.

- Hurtado, S.A.; Nogués, M.T.V.; Pulido, M.I.; & Font, A.M. (1997). Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. 778: 247-253.
- Jin, P.; Xia, L.; Li, Z.; Che, N.; Zou, D.; & Hu, X. (2012). Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in Vitamins with Minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 70: 151-157.
- Kall, M.A. (2003). Determination of total vitamin B₆ in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. *Food Chemistry*. 82: 315-327.
- Lebiedzińska, A.; Marszałł, M.L.; Kuta, J.; & Szefer, P. (2007). Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B1 (thiamine), B6 (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B12 in animal and plant foods. *Journal of chromatography A*. 1173: 71–80.
- Le, X.C.; & Ma, M. (1998). Short-Column Liquid Chromatography with Hydride Generation Atomic Fluorescence Detection for the Speciation of Arsenic. *Analytical Chemistry*. 70: 1926-1933.
- León-Ruiz, V.; Vera, S.; Amelia, V.; González-Porto; & Andrés, M.P.S. (2013). Analysis of Water-Soluble Vitamins in Honey by Isocratic RP-HPLC. *Food Analytical Methods*. 6: 488–496.
- Liu, S.; Zhang, Z.; Liu, Q.; Luo, H.; & Zheng, W. (2002). Spectrophotometric determination of vitamin B1 in a pharmaceutical formulation using triphenylmethane acid dyes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 30: 685-694.
- Márquez-Sillero, I.; Cárdenas, S.; & Valcárcel, M. (2013). Determination of water-soluble vitamins in Infant milk and dietary supplement using a liquid chromatography on-line coupled to a corona-charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*. 1313: 253– 258.

- Nishizawa, S.; Sankaran, N.B.; Seino, T.; Cui, Y.Y.; Dai, Q.; Xua, C.Y.; Yoshimoto, K.; & Teramae, N. (2006). Use of vitamin B₂ for fluorescence detection of thymidine related single-nucleotide polymorphisms. *Analytica Chimica Acta*. 556: 133–139.
- Rodriguez, R.S.J.; Ruiz, V.F.; Cámara, M.; & Mata, M.C.S. (2012). Simultaneous determination of vitamin B₁ and B₂ in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV. *Journal of Cereal Science*. 55: 293-299.
- Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; & Glajch, J.L. (1999). *Practical HPLC method development*. New York: A Wiley-Interscience Publication.
- Tanner J.T.; Barnett S.A. (1986). Methods of Analysis for Infant Formula: Food and Drug Administration and Infant Formula Council Collaborative Study, Phase III. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. 69: 777-785.
- Viñas, P.; López-Erroz, C.; Balsalobre, N.; & Hernández-Córdoba, M. (2003). Reverse-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of B group vitamins in baby food. *Journal of Chromatography A*. 1007: 77-84.
- Wu, X.; Diao, Y.; Sun, C.; Yang, J.; Wang, Y.; & Sun, S. (2003). Fluorimetric determination of ascorbic acid with *o*-phenylenediamine. *Talanta*. 59: 95-99.
- Yin, C.; Cao, Y.; Ding, S.; & Wang, Y. (2008). Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1193: 172–177.
- Youngvises, N.; Liawruangrath, B.; & Liawruangrath, S. (2003). Simultaneous micellar LC determination of lidocaine and tolperisone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 31: 629-638.
- Youngvises, N.; Chaida, T.; Khonyoung, S.; Kuppithayanant, N.; Tiyapongpatana, W.; Itharat, A.; & Jakmune, J. (2013). Greener liquid chromatography using a guard column with micellar mobile phase for separation of some pharmaceuticals and determination of parabens. *Talanta*. 106: 350-359.



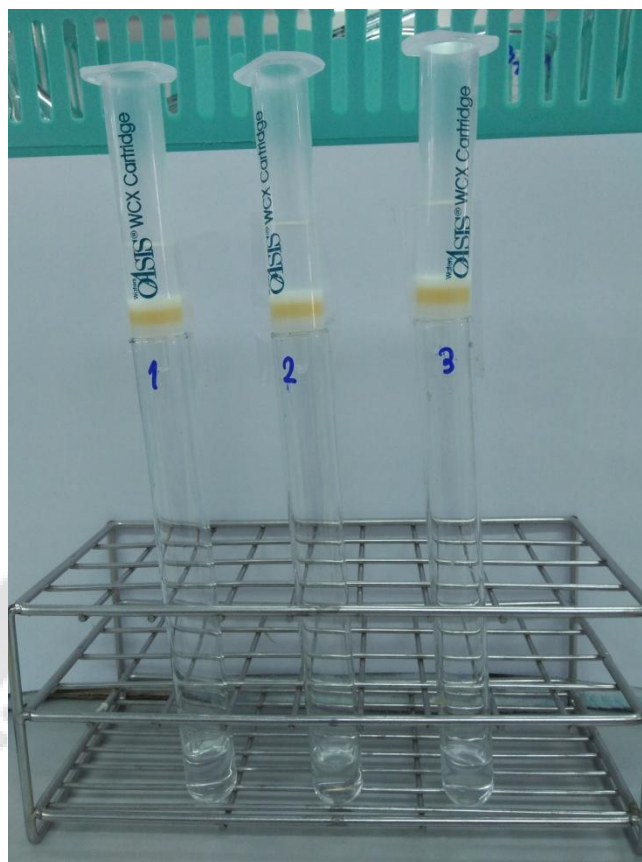
ภาคผนวก



ภาพประกอบ 12 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น LC-20A



ภาพประกอบ 13 เปรียบเทียบขนาดของความยาวคอลัมน์



ภาพประกอบ 14 อุปกรณ์การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction : SPE)



ประวัติย่อของผู้วิจัย

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ – ชื่อสกุล	นางสาวกมลรัตน์ เดียบศิริ
วันเดือนปีเกิด	26 มิถุนายน 2532
สถานที่เกิด	บ้านเลขที่ 187 หมู่ที่ 10 ตำบลไม้เค็ด อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี 25230
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2551	มัธยมศึกษา 1 - 6 จาก โรงเรียนปราจิณราษฎรอำรุง จังหวัดปราจีนบุรี
พ.ศ. 2554	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2558	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร