

โครงการวิจัย

เรื่อง

การแยกและการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid)
ในข้าวกล้องงอกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในข้าวกล้องงอกโดยการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย องค์ประกอบของกรดเฟอร์รูลิกจะถูกแยกด้วยระบบ HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ HiQSil C₁₈ HS อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตน ไทรล์ : กรดอะซิติก 2 % 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากกราฟมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 10-50 ppm. ได้สมการเชิงเส้นและสัมประสิทธิ์การตัดสิ้นใจของกราฟมาตรฐานเป็นดังนี้ $y = 67028x + 24831$ $r^2 = 0.9993$ ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง และเส้าไห้ คือ 14.73 13.74 และ 14.67 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ

การวิเคราะห์เชิงปริมาณกรดเฟอร์รูลิกโดยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน (External Standard Method) และการวิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน (Standard Addition Method) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจที่ 99 % ($P < 0.01$)

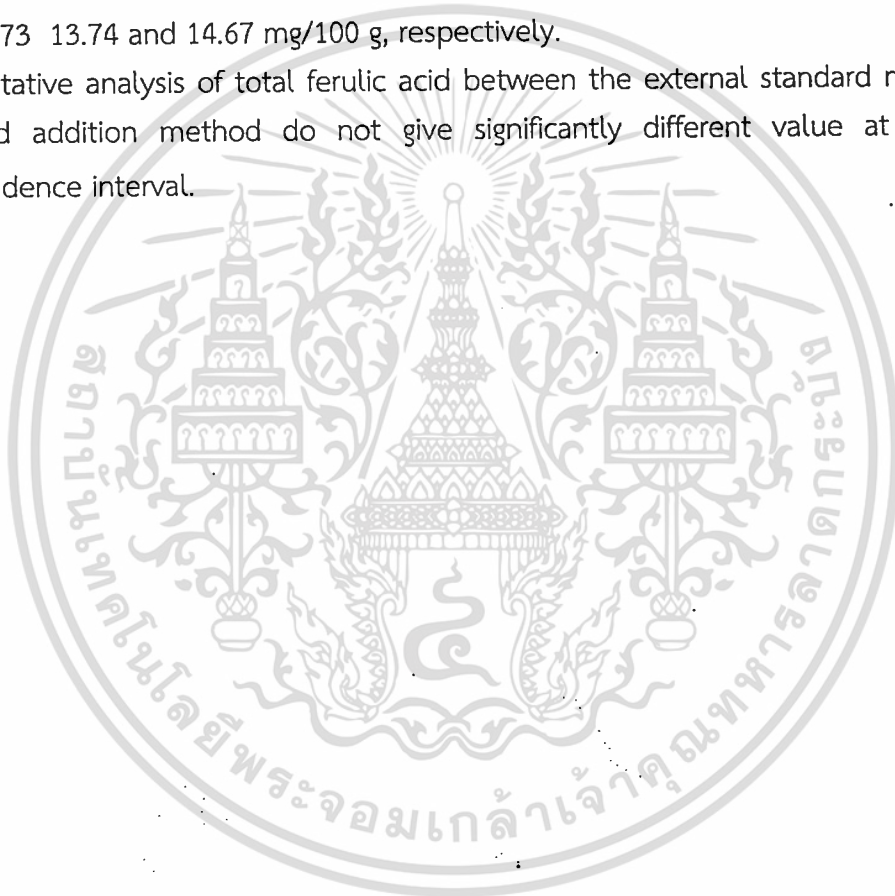


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

This methods are studies content ferulic acid in Germinated Brown Rice was extracted with ethyl acetate. Ferulic acid components were separated by isocratic reverse phase HPLC and quantified with a Turnable Absorbance detector at 310 nm. Separation performed Stationary phase on HiQSil C₁₈ HS column. Mobile phase were used Acetonitrile : 2% Acetic acid 15 :85 (v/v) at flow rate 1.0 mL/min. The standard calibration curve obtained at range was 10-50 ppm. The linear regression equation and Coefficient of Determination at calibration curve was $y = 67028x+24831$ $r^2 = 0.9993$ The mean content ferulic acid in Dok-Mali 105, Red Jasmine and Sao Hai Germinated Brown Rice were 14.73 13.74 and 14.67 mg/100 g, respectively.

In quantitative analysis of total ferulic acid between the external standard method and standard addition method do not give significantly different value at 99 % ($P < 0.01$) confidence interval.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔ ผู้วิจัยขอขอบคุณ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ที่ให้ข้อเสนอแนะ ข้อคิดเห็น พร้อมทั้งหลักการที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ มารดา และครอบครัวที่ให้ความรักและให้กำลังใจนี้ ผู้วิจัยตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีโครงการวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่านและบิดาที่ล่วงลับไปแล้ว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

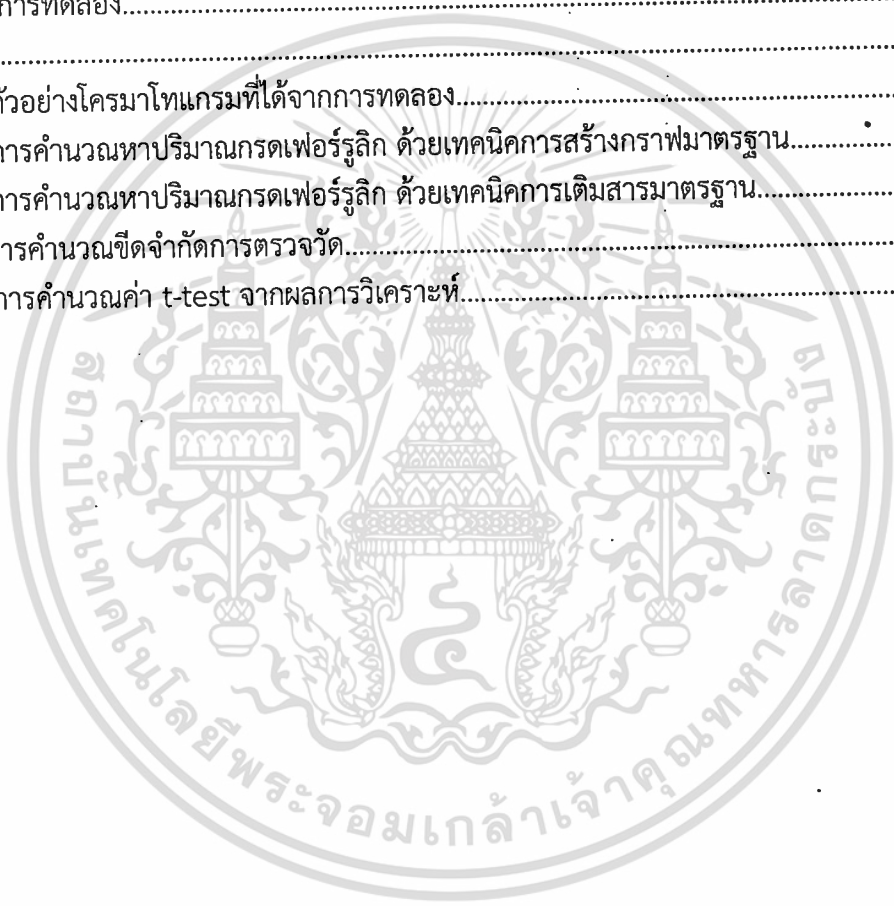
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญรูป.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ข้าวและความสำคัญของข้าว.....	4
2.1.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว.....	4
2.1.2 สัดส่วนโครงสร้างของเมล็ดข้าว.....	5
2.1.3 องค์ประกอบทางเคมีของข้าว.....	6
2.1.4 ข้าวกล้องงอก.....	8
2.1.5 ประโยชน์ของสารอาหารในข้าวกล้องงอกที่มีต่อร่างกาย.....	11
2.2 กรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid).....	12
2.2.1 สมบัติทางเคมีของกรดเฟอร์รูลิก.....	12
2.2.2 คุณสมบัติที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของกรดเฟอร์รูลิก.....	12
2.3 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	12
2.3.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์.....	13
2.3.2 ทฤษฎีการแยก (Separation Theory).....	15
2.3.3 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC (HPLC-System).....	16
2.3.4 เทคนิคการวิเคราะห์เชิงปริมาณ.....	21
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....	24
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	28
4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติก28	28
ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์	
4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติก.....33	33
4.3 ศึกษาความเที่ยง (Precision)34	34
4.4 ศึกษาความแม่นยำ (Accuracy).....34	34
4.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดเพอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องอก.....35	35
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	38
เอกสารอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก ก. ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลอง.....42	42
ภาคผนวก ข. การคำนวณหาปริมาณกรดเพอร์รูติก ด้วยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน.....47	47
ภาคผนวก ค. การคำนวณหาปริมาณกรดเพอร์รูติก ด้วยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน.....55	55
ภาคผนวก ง. การคำนวณขีดจำกัดการตรวจวัด.....59	59
ภาคผนวก จ. การคำนวณค่า t-test จากผลการวิเคราะห์.....62	62



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สัดส่วนโครงสร้างของเมล็ดข้าว.....	6
2.2 การเปรียบเทียบคุณค่าสารอาหารของข้าวกล้องและข้าวขาว.....	9
2.3 ประโยชน์ของสารอาหารในข้าวกล้องงอก.....	11
4.1 แสดงค่าเวลารีเทนชัน (retention time) ในการแยกสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริกที่.....	28
อัตราส่วนต่าง ๆ	
4.2 แสดงอัตราส่วนในการแยกสารละลายกรดเฟอร์ริกที่อัตราส่วนต่างๆ ตรวจวัดที่ความ.....	32
ยาวคลื่น 310 นาโนเมตร	
4.3 แสดงผลความเที่ยงสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริก.....	34
เข้มข้น 100 mg/L	
4.4 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก.....	35
ด้วยเทคนิค External Standard Method	
4.5 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกด้วย.....	36
เทคนิค Standard Addition Method	
4.6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกทั้ง 2วิธี.....	36
4.7 แสดงผลการวิเคราะห์ t-test ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ที่ระดับความมั่นใจ 95%.....	37
4.8 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก และข้าวกล้อง.....	37
ข.1 พื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริก ช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L.....	47
ข.2 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องงอก ดอกมะลิ 105	48
ข.3 ปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ดอกมะลิ 105.....	49
ข.4 พื้นที่พีคในตัวอย่างข้าวกล้องงอกหอมมะลิแดง.....	50
ข.5 ปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก หอมมะลิแดง.....	50
ข.6 พื้นที่พีคในตัวอย่างข้าวกล้องงอก เส้าให้.....	51
ข.7 ปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก เส้าให้.....	51
ข.8 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้อง ดอกมะลิ 105	52
ข.9 ปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้อง ดอกมะลิ 105.....	52
ข.10 พื้นที่พีคในตัวอย่างข้าวกล้องงอกหอมมะลิแดง.....	53
ข.11 ปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องหอมมะลิแดง.....	53
ข.12 พื้นที่พีคในตัวอย่างข้าวกล้องเส้าให้.....	54
ข.13 ปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องเส้าให้.....	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค.1 พื้นที่พืคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105.....	55
ค.2 ปริมาณกรดเพอร์รูติกของตัวอย่างข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105	57
ค.3 พื้นที่พืคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกหอมมะลิแดง.....	57
ค.4 ปริมาณกรดเพอร์รูติกของตัวอย่างข้าวกล้องงอกหอมมะลิแดง.....	57
ค.5 พื้นที่พืคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกเสาไห้.....	58
ค.6 ปริมาณกรดเพอร์รูติกของตัวอย่างข้าวกล้องงอกเสาไห้.....	58
ง.1 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดเพอร์รูติก โดยทำการทดสอบ.....	60
ในช่วงความเข้มข้น 10-50 ppm ในเฟสเคลื่อนที่เฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ : กรดแอซิดิก 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร	
ง.2 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ	61
สารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติกกับพื้นที่พืคเฉลี่ย	
จ.1 ปริมาณกรดเพอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกที่วิเคราะห์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่สารละลาย.....	62
อะซิโตนไทรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดที่ความ ยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร	
จ.2 ปริมาณกรดเพอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้องที่วิเคราะห์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่	64
สารละลายอะซิโตนไทรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

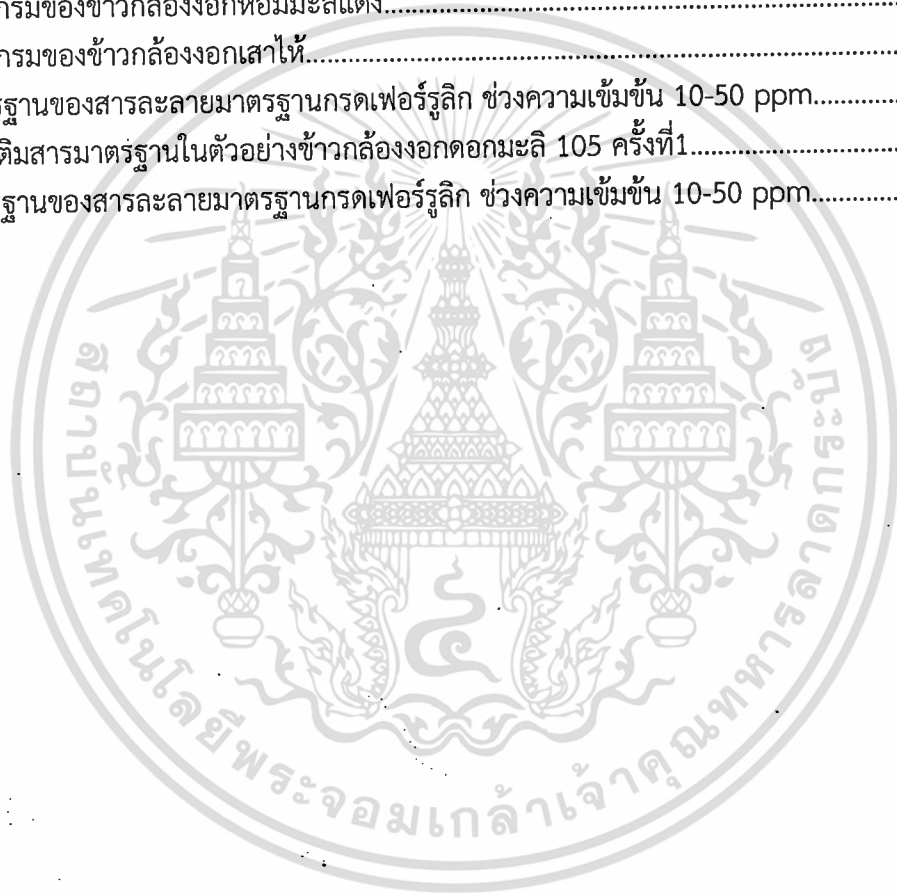
สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว.....	5
2.2 โครงสร้างของอะมิโลสและอะมิโลแพคติน.....	7
2.3 ปริมาณสารอาหารของข้าวกล้องงอกเมื่อเทียบกับข้าวขาว.....	10
2.4 โครงสร้างของกรดเฟอร์รูลิก.....	12
2.5 แสดงแผนภาพส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC.....	16
2.6 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC.....	17
2.7 ระบบการฉีดสารตัวอย่างชนิด rotary.....	19
4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ความเข้มข้น 100 ppm..... เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโตนไนไตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตร โดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที	29
4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ความเข้มข้น 100 ppm..... เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโตนไนไตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตร โดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที	29
4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ความเข้มข้น 100 ppm..... เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโตนไนไตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตร โดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที	30
4.4 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 กล้องงอก โดยเฟส..... เคลื่อนที่อะซิโตนไนไตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 10 : 90 ปริมาตรโดยปริมาตร และ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตร ในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร	31
4.5 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 กล้องงอก โดยเฟส..... เคลื่อนที่อะซิโตนไนไตรล์ : แอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตร ในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร	31
4.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 กล้องงอกโดยเฟส..... เคลื่อนที่อะซิโตนไนไตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 20 : 80 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร	32
4.7 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดเฟอร์รูลิก ช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L..... โดยใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไนไตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีด วิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ก.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอรัลิก ที่ความเข้มข้น 10 ppm.....	42
ก.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอรัลิก ที่ความเข้มข้น 20 ppm.....	43
ก.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอรัลิก ที่ความเข้มข้น 30 ppm.....	43
ก.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอรัลิก ที่ความเข้มข้น 40 ppm.....	44
ก.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอรัลิก ที่ความเข้มข้น 50 ppm.....	44
ก.6 โครมาโทแกรมของข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105.....	45
ก.7 โครมาโทแกรมของข้าวกล้องงอกหอมมะลิแดง.....	45
ก.8 โครมาโทแกรมของข้าวกล้องงอกเสาไห้.....	46
ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอรัลิก ช่วงความเข้มข้น 10-50 ppm.....	47
ค.1 กราฟการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105 ครั้งที่1.....	55
ง.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอรัลิก ช่วงความเข้มข้น 10-50 ppm.....	60



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับสามของโลก รองจากข้าวสาลี และข้าวโพดซึ่งใช้ในการบริโภคของมนุษย์ โดยพลังงานที่ได้จากข้าวคิดเป็น 22 เปอร์เซ็นต์ ของพลังงานทั้งหมดที่มนุษย์ได้รับการบริโภค (Ohtsubo, Suzuki, Yasui & Kasumi, 2005) ในทั่วโลกนั้นมีมากกว่า 100 ประเทศที่ปลูกและบริโภคข้าว โดย 92 เปอร์เซ็นต์ของประเทศที่ผลิตและบริโภคข้าวอยู่ในทวีปเอเชีย และสำหรับประเทศไทยข้าวไม่ได้เป็นเพียงอาหารหลักเท่านั้น แต่ข้าวยังเป็นสินค้าออกที่สำคัญของประเทศ

ประเทศไทยถือเป็นผู้ผลิตข้าวอันดับต้นๆ ของโลก ซึ่งมีวิธีการปลูกและสายพันธุ์ข้าวหลากหลาย ในกระบวนการสีข้าวนั้นถ้ามีการแยกเฉพาะเปลือกข้าวออก จะได้ข้าวกล้องซึ่งมีส่วนของจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว และเป็นแหล่งรวมสารอาหารที่มีคุณค่าและประโยชน์ต่อร่างกายสูง ขณะที่ข้าวที่บริโภคกันส่วนมากเป็นข้าวที่ถูกขัดสีหลายครั้งจนเหลือแต่เนื้อข้าวสีขาวที่แทบจะไม่มีคุณค่าและประโยชน์ทางโภชนาการ เนื่องจากมีส่วนประกอบของแป้งเป็นส่วนใหญ่ และสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของรำข้าวที่ถูกขัดทิ้งไปในการขัดขาว ได้แก่ กรดเฟอร์ริก (Ferulic acid) กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก (γ -aminobutyric acid, GABA) วิตามินอี (tocopherol) วิตามินบี และโอรีซานอล (oryzanols) ผู้บริโภคทั่วไปมีความคุ้นเคยและติดใจในความนุ่มและสีขาวนวลรับประทาน จนมองข้ามคุณค่ามหาศาลของข้าวกล้องไป

ข้าวกล้องงอก (germinated brown rice) เป็นข้าวกล้องที่ผ่านกระบวนการงอกในระยะเวลาสั้นๆ โดนการนำข้าวกล้องมาแช่น้ำในระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้ข้าวกล้องซึ่งยังมีส่วนของคัพภะติดอยู่เริ่มกระบวนการงอก จากนั้นนำไปลดความชื้น หรือนำข้าวเปลือกมาแช่น้ำเพื่อให้เกิดการงอก จากนั้นนำไปลดความชื้นและทำการกะเทาะเปลือกออกด้วยกระบวนการเดียวกับข้าวกล้องปกติ (Ito & Ishikawa, 2004)

สารอนุมูลอิสระ หมายถึง สารซึ่งมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ในโมเลกุลโดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว โดยเฉพาะเวลาที่มีการออกกำลังกายหนัก ท้องแดง แดดจ้า โคมัยม นิกิล อยู่เป็นจำนวนมากๆ มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และร่างกายก็จะมีระบบแอนติออกซิแดนท์ขจัดออกไป แต่ถ้าร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไป ตัวอย่างเช่น ได้รับจากอาหารบางชนิด จากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูงๆ มาใช้อีก หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสี ultraviolet การแผ่รังสี (radiation) รังสี หรือจากมลพิษ เช่น ควีนบูรี่ ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ ถ้าสารเหล่านี้มีมากกว่าความสามารถของแอนติออกซิแดนท์ในร่างกายจะขจัดหมด หรือในภาวะที่จำนวนแอนติออกซิแดนท์ในร่างกายลดลง เช่น ผู้สูงอายุ ก็จะทำให้มีสารอนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระเช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งมีออกซิเจนเป็นศูนย์กลางเช่นกัน โดยรวมเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) มากเกินไปก่อให้เกิดอันตรายได้

อนุมูลอิสระมีหลายชนิด สารประกอบออกซิเจน หรือไนโตรเจน หรือ คลอรีน ซึ่งสามารถเป็นสารอนุมูลอิสระ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์
 อนุมูลอิสระไฮดรอกซี
 อนุมูลไขมันเปอร์ออกซี
 ซิงเกิ้ลทออกซิเจน
 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
 กรดไฮโปคลอรัส
 ไนตริกออกไซด์

reactive oxygen species (ROS)

อนุมูลอิสระ มีที่มาจากแหล่งภายนอกร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น คิวบุนทรีย์ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือธาตุเหล็กมากกว่าปกติ แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา ยาบางชนิด เช่น Doxorubicin, Penicillamine, Paracetamol, CCl₄ เป็นต้น และแหล่งภายในร่างกาย ได้แก่ ออกซิเจน ในกระบวนการเผาผลาญสารอาหารในร่างกายซึ่งมีความจำเป็นต้องอาศัยออกซิเจนช่วย และเกิดผลพลอยได้ คือ ออกซิเจนที่มีประจุลบ ซึ่งก็คืออนุมูลอิสระ สารตัวนั้นนอกจากจะรวมตัวกับ LDL (Low density lipoprotein) ยังสามารถไปรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกาย แล้วก่อให้เกิดเป็นสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ปกติแปรสภาพไปเป็นมะเร็ง

ร่างกายก็มีกลไกที่จะกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้โดย 2 วิธี คือใช้เอนไซม์ต่างๆในร่างกายเช่น Superoxide dismutase (SOD) และไมโซไซม์ ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี เบตาแคโรทีน และกรดเพอร์รูติก เนื่องจากเอนไซม์ต่างๆที่ใช้กำจัดอนุมูลอิสระ เช่น SOD มีได้จำกัด แต่สารอาหารที่สามารถทานเสริมได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี เบตาแคโรทีน และกรดเพอร์รูติก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรืออีกชื่อ Antioxidant นั้นสามารถหารับประทานได้จากผลไม้และธัญพืช ต่าง ๆ ได้

ในที่นี่จะทำการวิเคราะห์หากรดเพอร์รูติกในข้าวกล้องงอก ซึ่งถือว่าเป็นสารสำคัญที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมเกี่ยวกับเครื่องสำอาง กรดเพอร์รูติกเป็นกรดอินทรีย์จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอล มีสรรพคุณมากมาย เช่น ทำให้ต่อมไร้ท่อทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ กระตุ้นฮอร์โมนในการเติบโต ส่งเสริมการหมุนเวียนโลหิต ลดการดูดซับโคเลสเตอรอลในร่างกาย กระตุ้นการขับน้ำดีออกมาสู่ลำไส้เพื่อสลายไขมันในลำไส้ได้ดียิ่งขึ้น ควบคุมระดับคาร์โบไฮเดรตในร่างกาย มีแนวโน้มควบคุมการผลิตฮอร์โมนเทสโตสเทอโรน (Testosterone) อยู่ในระดับสูงอย่างสม่ำเสมอ ให้สัมพันธ์กับฮอร์โมนการเจริญเติบโต สามารถชะลอความแก่ (Anti - Aging) เป็นตัวสมานผิวโดยธรรมชาติ (Natural Healer) กระตุ้นดีเอ็นเอที่จำกัดสารพิษออกจากร่างกายและควบคุมน้ำตาล มีสาร ID6 ที่สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ลดโอกาสการเป็นโรคไขข้ออักเสบชนิดเริ่มต้น (Early arthrosclerosis) ช่วยในการผลิตเอ็นโดรฟิน ช่วยเสริมสร้างเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อเรียบป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ คุณสมบัติมากมายเหล่านี้จึงเหมาะกับผู้ที่เข้าสู่วัยทอง ผู้ควบคุมน้ำหนัก ผู้ที่ท้องผูกกรดเพอร์รูติกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงมากในเนื้อเยื่อของคน ช่วยสร้างคอลลาเจนและเสริมสร้างกระบวนการป้องกันสารอนุมูลอิสระ คั้นการกระชับและความยืดหยุ่นให้กับผิวได้อย่างเห็นได้ชัด (ต่อต้านความแก่) ป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง โรคหัวใจ ใช้หวัด รักษาสุขภาพของกล้ามเนื้อ ต่อต้านผลกระทบจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต เรียกได้ว่าเป็นสารต่อต้านริ้วรอยอันเกิดจากการโดนแสงแดดที่นำจะเห็นผลมากที่สุด สามารถใช้ร่วมกับผลิตภัณฑ์กันแดดได้ดี ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดเพอร์รูติกและผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เกิดขึ้น เพื่อนำสารสกัดที่ได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ดังนั้นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือความเที่ยงและความแม่นยำของการวิเคราะห์เพื่อให้ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีหลักในการพิจารณาเทคนิคหลายองค์ประกอบด้วยกันเช่น เทคนิคในการวิเคราะห์ สารเคมี เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ และความจำเพาะในการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดข้อจำกัดหลายประการในการวิเคราะห์ในงานวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการนำเทคนิคหลายๆ เทคนิคมาใช้ในการวิเคราะห์กรดเพอร์รูติก เช่น ทินเลเยอร์ โครมาโทกราฟี(TLC) ซึ่งเป็นเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เทคนิคนี้ค่อนข้างยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่าง มีขั้นตอนการวิเคราะห์หลายขั้นตอน และมีความจำเพาะต่ำจึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมนำมาใช้ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(HPLC) เป็นเทคนิคที่ให้ความแม่นยำสูงในการวิเคราะห์ด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมาผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิจัยครั้งนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกและสกัดสารประกอบฟีนอลกรดเพอร์รูติก ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก
2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารกรดเพอร์รูติก โดยวิธี HPLC แล้วสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่นได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทำการศึกษาวิธีสกัดที่เหมาะสมในการหาสารประกอบฟีนอลกรดเพอร์รูติก ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก
2. วิเคราะห์ปริมาณกรดเพอร์รูติก ที่มีอยู่ในข้าวกล้องงอกว่ามีปริมาณเท่าใด เพื่อนำมาใช้เป็นประโยชน์ต่อไปในอุตสาหกรรม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาวิธีสกัด กรดเพอร์รูติกในข้าวกล้องงอก และการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี HPLC
2. สามารถนำสารสกัดที่ได้จากการวิเคราะห์มาใช้ประโยชน์ได้จริงในอุตสาหกรรมอาหารและยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าวและความสำคัญของข้าว

ข้าวเป็นอาหารหลักของชาวเอเชียแปซิฟิกและไทยรวม 17 ประเทศ (Liang, Han, Nout & Hamer, 2008) ประเทศในทวีปอเมริกาเหนือและใต้ 9 ประเทศ และประเทศในทวีปแอฟริกาอีก 8 ประเทศ (FAO, 2004) มาเป็นเวลานาน ข้าวมีส่วนประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ในการเป็นอาหารให้พลังงานของโลก โดยที่ข้าวสาลีและข้าวโพดมีส่วนประมาณ 19 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกเหนือจากการให้พลังงานแล้ว ข้าวยังเป็นแหล่งที่สี่ของสารอาหารรอง ประเทศในเอเชียปลูกและบริโภคข้าวประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของโลก (Khush, 1997 Hossain & Narciso, 2004) ประชากรประเทศไทยประมาณ 64.24 ล้านคนบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก โดยข้าวที่ปลูกในประเทศไทยนั้นใช้บริโภคประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ และส่งออกประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ โดยประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวอันดับของโลกเป็นเวลานานกว่า 1 ทศวรรษ ซึ่งสร้างรายได้ประมาณ 1,700 ถึง 1,900 ล้านดอลลาร์สหรัฐอเมริกาต่อปี (Vanichanont, 2004) ประเทศหลักที่นำเข้าข้าวจากประเทศไทยคือ อินโดนีเซีย ไนจีเรีย อิหร่าน สหรัฐอเมริกา และสิงคโปร์ (Asia BioBusiness, 2006)

2.1.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

เมล็ดข้าวเรียกว่า คาริออปซิส (caryopsis) เมื่อนำข้าวไปผ่าตามความยาวและศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าเมล็ดข้าวประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ (บุญหงส์, 2547)

1. แกลบ (hull หรือ husk) เป็นส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าวประกอบด้วยเปลือกใหญ่ (lemma) เปลือกเล็ก (palea) หาง (awn) ขั้วเมล็ด (rachilla) และกลีบรองเมล็ด (sterile lemma)

2. ข้าวกล้อง (brown rice) เป็นส่วนที่ใช้บริโภค ซึ่งประกอบด้วย

- 2.1 เยื่อข้าวกล้อง (caryopsis coat) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ได้แก่ เยื่อชั้นนอก (pericarp) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่มีผนังเส้นใย 6 ชั้น มีสารสีหรือรงควัตถุปนอยู่ทำให้ข้าวกล้องมีสีต่างๆ เช่น น้ำตาลอ่อน น้ำตาลแก่ น้ำตาลแดง น้ำตาลม่วง น้ำตาลจนเกือบดำ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีโปรตีน เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสำคัญ เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มผลเข้ามา ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชั้น รูปยาวเรียวยาวตามขวางประกอบด้วยไขมันและสารสีเช่นกัน และเยื่อ-คั่น (nucellus) เป็นเซลล์ที่ติดกับเยื่อหุ้มเมล็ดไม่ติดแน่นจึงแยกออกจากกันได้ง่าย

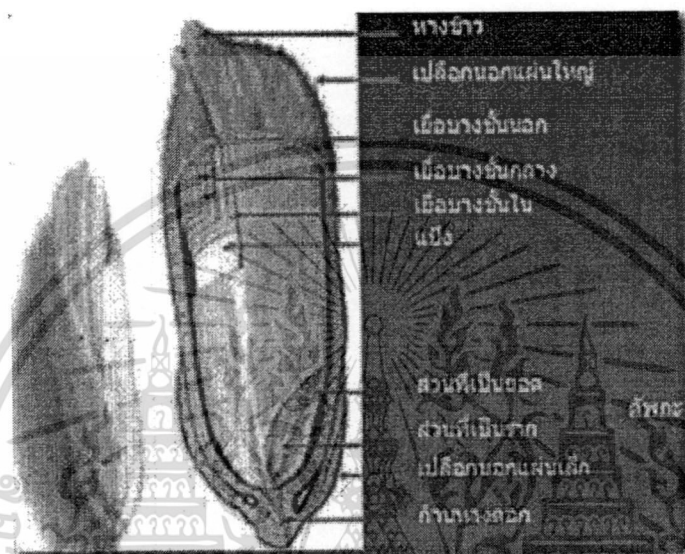
- 2.2 เยื่อหุ้มชั้นใน (aleurone layer) อยู่ด้านในต่อจากเยื่อคั่น เป็นเนื้อเยื่อชนิดเดียวกับเนื้อเมล็ด (endosperm) เซลล์ของเยื่อหุ้มเนื้อเมล็ดประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน

- 2.3 ส่วนสะสมอาหาร (starchy endosperm) เรียกว่าเอนโดสเปิร์ม เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ (ประมาณ 83 เปอร์เซ็นต์) ของข้าวกล้อง เอนโดสเปิร์มจะถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มชั้นใน (aleurone layer) และตัวเอนโดสเปิร์มเองจะประกอบไปด้วยเซลล์พาราเรนาไคมา (parenchyma cell) ที่มีผนังบางซึ่งบรรจุเม็ดแป้ง (compound starch granules) ไว้เต็มโดยมีโปรตีนแทรกอยู่รอบนอกใกล้ๆกับชั้นของเยื่อหุ้มชั้นใน

- 2.4 คัพภะ (embryo) เป็นส่วนที่เจริญเป็นต้นอ่อนต่อไป ดังนั้นจึงประกอบด้วยส่วนของต้นอ่อน (plumule) รากแรกเกิด (radicle) โดยมีส่วนของลำต้นอ่อนสั้นๆ (mesocotyl) เชื่อมอยู่ตรงกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างส่วนของใบและราก ส่วนของใบจะถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกหุ้มต้นอ่อน (coleoptile) และส่วนของราก ก็จะถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มรากอ่อน (coleorhiza) ส่วนของปลอกหุ้มต้นอ่อนนั้นจะถูกล้อมรอบด้วยชั้นของ เซลล์ที่อาน้ำที่อาหาร (epiblast) และใบเลี้ยง (scutellum) ซึ่งเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว คัพพะเป็นแห่งสะสม อาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจึงอุดมด้วยโปรตีนและไขมัน โครงสร้างของเมล็ดข้าวดัง แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

2.1.2 สัตส่วนโครงสร้างของเมล็ดข้าว

จากโครงสร้างของเมล็ดข้าวประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ แกลบและข้าวกล้อง เมื่อเปรียบเทียบส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าวจากน้ำหนักเมล็ดข้าว (ข้าวเปลือก) 100 เปอร์เซ็นต์ มีสัดส่วนดังแสดงในตารางที่ 2.1 จะเห็นว่าสัดส่วนของน้ำหนักข้าวเปลือก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นสัดส่วนของแกลบประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นสัดส่วนของข้าวกล้องประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบน้ำหนักข้าวกล้องให้เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จะมีสัดส่วนของเยื่อหุ้มต่างๆรวมประมาณ 6.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของคัพพะ 3 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อเมล็ดประมาณ 90.5 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของคัพพะจะประกอบด้วยใบเลี้ยงมากที่สุด (1.18-1.4 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสัดส่วนต่างๆในข้าวเปลือกนี้ จะมีผลต่อกระบวนการแปรรูปข้าวเปลือกเป็นข้าวกล้อง และข้าวสารใน ปริมาณผลผลิตที่ได้ (เครือวัลย์,สุนันทา,อนงค์ และ รุจี, 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สัดส่วนโครงสร้างของเมล็ดข้าว (เครือวัลย์,สุนันทา,อนงค์ และ รุจี, 2535)

โครงสร้างของเมล็ดข้าว	สัดส่วน(เปอร์เซ็นต์)	
	ค่าเฉลี่ย	ช่วงสัดส่วน
ข้าวเปลือก	100	-
แกลบ	20	16-18
ข้าวกล้อง	80	72-84
ข้าวกล้อง	100	-
เยื่อหุ้มเมล็ด	5	4-6
เยื่อหุ้มผล	1.5	1-2
เนื้อเมล็ด	90.5	89-94
คัพภะ	3	2-3
คัพภะ	3	-
รากอ่อน	0.18	-
ต้นอ่อน	0.34	-
เยื่อหุ้มรากอ่อน	0.18	-
ใบเลี้ยง	1.29	1.18-1.40
ท่อน้ำ ท่ออาหาร	0.26	-
อื่นๆ	0.75	-

2.1.3 องค์ประกอบทางเคมีของข้าว

ข้าวที่บริโภคจะอยู่ในรูปของข้าวสารขาวและข้าวกล้อง ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

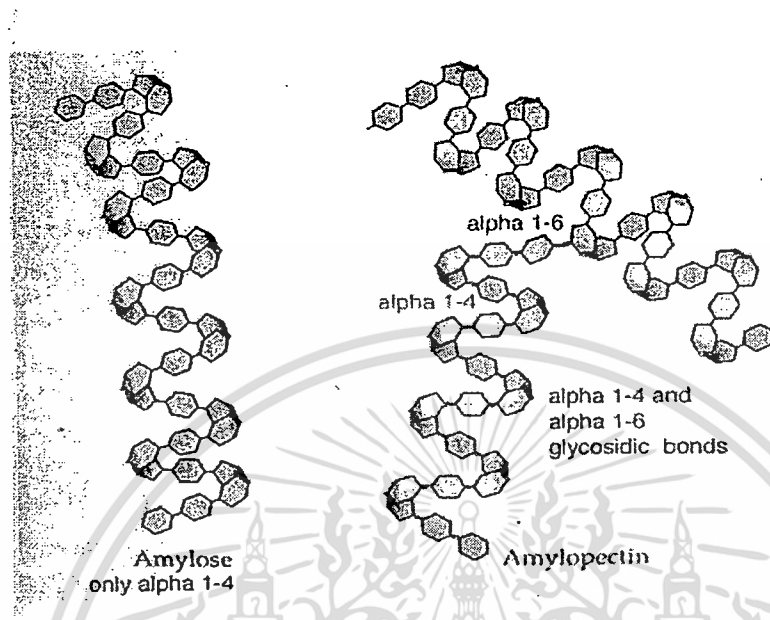
1. คาร์โบไฮเดรต ที่พบมากในข้าวจะอยู่ในรูปของแป้ง (starch) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์จะพบมากที่สุดประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ จึงมีผลต่อคุณภาพข้าวมากที่สุด โมเลกุลของแป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ อะมิโลส และอะมิโลแพคติน ซึ่งโมเลกุลแป้งทั้ง 2 ชนิดรวมกันแน่นจนเป็นเม็ดแป้ง (อรอนงค์, จันทร์จรัส และวราภา, 2547)

1.1 อะมิโลส (amylose) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสจัดเรียงตัวเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้น ด้วยพันธะ α -1,4 glucoside bond เมื่อย่อยด้วยสารละลายไอโอดีนจะมีสีน้ำเงิน และละลายน้ำได้ ในแป้งจะมีอะมิโลสเป็นส่วนรองโดยอยู่ปะปนกับอะมิโลแพคติน(งามชื่น, 2545)

1.2 อะมิโลแพคติน (amylopectin) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสจัดเรียงตัวเป็นพอลิเมอร์ลักษณะกิ่งก้านเป็นแขนงมากประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์ โดยโมเลกุลของกลูโคสจะต่อกันด้วยพันธะ α -1,4 glucoside bond และ พันธะ α -1,6 glucoside bond (อรอนงค์, จันทร์จรัส และวราภา, 2547) ไม่ว่าจะรับประทานอย่างไรก็ตาม ก็ต้องอาศัยน้ำย่อยจากน้ำลายและน้ำในกระเพาะอาหารในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลที่ร่างกายนำไปใช้พลังงานได้ทันที

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2547) เมื่อย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนจะมีสีน้ำตาลแดง และไม่สามารถละลายน้ำได้(งามชื่น, 2545) โครงสร้างของอะมิโลสและอะมิโลแพคติน ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของอะมิโลสและอะมิโลแพคติน

2. โปรตีน ในข้าวมีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว โดยโปรตีนจะเกิดขึ้นตามส่วนต่างๆของ เมล็ด มีมากในชั้นเปลือกหุ้มเมล็ด และเนื้อเมล็ดด้านนอกมีโปรตีนมากกว่าใจกลางเมล็ด ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในโปรตีนของข้าวเปลือกไม่ต่างจากข้าวกล้องและข้าวสารมากนักเพราะในส่วนเปลือกมีโปรตีนน้อยมาก (2-6 เปอร์เซ็นต์) จึงได้รับโปรตีนจากเนื้อเมล็ดมากเนื่องจากสัดส่วนของเนื้อเมล็ดมีมากกว่าส่วนอื่น และแหล่งที่มีโปรตีนมากอีกส่วนหนึ่งคือ ชั้นถัดจากแอลิวโรนและชั้นแอลิวโรนจะสะสมเป็นกลุ่มโปรตีน (protein bodies) (อรอนงค์, จันทร์จรัส และวราภา; 2547)

โมเลกุลของโปรตีนจะรวมตัวกันเป็นรูปร่างที่มีกฏแต่กลืนเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ภายใน ซึ่งมี 3 รูปแบบ คือ แบบผลึก (crystalline) แบบรูปร่างกลมขนาดเล็ก และรูปร่างกลมขนาดใหญ่ โดยโปรตีนที่แทรกอยู่ในเมล็ดจะแทรกอยู่ระหว่างเม็ดแป้งที่เชื่อมโยงกับเม็ดแป้ง ซึ่งอาจมีผลต่อการเกิดเจลาตีไนซ์ทำให้การพองตัวของเม็ดแป้งเสียรูปร่างได้ง่าย และโมเลกุลของอะมิโลสไม่ซึมผ่านออกมามีผลต่อลักษณะความอ่อนหรือแข็งเมื่อเย็นลง ซึ่งส่งผลต่อข้าวสุกที่มีลักษณะนุ่ม เหนียวหรือร่วน โปรตีนในเมล็ดข้าวสามารถแบ่งเป็น 4 ชนิด ตามคุณสมบัติในการละลายได้แก่

- 2.1 อัลบูมิน (albumin) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำ (water soluble protein)
- 2.2 โกลบูลิน (globulin) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำเกลือ (salt soluble protein)
- 2.3 โปรลามิน (prolamin) มีคุณสมบัติละลายได้ในแอลกอฮอล์ (alcohol soluble protein)
- 2.4 กลูเทลลิน (glutelin) มีคุณสมบัติละลายได้ในกรดหรือด่าง (acid or alkali soluble protein)

ในข้าวกล้องมีโปรตีนชนิดที่ละลายน้ำได้(albumin) และละลายได้ในน้ำเกลือ(globulin) มากกว่าในข้าวสาร ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ส่วนใหญ่อยู่ในเนื้อเยื่อหุ้มเมล็ดและคัพพะ ส่วนโปรตีนชนิดที่ละลายได้ทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกรดหรือต่าง(glutelin) เป็นโปรตีนหลักที่พบในเมล็ดข้าวกล้องและข้าวสาร และในรำข้าวก็มีความแตกต่างกันของชนิดโปรตีนเช่นกัน

3. ไขมัน ข้าวมีปริมาณไขมันประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของข้าวทั้งเมล็ด คล้ายธัญพืชอื่นและมีอยู่ในส่วนของรำข้าวมากกว่าเนื้อเมล็ด การสีข้าวให้ขาวทำให้ไขมันเหลืออยู่เพียง 0.3-0.5 เปอร์เซ็นต์ ประเภทไขมันในข้าวส่วนใหญ่คือ ไตรกลีเซอไรด์ รองลงมาคือ ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ไกลโคลิพิด (glycolipids) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) (Henry and Kettlewell.1996) องค์ประกอบของไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกายประเภทกรดไขมันไม่อิ่มตัวและกรดไขมันอิ่มตัวซึ่งมีอยู่มาก คือ กรดโอเลอิก 4.25 เปอร์เซ็นต์ ลิโนเลอิก 39.1 เปอร์เซ็นต์ ปาล์มติก 15 เปอร์เซ็นต์ ไมริสติก 0.2 เปอร์เซ็นต์ และบีเฮนิก 0.2 เปอร์เซ็นต์

4. แร่ธาตุ ในเมล็ดข้าวที่สำคัญมี 9 ชนิด ได้แก่ แคลเซียม (calcium) แมกนีเซียม (magnesium) ฟอสฟอรัส(phosphorus) โพแทสเซียม (potassium) เหล็ก (iron) สังกะสี (zinc) แมงกานีส (manganese) ซีลีเนียม (selenium) และกาบา หรือ GABA (gamma-amino butyric acid) ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นในเมล็ดข้าวขณะที่ข้าวเริ่มงอก

5. วิตามิน (vitamin) ในเมล็ดข้าวมีวิตามินที่สำคัญได้แก่

5.1 กลุ่มวิตามินที่ละลายในน้ำ ประกอบด้วย วิตามินบี 1(thiamine) วิตามินบี 2(riboflavin) วิตามินบี 3(niacin) วิตามินบี 5(pathothenic acid) วิตามินบี 6 (pyridoxine) วิตามินบี 9(folic acid) วิตามินบี 12(cyanocobalamin) โคโลรีน (chlorine) และอินโนซิทอล(inositol) (ฉัตรชัย วงษ์รักษา. 2546)

5.2 กลุ่มวิตามินที่ละลายในไขมัน ประกอบด้วย วิตามิน 4 ชนิด คือ วิตามินเอ (retinol) วิตามินอี (α-tocopherol) วิตามินเอฟ หรือที่รู้จักกันในชื่อ กรดไลโนเลอิก (linoleic acid) และแคโรทีน (carotene)

2.1.4 ข้าวกล้องงอก

ข้าวกล้องงอกมีคุณค่าทางสารอาหารสูงกว่าข้าวขาวขัดตังแสดงในตารางที่ 2.2 ข้าวกล้องคือข้าวที่กะเทาะเอาเปลือกหรือแกลบออก โดยผ่านการขัดสีเพียงครั้งเดียว ข้าวที่ได้จะมีสีขุ่น ละยังคงส่วนของจมูกข้าว เยื่อหุ้มข้าว และแอลิวโรน (aleurone) หรือรำข้าวที่หุ้มเมล็ดอยู่ติดไปด้วยสารที่มีประโยชน์ แต่ถึงแม้ข้าวกล้องจะมีคุณค่าทางสารอาหารที่ดีแต่พื้นผิวที่ล้อมรอบเมล็ดชั้นนอกจะแข็งอดมไปด้วยน้ำมันและเส้นใย ซึ่งเป็นส่วนที่ป้องกันการแทรกผ่านของความร้อนและการดูดซับน้ำ ทำให้การหุงข้าวภายใต้แรงดันบรรยากาศเกิดการเจลาติไนซ์ของเม็ดแป้ง และการอ่อนตัวหรือการสลายตัวของเนื้อเยื่อชั้นนอกได้ไม่ดีพอ จึงทำให้ข้าวกล้องที่หุงสุกภายใต้ความดันปกติมีความแข็งและร่วน คุณภาพในการรับประทานต่ำเมื่อเทียบกับข้าวขาว ฉะนั้นเพื่อให้ข้าวกล้องมีลักษณะนุ่ม อร่อย และสามารถหุงได้ง่ายเช่นเดียวกับข้าวขาว จึงได้มีการพัฒนาเป็นข้าวกล้องงอก (Ohtsubo,Suzuki,Yasui & Kasumi (2005)

ข้าวกล้องงอก (germinate brown rice : GBR) คือข้าวกล้องที่ผ่านกระบวนการงอกในระยะเวลาสั้นๆ โดยนำข้าวกล้องมาแช่น้ำในระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมประมาณ 30-40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง จนส่วนของจมูกข้าวงอกมีความยาวประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร แล้วจึงนำไปลดความชื้น โดยเมล็ดธัญพืชงอก เช่น ข้าวบาเลย์ ข้าวสาลี และข้าว จะสร้างเอนไซม์ hydrolytic ย่อยสลายแป้ง โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งและโปรตีน ทำให้มีโอลิโกแซคคาไรด์และกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น ซึ่งช่วยให้ข้าวเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้องงอกหุงง่ายขึ้น มีรสชาติดีขึ้น เนื้อสัมผัสนุ่มและมีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเพิ่มขึ้น (Ohtsubo, Suzuki, Yasui & Kasumi, 2005)

เมื่อเทียบกับข้าวขาวแล้วข้าวกล้องจะมีปริมาณกรดแกมมาอะมิโนบิวทริก(GABA) มากกว่า 10 เท่า มีใยอาหาร วิตามินอี ไนอะซิน และไลซีน มากกว่าประมาณ 4 เท่า และวิตามินบี1 บี6 และแมกนีเซียมมากกว่าข้าวขาวประมาณ 3 เท่า (Kayahara & Tsukahara, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบคุณค่าสารอาหารของข้าวกล้องและข้าวขาว

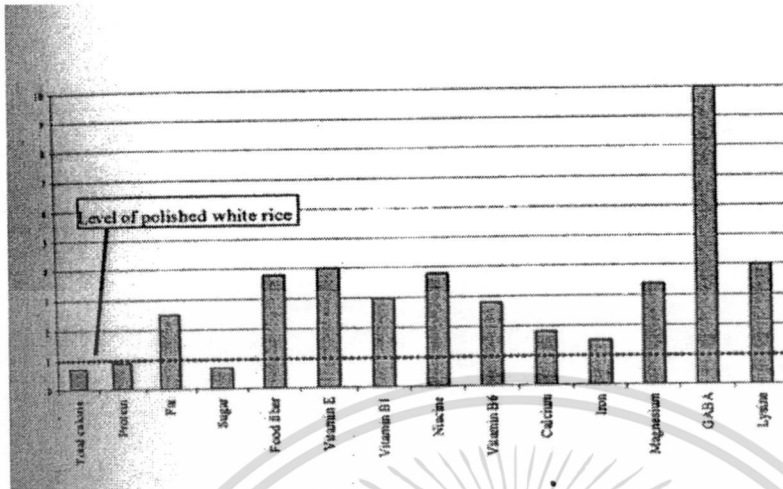
สารอาหารและวิตามิน	ข้าวกล้อง (brown rice)	ข้าวขัดขาว (milled rice)
โปรตีน (protein)(เปอร์เซ็นต์)	7.1-8.3	6.3-7.1
ไขมัน(crude)(เปอร์เซ็นต์)	1.6-2.8	0.3-0.5
เส้นใย(crude fibers)(เปอร์เซ็นต์)	0.6-1.0	0.2-0.5
เถ้า(ash)(เปอร์เซ็นต์)	1.0-1.5	0.3-0.8
แป้ง(carbohydrate)(เปอร์เซ็นต์)	75.9	76.7-78.4
วิตามินเอ(retinol)(mg)	0.11	Tr
วิตามินบี 1(thiamine)(mg)	2.9-6.1	0.2-1.1
วิตามินบี 2 (riboflavin)(mg)	0.4-1.4	0.2-0.6
วิตามินบี 3 (niacin)(mg)	35-53	13-24
วิตามินบี 5(pathothenic acid)(mg)	9-15	3-7
วิตามินบี 6 (pyridoxine)(mg)	5-9	0.4-1.2
วิตามินบี 9 (folic acid)(mg)	0.1-0.5	0.03-0.14
วิตามินบี 12 (cyanocobalamin)(mg)	0-0.004	0-0.001
คลอรีน (chlorine) (mg)	950	390-880
อินโนซิทอล (inosital) (mg)	1,000	90-110
วิตามินอี (α -tocopherol) (mg)	9.25	Tr-3

หมายเหตุ

- Tr = น้อยมาก

- คุณค่าสารอาหารตามธรรมชาติของข้าวกล้องเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสาร คิดเป็น
คุณค่าสารอาหารต่อน้ำหนักข้าวสาร 100 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ปริมาณสารอาหารของข้าวกล้องงอกเมื่อเทียบกับข้าวขาว

แกน x คือ ชนิดของสารอาหารที่พบ แกน y คือ จำนวนเท่าของสารอาหารที่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 ประโยชน์ของสารอาหารในข้าวกล้องงอกที่มีต่อร่างกาย

ประโยชน์ของสารอาหารที่ได้รับจากข้าวกล้องงอก ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ประโยชน์ของสารอาหารในข้าวกล้องงอก

สารอาหาร	ประโยชน์ของสารอาหาร
สารกลุ่มวิตามินอี	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากอนุมูลอิสระเป็นตัวการทำให้เซลล์เสียหายและแก่ก่อนวัย - มีคุณประโยชน์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน - ป้องกันผิวจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต
แกมมาโอรีซานอล (γ -oryzanol)	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเหี่ยวเฉา - ปรับระดับคอเลสเตอรอล
กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก (γ -aminobutyric acid : GABA)	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง - เป็นสารสื่อประสาทประเภทสารยับยั้ง รักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้น ช่วยให้สมองเกิดการผ่อนคลายและนอนหลับสบาย - ช่วยกระตุ้นต่อมไทรอยด์ ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโตทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ กล้ามเนื้อเกิดความกระชับ - เกิดสาร lipotropic เป็นสารป้องกันการสะสมไขมัน
อินโนซิทอล (inositol)	<ul style="list-style-type: none"> - เร่งกระบวนการเผาผลาญไขมันป้องกันการสะสมไขมันที่ตับ - ป้องกันผนังหลอดเลือดแดงหนาและแข็งตัว
กรดเฟอร์รูริก (ferulic acid)	<ul style="list-style-type: none"> - ทำลายสาร oxides ที่ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระได้ง่าย - ระวังการสร้างเม็ดเลือดสีของผิว
กรดไฟติก (phytic acid)	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ - ป้องกันโรคทางหัวใจและหลอดเลือด เช่น ความดัน - ป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด
แมกนีเซียม (magnesium)	<ul style="list-style-type: none"> - ป้องกันโรคหัวใจ
โพแทสเซียม (potassium)	<ul style="list-style-type: none"> - ลดระดับความดันเลือด
สังกะสี (zinc)	<ul style="list-style-type: none"> - กระตุ้นการทำงานของระบบสืบพันธุ์ - ป้องกันภาวะเส้นเลือดแดงหนาและแข็งตัวจากการที่ - คอเลสเตอรอลไปเกาะที่ผนังเส้นเลือด

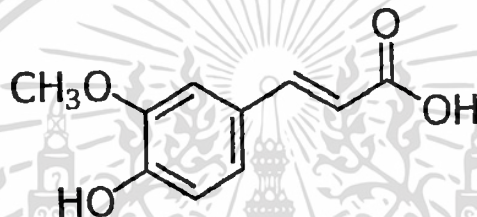
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid)

กรดเฟอร์รูลิก เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทสารประกอบฟีนอล พบในผนังเซลล์โดยจะอยู่ร่วมกับสารประกอบลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ซึ่งช่วยให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรง แหล่งที่พบกรดเฟอร์รูลิกได้แก่ เมล็ด ใบของพืช ธัญพืชต่างๆเช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด และข้าวโอ๊ต เมล็ดกาแฟ ถั่วลิสง ผลไม้เช่น สับปะรด แอปเปิ้ล และส้ม ชนิดต่างๆ

2.2.1 สมบัติทางเคมีของกรดเฟอร์รูลิก

กรดเฟอร์รูลิก มีชื่อ IUPAC คือ E-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-enoic acid มีสูตรเคมีคือ $C_{10}H_{10}O_4$ มีมวลโมเลกุล 194.184 g/mol การละลายของกรดเฟอร์รูลิกสามารถละลายได้ดีในเมทานอล เอทานอล และไดเอทิลพทาเลท แต่ไม่ละลายในเบนซีน มีจุดหลอมเหลวที่ 168-172 °C (Wikipedia, 2011)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของกรดเฟอร์รูลิก

2.2.2 คุณสมบัติที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของกรดเฟอร์รูลิก

ทำให้ต่อมไร้ท่อทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ กระตุ้นฮอร์โมนในการเจริญเติบโต ส่งเสริมการหมุนเวียนโลหิต ลดพลาสมาโคเลสเตอรอล ลดการดูดซับโคเลสเตอรอลในร่างกาย กระตุ้นการขับน้ำดีออกสู่ลำไส้ เพื่อสลายไขมันในลำไส้ได้ดียิ่งขึ้น กำจัดอนุมูลอิสระ (Superoxides) ระวังกระบวนการสร้างเม็ดสีผิว (Melanogenesis) (Kayahara & Tsukahara, 2000) ควบคุมระดับคาร์โบไฮเดรตในร่างกาย มีแนวโน้มควบคุมการผลิตฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Testosterone) อยู่ในระดับสูงอยู่เสมอให้สัมพันธ์กับฮอร์โมนการเจริญเติบโต สามารถชะลอความแก่ (Anti-Aging) เป็นตัวสมานผิวโดยธรรมชาติ (Natural Healer) กระตุ้นตับให้กำจัดสารพิษออกจากร่างกายและควบคุมน้ำตาล มีสาร ID6 ที่สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ลดโอกาสการเป็นโรคไขข้ออักเสบชนิดเริ่มต้น (Early arthrosclerosis) ช่วยในการผลิตเอนโดฟิน ช่วยเสริมสร้างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อเรียบ ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ คุณสมบัติมากมายเหล่านี้จึงเหมาะกับผู้ที่สู่วัยทอง ควบคุมน้ำหนัก ผู้ที่ท้องผูกประจำ

2.3 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (Substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบใน Stationary Phase ของคอลัมน์โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับ Detector จะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ (Analyses or Solutes) ได้อย่างต่อเนื่องสามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis) และเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Analysis) ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (Low Volatile Substation) หรือน้ำหนักโมเลกุลสูง (High Molecular Weight Compounds)

2.3.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ โพลีเมอร์ คูอิแนนทีโอเมอร์ สารประกอบที่เสถียรได้ง่าย สารประกอบที่ระเหยยาก ไอออนขนาดเล็ก ไมโครโมเลกุล ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลว ต้องละลายได้ 100% (กรองด้วย) การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป

การแยกสารที่เป็นของผสมด้วยวิธีโครมาโทกราฟี จะอาศัยอัตราการเคลื่อนที่ของสาร(หรือความสามารถในการกระจายตัวของสาร) ระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสนิ่ง(stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเฟสเคลื่อนที่พาของผสมให้เคลื่อนไปบนเฟสนิ่ง การแยกของผสมอาศัยการดูดซับหรือการกระจายตัวของแต่ละองค์ประกอบในเฟสนิ่งได้แตกต่างกัน เฟสนิ่งอาจเลือกใช้ได้ทั้งของเหลวและของแข็ง และเฟสเคลื่อนที่อาจเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้

หลักการพื้นฐานของเทคนิค ลิกวิดโครมาโทกราฟี คือ การแยกสารละลายผสมออกจากกันภายในคอลัมน์ที่มีลักษณะปิดซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็กที่มีรูพรุนเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 150 ไมครอน สารประกอบแต่ละตัวจะถูกดูดซับและทำให้หลุดออกจากการดูดซับบนอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ผลที่ตามมาคือสารประกอบจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้าลงและอัตราเร็วเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพของสารกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์

เทคนิค Liquid chromatography ที่ใช้ในการแยกสารนั้น สามารถจำแนกได้อย่างกว้างๆ ตามกลไกของการแยกสารโดยอาศัยเฟสเป็นตัวกำหนด

1. Adsorption Chromatography
2. Liquid- Liquid Chromatography
3. Ion Exchange Chromatography
4. Size Exclusion Chromatography

1. Adsorption Chromatography หรือ Liquid-Sold Chromatography (LSC)

หลักการแยกสารนั้นอาศัยการเกิดอันตรกิริยา ที่ต่างกันระหว่างสารกับตำแหน่งซึ่ง active บนผิวของตัวดูดซับที่ใช้เป็นเฟสที่อยู่กับที่ ตัวดูดซับเป็นของแข็งมีขั้ว เช่น ซิลิกา อะลูมินา สามารถเกิดอันตรกิริยากับสารประกอบที่มีฟังก์ชันนัลกรุปที่มีขั้ว (polar functional group) ส่วนของ non-polar ที่อยู่ในโมเลกุลนั้นจะมีอิทธิพลต่อการแยกสารน้อยมาก องค์ประกอบที่สามารถยึดติดกับเฟสนิ่งที่ตำแหน่งว่าง (active site) ได้น้อยกว่า แต่ละลายได้ดีในเฟสเคลื่อนที่ก็จะสามารถถูกแยกออกมาก่อนองค์ประกอบที่ยึดติดกับเฟสนิ่งได้ดี ดังนั้นองค์ประกอบที่มีขั้วสูงจะยึดติดกับเฟสนิ่งได้ดีกว่า องค์ประกอบที่มีขั้วน้อยกว่า ซึ่งมีผลต่อ retention time ของแต่ละองค์ประกอบ จึงมีความเหมาะสมมากสำหรับกาแยกสารประกอบที่มีขั้ว เช่น การแยกสารประกอบพวก alcohol ออกจาก aromatic hydrocarbon

2. Partition Chromatography หรือ Liquid-Liquid Chromatography(LLC)

มีเฟสนิ่งเป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บนอนุภาคของแข็ง และไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลว มีหลักการแยกโดยอาศัยการกระจายตัวหรือการละลายได้ขององค์ประกอบในของผสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสนิ่ง องค์ประกอบที่กระจายตัวได้ดีในเฟสนิ่งจะถูกยับยั้งได้ดีในเฟสนิ่งได้ดีกว่า ถ้าเฟสนิ่งมีขั้วสูงกว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เราเรียกว่า normal phase chromatography องค์ประกอบที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยจะไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระจายตัวได้ดีในเฟสเคลื่อนที่มากกว่า ดังนั้นจึงถูกพาออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าตัวที่มีขั้วสูง แต่ถ้าเฟสหนึ่งมีขั้วสูงกว่าเฟสเคลื่อนที่ เรียกว่า reverse phase chromatography เฟสเคลื่อนที่ได้แก่ น้ำ เมทานอล เป็นต้น

3. Ion exchange chromatography

โครมาโทกราฟีชนิดนี้ใช้แยกไอออน โดยอาศัยหลักการกระจายตัวของไอออนระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสนิ่งที่แลกเปลี่ยนไอออนได้ต่างกัน ขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพของไอออนในสารละลายกับไอออนที่มีประจุตรงกันข้ามซึ่งอยู่ที่ผิวของเฟสที่อยู่กับที่ โดยทั่วไปจะใช้ของแข็งที่มีรูพรุนเป็นเรซินที่ทำจากสไตรีนไดไวนิลเบนซีน ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์แบบโครงข่าย ที่มีหมู่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้เกาะอยู่บนเรซิน ไอออนบวกจะถูกแยกด้วยเรซินที่ใช้แลกเปลี่ยนไอออนบวก และไอออนลบก็ถูกแยกด้วยเรซินที่แลกเปลี่ยนไอออนลบ เฟสเคลื่อนที่ปกติแล้วจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย counter ion ที่มีประจุตรงข้ามกับ group ที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่บรรจุอยู่คือ ไอออนในเฟสเคลื่อนที่ที่มีประจุเหมือนกับไอออนที่ต้องการแยก ซึ่งทำให้ประจุทั้งหมดอยู่ในสภาวะสมดุล การแข่งขันกันระหว่างไอออนในสารละลายกับ counter ion เพื่อเข้าครอบครองตำแหน่งที่มีประจุบนผิวของเรซินจะมีผลทำให้เกิดการยึดเกาะขึ้น ion-exchange chromatography ไอออนที่มีขนาดและประจุที่ต่างกันจะถูกแยกออกจากคอลัมน์ในเวลาที่แตกต่างกัน

4. Size Exclusion Chromatography

แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ Gel Permeation Chromatography (GPC) และ Gel Filtration Chromatography (GFC) เฟสอยู่กับที่ควรมีความเฉื่อยทางเคมี กลไกการแยกสารโดย size exclusion chromatography นั้นจะเกี่ยวข้องกับสารที่จะถูกเลือกให้แพร่ผ่านรูพรุนของ packings ที่มีลักษณะเป็น network 3 มิติ และ packings นี้อาจเป็น gel หรือของแข็งที่มีรูพรุนซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ การที่สารจะถูกยึดเหนี่ยวให้อยู่ในคอลัมน์นานหรือไม่ขึ้นขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล เมื่อเทียบกับขนาดของรูของอนุภาคที่ถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ โมเลกุลเล็กสามารถที่จะแพร่ผ่านเข้าไปในรูที่เล็ก โมเลกุลใหญ่ที่มีขนาดกึ่งกลางไม่ใหญ่มากนักจะแพร่ผ่านได้เฉพาะบางส่วนของรูที่อยู่ในอนุภาคเท่านั้น และจะถูกกีดกันจากรูที่เล็กมากๆ สำหรับโมเลกุลใหญ่มากจะถูกกีดกันออกไป และไม่สามารถแพร่เข้าไปในรูได้ ดังนั้นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะเดินทางเร็วมาก และจะออกมาคอลัมน์เป็นพวกแรก ดังนั้น size exclusion chromatography จะมีประโยชน์มากสำหรับแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น polymer และ biopolymer ออกจากโมเลกุลเล็กๆ

สำหรับ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) มีความแตกต่างจาก Liquid Chromatography (LC) เนื่องจากว่าเทคนิค (LC) นั้นอนุภาคที่ใช้มันจะมีรูพรุนขนาดใหญ่โดยทั่วไปแล้วค่า $dp = 100-250 \mu m$ ซึ่งบรรจุในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-5 เซนติเมตร ความดันที่ต้องการทำให้ตัวทำละลายไหลผ่านระหว่างอนุภาคน้อยมาก โดยปกติภาชนะที่ใส่ตัวทำละลายที่ต่อเข้ากับคอลัมน์จะทำหน้าที่เป็นแหล่งที่ทำให้ความดันคงที่ โดยภาชนะที่ใส่ตัวทำละลายอยู่เหนือผิวของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์เล็กน้อย ความดันจะลดลงอยู่ในช่วง 0.1-1 บรรยากาศ อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่จะช้ามาก ซึ่งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จะช้ามาก อาจมีค่า 0.1 มิลลิลิตรต่อนาทีหรือน้อยกว่านี้ ทำให้ต้องมีการใช้ปั๊มในการช่วยทำให้ความดันนั้นเพิ่มมากขึ้นถือเป็นจุดเริ่มต้นของ (HPLC) เนื่องจากจะใช้ high pressure pump ที่ให้ pressure drop ประมาณ 300 บรรยากาศ ทำให้อัตราการไหลสูงประมาณ 0.5-5 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้การแยกของผสมด้วยเทคนิคนี้กระทำได้รวดเร็ว และยังมีการเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์จะทำได้โดยการลดขนาดของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ ซึ่งในระยะแรกๆของการพัฒนาคอลัมน์โครมาโทกราฟีไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาโทกราฟี วัสดุที่ใช้บรรจุในคอลัมน์มีขนาดของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์มีขนาดของอนุภาคในช่วง 30-75 μm การบรรจุลงในคอลัมน์ที่แคบ ผลทำให้เกิด back pressure สูงมากกว่า classical LC column การใช้ high pressure pump จึงจำเป็นมาก การลดอนุภาคให้ต่ำกว่า 30 ไมโครเมตร ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ในการแยกสารเพิ่มมากขึ้นด้วย ประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นเป็น 10 -100 เท่า เมื่อเทียบกับ classical LC และเวลาที่ใช้ในการแยกจะสั้นลง นอกจากนี้เทคนิค HPLC ยังเป็นเทคนิคที่เกื้อกูลเทคนิค GC คือสารที่ไม่สามารถระเหยกลายเป็นไอได้ หรือสารที่เกิดการสลายตัวเมื่อได้รับความร้อนที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค GC ก็สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ได้

2.3.2 ทฤษฎีการแยก (Separation Theory)

2.3.2.1 Retention

ในการแยกสารจะประสบผลสำเร็จได้ก็ต่อเมื่ออัตราการเคลื่อนที่ภายในคอลัมน์ของสารที่ต้องการแยกแตกต่างกัน และใช้เวลาพอสมควร ค่า capacity factor (k_C) เป็นค่าที่นำมาใช้ และสามารถหาได้โดยตรวจจากโครมาโทแกรมดังนี้

$$k_C = (t_r - t_o) / t_o$$

เมื่อ

t_r = peak retention time

t_o = เวลาที่โมเลกุลของตัวทำละลายที่ฉีดเข้าไปหรือเป็นสารที่ไม่ถูกยึดเกาะเดินทางผ่าน

ไปในคอลัมน์

2.3.2.2 ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Column Efficiency)

ประสิทธิภาพของคอลัมน์พิจารณาจากอัตราการขยายตัวของแถบที่กว้างขึ้น โดยโมเลกุลทุกตัวจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วต่างกัน k_C - value คือ ค่าจุดกึ่งกลางของแถบของสารแต่ละชนิดซึ่งหมายถึงอัตราเร็วโดยเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลนั้น ประสิทธิภาพของคอลัมน์คือจำนวน theoretical plate (N) หาได้จากโครมาโทแกรมดังนี้

$$N = 16 (t_r / W)^2$$

$$= 5.54 (t_r / W_{1/2})^2$$

เมื่อ

W = ความกว้างของฐานพีค

$W_{1/2}$ = ความกว้างของพีคที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

ค่า N ยิ่งมีค่ามากประสิทธิภาพในการแยกยิ่งสูง หรือจะใช้พารามิเตอร์อีกตัวคือ height equivalent to a theoretical plates (HETP) แทนด้วย H ดังนี้

$$H = L / N$$

เมื่อ

L = ความยาวของคอลัมน์

ค่า H ยิ่งต่ำประสิทธิภาพการแยกยิ่งสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.3 การแยกและเวลาใช้แยก (Resolution and Separation Time)

ในการแยกสารละลายผสมได้นั้น ควรจะต้องสามารถวัดในเชิงปริมาณของการแยกให้ได้ หรือที่ว่าการแยก (resolution) จะต้องประสบผลสำเร็จนั่นเอง นิยามการแยก (R_s) แถบ 2 แถบที่อยู่ใกล้กัน คือ ระยะห่างกันของแถบทั้งสองหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของแถบทั้งสอง

$$R_s = (t_2 - t_1) / (1/2)(W_1 + W_2)$$

เมื่อ

t_1 และ t_2 คือ t_r ของแถบ 1 และ 2 ตามลำดับ

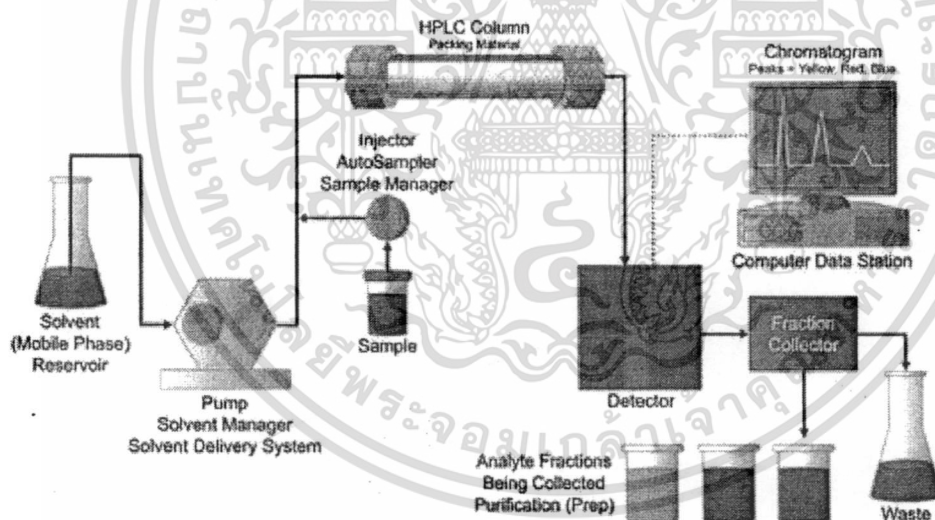
W_1 และ W_2 คือ ความกว้างของแถบ 1 และ 2 ตามลำดับ

ถ้า $R_s = 1$ หมายความว่าแถบทั้งสองแยกออกจากกันประมาณ 98% เหลืออีก 2% นั้นเป็นส่วนที่แถบทั้งสองทับกัน ค่า R_s ยิ่งมีค่ามากเท่าใด แสดงถึงการแยกยิ่งดีขึ้นเท่านั้น

2.3.2.4 ความจุสารของเฟสคงที่ (Sample Capacity)

ความจุของสารตัวอย่างในเฟสคงที่มีความสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของสารตัวอย่างที่ถูกดูดซับไว้บนเฟสคงที่ก่อนที่จะเกิดการ overload การใช้ปริมาณสารมากเกินไปกว่าความจุสารจะทำให้เกิดรูปร่างพีคไม่สมมาตร เกิดการเปลี่ยนแปลง retention time และทำให้การแยกไม่ดี

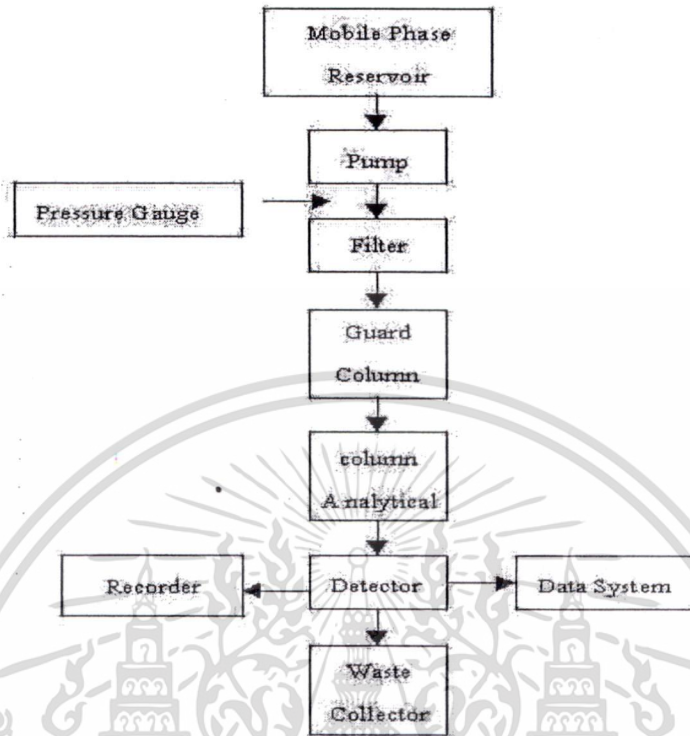
2.3.3 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC (HPLC-System)



รูปที่ 2.5 แสดงแผนภาพส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบที่สำคัญและหน้าที่



รูปที่ 2.6 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

2.3.3.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase Reservoir)

เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในทางวิเคราะห์ขวดนี้ควรมีความจุประมาณ 1 ลิตร แต่ใน preparative HPLC ความจุของขวดควรมากกว่านี้ ในปัจจุบันขวดที่ใช้เฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น ก๊าซออกซิเจน จุดประสงค์ของการไล่อากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่คือต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ และยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหาขณะทำการทดลองอยู่ การไล่อากาศที่ละลายอยู่จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว (polar solvents) แต่บางบริษัทที่ผลิตเครื่อง HPLC สามารถใช้ระบบที่ไม่ต้องไล่อากาศก่อนได้ Mobile Phase แบ่งเป็น 2 ระบบ

- Isocratic elution เป็นระบบที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่คงที่ตลอด ใช้ในกรณีที่สารสามารถแยกออกจากกันได้ดีอยู่แล้ว
- Gradient elution เป็นระบบที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ไม่คงที่ มีการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนเพื่อให้สารที่ต้องการแยกออกจากกันได้ดีขึ้น

120409

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.2 ระบบปั๊ม (Pumping System)

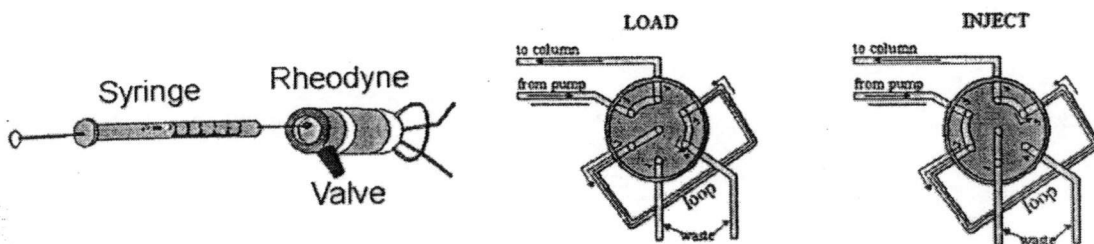
ระบบปั๊มในเครื่อง HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลจะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็ก ๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงต้องมีความดันสูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป หลักการเลือก pumping system เพื่อใช้กับ HPLC ควรมีสมบัติต่อไปนี้

1. ปั๊มและส่วนประกอบควรจะต้องทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ รวมทั้งท่อ fittings และ flow cells ด้วย เช่น ทำด้วยเหล็กไร้สนิมคุณภาพสูง inert polymers เช่น polytetrafluoroethylene (PTFE)
2. ควรจะสามารถปั๊มเฟสเคลื่อนที่ที่มีปริมาณมาก ๆ ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีกรขัดข้อง
3. สามารถให้ความดันได้ถึง 4,000-6,000 psi เพื่อปั๊มให้เฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านคอลัมน์ขนาดเล็กขนาดยาว 30 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้
4. ให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงถึง 3 มิลลิลิตร/นาที เป็นอย่างน้อยและคงที่
5. ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ต้องไม่เกิน 1-2 %
6. ควรจะมีปริมาตรภายในต่ำเพื่อความสะอาดและรวดเร็วในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่
7. ต้องไม่มีพัลส์ (pulse) หรือมีตัวใช้ลด pulse หรือไม่ทำให้เกิด detector noise

2.3.3.3 ระบบการฉีดสารตัวอย่าง (injector)

เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ควบคุมปริมาตรของสารตัวอย่างที่ไหลเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 0.5-10 ไมโครลิตร สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ชนิดไซริงก์ เป็นชนิดที่ใช้ไซริงก์ขนาดเล็กดูดสารตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการฉีด ผ่านเยื่อกั้น (septum) ซึ่งมักเป็นยางซิลิโคนอยู่บนคอลัมน์ ตัวฉีดชนิดนี้อาจมีการรั่วบริเวณรูที่ฉีดเพราะคอลัมน์มีความดันสูง
2. ชนิดโรตารี (rotary type) เป็นชนิดที่ใช้ลิ้นควบคุมการฉีดตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์โดยในขั้นตอนแรกจะใช้ ไซริงก์ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่าง (sample loop) ซึ่งมีปริมาตรคงที่ (fixed loop injector) หลังจากนั้นจึงหมุนลิ้นให้เฟสเคลื่อนที่ไล่ของเหลวทั้งหมดเข้าสู่คอลัมน์ นอกจากนี้ยังสามารถดูดสารตัวอย่างเข้าไปในปริมาตรที่ต้องการฉีดเข้าไปพักสารตัวอย่างที่มีเฟสเคลื่อนที่อยู่มาก่อนแล้วบางส่วน เมื่อหมุนลิ้นไปที่ตำแหน่งฉีดเฟสเคลื่อนที่ที่พาสารตัวอย่างทั้งหมดเข้าไปในคอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 ระบบการฉีดสารตัวอย่างชนิด rotary

ข้อควรระวังในระบบการฉีดสารตัวอย่าง

1. ระบบการฉีดสารตัวอย่างมีทั้งแบบที่เป็น manual และแบบ automatic ซึ่งอาจเกิดปัญหาอุดตันได้ โดยหากเป็นแบบ manual จะต้องใช้เข็มให้ถูกต้องซึ่งเป็นเข็มที่ไม่มีปลายแหลม ส่วนแบบ automatic นั้นจะมีระบบล้างเข็มและฉีดสารตัวอย่างในตัว จึงต้องเลือกสารละลายสำหรับล้างเข็มให้เหมาะสมกับการใช้งาน หลังใช้งานต้องล้างเข็มด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล ทุกครั้ง

2. ในการฉีดแบบ manual ต้องเลือกใช้ sample loop ให้เหมาะกับปริมาณที่ฉีด และควรฉีดสารให้เต็ม loop

3. ตัวอย่างที่จะฉีดต้องผ่านการกรองทุกครั้ง โดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 หรือ 0.45 ไมครอน ซึ่งจะช่วยกำจัดอนุภาคปนเปื้อนและป้องกันการอุดตันเพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์

2.3.3.4 คอลัมน์ (column)

อาจทำจากแก้ว พลาสติก หรือเหล็กกล้าไร้สนิม มีความยาวการใช้งานตั้งแต่ 10-150 เซนติเมตร กรณีที่มีความยาวเกินอาจขดคอลัมน์เป็นวง แต่จะพบว่าประสิทธิภาพในการแยกสารลดลง คอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1 มิลลิเมตรจนถึงหลายมิลลิเมตร สามารถทนแรงดันได้ถึง 6,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง

เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) สารที่นำมาทำเป็นเฟสอยู่กับที่มักมีขนาด 5-10 ไมครอน แต่เนื่องจากเฟสอยู่กับที่ แต่ละชนิดมีพื้นที่ผิว ขนาดรูและสภาพขั้วที่ต่างกันจึงจำเป็นต้องเลือกให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างแต่ละประเภท เฟสอยู่กับที่ ที่นิยมใช้ ได้แก่ silica gel, alumina และ celite (diatomaceous earth) แต่อาจพบเฟสอยู่กับที่ อีกชนิดหนึ่งคือ ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดแก้วขนาดประมาณ 40 ไมครอนเคลือบด้วย pellicular partical หรือซิลิกาให้มีความหนาประมาณ 1-3 ไมครอน หรือเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ได้เร็วแต่มีความจุของเฟสอยู่กับที่ต่ำ

ข้อควรระวังในการใช้คอลัมน์

1. ต้องทราบคุณสมบัติของวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์ และข้อห้ามในการใช้งานต่างๆ เช่น ห้ามใช้กับเฟสเคลื่อนที่ใดบ้าง มีช่วง pH การใช้งานเท่าไร มีการกำจัดความดันใช้งานเท่าใด ซึ่งทราบได้จากคู่มือการใช้งานของคอลัมน์แต่ละชนิด หรือจากบริษัทผู้ผลิต

2. ในการปรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ต้องค่อยๆลดหรือเพิ่ม เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ โดยทั่วไปจะลดหรือเพิ่มครั้งละ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เก็บรักษาคอลัมน์ในสถานะที่ไม่มีมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมาก ไม่ถูกแสงแดดโดยตรง และป้องกันไม่ให้กระทบกระเทือน

4. คอลัมน์แต่ละชนิดจะเก็บในเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมกับคอลัมน์ชนิดนั้น ตัวอย่างเช่น คอลัมน์ชนิด reverse phase เช่น คอลัมน์ ODS หรือ C₁₈ เก็บในเมทานอลหรืออะซิโตนไทล์

5. ในการฉีดสารต้องคำนึงถึงความสามารถในการรองรับสารของคอลัมน์ เพื่อป้องกันการเกิด column overloading

6. ในการใช้คอลัมน์เพื่อการแยกจะต้องใช้ guard column ทุกครั้งเพื่อใช้ป้องกันการเกิดการอุดตันและช่วยยืดอายุการใช้งานคอลัมน์

2.3.3.5 เครื่องตรวจวัด (Detector)

เครื่องตรวจวัดใน LC สมัยใหม่ ต้องมีความไวของเครื่องตรวจวัดซึ่งสามารถทำการตรวจวัดสิ่งที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น Detector แบบอุดมคติใน LC ควรมีสมบัติดังนี้

- มีความไวสูง และให้สัญญาณตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้
- ให้สัญญาณตอบรับ (response) ได้กับสารทุกชนิด
- ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่
- เชื้อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน
- ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัด ควรมีสภาพเชิงเส้น

(linearity) ในช่วงกว้าง

- ไม่ทำลายสารตัวอย่าง
 - ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับ peak ที่ต้องการตรวจสอบ
- พารามิเตอร์ที่สำคัญของเครื่องที่จะนำมาใช้ในการพิจารณา

1. สัญญาณรบกวน (noise) ของเครื่องตรวจวัดซึ่งควรจะทราบ สัญญาณรบกวนนี้อาจจะมาจากอุปกรณ์ไฟฟ้า (instrument electronics) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ การเพิ่มขึ้นลงของ line voltage การเปลี่ยนแปลงสัญญาณจากเครื่องตรวจวัด การเปลี่ยนแปลงของการไหล pulse จาก pump เป็นต้น

2. Detection Limit คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวถูกละลายที่ควรจะตรวจวัดได้ แต่โดยทั่วไปทางโครมาโทกราฟีนิยมใช้ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (minimum detectable quantity, MDQ) ก็คือความเข้มข้นต่ำสุดของตัวถูกละลายที่ทำให้พีคมีความสูงเป็น 2 เท่าของ noise

3. การเบี่ยงเบนของเครื่องตรวจวัด (Detector drift) จะเป็นการเคลื่อนที่ของ base line ขึ้นหรือลง เนื่องจากสัญญาณรบกวนจากคลื่นความถี่สูง (high frequency noise) จะปรากฏเป็นฟอย (frizz) พบส่วนของ base line และ short term noise

4. Absolute Sensitivity ของเครื่องตรวจวัด คือการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ทางกายภาพ เพื่อต้องการทำให้ปากกาของเครื่องบันทึกผลเกิดการหักเห (deflection) เต็มสเกลที่ความถี่สูงสุดโดยกำหนดให้ noise มีค่าหนึ่ง

เครื่อง Detector ที่นิยมใช้ในเครื่อง HPLC ทั่วไปมีดังนี้

1. ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-VIS Detectors)

หลักการทางานอาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง เป็นที่นิยมมากใน HPLC เพราะมีลักษณะพิเศษ คือไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลของอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างจะมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่

2. เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์ (Differential Refractometers)

เป็นที่ได้รับความนิยมรองลงมาจาก ยูวี ดีเทคเตอร์ เนื่องจากดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดอยู่ในแบบ bulk property หรือ general detector ดังนั้นมันจึงให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมดตราบที่ตัวถูกละลายมีค่าดัชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่

2.3.3.5 เครื่องบันทึกผล (data system)

ใช้สำหรับแสดงตำแหน่งของสารที่ออกมาจากคอลัมน์เพื่อประโยชน์ในการจำแนกชนิดของสารหรือคำนวณหาปริมาณสาร ซึ่งสามารถคำนวณได้จากความสูงของยอดพีก (peak high) หรือพื้นที่ใต้พีก (peak area) โดยกราฟที่มีลักษณะสมมาตรควรคำนวณค่าจากความสูง แต่ถ้ากราฟเบ้ ควรคำนวณจากพื้นที่ใต้พีก

2.3.4 เทคนิคการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สารละลายมาตรฐาน ใช้สำหรับเป็นตัวเปรียบเทียบหาปริมาณในสารตัวอย่าง สารละลายมาตรฐาน อาจใช้งานใน 2 ลักษณะ คือ

1. สารมาตรฐานภายนอก (external standard)

นิยมใช้สารบริสุทธิ์ชนิดเดียวกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์จะทำให้สามารถหาปริมาณของสารตัวอย่างได้จากการอ่านกราฟมาตรฐาน หรือใช้วิธีคำนวณเปรียบเทียบหาปริมาณของสารจากความสูงของกราฟ หรือพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งอาจจะอ่านค่าได้คลาดเคลื่อนไปจากความจริง ถ้าสภาพของคอลัมน์ หรือเครื่องมือ ในขณะที่ทำการกราฟมาตรฐานและการวิเคราะห์สารตัวอย่างแตกต่างกันมาก

2. สารมาตรฐานภายใน (internal standard)

เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายสารที่ต้องการวิเคราะห์ ใช้เติมลงในสารมาตรฐานภายนอกและสารตัวอย่างในปริมาณคงที่ ก่อนทำการวิเคราะห์ ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์ จะปรากฏเป็นกราฟอ้างอิงในตำแหน่งที่คงที่ในเครื่องบันทึกผล ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการตรวจสอบหาความผิดปกติของเครื่องมือ โดยการเปลี่ยนแปลงตำแหน่ง หรือเวลาหน่วง (retention time) ของสารมาตรฐานภายใน นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน Y เป็นสัดส่วนระหว่างความสูงของกราฟของสารมาตรฐานภายนอกและความสูงของกราฟของสารมาตรฐานภายใน ส่วนแกน X เป็นค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แล้วจึงนำอัตราส่วนระหว่างความสูงของกราฟของสารตัวอย่างและความสูงของสารมาตรฐานภายในมาอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟดังกล่าว วิธีนี้มีข้อดีตรงที่สามารถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้ถูกต้อง ถึงแม้ว่าเครื่องมือจะมีความผิดปกติในการวิเคราะห์บ้าง เพราะเป็นการหาค่าที่เทียบสัดส่วนกับสารมาตรฐานภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เรารู้จักสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอยู่ในพืชและสมุนไพรหลายชนิดและทำให้นักวิทยาศาสตร์สนใจสารต้านอนุมูลอิสระจะส่งผลดีต่อสุขภาพ Proestos, Sereli & Komaitis (2006) ได้ทำการทดลองโดยนำพืช 5 ชนิด คือ *Vitex agnus-castus* (Verbenaceae) *Origanum dictamnus* (Lamiaceae) *Teucrium polium* (Lamiaceae) *Lavandula vera* (Lamiaceae) และ *Lippia triphylla* (Verbenaceae) ซึ่งทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกที่ผสมกันโดยใช้ HPLC แบบ reverse phase เพื่อวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก และใช้ GC-MS วิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของสารประกอบฟีนอลิก หลังจากทำปฏิกิริยา silylation เราใช้ GC-MS เพื่อทำการแปรสภาพสารให้สามารถระเหยได้และทนความร้อนได้โดยการทำอนุพันธ์ ในการทำอนุพันธ์จะทำให้สารทนต่อ reagent อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยา จะมีสาร N,O-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide จำนวนมากซึ่งประกอบด้วย trimethylchlorosilane เป็น reagent ที่ทำให้เป็นสารอนุพันธ์ของ trimethylsilyl ที่ระเหยได้ การตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่เป็นกรดคาเฟอิก (มีปริมาณ 0.12-0.93 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม) กรดเฟอร์รูติก (มีปริมาณ 0.34-1.52 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม) และ (+) - catechin (มีปริมาณ 0.22-0.43 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม)

Kim, Tsao, Yang & Cui (2006) ศึกษาข้าวแต่ละประเภทเพื่อทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอล โดยใช้ HPLC โดยนำมาสกัดเพื่อหาสารประกอบฟีนอลในแบบต่างๆและเปรียบเทียบกับการทำไฮโดรไลซิสซึ่งในขั้นตอนนี้ในช่วงสุดท้ายได้ทำการสกัดด้วยเอธิลอีเทอร์ เมื่อนำแต่ละส่วนที่มีการเตรียมแต่ละวิธีมาเทียบผลเพื่อดูปริมาณสารประกอบฟีนอล พบว่าเมื่อนำชิ้นล่างของวิธีการทำไฮโดรไลซิสที่สกัดด้วยเอธิลอีเทอร์ มีกรดเฟอร์รูติกมากที่สุดทั้งในข้าวแดงและข้าวขาว

Romeu-Nadal, Morera-Pons, Castellote & Lopez-Sabater (2006) วิเคราะห์โดยวิธีตรงที่รวดเร็ว (วิธีที่ 1 การสกัดด้วยเฮกเซน) สำหรับตรวจวัดแกมมา-โทโคฟีรอล และอัลฟา-โทโคฟีรอลในน้ำมันมนุษย์ได้รับการพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยใช้ RP-HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ตัวอย่างน้ำมันมนุษย์จะถูกละลายด้วยเฮกเซนร่วมกับและอัลฟา-โทโคฟีรอลอะซีเตตเป็น internal standard ระบบโครมาโทกราฟีประกอบด้วย คอลัมน์ขนาดสั้น (50 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.1 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 3 ไมครอน) สามารถแยกแกมมา-โทโคฟีรอล และอัลฟา-โทโคฟีรอลในเวลาต่ำกว่า 6 นาที การวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ 1 นำมาเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ วิธีที่ 2 (ปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันร่วมกับการตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิล) มีค่าการวิเคราะห์คืนกลับของแกมมา-โทโคฟีรอลและอัลฟา-โทโคฟีรอล ลดลง 24 % และ 22 % ตามลำดับ วิธีที่ 3 (ปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันร่วมกับการตรวจวัดปริมาณสารโดยวัดการกระเจิงแสงของสาร) มีค่าการวิเคราะห์คืนกลับของแกมมา-โทโคฟีรอลและอัลฟา-โทโคฟีรอล ใกล้เคียงกับวิธีที่ 2 ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในวิธีที่ 3 สูงกว่าปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในวิธีที่ 2 นอกจากนี้วิธีที่ 1 ใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อยกว่าจึงวิเคราะห์ได้ง่ายและรวดเร็วกว่าวิธีที่ 2 และ 3 ดังนั้นการใช้ตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยมีความเหมาะสมสำหรับกรวิเคราะห์ทางชีววิทยา

Zigoneanu, Williams, Xu & Sabliov (2008) การวิเคราะห์สารประกอบโทโคฟีรอลและโทโคไตรอินอลในน้ำมันรำข้าวที่ใช้ไมโครเวฟช่วยสกัด โดยใช้ไอโซโพรพานอลและเฮกเซนเป็นตัวสกัดใช้อัตราส่วนตัวทำละลายต่อรำข้าวเป็น 3 : 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก การทดลองทำ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 60 80 100 และ 120 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้เวลาสกัด 15 นาที ต่อตัวอย่างองค์ประกอบของสารถูกแยกด้วยเทคนิค normal phase HPLC ตัวตรวจวัดเป็น fluorescence การเพิ่มขึ้นของวิตามินอีที่อุณหภูมิ 40 ถึง 120 องศาเซลเซียส ในการใช้ไอโซโพรพานอลเป็น 39.63 % และเฮกเซนเป็น 342.01 % ซึ่งไอโซ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพรพานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับการสกัด γ -tocopherol และ γ -tocotrienol เมื่อเปรียบเทียบกับเฮกเซนที่ใช้ไมโครเวฟช่วยสกัดและวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายไอโซโพรพานอลดีกว่าในเรื่องของการได้ oil yield ที่อุดมภูมิสูง

นฤมล (2004) ได้ทำการศึกษา รำข้าวเป็นแหล่งธรรมชาติที่สำคัญของสารแกมมา โอรีซานอล ซึ่งคือส่วนผสมทั้ง 10 ตัวอย่างของ ferulate ester of triterpene alcohol สารประกอบ แกมมา โอรีซานอล น่าจะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพราะภายในโครงสร้างประกอบด้วยกรดเฟอร์รูลิก ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันที่รุนแรง เพราะฉะนั้นจึงน่าจะนำสารประกอบโอรีซานอลมาใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ น้ำมันรำข้าวดิบนำมาสกัดโดยวิธีใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ที่ไม่เข้ากันทำการแยกสกัดแยกเอาเฉพาะส่วนที่ต้องการ โดยตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่เมทานอลและเฮกเซนได้ปริมาณสารสกัดน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10.9 เมื่อเทียบกับน้ำมันรำข้าวดิบ

ผดุงขวัญ, อรุณี, บุญมี, ชิดชนก และบังอร (2547) ได้ทำการศึกษา การพัฒนาเม็ดรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 (RBT) เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการต้านออกซิเดชันและปริมาณแกมมา โอรีซานอล ในสภาวะที่เก็บรักษา RBT ที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเม็ดละ 468.2 มิลลิกรัม มีการแตกตัวในเวลา 13.6 นาที และมีความร้อน 0.13 % เมื่อนำไปสกัดและทดสอบการต้านออกซิเดชันด้วย 2,2 -diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) ให้ค่า EC 50 เทียบเป็นรำข้าว 18.66 มิลลิกรัม ซึ่งเทียบเท่าวิตามินซี 0.01 มิลลิกรัมหรือวิตามินอี 0.03 มิลลิกรัม การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย HPLC ทำให้การแยกสารหลักที่สำคัญในกลุ่มแกมมา โอรีซานอล คือ cycloartanyl ferulate และ 2,4 -methylenecycloartanyl ferulate ซึ่งมีค่าตั้งต้น 1.03 และ 2.14 มิลลิกรัมต่อกรัมของ RBT

กษมา และกัญทิมา (2544) ได้ทำการศึกษา การพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากน้ำมันรำข้าว เริ่มจากการสกัดรำข้าวโดยใช้ Hexane และ Isopropanol ในอัตราส่วน 1 :1 สกัดได้ %yield เท่ากับ 27.2% เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับน้ำมันรำข้าว (F&C grade) ที่ได้จากบริษัท ซีพี และสารมาตรฐานแกมมา โอรีซานอล และวิตามินอี ด้วยวิธี TLC โดยใช้ตัวทำละลาย คือ Toluene : Ethyl acetate (9 :1) พบว่าน้ำมันรำข้าวที่ได้จากการสกัดเองลักษณะ Chromatogram คล้ายน้ำมันรำข้าว(F&C grade) ที่ได้จากบริษัท ซีพี แต่มีปริมาณแกมมา โอรีซานอลมากกว่าและเมื่อตรวจสอบโดยวิธี HPLC ก็ได้ผลยืนยันการตรวจสอบเช่นเดียวกับวิธี TLC

Buranov & Mazza (2009) ได้ทำการศึกษาเฟอร์รูลิก และvanillin จากป่าน เมล็ดธัญพืช แกลบ และซังข้าวโพด สำเร็จและนำไปใช้ในการสกัด ได้สองขั้นตอน โดยปราศจากแรงดัน โดยใช้ alkaline ด้วยการทำไฮโดรไลซิส (0.5 M NaOH) และความดันของสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ น้ำ เอทานอล และแอมโมเนีย ซึ่งปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีความแตกต่าง การสกัดโดยปราศจากแรงดัน และใช้แรงดัน 0.5 บาร์ เซ็นต์ของสารละลาย ที่ได้ส่วนมากมีกรดเฟอร์รูลิก และจำนวนของvanillin เล็กน้อย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

1.1 สารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid)

1.2 ตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง

1.2.1 ข้าวกล้องงอก ดอกมะลิ 105 (Jasmine Germinated Brown Rice) บริษัททริฟเป็ลทู มาร์เก็ตติ้ง จำกัด วันที่ผลิต 18-01-2010

1.2.2 ข้าวกล้องงอก หอมมะลิแดง (Red Jasmine Germinated Brown Rice) บริษัททริฟเป็ลทู มาร์เก็ตติ้ง จำกัด วันที่ผลิต 20-03-2010

1.2.3 ข้าวกล้องงอก เสาไห้ (Germinated Brown Rice) บริษัทเจียมแม้งมาร์เก็ตติ้ง จำกัด วันที่ผลิต 16-10-2010

1.2.4 ข้าวกล้องดอกมะลิ 105 (Jasmine Brown Rice) บริษัทนครหลวงค้าข้าว จำกัด

1.2.5 ข้าวกล้องหอมมะลิแดง (Red Jasmine Brown Rice) บริษัทชัยทิพย์ จำกัด

1.2.6 ข้าวกล้องเสาไห้ (Brown Rice) ตามร้านจำหน่ายในตลาด

1.3 น้ำปราศจากไอออน

1.4 กรดแอซติก (Acetic acid, CH_3COOH) เกรด AR

1.5 อะซิโตนไนไทรล์ (Acetonitril, CH_3CN) เกรด HPLC

1.6 เฮกเซน (Hexane, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) เกรด AR

1.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) เข้มข้น 2 mol/L

1.8 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) เข้มข้น 6 mol/L

1.9 เมทานอล (Methanol, CH_3OH) เกรด AR

1.10 เอทิล แอซิเตท (Ethyl acetate)

3.1.2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC ของบริษัท Waters

2. ปุ่มของระบบลิควิดโครมาโทกราฟี (รุ่น Waters 515) ของบริษัท Waters

3. คอลัมน์ HiQSil C18 HS ขนาด 4.6 x 150 mm ของบริษัท KYA TECH Corporation

4. Guard column Nova-Pack C18 ของบริษัท Millipore

5. ชุดกรองแบบลดความดัน

6. เครื่องไล่ฟองอากาศ (ultrasonic bath)

7. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดชนิดนิยม 4 ตำแหน่ง

8. เครื่องวัด pH

9. แท่งแม่เหล็ก

10. กรวยสกัด (Separatory funnel)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1.1 การเตรียมสต็อกสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติก 100 mg/L

ชั่งกรดเพอร์รูติก 0.01 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายในเมทานอลเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตรเก็บในภาชนะที่บ่งแสงไว้ในตู้เย็น

3.2.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติก 10, 20, 30, 40 และ 50 mg/L

ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติก 100 mg/L มา 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตรเก็บในภาชนะที่บ่งแสงไว้ในตู้เย็น

3.2.2 การสกัดกรดเพอร์รูติกจากตัวอย่างข้าวกล้องงอก

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของข้าวกล้องงอกประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ นำไปปั่นจนด้วยสารละลายเฮกเซน-ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นาน 2 ชั่วโมง กรองสารละลายออก นำข้าวมาเติมสารละลายไฮโดรเจนไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 mol/L ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปั่นจนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำส่วนที่ได้ปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 mol/L นำมาสกัดด้วยเอทิล แอซิเตท ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ซ้ำ 3 ครั้ง เก็บส่วนบนที่สกัดได้มาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน เมื่อตัวทำละลายที่ใช้สกัดระเหยหมดนำมาละลายด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Nylon ขนาด 0.45 μm ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตัดแปลงจากวิธี Ohtsubo, Suzuki, Yasui & Kasumi, 2005)

3.2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติก ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์

เตรียมสารละลายอะซิโทไนไตรล์และสารละลายกรดแอสติกเข้มข้น 2% ที่อัตราส่วน 10 : 90 และ 15 : 85 และ 20 : 80 ปริมาตรโดยปริมาตร เพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ แล้วนำสารละลายที่เตรียมได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นนำไปใส่ภาชนะที่ละลายอยู่ด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนที่อาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ จึงจะนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติกโดยใช้ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

3.2.3.1 ศึกษาหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

ทดสอบหาสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายอะซิโทไนไตรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% ที่อัตราส่วน 10 : 90 และ 15 : 85 และ 20 : 80 ปริมาตรโดยปริมาตร ด้วยคอลัมน์ C-18 5.0 ไมโครเมตร 4.6 x 150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

3.2.3.2 ศึกษาหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

นำสารละลายอะซิโทไนไตรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% ที่ได้จากการทดสอบขั้นต้นข้อ 3.2.3.1 มาทดสอบหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยทดสอบอัตราการไหลที่ 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร จากนั้นเลือกสภาวะที่ทำให้การแยกที่ดีที่สุดมาใช้ในการวิเคราะห์กรดเพอร์รูติก ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 ประเมินผลทดสอบทางความใช้ได้ของวิธี

3.2.4.1 การทำกราฟมาตรฐาน

ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติกที่ความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้คือ ช่วง 10-50 mg/L ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเข้าสู่ระบบ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไทรล์ : สารละลายกรดแอซิติคเข้มข้น 2% ทำการตรวจวัดที่สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.2.3 ซึ่งตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของกรดเพอร์รูติก ดูช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟ หาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) และขีดจำกัดการตรวจวัดของกรดเพอร์รูติกจากกราฟมาตรฐาน

3.2.4.2 การศึกษาความเที่ยง (Precision)

การนำสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติกที่ความเข้มข้น 100 mg/L นำมาตรวจวัดซ้ำ 6 ครั้ง ในช่วงเวลาต่างกัน ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไทรล์ : สารละลายกรดแอซิติคเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร แล้วคำนวณหา % Relative Standard Deviation (% RSD)

3.2.4.3 การศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาโดยการตรวจวัดปริมาณกรดเพอร์รูติกด้วยวิธี spiked sample เตรียมตัวอย่างสองชุด การทดลองโดยชุดการทดลองแรกเติมสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติกความเข้มข้น 100 mg/L ชุดการทดลองที่สองไม่ต้องเติมสารละลายมาตรฐาน ทำการสกัดตามข้อ 3.2.2 คำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) =
$$\frac{\text{ความเข้มข้นของ spiked sample} - \text{ความเข้มข้นของตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}}$$

3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดเพอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง

ตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้องนำมาศึกษา 3 พันธุ์ คือ ข้าวดอกมะลิ 105 ข้าวหอมมะลิแดง และข้าวเสาไห้ ใช้วิธีการสกัด การเตรียมเป็นสารละลาย และการวิเคราะห์เช่นเดียวกันในทุกพันธุ์ตามข้อ 3.2.2

3.2.5.1 การวิเคราะห์โดยเทคนิค External standard

นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ที่สภาวะเหมาะสมจากการศึกษาข้อ 3.2.3 ใช้ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร วิเคราะห์ผลที่ได้และเทียบหาปริมาณกรดเพอร์รูติกของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่ได้จาก 3.2.4.1

3.2.5.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิค Standard addition

3.2.5.2.1 ปิเปตสารตัวอย่างจากข้อ 3.2.2 มา 4 จำนวนๆ ละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตรจำนวน 4 ขวดวัดปริมาตร

3.2.5.2.2 เติมสารละลายมาตรฐาน 100 mg/L ลงไป 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรใบที่ 2-4 ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของกรดเพอร์รูติกที่เติมลงในขวดใบที่ 2-4 เท่ากับ 2 4 และ 6 mg/L ตามลำดับ

3.2.5.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตามสภาวะที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.2.3 ฉีดวิเคราะห์ด้วยปริมาตร 10 ไมโครลิตรและตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดเพอร์รูติก นำไปใช้ประโยชน์ด้านการคำนวณหาปริมาณกรดเพอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.2.4 คำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์ริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติก ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัว ตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์

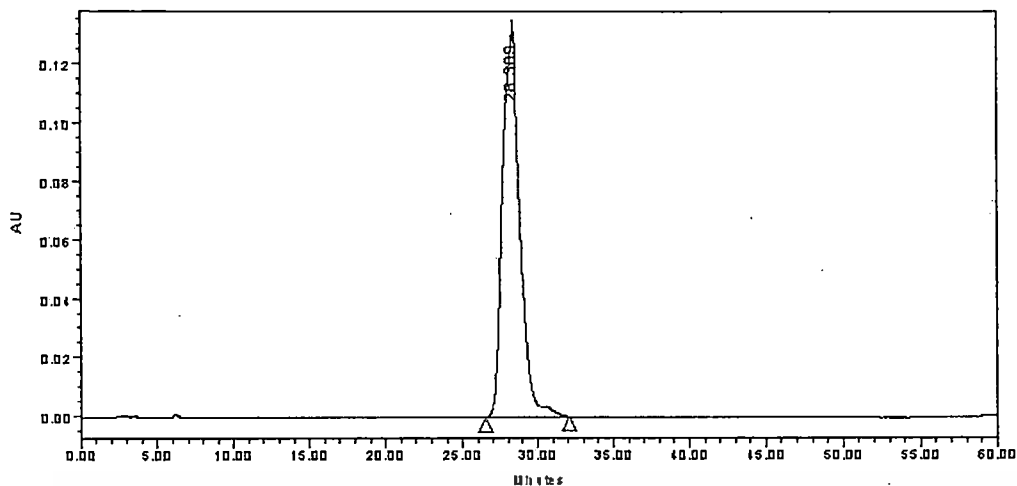
4.1.1 ศึกษาหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

ศึกษาหาอัตราการไหลที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติก โดยใช้สัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ สารละลายอะซิโตนไทรล์ : กรดแอซิติคเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

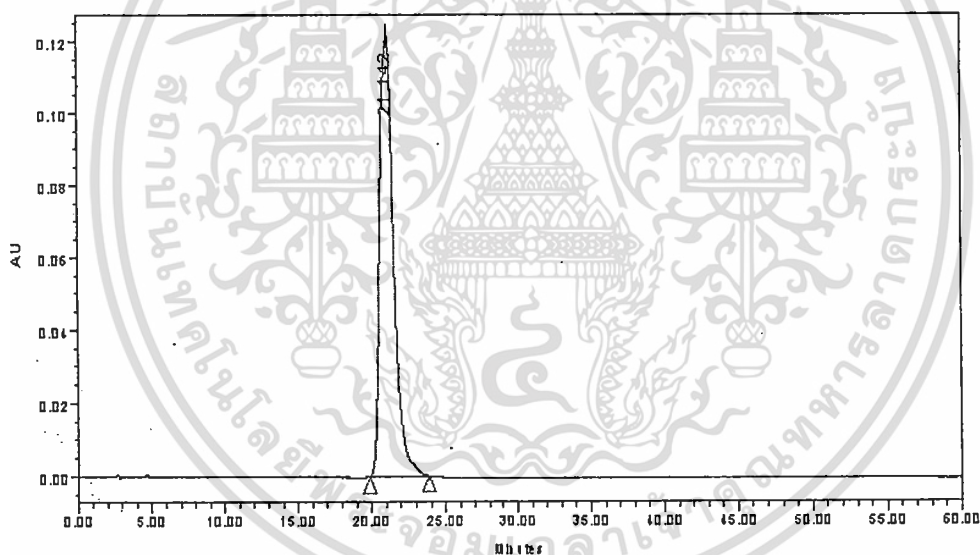
จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้สารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติกทดสอบหาอัตราการไหลที่ 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติก คือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมเนื่องจากมีเวลาริเทนชันเร็วกว่าอัตราการไหลที่ 0.6 และ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเวลาริเทนชัน (retention time) ในการแยกสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติกที่อัตราส่วนต่าง ๆ

อัตราส่วนของสารละลาย อะซิโตนไทรล์ : กรดแอซิติคเข้มข้น 2% (ปริมาตรโดยปริมาตร)	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	เวลาริเทนชัน (นาที)
15 : 85	0.6	28.31
15 : 85	0.8	21.14
15 : 85	1.0	17.18

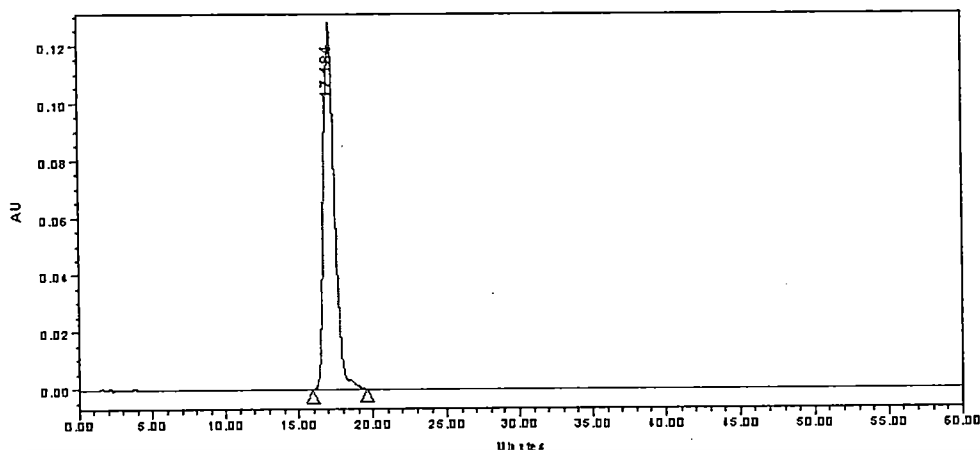


รูปที่ 4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติก ความเข้มข้น 100 ppm เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโตนไนโตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตร โดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติก ความเข้มข้น 100 ppm เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโตนไนโตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตร โดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

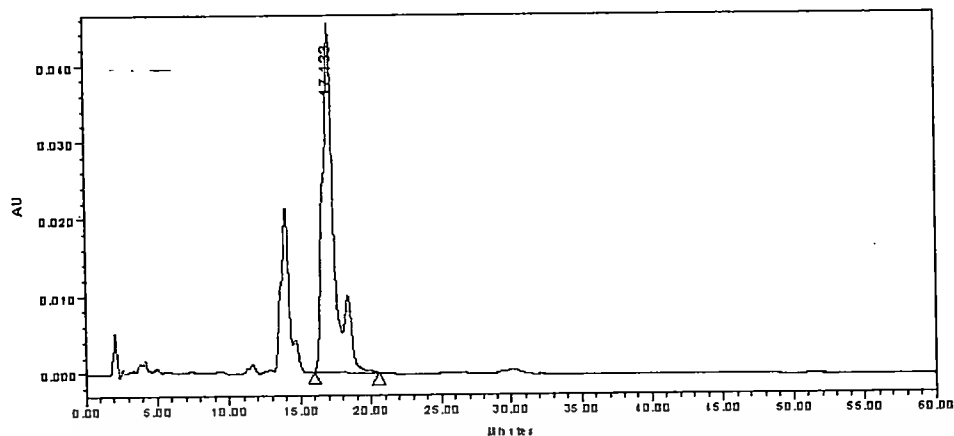


รูปที่ 4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติก ความเข้มข้น 100 ppm เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโตนไนโตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

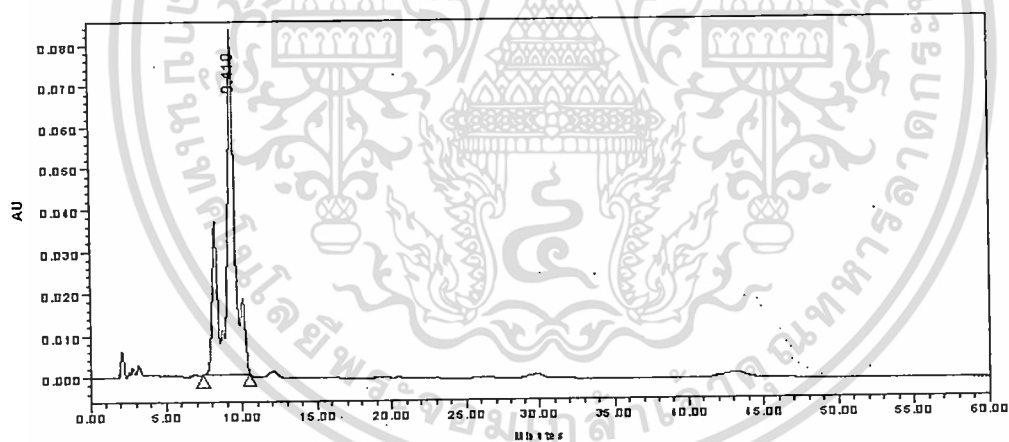
4.1.2 ศึกษาหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

ใช้สารละลายตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ HiQ sil C18 HS ขนาดอนุภาค 5 ไมครอนโดยศึกษาจากอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร และสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษาคืออะซิโตนไนโตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 10 : 90 15 : 85 และ 20 : 80 ปริมาตรโดยปริมาตรตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

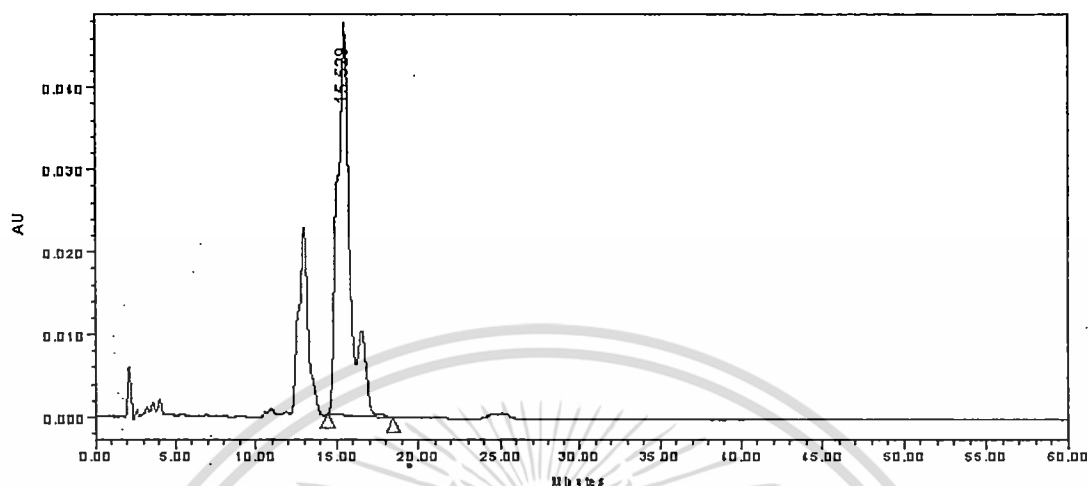
จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแยกสารละลายตัวอย่างคือ อัตราส่วน อะซิโตนไนโตรล์ : กรดแอซิดิกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร จากในรูปที่ 4.5 ได้ผลการแยกที่เวลาริเทนชันที่ 17.133 โดยอัตราส่วน 10 : 90 เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วทำให้การแยกสารตัวอย่างไม่ดี (รูปที่ 4.4) และอัตราส่วน 20 : 80 เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วทำให้เกิดการแยกที่ไม่สมบูรณ์ ลักษณะดังกล่าวเกิดจากการเคลื่อนที่ที่ยังไม่เหมาะสมเพียงพอ (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.4 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 กล้องงอก โดยเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% 10 : 90 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร



รูปที่ 4.5 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 กล้องงอก โดยเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ : แอสติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร



รูปที่ 4.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 กล้องงอกโดยเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% 20 : 80 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีควิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

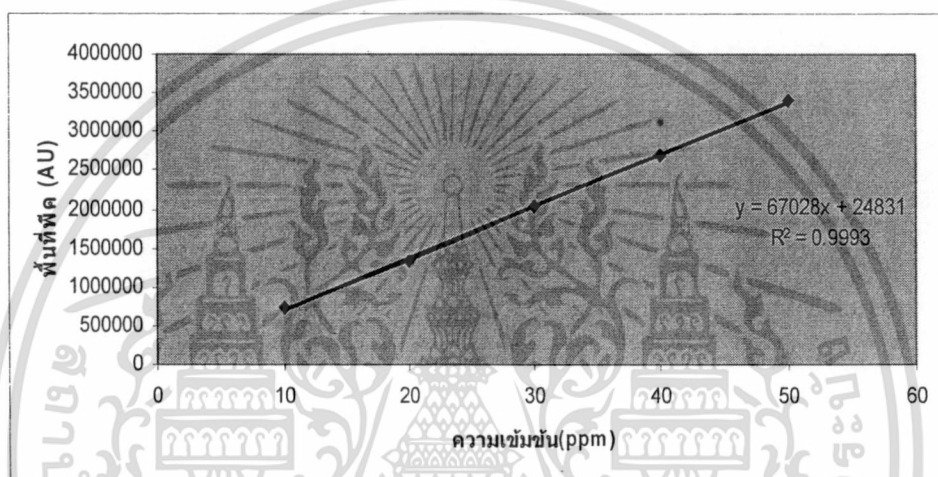
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเฟสเคลื่อนที่สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เหมาะสมคืออะซิโตนไทรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ซึ่งสามารถแยกสารประกอบกรดเฟอร์รูลิกจากสารตัวอย่างได้เนื่องจากมีความแรงของตัวทำละลายสำหรับการชะที่เหมาะสม (ภาคผนวก ก.) อัตราส่วนในการแยกสารละลายกรดเฟอร์รูลิกสรุปได้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราส่วนในการแยกสารละลายกรดเฟอร์รูลิกที่อัตราส่วนต่างๆ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

อัตราส่วนของอะซิโตนไทรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% (ปริมาตรโดยปริมาตร)	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	เวลารีเทนชัน (นาที)
10 : 90	1.0	15.520
15 : 85	1.0	17.133
20 : 80	1.0	9.410

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิก

นำสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิกโดยทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L ในเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร ทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง (ภาคผนวก ข.) แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิก ดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดเฟอร์รูสิก ช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L โดยใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร .

จากกราฟสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิก รูปที่ 4.7 คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสิ้นใจ (R^2) เท่ากับ 0.9993 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ พบว่าปริมาณกรดเฟอร์รูสิกต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 1.4995 mg/L และปริมาณกรดเฟอร์รูสิกต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) เท่ากับ 4.9985 mg/L (ภาคผนวก ง.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาความเที่ยง (Precision)

ศึกษาโดยการนำสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิก เข้มข้น 100 mg/L ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดซ้ำ 5 ครั้ง ได้ค่า % RSD เท่ากับ 1.37 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (% RSD ไม่ควรเกินร้อยละ 2.0) ดังแสดงตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลความเที่ยงสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิก เข้มข้น 100 mg/L

ครั้งที่	ปริมาณกรดเฟอร์รูสิก (mg/L)
1	99.37
2	98.03
3	99.1
4	100.48
5	101.59
ค่าเฉลี่ย	99.71
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.36
% RSD	1.37

4.4 ศึกษาความแม่นยำ (Accuracy)

ทำการศึกษาโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิกจาก stock standard solution 100 mg/L ด้วยวิธี spiked sample

ตัวอย่างที่ทดสอบ มีปริมาณกรดเฟอร์รูสิก = 20 mg/L

ตัวอย่าง + spiked มีปริมาณกรดเฟอร์รูสิก = 68 mg/L

สารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิก ที่เดิมมีความเข้มข้น = 50 mg/L

คำนวณร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ได้เท่ากับ $(68-20) \times 100 / 50 = 96 \%$

ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (% recovery จะต้องอยู่ระหว่าง 85-115 %)

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก

4.5.1 การวิเคราะห์โดยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน (External Standard Method)

นำตัวอย่างข้าวกล้องงอกที่ผ่านการสกัดตามหัวข้อ 3.2.2 ที่สภาวะการทดลองที่ใช้ใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลที่ได้เทียบหาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกจากกราฟมาตรฐานหัวข้อ 4.2 โดยการฉีดตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง ($n = 3$) (ภาคผนวก ข.)

ตารางที่4.4 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ด้วยเทคนิค External Standard Method

ตัวอย่าง ข้าว	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกเฉลี่ย (มิลลิกรัม/ตัวอย่าง100 กรัม)
ดอกมะลิ 105	14.73
หอมมะลิแดง	13.74
เสาไห้	14.67

4.5.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน (Standard Addition Method)

นำสารละลายที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.2.5.2 ที่สภาวะเหมาะสมอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร ต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร วัดพื้นที่พีคและเขียนกราฟระหว่างพื้นที่พีคกับปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงไปปริมาณต่างๆ เพื่อหาปริมาณของกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก (ภาคผนวก ค.)

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกด้วย
เทคนิค Standard Addition Method

ตัวอย่าง ข้าวกล้องงอก	น้ำหนัก ตัวอย่าง (กรัม)	ความเข้มข้น สารมาตรฐาน ที่เติม (mg/L)	ปริมาณกรด เฟอร์รูติก เฉลี่ย (mg/10 mL)	ปริมาณกรด เฟอร์รูติก เฉลี่ย (mg/100 g)	% RSD
ดอกมะลิ 105	2.0636	2	1.56	15.60	6.03
		4			
		6			
หอมมะลิแดง	2.0377	2	1.79	17.90	14.24
		4			
		6			
เสาไห้	2.0582	2	1.63	16.36	0.18
		4			
		6			

จากตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูติกที่ได้สามารถคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์
ความแปรผันได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับ แสดงว่าผลการวิเคราะห์มีความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกทั้ง 2 วิธี

ตัวอย่าง ข้าวกล้องงอก	ปริมาณกรดเฟอร์รูติก	
	External Standard Method	Standard Addition Method
ดอกมะลิ 105	15.33±0.47	15.60±0.94
หอมมะลิแดง	16.00±0.24	17.90±2.55
เสาไห้	15.06±0.82	16.36±0.03

นำผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกไปทดสอบโดยวิธี เพื่อ
เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีวิเคราะห์ แสดงผลดังตารางที่ 4.6 (การคำนวณในภาคผนวก จ.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการวิเคราะห์ t-test ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ที่ระดับความมั่นใจ 99% ($P < 0.01$)

ตัวอย่าง ข้าวกล้องงอก	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (มิลลิกรัม/100กรัม)					
	External Standard			Standard Addition		
	Mean	SD	%RSD	Mean	SD	%RSD
ดอกมะลิ 105	15.33	0.47	3.08	15.60	0.94	6.03
หอมมะลิแดง	16.00	0.24	1.53	17.90	2.55	14.24
เส้าไห้	15.06	0.82	5.47	16.36	0.03	0.18

จากผลการคำนวณ t-test ที่คำนวณได้ (t_{cal}) น้อยกว่าค่า จากตาราง (t_{table}) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก ทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจ 99% ($P < 0.01$) (การคำนวณในภาคผนวก จ.ตารางที่ จ.1)

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก และข้าวกล้อง

ตัวอย่าง พันธุ์ข้าว	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (มิลลิกรัม/100กรัม)	
	ข้าวกล้องงอก	ข้าวกล้อง
ดอกมะลิ 105	14.73	14.48
หอมมะลิแดง	13.74	13.64
เส้าไห้	14.67	14.80

จากผลการคำนวณ t-test ที่คำนวณได้ (t_{cal}) น้อยกว่าค่า จากตาราง (t_{table}) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก ทั้งในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจ 99% ($P < 0.01$) (การคำนวณในภาคผนวก จ. ตารางที่ จ.2)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติก เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ สารละลายอะซิโตนไนโตรล์ : กรดอะซิติกเข้มข้น 2 % 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวี ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร พบว่าอัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้กรดเพอร์รูติกมีเวลาอยู่ในคอลัมน์นานเพียงพอที่จะทำให้การแยกวิเคราะห์เป็นไปอย่างสมบูรณ์ ($t_R = 17.18$ นาที) ขณะที่การใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้กรดเพอร์รูติกใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานเกินไป ($t_R = 28.31$ นาที) และการใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้กรดเพอร์รูติกใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานเกินไป ($t_R = 21.14$ นาที)

สถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติก จะเปรียบเทียบกับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษาคือ สารละลายอะซิโตนไนโตรล์ : กรดอะซิติกเข้มข้น 2 % 10 : 90 15 : 85 และ 20 : 80 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวี ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าอัตราส่วนสารละลายอะซิโตนไนโตรล์ : กรดอะซิติกเข้มข้น 2 % 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร มีความแรงของตัวทำละลายสำหรับการแยกที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้เวลาริเทนชัน 17.18 นาที

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติกในช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L มีสมการเชิงเส้น $y = 67028x + 24831$ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของกราฟมาตรฐาน เท่ากับ 0.9993 พบว่าปริมาณกรดเพอร์รูติกต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 1.4995 mg/L และปริมาณกรดเพอร์รูติกต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) เท่ากับ 4.9985 mg/L

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง 3 สายพันธุ์ คือ ดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง และเส้าไห้ โดยเทคนิคสร้างกราฟมาตรฐาน (External Standard Method) ทำการฉีดวิเคราะห์สารตัวอย่างซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n = 3$) ตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ในเฟสเคลื่อนที่ สารละลายอะซิโตนไนโตรล์ : กรดอะซิติกเข้มข้น 2 % 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวี ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาณกรดเพอร์รูติกใน 100 กรัม ของข้าวกล้องงอกพันธุ์ ดอกมะลิ105, หอมมะลิแดง และ เส้าไห้ คือ 14.73, 13.74 และ 14.67 มิลลิกรัม ตามลำดับ และปริมาณกรดเพอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ ดอกมะลิ105 หอมมะลิแดง และเส้าไห้ คือ 14.48, 13.64 14.80 มิลลิกรัม ตามลำดับจากผลการวิจัยของ Ohtsubo, Suzuki, Yasui & Kasumi (2005) รายงานว่า การแช่เมล็ดข้าวกล้องก่อนงอกในน้ำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตามด้วยการลดความชื้นจนถึงประมาณ 13-15 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสในห้องควบคุมความชื้นต่ำ ทำให้ข้าวกล้องดังกล่าวมีใยอาหารรวมกรดเพอร์รูติกรวม และGABA สูงกว่าข้าวกล้องทั่วไปและข้าวขัดสี

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดเพอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก 3 สายพันธุ์ คือ ดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง และเส้าไห้ โดยเทคนิคสร้างกราฟมาตรฐาน และ เทคนิคสร้างการเติมสารมาตรฐาน ทั้ง 2 วิธี ผลที่ได้นำไปทดสอบโดยวิธี t-test โดยการคำนวณ t-test ซึ่งค่า t_c ที่คำนวณได้มีค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยกว่า t จากตาราง แสดงว่าแต่ละวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดเพอร์รูติกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจที่ 99 % ($P < 0.01$)

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำการศึกษาสภาวะในการวิเคราะห์ก่อนเพื่อช่วยประหยัดเวลา เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นเมล็ดพันธุ์ข้าว

5.2.2 ควรตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ก่อนการวิเคราะห์ให้อยู่ในค่าที่เหมาะสมเพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีประสิทธิภาพ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กษมา สุขโข และกัณทิมา อาระอินทร์. (2544). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากข้าว น้ำมันข้าว*. เกษศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล.
- เครือวัลย์ อัดตะวิริยะสุข สุนันทา หมื่นผล อนงค์ พุ่มเพ็งและ รุจี กุลประสูติ . (2535). *คุณภาพการขัดสีและคุณสมบัติเมล็ดทางกายภาพบาง ประการของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งปลูกโดยใช้วันปลูกและอัตราปุ๋ยเคมีที่ต่างกัน*. สถาบันวิจัยข้าว ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี. กรมวิชาการ เกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- งามชื่น คงเสรี. (2545). *คุณภาพข้าวและการตรวจสอบข้าวปนในข้าวหอมมะลิไทย*. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ผดุงขวัญ จิตโรภาส อรุณี ปรีเปรม บุญมี ศิริ ชิตชนก คำเลิศ และบังอร ศรีพานิชกุลชัย. (2547). *การพัฒนาเมล็ดข้าวหอมดอกมะลิ 105 (RBT) เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการต้านออกซิเดชันปริมาณแอมมา โอรีซานอล ในสภาวะที่เก็บรักษา*. วารสารงานวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- บุญหงส์ จงคิด. (2547). *ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต*, 1, กรุงเทพฯ : จุฬาฯ.
- นฤมล นิมนานพิภักดิ์. (2004). *การเตรียมและการประเมินของสารสกัดน้ำมันรำข้าวที่มีส่วนประกอบแอมมา-โอรีซานอล*. วิทยานิพนธ์. ภ.ม. (เภสัชกร) คณะกรรมการควบคุม วิทยานิพนธ์, มหาวิทยาลัยมหิดล.
- อรอนงค์ นัยวิกุล, จันทรจักรัส ศรีศิริ และ วราภา มหากาญจนกุล. (2547). *การใช้ประโยชน์จากข้าว ในการสร้างมูลค่าเพิ่มเพื่อการส่งออก : รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่2, 2* กรุงเทพฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน คณะอุตสาหกรรมเกษตร.
- Asia BioBusiness. (2006). *Potential world markets for innovative rice business in Thailand. Final report prepared for the Nation Innovation Agency, Thailand*. Asia BioBusiness Pte Ltd, Singapore.
- Buranov,A.U., & Mazza, G. (2009). *Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurized solvents*". Pacific Agri-Food Research Center,Agriculture and Agri-Food Canada. *Food Chemistry*. 115 (2009).
- Food and Agriculture Organization of the United nation (FAO). (2004). *International Year of Rice 2004*. Romr, Italy. <http://www.rice2004.org> (2 december 2009)
- Hossain, M.,& Narciso, J. (2004). *Global rice economy: Long-term perspectives*. Proceedings of the FAO Rice Conference, *Rice in Global Market*. Pp4-7. FAO, Rome, Italy.
- Ito, S., & Ishikawa, Y. (2004). *Marketing of value-added rice products in Japan: Germinated brown rice and rice bread*. Proceedings of the FAO Rice Conference, *Rice in Global markets*. Pp 62-68. FAO, Rome, Italy.

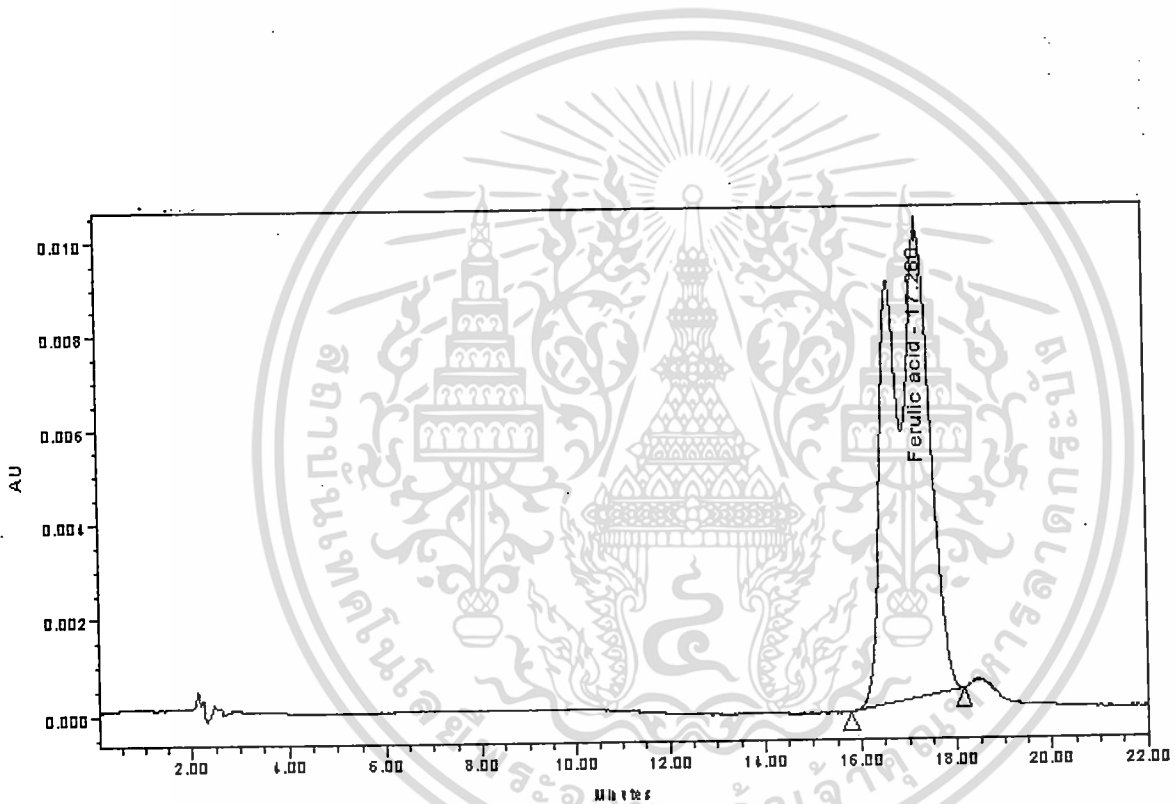
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kayahara, H., & Tsukahara, K. (2000). *Flavor, health, and nutritional quality of pre-germinated brown rice*. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies in Hawaii.
- Kim, K., Tsao, R., Yang, R., & Cui, S., W. (2006). Phenolic acid profiled and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions". *Food Chemistry*. 95, 466-473.
- Khush, G. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology*. 35, 25-34.
- Komatsuzaki, N., Tsukahara, K., Toyoshima, H., Suzuki, T., Shimizu, N., & Kimura, T. (2005). Morphological plasticity in maternal brain : Comment on Kinsley *et al.*; motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines, Center of Studies.
- Liang, J., Han, B.Z., Nout, M.J.R., & Hamer, R.J. (2008). Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and *in vitro* soluble zinc in brown rice. *Food Chemistry*. 110, 821-828.
- Ohtsubo, K., Suzuki, K., Yasui, Y., & Kasumi, T. (2005). Bio-functional components in the processed pre-germinated brown rice by a twin-screw extruder. *Journal of Food Composition and analysis*. 18, 303-316.
- Proestos, C., Sereli, D., & Komaitis, M. (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*. 95, 44-52.
- Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A.I., & Lopez-Sabater, M.C., (2006). Determination of γ - and δ tocopherols in human milk by a direct high-performance liquid chromatographic method with UV-vis detection and comparison with evaporative light scattering detection". *Journal of Chromatography A*. (1114), 132-137.
- Vanichanont, P. (2004). Thai rice: Sustainable life for rice growers. Proceeding of the FAO Rice Conference, *Rice in Global markets*. Pp 113-117. FAO, Rome, Italy.
- Wikipedia. (2011). *Ferulic acid*. Retrieved July 10, 2011. from http://en.wikipedia.org/wiki/ferulic_acid
- Zigoneanu, I.G., Williams, L., Xu, Z., & Sabliov, C.W. (2008). Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. *Bioresource Technology*. 99, 4910-4918.

ภาคผนวก ก.

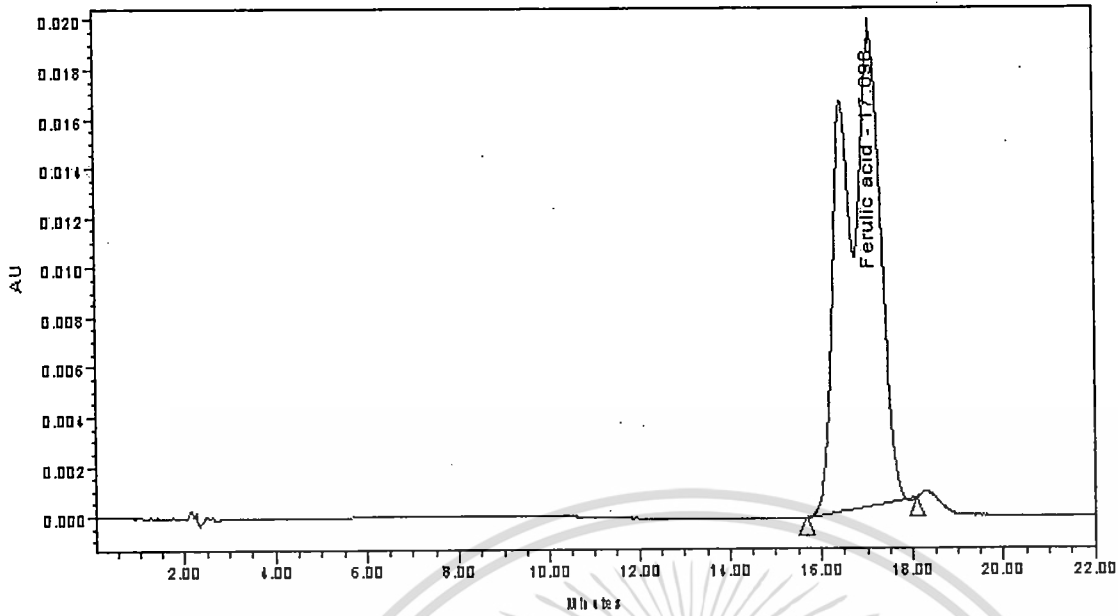
ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลอง

โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริก ที่ความเข้มข้น 10-50 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไทล์ : กรดแอสติก 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10ไมโครลิตรแสดงดังรูปที่ ก.1-ก.5

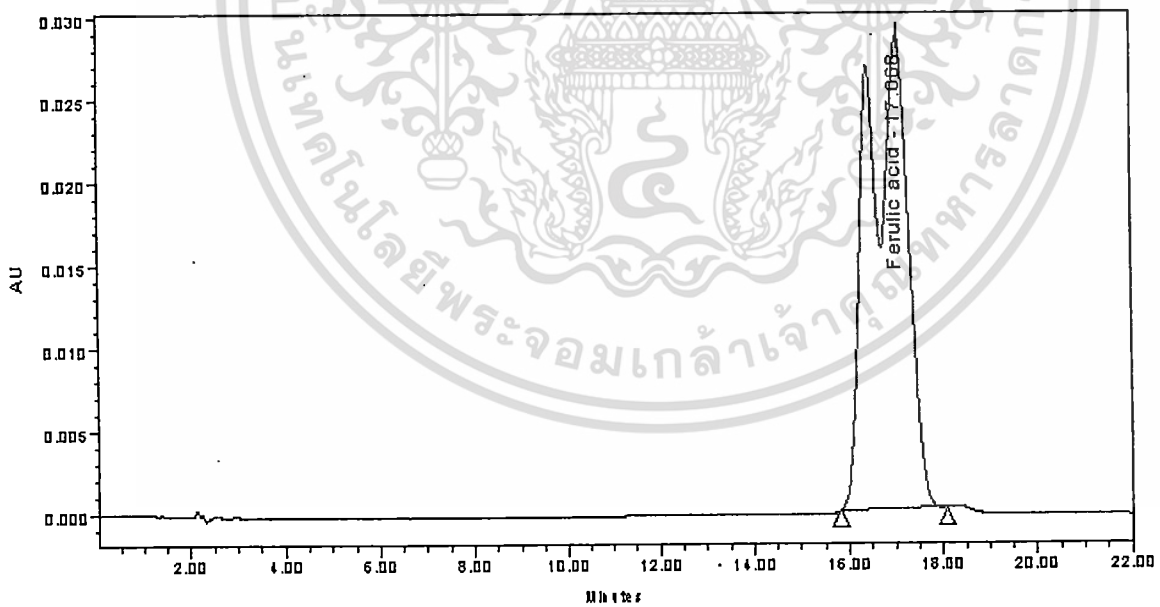


รูปที่ ก.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริก ที่ความเข้มข้น 10 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

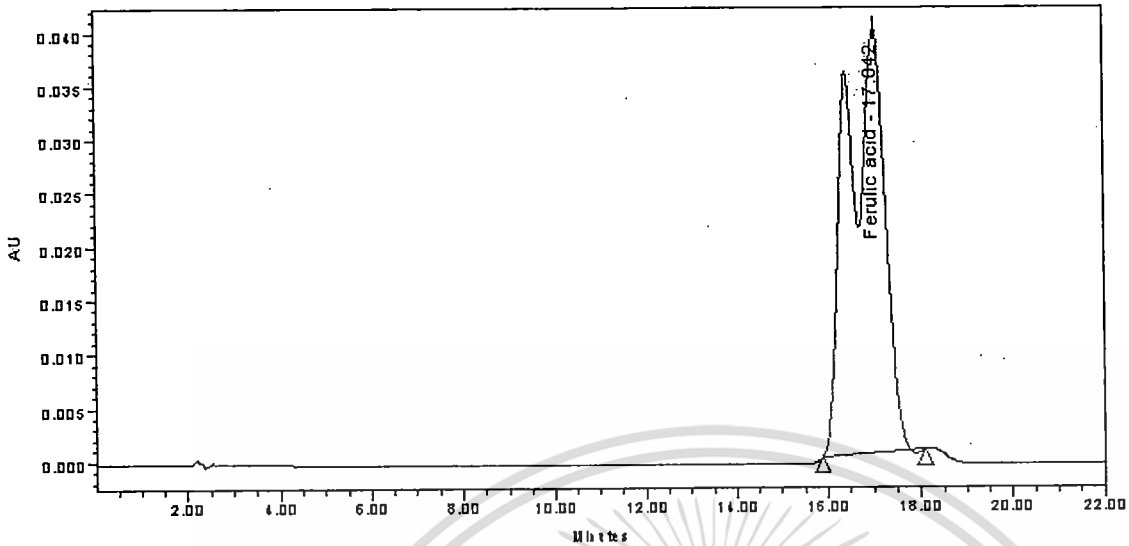


รูปที่ ก.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ที่ความเข้มข้น 20 ppm

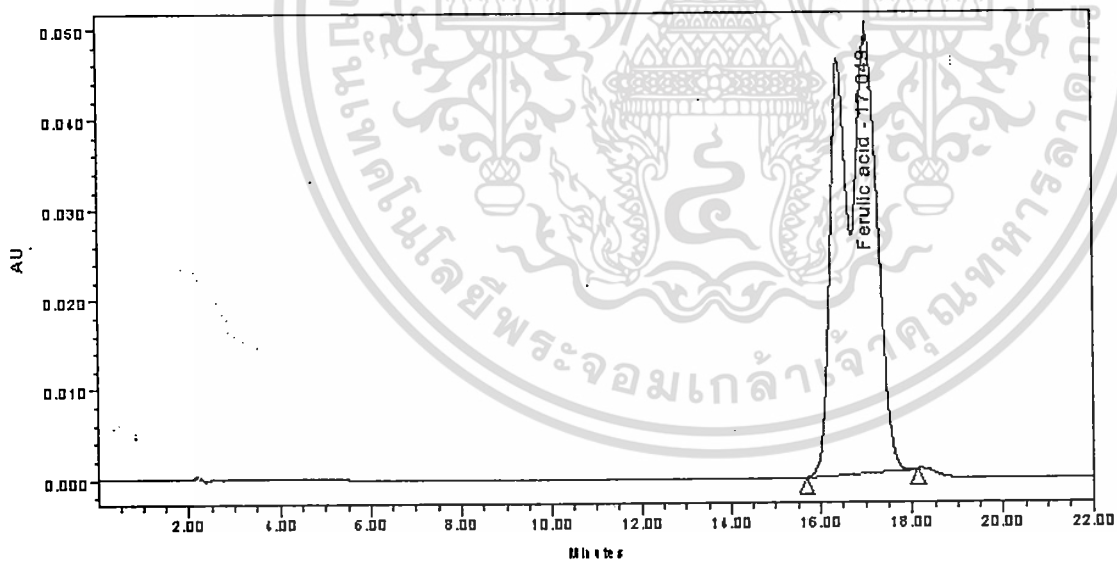


รูปที่ ก.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ที่ความเข้มข้น 30 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



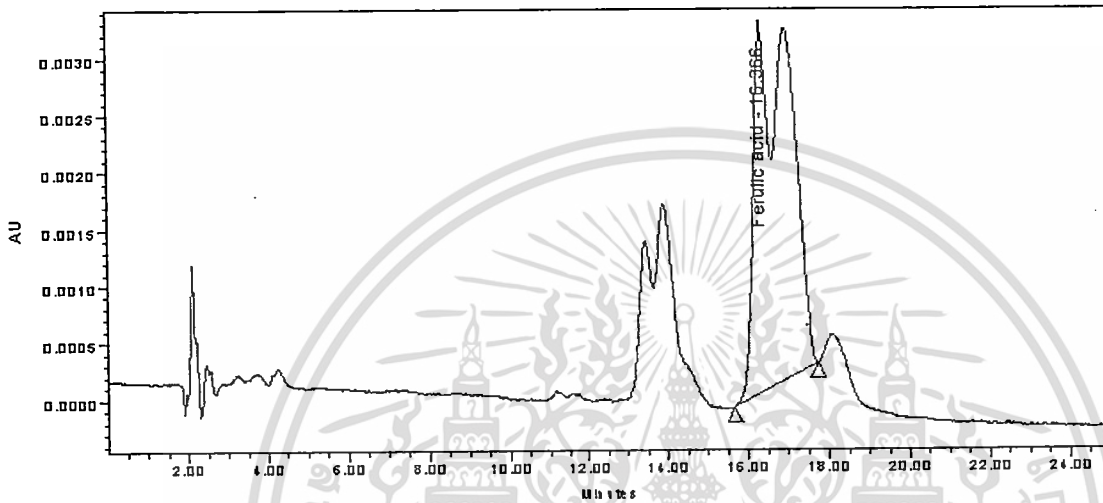
รูปที่ ก.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ที่ความเข้มข้น 40 ppm



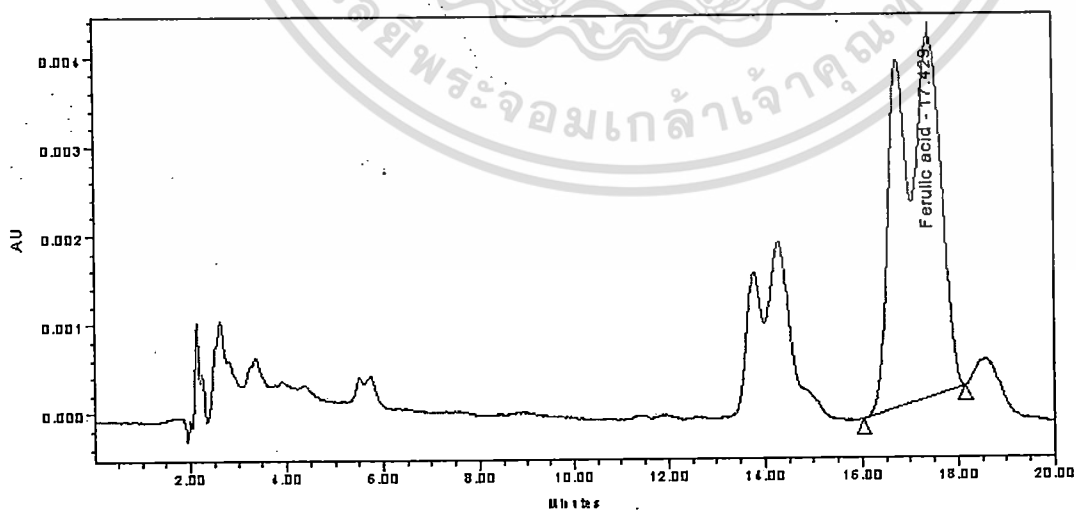
รูปที่ ก.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ที่ความเข้มข้น 50 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง และ เส้าให้ ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไนโตรเจน : กรดแอสซิติค 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10ไมโครลิตร

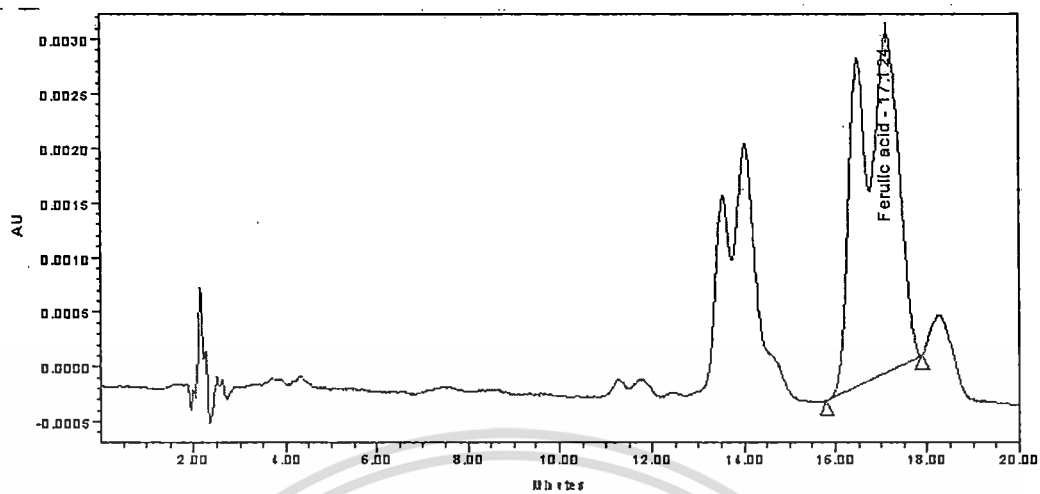


รูปที่ ก.6 โครมาโทแกรมของข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105



รูปที่ ก.7 โครมาโทแกรมของข้าวกล้องงอกหอมมะลิแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.8 โครมาโทแกรมของข้าวกล้องงอกเส้าให้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

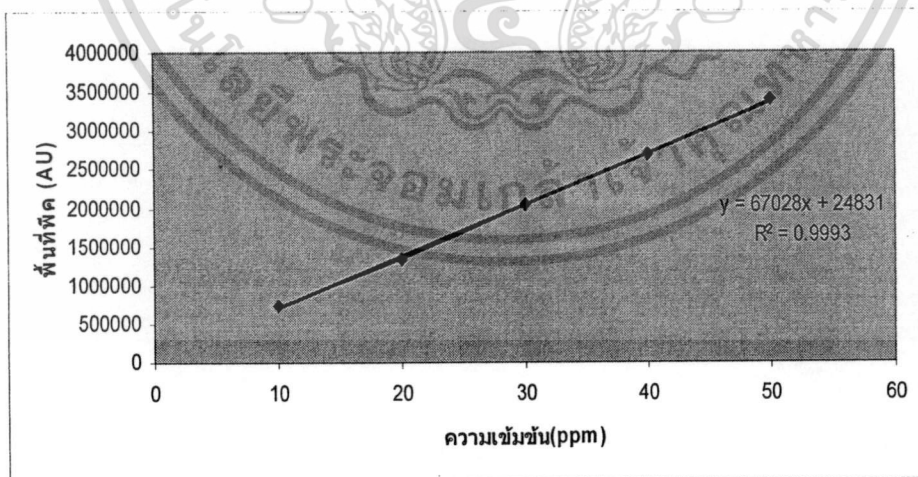
การคำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์ริก ด้วยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์ริกจากตัวอย่างข้าวกล้องงอก และข้าวกล้องด้วยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐานที่ใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ : กรดแอซติก 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

ตารางที่ ข.1 พื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริก ช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L

ความเข้มข้น (mg/L)	พื้นที่พีค (AU)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	
10	699873	591243	889464	726860
20	1487613	1089302	1392133	1323016
30	2100381	1700829	2317190	2042800
40	2715677	2243514	3116050	2691747
50	3361059	2836058	3984508	3393875

1. สร้างกราฟมาตรฐาน กำหนดให้แกน x คือ ความเข้มข้น
แกน y คือ พื้นที่พีคเฉลี่ย



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์ริก ช่วงความเข้มข้น 10-50 ppm

2. นำพื้นที่พีคของตัวอย่างที่ได้จากการสกัดมาฉีดวิเคราะห์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องงอก ดอกมะลิ 105

น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
2.0636	2096087	2219954	2121837
2.0592	1897042	1849241	1857926
1.0944	1162219	1173617	1146450

นำค่าพื้นที่พีคของตัวอย่างมาแทนในสมการของกราฟมาตรฐาน $y = 67028x + 24831$

ตัวอย่าง หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ดอกมะลิ 105 จากการฉีดครั้งที่1

$$y = 67028x + 24831$$

$$x = \frac{2096087 - 24831}{67028}$$

$$= 30.90135 \text{ mg/L (ppm)}$$

คำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกใน 10 mL (จากตัวอย่างน้ำหนัก 2.0636 กรัม)

ตัวอย่าง 1,000 mL มีปริมาณกรดเฟอร์รูลิก 30.90135 mg

ตัวอย่าง 10 mL มีปริมาณกรดเฟอร์รูลิก $30.90135 (10)/1000$ mg

$$= 0.3090 \text{ mg}$$

คำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่าง 100 กรัม (จากตัวอย่างน้ำหนัก 2.0636 กรัม)

ตัวอย่าง 2.0636 กรัม มีปริมาณกรดเฟอร์รูลิก 0.3090 mg

ตัวอย่าง 100 กรัม มีปริมาณกรดเฟอร์รูลิก $0.3090(100)/2.0636$ mg

$$= 14.9745 \text{ mg}$$

ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกจากตัวอย่างอื่นสามารถคำนวณได้จากตัวอย่างข้างต้น

ตารางที่ ข.3 ปริมาณกรดเฟอรูริกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ดอกมะลิ 105

น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณกรดเฟอรูริก (มิลลิกรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	
2.0636	14.9745	15.8700	15.1607	15.3351
2.0592	13.5644	13.2181	13.2810	13.3545
1.0944	15.5052	15.6605	15.2902	15.4853
ค่าเฉลี่ย				14.7250
SD				1.1892
%RSD				8.0763



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 พื้นที่ฟีดในตัวอย่างข้าวกล้องงอกหอมมะลิแดง

น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	พื้นที่ฟีด (AU)		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
2.0377	2171984	2235729	2221210
2.0418	1857926	1799546	1783536
1.0533	897518	890184	860047

ตารางที่ ข.5 ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก หอมมะลิแดง

น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (มิลลิกรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	
2.0377	15.7205	16.1872	16.0809	15.9962
2.0418	13.3942	12.9676	12.8506	13.0708
1.0533	12.3609	12.2570	11.8302	12.1494
			ค่าเฉลี่ย	13.7388
			SD	2.0085
			%RSD	14.6193

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.6 พื้นที่ฟีดในตัวอย่างข้าวกล้องงอก เสาให้

น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	พื้นที่ฟีด (AU)		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
2.0652	1370782	1557391	1788363
2.0963	2271953	2097769	2052677
2.0197	2442020	2474638	2448920

ตารางที่ ข.7 ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก เสาให้

น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (มิลลิกรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	
2.0652	9.7232	11.0713	12.7399	11.1781
2.0963	15.9925	14.7529	14.4319	15.0591
2.0197	17.6718	17.9128	17.7228	17.7691
			ค่าเฉลี่ย	14.6688
			SD	3.3128
			%RSD	22.5840

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.8 พื้นที่ฟีดในตัวอย่างข้าวกล้องดอกมะลิ 105

น้ำหนักตัวอย่างข้าว (กรัม)	พื้นที่ฟีด (AU)		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
2.5886	2379580	2539366	2493168
2.6377	2555621	2592494	2610217
2.5864	2598770	2631696	2654184

ตารางที่ ข.9 ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องดอกมะลิ 105

น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (มิลลิกรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	
2.5886	13.5714	14.4928	14.2260	13.9967
2.6377	14.3144	14.5230	14.6232	14.4173
2.5864	14.8472	15.0372	15.1669	15.0171
			ค่าเฉลี่ย	14.4770
			SD	0.5128
			%RSD	3.5423

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.10 พื้นที่ฟีดในตัวอย่างข้าวกล้องหอมมะลิแดง

น้ำหนักตัวอย่างข้าว (กรัม)	พื้นที่ฟีด (AU)		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
2.0176	1752011	1733489	1700526
2.0012	1544601	1514852	1464907
2.0520	2428542	2429913	2344456

ตารางที่ ข.11 ปริมาณกรดเฟอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องหอมมะลิแดง

น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณกรดเฟอร์รูติก (มิลลิกรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	
2.0176	12.7716	12.6347	12.3909	12.5991
2.0012	11.3300	11.1082	10.7359	11.0580
2.0520	17.4763	17.4862	16.8649	17.2758
			ค่าเฉลี่ย	13.6443
			SD	3.2380
			%RSD	23.7315

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.12 พื้นที่ฟีดในตัวอย่างข้าวกล้องเสาให้

น้ำหนักตัวอย่างข้าว (กรัม)	พื้นที่ฟีด (AU)		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
2.0788	2026567	2139366	2093628
2.0377	2045621	2062494	2030217
2.0864	2098680	2133698	2056185

ตารางที่ ข.13 ปริมาณกรดเพอร์รูติกในตัวอย่างข้าวกล้องเสาให้

น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณกรดเพอร์รูติก (มิลลิกรัม/ตัวอย่าง 100 กรัม)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	
2.0788	14.3661	15.1756	14.8473	14.7963
2.0377	14.7953	14.9189	14.6825	14.7989
2.0864	14.8294	15.0798	14.5255	14.8116
			ค่าเฉลี่ย	14.8023
			SD	0.0082
			%RSD	0.0553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

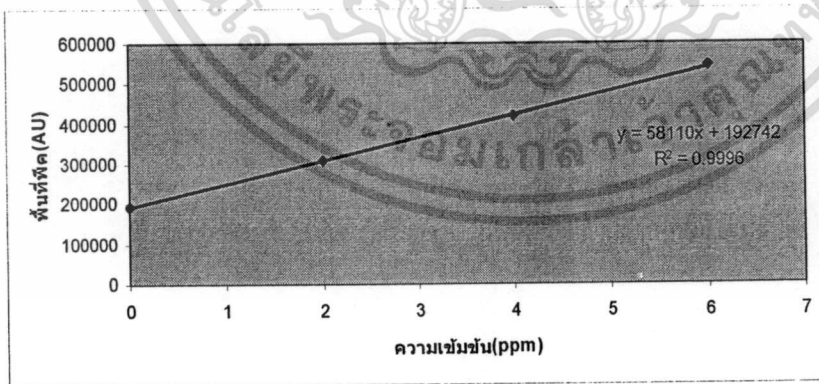
การคำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์ริก ด้วยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน

ตัวอย่างคำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์ริกจากตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ ดอกมะลิ 105 ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ : กรดแอสติก 2% 15 :85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

ตารางที่ ค.1 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105 (น้ำหนักตัวอย่าง 2.0636 กรัม)

ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (ppm)	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
0	194079	189079	185979
2	309114.78	315114	345247
4	420863	418863	458963
6	544229	538229	586229
ปริมาณกรดเฟอร์ริกครั้งที่1	3.317 mg/L		
ปริมาณกรดเฟอร์ริกครั้งที่2	3.347 mg/L		
ปริมาณกรดเฟอร์ริกครั้งที่3			2.996 mg/L

1. สร้างกราฟมาตรฐาน กำหนดให้แกน x คือ ความเข้มข้น แกน y คือ พื้นที่พีคเฉลี่ย



รูปที่ ค.1 กราฟการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105 ครั้งที่1

2. คำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในหน่วยต่างๆ

ตัวอย่าง หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105

$$y = 58110x + 192742$$

$$x = 192742 / 58110$$

$$= 3.317 \text{ mg/L (ppm)}$$

คำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกใน 10 mL (จากตัวอย่าง 1 mL)

ตัวอย่าง 1,000 mL มีปริมาณกรดเฟอร์รูลิก 3.317 mg

ตัวอย่าง 10 mL มีปริมาณกรดเฟอร์รูลิก $3.317 (10) / 1,000$ mg

$$= 0.03317 \text{ mg}$$

คำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่าง 100 กรัม (จากตัวอย่างน้ำหนัก 2.0636 กรัม ปรับ

ปริมาตรด้วยเมทานอล 10 mL)

ตัวอย่าง 2.0636 กรัม มีปริมาณกรดเฟอร์รูลิก 0.03317×10 mg

ตัวอย่าง 100 กรัม มีปริมาณกรดเฟอร์รูลิก $0.03317(10) / 2.0636$ mg

$$= 0.1607 \text{ mg/g}$$

$$= 0.1607 \times 100$$

$$= 16.0729 \text{ g/100 g}$$

*** ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกจากตัวอย่างอื่นสามารถคำนวณได้จากตัวอย่างข้างต้น

ตารางที่ ค.2 ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกของตัวอย่างข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105

ครั้งที่	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (mg/100 g)
1	16.0729
2	16.2182
3	14.5204
Mean	15.6038
SD	0.9411

ตารางที่ ค.3 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกหอมมะลิแดง (น้ำหนักตัวอย่าง 2.0377 กรัม)

ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (ppm)	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
0	214791	238972	268972
2	328615.5	355815	385815
4	485085.25	500085	510085
6	606497.45	622497	642497
ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกครั้งที่1	3.139 mg/L		
ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกครั้งที่2		3.631 mg/L	
ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกครั้งที่3			4.259 mg/L

ตารางที่ ค.4 ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกของตัวอย่างข้าวกล้องงอกหอมมะลิแดง

ครั้งที่	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (mg/100 g)
1	15.4059
2	17.8191
3	20.5061
Mean	17.904
SD	2.5513
%RSD	14.2450

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.5 พื้นที่ฟิคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกเส้าให้ (น้ำหนักตัวอย่าง 2.0963 กรัม)

ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (ppm)	พื้นที่ฟิค (AU)		
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3
0	244869	202599	212599
2	409220	337036	327036
4	569269	465844	485844
6	660158	573283	579288
ปริมาณกรดเฟอร์รูริกครั้งที่1	3.698 mg/L		
ปริมาณกรดเฟอร์รูริกครั้งที่2		3.362 mg/L	
ปริมาณกรดเฟอร์รูริกครั้งที่3			3.374 mg/L

ตารางที่ ค.6 ปริมาณกรดเฟอร์รูริกของตัวอย่างข้าวกล้องงอกเส้าให้

ครั้งที่	ปริมาณกรดเฟอร์รูริก (mg/100 g)
1	17.6431
2	16.3326
3	16.3920
Mean	16.3612
SD	0.0298
%RSD	0.1819

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

การคำนวณขีดจำกัดการตรวจวัด

การทดสอบและการคำนวณเพื่อหาขีดจำกัดการตรวจวัด ทำการทดสอบและคำนวณตามวิธีของ International Union of Pure and Applied chemistry (IUPAC)

สูตรการคำนวณและวิธีทดสอบ

1. เตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่แน่นอนต่าง ๆ กัน แล้วนำไปทดลองนำผลทดลองที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่พีคของสารมาตรฐานที่วัดได้ สามารถหาความเข้มข้นของกราฟได้จากสมการ

$$Y = bX + a$$

เมื่อ a คือ ความชันของกราฟ
 B คือ จุดตัดแกน y

2. เมื่อหาความเข้มข้นของกราฟได้แล้ว นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าสัญญาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้และขีดจำกัดการตรวจวัดจากสูตร

$$\text{สัญญาณต่ำสุดที่วัดได้ } Y = Y_B + 3S_B$$

เมื่อ 3 คือ ค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 99 % เมื่อ $Y \geq Y_B + 3S_B$

$$\text{ขีดจำกัดการตรวจหา } LOD = Y - Y_B / b$$

$$\text{หรือ } LOD = 3S_B / b = 3S_{y/x} / b$$

เมื่อ Y คือ สัญญาณต่ำสุดที่วัดได้
 Y คือ ค่าเฉลี่ยของสัญญาณจาก Blank
 S_B คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Blank
 LOD คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้
 b คือ ความชันของกราฟ (สภาพไว)

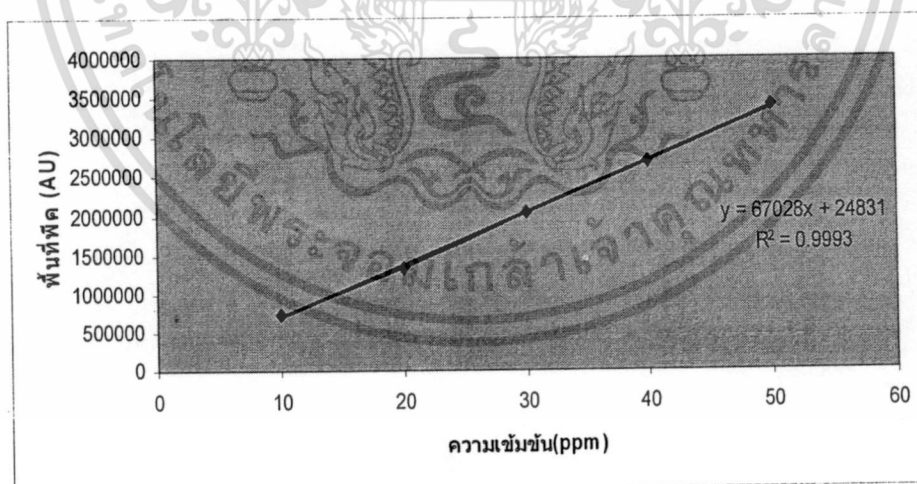
3. เมื่อคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัดได้แล้ว นำค่าที่ได้มาหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ โดยมีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (Limit Of Quantitation, LOQ)

$$\text{จากสูตร } LOQ = 10S_{y/x} / b$$

การคำนวณขีดจำกัดการตรวจวัดสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เมื่อทำการวัดสารมาตรฐานกรดเฟอรัสริกและตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถสรุปเป็นตารางได้ดังนี้

ตารางที่ ง.1 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดเฟอร์รูสิค โดยทำการทดสอบ ในช่วงความเข้มข้น 10-50 ppm ในเฟสเคลื่อนที่เฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไนโตรล์ : กรดแอสติก 2% 15 :85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์ คือ 10 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่พีค (AU)			Mean	SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
10	699873	591243	889464	726860	150930.9936	20.7648
20	1487613	1089302	1392133	1323016	207956.2044	15.7183
30	2100381	1700829	2317190	2042800	312662.9776	15.3306
40	2715677	2243514	3116050	2691747	436759.9472	16.2259
50	3361059	2836058	3984508	3393875	574927.8372	16.9402



รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิค ช่วงความเข้มข้น 10-50 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดเพอร์รูติกกับพื้นที่ที่คั่นเฉลี่ย

X_i	X_i^2	Y_i	Y^{\wedge}_i	$Y_i - Y^{\wedge}_i$	$(Y_i - Y^{\wedge}_i)^2$
10	100	726860	695111	31749	1007999001
20	400	1323016	1365391	-42375	1795640625
30	900	2042800	2035671	7129	50822641
40	1600	2691747	2705951	-14204	201753616
50	2500	3393875	3376231	17644	311310736

$$\sum X_i^2 = 5500$$

$$\sum (Y_i - Y^{\wedge}_i)^2 = 3367526619$$

เมื่อ X_i คือ ความเข้มข้นที่แท้จริง

$$Y^{\wedge}_i = 67028 X_i + 24831$$

$$\text{ขีดจำกัดการตรวจวัด : LOD} = 3S_{y/x}/b$$

$$S_{y/x} = \frac{[\sum (Y_i - Y^{\wedge}_i)^2 / n - 2]^{1/2}}{n}$$

$$= \frac{\sqrt{3367526619/3}}{50}$$

เพราะฉะนั้น $\text{LOD} = (3 \times 33503.8636) / 67028$

ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัดได้ $\text{LOD} \cong 1.4995 \text{ mg/L}$

$$\text{LOQ} = 10S_{y/x}/b$$

ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถวิเคราะห์ได้ $\text{LOQ} = (10 \times 33503.8636) / 67028$

$$\cong 4.9985 \text{ mg/L}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.

การคำนวณค่า t-test จากผลการวิเคราะห์

การเปรียบเทียบความแตกต่างของวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณระหว่างเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐานกับเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน

ตารางที่ จ.1 ปริมาณกรดเฟอรรัสในตัวอย่างข้าวกล้องงอกที่วิเคราะห์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

ตัวอย่าง ข้าวกล้องงอก	ปริมาณกรดเฟอรรัส (มิลลิกรัม/100กรัม)					
	External Standard			Standard Addition		
	Mean	SD	%RSD	Mean	SD	%RSD
ดอกมะลิ 105	15.335	0.472	3.081	15.604	0.941	6.031
หอมมะลิแดง	15.996	0.245	1.529	17.904	2.551	14.245
เส้าให้	15.059	0.824	5.473	16.361	0.030	0.182

ตัวอย่างเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ระหว่างเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐานกับเทคนิคการเติมสารมาตรฐานของตัวอย่างข้าวกล้องงอกดอกมะลิ 105

ขั้นที่1 ตั้งสมมติฐาน $H_0 : \mu_{\text{External Standard}} = \mu_{\text{Standard Addition}}$

$H_1 : \mu_{\text{External Standard}} \neq \mu_{\text{Standard Addition}}$

เมื่อ $\alpha = 0.01$

ขั้นที่2 ทดสอบความแปรปรวน ด้วยการทดสอบค่าเอฟ หรือ F-test

$H_0 : \sigma^2_{\text{External Standard}} = \sigma^2_{\text{Standard Addition}}$

$H_1 : \sigma^2_{\text{External Standard}} \neq \sigma^2_{\text{Standard Addition}}$

สูตรการทดสอบค่าเอฟ คือ $\frac{S_1^2}{S_2^2}$ เมื่อ $S_1^2 > S_2^2 = 0.9411^2 / 0.4725^2 = 3.967$

ขั้นที่3 อ่านค่า F จากตารางที่ 3-1 และ $3-1 = 2$ degree of freedom

ที่ $df_1 = 2$ $df_2 = 2$ จากตาราง F แสดงค่าวิกฤต $F = 19$ ที่ $\alpha = 0.05$ และค่าวิกฤต $F = 99$ ที่ $\alpha = 0.01$
 การทดสอบนี้มุ่งเน้นที่จะแสดงค่า $\sigma^2_{\text{External Standard}} = \sigma^2_{\text{Standard Addition}}$ จึงควรเลือกค่าวิกฤต ที่ทำให้
 ยอมรับได้ยากกว่า เพื่อลดโอกาสที่จะเกิดความคลาดเคลื่อนในการยอมรับ H_0 ดังนั้นจึงเลือก

$$F_{t,(2,2),0.05} = 19$$

$$F_t > F_c \text{ จึงยอมรับ } H_0$$

พิจารณาค่า F-test ถ้า F-test ที่คำนวณ (Fc) ได้น้อยกว่า ค่า F ที่ได้จากรายการ (Ft) แสดงว่า
 ความแปรปรวนของทั้งสองกลุ่มเท่ากัน ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 นั่นคือยอมรับ H_0 ใช้สูตร

Pooled Variance (เมื่อ $\sigma^2_{\text{External Standard}} = \sigma^2_{\text{Standard Addition}}$)

ขั้นที่4 คำนวณค่า T_c

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left\{ \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right\}}}$$

$$= 0.442$$

ขั้นที่5 คำนวณค่า T_t จากสูตร v df ($\alpha = 0.01$)

$$\begin{aligned} df &= n_1 + n_2 - 2 \\ &= 3 + 3 - 2 \\ &= 4 \end{aligned}$$

$$T_{t \text{ v df } \alpha/2} = T_{t \text{ 4 df } ,0.005} = 4.60$$

ขั้นที่6 สรุปผล ยอมรับ H_0

ดังนั้นผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่ต่างกันที่ระดับความมั่นใจที่ 99%

การเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณกรดเฟอร์รูลิกระหว่างข้าวกล้องงอกกับข้าวกล้อง

ตารางที่ จ.2 ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้องที่วิเคราะห์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ สารละลายอะซิโตนไนโตรล์ : กรดแอสติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

ตัวอย่าง พันธุ์ข้าว	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (มิลลิกรัม/100กรัม)					
	ข้าวกล้องงอก			ข้าวกล้อง		
	Mean	SD	%RSD	Mean	SD	%RSD
ดอกมะลิ 105	14.725	1.189	8.076	14.477	0.513	3.542
หอมมะลิแดง	13.739	2.008	14.619	13.644	3.238	23.732
เสาไห้	14.669	3.312	22.584	14.802	0.008	0.055

ตัวอย่างเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ระหว่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง พันธุ์ดอกมะลิ 105

ขั้นที่1 ตั้งสมมติฐาน

$$H_0 : \mu_{\text{External Standard}} = \mu_{\text{Standard Addition}}$$

$$H_1 : \mu_{\text{External Standard}} \neq \mu_{\text{Standard Addition}}$$

เมื่อ $\alpha = 0.01$

ขั้นที่2 ทดสอบความแปรปรวน ด้วยการทดสอบค่าเอฟ หรือ F-test

$$H_0 : \sigma^2_{\text{External Standard}} = \sigma^2_{\text{Standard Addition}}$$

$$H_1 : \sigma^2_{\text{External Standard}} \neq \sigma^2_{\text{Standard Addition}}$$

สูตรการทดสอบค่าเอฟ คือ $\frac{S_1^2}{S_2^2}$ เมื่อ $S_1^2 > S_2^2 = 1.189^2 / 0.513^2 = 5.372$

ขั้นที่3 อ่านค่า F จากตารางที่3-1 และ $3-1 = 2$ degree of freedom

ที่ $df_1 = 2$ $df_2 = 2$ จากตาราง F แสดงค่าวิกฤต $F = 19$ ที่ $\alpha = 0.05$ และค่าวิกฤต $F = 99$ ที่ $\alpha = 0.01$

การทดสอบนี้มุ่งเน้นที่จะแสดงค่า $\sigma^2_{\text{External Standard}} = \sigma^2_{\text{Standard Addition}}$ จึงควรเลือกค่าวิกฤต ที่ทำให้ยอมรับได้ยากกว่า เพื่อลดโอกาสที่จะเกิดความคลาดเคลื่อนในการยอมรับ H_0 ดังนั้นจึงเลือก

$$F_{t,(2,2), 0.05} = 19$$

$$F_t > F_c \text{ จึงยอมรับ } H_0$$

พิจารณาค่า F-test ถ้า F-test ที่คำนวณ (Fc) ได้น้อยกว่า ค่า F ที่ได้จากราย (Ft) แสดงว่าความแปรปรวนของทั้งสองกลุ่มเท่ากัน ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 นั่นคือยอมรับ H_0 ใช้สูตร

Pooled Variance (เมื่อ $\sigma^2_{\text{External Standard}} = \sigma^2_{\text{Standard Addition}}$)

ขั้นที่4 คำนวณค่า T_c

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left\{ \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right\}}}$$

$$= 0.332$$

ขั้นที่5 คำนวณค่า T_t จากสูตร v df ($\alpha = 0.01$)

$$df = n_1 + n_2 - 2$$

$$= 3 + 3 - 2$$

$$= 4$$

$$T_{t \text{ v df } \alpha/2} = T_{t \text{ 4 df, 0.005}} = 4.60$$

ขั้นที่6 สรุปผล ยอมรับ H_0

ดังนั้นผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดเพอร์รูลิกทั้งข้าวกล้องงอกและข้าวกล้องไม่ต่างกันที่ระดับความมั่นใจที่ 99%