

การพัฒนาการแยกและวิเคราะห์สารสำคัญในเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการแยกภายใต้
สนามการไหลแบบอสมมาตร

DEVELOPMENT OF SEPARATION AND ANALYSIS OF ACTIVE INGREDIENTS IN
FUNCTIONAL DRINKS WITH ASYMMETRICAL FLOW FIELD-FLOW
FRACTIONATION TECHNIQUE

วรินรำไพ เอื้อชินกุล
WARINRAMPAI UAHCHINKUL

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมวัสดุ
วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2561

DEVELOPMENT OF SEPARATION AND ANALYSIS OF ACTIVE
INGREDIENTS IN FUNCTIONAL DRINKS WITH ASYMMETRICAL FLOW
FIELD-FLOW FRACTIONATION TECHNIQUE

WARINRAMPAI UAHCHINKUL

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF ENGINEERING
IN NANOMATERIAL ENGINEERING
COLLEGE OF NANOTECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2018

COPYRIGHT 2018

COLLEGE OF NANOTECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ภาควิชานาโนวิทยาและนาโนเทคโนโลยี
วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
โครงการพิเศษ

หัวข้อโครงการพิเศษ การพัฒนาการแยกและวิเคราะห์สารสำคัญในเครื่องดื่ม
ด้วยเทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหลแบบอสมมาตร

Special Project Title Development of Separation and Analysis of Active Ingredients in
Functional Drinks with Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation
Technique

นักศึกษา วรินรำไพ เอื้อชินกุล

รหัสประจำตัว 58110052

ปริญญา วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต




ภาควิชา นาโนวิทยาและนาโนเทคโนโลยี

สาขาวิชา วิศวกรรมวัสดุนาโน

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุธิ ชูตีไพจิตร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

คณะกรรมการสอบโครงการพิเศษ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. สุธิ ชูตีไพจิตร	
ผศ.ดร. อภิลักษณ์ เอียดเอื้อ	
ดร.ศุภมาส วิรุญจิตร	

ภาควิชานาโนวิทยาและนาโนเทคโนโลยี วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบังอนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมวัสดุนาโน
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดารินี พรหมโยธิน)
หัวหน้าภาควิชานาโนวิทยาและนาโนเทคโนโลยี
วันที่..... 20 เดือน..... มี.ย.พ.ศ. 2562

หัวข้อโครงการพิเศษ	การพัฒนาการแยกและวิเคราะห์สารสำคัญในเครื่องดื่มด้วยเทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหลแบบอสมมาตร
นักศึกษา	นางสาววรินรำไพ เอื้อชินกุล
รหัสประจำตัว	58110052
ปริญญา	วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา	วิศวกรรมวัสดุนาโน
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สุธี ชูดีไพจิตร

บทคัดย่อ

เทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหลแบบอสมมาตร (Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4)) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการแยกสารตามขนาดหรือมวลโมเลกุล ซึ่งสามารถใช้ได้กับตัวอย่างที่หลากหลาย ทั้งอนุภาคขนาดเล็กจนถึงแมโครโมเลกุล โดยการแยกขึ้นกับสัมประสิทธิ์การแพร่ขนาด และแรงจากสนามภายนอก โดย AF4 นั้น เป็นเทคนิคที่มีแขนแนลแบบเปิดทำให้ไม่ต้องใช้วัสดุอื่นในการแยก (เฟสนิ่ง อาทิเช่น คอลัมน์) โดยสามารถวัดสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างได้ โดยใช้ตัวตรวจจับทางแสง ได้แก่ UV-Vis และ Maltiangle Light Scattering (MALS) ในการตรวจจับและคำนวณค่าต่างๆโดยใช้โบรินเซรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin ; BSA) เป็นสารมาตรฐาน โดยได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นตัวอย่าง และค่า Cross flow ที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างโคเอ็นไซม์คิวเท็นและทอรีนในเครื่องดื่มฟังก์ชันนอลสำหรับการแยกและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AF4 โดยสามารถแยกสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นและทอรีนในเครื่องดื่มฟังก์ชันนอล ซึ่งมีการกระจายตัวของขนาดค่อนข้างกว้างได้ ภายใต้เงื่อนไขส่งผลกระทบต่อตัวอย่าง และวัดการกระจายขนาดของตัวอย่างที่แยกและไม่ได้แยกผ่านเทคนิค AF4 ด้วยเทคนิค DLS (Dynamic Light Scattering) และนำมาเปรียบเทียบพบว่าตัวอย่างที่แยกผ่านเทคนิค AF4 อาจไม่เหมาะกับการนำมาวิเคราะห์ด้วย DLS เนื่องจากผลกระทบของสารละลายตัวพา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นถึงข้อดีของเทคนิค AF4 และอาจพัฒนาเทคนิคการแยกสารผสมที่มีส่วนประกอบหลากหลายในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง

Special Project Title	Development of Separation and Analysis of Active Ingredients in Functional Drinks with Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Technique
Student	Warinrampai Uahchinkul
Student ID	58110052
Degree	Bachelor of Engineering
Program	Nanomaterial Engineering
Year	2018
Special Project Advisor	Dr.Sutee Chutipaijit

Abstract

Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) is widely used in fractionating objective size and molar mass from particles and macromolecules with wide span hydrodynamic radius. Based on diffusivity, size and external flow, with the application of an open channel designs of AF4 is void of packing materials. The physical properties of sample directly measured by AF4 technique were concluded. The AF4 system performance for separation and spectrophotometric detection of size was examined using standard size, bovine serum albumin. The size distribution of BSA fraction was measured by an on-line coupled with UV-Vis and MALS detector. In this study, the feasibility of using AF4 for Coenzyme Q10 and taurine fractionation from functional drinks was demonstrated. It was concluded that the concentration of sample and cross flow optimized AF4 in elution step was a potentially characteristic technique for comprehensive understanding of the microstructure and assessment of CoQ10 and taurine in functional drink products, with high polydispersity as model. Furthermore, it offers the possibility to obtain the conformational properties as well as functional properties over wide size distribution of CoQ10 and taurine, under gentle conditions. Therefore, this research might be one of the major strengths of the separation of mixtures for food and cosmetics applications in further research.

กิตติกรรมประกาศ

ในโครงการพิเศษนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับคำปรึกษาและการแนะนำเป็นอย่างดีจาก ผศ.ดร. สุธี ชูติไพจิตร อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องมาโดยตลอด และนางสาว อรุมา เกตุชาติ ที่ได้ให้คำปรึกษาและดูแลผู้วิจัยในการทำโครงการพิเศษนี้ ตั้งแต่เริ่มต้น จนสำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ช่วยให้คำแนะนำ ปรึกษา และประสานงานต่ออาจารย์ที่ ปรึกษาโครงการ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ให้ความสำคัญกับการศึกษาที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และให้กำลังใจมาโดยตลอด และ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ รวมไปถึงทุกท่านที่มีส่วนร่วมในโครงการ พิเศษนี้ ที่คอยให้คำแนะนำ รับฟัง และช่วยให้ข้อมูลเกี่ยวกับการดำเนินโครงการพิเศษ ผู้วิจัยหวังอย่างยิ่งว่า งานวิจัยเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากนักน้อย

นางสาววรินรำไพ เอื้อชินกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	i
Abstract	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญรูป.....	vii
สารบัญตาราง	xiv
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 สมมติฐาน	3
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 โคเอนไซม์คิวเทิน	4
2.2 ทอรีน.....	5
2.3 เทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหล (Field Flow Fractionation; FFF).....	6
2.3.1 หลักการเทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหล	6
2.3.2 เทคนิคย่อยของ Field-Flow Fractionation (FFF)	7
2.3.3 เทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหลแบบไม่สมมาตร [Asymmetrical flow Field-Flow Fractionation (AF4)].....	14
2.3.4 โหมดในการแยกตัวอย่าง (Mode Retention)	18
2.3.5 การเลือกตัวแปรใน Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4)	18
2.3.6 ตัวตรวจจับใน Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4)	19
2.4 การกระเจิงแสงแบบไดนามิก (Dynamic Light Scattering; DLS).....	20
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
3.1 วัตถุประสงค์.....	23
3.1.1 วัตถุประสงค์และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	23
3.1.2 สารเคมี.....	23
3.1.3 อุปกรณ์.....	23
3.1.4 เครื่องมือ.....	24
3.2 วิธีการทดลอง.....	24
3.2.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างและแยกโบวินเซรัมอัลบูมิน (BSA).....	25
3.2.2 วิธีการเตรียมตัวอย่าง แยกและวิเคราะห์สารโคเอ็นไซม์คิวเทิน.....	26
3.2.3 วิธีการเตรียมตัวอย่าง แยกและวิเคราะห์สารทอรีน.....	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	32
4.1 การวิเคราะห์สารมาตรฐานโบวินเซรัมอัลบูมินและโพลีสไตรีน.....	32
4.1.1 การวิเคราะห์สารมาตรฐานโบวินเซรัมอัลบูมินด้วยเทคนิค AF4.....	32
4.1.2 การวิเคราะห์สารมาตรฐานโพลีสไตรีนด้วยเทคนิค DLS.....	34
4.2 การวิเคราะห์สารโคเอ็นไซม์คิวเทินด้วยเทคนิค AF4.....	34
4.2.1 ผลของการแยกสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค AF4.....	34
4.2.2 ผลของการใช้ค่า Cross flow ที่แตกต่างกันสำหรับการแยกสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานด้วยเทคนิค AF4.....	41
4.2.3 ผลของการใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันสำหรับการแยกสารโคเอ็นไซม์คิวเทินในตัวอย่างเครื่องตีด้วยเทคนิค AF4.....	48
4.2.4 วิเคราะห์การกระจายตัวของขนาดอนุภาคโคเอ็นไซม์คิวเทินที่แยกจากเครื่องตีผสมโคเอ็นไซม์คิวเทินด้วยเทคนิค DLS.....	52
4.3 การวิเคราะห์สารทอรีนด้วยเทคนิค AF4.....	55
4.3.1 ผลของการแยกสารทอรีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค AF4.....	55

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.2 ผลของการใช้ค่า Cross flow แตกต่างกันสำหรับการแยกสารทอรีนมาตรฐาน ด้วยเทคนิค AF4	62
4.3.3 การแยกสารทอรีนในตัวอย่างเครื่องต้มด้วยเทคนิค AF4	68
4.3.4 วิเคราะห์การกระจายตัวของขนาดอนุภาคทอรีนที่แยกจากเครื่องต้มผสมทอรีนด้วย เทคนิค DLS.....	72
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาวิจัยและแนวทางการพัฒนา	75
5.1 สรุปผลการศึกษาวิจัย.....	75
5.2 แนวทางการพัฒนาการศึกษาวิจัย	76
บรรณานุกรม	77
ประวัติผู้เขียน	79

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของโคเอ็นไซม์คิวเท็น	4
2.2 โครงสร้างของทอรีน.....	5
2.3 แผนผังแสดงเทคนิคย่อยของ Field-Flow Fractionation (FFF)	7
2.4 หลักการทำงานของ Sedimentation FFF	8
2.5 ภาพประกอบของแซนแนล ThFFF ที่มีส่วนประกอบตัวอย่างสะสมอยู่ที่ผนังแซนแนลเย็น.....	9
2.6 หลักการของ electrical FFF.....	11
2.7 แสดงภายในแซนแนลของ FFFFF	11
2.8 กระบวนการ elution ภายในแซนแนลของ SF4	12
2.9 ภายในแซนแนลของ AF4	13
2.10 แผนภาพของแซนแนลใน AF4.....	17
3.1 แสดงลำดับการทำงานในงานวิจัย.....	24
3.2 แสดงค่า cross flow (ml/min) เทียบกับเวลา (นาที)	25
3.3 แสดงการตั้งโปรแกรม cross flow 3, 2, 1 และ 0 (มิลลิลิตร/นาที) เทียบกับเวลา (นาที)	26
3.4 แสดงลำดับการทำงานในการแยกและวิเคราะห์สารโคเอ็นไซม์คิวเท็นด้วยเทคนิค AF4	27
3.5 แสดงการตั้งโปรแกรม cross flow 3, 2, 1 และ 0 (มิลลิลิตร/นาที) เทียบกับเวลา (นาที)	29
3.6 แสดงลำดับการทำงานในการแยกและวิเคราะห์สารทอรีนด้วยเทคนิค AF.....	30
4.1 (ก) เส้นสีดำแสดงผลสัญญาณจากเครื่องตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) และ สัญญาณสีน้ำเงินแสดงมวลโมเลกุล (กรัม/โมล) ของ BSA เมื่อเทียบกับเวลาที่เปลี่ยนไปในหน่วยนาที (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม.....	333
4.2 (ก) เส้นสีดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศาหน่วยโวลต์ และ สัญญาณสีแดงแสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม.....	355

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.3 (ก) เส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญญาณสีเขียว แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเทิน มาตรฐานความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม	366
4.4 (ก) เส้นสีน้ำเงินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญญาณน้ำเงิน แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ของสารโคเอ็นไซม์คิวเทิน มาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม	377
4.5 (ก) เส้นสีเขียวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญญาณชมพู แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสาร โคเอ็นไซม์คิวเทิน มาตรฐานความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม	38
4.6 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยเส้นสีดำแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรเส้นสีแดงแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ เส้นสีเขียวแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร.....	3939
4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ UV-Vis (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ โดยเส้นสีดำแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีแดงแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ เส้นสีเขียวแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	400

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

หน้า

- 4.8 (ก) เส้นสีดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญญาณสีแดง แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม..... 422
- 4.9 (ก) เส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญญาณสีเขียว แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 1 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญญาณสีแดง แสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม 433
- 4.10 (ก) เส้นสีเขียวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญญาณสีน้ำเงิน แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 2 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม..... 444
- 4.11 (ก) เส้นสีน้ำเงินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญญาณสีชมพู แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม..... 455
- 4.12 เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ สีดำแสดงถึงการใช้ Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที่ สีแดงแสดงถึงการใช้ Cross flow 1 มิลลิลิตร/นาที่ สีเขียวแสดงถึงการใช้ Cross flow 2 มิลลิลิตร/นาที่ และ สีน้ำเงินแสดงถึงการใช้ Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ 466

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

หน้า

- 4.13 (ก) เส้นดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญลักษณ์สีแดง แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเทินในเครื่องตีที่มี ส่วนผสมของโคเอ็นไซม์คิวเทินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สี น้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม 48
- 4.14 เส้นแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญลักษณ์สีน้ำเงิน แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิว- เทินในเครื่องตีที่มีส่วนผสมของโคเอ็นไซม์คิวเทินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและ สัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม..... 49
- 4.15 (ก) เส้นสีน้ำเงินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์และสัญลักษณ์ สีดำ แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเทินในเครื่องตีที่มี ส่วนผสมของโคเอ็นไซม์คิวเทินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/ นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการ เพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม..... 500
- 4.16 เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วย นาที่ และสัญลักษณ์กากบาทแสดงความสัมพันธ์ระหว่างมวลโมเลกุล (กรัม/โมล) กับเวลาในหน่วยนาที่ สีดำแสดงถึงตัวอย่างความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สีแดงแสดงถึงตัวอย่างความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สีน้ำเงินแสดงตัวอย่างความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ สีเขียวแสดงถึง ตัวอย่างโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ 51
- 4.17 (ก) เส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์และสัญลักษณ์สีดำ แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและ สัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม 566

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.18 (ก) เส้นสีดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญลักษณ์สีน้ำเงิน แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสาร ทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและ สัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล.....	577
4.19 (ก) เส้นสีดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญญาณสีแดง แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและ สัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม.....	58
4.20 (ก) เส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์และสัญญาณสีเขียว แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ของสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและ สัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม.....	59
4.21 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ ของสารทอรีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยเส้นสีเขียวแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีแดงแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ เส้นดำแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.....	60
4.22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ UV-Vis (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ โดยเส้นสีเขียวแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีแดงแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเส้นสีดำแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร....	61
4.23 (ก) เส้นสีดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญลักษณ์กากบาท แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนมาตรฐานที่ใช้ค่า Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลใน ตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม.....	62

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.24 (ก) เส้นสีน้ำเงินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์และสัญลักษณ์ สีเขียว แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 1 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและ สัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล.....	63
4.25 (ก) เส้นสีชมพูแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์และสัญลักษณ์ สีดำ แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 2 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความ แตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและ สัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม	64
4.26 (ก) เส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์และสัญลักษณ์สีดำ แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและ สัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม	65
4.27 เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วย นาที่ และสัญลักษณ์กากบาทแสดงความสัมพันธ์ระหว่างมวลโมเลกุล (กรัม/โมล) กับเวลาในหน่วยนาที่ สีแดงแสดงถึงการใช้ Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที่ สีน้ำเงินแสดงถึงการใช้ Cross flow 1 มิลลิลิตร/นาที่ และ สีเขียวแสดงถึงการใช้ Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่.....	66
4.28 (ก) เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญลักษณ์สีดำ แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนในเครื่องตีที่มีส่วนผสมของ ทอรีน ยี่ห้อที่ 1 โดยใช้ความเข้มข้นจากขวดเครื่องตีและใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้น ของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม.....	68
4.29 (ก) เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์ กากบาท แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนในเครื่องตีที่มี ส่วนผสมของทอรีน ยี่ห้อที่ 2 โดยใช้ความเข้มข้นจากขวดฉีตสารโดยตรง โดยใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สี น้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม	69

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.30 (ก) เส้นแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญญาณสี่เหลี่ยม แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนในเครื่องต้มที่มีส่วนผสมของทอรีน ยี่ห้อที่ 3 โดยใช้ความเข้มข้นจากขวดเครื่องต้มและใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญญาณสี่เหลี่ยมแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม.....	70
4.31 เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ สีน้ำเงินแสดงถึงตัวอย่างทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สีชมพูแสดงถึงตัวอย่างเครื่องต้มทอรีนยี่ห้อ 1 สีดำแสดงถึงตัวอย่างเครื่องต้มทอรีนยี่ห้อ 2 และ สีแดงแสดงถึงตัวอย่างเครื่องต้มทอรีนยี่ห้อ 3 เปรียบเทียบ	71

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของอนุภาคโพลีสไตรีนมาตรฐานขนาด 200 นาโนเมตร..... 34
4.2	แสดงค่ามวลโมเลกุลของโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับ MALS 41
4.3	แสดงค่ามวลโมเลกุลของโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานที่ปรับค่า Cross flow ต่างๆกัน โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับ MALS 47
4.4	แสดงค่ามวลโมเลกุลของตัวอย่างเครื่องตีผสมโคเอ็นไซม์คิวเทินที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับ MALS..... 52
4.5	แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของสารมาตรฐานโคเอ็นไซม์คิวเทินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร..... 53
4.6	เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) สารมาตรฐานโคเอ็นไซม์คิวเทินที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4 53
4.7	เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ในตัวอย่างเครื่องตีผสมโคเอ็นไซม์-คิวเทินที่ไม่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4 54
4.8	เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ในตัวอย่างเครื่องตีผสมโคเอ็นไซม์-คิวเทินที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 55
4.9	แสดงค่ามวลโมเลกุลของโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับ MALS 61
4.10	แสดงค่ามวลโมเลกุลของสารทอรีนมาตรฐานที่ปรับค่า Cross flow ต่างๆกัน โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV ร่วมกับ MALS..... 67
4.11	แสดงค่ามวลโมเลกุลของโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานที่ปรับค่า Cross flow ต่างๆกันโดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV ร่วมกับ MALS..... 71
4.12	แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร..... 72
4.13	แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4..... 73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.14 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ในตัวอย่างเครื่องตีผสมทอรีนที่ไม่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4.....	73
4.15 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ในตัวอย่างเครื่องตีผสมทอรีนจำนวน 3 ยี่ห้อ ที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4	74

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารเสริมมีการเติบโตเป็นอย่างมาก และมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ เข้าสู่ตลาดอย่างต่อเนื่อง รวมไปถึงการเติมสารประกอบต่าง ๆ เสริมเข้าไปในเครื่องดื่ม อาทิเช่น ทอรีน และโคเอนไซม์คิวเท็น เป็นต้น ในหนึ่งวันมนุษย์ควรบริโภคสารอาหารแต่ละชนิดในปริมาณที่ไม่น้อยหรือมากเกินไป ซึ่งอาจจะส่งผลต่อสุขภาพร่างกายในทางลบ โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้กำหนดปริมาณสูงสุดของสารต่างๆที่ใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่แนะนำให้บริโภคใน 1 วันเอาไว้เพื่อสุขภาพที่ดีของผู้บริโภค เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับผู้ผลิต เพิ่มความมั่นใจ และให้ข้อมูลที่ถูกต้องกับผู้บริโภค จึงควรมีวิธีในการตรวจสอบปริมาณสารประกอบต่างๆที่เติมเข้าไปในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมรวมถึงผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มภาชนะบรรจุปิดสนิทได้ ซึ่งวิธีการที่ใช้ตรวจสอบปริมาณสารต่างๆในอาหารในปัจจุบันมักจะใช้เทคนิค โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แม้วิธีดังกล่าวจะให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำ แต่ต้องใช้เวลาในการตรวจสอบตัวอย่างมาก มีหลายขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ มีค่าใช้จ่ายสูงทั้งด้านของเครื่องมือและสารเคมี อีกทั้งต้องเลือกคอลัมน์ (solid phase) ที่ใช้ในการแยกสารให้เหมาะสมสำหรับแต่ละตัวอย่าง เป็นการตรวจสอบที่ทำลายตัวอย่าง และต้องใช้ผู้ชำนาญในการตรวจสอบอีกด้วย งานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาและพัฒนาการแยกสารโดยการใช้เทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหลแบบอสมมาตร หรือ Asymmetrical Flow-Field-Flow Fractionation (AF4) มาแยกและวิเคราะห์ตัวอย่างที่ผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากสามารถช่วยลดระยะเวลาในการแยกสาร ลดค่าใช้จ่าย สามารถทำการทดลองได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้งานได้กว้างขวางสำหรับการแยกสารในกลุ่มพอลิเมอร์ เอ็นไซม์ โปรตีน และสารอนินทรีย์ ตั้งแต่อนุภาคขนาดไมโครเมตรจนถึงระดับนาโนเมตร

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการแยกและหาปริมาณโคเอนไซม์คิวเท็น (CoQ10) ในเครื่องดื่มฟังก์ชันนอล (Functional Drink) หรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ กลุ่มเครื่องดื่มเสริมสุขภาพ (Enriched Drink) และทอรีน (Taurine) ในเครื่องดื่มฟังก์ชันนอล กลุ่มเครื่องดื่มให้พลังงาน (Energy Drink) ซึ่งโคเอนไซม์คิวเท็นยังมีความสำคัญ คือช่วยสร้างพลังงานให้กับเซลล์ ช่วยรักษาภาวะหัวใจล้มเหลว ช่วยเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ทั้งลดการเสื่อมสภาพและเพิ่มปริมาณไข่ในเพศหญิง และ ช่วยเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพของสเปิร์มในเพศชาย ช่วยให้ผิวดูอ่อนกว่าวัย ลดอาการปวดหัวจากไมเกรน นอกจากนี้โคเอนไซม์คิวเท็นยังสามารถช่วยลดความเสียหายจากอนุมูลอิสระ ส่งเสริมประสิทธิภาพในการออกกำลังกายและลดความเมื่อยล้าได้ ช่วยลดภาวะเบาหวานได้ ปกป้องสมองจากโรคเกี่ยวกับสมอง เช่น

โรคพากินสัน หรือ อัลไซเมอร์ ปกป้องปอดจากโรค เช่น โรคหอบหืด และอื่นๆ [1] ในขณะที่ ทอรีน เป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญถึงกับมีการกล่าวถึงว่า “The nutritional factor for the longevity of the Japanese” [2] หรือปัจจัยด้านโภชนาการในการมีอายุยืนยาวของชาวญี่ปุ่น ทอรีนช่วยลดผลเสียจากการรับประทานไขมัน กลูโคส และอินซูลินที่มากเกินไปได้ ทำให้สามารถช่วยบรรเทาอาการแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน ทอรีนเพิ่มความแข็งแรงและปกป้องเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและระบบไหลเวียนเลือด ลดความดันโลหิตและอาการหัวใจเต้นผิดจังหวะได้ ป้องกันหลอดเลือดตีบตัน หัวใจวาย และป้องกันเกี่ยวกับความผิดปกติทางการมองเห็นและได้ยิน สามารถป้องกันและบรรเทาอาการลมชัก [3]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาถึงวิธีการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณโคเอนไซม์คิวทีนในเครื่องดื่มฟังก์ชันนอล กลุ่มเครื่องดื่มเสริมสุขภาพ และทอรีนในเครื่องดื่มฟังก์ชันนอล กลุ่มเครื่องดื่มให้พลังงาน โดยทำการประยุกต์ใช้เทคนิค AF4 ในการพัฒนาการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณสารดังกล่าว

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาตัวแปรที่เหมาะสมในการใช้เทคนิค Asymmetrical Flow- Field-Flow Fractionation (AF4) ในการแยกโคเอโนโซมคิวเทินและทอรีนในเครื่องต้มที่มีโคเอโนโซมคิวเทินและทอรีนเป็นส่วนผสม
- 1.2.2 เพื่อศึกษาความสามารถในการแยกขนาด อนุภาคและมวลโมเลกุล และวิเคราะห์โคเอโนโซมคิวเทินและทอรีนที่ผสมอยู่ในเครื่องต้มชนิดต่างๆด้วยเทคนิค Asymmetrical Flow- Field-Flow Fractionation (AF4) ร่วมกับเทคนิค Dynamic light scattering (DLS)

1.3 สมมติฐาน

สามารถพัฒนาเทคนิคใหม่ในการแยกทอรีนและโคเอโนโซมคิวเทินที่ผสมอยู่ในเครื่องต้มฟังก์ชันนอล โดยใช้เครื่องมือ Asymmetrical Flow- Field-Flow Fractionation (AF4) ที่ต่อกับตัวตรวจจับ Ultraviolet/Visible Spectroscopic Detectors (UV-Vis) และ Multi Angle Light Scattering Detectors (MALS) ได้ สามารถระบุและแยกตัวอย่างแต่ละชนิดออกมาได้ และได้ปริมาณเท่ากับหรือใกล้เคียงกับความเป็นจริง

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย เครื่องต้มที่มีโคเอโนโซมคิวเทินเป็นส่วนผสมและเครื่องต้มที่มีทอรีนเป็นส่วนผสม

ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรต้น การปรับพารามิเตอร์ของเทคนิค AF4 ได้แก่ ความเข้มข้นของตัวอย่าง และ ค่า Cross flow ในการแยกสาร

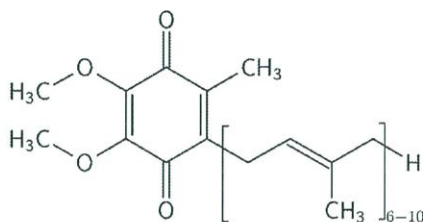
ตัวแปรตาม ปริมาณและคุณภาพของสารสำคัญที่แยกได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โคเอนไซม์คิวเท็น

โคเอนไซม์คิวเท็นมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ Ubiquinone, Ubidecarenone หรือ Mitoquinone มีชื่อสามัญคือ Coenzyme Q10, CoQ10 หรือ Vitamin Q10 โดยโคเอนไซม์หมายถึงสารอินทรีย์ที่ไม่ใช่โมเลกุลของโปรตีน Q หมายถึง สารเคมีกลุ่ม quinone และ 10 หมายถึง มี isoprenyl 10 หน่วยย่อยในโมเลกุล โคเอนไซม์คิวเท็นเป็นสารสังเคราะห์ที่ร่างกายสามารถผลิตได้เองตามธรรมชาติ มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{59}H_{90}O_4$ และมีมวลโมเลกุล 863.365 กรัมต่อโมล



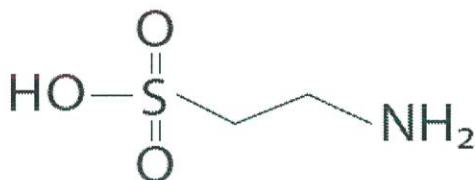
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของโคเอนไซม์คิวเท็น
ที่มา : Int J Cosmet Sci (2009)

โคเอนไซม์คิวเท็นมีลักษณะคล้ายวิตามินอีและวิตามินเค สามารถละลายได้ในไขมัน พบได้ในทุกเซลล์ของร่างกาย โดยจะอยู่ที่ส่วนเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรียที่ทำหน้าที่ในการผลิตพลังงานพื้นฐานของเซลล์ ส่วนใหญ่พบมากตามอวัยวะที่ต้องการพลังงานสูง เช่น หัวใจ ตับ และตับอ่อน [4] เป็นสารที่ช่วยเหลือการทำงานของเอ็นไซม์ในร่างกายหลายชนิด ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างวิตามินและเกลือแร่ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายหน้าที่ของโคเอนไซม์คิวเท็นคือช่วยในการออกซิเดชันของ กรดไขมันเพื่อเปลี่ยนให้เป็นพลังงาน (ATP) แก่ร่างกาย ช่วยทำให้เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆของร่างกายทำงานเป็นปกติอย่างมีประสิทธิภาพและยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยชะลอเสื่อมสภาพของเซลล์ต่างๆในร่างกายอีกด้วย เนื่องจากแสงแดดมีผลให้ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระลดลง การมีอายุเพิ่มขึ้นพบว่ามี การสร้างโคเอนไซม์คิวเท็นลดลงเช่นกัน จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผิวหนังเกิดริ้วรอยเมื่อมีอายุมาก ส่วนประโยชน์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด พบว่าช่วยให้กล้ามเนื้อหัวใจทำงานดีขึ้น อาการของโรคหัวใจดีขึ้น ความดันโลหิตในผู้ที่มีความดันโลหิตสูงลดลง จากการศึกษาพบว่าภาวะการขาดสารโคเอนไซม์คิวเท็น พบในผู้ป่วยโรคหัวใจ เช่น ภาวะหัวใจล้มเหลวจากเลือดคั่งอาการปวดเค้นหน้าอก และความดันโลหิตสูง โคเอนไซม์คิวเท็นสามารถพบได้ในอาหารต่างๆ เช่น น้ำมัน

ปลา ปลาแซลมอน ปลาซาติน ปลาทะเลบางชนิด เนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์ เช่น หัวใจและตับ ในถั่วลิสง น้ำมันถั่วเหลือง ขนาดที่แนะนำให้รับประทานต่อวันสำหรับวัยผู้ใหญ่ คือ 30 มิลลิกรัม แต่สำหรับผู้ที่เป็นโรคซราหรือเป็นโรคอื่น ๆ ควรรับประทาน 50 – 100 มิลลิกรัม ต่อวัน ผู้ที่ควรได้รับโคเอนไซม์คิวเท็นเสริม ได้แก่ ผู้ป่วยเกี่ยวกับโรคหัวใจ ผู้ป่วยที่มีภาวะขาดโคเอนไซม์คิวเท็น ผู้ที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับไมโตรคอนเดรีย ผู้ป่วยไมเกรน บุคคลที่เป็นโรคเกี่ยวกับเหงือก หรือบุคคลที่เป็นโรคพาร์กินสัน เป็นต้น [5] โดยโคเอนไซม์คิวเท็นมักจำหน่ายอยู่ในรูปผลิตภัณฑ์อาหารเสริมแบบแคปซูล หรือถูกนำมาผสมในเครื่องดื่มเช่นเดียวกับคอลลาเจน

2.2 ทอรีน

ทอรีน หรือ beta-aminoethanesulfonic acid เป็นกรดอะมิโนไม่จำเป็นซึ่งร่างกายสามารถสังเคราะห์เองได้ เป็นสารประกอบที่เป็นผลึก ไม่มีสี มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น $C_2H_7NO_3S$ มีคุณสมบัติเป็นกลาง มีน้ำหนักโมเลกุล 125 กรัม ละลายที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส พบได้มากในเซลล์ประสาท กล้ามเนื้อลาย กล้ามเนื้อหัวใจ เกล็ดเลือด และสมองที่กำลังเจริญเติบโต [6]



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของทอรีน

ที่มา : AOR US (2018)

ประโยชน์ของทอรีนมีมากมาย เช่น ส่งเสริมการเจริญเติบโต แก้อาการอ่อนเพลีย ส่งเสริมการมองเห็นและป้องกันศูนย์กลางจอประสาทตาเสื่อม ช่วยในการขนส่งไอออน เช่น โซเดียมโพแทสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียม ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด เสริมสร้างเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ตีต่อระบบไหลเวียนเลือด สามารถช่วยควบคุมปริมาณแคลเซียมในหัวใจให้พอดี ทำให้ร่างกายดึงแคลเซียมมาใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจได้อย่างสมดุล ซึ่งทำให้ไม่เกิดภาวะมีแคลเซียมมากเกินไปในหัวใจ แม้ในสภาวะที่มีแคลเซียมสูง ทำให้ช่วยรักษาภาวะหัวใจวายได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดความดันโลหิต ควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจ การสูบฉีดเลือด และช่วยทำให้ความเข้มข้นของเกล็ดเลือดเป็นปกติ โดยการลดการเกาะตัวของเกล็ดเลือด ช่วยคลายความเครียด รักษาโรควิตกกังวล ส่งเสริมการทำงานของอินซูลิน ช่วยควบคุมการทำงานและการพัฒนาของระบบประสาท [7] นอกจากนี้ทอรีนยังเป็นแอนติออกซิแดนท์ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระและสารพิษ เสริมความแข็งแรงให้กับเยื่อหุ้มเซลล์และยังเป็น

ตัวควบคุมน้ำในเซลล์สมองอีกด้วย ปัจจุบันมีหลักฐานทางด้านระบาดวิทยาแสดงว่ามนุษย์กลุ่มที่มีอายุยืนจะเป็นกลุ่มที่ได้รับทอรีนมากกว่ากลุ่มอื่นๆ การเสริมทอรีนสามารถป้องกันโรคเบาหวานและโรคอ้วนในสัตว์ทดลองและสามารถบรรเทาผลกระทบของภาวะทั้งสองในมนุษย์ได้ โดยปกติมนุษย์จะสามารถสร้างทอรีนเองได้ในผู้ใหญ่ แต่จะสร้างทอรีนได้น้อยในทารก หรือ ผู้ที่มีภาวะเสี่ยงจากการขาดทอรีน เช่น บุคคลที่ขาดเมทไทโอนีนหรือซิสเตอีน บุคคลที่บริโภคมังสวิรัตโดยไม่รับประทานไข่ คนที่ขาดเอนไซม์ *cystathionase* CSAD และ วิตามินบี 6 คนที่เป็นโรคการดูดซึมบกพร่องเรื้อรังและคนที่เป็นโรคตับเรื้อรังชนิดที่ไม่สามารถสร้างทอรีนได้ เป็นต้น

ทอรีนจะพบได้เฉพาะในสัตว์เท่านั้น ไม่พบในพืช หรือถ้าพบก็มีปริมาณน้อยมากๆ คือประมาณ 0.01 ไมโครโมลต่อกรัม แหล่งที่พบทอรีน ได้แก่ ในไข่ นม เนื้อสัตว์ ปลาโดยเฉพาะปลาทูน่า หอยชนิดต่างๆ เช่น หอยแมลงภู่ หอยนางรม รวมไปถึงสาหร่ายทะเลโดยเฉพาะสาหร่ายแดง การสร้างทอรีนต้องอาศัยวิตามินบี 6 เป็นโคแฟกเตอร์ การขาดวิตามินบี 6 จะส่งผลให้สร้างทอรีนลดลงและขับทอรีนออกมาทางปัสสาวะอีกด้วย ในเครื่องดื่มชูกำลังไม่มีการกำหนดปริมาณทอรีน ส่วนใหญ่ใช้อยู่ที่ประมาณ 800 มิลลิกรัม แต่ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 293) พ.ศ.2548 จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนดให้ปริมาณสูงสุดที่ใช้ได้ตามคำแนะนำให้บริโภคใน 1 วัน คือไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัม ปัจจุบันยังไม่พบการเป็นพิษของทอรีนในคน แต่หากขาดทอรีนจะส่งผลต่อทารกทำให้มีการเจริญเติบโตที่ช้าลง หากขาดทอรีนอย่างรุนแรงจะเกิดอาการเซื่องซึม ผมเปลี่ยนสี ตับถูกทำลาย สูญเสียกล้ามเนื้อและไขมัน ผอม ผิวหนังอักเสบหรือแห้ง และอ่อนเพลีย โดยทอรีนนิยมนำมาผสมในผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องดื่มชูกำลังและในอาหารของสัตว์ เช่น แมว และสุนัข [8]

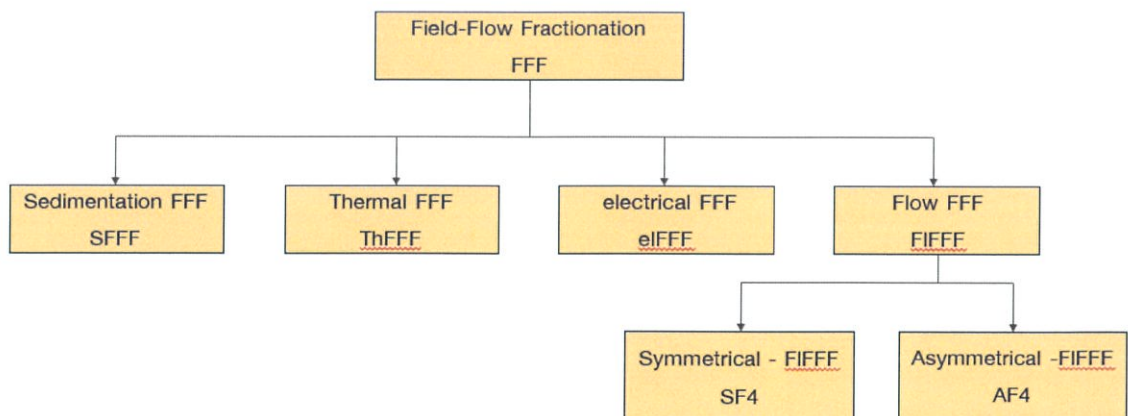
2.3 เทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหล (Field Flow Fractionation; FFF)

2.3.1 หลักการเทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหล

เทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหล (Field-Flow Fractionation; FFF) เป็นเทคนิคใช้สำหรับการแยกและการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของโมเลกุลขนาดใหญ่ คอลลอยด์ ไปจนถึงอนุภาคขนาดเล็ก สามารถแยกสารตัวอย่างที่มีขนาดอนุภาคได้ในช่วงที่กว้างคือตั้งแต่ 1 นาโนเมตร ถึง 100 ไมโครเมตร หรือแยกโมเลกุลได้ในช่วง $10^3 - 10^{15}$ กรัมต่อโมล ที่อยู่ในตัวกลางของเหลวได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง โดยการแยกใน FFF เกิดจากการให้แรงภายนอกที่ตั้งฉากกับทิศการไหลหลัก ซึ่งจะกล่าวถึงในย่อหน้าถัดไป และเป็นารแยกที่ละเอียดอ่อนเนื่องจากเป็นแขนแนลเปิดและไม่มีเฟสคงที่ทำให้ไม่มีแรงเฉือนและแรงเค้นของโมเลกุล ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงปัญหาต่างๆได้ เช่น ผลจากการกรองหรือดูดซับ การสลายของสายโซ่โมเลกุลเนื่องจากแรงเฉือนระหว่างเฟสคงที่กับตัวอย่าง และการใช้เวลานาน

FFF นี้ประกอบด้วยเทคนิคย่อยหลายเทคนิค เช่น sedimentation FFF, thermal FFF, electric FFF และ flow FFF ซึ่งแต่ละเทคนิคย่อยนั้นใช้หลักการในการแยกพื้นฐานที่เหมือนกัน แตกต่างกันที่แรงภายนอกที่ใช้ในการแยก โดยหลักการพื้นฐานของ FFF คือใช้วิธีการชะสารตัวอย่าง โดยใช้เฟสของเหลวเพียงเฟสเดียวในการแยกสาร และให้แรงจากภายนอกเข้าไปในทิศทางตั้งฉากกับ ทิศทางการไหลหลักผ่านแขนแนลที่มีลักษณะคล้ายริบบินบาง ทำให้เกิดการชะลอการเคลื่อนที่ของ ตัวอย่างในสารละลายและตัวอย่างที่ต้องการวัดจะเกิดการสะสมเข้าหาผนังแขนแนลด้านล่าง เรียกว่า ผนังสะสม (accumulation wall) ซึ่งประกอบด้วยเมมเบรน วางอยู่บนผนังที่มีรูพรุน โดยแขนแนลมีความยาวในช่วง 20-50 เซนติเมตร ความกว้าง 2-3 เซนติเมตร และ มีความหนา 0.01-0.05 เซนติเมตร เมื่อทำการปั๊มตัวพาเข้าไปภายในแขนแนลจะเกิดการสร้างลักษณะการไหลแบบพาราโบลา (laminar Newtonian flow) ในแขนแนล คือมีความเร็วในการไหลสูงที่สุดบริเวณศูนย์กลางของท่อ และความเร็วของการไหลจะลดลงเมื่อเข้าใกล้บริเวณผนังท่อ โดยการแยกโมเลกุลออกจากกันหรืออนุภาคที่ต่างกัน เกิดจากความแตกต่างของสัมประสิทธิ์การแพร่ของตัวอย่างที่ทำการแยก และกลุ่มตัวอย่างที่ถูกแยกจะถูกตัวพาไหลเข้าสู่เครื่องตรวจจับ เพื่อทำการวิเคราะห์และไหลออกไปยังทางออกด้วยเวลาที่ต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของสัมประสิทธิ์การแพร่ หรือความหนาแน่น หรือ ประจุของอนุภาค ตามแต่ละเทคนิคย่อย

2.3.2 เทคนิคย่อยของ Field-Flow Fractionation (FFF)

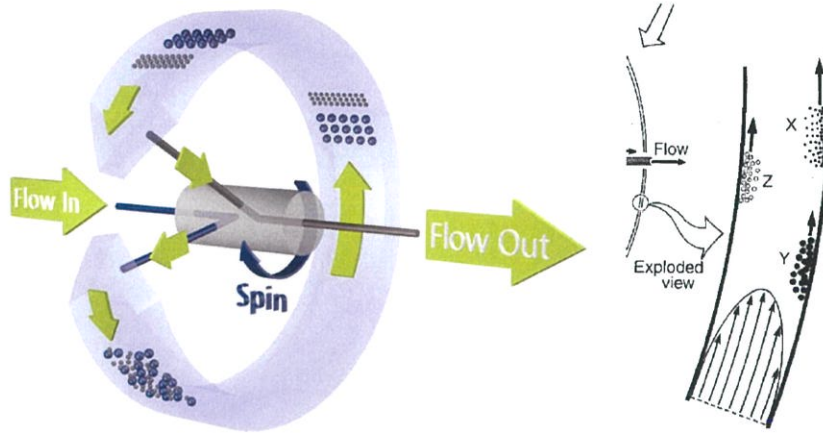


รูปที่ 2.3 แผนผังแสดงเทคนิคย่อยของ Field-Flow Fractionation (FFF)

ที่มา : <http://www.postnova.com>

2.3.2.1 Sedimentation FFF (SFFF) หรือ Centrifugal FFF (CFFF) เป็นเทคนิคที่มีแขนแนลสองแขนแนลที่อยู่ใกล้กันมากและขนานกัน เมื่อแขนแนลนี้หมุนในเครื่องปั่นเหวี่ยง ตัวอย่าง

ที่มีการละลายและ สารแขวนลอยที่มีความหนาแน่นมากกว่าตัวพาจะถูกแรงผลึกให้ไปอยู่ด้านนอกของผนัง ส่วนตัวอย่างที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าตัวพาจะเกิดการลอยตัวขึ้นและส่วนประกอบตัวอย่างนั้นจะสะสมอยู่ที่ผนังด้านใน เนื่องจากการเพิ่มความเร็วยิ่งขึ้นในการปั่นเหวี่ยง การแยกสารแขวนลอยจะเกิดจากความแตกต่างของความหนาแน่นของตัวถูกละลายและการลอยตัวของตัวถูกละลาย (z) ตรงข้ามกับแถบของกลุ่มตัวอย่างที่หนาแน่น (x,y) ทำให้สามารถแยกส่วนประกอบที่แขวนลอยออกจากกันดังรูป 2.4



รูปที่ 2.4 หลักการทำงานของ Sedimentation FFF

ที่มา : <http://www.postnova.com>

ขนาดของอนุภาคที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคนี้อยู่ในช่วง 10 นาโนเมตร ถึง 20 ไมโครเมตร ขึ้นกับวัสดุตัวอย่าง ความหนาแน่นของตัวพา และ ขึ้นกับความเร็วสูงสุดของเครื่องปั่นเหวี่ยง ในอุปกรณ์ SFFF ที่ทันสมัยมีแรงโน้มถ่วงมากถึง 100 ถึง 1000g สามารถแยกอนุภาคได้ช่วงที่กว้างและเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ความหนาแน่นของตัวพาสามารถปรับให้น้อยลงได้โดยการเติมสารละลายอินทรีย์เข้าไป ในทางกลับกันความหนาแน่นจะเพิ่มขึ้นถ้าเติมเกลือหรือน้ำตาลลงไปหรือเพิ่มน้ำเข้าไปในสารละลายอินทรีย์ หลักการทางทฤษฎีของ SFFF สรุปด้วยสมการ (2.1) ด้านล่าง

$$F = \frac{\pi d_H^3 G |\Delta\rho|}{6}$$

(2.1)

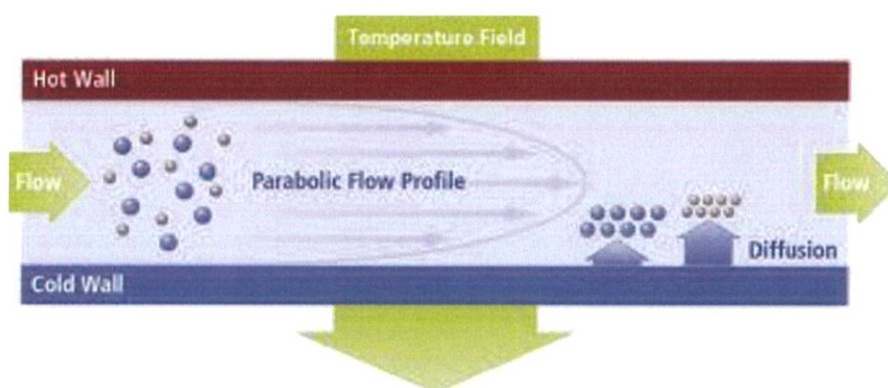
| F | คือ effective driving force ต่อตัวถูกละลาย

G คือ ความเร็วของแรงปั่นเหวี่ยงหรือแรงโน้มถ่วง

$|\Delta p|$ คือ ความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างองค์ประกอบตัวอย่างกับสารละลายที่ใช้
 d_H คือ เส้นผ่าศูนย์กลางทรงกลมของส่วนประกอบตัวอย่าง

SFFF เหมาะกับการนำไปใช้งานทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น จำแนกลักษณะเกี่ยวกับดินและการตกตะกอนของคอลลอยด์ การแยกวัสดุนาโน ไบโอฟอลิเมอร์ โมเลกุลขนาดใหญ่ หรือ การแยกกลุ่มเซลล์และการใช้งานทางด้านอาหาร การเกษตร และ เครื่องสำอาง

2.3.2.2 Thermal FFF (ThFFF) ThFFF เป็นเครื่องมือแรกที่ใช้สำหรับการแยกโพลีสไตรีนและเริ่มมีการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการแยกส่วนประกอบพอลิเมอร์ในปี 1978 เหมาะสำหรับการแยก โพลิเมอร์ เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันจะมีการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกันหรือแยกพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบสายโซ่กับแบบกิ่ง และยังสามารถแยกพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากันแต่เป็นพอลิเมอร์ต่างชนิดกันได้ เช่น PS กับ PMMA โดยสามารถแยกได้ตั้งแต่ขนาด 10 กิโลดาลตัน ถึง 100 เมกะดาลตัน รูปร่างแบนแนลของ ThFFF แสดงดังรูปที่ 2.5 ด้านล่าง



รูปที่ 2.5 ภาพประกอบของแบนแนล ThFFF ที่มีส่วนประกอบตัวอย่างสะสมอยู่ที่ผนังแบนแนลเย็น

ที่มา : <http://www.postnova.com>

จากความแตกต่างที่มากของอุณหภูมิตามขวางของแบนแนล การแพร่กระจายความร้อนจะทำให้ส่วนประกอบมีการเคลื่อนที่มาเกาะกลุ่มและมีความเข้มข้นมากขึ้นที่บริเวณใกล้ผนังเย็น ตัวอย่างที่ทดลองมักเป็นพอลิเมอร์และคอลลอยด์ อุณหภูมิระหว่างผนังร้อนที่ให้ความร้อนด้วยตัวลัดไฟฟ้าและผนังเย็นที่ระบายความร้อนด้วยน้ำเย็นสามารถแตกต่างกันได้ 100 องศาเซลเซียส การคำนวณและแรงขับเคลื่อนใน ThFFF สามารถทำได้ตามสมการ (2.2) ด้านล่าง

$$|F| = kT \frac{D_T}{D} \frac{dT}{dx}$$

(2.2)

$|F|$ คือ effective driving force ต่อตัวถูกวิเคราะห์

D_T คือสัมประสิทธิ์การแพร่ความร้อน

T คือ อุณหภูมิ

D คือสัมประสิทธิ์การแพร่

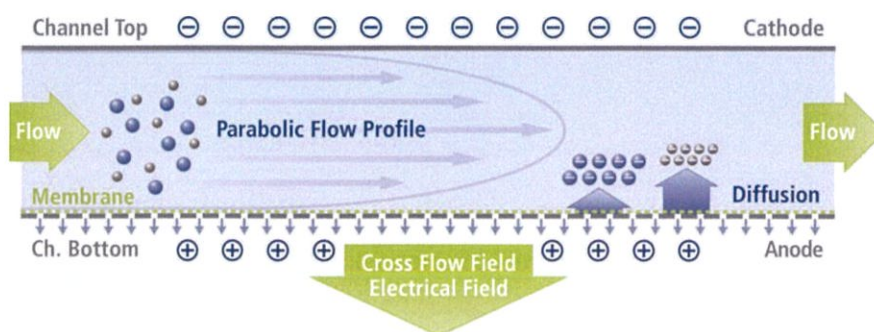
โดยการประมาณค่าในเทคนิค ThFFF นั้นซับซ้อนมากที่สุดในเทคนิคย่อยของ FFF

2.3.2.3 electrical FFF (elFFF) เหมาะสำหรับการแยกขนาดอนุภาค มวลโมเลกุล และความหนาแน่นของประจุพื้นผิวของตัวอย่าง นอกจากนี้ยังสามารถหาค่าศักย์ซีต้าได้อีกด้วย แชนแนลของ elFFF ทำจากแผ่นแกรไฟต์สองแผ่นซึ่งทำหน้าที่เป็นทั้งผนังแชนแนลและขั้วอิเล็กโทรด ถูกคั่นด้วยเทฟลอน มีการเปิดแชนแนลกว้างประมาณ 150 ไมโครเมตร เมื่อให้ค่าศักย์ไฟฟ้า ประมาณ 100 – 200 โวลต์ต่อเมตร จะทำให้ความแข็งแรงของสนามมีประสิทธิภาพที่มากขึ้นตามลำดับ และเพื่อให้สนามแข็งแรงเท่ากับภายใน capillary electrophoresis ควรจะให้ศักย์ไฟฟ้าที่ 20 – 30 กิโลโวลต์ นอกจากนี้การแยกโดยใช้ไฟฟ้ามีความเป็นไปได้น้อยที่จะแยกอนุภาคที่มีไซส์แตกต่างกันแต่มีความหนาแน่นของประจุพื้นผิวที่เหมือนกันเนื่องจากสนามไฟฟ้า E มีความสัมพันธ์กับความเร็วดริฟท์ U ของชิ้นส่วนตัวอย่างที่มี electrophoretic mobility μ_e โดย $U = \mu_e E$ และแรง F ที่กระทำต่อตัวอย่างสามารถแสดงตามสมการ (2.3) ด้านล่าง

$$\lambda = \frac{D}{\mu_e E w}$$

(2.3)

elFFF มีข้อจำกัดคือ ขั้วไฟฟ้าจะจำกัดชนิดของสารละลายตัวพาที่สามารถใช้ได้ นอกจากนี้ความแตกต่างระหว่างสารละลายและของเหลวมีผลต่อการเก็บตัวอย่าง (retention) กล่าวคือความเข้มข้นของตัวอย่างจะส่งผลถึงข้อมูลที่จะได้รับ หลักการใน electrical FFF แสดงดังรูป 2.6 ด้านล่าง

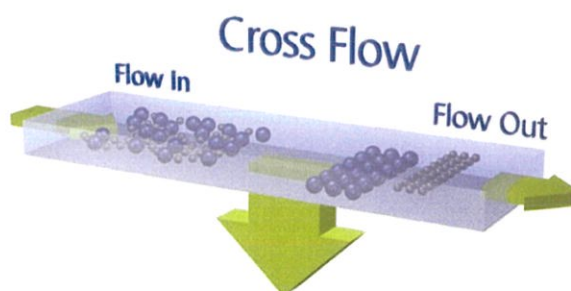


รูปที่ 2.6 หลักการของ electrical FFF

ที่มา : postnova (Online)

elFFF เหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านยา เช่น ตัวอย่างประเภทโปรตีน แอนติบอดี ไวรัส และการขนส่งยา ทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น แยกอนุภาคนาโนจากในดิน ซิลิกา หรือ แยกไทเทเนียม ไดออกไซด์ หรือแยกอนุภาคนาโน เช่น อนุภาคนาโนที่มีประจุไฟฟ้า หรือ วัสดุนาโนระดับสูง

2.3.2.4 flow-FFF (FIFFF) เป็นเทคนิคย่อยที่นิยมและมีความครอบคลุมที่สุดของเทคนิค FFF เทคนิคนี้ใช้การไหลของตัวพลาอิกสายในทิศการไหลลงมาตั้งฉากกับการไหลหลักที่เรียกว่า cross flow เพื่อใช้ในการแยกดังรูป 2.7 ด้านล่าง [9]



รูปที่ 2.7 แสดงภายในแขนแนลของ FIFFF

ที่มา : postnova (Online)

ใน FIFFF การแยกจะเกิดจากแรงสนามภายใน เหมาะกับตัวอย่างที่หลากหลายที่มีสัมประสิทธิ์การแพร่แตกต่างกัน ส่วน SFFF, TFFF และ ELFFF เป็นเทคนิคที่ใช้กับตัวอย่างที่มีความเฉพาะเจาะจงมากกว่าใน FIFFF โดยเลือกใช้สนามการแยกให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่อาจแยกด้วย FIFFF ไม่ได้ โดยการแยกตัวอย่างจะเกิดจากสนามภายนอกที่ให้เข้าไป เนื่องจากการแยกอาศัยเพียงความแตกต่างของสัมประสิทธิ์การแพร่ FIFFF จึงเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุด โดยสามารถใช้วิเคราะห์ลักษณะตัวอย่างได้ตั้งแต่ตัวละลายที่มีมวลโมเลกุล 500 กรัมต่อโมล และ อนุภาคขนาด <math>< 2</math> นาโน

เมตร จนถึงขนาด 100 ไมโครเมตร ขนาดตัวอย่างเล็กที่สุดที่จะแยกได้ถูกกำหนดโดยมวลโมเลกุลคัตออฟ (molecular weight cut-off) ของเมมเบรนแต่ละประเภท ส่วนขีดจำกัดในการแยกได้ถูกกำหนดโดยความสูงของแขนแนล โดยขนาดอนุภาคมีความสูงไม่เกิน 20% ของความสูงของแขนแนล แรงผลักดันของการแยกใน FLFFF ที่กระทำกับตัวอย่างวิเคราะห์โดย cross flow สามารถแสดงเป็นสมการ (2.4) ด้านล่าง

$$|F| = f|U| = 3\pi\mu d|U| = \frac{kT|U|}{D} \quad (2.4)$$

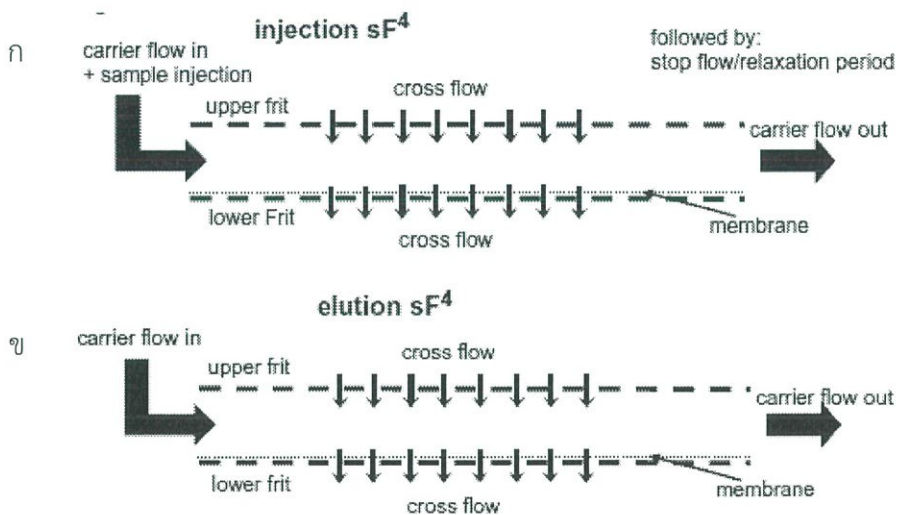
เมื่อ d_H คือ hydrodynamic diameter ของตัวอย่าง

$|U|$ คือ ความเร็วของ cross flow ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ในการทดลอง

D คือ สัมประสิทธิ์การแพร่

จากสมการด้านบนแสดงให้เห็นว่า เมื่อ $|U|$ กระทำต่อแต่ละส่วนขององค์ประกอบด้วยความเข้มข้นที่จำเพาะ การแยกของตัวอย่างจะเกิดเนื่องจากมิติตามธรรมชาติของมัน ซึ่งก็คือสัมประสิทธิ์การแพร่ D [9] โดยเทคนิคย่อยของ FLFFF สามารถแบ่งได้อีกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

(1) เทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหลแบบสมมาตร (Symmetrical Flow Field-Flow Fractionation; SF4)



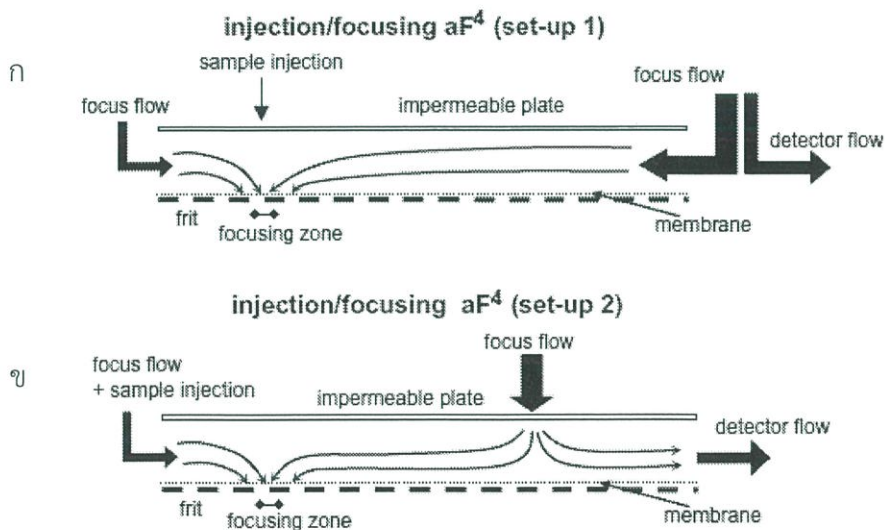
รูปที่ 2.8 กระบวนการ elution ภายในแขนแนลของ SF4

ที่มา: Frank von der Kammer. (2011)

ภายในแขนแนลของ SF4 จะประกอบไปด้วยฟritรูพรุนกึ่งซึมผ่านทั้งด้านบนและล่าง (จากรูป 2.8ก และ 2.8ข คือ upper frit และ lower frit) อยู่ภายใน external blocks ในขั้นตอนการฉีดสารตัวอย่างหรือ injection ของ SF4 ดังรูป 2.8ก จะพบว่าตัวพากับสารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าทางด้านซ้ายสุดของแขนแนล โดยมีการไหลในทิศทางตั้งฉาก (cross flow) ซึ่งเป็นแรงจากสนามภายนอกกระทำอย่างสม่ำเสมอทั้งแขนแนลในทิศทางตั้งฉากกับการไหลหลัก การไหลหลักในแขนแนลจะถูกหยุดในช่วงเวลารีแลกซ์เซชัน เพื่อสูบ cross flow เข้าไปในแขนแนลปริมาตรหนึ่ง ในช่วงเวลาสั้นๆ นี้ องค์ประกอบของตัวอย่างจะหาตำแหน่งสมดุลที่แรงจากสนามภายนอกและการแพร่สมดุลกัน ดังนั้น ตัวอย่างจะแพร่กระจายตามขนาดของตัวอย่างที่ความสูงแขนแนลต่างๆ กันเนื่องจากมีสัมประสิทธิ์การแพร่ต่างกัน หลังจากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนของการชะหรือ elution โดยการไหลหลักจะทำการชะตัวอย่างออก โดยตัวอย่างขนาดเล็กจะอยู่ห่างจากผนังแขนแนลด้านล่างมากกว่าและถูกชะออกไปก่อนตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่

(2) เทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหลแบบไม่สมมาตร (Asymmetrical flow Field-Flow Fractionation; AF4)

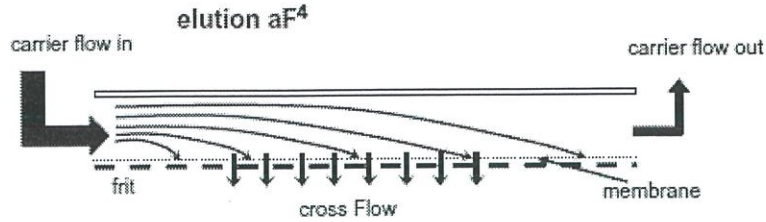
AF4 ต่างจาก SF4 เนื่องจากผนังด้านบนของแขนแนลถูกแทนที่ด้วยแผ่นกระจกที่มีคุณสมบัติไม่สามารถซึมผ่านแทน ส่วนผนังด้านล่างแขนแนลจะเป็นเมมเบรนที่มีความสามารถในการซึมผ่านที่สามารถดูดซับได้ โดย cross flow จะถูกปั๊มเข้ามาจากจุดๆ หนึ่งของผนังด้านบน ต่างจาก SF4 ส่งผลให้การแยกมีประสิทธิภาพที่สูงกว่าใน SF4



รูปที่ 2.9 ภายในแขนแนลของ AF4

ที่มา: Frank von der Kammer. (2011)

ค



รูปที่ 2.9 (ต่อ)

ขนาดรูพรุนในเมมเบรนของ AF4 จะต้องมีขนาดที่ทำให้ตัวทำละลายสามารถไหลผ่านได้ในขณะที่อนุภาคของตัวอย่างยังถูกกักไว้ ใน AF4 กระบวนการรีแลกซ์เซชัน ถูกเรียกว่า รีแลกซ์เซชัน – การโฟกัส (relaxation-focusing) คือตัวพาสสามารถไหลเข้ามาจากทั้งสองทางคือ ทางเข้าและทางออกของแขนแนล และมาพบกันที่จุดๆหนึ่ง ซึ่งเรียกว่าจุดโฟกัส (focusing point) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ทำให้ตัวอย่างนิ่งและเกิดการแยกชั้นระหว่างตัวอย่างที่มีสัมประสิทธิ์การแพร่ที่แตกต่างกัน หากกระบวนการรีแลกซ์เซชัน – การโฟกัส เสร็จสมบูรณ์ตัวอย่างจะเกิดภาวะสมดุลหลังจากฉีดตัวอย่างเข้าไป [9] และหลังจากนั้นจะเป็นกระบวนการชะ (elution) ดังรูปที่ 2.9

2.3.3 เทคนิคการแยกภายใต้สนามการไหลแบบไม่สมมาตร [Asymmetrical flow Field-Flow Fractionation (AF4)]

2.3.3.1 ทฤษฎีของ AF4

ทฤษฎีของ FLFFF ที่กล่าวข้างต้นสามารถใช้ได้กับ AF4 และ retention modes ที่ต่างกันโดยตรง หลังจากฉีดตัวอย่างเข้าไปแล้ว โมเลกุลตัวอย่างจะกระจายไปทั่วแบบเนื้อเดียวกันผ่านความหนาแขนแนล (w) และถูกผลักไปยังด้านล่างของแขนแนลด้วยแรงจากสนามไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic force field) ที่ให้ไปจากภายนอก สุดท้ายจะมีการกระจายความเข้มข้นแบบเอกซ์โพเนนเชียลเกิดขึ้นที่ผนังสะสม เนื่องจากผนังสะสมทำหน้าที่เป็นเหมือนกำแพงหรืออุปสรรคในการเคลื่อนที่ของอนุภาค การเคลื่อนไหวสุทธิของกลุ่มตัวอย่างเนื่องจากสนามภายนอกเกิดขึ้นเพราะการแพร่จากบริเวณความเข้มข้นสูงที่ผนังสะสมไปยังบริเวณที่มีระดับความเข้มข้นต่ำกว่า

หลังจากช่วงรีแลกซ์เซชันจะเป็นเทอมของไดนามิกสเตรตตี (dynamic steady) โดยให้ λ คือ อัตราส่วนของ l กับ w . (ระยะห่างเฉลี่ยระหว่างอนุภาคของตัวอย่างกับผนังแขนแนล) สำหรับ FLFFF λ เกี่ยวข้องกับสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient) หรือ D ของอนุภาคตัวอย่าง ปริมาตรแขนแนลที่ว่างเปล่า V^0 อัตราของ cross flow V_c และ ความหนาแขนแนล w ตามสมการ (2.5) ด้านล่าง

$$\lambda = \frac{l}{w} = \frac{DV^0}{w^2 \dot{V}_c} \quad (2.5)$$

ตามสมการ (1) V^0 และ w เป็นค่าคงที่ของลักษณะ รูปทรงของแขนแนลและ V_c อัตราการไหลที่สามารถวัดปริมาณได้ การแยกบริเวณอนุภาคต่างๆในแขนแนลจึงขึ้นอยู่กับความแตกต่างของค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของอนุภาค เนื่องจากรูปแบบการไหลแบบพาราโบลา อนุภาคจะเกิดการเคลื่อนย้ายผ่านแขนแนลแตกต่างกันตามระยะทาง (l) จากผนังสะสม อนุภาคขนาดเล็กซึ่งอยู่ตรงกลางของแขนแนลจะมีการไหลเร็วที่สุดและจะถูกชะออกมาก่อน สำหรับอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะอยู่ใกล้กับผนังสะสมมากขึ้นและจะถูกชะออกมาทีหลังตามลำดับขนาดจากน้อยไปมาก อัตราส่วนการเก็บรักษาอนุภาค R เป็นอัตราส่วนระหว่างเวลาในการเก็บรักษาอนุภาค (retention time) t^0 ของตัวทำละลายที่ไม่ได้เก็บไว้กับเวลาในการกักอนุภาค t^r ของตัวทำละลายที่ถูกเก็บไว้ ขึ้นกับ λ ตามสมการ (2.6) ด้านล่าง

$$R = \frac{t^0}{t^r} = 6\lambda \left[\coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 2\lambda \right] \quad (R \approx 6\lambda \text{ if } \lambda < 0.1) \quad (2.6)$$

จากสมการ (1) และ (2) และสมการจาก Stokes สำหรับสัมประสิทธิ์การแพร่ ขนาดของอนุภาคไฮโดรไดนามิก d_H ใน FIFFF สามารถหาได้จากสมการ (2.7) ด้านล่าง

$$d_H = \frac{2kTV^0}{\pi\eta w^2 \dot{V}_c} \frac{t_r}{t^0} \quad (2.7)$$

เมื่อขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้นเกินขีดจำกัด (ประมาณ 1 ไมโครเมตร) และรัศมีไฮโดรไดนามิก, r_H ($d_H = 2r_H$) [9]

2.3.3.2 หลักการทำงาน Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4)

เทคนิค Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4) จะใช้หลักการของ hydrodynamic field โดยมีทิศทางการไหลสองทิศทางที่ตั้งฉากกันของตัวพาโดยการไหลทางแรกจะไหลเข้าที่ช่อง tip ของแขนแนลจะสร้างการไหลแบบแนวขวางหรือ longitudinal คือ channel flow หรือการไหลหลัก และทิศทางที่สองคือการไหลแบบแนวตั้งหรือ horizontal fluid flow คือ crossflow แรกเริ่มสารละลายที่เป็นตัวพาจะถูกบีบเข้าสู่ภายในแขนแนลซึ่งมีการไหลแบบพาราโบลาที่มีความเร็วการไหลสูงสุดที่บริเวณตรงกลางของแขนแนล และเป็น 0 ที่บริเวณผนังแขนแนล เคลื่อนที่ไปยังทางออกตามหลักการของ Normal Mode หรือ Brownian mode

Cross flow ถูกสร้างขึ้นในแขนแนลจากบริเวณผนังที่เป็นรูพรุนโดยการบีบให้ตัวพาสามารถไหลผ่านออกมาที่ผนังด้านล่างของแขนแนล โดย cross flow มีลักษณะการไหลเป็นเส้นและตั้งฉากกับ channel flow จะทำให้เกิดแรงกดทำให้ตัวอย่างมาสะสมอยู่ที่ด้านล่างของแขนแนล เมื่อทำการฉีดตัวอย่างเข้าไป หลังจากนั้นจะเกิดสภาวะรีแล็กซ์เซชัน คือการบีบ cross flow ไหลเข้าไปปริมาตรหนึ่ง อาจเรียกว่าขั้นตอนโฟกัส ในระหว่างช่วงเวลาสั้นๆนี้ ส่วนประกอบของตัวอย่างจะหาจุดที่สมดุลระหว่างแรงจากสนามภายนอกกับการแพร่ของกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งเป็นขั้นที่จำเป็นเนื่องจากทำให้องค์ประกอบต่างๆในตัวอย่างอยู่ในสภาวะที่มีการกระจายอย่างเสถียรหรือคงที่ โดย cross flow ทำให้เกิดแรงหนีที่ทำการลากตัวอย่างไปตามผิวเมมเบรนออกไปที่บริเวณผนังสะสม เมื่อตัวอย่างไปอยู่ที่บริเวณผนังสะสม แต่ละกลุ่มตัวอย่างจะไปที่ตำแหน่งสมดุลซึ่งเป็นบริเวณที่จำเพาะเจาะจง การแพร่และขนาดของตัวอย่างแต่ละชนิดและจำนวนของ cross flow field จะกำหนดบริเวณนั้น เพื่อการแยกต่อในสภาวะการชะ

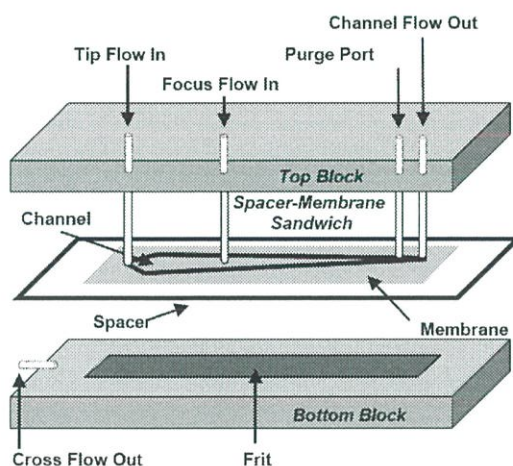
หลังจากตัวอย่างคงที่แล้วจะเข้าสู่เทอมของการชะ ส่วนประกอบต่างๆที่ถูกบีบอัดเข้ากับผนังจะถูกพาไปอย่างช้าๆด้วยการไหลเพราะถูกแรงกดแซ่ไว้ ในกระแสการไหลที่มีความเร็วที่น้อยที่อยู่ติดกับผนัง ตัวอย่างที่มีขนาดเล็กจะถูกชะล้างออกมาก่อนเนื่องจากสัมประสิทธิ์การแพร่ที่มากกว่าและตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่กว่าจะถูกชะตามออกมาทีหลัง ข้อจำกัดของการแยกโดยเทคนิคนี้ คือ ผนังของที่ใช้แยกสารจะมีลักษณะเป็นรูพรุน ดังนั้นสารที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของท่อจะไม่สามารถแยกได้โดยใช้เทคนิคนี้ นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังไม่นิยมใช้ในการหาปริมาณของสาร แรงจากสนามภายนอกทำให้ชั้นส่วนตัวอย่างสะสมที่ระดับต่างๆกันในแขนแนล เมื่อการไหลของตัวพาไหลผ่านตลอดแขนแนล ชั้นส่วนตัวอย่างจะถูกพาออกไปด้วยความเร็วที่ต่างกันตามระดับความสูงที่ถูกแยก ผลคือเราสามารถแยกองค์ประกอบของตัวอย่างออกมาได้

ปัจจุบัน AF4 เป็นที่นิยมในการนำมาใช้ในเทคนิค FFF เนื่องจากเหมาะสมสำหรับการแยกและวิเคราะห์พอลิเมอร์และอนุภาคและมีแอปพลิเคชันสำหรับด้านชีววิทยา ด้านยา ด้านอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์การเกษตร เทคนิคทางด้านชีววิทยาและนาโนเทคโนโลยี

AF4 สามารถใช้งานได้กว้างขวาง ในการวิเคราะห์ โดยช่วงในการวิเคราะห์มวลโมเลกุลจากตัวทำละลายอยู่ในช่วง 103 ถึง 109 กรัมต่อโมลและวิเคราะห์อนุภาคตัวอย่างได้ในช่วง <math>< 2</math> นาโนเมตร ถึง 50 ไมโครเมตร ลิ้มิตของไซส์ต่ำสุดจะถูกกำหนดจาก molecular weight cutoff ของเมมเบรนและขอบบน จะกำหนดจาก 20% ของความหนาแน่น w เช่นเดียวกับใน FIFFF

ในขณะที่ AF4 แบบเดิมใช้ขั้นตอนการโฟกัสและรีแลกซ์เซชันในการทำให้ตัวอย่างที่มีการเคลื่อนที่หยุดในช่วงเวลาหนึ่ง ได้มีเทคนิคที่พัฒนาขั้นตอนดังกล่าวขึ้นมาใหม่เพื่อให้สะดวกในการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยไม่จำเป็นต้องใช้ขั้นตอนโฟกัสหรือรีแลกซ์เซชัน ระหว่างที่ฉีดตัวอย่างเข้าไปใน AF4 องค์ประกอบของตัวอย่างจะถูกผลักไปที่ผนังสะสมโดยแรงเสริมจากการไหลผ่านพริตขนาดเล็กที่สามารถซึมผ่านได้บริเวณใกล้กับอินเจ็คชั่นพอร์ต ดังนั้นการวิเคราะห์จึงเกิดการรีแลกซ์เซชันในขณะที่ยังคงมีการไหลอย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการหยุดในกระบวนการไม่เกรซัน

การแยกใน AF4 นี้ทำในแซนแนลที่มีลักษณะคล้ายริบบิ้นบางแบบไม่สมมาตรโดยแซนแนลสร้างจากการหนีบโดยมีช่องว่างแคบๆ ระหว่างแผ่นที่เป็นรูพรุนกับแผ่นที่ไม่เป็นรูพรุน ดังรูป 2.10



รูปที่ 2.100 แผนภาพของแซนแนลใน AF4

ที่มา : Postnova Analytics (2007)

สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้เครื่องมือ Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4) ในการแยกและวิเคราะห์สารเนื่องจากสามารถใช้งานกับตัวอย่างได้หลากหลาย ทั้งอนุภาคและพอลิเมอร์ มีช่วงการใช้งานที่กว้างตั้งแต่ 1 นาโนเมตร - 10 ไมโครเมตร สำหรับอนุภาค และ 500 ดาลตัน ถึง 10^{12} ดาลตัน สำหรับพอลิเมอร์ และสามารถแยกได้อย่างมีประสิทธิภาพ [9] - [11]

2.3.4 โหมดในการแยกตัวอย่าง (Mode Retention)

ใน FFF จะมี 2 โหมดในการทำงาน

- (1) โหมดปกติ สำหรับวิเคราะห์อนุภาคขนาดเล็ก พอลิเมอร์ และ โมเลกุลขนาดใหญ่
- (2) โหมดสเตอร์ริก หรือ โหมดไฮโปเลเยอร์ จะเกิดขึ้นเมื่อตัวอย่างเป็น อนุภาคขนาดใหญ่ หรือ โมเลกุลขนาดใหญ่ที่ซับซ้อน (macromolecular complexes) ในขนาดช่วง 0.5 ถึง 50 ไมครอน

2.3.4.1. โหมดปกติ

การแยกโหมดปกติหรือโหมดบราวเนียนจะเกิดเมื่ออนุภาคมีขนาดเล็กมากพอที่จะเกิดการเคลื่อนที่แบบบราวเนียนได้และมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับความหนาของกลุ่มการกระจายตัวของตัวอย่าง (diffusional cloud formed) ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่จะมีค่ามากขึ้นตามความหนาของกลุ่มการกระจายตัวของตัวอย่าง หมายถึงยิ่งความหนาของกลุ่มตัวอย่างมาก ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคจะสูงตาม ดังนั้นอนุภาคขนาดเล็กจะชะออกมาก่อน และปริมาณการเก็บตัวอย่างเกี่ยวข้องกับสัมประสิทธิ์การแพร่

ความเร็วการไหลในแกนแนล ความหนาของแกนแนล และขนาดทางกายภาพของกลุ่มตัวอย่าง จะเป็นตัวกำหนดรูปแบบในการ retention สำหรับตัวอย่างที่ประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กและโมเลกุลเล็กๆ จะเป็นรูปแบบการชะแบบโหมดปกติ นั่นคือการชะตัวอย่างตามลำดับการเพิ่มขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล

2.3.4.2. โหมดสเตอร์ริก หรือ โหมดไฮโปเลเยอร์

โหมดสเตอร์ริกเกิดเมื่ออนุภาคมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มการแพร่กระจายของตัวอย่าง (diffusional cloud) จะเกิดเมื่อความหนาของกลุ่มการแพร่กระจายของตัวอย่างน้อยมากเมื่อเทียบกับขนาดของอนุภาค หรือถูกยับยั้งด้วยแรงจากสนามภายนอก ในโหมด steric อนุภาคขนาดใหญ่จะชะล้างออกก่อนเนื่องจากความเร็วในการเดินทางในแกนแนลกำหนดด้วยการเพิ่มขนาดของอนุภาค แทนที่จะเป็นการแพร่กระจายของตัวอย่าง

2.3.5. การเลือกตัวแปรใน Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4)

ใน AF4 สารละลายของเหลวทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์เกือบทั้งหมดสามารถใช้เป็นตัวพาได้ เทคนิคนี้มีความยืดหยุ่นสูงมากในส่วนของตัวอย่างที่จะนำมาใช้ ได้แก่ ประเภทของตัวอย่าง ค่า pH ความแรงของพันธะไอออนิก และอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถเลือกอัตราการไหล ชนิดของเมมเบรน และ จับคู่เครื่องตรวจจับประเภทต่างๆได้อีกด้วย

แม้หลักการของ AF4 จะง่าย แต่พารามิเตอร์ในการใช้งานมีจำนวนมากที่ต้องทำการเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละการทดลอง เช่น ชนิดของเมมเบรน การเลือกตัวทำละลายในการชะ ความแรงของพันธะไอออนิก ค่า pH อัตราการไหล อุณหภูมิในการทำงาน และปริมาณที่ทำการฉีดสารเข้าไป โดยพารามิเตอร์เหล่านี้ล้วนส่งผลต่อความสามารถในการแยกและปริมาณที่จะแยกตัวอย่างออกมาได้ โดยเมมเบรนที่ใช้ควรมีขนาดรูพรุน และ molecular weight cut off (MWCO) ที่เหมาะสม มีความสม่ำเสมอของพื้นผิวที่ดี และต้องไม่มีปฏิสัมพันธ์กับตัวอย่าง เมมเบรนที่นิยมใช้ที่สุดคือ regenerated cellulose (RC) ซึ่งมี 104 MWCO

ในการเลือกพารามิเตอร์นั้นไม่ควรใช้ retention time ที่น้อยเกินไปเพื่อหลีกเลี่ยงการเก็บพีคเปล่า (void peak) หรือมากเกินไปเนื่องจากจะใช้เวลาในการทดลองนาน [9] - [11]

2.3.6. ตัวตรวจจับใน Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4)

เครื่องตรวจจับ UV-Vis เป็นเครื่องที่ใช้กันมากที่สุดในทุกเทคนิคย่อยของ FFF เนื่องจากความพร้อมใช้งาน ใช้งานง่ายและต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตามการใช้ UV-vis เพียงอย่างเดียวอาจไม่ใช่ทางเลือกที่เหมาะสมกับงานเชิงปริมาณสำหรับอนุภาคหรือโมเลกุลขนาดใหญ่เพราะบางสารประกอบ เช่น เซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสหรือน้ำตาล ไม่ได้ดูดซับแสง UV-Vis ทั้งหมด หรือดูดซับเพียงเล็กน้อย หรืออาจเกิดการกระเจิงของแสงแล้วเกิดการดูดซับแสงช่วง UV-Vis

การกระเจิงของสัญญาณเป็นฟังก์ชันที่ซับซ้อนที่เกิดจากขนาดและรูปร่างของอนุภาค ส่งผลให้สัญญาณตรวจจับตรวจวัดได้เพิ่มขึ้น และทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในอนุภาคที่มีขนาดใหญ่

ตัวตรวจจับใน AF4

- (1) UV-Vis detector ให้ข้อมูลเชิงปริมาณสำหรับการวัดการดูดกลืนแสงของโมเลกุลหรืออนุภาค
- (2) Refractive Index Detector (RI detector) ใช้หามวลโมเลกุล จากการหักเหของแสง
- (3) Fluorescence detector (FL detector) ใช้กับตัวอย่างที่มีการเรืองแสง
- (4) Multi-Angle Light Scattering Detector (MALS detector) ใช้หลักการของการกระเจิงแสง สามารถหาขนาด รูปร่าง มวลโมเลกุล และสัมประสิทธิ์การแพร่ของโมเลกุลและอนุภาคได้ เมื่อตัวอย่างมีขนาดและรูปร่างต่างกัน โดยมีการตรวจวัดสัญญาณทั้งหมด 21 มุม

การใช้ MALS detector ใน AF4 ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีการตรวจจับหลายมุมและให้ผลได้ทั้งการวัดมวลโมเลกุลและช่วงของขนาดอนุภาคและพอลิเมอร์ และการใช้ MALS ร่วมกับ UV-Vis ทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องมากขึ้น ในปัจจุบันยังมีการใช้ nano DLS คู่กับ AF4 ในการวัดรัศมี

ไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic radius) นอกจากนี้การใช้ MALS ช่วยให้แยกโมโนเมอร์โปรตีนออกจากโปรตีนที่เกิดการรวมตัวกันได้ในครั้งเดียวและสามารถหาขนาดและมวลโมเลกุลของแต่ละส่วนได้ในเวลาเดียวกัน

2.4 การกระเจิงแสงแบบไดนามิก (Dynamic Light Scattering; DLS)

Dynamic light scattering (DLS) เป็นเทคนิคใช้หาการกระจายตัวของอนุภาคเฉลี่ยที่มีการเคลื่อนที่ในสารละลายแบบบราวน์เนียน (Brownian) โดยการวัดการกระเพื่อมของความเข้มแสงหรือเรียกว่า photo correlation spectroscopy (PCS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วัดขนาดของอนุภาคได้ต่ำถึงระดับ 1 นาโนเมตร สามารถใช้งานได้กับอิมัลชัน โพลีเมอร์ โปรตีน อนุภาคนาโนและคอลลอยด์

อนุภาคขนาดเล็กในสารแขวนลอยจะมีการเคลื่อนที่แบบบราวน์เนียนคืออนุภาคมีการเคลื่อนที่ตลอดเวลา ก่อให้เกิดการกระเจิงของแสง ความถี่ของการกระเพื่อมขึ้น - ลงสามารถตรวจจับโดยใช้ photomultiplier ในขณะที่ขนาดของอนุภาคสามารถคำนวณได้จากความถี่โดยใช้สมการที่ (2.8) คือสมการของสโตกส์และไอสไตน์ (Stokes- Einstein equation) ด้วยการหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เลื่อนตำแหน่ง (translational diffusion coefficient, D_T) ของอนุภาค ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของอนุภาค

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t} \quad (2.8)$$

โดย

D_h คือเส้นผ่านศูนย์กลางไฮโดรไดนามิก ใช้หาขนาดอนุภาค

D_t คือ translational diffusion coefficient ซึ่งหาได้จาก dynamic light scattering

k_B คือ ค่าคงที่ของ Boltzmann

T คือ อุณหภูมิ thermodynamic

η คือ ความหนืดไดนามิก

อนุภาคขนาดใหญ่ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เลื่อนตำแหน่ง (translation diffusion coefficient) ต่ำ จะเคลื่อนที่ช้ากว่าอนุภาคขนาดเล็ก หรืออาจกล่าวได้ว่า อนุภาคขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้าทำให้เกิดการควมถี่ในการกระเพื่อมขึ้น - ลงของแสงที่กระเจิงต่ำ และอนุภาคขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้เร็วมีความถี่ในการกระเพื่อมของแสงที่กระเจิงสูงกว่า ดังนั้นอัตราการเปลี่ยนแปลงของแสงที่กระเจิงจะช้ากว่าสัญญาณที่ได้จากการวัดความเข้มแสงในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ของอนุภาคขนาดเล็ก

และความถี่ในการกระเพื่อมขึ้น - ลงของความเข้มแสงนี้จะถูกส่งไปยัง correlator เพื่อนำไปคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เลื่อนตำแหน่งและนำไปหาขนาดอนุภาคต่อไป ข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ สารตัวอย่างต้องผ่านการเตรียมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เจือจางอย่างเหมาะสม สารตัวอย่างต้องไม่มีคุณสมบัติเรืองแสงและตัวอย่างต้องสามารถลอยได้ในตัวกลาง นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังต้องการความสะอาดสูง เนื่องจากการป้องกันการรบกวนจากการกระเจิงของอนุภาคฝุ่นหรือสิ่งสกปรก [12]

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัย Asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multiple detections: A complementary approach in the characterization of egg yolk plasma ได้ศึกษาการใช้ Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4) คู่กับตัวตรวจจับ UV-Vis Multiangle Light Scattering (MALS) และ Quasi-Elastic Light Scattering (QELS) (AF4 - UV-MALS-QELS) สำหรับการแยกและหาลักษณะของพลาสมาไข่แดงที่ประกอบไปด้วย livetins LDL และ LDL ที่เกิดการรวมตัวกัน ซึ่ง พลาสมาไข่แดงนั้นเป็นตัวอย่างชีวภาพที่มีการกระจายของขนาดค่อนข้างกว้าง พบว่าการใช้ Cross flow rate แบบการลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponentially decaying) ไม่เพียงแต่ลดเวลาการวิเคราะห์พลาสมาไข่แดงใน AF4 เท่านั้น แต่ยังได้รับความละเอียดในการแยกที่ดีกว่าการใช้ Cross flow rate แบบคงที่ (constant) หรือลดลงแบบเป็นเส้นตรง (linearly decaying) การรวมกันของการใช้ Cross flow rate ที่มีอัตราการลดลงแบบเอกซ์-โพเนนเชียลใน AF4-UV-MALS-QELS และการใช้สมการการเก็บตัวอย่างแบบเต็ม พิสูจน์ว่าเทคนิคนี้สามารถใช้ในการแยกและตรวจวัดลักษณะตัวอย่างชีวภาพที่มีการกระจายของขนาดค่อนข้างกว้าง เช่น พลาสมาไข่แดงได้

จากงานวิจัย Impact of asymmetrical flow field-flow fractionation on protein aggregates stability ได้ทำการตรวจสอบการรวมกันของโปรตีน Anti-streptavidin (anti-SA) IgG1 ซึ่งประกอบไปด้วยการรวมตัวของโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลสูงและต่ำ และมีขนาดที่แตกต่างกัน ด้วย AF4 คู่กับตัวตรวจจับ Multiangle Light Scattering (MALS) และ Dynamic Light Scattering (DLS) ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้ ได้แก่ การรวมตัวกันในตัวพาที่แตกต่างกัน ทั้ง pH และค่าประจุไอออน มีผลกระทบต่อเสถียรภาพของการรวมตัวกันอย่างมาก โดยในงานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบระหว่าง Phosphate Buffer (PBS) กับ Citric Acid (CA) การรวมตัวกันของโปรตีนที่มีมวลต่ำจะมีการแยกออกเป็นโมโนเมอร์ได้มากกว่ามวลสูง โดยมีความเกี่ยวข้องกับเสถียรภาพของการรวมตัวกัน ความเข้มข้นของตัวอย่างในขั้นตอนการโฟกัสไม่มีผลต่อการกระจายของโปรตีนที่รวมตัวกันการเจือจางตัวอย่างในขณะที่เกิดการแยกตัวอย่าง และ ทฤษฎีการเก็บรักษาของ AF4 อาจให้ข้อมูลขนาดที่แม่นยำกว่าเครื่องตรวจจับการกระเจิงแสงแบบออนไลน์ โดยเฉพาะมวลรวมที่แยกตัวออกอย่างรวดเร็วเมื่อเจือจาง

จากงานวิจัย Analysis of lipoprotein-specific lipids in patients with acute coronary syndrome by asymmetrical flow field- flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry ได้ทำการแยกและวิเคราะห์ระดับไขมันในพลาสมาของ lipoproteins ในผู้ป่วยโรค acute coronary syndrome (ACS) และ stable coronary artery disease (CAD) จากการใช้เทคนิค Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4) สามารถแยกลิโปโปรตีน (lipoproteins) ออกมาตามขนาดเป็น ลิโปโปรตีนความหนาแน่นสูง (HDL) และ ลิโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (LDL) ได้ โดยการทดลองได้เปรียบเทียบพีคของ HDL และ LDL ตัวมาตรฐานที่นำมาผสมกัน เปรียบเทียบกับปริมาณ HDL กับ LDL ในผู้ป่วย ACS กับ CAD โดยพบว่ามีการเลื่อนของพีค LDL ในผู้ป่วยที่เวลามากขึ้นเทียบกับ LDL มาตรฐาน จึงสรุปได้ว่า อนุภาค LDL ในผู้ป่วยมีขนาดใหญ่และช่วงที่กว้างกว่า อนุภาค LDL มาตรฐาน ส่วน HDL ไม่มีการเลื่อนของพีค หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์หาลักษณะและโครงสร้างของโมเลกุลอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมายด้วยเทคนิค Nanoflow ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (nUPLC-ESI-MS/MS)

จากงานวิจัย Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field -flow fractionation ใช้เทคนิค AF4 ในการวิเคราะห์และแยกอนุภาคนาโนในอาหารที่เป็นตัวอย่างซับซ้อน และ ในธรรมชาติ เนื่องจาก AF4 สามารถใช้ในการแยกอนุภาคนาโนได้หลากหลาย เช่น พวกสารอินทรีย์หรือโมเลกุลขนาดใหญ่และกลุ่มสารอนินทรีย์ เมื่อเทคนิคนี้จับคู่กับตัวตรวจจับที่ต่างกันทำให้ได้รับข้อมูลจำเพาะที่ต้องการและกำหนดสมบัติที่ขึ้นกับขนาดที่เทคนิคอื่นๆไม่สามารถทำได้ โดยจากการทดลองสามารถใช้ AF4 ตรวจสอบลักษณะจำเพาะและหาปริมาณอนุภาคนาโนในตัวอย่างที่ผสมหรือไม่เป็นเนื้อเดียวกันได้ และข้อมูลที่ได้รับจากการเลือกตัวตรวจจับและเลือกเงื่อนไขในการแยก ทำให้สามารถแยก NPs ทุกชนิดในตัวอย่างได้ในการทดลองเดียว ซึ่งเป็นวิธีการแบบองค์รวมที่นิยมกว่าเทคนิคที่มุ่งเน้นเพียงตัวอย่างหนึ่งๆ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุดิบ

3.1.1 วัสดุดิบและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- (1) เครื่องดื่มที่มีทอรีนเป็นส่วนผสม
- (2) เครื่องดื่มที่มีโคเอนไซม์คิวเท็นเป็นส่วนผสม

3.1.2 สารเคมี

- (1) สารมาตรฐานทอรีน (98% Food grade, Aldrich)
- (2) สารมาตรฐานโคเอนไซม์คิวเท็น ($\geq 98\%$ HPLC, Sigma)
- (3) สารมาตรฐานโบวีนเซรัมอัลบูมิน ($\geq 99\%$ agarose gel electrophoresis, Sigma)
- (4) สารมาตรฐานโพลีสไตรีนขนาดอนุภาค 100 นาโนเมตร (Thermo Fisher Scientific)
- (5) สารโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (CARLO ERBA REAGENT)
- (6) สารละลาย NovaChem (Postnova)
- (7) น้ำปลอดประจุ

3.1.3 อุปกรณ์

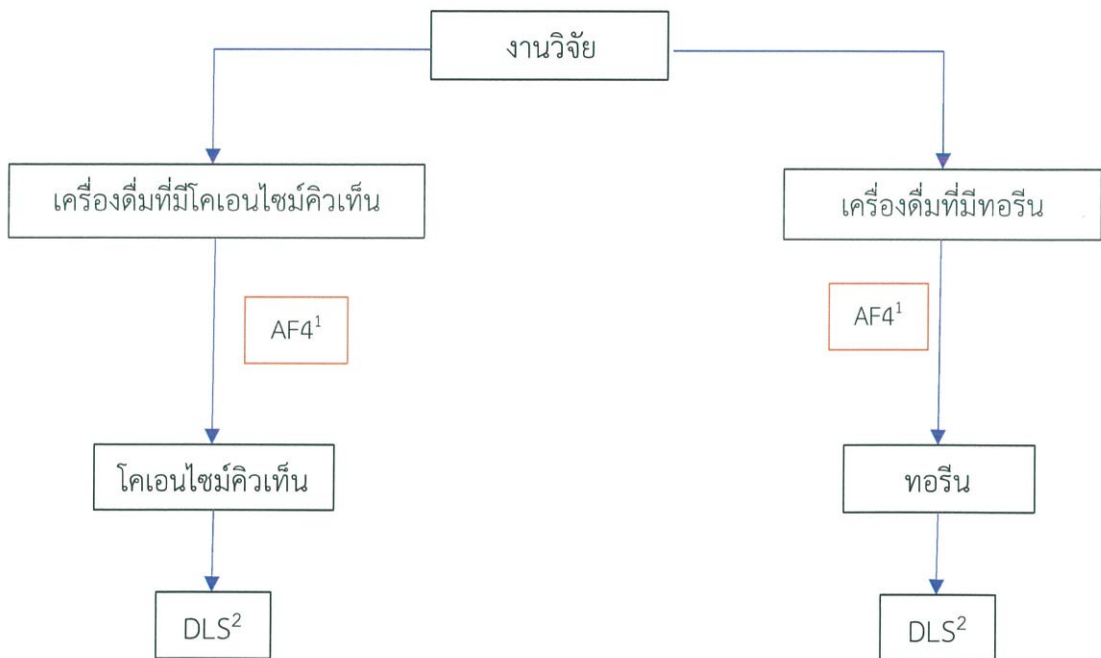
- (1) ชุดการกรองสุญญากาศ
- (2) 0.1 ไมโครเมตร PVDF Membrane Filter
- (3) ไมโครปิเปตขนาด 1-10 มิลลิลิตร และ ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
- (4) ขวดใส่สาร
- (5) ขวดเก็บตัวอย่าง

3.1.4 เครื่องมือ

- (1) Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4) รุ่น AF2000MF (Postnova, Germany)
- (2) Dynamic light scattering (DLS) รุ่น Zetasizer Nano series (Malvern, England)
- (3) Fraction collector รุ่น PN8050 (Postnova, Germany)
- (4) เครื่องชั่ง รุ่น ML304T/00 (Mettler-Toledo, Switzerland)

3.2 วิธีการทดลอง

ในงานวิจัยนี้จะทำการแยกและวิเคราะห์สารทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ทอรีน คอลลาเจน และโคเอนไซม์คิวเท็น ในเครื่องต้ม ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงลำดับการทำงานในงานวิจัย

AF4¹ ใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารตัวอย่าง

DLS² สำหรับวัดการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย

3.2.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างและแยกโพรตีนเซรัมอัลบูมิน (BSA)

ซัง BSA โดยเครื่องชั่งน้ำหนัก 5 มิลลิกรัม และเติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.1.1 วิธีการแยกสาร BSA ด้วยเทคนิค AF4

(1) เตรียมสารละลายตัวพา 0.9% NaCl โดยซัง NaCl มา 9 กรัม มาละลายในน้ำปลอดประจุ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำมากรองผ่าน PVDF Membrane Filter ที่มีขนาดรูพรุน 0.1 ไมโครเมตร จำนวน 2 รอบ

(2) สภาวะในการแยกสาร BSA ด้วยเทคนิค AF4 โดยทำการแยกผ่าน membrane ชนิด regenerated cellulose ที่มีขนาด spacer ยาว 280 มิลลิเมตร และมีความหนา 350 ไมโครเมตร ทำการปรับค่าตัวแปรในการแยก 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

(2.1) ขั้นตอน focusing

ทำการปรับค่า cross flow เป็น 3 mL/min โดยกำหนดให้ค่า detector flow เป็น 0.5 mL/min และค่า injection flow เป็น 1.0 mL/min คงที่

(2.2) ขั้นตอน elution

ทำการปรับสภาวะไหลของตัวพาภายในเซนแนลดังต่อไปนี้

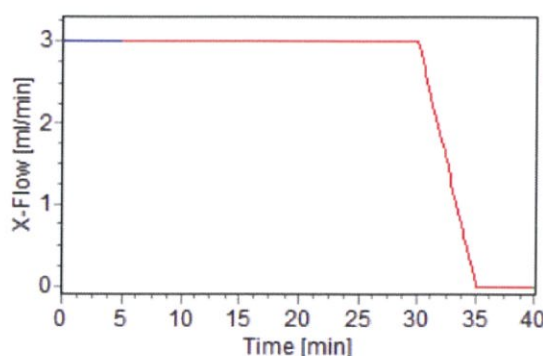
ช่วงที่ 1 กำหนดค่าคงที่ของ cross flow อยู่ในช่วง 3 mL/min เป็นเวลา 25.00 นาที

ช่วงที่ 2 ทำการลดค่า cross flow จากค่าตั้งต้นจนถึง 3 mL/min เป็นเวลา 5.00 นาที

ช่วงที่ 3 กำหนดค่าคงที่ของ cross flow เป็น 0 mL/min เป็นเวลา 5.00 นาที

(2.3) ขั้นตอน rinse

กำหนดให้ค่า tip pump เป็น 0.05 mL/min และค่า focus pump เป็น 0.0 mL/min เป็นเวลา 0.5 นาที



รูปที่ 3.2 แสดงค่า cross flow (ml/min) เทียบกับเวลา (นาที)

(3) สภาวะในการวิเคราะห์สาร BSA ด้วยตัวตรวจจับ UV-Vis และ MALS โดยทำการวิเคราะห์สารที่ค่าความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

3.2.2 วิธีการเตรียมตัวอย่าง แยกและวิเคราะห์สารโคเอนไซม์คิวเทิน

3.2.2.1 วิธีการแยกสารโคเอนไซม์คิวเทินด้วยเทคนิค AF4

(1) เตรียมสารละลายตัวพา 0.9% NaCl โดยชั่ง NaCl มา 9 กรัม มาละลายในน้ำปลอดประจุ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำมากรองผ่าน PVDF Membrane Filter ที่มีขนาดรูพรุน 0.1 ไมโครเมตร จำนวน 2 รอบ

(2) สภาวะในการแยกสารโคเอนไซม์คิวเทินจากเครื่องที่มีโคเอนไซม์คิวเทินและคอลลาเจนด้วยเทคนิค AF4 โดยทำการแยกผ่าน membrane ชนิด regenerated cellulose ที่มีขนาด spacer ยาว 280 มิลลิเมตร และมีความหนา 350 ไมโครเมตร ทำการปรับค่าตัวแปรในการแยก 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

(2.1) ขั้นตอน focusing

ทำการปรับค่า cross flow เป็น 0 - 3 มิลลิลิตร/นาที (รูป 3.3) โดยกำหนดให้ค่า detector flow เป็น 0.5 มิลลิลิตร/นาที และค่า injection flow เป็น 1.0 มิลลิลิตร/นาที คงที่

(2.2) ขั้นตอน elution

ทำการปรับสภาวะไหลของตัวพาภายในเซนแนลดังต่อไปนี้

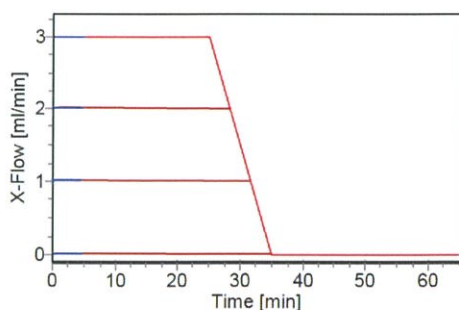
ช่วงที่ 1 กำหนดค่าคงที่ของ cross flow อยู่ในช่วง 0-3 มิลลิลิตร/นาทีเป็นเวลา 20.00 นาที

ช่วงที่ 2 ทำการลดค่า cross flow จากค่าตั้งต้นจนถึง 0.1 มิลลิลิตร/นาทีเป็นเวลา 10.00 นาที

ช่วงที่ 3 กำหนดค่าคงที่ของ cross flow เป็น 0.1 มิลลิลิตร/นาที เป็นเวลา 30.00 นาที

(2.3) ขั้นตอน rinse

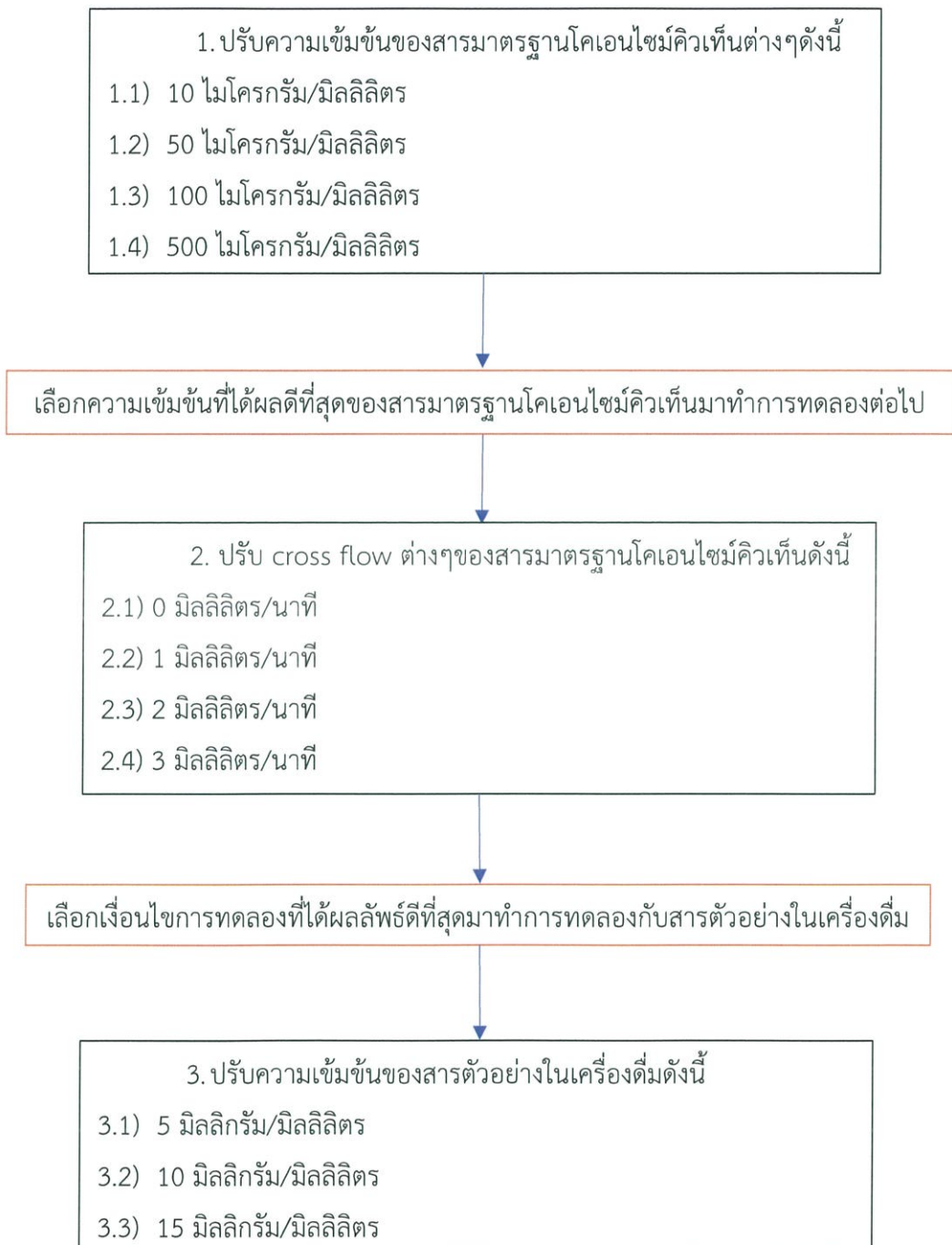
กำหนดให้ค่า tip pump เป็น 0.05 มิลลิลิตร/นาที และค่า focus pump เป็น 0.0 มิลลิลิตร/นาที เป็นเวลา 0.5 นาที



รูปที่ 3.3 แสดงการตั้งโปรแกรม cross flow 3, 2, 1 และ 0 (มิลลิลิตร/นาที) เทียบกับเวลา (นาที)

(3) สภาวะในการวิเคราะห์สารโคเอินไซม์คิวเทินจากเครื่องต้มชูกำลังด้วยตัวตรวจจับ UV-Vis, MALS และ RI โดยทำการวิเคราะห์สารที่ค่าความยาวคลื่น 270 และ 285 นาโนเมตร

(4) ทำการแยกเก็บสารละลายด้วยเครื่อง fraction collector โดยทำการทดลองข้อ 1-3 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง เพื่อนำสารละลายที่แยกได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS



รูปที่ 3.4 แสดงลำดับการทำงานในการแยกและวิเคราะห์สารโคเอินไซม์คิวเทินด้วยเทคนิค AF4

วิธีเตรียมตัวอย่างโคเอ็นโซมคิวเทินใน AF4

จากรูปที่ 3.3 ข้อที่ 1 จะทำการเตรียมตัวอย่างโดยซึ่งสารโคเอ็นโซมคิวเทินมาตรฐานมาปริมาณ 5 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุที่ผ่านการกรองด้วย nylon membrane filters ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยน้ำปลอดประจุ ดังนี้ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

รูปที่ 3.3 ข้อที่ 3 จะทำการเตรียมตัวอย่างโดยซึ่งเครื่องตีที่ผสมโคเอ็นโซมคิวเทินมาปริมาณ 200 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปลอดประจุที่ผ่านการกรองด้วย nylon membrane filters ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยน้ำปลอดประจุ ดังนี้ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.2.2.2 วิธีการวิเคราะห์หาค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ยด้วยเทคนิค DLS

นำสารที่คาดว่าเป็นโคเอ็นโซมคิวเทินที่แยกออกมาจากเครื่องตีด้วยเทคนิค AF4 ที่เงื่อนไขต่างๆกันมาตรวจสอบด้วยเทคนิค DLS เพื่อหาขนาดเฉลี่ยของสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคเฉลี่ยกับสารตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์โดยตรง ทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลการทดลอง

3.2.3 วิธีการเตรียมตัวอย่าง แยกและวิเคราะห์สารทอรีน

3.2.3.1 วิธีการแยกสารทอรีนด้วยเทคนิค AF4

(1) เตรียมสารละลายตัวพา 0.2% NovaChem โดยดูดสารละลาย NovaChem มา 200 ไมโครลิตร มาละลายในน้ำปลอดประจุ ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำมากรองผ่าน PVDF Membrane Filter ที่มีขนาดรูพรุน 0.1 ไมโครเมตร จำนวน 2 รอบ

(2) สภาวะในการแยกสารทอรีนจากเครื่องตีซูกำลังด้วยเทคนิค AF4 โดยทำการแยกผ่าน membrane ชนิด regenerated cellulose ที่มีขนาด spacer ยาว 280 มิลลิเมตร และมีความหนา 350 ไมโครเมตร ทำการปรับค่าตัวแปรในการแยก 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

(2.1) ขั้นตอน focusing

ทำการปรับค่า cross flow อยู่ในช่วง 0.5-3 มิลลิลิตร/นาที โดยกำหนดให้ค่า detector flow เป็น 0.5 มิลลิลิตร/นาทีและค่า injection flow เป็น 1.0 มิลลิลิตร/นาที

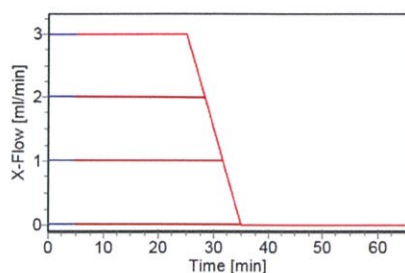
(2.2) ขั้นตอน elution

ทำการปรับสภาวะไหลของตัวพาทายในเซนแนลดังต่อไปนี้
 ช่วงที่ 1 กำหนดค่าคงที่ของ cross flow อยู่ในช่วง 0.5-3 มิลลิลิตร/นาที เป็นเวลา 0.20 นาที
 ช่วงที่ 2 ทำการลดค่า cross flow จากค่าตั้งต้นจนถึง 0.1 มิลลิลิตร/นาที เป็นเวลา 5.00 นาที

ช่วงที่ 3 กำหนดค่าคงที่ของ cross flow เป็น 0.1 มิลลิลิตร/นาทีเป็นเวลา 5.00 นาที

(2.3) ขั้นตอน rinse

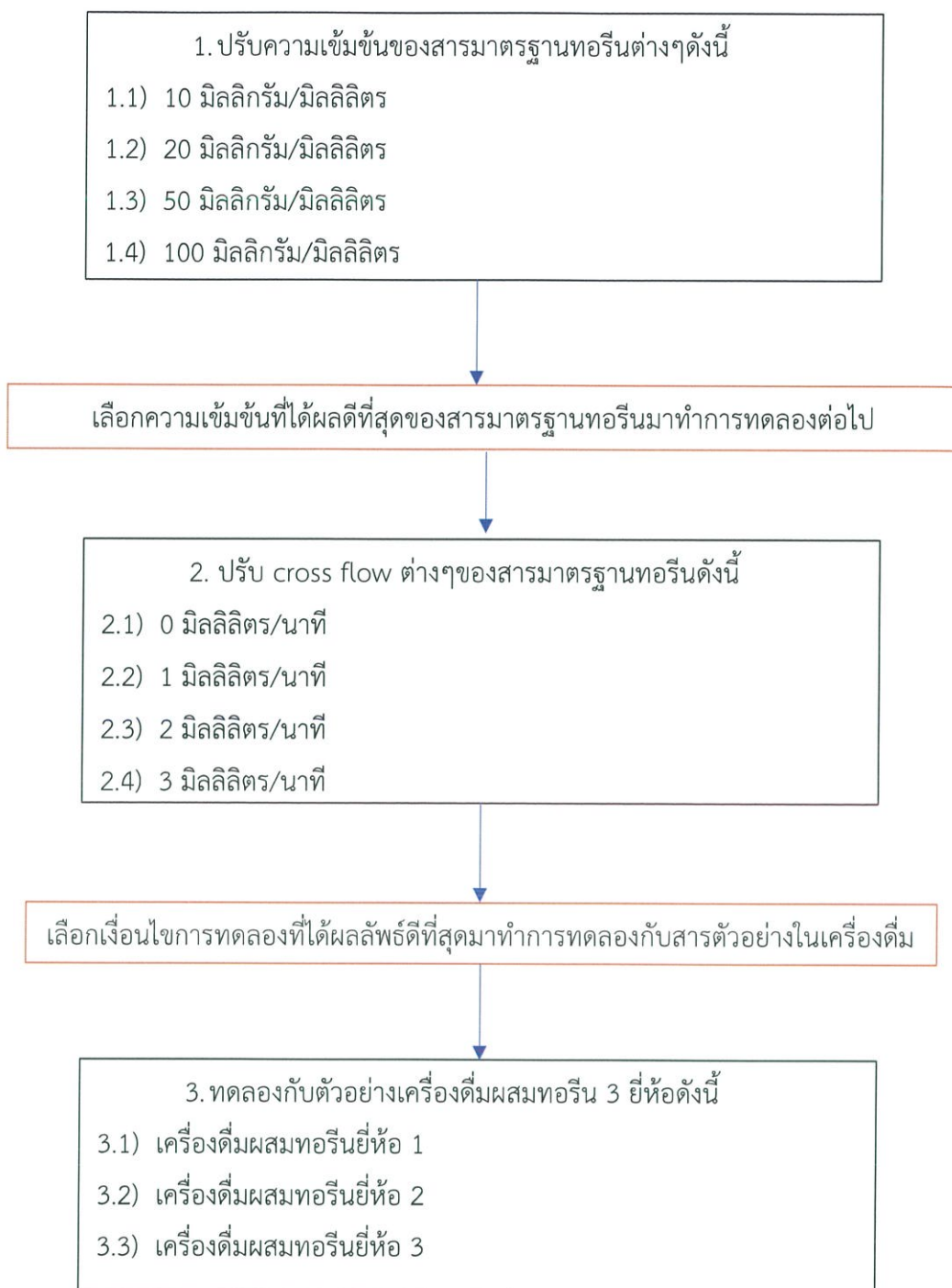
กำหนดให้ค่า tip pump และค่า focus pump เป็น 0.1 มิลลิลิตร/นาที เป็นเวลา 5.00 นาที



รูปที่ 3.5 แสดงการตั้งโปรแกรม cross flow 3, 2, 1 และ 0 (มิลลิลิตร/นาที) เทียบกับเวลา (นาที)

(3) สภาวะในการวิเคราะห์สารทอรีนจากเครื่องต้มชูกำลังด้วยตัวตรวจจับ UV-Vis, MALS และ RI โดยทำการวิเคราะห์สารที่ค่าความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

(4) ทำการแยกเก็บสารละลายด้วยเครื่อง fraction collector โดยทำการทดลองข้อ 1-3 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง เพื่อนำสารละลายที่แยกได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS



รูปที่ 3.6 แสดงลำดับการทำงานในการแยกและวิเคราะห์สารทอรีนด้วยเทคนิค AF4

วิธีเตรียมตัวอย่างทอรินใน AF4

จากรูปที่ 3.5 ข้อที่ 1 จะทำการเตรียมตัวอย่างโดยซึ่งสารทอรินมาตรฐานมาปริมาณ 5 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุที่ผ่านการกรองด้วย nylon membrane filters ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆด้วยน้ำปลอดประจุ ดังนี้ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

รูปที่ 3.5 ข้อที่ 3 จะทำการเตรียมตัวอย่างโดยซึ่งเครื่องต้มที่ผสมทอรินมาปริมาณ 200 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปลอดประจุที่ผ่านการกรองด้วย nylon membrane filters ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆด้วยน้ำปลอดประจุ ดังนี้ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.2.3.2 วิธีการวิเคราะห์หาค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ยด้วยเทคนิค DLS

นำสารที่คาดว่าเป็นทอรินที่แยกออกมาจากเครื่องต้มด้วยเทคนิค AF4 ที่เงื่อนไขต่างๆกันมา ตรวจสอบด้วยเทคนิค DLS เพื่อหาขนาดเฉลี่ยของสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคเฉลี่ยกับสารตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์โดยตรง ทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลการทดลอง

บทที่ 4

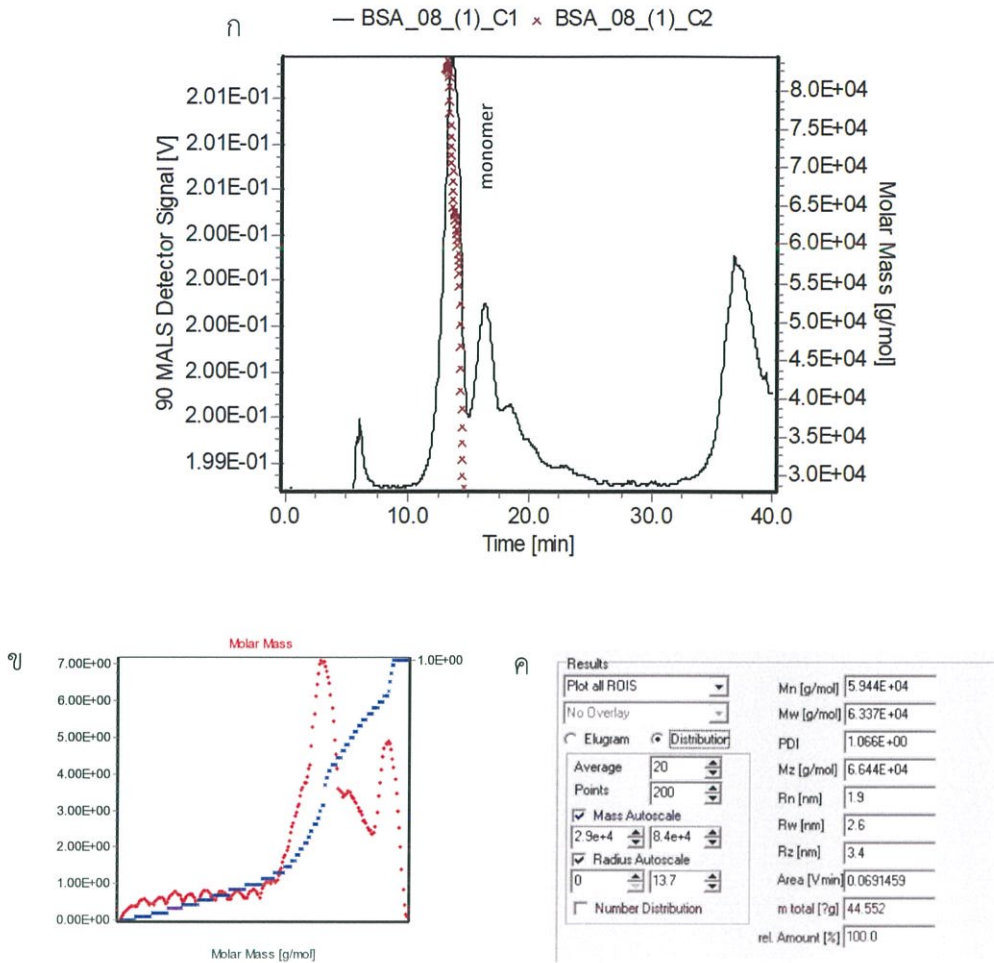
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การวิเคราะห์สารมาตรฐานโบวีนเซรัมอัลบูมินและโพลีสไตรีน

4.1.1 การวิเคราะห์สารมาตรฐานโบวีนเซรัมอัลบูมินด้วยเทคนิค AF4

ในขั้นตอนแรกของงานนี้ได้ทำการสอบเทียบเครื่องมือ AF4 ต่อกับตัวตรวจจับ UV-Vis และ MALS ด้วยสารโบวีนเซรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งมีมวลโมเลกุล 66 กิโลดาลตัน (kDa) หรือ 66000 กรัม/โมล เป็นสารมาตรฐานในการสอบเทียบเทคนิค AF4 สำหรับสารโคเอ็นไซม์ควิเทิน โดยใช้ BSA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และใช้เงื่อนไขเริ่มต้นสำหรับการแยกคือการปรับค่า cross flow ช่วงแรกคงที่ที่ 3 มิลลิลิตร/นาที ช่วงที่สองมีการลดลง 3 มิลลิลิตร/นาที แบบเส้นตรง จนถึง 0 มิลลิลิตร/นาที และช่วงสุดท้ายคงที่ที่ 0 มิลลิลิตร/นาที และทำการปรับเงื่อนไขตามรูปที่ 3.5 ดังที่กล่าวมาแล้ว

จากรูปที่ 4.1ก พบว่าสามารถแยก BSA ออกมาเป็นมอนอเมอร์ ไดเมอร์ และไตรเมอร์ หรือ โอลิโกเมอร์ได้ โดยทำการสร้างเบสไลน์ใต้พีคที่เลือกของแต่ละสัญญาณจากตัวตรวจจับ UV-Vis และ MALS ทั้ง 21 มุม มาวิเคราะห์และทำการอินทิเกรตร่วมกัน และคำนวณด้วยโปรแกรม AF2000 จะได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.1ข และ 4.1ค ตามลำดับ โดยรูปที่ 4.1ข แสดงการกระจายตัวของมวลโมเลกุลของพีคมอนอเมอร์ BSA ที่ช่วงเวลา 13.06 ถึง 14.60 นาที โดยพบมวลโมเลกุลในช่วงประมาณ $6.5 - 7 \times 10^4$ กรัม/โมล สูงที่สุด และรูปที่ 4.1ค แสดงค่าต่างๆที่สามารถหาได้จากเทคนิค AF4 ที่พีคมอนอเมอร์



รูปที่ 4.1 (ก) เส้นสีดำแสดงผลสัญญาณจากเครื่องตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) และสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงมวลโมเลกุล (กรัม/โมล) ของ BSA เมื่อเทียบกับเวลาที่เปลี่ยนไปในหน่วยนาที (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม

จากรูปที่ 4.1ค เทคนิค AF4 ต่อกับตัวตรวจจับ UV-Vis และ MALS สามารถคำนวณค่ามวลโมเลกุล (Mz) ของ BSA ได้ 6.644×10^4 กรัม/โมล หรือประมาณ 66 KDa ซึ่งใกล้เคียงกับค่ามวลโมเลกุลของ BSA แสดงให้เห็นว่าสถานะของเครื่องเหมาะสมที่จะทำการทดลองกับตัวอย่างโคเอ็นไซม์ คิวเท็นและทอรีนต่อไป

4.1.2 การวิเคราะห์สารมาตรฐานโพลีสไตรีนด้วยเทคนิค DLS

สอบเทียบเครื่องมือ DLS ด้วยอนุภาคโพลีสไตรีนมาตรฐาน ขนาด 200 นาโนเมตร มาวัดค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค DLS จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของอนุภาคโพลีสไตรีนมาตรฐาน ขนาด 200 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่างเฉลี่ย (เส้นผ่านศูนย์กลาง นาโนเมตร)	Pdl
200 nm Polystyrene Latex	200.5±1.323	0.017

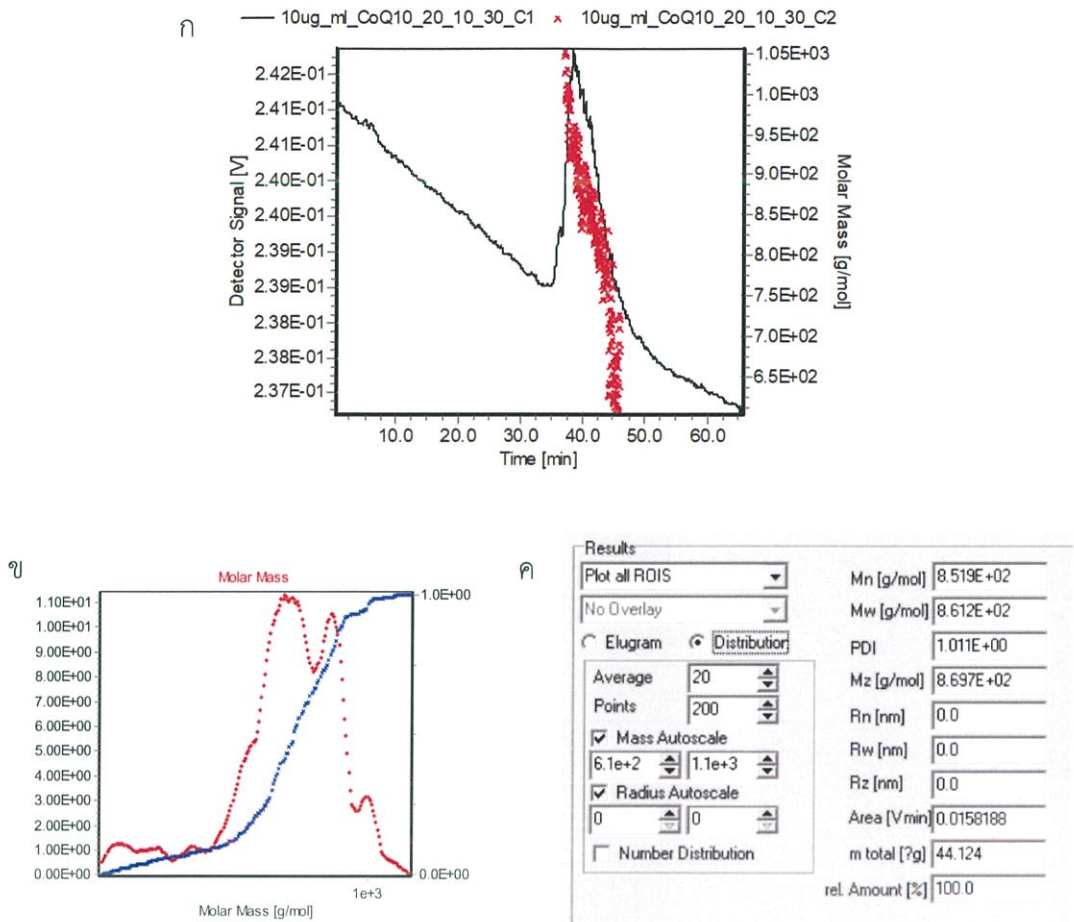
จากการทดลองพบว่าสามารถหาการกระจายตัวของขนาดอนุภาคโพลีสไตรีน 200 นาโนเมตร ได้ 200.5±1.323 นาโนเมตร และได้ค่า Pdl 0.017 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงแคบและมีค่า SD ในช่วงที่ระบุไว้ ดังนั้นการวัดขนาดอนุภาคของตัวอย่างด้วยเครื่อง DLS เหมาะสมที่จะทำการทดลองต่อไป

4.2 การวิเคราะห์สารโคเอ็นไซม์คิวเทินด้วยเทคนิค AF4

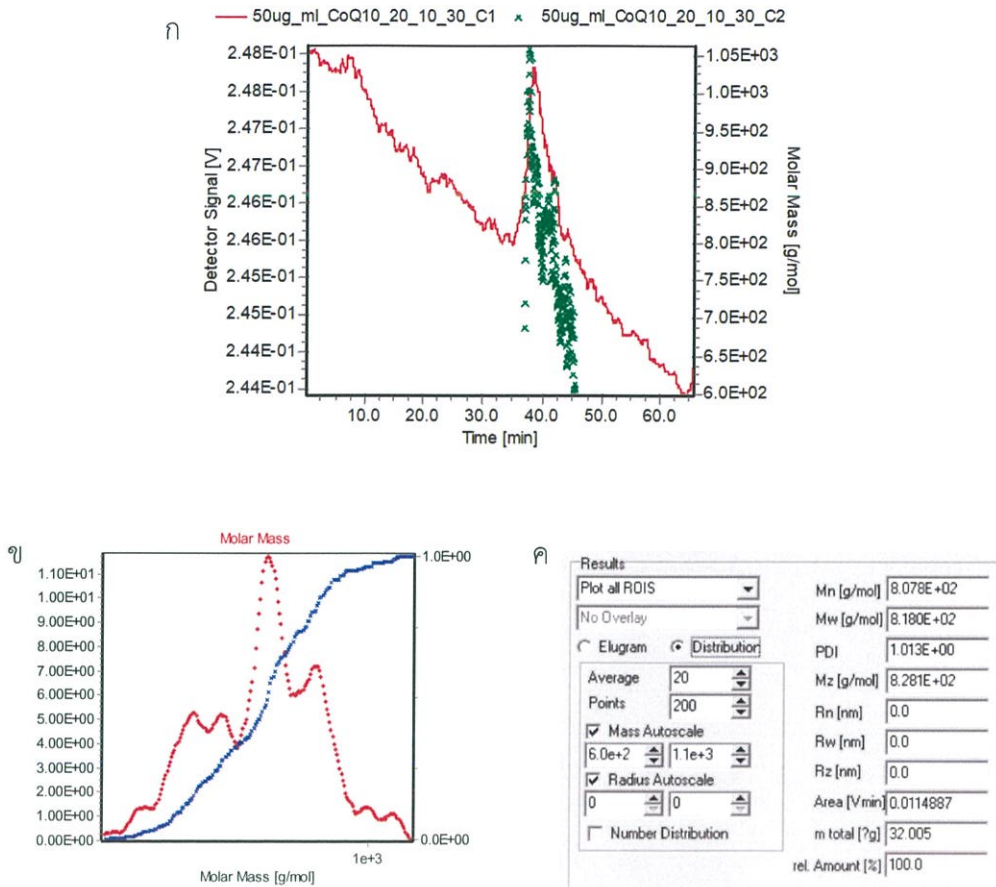
4.2.1 ผลของการแยกสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค AF4

เมื่อนำสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม นำไปฉีดเข้าเครื่อง AF4 ที่ปริมาตร 60 ไมโครลิตร โดยใช้ 0.9% NaCl เป็นสารละลายตัวพา

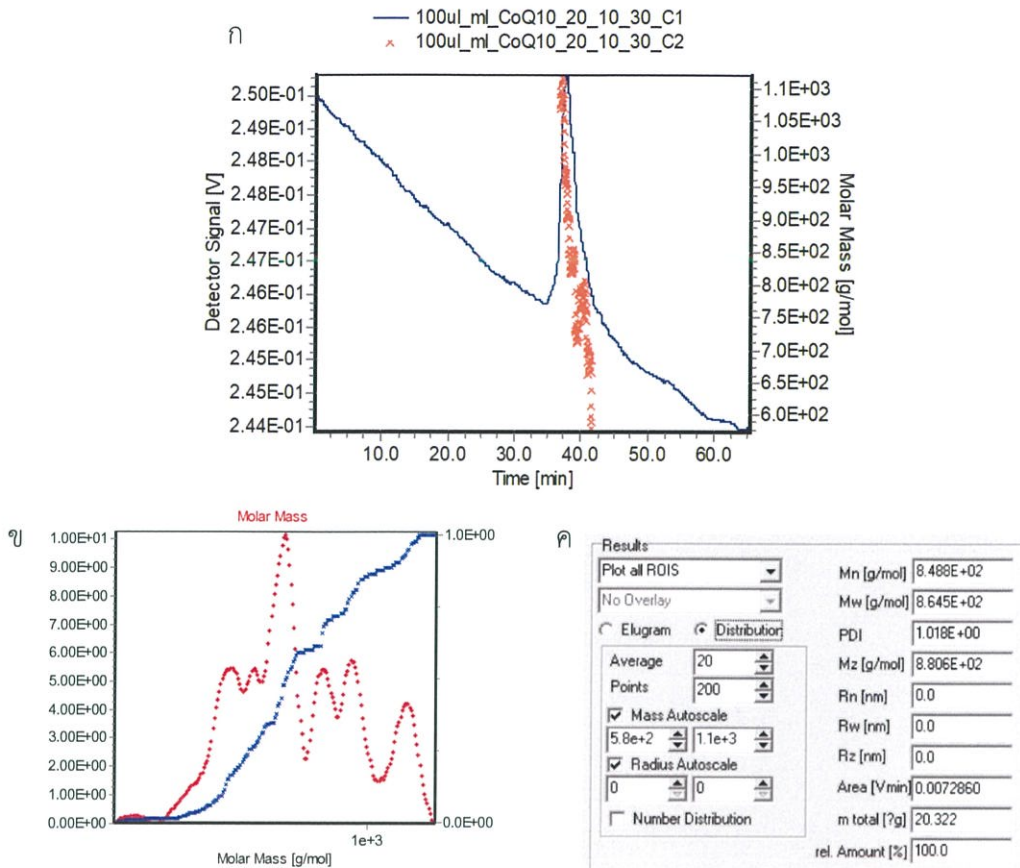
การแยกสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม พบพีคที่เวลาเดียวกันคือ 37.03 นาที ถึง 45.82 นาที แสดงดังรูปที่ 4.2ก ถึง 4.2ค ตามลำดับ จากรูปที่ 4.2ข ถึง 4.2ค แสดงการกระจายตัวของมวลโมเลกุลและการสะสมของมวลที่เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ และทำการคำนวณมวลโมเลกุลด้วยการหาพื้นที่ใต้กราฟจากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับตัวตรวจจับ MALS จำนวน 21 มุม จะได้ผลการคำนวณจากโปรแกรม AF2000 ของสารโคเอ็นไซม์คิวเทินที่ความเข้มข้นต่างๆดังรูปที่ 4.2ค ถึง 4.2ค



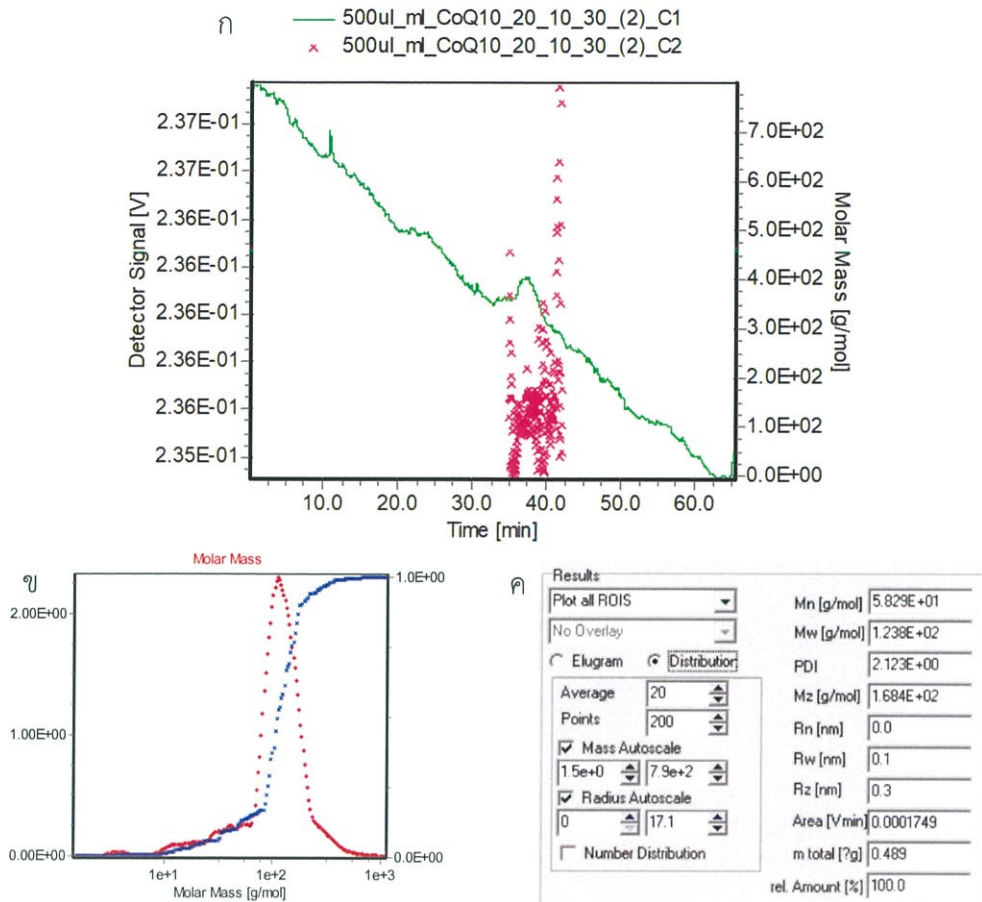
รูปที่ 4.2 (ก) เส้นสีดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญลักษณสีแดง แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารโคเ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณสีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม



รูปที่ 4.3 (ก) เส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์สีเขียว แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสารโคเอ็นไซม์คิวเห็นมาตรฐานความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆ ที่คำนวณได้จากโปรแกรม

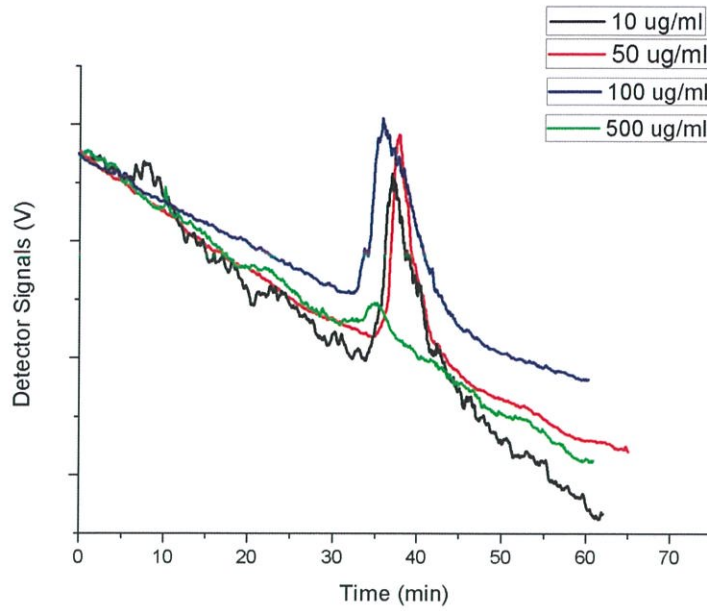


รูปที่ 4.4 (ก) เส้นสีน้ำเงินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์น้ำเงิน แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆ ที่คำนวณได้จากโปรแกรม

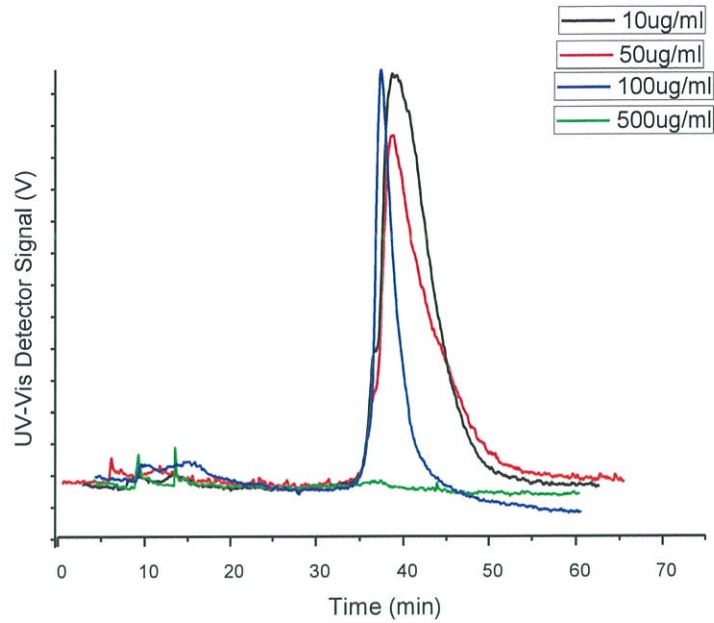


รูปที่ 4.5 (ก) เส้นสีเขียวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์ชมพู แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสาร โคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณ์สีแดง แสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆ ที่คำนวณได้จากโปรแกรม

เมื่อนำกราฟจากรูปที่ 4.2ก ถึง 4.5ก มาทำการปรับสเกลแกน y ซึ่งคือค่าสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) ให้เท่ากัน และนำมาพล็อตเปรียบเทียบลักษณะของสัญญาณเมื่อทำการปรับความเข้มข้นสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานที่ 10, 50, 100 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับเวลาในหน่วยนาที แสดงดังรูปที่ 4.6 และนำสัญญาณจากตัวตรวจจับ UV-Vis มาปรับสเกลแกน y เปรียบเทียบ แสดงดังรูปที่ 4.7 ด้านล่าง



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยเส้นสีดำแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีแดงแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ เส้นสีเขียวแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ UV-Vis (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ โดยเส้นสีดำแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีแดงแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ เส้นสีเขียวแสดงถึงสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากรูปที่ 4.6 และ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ และพบว่าทั้ง 4 สัญญาณจากตัวตรวจจับ UV (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ ของสารโคเอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐานที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน จากการทดลองพบว่าทุกความเข้มข้นจะเกิดพีคที่เวลาใกล้เคียงกันที่เวลาประมาณ 35 - 50 นาที ทั้งในภาพที่แสดงผล MALS และ UV-Vis แต่รูปร่างของพีคจะแตกต่างกัน โดยจะสังเกตได้ชัดในรูปที่ 4.7 ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะมีความกว้างของพีค ลดลงตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พีคที่พบมีความสูงน้อยกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างสังเกตได้ชัด แต่ยังสามารถเห็นเป็นพีคขนาดเล็ก (รูปที่ 4.5ก) อาจเกิดจากการที่มีความเข้มข้นมากเกินไปจึงเกิดกระบวนการโฟกัสและรีแฟล็กซ์เซชันที่ไม่เสร็จสมบูรณ์ ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของ UV ลดลงเมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่น้อยกว่า [10]

จากรูปที่ 4.2ค ถึง 4.5ค สามารถสรุปค่ามวลโมเลกุล (MW) ที่คำนวณได้จากเทคนิค AF4 ที่ความเข้มข้นต่างๆดังแสดงในตารางที่ 4.2

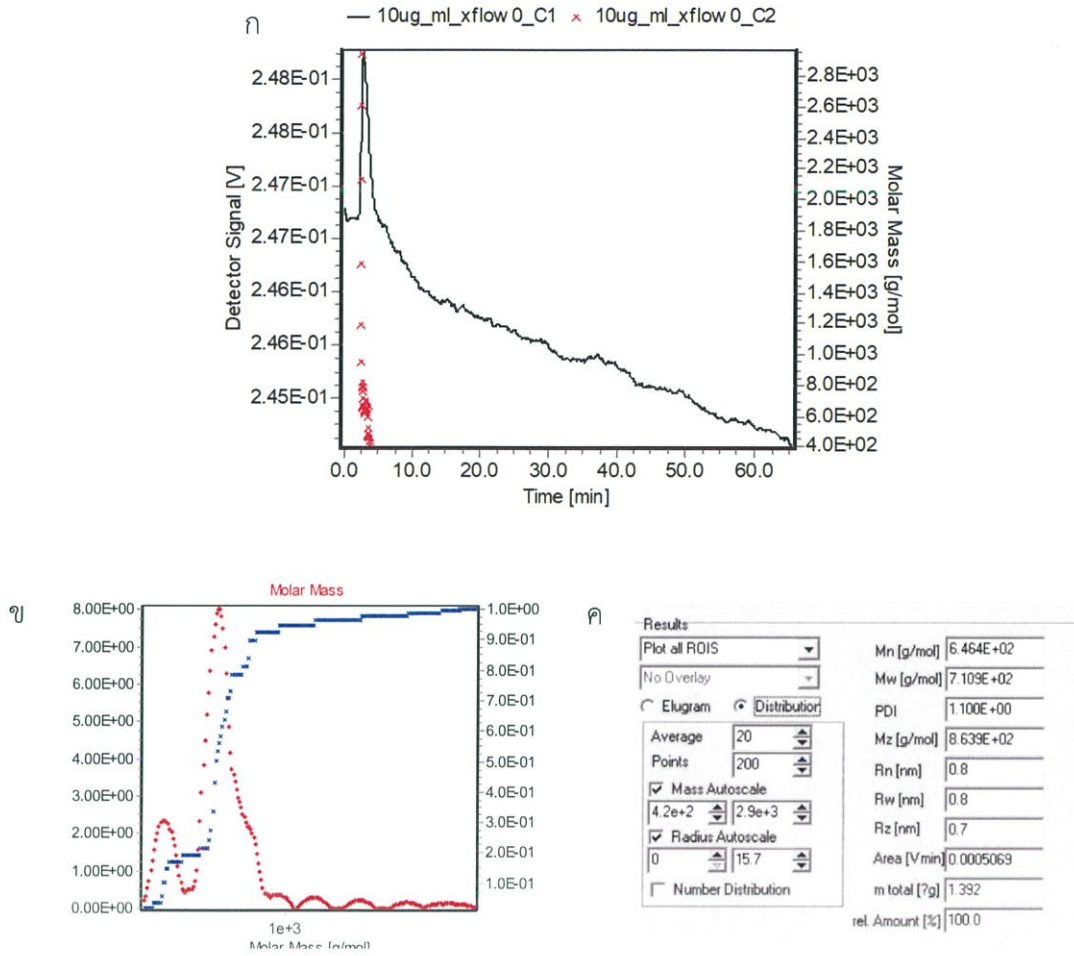
ตารางที่ 4.2 แสดงค่ามวลโมเลกุลของโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับ MALS

ความเข้มข้น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	มวลโมเลกุล กรัม/โมล
10	8.606×10^2
50	8.650×10^2
100	8.637×10^2
500	1.635×10^2

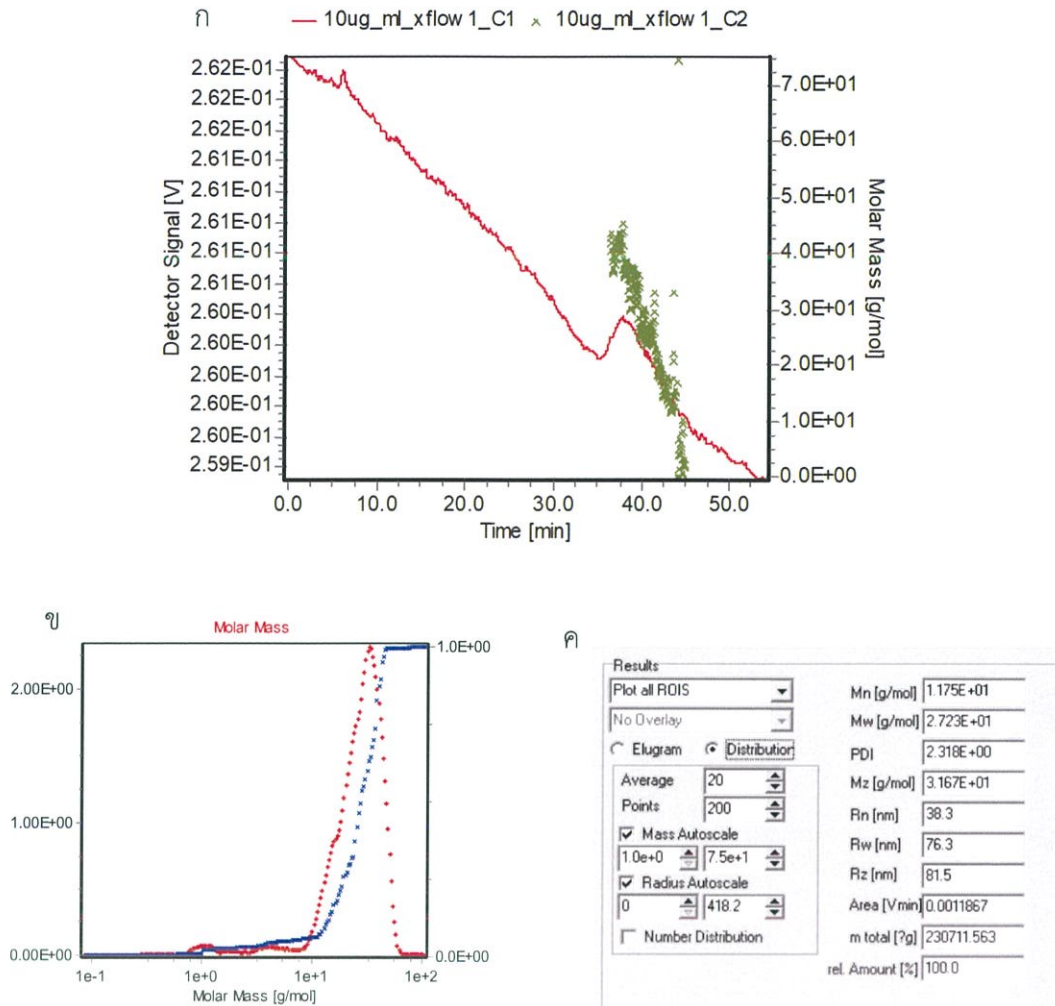
เมื่อทำการวิเคราะห์สารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานที่ใช้ความเข้มข้นต่างกัน สามารถหาค่ามวลโมเลกุลได้ใกล้เคียงกับค่ามวลโมเลกุลที่แท้จริงคือ 863.34 Da หรือ 863.34 กรัม/โมล แต่จากผลค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของโคเอ็นไซม์คิวเท็น แสดงให้เห็นผลของความเข้มข้นต่อความสมบูรณ์/ประสิทธิภาพของการแยก แต่ไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุล ดังนั้นสำหรับการทดลองถัดไปจึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เนื่องจากพบสัญญาณของ UV-Vis ที่ชัดเจนอย่างมีนัยสำคัญ

4.2.2 ผลของการใช้ค่า Cross flow ที่แตกต่างกันสำหรับการแยกสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานด้วยเทคนิค AF4

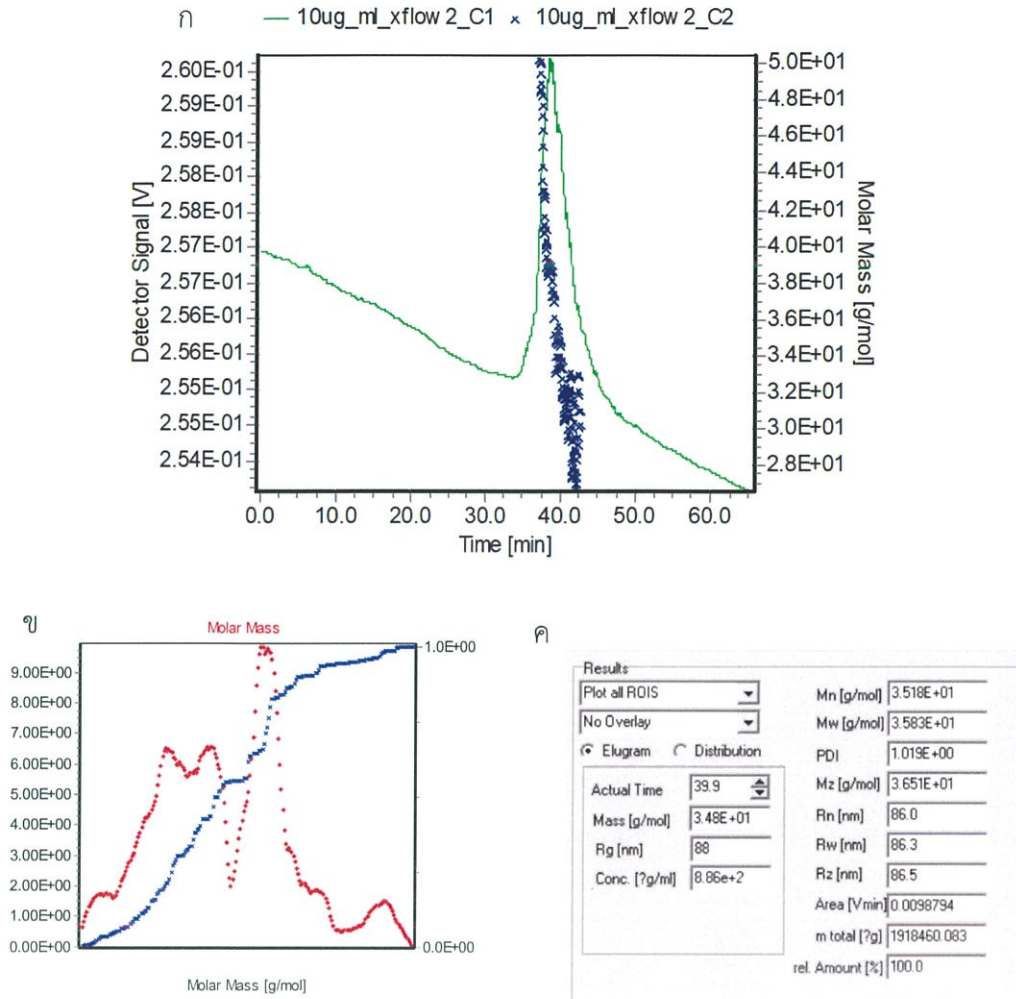
จากการทดลองที่ 4.2.1 หัวข้อนี้เลือกใช้โคเอ็นไซม์คิวเท็นที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการปรับค่า Cross flow ให้เหมาะสม โดยเลือกใช้ค่า Cross flow ที่ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร/นาที มาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่ค่า Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที เวลาในการเกิดพีคมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยมีพีคเกิดขึ้นในช่วงเวลาประมาณ 2.5 ถึง 4.4 นาที (รูปที่ 4.8ก) ส่วนที่ค่า Cross flow 1 2 และ 3 มิลลิลิตร/นาที พบพีคที่เวลาเดียวกันคือ 37.03 นาที ถึง 45.82 นาที (รูปที่ 4.9ก ถึง 4.11ก) จากรูปที่ 4.8ข ถึง 4.11ข แสดงการกระจายตัวของมวลโมเลกุลและการสะสมของมวลที่เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ และทำการคำนวณมวลโมเลกุลด้วยการหาพื้นที่ใต้กราฟจากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับตัวตรวจจับ MALS จำนวน 21 มุม จะได้ผลการคำนวณจากโปรแกรม AF2000 ออกมาดังรูป 4.2ค ถึง 4.5ค



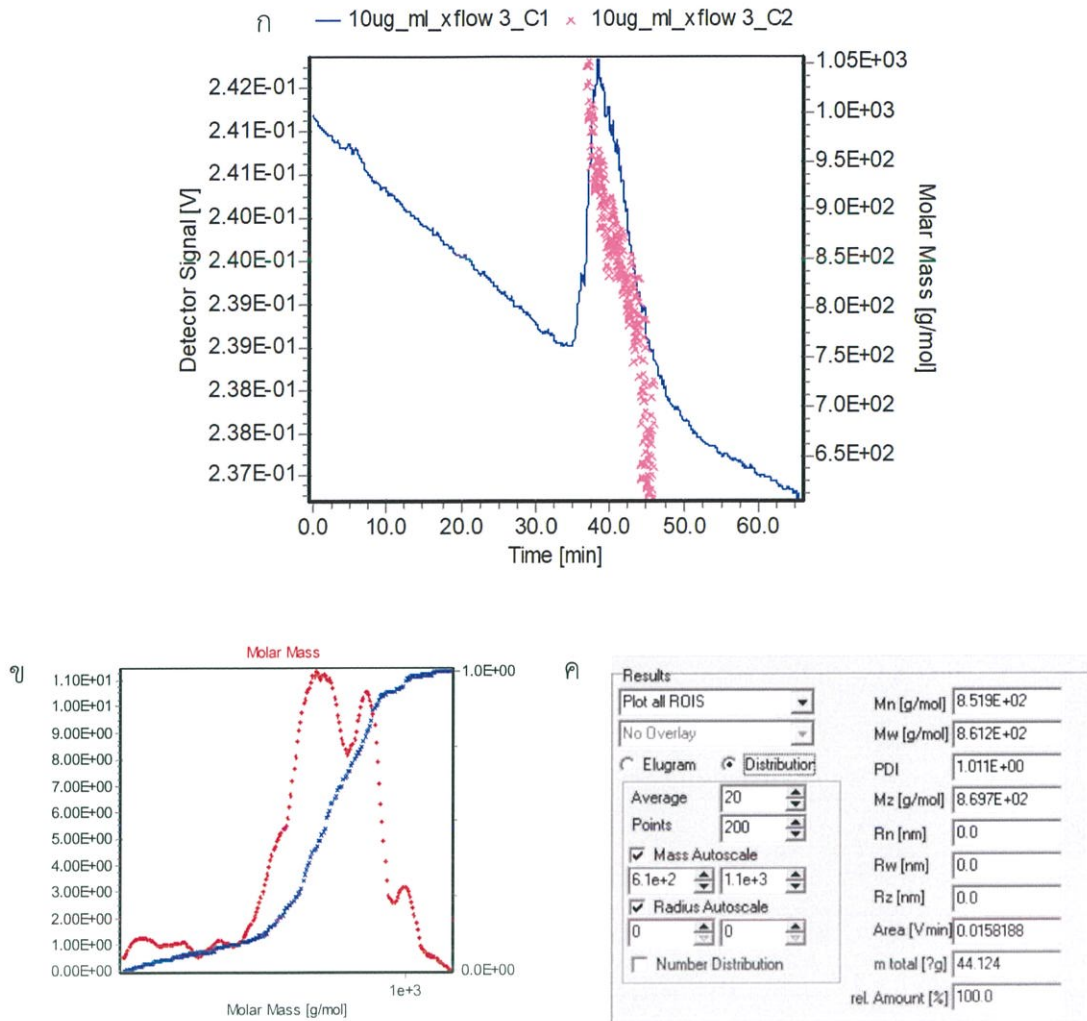
รูปที่ 4.8 (ก) เส้นสีดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์แดง แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสารโค-เอ็นไซม์คิวเทินมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที (ข) สัญลักษณ์สีแดง แสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม



รูปที่ 4.9 (ก) เส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญญาณสีเขียว แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 1 มิลลิลิตร/นาที (ข) สัญญาณสีแดง แสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม

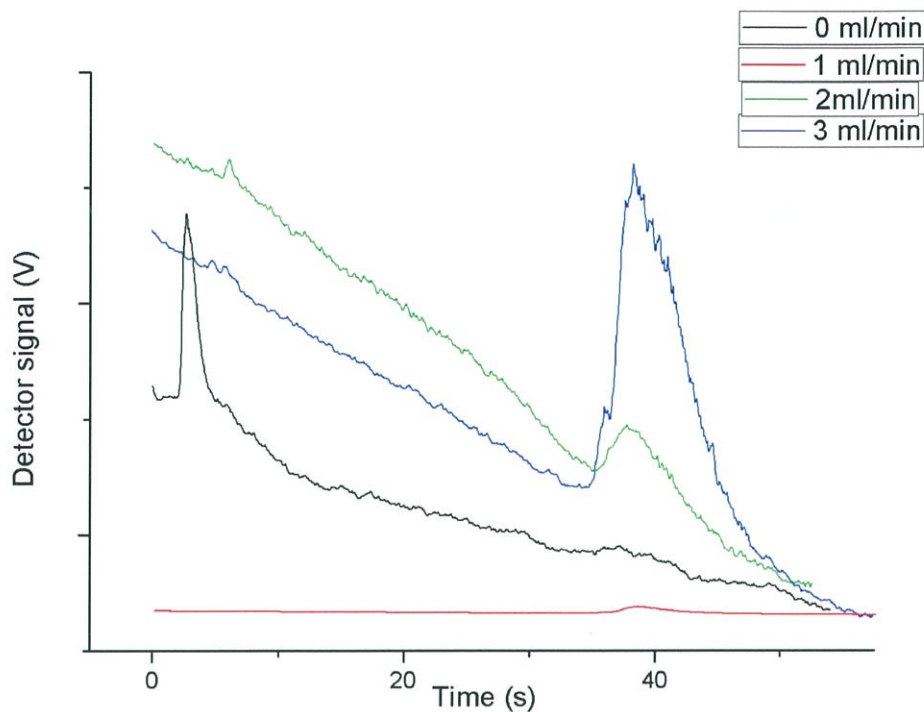


รูปที่ 4.10 (ก) เส้นสีเขียวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์สีน้ำเงิน แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 2 มิลลิลิตร/นาที (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม



รูปที่ 4.11 (ก) เส้นสีน้ำเงินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์สีชมพู แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสารโคเอ็นโซมคิวเทินมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม

เมื่อนำกราฟจากรูปที่ 4.8 ก ถึง 4.11 ก มาทำการปรับสเกลแกน y ซึ่งคือค่าสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) ให้เท่ากัน และนำมาพล็อตเปรียบเทียบลักษณะของสัญญาณเมื่อทำการปรับค่า Cross flow ที่ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร/นาที เทียบกับเวลาในหน่วยนาที แสดงดังรูปที่ 4.12 และนำสัญญาณจากตัวตรวจจับ UV-Vis มาปรับสเกลแกน y เปรียบเทียบ แสดงดังรูปที่ 4.13 ด้านล่าง



รูปที่ 4.12 เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ สีดำแสดงถึงการใช้ค่า Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที่ สีแดงแสดงถึงการใช้ค่า Cross flow 1 มิลลิลิตร/นาที่ สีเขียวแสดงถึงการใช้ค่า Cross flow 2 มิลลิลิตร/นาที่ และ สีน้ำเงินแสดงถึงการใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่

จากรูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลา (นาที่) พบว่าเมื่อปรับค่า Cross flow ในการทดลองแยกสารโคเอ็นไซม์คิวเท็น มาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ค่า Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที่ จะเกิดพีคก่อนที่ค่า Cross flow 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร/นาที่ มีลักษณะพีคที่แคบและสูง ส่วนที่ค่า Cross flow อื่นๆ เกิดพีคที่เวลาเดียวกันแต่มีความสูงของสัญญาณที่แตกต่างกัน โดยมีความสูงของพีคเพิ่มขึ้นจากค่า Cross flow 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร/นาที่ ตามลำดับ

นำค่ามวลโมเลกุล (MW) จากรูปที่ 4.8ค ถึง 4.11ค ที่คำนวณได้จากเทคนิค AF4 ที่ค่า Cross flow ต่างๆกันมาทำเป็นตารางที่ 4.3

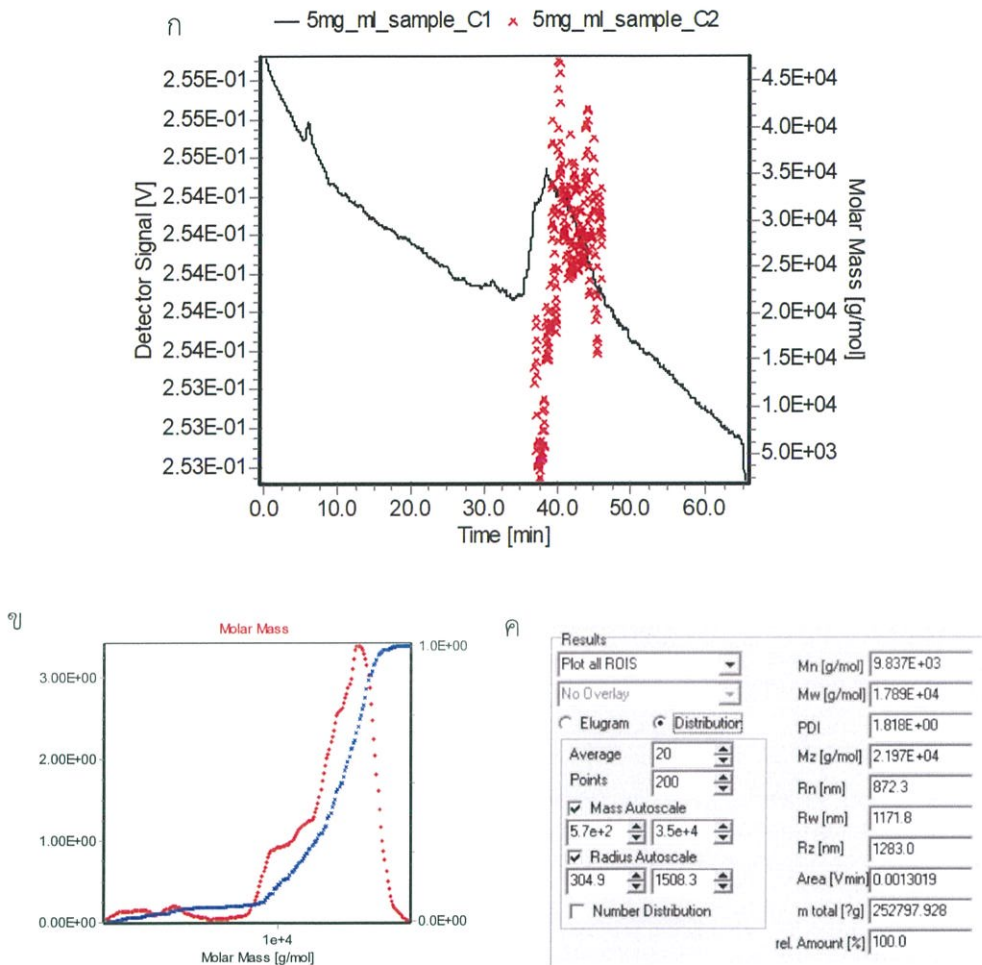
ตารางที่ 4.3 แสดงค่ามวลโมเลกุลของโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานที่ปรับค่า Cross flow ต่างๆกัน โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับ MALS

Cross flow มิลลิลิตร/นาที่	มวลโมเลกุล กรัม/โมล
0	8.662×10^2
1	3.955×10^2
2	3.588×10^1
3	8.606×10^2

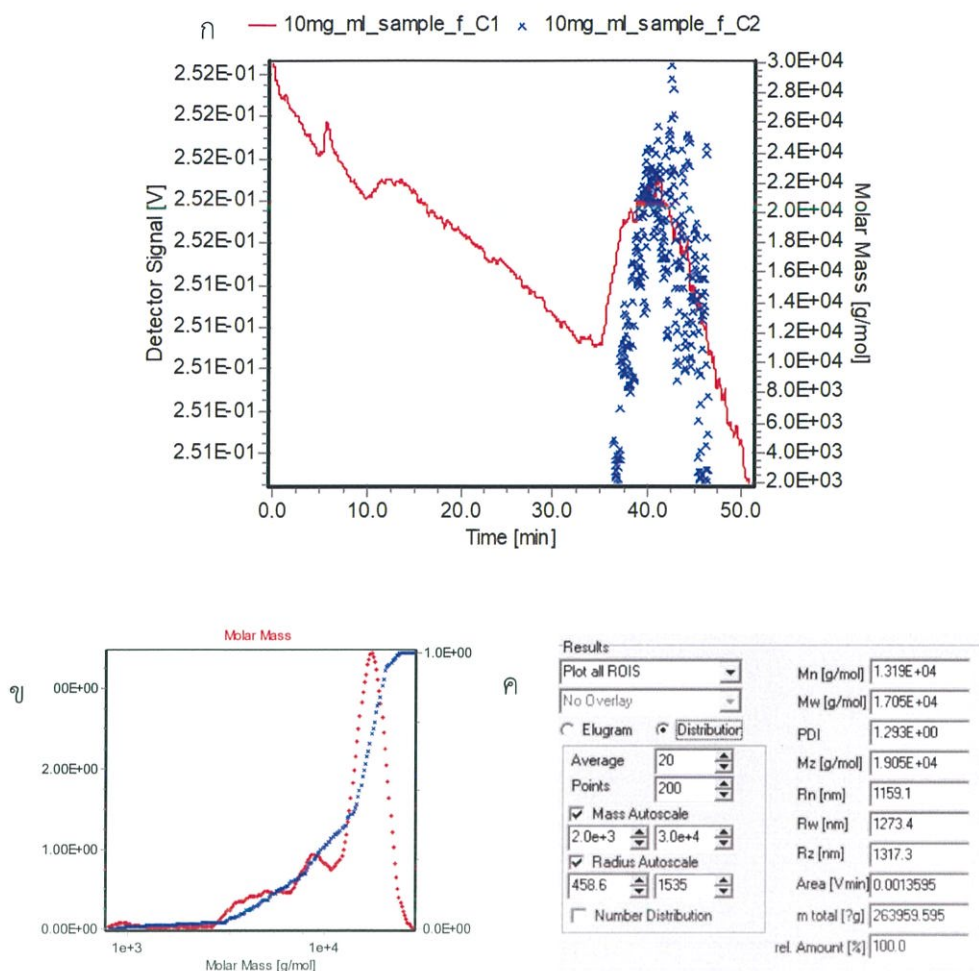
จากรูปตารางที่ 4.3 พบว่าที่ค่า Cross flow 0 และ 3 มิลลิลิตร/นาที่ สามารถคำนวณค่ามวลโมเลกุลของโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานได้ใกล้เคียงกับค่ามวลโมเลกุลที่แท้จริงของโคเอ็นไซม์คิวเท็น คือ 863.34 กรัม/โมล หรือ 8.633×10^2 กรัม/โมล ส่วนที่ค่า Cross flow 1 และ 2 มิลลิลิตร/นาที่ ไม่สามารถแยกและคำนวณมวลโมเลกุลได้เท่ากับของจริง แสดงว่าค่า Cross flow ดังกล่าวไม่สามารถแยกและวิเคราะห์โคเอ็นไซม์คิวเท็นให้ถูกต้องได้ เนื่องจากแรงกดยังไม่มากพอให้สารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานเกิดการแยกตัวอย่างสมบูรณ์ในช่วงการโฟกัส - รีแลกซ์เซชัน โดยที่ค่า Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที่ หมายถึงไม่มีการให้แรงกดยในแนวตั้งฉากสำหรับการแยกสารสามารถให้ค่ามวลโมเลกุลที่ถูกต้องได้ แต่เมื่อไม่มีแรงกดยตั้งฉากแสดงว่าไม่มีการแยกสารเกิดขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกค่า Cross flow ที่ 3 มิลลิลิตร/นาที่ ในการทำการทดลองแยกโคเอ็นไซม์คิวเท็นในตัวอย่างเครื่องดื่มที่ผสมโคเอ็นไซม์คิวเท็นในหัวข้อ 4.1.3 ถัดไป [10], [13]

4.2.3 ผลของการใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันสำหรับการแยกสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นในตัวอย่างเครื่องต้มด้วยเทคนิค AF4

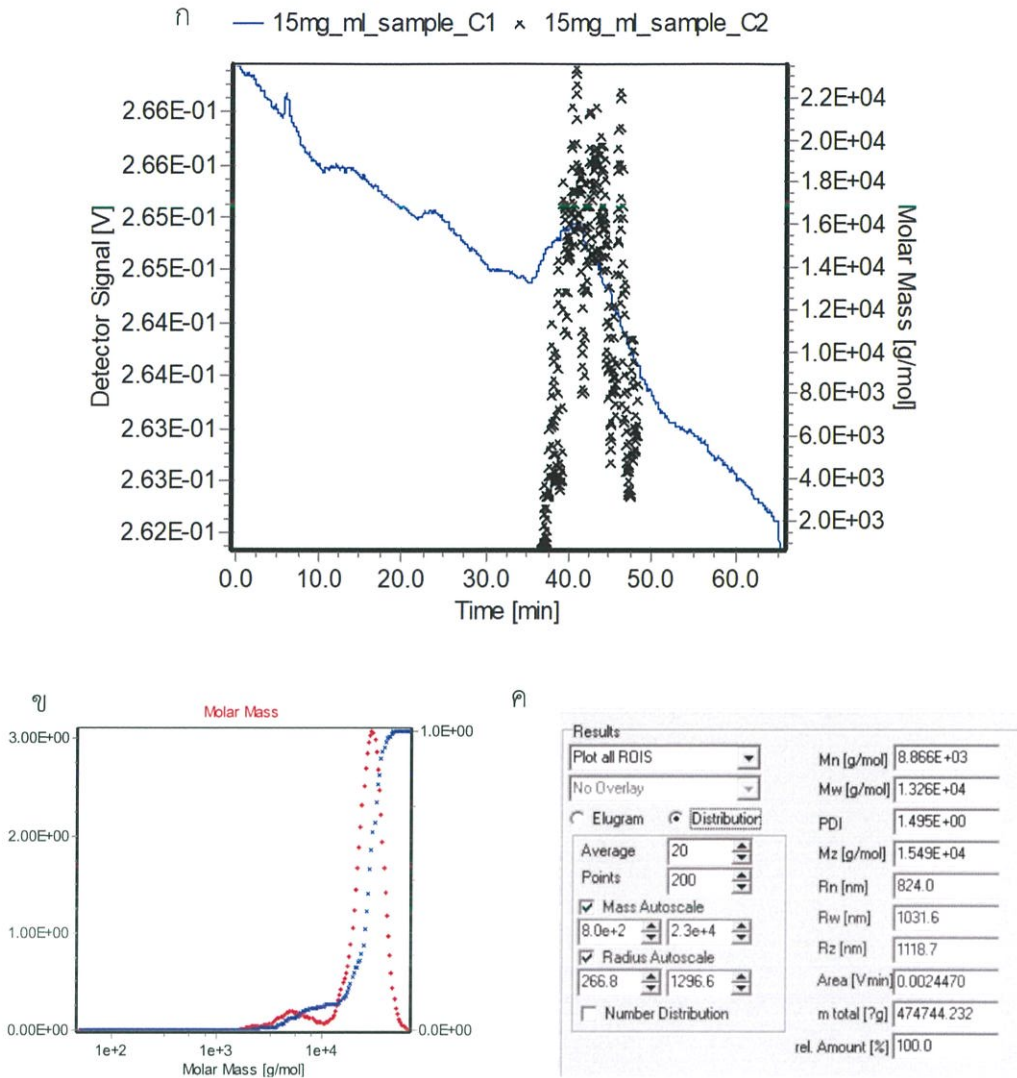
เมื่อนำวิธีการที่ใช้แยกโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานมาใช้กับตัวอย่างเครื่องต้มที่ผสมโคเอ็นไซม์คิวเท็น ซึ่งตัวกลางไม่ใช้น้ำปลอดประจุ โดยนำตัวอย่างเครื่องต้มมาเจือจางกับน้ำปลอดประจุที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 5, 10 และ 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.23 ถึง 4.25



รูปที่ 4.13 (ก) เส้นดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์สีแดง แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นในเครื่องต้มที่มีส่วนผสมของโคเอ็นไซม์คิวเท็นความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม

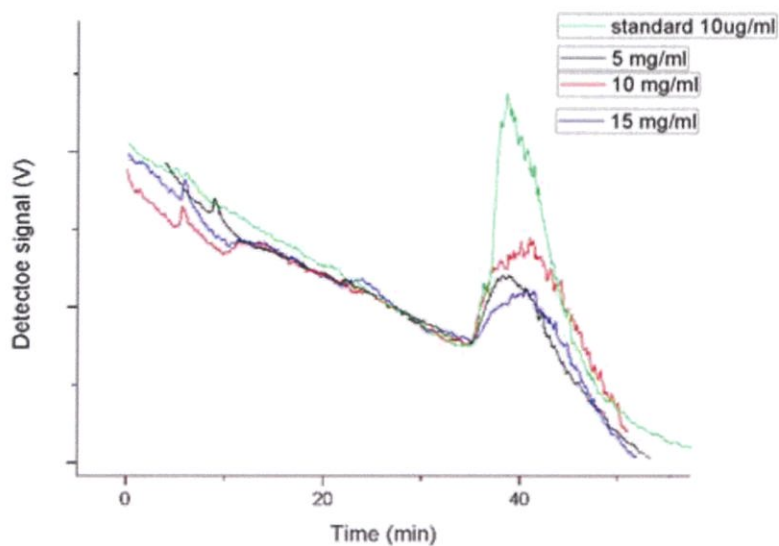


รูปที่ 4.14 (ก) เส้นแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญลักษณ์สีน้ำเงิน แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสาร โคเอ็นโซมคิควเทินในเครื่องตีที่มีส่วนผสมของโคเอ็นโซมคิควเทินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม



รูปที่ 4.15 (ก) เส้นสีน้ำเงินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์สีดำ แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสาร โคเอ็นไซม์คิวเท็นในเครื่องตีที่มีส่วนผสมของโคเอ็นไซม์คิวเท็นความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม

เมื่อนำกราฟจากรูปที่ 4.13ก ถึง 4.15ก ของตัวอย่างเครื่องดื่มผสมโคเอ็นไซม์คิวเท็นที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และกราฟจากตัวอย่างโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที (รูปที่ 4.11ก) มาทำการปรับสเกลแกน y ซึ่งคือค่าสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) ให้เท่ากัน และนำมาพล็อตเปรียบเทียบลักษณะของสัญญาณ เทียบกับเวลาในหน่วยนาที ได้ดังรูปที่ 4.16 ด้านล่าง



รูปที่ 4.16 เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที และสัญลักษณ์กากบาทแสดงความสัมพันธ์ระหว่างมวลโมเลกุล (กรัม/โมล) กับเวลาในหน่วยนาที สีดำแสดงถึงตัวอย่างความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สีแดงแสดงถึงตัวอย่างความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สีน้ำเงินแสดงตัวอย่างความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ สีเขียวแสดงถึงตัวอย่างโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที

จากรูปที่ 4.13ค ถึง 4.15ค นำค่ามวลโมเลกุล (MW) ที่คำนวณได้จากเทคนิค AF4 ที่ความเข้มข้นต่างๆมาทำเป็นตารางที่ 4.4 ด้านล่าง

ตารางที่ 4.4 แสดงค่ามวลโมเลกุลของตัวอย่างเครื่องตีผสมโคเอ็นโซมคิวเทินที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับ MALS

ความเข้มข้น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	มวลโมเลกุล กรัม/โมล
5	2.197×10^4
10	1.905×10^4
15	1.549×10^4

จากตาราง 4.4 ไม่สามารถคำนวณมวลโมเลกุลได้เท่ากับของสารโคเอ็นโซมคิวเทินมาตรฐาน อาจเกิดจากตัวกลางของตัวอย่างเครื่องตีผสม แต่จากรูปที่ 4.16 พบว่าพีคที่เกิดขึ้นในตัวอย่างเครื่องตีผสมทั้ง 3 ความเข้มข้น พบพีคที่เวลาประมาณ 35 ถึง 50 นาที และเกิดพีคที่เวลาเดียวกับสารโคเอ็นโซมคิวเทินมาตรฐาน จะสรุปได้ว่า AF4 สามารถแยกและตรวจจับสารโคเอ็นโซมคิวเทินเชิงคุณภาพได้ แต่ไม่เหมาะสำหรับการหาข้อมูลเชิงปริมาณ [13]

4.2.4 วิเคราะห์การกระจายตัวของขนาดอนุภาคโคเอ็นโซมคิวเทินที่แยกจากเครื่องตีผสมโคเอ็นโซมคิวเทินด้วยเทคนิค DLS

4.2.4.1 สารมาตรฐานโคเอ็นโซมคิวเทินที่ไม่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

นำตัวอย่างสารมาตรฐานโคเอ็นโซมคิวเทินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาวัดค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค DLS จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของสารมาตรฐานโคเอ็นไซม์ คิวทีนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่างเฉลี่ย (เส้นผ่านศูนย์กลาง นาโนเมตร)	Pdl
10 µg /ml coQ10 standard	454.6±35.66	0.555

4.2.4.2 สารมาตรฐานโคเอ็นไซม์คิวทีนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

นำตัวอย่างสารมาตรฐานโคเอ็นไซม์คิวทีนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4 โดยทำการเก็บสารละลายออกมา ทั้งหมด 2 ช่วง แบ่งเป็นช่วงต้นถึงกลางพีคที่ เวลา 35 ถึง 38.5 นาที (F1) และช่วงกลางถึงหลังพีคที่เวลา 38.5 ถึง 50 นาที (F2 และ F3) โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ 1 มิลลิลิตร/นาที และนำตัวอย่างที่เก็บออกมาวัดค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค DLS จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) สารมาตรฐานโคเอ็นไซม์คิวทีนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่างเฉลี่ย (เส้นผ่านศูนย์กลาง นาโนเมตร)	Pdl
10 µg/ml F1 coQ10 standard	594.4±18.36	0.562
10 µg/ml F2 coQ10 standard	268.8±25.39	0.386
10 µg/ml F3 coQ10 standard	204.6±9.557	0.334

4.2.4.3 สารโคเอ็นไซม์คิวทีนในตัวอย่างเครื่องดื่มที่ไม่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

นำตัวอย่างเครื่องดื่มผสมโคเอ็นไซม์คิวทีนมาทำการเจือจางด้วยน้ำปอดประจุในอัตราส่วน 1:10 1:20 และ 1:50 ตามลำดับ มาวัดค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค DLS จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ในตัวอย่างเครื่องตีผสมโคเอ็นโซมควิเทินที่ไม่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่างเฉลี่ย (เส้นผ่านศูนย์กลาง นาโนเมตร)	Pdl
1:10 coQ10	481.5±10.68	0.452
1:20 coQ10	466.4±2.359	0.425
1:50 coQ10	424.4±14.57	0.510

จากตารางที่ 4.7 พบว่าแม้จะมีการเจือจางเครื่องตีตัวอย่างที่ผสมโคเอ็นโซมควิเทินด้วยน้ำปลอดประจุที่อัตราส่วนต่างๆกัน ให้ผลค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของขนาดอนุภาคต่างๆ ในเครื่องตีที่มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยที่อัตราส่วน 1:10 1:20 และ 1:50 มีขนาดการกระจายตัวเฉลี่ย 469.7, 466.4 และ 458.8 นาโนเมตร ตามลำดับ แต่มีช่วงการเบี่ยงเบนมาตรฐานที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.7 โดยที่เตรียมตัวอย่างด้วยการเจือจางในอัตราส่วนที่แตกต่างกันมีผลต่อการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในตัวกลาง

4.2.4.4 สารโคเอ็นโซมควิเทินในตัวอย่างเครื่องตีที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

นำเครื่องตีผสมโคเอ็นโซมควิเทินที่ไม่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4 ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการเก็บออกมา ทั้งหมด 2 ช่วง แบ่งเป็น ช่วงต้นถึงกลางพีคที่ เวลา 35 ถึง 38.5 นาที (F1) และช่วงกลางถึงหลังพีคที่เวลา 38.5 ถึง 50 นาที (F2 และ F3) โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ 1 มิลลิลิตร/นาที และนำตัวอย่างที่เก็บออกมาวัดค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค DLS จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ในตัวอย่างเครื่องดื่มผสมโคเอ็นไซม์คิวเท็นที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

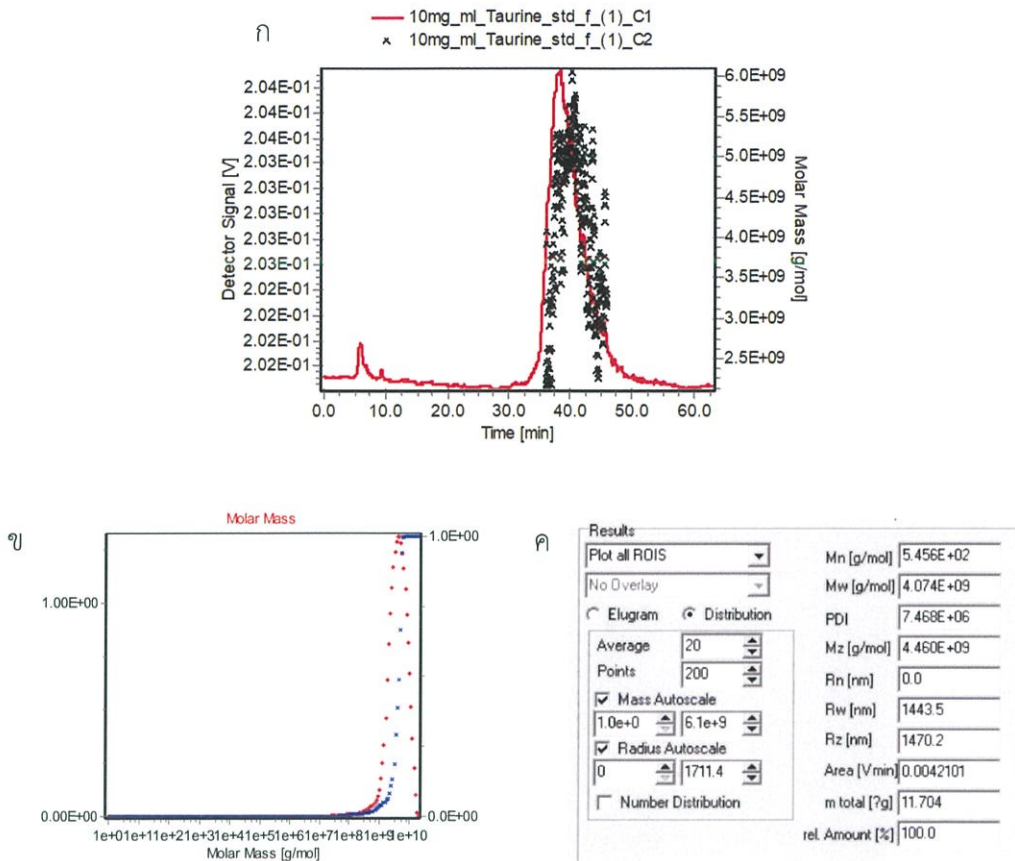
ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่างเฉลี่ย (เส้นผ่านศูนย์กลาง นาโนเมตร)	Pdl
5mg/ml F1 coQ10	792.4±65.19	0.685
10mg/ml F1 coQ10	711.8±51.68	0.599
15mg/ml F1 coQ10	246.6±15.76	0.321
5mg/ml F2 coQ10	1016±65.01	0.663
10mg/ml F2 coQ10	1323±43.35	0.802
15mg/ml F2 coQ10	220.5±8.107	0.277
5mg/ml F3 coQ10	6740±574.6	1.000
10mg/ml F3 coQ10	985.1±42.76	0.727
15mg/ml F3 coQ10	346.7±34.43	0.369

โดยจากตารางที่ 4.6 และ 4.8 พบว่าเมื่อทำการแยกสารออกมาด้วยวิธี AF4 และมาวัดด้วยเทคนิค DLS แล้วมีค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ยค่อนข้างกว้าง และสังเกตได้จากค่า Pdl ที่วัดได้

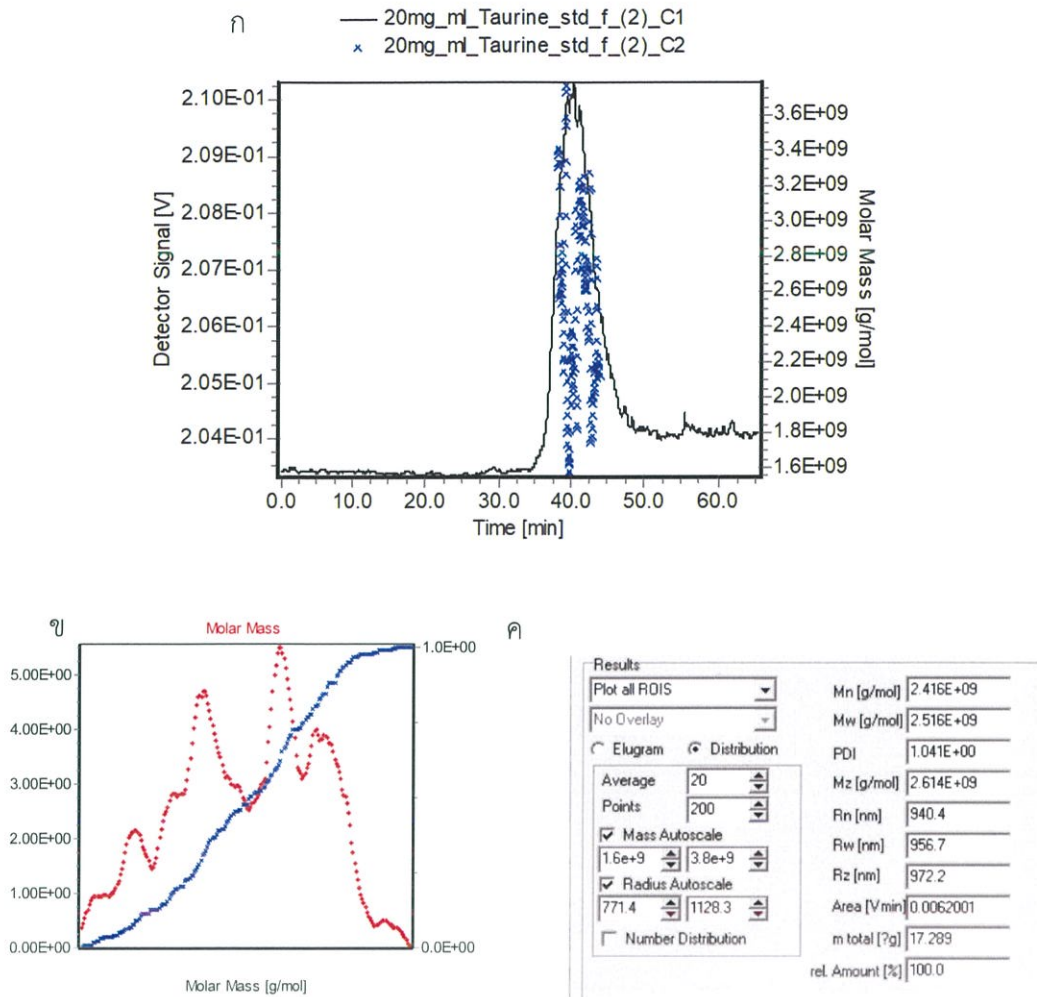
4.3 การวิเคราะห์สารทอรีนด้วยเทคนิค AF4

4.3.1 ผลของการแยกสารทอรีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค AF4

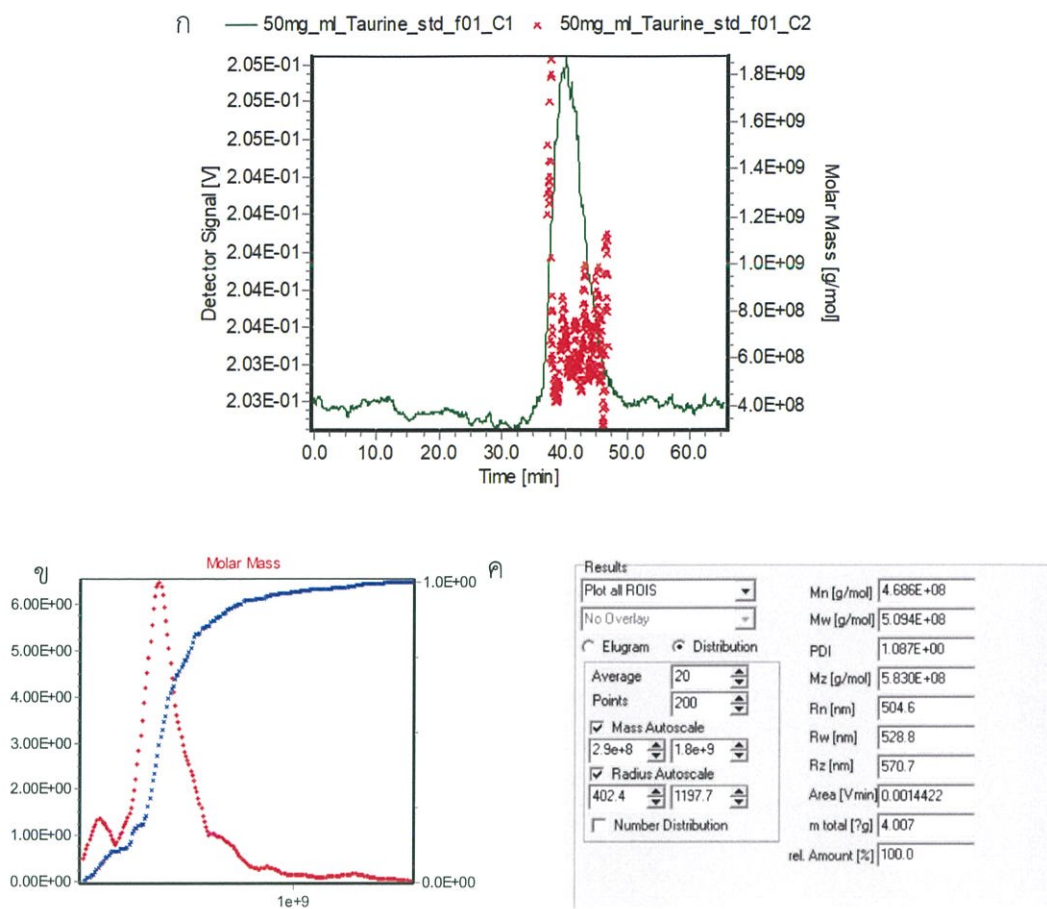
เมื่อนำสารทอรีนมาตรฐานที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง AF4 ด้วยปริมาตร 60 ไมโครลิตร โดยใช้ 0.9% NaCl เป็นสารละลายตัวพา จะได้ภาพเปรียบเทียบของสารทอรีนที่แต่ละความเข้มข้นตั้งรูปด้านล่าง โดยตั้งแต่วันที่ 4.24ก ถึง 4.27ก แสดงถึงกราฟความเข้มของสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) เทียบกับเวลา (นาท) ข แสดงถึงการกระจายตัวของมวลโมเลกุล และ ค คือผลการคำนวณค่าต่างๆโดยโปรแกรม AF2000 จากการหาพื้นที่ใต้กราฟจากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับตัวตรวจจับ MALS จำนวน 21 มุม



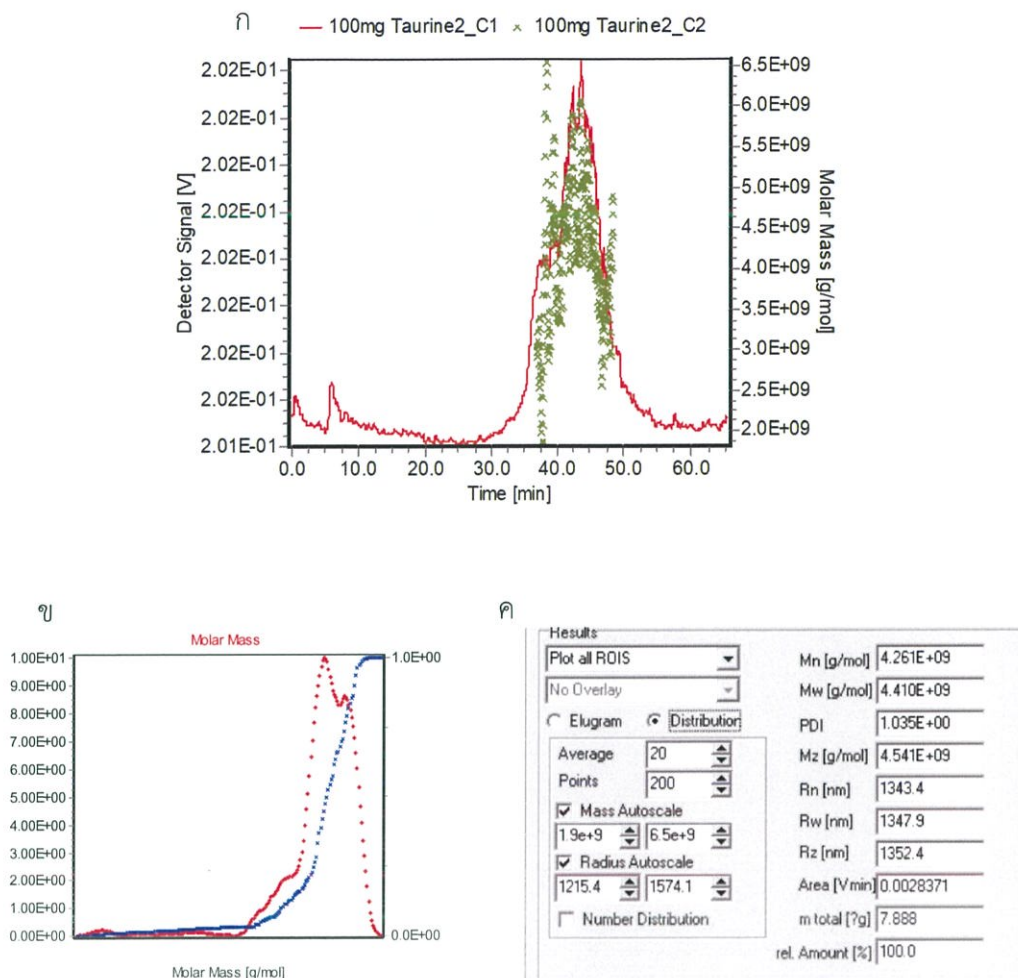
รูปที่ 4.17 (ก) เส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์สีดำ แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม



รูปที่ 4.18 (ก) เส้นสีดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญญาณสีน้ำเงิน แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสาร ทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความ แตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวล โมเลกุล



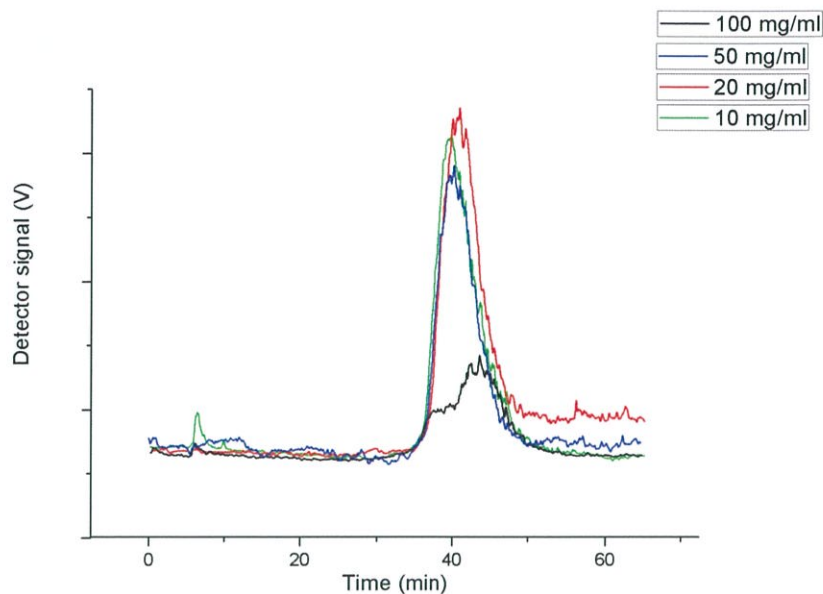
รูปที่ 4.19 (ก) เส้นสีดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญลักษณสีแดง แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสาร ทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณสีแดงแสดงความ แตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวล โมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม



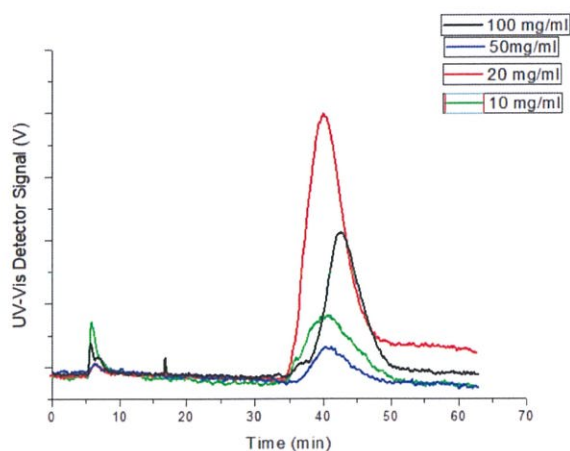
รูปที่ 4.20 (ก) เส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์สีเขียว แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม

เมื่อนำกราฟจากรูปที่ 4.24ก ถึง 4.27ก มาทำการปรับสเกลแกน y ซึ่งคือค่าสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) ให้เท่ากัน เทียบกับเวลาในหน่วยนาที่ แสดงดังรูปที่ 4.28 และนำสัญญาณจากตัวตรวจจับ UV-Vis มาปรับสเกลแกน y เปรียบเทียบ แสดงดังรูปที่ 4.29 ด้านล่าง แสดงการเปรียบเทียบลักษณะสัญญาณของสารทอรีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน จากการทดลองพบว่าทุกความเข้มข้นจะเกิดพีคที่เวลาใกล้เคียงกันที่เวลาประมาณ 41 นาที โดยที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสูงของพีคใกล้เคียงกัน ส่วนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะมีพีคที่มีความสูงน้อยกว่าความเข้มข้นอื่นมากอย่างสังเกตเห็นได้ชัด อาจ

เกิดจากการที่มีความเข้มข้นมากเกินไปจึงเกิดกระบวนการโฟกัสและรีแลกซ์เซชันที่ไม่เสร็จสมบูรณ์ ส่งผลให้อาจจะมีตัวอย่างบางส่วนที่หลุดออกมาก่อนทำให้เหลือพีคที่ตำแหน่งประมาณ 41 นาที น้อยกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ



รูปที่ 4.21 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที ของสารทอรีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน โดยเส้นสีเขียวแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีแดงแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ เส้นดำแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 4.22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ UV-Vis (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที่ โดยเส้นสีเขียวแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีแดงแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เส้นสีน้ำเงินแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเส้นสีดำแสดงถึงสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

นำค่ามวลโมเลกุล (MW) ของทอรีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับ MALS ของเทคนิค AF4 ด้วยโปรแกรม AF200 (4.24ค ถึง 4.27ค) นำมาทำเป็นตารางเปรียบเทียบดังตารางที่ 4.9 ด้านล่าง

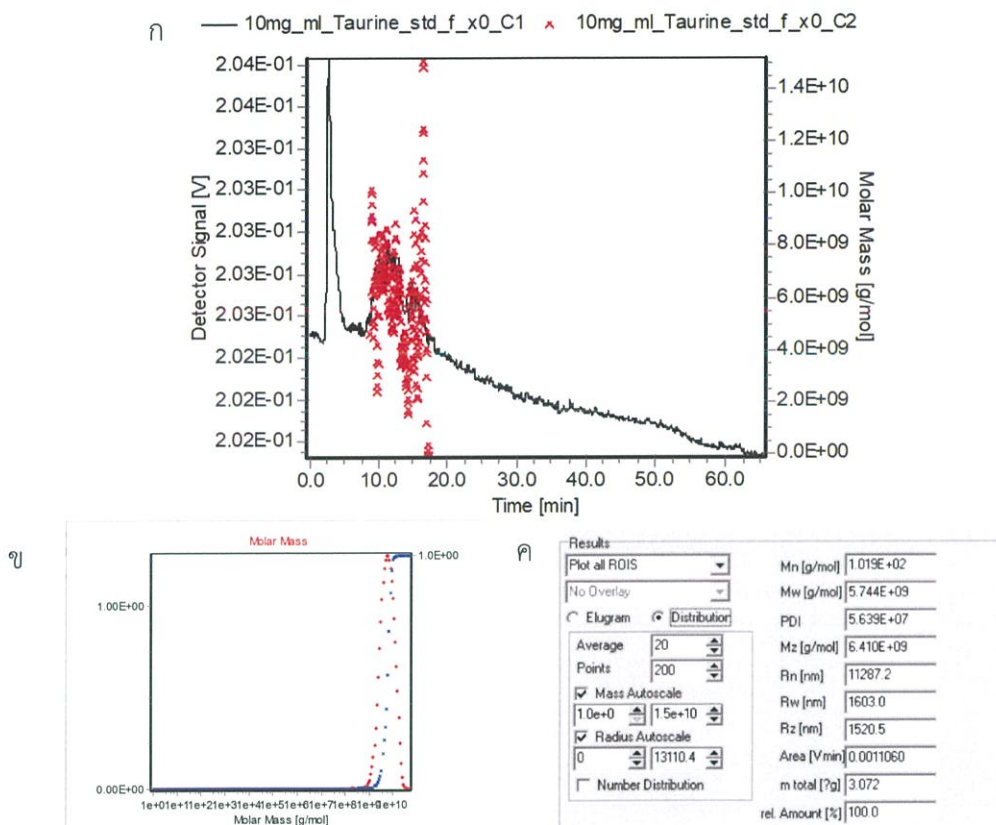
ตารางที่ 4.9 แสดงค่ามวลโมเลกุลของโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับ MALS

ความเข้มข้น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	มวลโมเลกุล กรัม/โมล
10	4.460×10^9
20	2.614×10^9
50	5.830×10^8
100	4.541×10^9

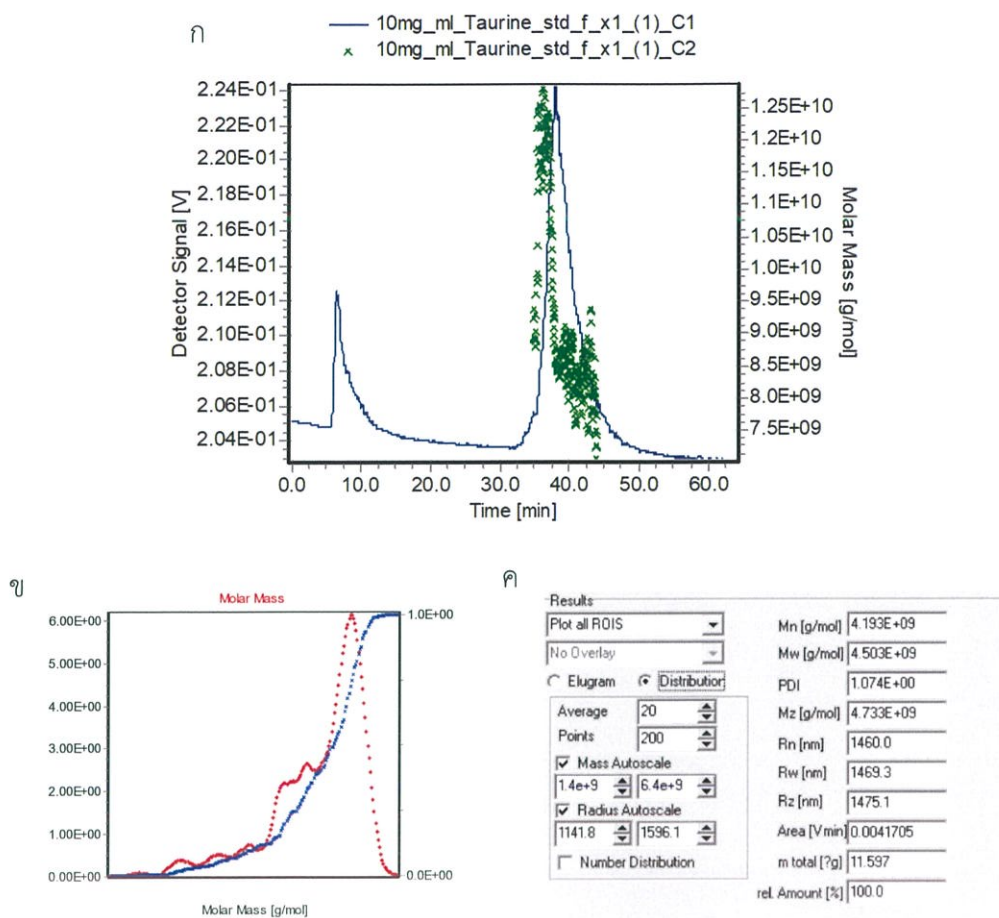
เมื่อทำการวิเคราะห์สารทอรีนมาตรฐานที่ใช้ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าไม่สามารถหาค่ามวลโมเลกุลของสารทอรีนด้วยเทคนิค AF4 ต่อกับตัวตรวจจับ MALS และ UV-Vis ได้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงคือ 125.5 กรัม/โมล จึงสรุปได้ว่าเทคนิคนี้อาจไม่เหมาะสมสำหรับการหาข้อมูลเชิงคุณภาพสำหรับทอรีน และสำหรับการทดลองถัดไปเลือกใช้สารทอรีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เนื่องจากมีการกระจายตัวของมวลโมเลกุลในช่วงแคบ (รูป 4.17ข)

4.3.2 ผลของการใช้ค่า Cross flow แตกต่างกันสำหรับการแยกสารทอรีนมาตรฐาน ด้วยเทคนิค AF4

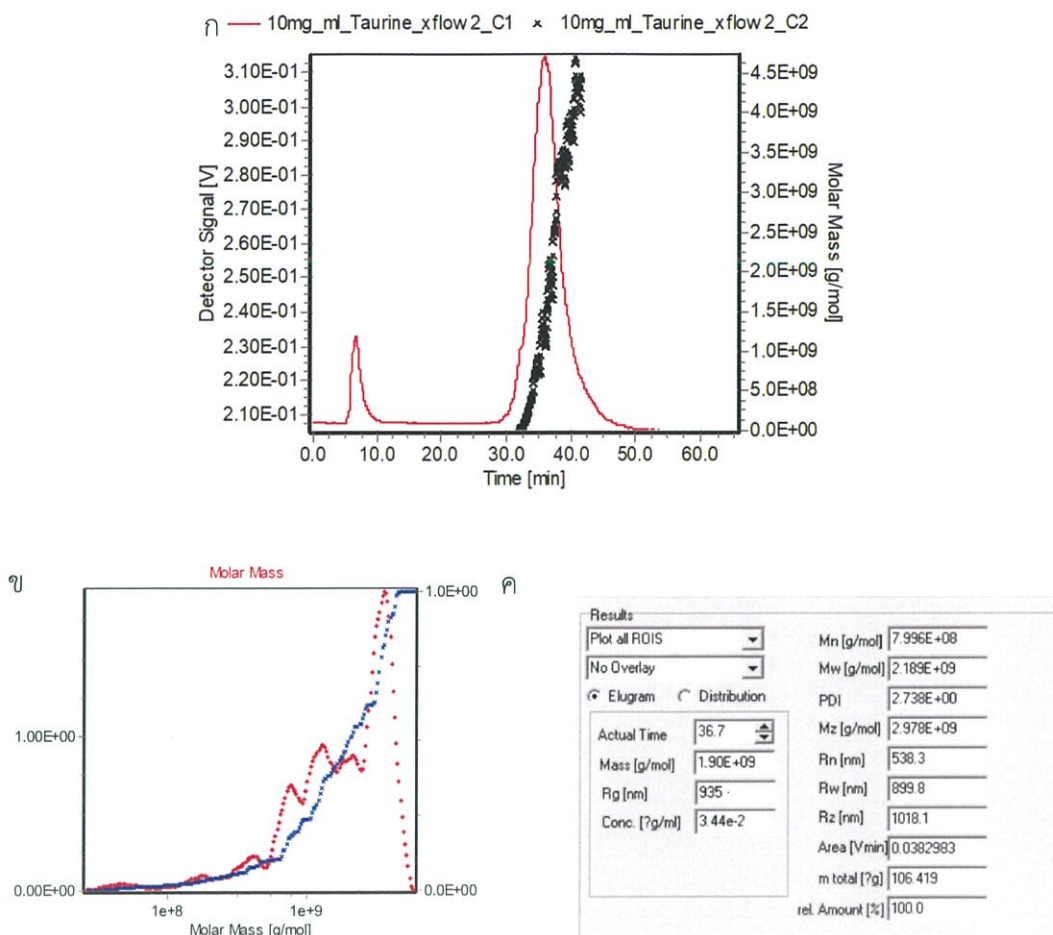
จากการทดลองที่ 4.2.1 หัวข้อนี้เลือกใช้ทอรีนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการปรับค่า Cross flow ให้เหมาะสม โดยเลือกใช้ค่า Cross flow ที่ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร/นาที มาเปรียบเทียบกัน เนื่องจากทอรีนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้ผลดังรูปที่ 4.29 ถึง 4.32 โดยตั้งแต่รูปที่ 4.29ก ถึง 4.32ก แสดงถึงกราฟความเข้มของสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) เทียบกับเวลา (นาที) ข แสดงถึงการกระจายตัวของมวลโมเลกุล และ ค คือผลการคำนวณค่าต่างๆ โดยโปรแกรม AF2000 จากการหาพื้นที่ใต้กราฟจากตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับตัวตรวจจับ MALS จำนวน 21 มุม



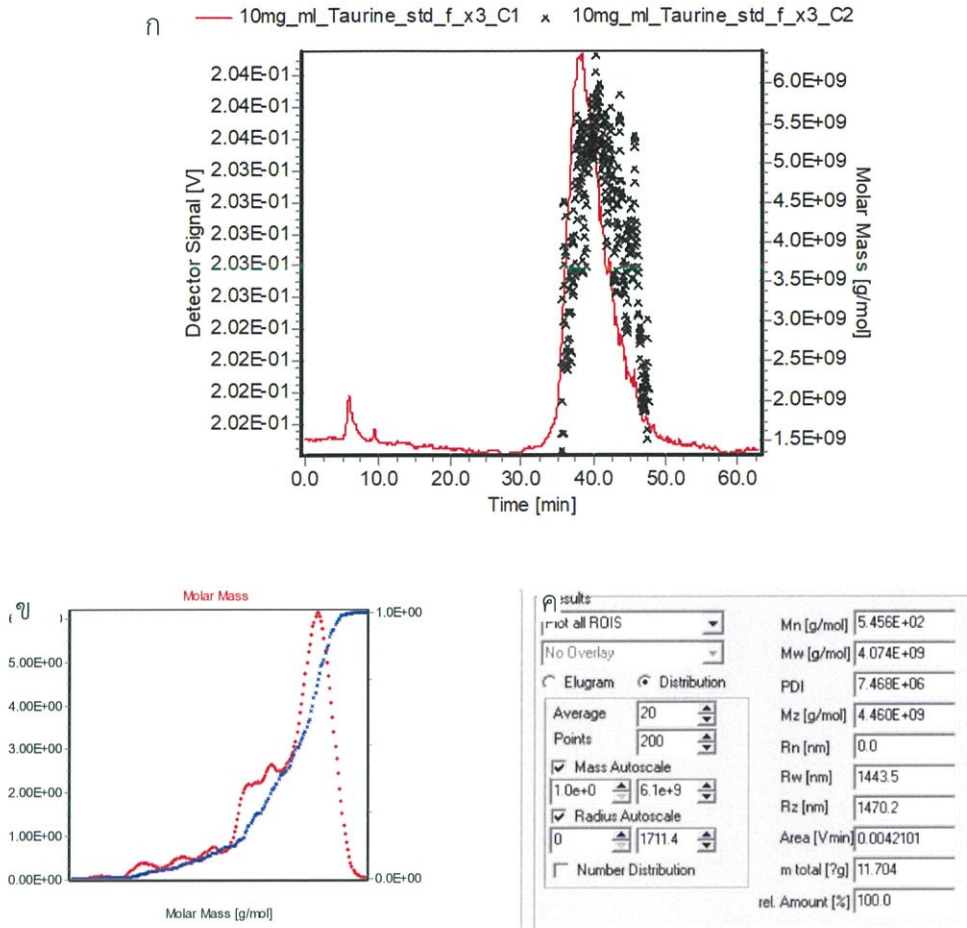
รูปที่ 4.23 (ก) เส้นสีดำแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญญาณลักษณะการกระจายตัวของมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสารทอรีนมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม



รูปที่ 4.24 (ก) เส้นสีน้ำเงินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ . และสัญลักษณ์สีเขียว แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 1 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล

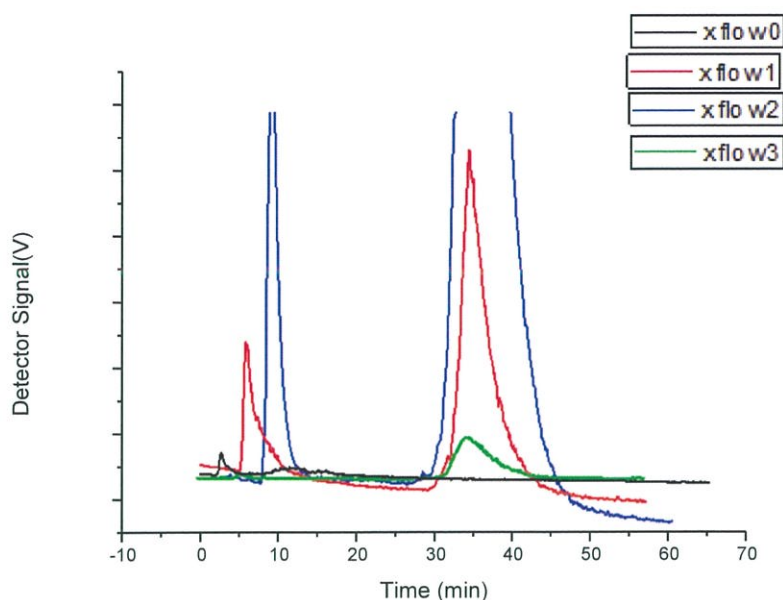


รูปที่ 4.25 (ก) เส้นสีชมพูแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์สีดำ แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสารทอรีนมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 2 มิลลิลิตร/นาที (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม



รูปที่ 4.26 (ก) เส้นสีแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์สีดำ แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที ของสารทอรีนมาตรฐาน ที่ใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์สีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม

เมื่อนำพีคของสารทอรีนมาตรฐานที่ทำการแยกที่เงื่อนไขของค่า Cross flow 0 ,1 ,2 และ 3 มิลลิลิตร/นาที (4.30 ถึง 4.33ก) มาพล็อตโดยปรับแกน y ให้เท่ากันมาเปรียบเทียบรูปร่างและขนาดสัญญาณ ดังรูปที่ 4.34 ด้านล่าง



รูปที่ 4.27 เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที และสัญลักษณ์กากบาทแสดงความสัมพันธ์ระหว่างมวลโมเลกุล (กรัม/โมล) กับเวลาในหน่วยนาที สีแดงแสดงถึงการใช้ค่า Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที สีน้ำเงินแสดงถึงการใช้ค่า Cross flow 1 มิลลิลิตร/นาที และ สีเขียวแสดงถึงการใช้ ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที

จากรูปที่ 4.34 พบว่าทุกค่า Cross flow มีพีคของสัญญาณของตัวตรวจจับ MALS ที่เวลาเดียวกัน ยกเว้นค่า Cross flow 0 มิลลิลิตร/นาที ที่เกิดพีคออกมาก่อนที่เวลาประมาณ 10 นาที โดยแต่ละค่า Cross flow มีความเข้มของสัญญาณแตกต่างกัน โดยมีความเข้มของสัญญาณจากมากไปน้อยเมื่อใช้ค่า Cross flow 2, 1, 3 และ 0 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ

นำค่ามวลโมเลกุล (MW) จากรูปที่ 4.30ค ถึง 4.33ค ที่คำนวณได้จากเทคนิค AF4 ที่ค่า Cross flow ต่างๆกันมาทำเป็นตารางที่ 4.10

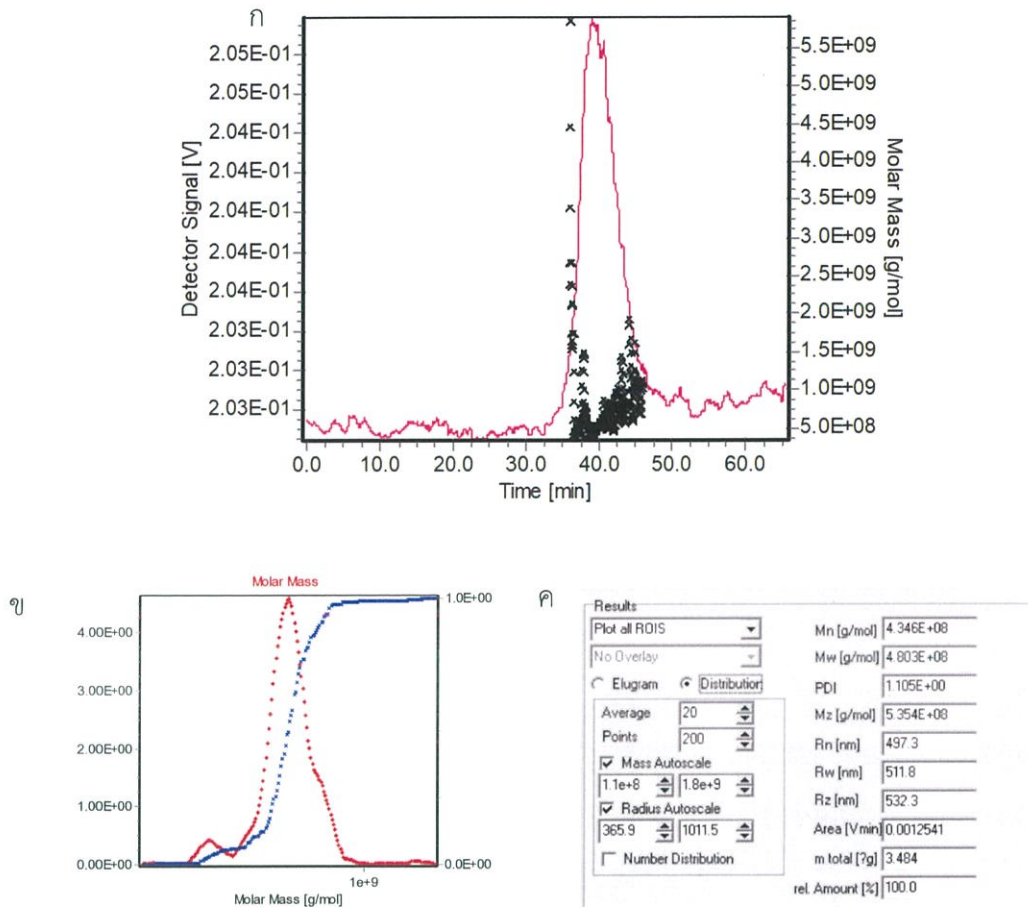
ตารางที่ 4.10 แสดงค่ามวลโมเลกุลของสารทอรีนมาตรฐานที่ปรับค่า Cross flow ต่างๆกัน โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV ร่วมกับ MALS

Cross flow มิลลิลิตร/นาที่	มวลโมเลกุล กรัม/โมล
0	6.410×10^9
1	4.733×10^9
2	2.978×10^9
3	4.460×10^9

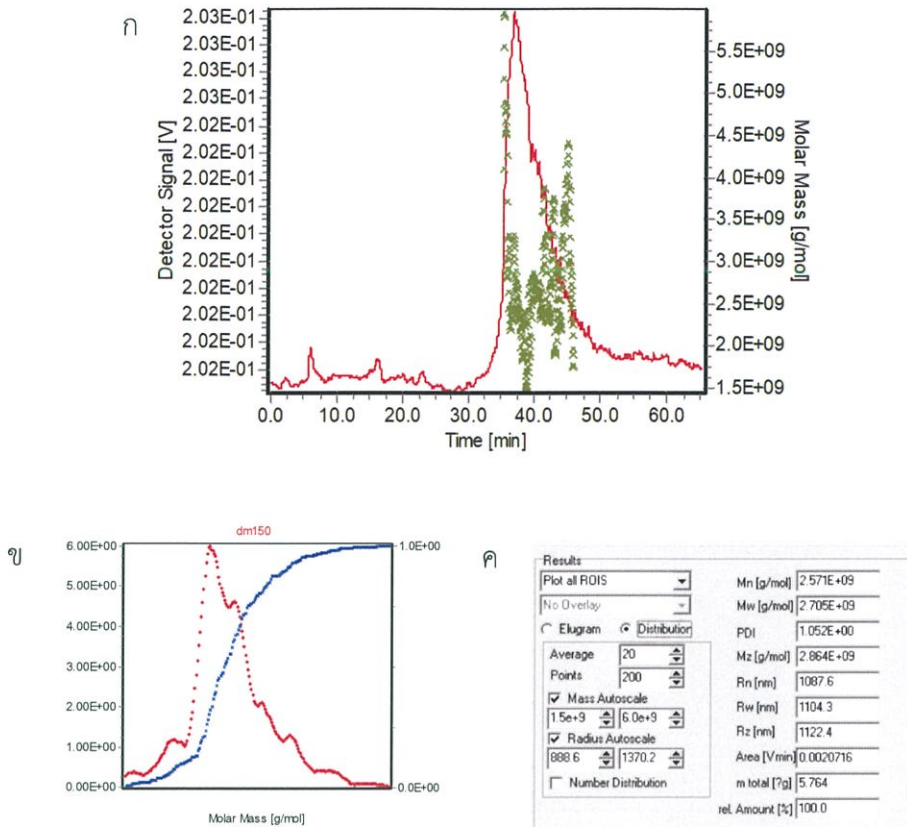
จากการทดลองพบว่าที่ค่า Crossflow 1 และ 2 มิลลิลิตร/นาที่ พบพีคหลักที่เวลาเดียวกันคือ 30-50 นาที และพบพีคบริเวณที่เกิดจาก void volume หรือปริมาณช่องว่างในคอลัมน์ที่ทำให้คอลัมน์ไม่สามารถจับสารไว้ได้ในช่วงเวลา 5 ถึง 14 นาที ในขณะที่ค่า Crossflow 3 มิลลิลิตร/นาที่ ไม่พบ void volume peak อาจเกิดจากเนื่องจากสารทอรีนเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ดังนั้นการที่แรงกดมีไม่มากพอส่งผลให้คอลัมน์ไม่สามารถจับสารไว้ได้ดีสารทอรีนจึงสามารถผ่านออกมาพร้อมกับสารละลายตัวพาได้ [9] ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกค่า Crossflow 3 มิลลิลิตร/นาที่ ในการทำการทดลองแยกสารทอรีนในตัวอย่างเครื่องตีมีผสมทอรีนในหัวข้อ 4.3.3 ถัดไป

4.3.3 การแยกสารทอรีนในตัวอย่างเครื่องดื่มด้วยเทคนิค AF4

เมื่อนำวิธีการที่ใช้แยกทอรีนมาตรฐานมาใช้กับตัวอย่างเครื่องดื่มที่ผสมทอรีนทั้งหมด 3 ยี่ห้อในตลาด ซึ่งตัวกลางของสารไม่ใช่ น้ำเปล่าอดประจุ และมีส่วนผสมที่แตกต่างกัน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.34 4.35 และ 4.36 ตามลำดับ

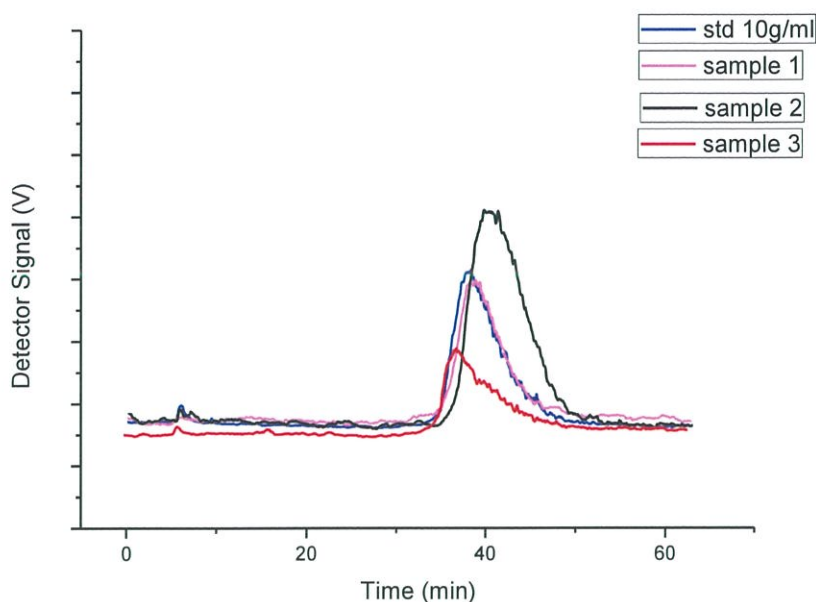


รูปที่ 4.28 (ก) เส้นแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และสัญลักษณ์สีดำ แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสารทอรีนในเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของทอรีน ยี่ห้อที่ 1 โดยใช้ความเข้มข้นจากขวดเครื่องดื่ม และใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญลักษณ์สีแดงแสดงความแตกต่างของมวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญลักษณ์น้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดงค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม



รูปที่ 4.30 (ก) เส้นแดงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ MALS ที่มุม 90 องศา หน่วยโวลต์ และ สัญญาณสี่เหลี่ยม แสดงมวลโมเลกุลหน่วยกรัม/โมล เทียบกับเวลาหน่วยนาที่ ของสาร ทอรีนในเครื่องตีที่มีส่วนผสมของทอรีน ยี่ห้อที่ 3 โดยใช้ความเข้มข้นจากขวดเครื่องตี และใช้ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ (ข) สัญญาณสีแดงแสดงความแตกต่างของ มวลโมเลกุลในตัวอย่างและสัญญาณสีน้ำเงินแสดงการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุล (ค) แสดง ค่าต่างๆที่คำนวณได้จากโปรแกรม

เมื่อนำพีคของสารทอรีนมาตรฐานที่เงื่อนไขการแยกที่ดีที่สุด คือ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที่ (4.33ก) มาพล็อตเทียบกับสารทอรีนในเครื่องตีที่มีสารทอรีนเป็น ส่วนผสมทั้ง 3 ยี่ห้อ (4.35ก ถึง 4.37ก) มาพล็อตและปรับสเกลแกน y ให้เท่ากัน จะแสดงดังรูปที่ 4.38 โดยพบว่าทุกตัวอย่างเกิดพีคที่ช่วงเวลาเดียวกันแต่มีความสูงของสัญญาณตัวตรวจจับที่ไม่เท่ากัน โดยมีความสูงของสัญญาณจากมากไปน้อยคือ ตัวอย่างที่ 2 สารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 4.31 เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากตัวตรวจจับ MALS ที่มุม 90 องศา (โวลต์) กับเวลาในหน่วยนาที สีน้ำเงินแสดงถึงตัวอย่างทอริ่งมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สีชมพูแสดงถึงตัวอย่างเครื่องตีทอริ่งยี่ห้อ 1 สีดำแสดงถึงตัวอย่างเครื่องตีทอริ่งยี่ห้อ 2 และ สีแดงแสดงถึงตัวอย่างเครื่องตีทอริ่งยี่ห้อ 3 เปรียบเทียบ

นำค่ามวลโมเลกุล (MW) ของสารทอริ่งในเครื่องตียี่ห้อ 1, 2 และ 3 จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของตัวตรวจจับ UV-Vis ร่วมกับ MALS ของเทคนิค AF4 ด้วยโปรแกรม AF200 (4.35ค ถึง 4.37ค) นำมาทำเป็นตารางเปรียบเทียบดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงค่ามวลโมเลกุลของโคเอ็นไซม์ควินเท็นมาตรฐานที่ปรับค่า Cross flow ต่างๆกัน โดยคำนวณมาได้จากตัวตรวจจับ UV ร่วมกับ MALS

ตัวอย่าง	มวลโมเลกุล กรัม/โมล
เครื่องตีผสมทอริ่งยี่ห้อ 1	5.354×10^8
เครื่องตีผสมทอริ่งยี่ห้อ 2	2.186×10^9
เครื่องตีผสมทอริ่งยี่ห้อ 3	2.864×10^9

จากตารางที่ 4.11 พบว่าได้มวลโมเลกุลที่แตกต่างกันระดับ 10^1 กรัม/โมล สำหรับยี่ห้อ 1 เทียบกับยี่ห้อ 2 และ 3 แต่จากรูป 4.38 พบว่าพีคที่เกิดขึ้นในตัวอย่างเครื่องตีทั้ง 3 ยี่ห้อ พบพีคที่เวลาประมาณ 35 ถึง 50 นาที และเกิดที่เวลาเดียวกับสารทอริ่งมาตรฐาน แต่ต่างกันที่ความสูงของ

สัญญาณที่ตรวจพบ จึงสรุปได้ว่า AF4 สามารถแยกและตรวจจับสารทอรีนเชิงคุณภาพได้ แต่ไม่เหมาะสมสำหรับการหาข้อมูลเชิงปริมาณสำหรับสารทอรีน อาจเป็นเพราะสารทอรีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและสามารถละลายได้ดีในน้ำที่เป็นตัวกลาง [13], [14]

4.3.4 วิเคราะห์การกระจายตัวของขนาดอนุภาคทอรีนที่แยกจากเครื่องดื่มผสมทอรีนด้วยเทคนิค DLS

4.3.4.1 สารมาตรฐานทอรีนที่ไม่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

นำตัวอย่างสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาวัดค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค DLS จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของสารทอรีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่างเฉลี่ย (เส้นผ่านศูนย์กลาง นาโนเมตร)	Pdl
10 mg/ml ทอรีนมาตรฐาน	722.3±9.405	0.239

4.2.4.2 สารมาตรฐานทอรีนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

นำตัวอย่างสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4 โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการเก็บออกมา ทั้งหมด 2 ช่วง แบ่งเป็นช่วงต้นถึงกลางพีคที่ เวลา 35 ถึง 38.5 นาที (F1) และช่วงกลางถึงหลังพีคที่เวลา 38.5 ถึง 50 นาที (F2 และ F3) โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ 1 มิลลิลิตร/นาที และนำตัวอย่างที่เก็บออกมาวัดค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค DLS จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แสดงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของสารทอรีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่างเฉลี่ย (เส้นผ่านศูนย์กลาง นาโนเมตร)	Pdl
10 mg/ml F1 ทอรีนมาตรฐาน	1335±11.31	0.881
10 mg/ml F2 ทอรีนมาตรฐาน	1549±51.62	0.800
10 mg/ml F3 ทอรีนมาตรฐาน	1379±14.85	0.688

จากตาราง 4.13 ค่าขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของสารทอรีนมาตรฐานที่ทำการแยกและเก็บออกมาจากเทคนิค AF4 ในแต่ละช่วงเวลามีค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเนื่องจากผลของสารผสมในสารละลายตัวพา ระบบการวัดทำให้ค่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยที่ได้ไม่ใกล้เคียงกับสารทอรีนมาตรฐานที่ไม่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

4.2.4.3 สารทอรีนในตัวอย่างเครื่องดื่มที่ไม่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

นำตัวอย่างจากเครื่องดื่มผสมทอรีนทั้ง 3 ยี่ห้อ โดยใช้ตัวอย่างเครื่องดื่มจากขวดโดยตรง มาวัดค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค DLS จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ในตัวอย่างเครื่องดื่มผสมทอรีนที่ไม่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่างเฉลี่ย (เส้นผ่านศูนย์กลาง นาโนเมตร)	Pdl
ตัวอย่างทอรีน 1	163±2.404	0.582
ตัวอย่างทอรีน 2	721.6±32.1	0.555
ตัวอย่างทอรีน 3	44.83±2.843	1.000

4.2.4.4 สารทอรีนในตัวอย่างเครื่องดื่มที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

นำเครื่องดื่มผสมทอรีนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4 ที่จำนวน 3 ยี่ห้อ โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการเก็บออกมา ทั้งหมด 2 ช่วง แบ่งเป็นช่วงต้นถึงกลางพีคที่ เวลา 35 ถึง 38.5 นาที (F1) และช่วงกลางถึงหลังพีคที่เวลา 38.5 ถึง 50 นาที (F2 และ F3) โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ 1 มิลลิลิตร/นาที

และนำตัวอย่างที่เก็บออกมาวัดค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคด้วยเทคนิค DLS จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ในตัวอย่างเครื่องดื่มผสมทอรีนจำนวน 3 ยี่ห้อ ที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค AF4

ตัวอย่าง	ขนาดตัวอย่างเฉลี่ย (เส้นผ่านศูนย์กลาง นาโนเมตร)	Pdl
F1 ตัวอย่างทอรีน 1	1578±11.31	0.993
F1 ตัวอย่างทอรีน 2	1796±22.63	0.936
F1 ตัวอย่างทอรีน 3	925.6±38.48	0.553
F2 ตัวอย่างทอรีน 1	1442±21.21	0.559
F2 ตัวอย่างทอรีน 2	498.8±7.425	0.621
F2 ตัวอย่างทอรีน 3	634.6±35.6	0.671
F3 ตัวอย่างทอรีน 1	N/A*	N/A*
F3 ตัวอย่างทอรีน 2	716.4±35.4	0.374
F3 ตัวอย่างทอรีน 3	N/A*	N/A*

*N/A = not available

จากตาราง 4.14 และ 4.15 พบว่า ค่าขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของตัวอย่างที่ทำการแยกและเก็บออกมาจากเทคนิค AF4 มีค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ยค่อนข้างกว้าง และสังเกตได้จากค่า Pdl ที่วัดได้ เนื่องจากผลของสารผสมหลายชนิดในตัวอย่างเครื่องดื่มและในสารละลายตัวพารบกวนระบบการวัด

สรุปผลการศึกษาวิจัยและแนวทางการพัฒนา

5.1 สรุปผลการศึกษาวิจัย

ในงานวิจัยนี้สามารถใช้เทคนิค AF4 ต่อกับตัวตรวจจับ UV-Vis และ MALS ในการแยกและวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐาน 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ 0.9% NaCl เป็นสารละลายตัวพา ได้พีคที่เวลา เวลาประมาณ 37.03 นาที ถึง 45.82 นาที จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นไม่ส่งผลต่อเวลาในการแยกสาร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นพบสัญญาณจากตัวตรวจจับได้มากขึ้น จนถึงค่าความเข้มข้นที่สูงเกินไปส่งผลให้กระบวนการรีแลกซ์เซชันและการโฟกัสเกิดไม่สมบูรณ์ อาจเกิดการสูญเสียตัวอย่างออกมาก่อนเวลา ทำให้พบพีคที่มีสัญญาณน้อยกว่าความเข้มข้นอื่นๆ [10] ส่วนค่า Cross flow ส่งผลกระทบต่อความละเอียดของพีคที่ได้ โดยค่า Cross flow ที่เหมาะสมสำหรับสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร คือค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที ซึ่งสามารถคำนวณมวลโมเลกุลของโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐานได้อย่างถูกต้อง และเมื่อนำเงื่อนไขการทดลองค่า Cross flow 3 มิลลิลิตร/นาที ไปใช้กับตัวอย่างเครื่องดื่มที่ผสมโคเอ็นไซม์คิวเท็น พบว่าสามารถแยกสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นออกมาได้ที่เวลาเดียวกันกับสารมาตรฐาน แต่ไม่สามารถคำนวณมวลโมเลกุลได้ใกล้เคียงกับค่าจริง เมื่อนำตัวอย่างจากเครื่องดื่มมาเจือจางด้วยน้ำ ปลอดภัยอัตราส่วน 1:10 1:20 และ 1:50 ตรวจสอบด้วยเทคนิค DLS พบว่าค่าการกระจายตัวของอนุภาคเฉลี่ยในช่วงกว้างคือ 400 ถึง 500 นาโนเมตรเมื่อเทียบค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ยของสารมาตรฐาน 454.6 ± 35.66 นาโนเมตร แสดงว่าการเจือจางในอัตราส่วนที่ต่างกัันมีผลต่อการกระจายตัวของขนาดอนุภาคในตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ทำการแยกออกมาจาก AF4 ให้ค่าการกระจายตัวของขนาดเฉลี่ยค่อนข้างกว้าง สังเกตได้จากค่า SD จากการวัดซ้ำและค่า Pdl ที่วัดได้ อาจเกิดจากการรบกวนของสารตัวพาใน AF4

เมื่อนำเทคนิค AF4 ต่อกับตัวตรวจจับ UV-Vis และ MALS มาแยกและวิเคราะห์สารทอรีน มาตรฐานที่ค่าความเข้มข้น 10, 20, 50, และ 100 มิลลิลิตร/มิลลิลิตร พบว่าความเข้มข้นไม่มีผลต่อเวลาในการแยกสารเช่นเดียวกับในสารโคเอ็นไซม์คิวเท็นมาตรฐาน และการปรับค่า Cross flow พบพีคหลักที่เวลาเดียวกันคือ 30 - 50 นาที และพบพีครบกวนที่เกิดการ void volume ในช่วงเวลา 5 ถึง 14 นาที ในค่า Cross flow 1 และ 2 มิลลิลิตร/นาที แต่ไม่พบพีคดังกล่าวที่ค่า Crossflow 3 มิลลิลิตร/นาที เนื่องจากสารทอรีนเป็นสารที่ไม่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ดังนั้นการที่แรงกตมีไม่มากพอส่งผลให้คอลัมน์ไม่สามารถจับสารไว้ได้ดีสารทอรีนจึงสามารถผ่านออกมาพร้อมกับสารละลายตัวพาได้ ดังนั้นจึงทำการแยกเครื่องดื่มที่ผสมทอรีนจำนวน 3 ตัวอย่างด้วยเงื่อนไข Cross flow 3 มิลลิลิตร/

นาที่ สามารถแยกพีคออกมาได้ที่เวลาเดียวกันกับในสารทอรีนมาตรฐาน แต่ไม่สามารถคำนวณค่ามวลโมเลกุลที่แท้จริงของสารทอรีนได้ จากการทดลองสรุปได้ว่ากรวิเคราะห์โดยเทคนิค AF4 ไม่เหมาะสมสำหรับการศึกษาเชิงปริมาณแต่สามารถศึกษาเชิงคุณภาพได้เนื่องจากพบพีคในการแยกที่เวลาเดียวกัน [13] ส่วนค่าขนาดอนุภาคเฉลี่ย (นาโนเมตร) ของตัวอย่างที่ทำการแยกและเก็บออกมาจากเทคนิค AF4 มีค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเฉลี่ยค่อนข้างกว้าง เนื่องจากผลของสารผสมหลายชนิดในตัวอย่างเครื่องดื่มและในสารละลายตัวพารบกวระบบการวัดวิเคราะห์

5.2 แนวทางการพัฒนาการศึกษาวิจัย

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มที่มากขึ้นเพื่อศึกษาการแยกโคเอ็นไซม์คิวเท็นในเครื่องดื่มที่หลากหลาย รวมไปถึงในรูปแบบผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ในเครื่องสำอาง และศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับข้อผิดพลาดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารทอรีนด้วยเทคนิค AF4 โดยทำการปรับเงื่อนไขหรือตัวแปรอื่นๆที่อาจส่งผลต่อสารทอรีน เช่น ปริมาณในการฉีด การเตรียมตัวอย่างในสารละลายอื่น ใช้ตัวตรวจจับอื่นๆร่วมด้วย เป็นต้น

บรรณานุกรม

- [1] Semeco, A. 2017. 9 Benefits of Coenzyme Q10 (CoQ10). (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <https://www.healthline.com/nutrition/coenzyme-q10> [30 พฤศจิกายน 2561]
- [2] Yamori, Y., Liu, L., Mori, M. et al. 2009. Taurine as the nutritional factor for the longevity of the Japanese revealed by a world-wide epidemiological survey. *Adv Exp Med Biol.* 2009(643) : 13-25.
- [3] Macleavy, L. 2013. The Forgotten Longevity Benefits of Taurine. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <https://www.lifeextension.com/magazine/2013/6/The-Forgotten-Longevity-Benefits-of-Taurine/Page-01> [30 พฤศจิกายน 2561]
- [4] รัศมี เหล็กพรหม, และจาร์พงษ์ แสงบุญมี. 2556. “โคเอนไซม์ คิวเท็น: จากเคมีพื้นฐานสู่การประยุกต์ ในทางการแพทย์”. *ศรีนครินทร์เวชสาร* (2556): 590
- [5] Mindell, E. 2018. HOW TO REDUCE HEART FAILURE BY HALF. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://www.themindellhealthminute.com/2018/02/> [1 ธันวาคม 2561]
- [6] ประสงค์ เทียนบุญ. 2547. ทอริน. *วารสารโภชนบำบัด.* 2547(1) : 23-24.
- [7] Macleavy, L. 2013. The Forgotten Longevity Benefits of Taurine. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <https://www.lifeextension.com/magazine/2013/6/The-Forgotten-Longevity-Benefits-of-Taurine/Page-01> [30 พฤศจิกายน 2561]
- [8] ประสงค์ เทียนบุญ. 2547. ทอริน. *วารสารโภชนบำบัด.* 2547(1) : 25-30
- [9] Fraunhofer, W. (2003). *Asymmetrical Flow Field- Flow- Fractionation in Pharmaceutical Analytics- Investigations in Aggregation Tendencies of Pharmaceutical Antibodies.* Fakultät für Chemie und Pharmazie Dissertation, Munich Ludwig-Maximilians-University.
- [10] Frank von der Kammer., Legros, S., Erik, H. L., Loeschner K., และ Hofmann T. (2011). Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993611000069> [16 เมษายน 2561]
- [11] Operation Manual AF2000 MT/AT (ออนไลน์). (2007). สืบค้นจาก : www.postnova.com [10 กรกฎาคม 2561]

- [12] Nanotec. Dynamic Light Scattering (DLS). (ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://www2.nanotec.or.th/th/?page_id=554 [15 พฤศจิกายน 2561]
- [13] J.H. Lee et al. (2018). Analysis of lipoprotein-specific lipids in patients with acute coronary syndrome by asymmetrical flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Korea: Journal of Chromatography B
- [14] pubchem. Taurine. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Taurine> [1 พฤษภาคม 2562]

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)

นางสาววรินรำไพ เอื้อชินกุล

ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)

Miss Warinrampai Uahchinkul

วัน-เดือน-ปีเกิด

29 มีนาคม พ.ศ. 2540

สถานที่เกิด

กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ปัจจุบัน

228/13 ซอยรามคำแหง110 แขวงสะพานสูง เขตสะพาน-
สูง ถนนรามคำแหง กทม. 10240

ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา 2557 สำเร็จการศึกษาในระดับชั้นมัธยมศึกษา
ที่ โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ เตรียมอุดมศึกษาน้อมเกล้า
สายการเรียน พิเศษวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์
ปีการศึกษา 2561 สำเร็จการศึกษาในระดับชั้นปริญญาตรี
วิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต (วศ.บ.) วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยี
พระจอมเกล้าลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง