

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผง
รสช็อคโกแลต และอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์
สเปกโทรสโกปีโดยวิธีเดิมสารมาตรฐาน



นางสาวสุพัตรา ระวังงาน
นางสาวอภิรดา เตาะผู้ดี

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 107883
วัน,เดือน,ปี..... 8 สิ.ย. 2553

b. 12213512
i.

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Determination of Vitamin B2 in instant chocolate beverages and
breakfast cereal flakes by Fluorescence Spectroscopy with
standard addition method**



Miss Supattra Ravangnan

Miss Apirada Lorpudee

**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Degree of Bachelor of Science
Department of Chemistry
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2007**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ	การตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องคั่วสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อกโกแลต และอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีโดยวิธีเดิมสารมาตรฐาน
นักศึกษา	นางสาวสุพัตรา ระวังงาน นางสาวอภิรดา เกาะผู้ดี
ภาควิชา	เคมี คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.คณิตา ตั้งคณานุรักษ์

บทคัดย่อ

วิตามินบี 2 เป็นสารอาหารที่มีความสำคัญในการป้องกันการสะสมไขมันในร่างกายมนุษย์ วิตามินบี 2 มักจะอยู่ในตัวอย่างเครื่องคั่วสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อกโกแลต และอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องคั่วสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อกโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีโดยวิธีเดิมสารมาตรฐาน วิตามินบี 2 จะถูกสกัดโดยใช้กรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์และตรวจวัดปริมาณด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีโดยวิธีเดิมสารมาตรฐาน ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นที่ใช้ปลดปล่อย (λ_{em}) ของเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์คือ 326.0 และ 499.0 นาโนเมตรตามลำดับ วิธีการวิเคราะห์นี้ถูกทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยมีความเที่ยงของการตรวจวัดวิตามินบี 2 อยู่ในรูปของร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 11.1067 ความแม่นยำจะแสดงในรูปของร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) อยู่ในช่วง 102-110 % ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R^2) ของกราฟมาตรฐานแบบเดิมสารมาตรฐานมีค่าอยู่ในช่วง 0.9822 - 0.9994 และกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 มีค่าเท่ากับ 0.9984 ขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.1481 และ 0.4935 ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวข้างต้นแสดงถึงความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์นี้ ค่าเฉลี่ยของปริมาณวิตามินบี 2 คือ 5.3960 ppm สำหรับสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ A, 5.5507 ppm สำหรับสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ B, 3.0035 ppm สำหรับสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ C, 2.3631 ppm สำหรับสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ D และ 0.7125 ppm สำหรับสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Determination of Vitamin B2 in instant chocolate beverages and breakfast cereal flakes by Fluorescence Spectroscopy with standard addition method

Name Miss Supattra Ravangngan
Miss Apirada Lorpudee

Degree Bachelor of science

Program Industrial Chemistry Instrument

Academic Year 2007

Special Project Advisor Assoc.Prof. Kanita Tungkananuruk

Abstract

Vitamin B2 was necessary nutrient to protect accumulation of lipid in the body. Vitamin B2 were also present in instant chocolate beverages and breakfast cereal flakes. Therefore the objective of this project was to determine vitamin B2 in instant chocolate beverages and breakfast cereal flakes by Fluorescence Spectroscopy. Vitamin B2 was extracted from sample by 0.02 M. acetic acid and determined the quantity by Fluorescence Spectroscopy with standard addition method. Optimum excitation (λ_{ex}) and emission (λ_{em}) of Fluorescence Spectrometer were 326.0 and 499.0 nanometer, respectively. The analytical method was validated. Precision of vitamin B2 measurement in term of the relative standard deviation were (%RSD) 11.1067. Accuracy expressed in term of recovery percentage was in the range of 102-110 %. The correlation coefficient (R^2) of standard addition curve found in the range of 0.9822 - 0.9994 and standard curve of riboflavin standard solution was 0.9984. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) found were 0.1481 and 0.4935, respectively. These figures of merit indicated the validity of this method. The mean value of vitamin B2 quantity obtained were 5.3960 ppm for sample A, 5.5507 ppm for sample B, 3.0035 ppm for sample C, 2.3631 ppm for sample D and 0.7125 ppm for sample E.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำโครงการพิเศษนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี สืบเนื่องมาจากความร่วมมือ การได้รับการดูแล เอาใจใส่ ช่วยเหลือ แนะนำ และความกรุณาของทุกๆท่าน ทั้งอาจารย์ที่ปรึกษา คณะกรรมการ และผู้ที่เกี่ยวข้องที่กรุณาติดตาม ตรวจสอบ และแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้จน สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณรศ.คณิตา ตั้งคณาบุรุษ เป็นอย่างสูงที่ทำให้คำปรึกษา ช่วยแก้ไขปัญหา เอาใจใส่ดูแล ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษนี้มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผศ.นงนุช ศิวะภิญโญศ และดร.ณัฐวุฒิ เจริญชั้น คณะกรรมการตรวจสอบ โครงการพิเศษที่กรุณาแก้ไขโครงการพิเศษให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมี ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือให้การทำโครงการพิเศษนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณสุรินทร์ เหล่าพระจันทร์ที่ช่วยดูแลเรื่องการใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์ สเปกโตรมิเตอร์ให้การทำโครงการพิเศษนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี รวมทั้งแม่บ้านที่ คอยให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ญาติพี่น้อง เพื่อนๆ รวมถึงรุ่นพี่ รุ่นน้องทุกๆคนที่ให้กำลังใจ และช่วยเหลือในทุกๆด้านทำให้โครงการพิเศษนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ที่ช่วยทำให้โครงการ พิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวสุพัตรา ระวังงาน

นางสาวอภิรดา เลาะผู้ดี

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 : บทนำ	
1.1 ความสำคัญ และที่มาของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัย และวิธีดำเนินงาน	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 : ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 วิตามินบี 2	4
2.2 ฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปี	7
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 : วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์	15
3.2 วิธีดำเนินการทดลอง และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์	16
บทที่ 4 : ผลการทดลอง และการอภิปรายผล	
4.1 กราฟแบบเติมสารมาตรฐานวิตามินบี 2	22
4.2 การประเมินผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์	30
บทที่ 5 : ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ	33
บรรณานุกรม	35
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก แสดงผลการวิเคราะห์	36

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ ก.1 : แสดงปริมาณ (มิลลิกรัม) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐาน วิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A	36
ตารางที่ ก.2 : แสดงปริมาณ (มิลลิกรัม) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐาน วิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B	37
ตารางที่ ก.3 : แสดงปริมาณ (มิลลิกรัม) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐาน วิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C	37
ตารางที่ ก.4 : แสดงปริมาณ (มิลลิกรัม) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐาน วิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D	38
ตารางที่ ก.5 : แสดงปริมาณ (มิลลิกรัม) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐาน วิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E	38
ตารางที่ ก.6 : ความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด	39
ตารางที่ ก.7 : แสดงผลการวัดหาปริมาณวิตามินบี 2 ใน original sample กับ spiked sample และค่า%Recovery	39
ตารางที่ ก.8 : แสดงค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์	40
ตารางที่ ก.9 : แสดงผลการวัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพื่อหาค่า LOD และ LOQ	42
ตารางที่ ก.10 : แสดงความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2	43
ตารางที่ ก.11 : แสดงผลการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูป ชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ	44
ตารางที่ ก.12 : แสดงปริมาณของวิตามินบี 2 ที่หาได้จากการเตรียมตัวอย่าง 1 กรัม	45

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์	7
รูปที่ 2.2 แสดงการถูกกระตุ้นโดยแหล่งพลังงานที่ต่าง ๆ กัน และจะคายพลังงาน ที่แตกต่างกันตามแหล่งพลังงาน	8
รูปที่ 2.3 แสดงการถูกกระตุ้นให้ขึ้นไปอยู่ใน excited state และตกกลับสู่ ground state	9
รูปที่ 2.4 แสดงการสปีนของอิเล็กตรอนเมื่อถูกกระตุ้น	10
รูปที่ 4.1 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A1	22
รูปที่ 4.2 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A2	23
รูปที่ 4.3 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A3	23
รูปที่ 4.4 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B1	24
รูปที่ 4.5 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B2	24
รูปที่ 4.6 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B3	25
รูปที่ 4.7 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C1	25
รูปที่ 4.8 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C2	26
รูปที่ 4.9 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C3	26
รูปที่ 4.10 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D1	27
รูปที่ 4.11 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D2	27
รูปที่ 4.12 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D3	28
รูปที่ 4.13 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E1	28
รูปที่ 4.14 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E2	29
รูปที่ 4.15 กราฟแบบเดมัสการละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E3	29
รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2	30
รูปที่ 4.17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน วิตามินบี 2 กับค่าความเข้มข้นวิตามินบี 2 ที่ตรวจวัดได้ (Detector response)	31

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการ

เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบเป็นอาหารที่นิยมรับประทานแทนอาหารเช้า เนื่องจากมีคุณค่าทางสารอาหารที่มีประโยชน์และสะดวกต่อการรับประทานสำหรับชีวิตประจำวันที่เร่งรีบในปัจจุบัน โดยในเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบจะมีการเติมแร่ธาตุและวิตามินต่างๆลงไปเพื่อเพิ่มคุณค่าทางสารอาหารจากเดิมที่อาจมีไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย

ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบส่วนใหญ่มักจะมีวิตามินบี 2 เป็นส่วนประกอบ เนื่องจากวิตามินบี 2 ได้ชื่อว่าเป็นวิตามินป้องกันไขมันคือวิตามินบี 2 จัดว่าเป็นวิตามินที่มีความจำเป็นต่อการเผาผลาญกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นต่อเอนไซม์และกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารอาหารต่างๆในร่างกาย โดยเฉพาะไขมัน ป้องกันไขมันอุดตันในเส้นเลือดอันเป็นสาเหตุให้เส้นเลือดแข็งตัว ขจัดไขมันชนิดอิ่มตัวในเส้นเลือด

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบประเภทต่างๆจึงมีการแข่งขันในด้านของการตลาด โดยประเด็นที่สำคัญที่นำมาใช้ในการประชาสัมพันธ์คือ ปริมาณวิตามินบี 2 ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งบนฉลากของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบจะมีการแสดงปริมาณของวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ แต่เนื่องจากวิตามินนั้นจะสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อถูกแสงทำให้ปริมาณของวิตามินที่ได้รับจริงอาจมีค่าน้อยกว่าที่ได้แสดงไว้บนฉลากผลิตภัณฑ์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญของการตรวจวัดวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี เพื่อคำนวณหาปริมาณที่มีอยู่จริงของวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบประเภทต่างๆให้เป็นข้อมูลสำหรับผู้บริโภคต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการหาปริมาณวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชชงกรอบ โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี
2. เพื่อกำหนดหาปริมาณวิตามินบี 2 ที่ใช้ในการบ่งบอกคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชชงกรอบประเภทต่างๆ
3. ต้องการทราบปริมาณวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชชงกรอบเพื่อเปรียบเทียบกับฉลากบนผลิตภัณฑ์
4. เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพและควมใช้ได้ของเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปีและวิธีเติมสารมาตรฐานในการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. ศึกษาการเตรียมสารละลายตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชชงกรอบ
2. ศึกษาการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชชงกรอบประเภทต่างๆ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี
3. ศึกษาประสิทธิภาพและควมใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยศึกษาข้อมูลทางสถิติเพื่อบ่งบอกถึงความเที่ยง ความถูกต้อง ความสัมพันธ์เชิงเส้น จีซีจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และจีซีจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้
4. เป็นการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 2 ที่ได้จากการตรวจวัดกับปริมาณวิตามินบี 2 ที่แสดงบนฉลากผลิตภัณฑ์

1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีดำเนินงาน

1. ค้นหาหาข้อมูลที่น่าสนใจและมีความเกี่ยวข้องกับหัวข้อโครงการพิเศษ
2. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการค้นคว้าและวางแผนการดำเนินงานคือ เตรียมสารเคมีและสารมาตรฐานต่างๆที่ต้องใช้รวมถึงอุปกรณ์และเครื่องมือการทดลองที่ใช้ในโครงการพิเศษ
3. ดำเนินการทดลองโดยปฏิบัติตามแผนการดำเนินงานที่ได้เตรียมไว้สำหรับการศึกษาค้นคว้า
 - การเตรียมสารละลายมาตรฐาน
 - การเตรียมกราฟมาตรฐานแบบเติมสารมาตรฐาน
 - การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- หาคความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นและใช้ปลดปล่อยวิตามินบี 2 ที่เหมาะสมของเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์
- ตรวจสอบความเข้มแสงในสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง
- ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโดยหาค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ร้อยละของการคืนกลับได้ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ จีคจำกัดค่าสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และจีคจำกัดค่าสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบปริมาณที่ได้รับจริงของวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชชงกรอบประเภทต่างๆ ซึ่งสามารถบ่งบอกคุณภาพของผลิตภัณฑ์และใช้เป็นข้อมูลในการเลือกบริโภค
2. ทราบขั้นตอนการใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ และสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องในการตรวจวัดปริมาณของวิตามินบี 2
3. ทราบถึงประโยชน์ของวิตามินบี 2 ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชชงกรอบประเภทต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วิตามินบี 2

ชื่อสามัญเลขดัชนีสีชื่อทางเคมีไรโบฟลาวิน (Riboflavin)-7, 8-dimethyl-10-(D-ribo-2,3,4,5 tetrahydroxypentyl) ไอโซอัลโลซาซีน (7,8-dimethyl-10-(D-ribo-2,3,4,5, tetrahydroxypentyl) isoalloxazine) สูตรเคมีไพริคัลน้าหนักโมเลกุล $C_{17}H_{20}N_4O_6$ 376.371. มีคุณลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองถึงสีส้มและมีสีเหลืองแกมเขียวเรืองแสงในสารละลายไรโบฟลาวิน มีกลิ่นเล็กน้อย ละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์และค่าที่เจือจาง มีสีอยู่ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98 ของน้ำหนัก และไม่มากกว่าร้อยละ 102 ของน้ำหนักเมื่อคิดเป็นสมมูลของ $C_{17}H_{20}N_4O_6$ (คำนวณโดยน้ำหนักแห้ง) มีจุดหลอมเหลวที่ 280 องศาเซลเซียส และต้องไม่มีสารที่ทำให้เกิดอันตราย

วิตามินบี 2 หรือ ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) จัดว่าเป็นวิตามินที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ การหายใจของเซลล์ การเผาผลาญกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ช่วยรักษาสุขภาพของผิวหนังและระบบประสาท บำรุงสายตา และช่วยให้เม็ดเลือดแดงคงสภาพเมื่อขาดจะกลายเป็นคนแคระแกรน มีความจำเป็นต่อเอนไซม์และกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารอาหารต่างๆในร่างกายโดยเฉพาะไขมัน ป้องกันไขมันอุดตันในเส้นเลือดอันเป็นสาเหตุให้เส้นเลือดแข็งตัว ขจัดไขมันชนิดอิ่มตัวในเส้นเลือด ด้วยเหตุนี้เองวิตามินบี 2 จึงได้สมญาว่า "วิตามินป้องกันไขมัน" วิตามินบี 2 ช่วยระงับอาการตาและได้จึงใช้เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา

วิตามินบี 2 เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ (water soluble) ทนต่อกรด อากาศ ความร้อน และปฏิกิริยาทางเคมีต่อออกซิเจน แต่จะถูกทำลายหรือสลายตัวได้เร็วในด่างและเมื่อโดนแสงอาทิตย์ หรือจากการล้างน้ำ เมื่อถูกดูดซึมแล้วจะเปลี่ยนเป็น active form ที่ผนังลำไส้ในรูปของ Flavin adenine dinucleotide (FAD) และ Flavin mononucleotide (FMN) ทำหน้าที่เป็น co-enzyme เกี่ยวกับการถ่ายทอคิเล็กตรอน biological oxidation-reduction จึงมีความจำเป็นต่อการหายใจของเซลล์ เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็น co-enzyme ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนวิตามินบี 6 และกรดโฟลิกให้อยู่ในรูป active ทั้งยังทำหน้าที่รักษาสุขภาพของเยื่อผิวและ mucosa โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงที่ผิวโคซาเซลล์ (mucosa) และผิวหนัง ถ้าผ้าสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิดการขาดวิตามินบี 2 จะพบว่าไม่มีไขมันสะสมตามทิวชูด่าง ๆ เช่น ตับ ไต ต่อมอะดรีนาล และผนังเส้นเลือด ทั้งนี้เพราะ ไรโบฟลาวิน เกี่ยวข้องกับขบวนการ B-oxidation ของกรดไขมัน

2.1.1 ปริมาณวิตามินบี 2 ที่แนะนำของคนแต่ละวัย

วัยเด็ก

- เด็กอายุ 0-6 เดือน ประมาณ 0.3 มิลลิกรัมต่อวัน
- เด็กอายุ 7-12 เดือน ประมาณ 0.4 มิลลิกรัมต่อวัน
- เด็กอายุ 1-3 ปี ประมาณ 0.5 มิลลิกรัมต่อวัน
- เด็กอายุ 4-8 ปี ประมาณ 0.6 มิลลิกรัมต่อวัน
- เด็กอายุ 9-13 ปี ประมาณ 0.9 มิลลิกรัมต่อวัน

วัยรุ่นหนุ่มสาว

- สำหรับวัยรุ่นหญิงอายุ 14-18 ปี ประมาณ 1.0 มิลลิกรัมต่อวัน
- วัยรุ่นชายอายุ 14-18 ปี ประมาณ 1.3 มิลลิกรัมต่อวัน

วัยผู้ใหญ่

- ผู้ใหญ่เพศหญิงอายุมากกว่า 18 ปี ประมาณ 1.1 มิลลิกรัมต่อวัน
- ผู้ใหญ่เพศชายอายุมากกว่า 18 ปี ประมาณ 1.3 มิลลิกรัมต่อวัน

หญิงตั้งครรภ์

- หญิงตั้งครรภ์ ประมาณ 1.4 มิลลิกรัมต่อวัน
- หญิงให้นมบุตร ประมาณ 1.6 มิลลิกรัมต่อวัน

หมายเหตุ : กลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการขาดวิตามินบี 2 ได้แก่ ผู้สูงอายุ ผู้ที่เจ็บป่วยเรื้อรัง คนยากจน และผู้ที่ติดสุรา

2.1.2 แหล่งที่พบ

ยีสต์ (บริวเวอรี่ีสต์) จมูกข้าวสาลี ข้าวซ้อมมือ ข้าวแดง รำข้าว ข้าวโอ๊ต แป้งถั่วเหลือง ถั่ว เมล็ดแห้ง ถั่วอก ถั่วเขียว ยอดแค ปลาหู ปลาหมึกแห้ง หอยนางรม ตับ เครื่องในสัตว์ ไข่ นม ผัก ใบเขียว โดยทั่วไปแล้วคนปกติมักจะไม่ได้ขาดวิตามินนี้ยกเว้นแต่ในบุคคลที่รับประทานอาหารไม่ถูกส่วน หรือในรายที่เป็นโรคพิษสุราเรื้อรัง

อาหารที่เสริมฤทธิ์วิตามินบี 2

1. วิตามินบีรวม ระบบภูมิคุ้มกันจะทำงานไม่ได้ถ้าไม่มีกลุ่มวิตามินบี
2. วิตามินบี 6 และกรดแพนโทเทินิกถ้ามีไม่เพียงพอจะทำให้ความต้านทานของร่างกายลดลงมากจนใช้การไม่ได้
3. วิตามินบี 3 ไนอะซิน (NIACIN)
4. วิตามินซี ช่วยป้องกันการถูกทำลายของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมีของออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. วิตามินซี ช่วยป้องกันวิตามินบี 2 รวมตัวกับออกซิเจน
6. วิตามินบี 5 ช่วยในการใช้วิตามินบี 2 ให้เกิดประโยชน์เต็มที่และมีประสิทธิภาพ

อาหารหรือสารที่ต้านฤทธิ์ต่อวิตามินบี 2

1. สุรา
2. ยาประเภทปฏิชีวนะ
3. ยาคุมกำเนิดชนิดรับประทาน

2.1.3 ประโยชน์และหน้าที่สำคัญของวิตามินบี 2

- ทำหน้าที่เป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในการแตกตัว และการใช้ให้เกิดประโยชน์ของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ โปรตีน
- ทำให้ร่างกายเติบโต ตามปกติ และเพิ่มความทนทานให้แก่ร่างกาย
- ช่วยให้อาหารเม็ดโลหิตแดงอยู่ในระดับปกติ
- ป้องกันอันตรายจากมลภาวะและ ยาต่างๆ
- ช่วยป้องกันโรคต่อกระดูก หรือยึดเวลาเป็นให้ช้าลง

2.1.4 ผลของการขาดวิตามินบี 2

การขาดไรโบฟลาวินจะมีไกลโคเจนที่ตับและกล้ามเนื้อลดลงมากระดับน้ำตาลในเลือดก็ต่ำลงด้วย เมื่อทำให้หนูเกิดภาวะ anoxia พบว่าหนูปกติจะมีการสร้างไกลโคเจนที่ตับเพิ่มขึ้นแต่หนูที่ขาดวิตามินบี 2 จะไม่สร้าง เมื่อให้ไรโบฟลาวิน หรือยาคอร์ติโซน (cortisone) จะพบว่ามีการตอบสนองเหมือนหนูปกติ แสดงว่าในหนูที่ขาดไรโบฟลาวินนั้นมีความผิดปกติเกิดขึ้นที่ต่อมอดรีนาลจนไม่สามารถสร้างฮอร์โมนได้ นอกจากนี้หนูที่ขาดไรโบฟลาวินจะมีความสามารถในการสลายอินซูลินลดลงทำให้มีไขมันเพิ่มขึ้น

จะมีอาการแสดงทางตา ริมฝีปาก และผิวหนัง เริ่มแรกนั้นริมฝีปากจะอักเสบ แห้ง และแตกมุมปากจะซีด แดง เรียกลักษณะดังกล่าวว่าปากนกกระจอก (Angular stomatitis) และเมื่อเป็นมากขึ้นจะมีอาการทางผิวหนัง ใบหน้ามีสะเก็ดมันๆ ต่อมาจะมีอาการอักเสบของตา ตาสู้แสงไม่ได้ คันตาและแสบลูกตา จะทำให้เกิดโรคปากนกกระจอก ลิ้น มุมปาก และริมฝีปากอักเสบ ผิวเป็นตุ่มหนอง ตาแดง สายตาคิดปกติ เคืองตาเมื่อถูกแสง เหนื่อยง่าย

- มีอาการคันและรู้สึกร้อนที่ดวงตา
- มีอาการในช่องปาก เช่น เกิดแผลที่มุมปาก ปากเปื่อย ลิ้นแตก เลือดซึม ลิ้นลิ้น
- การย่อยอาหารผิดปกติ น้ำหนักลด กังวล เหนื่อยง่าย วิงเวียน ตามัว โลหิตจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผิวหนังมัน เป็นคัน คัน ผิวหนังอักเสบ
- ผมแห้งและร่วง ผลจากการวิจัยพบว่าทำให้ผมหลุดก่อนวัย ถ้าได้รับวิตามินบี 2 เพียงพอ (สำหรับผู้ใหญ่ 1.2-1.7 มิลลิกรัม) จะทำให้ผมงอกกลับเป็นปกติได้

2.1.5 ผลของการได้รับวิตามินบี 2 มากเกินไป

โดยทั่วไปแล้วการได้รับวิตามินบี 2 ในปริมาณที่สูงกว่าค่า RDA มักไม่พบความเป็นพิษ อย่างไรก็ตามอาจมีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้จากการได้รับวิตามินบี 2 ในปริมาณที่สูงมากๆ ได้แก่ โรคกรดไหลย้อน รู้สึกแสบร้อน และปัสสาวะมีสีเหลือง

2.1.6 ตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 2

1. ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต
2. อาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ

2.2 ฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี

รูปที่ 2.1 เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์

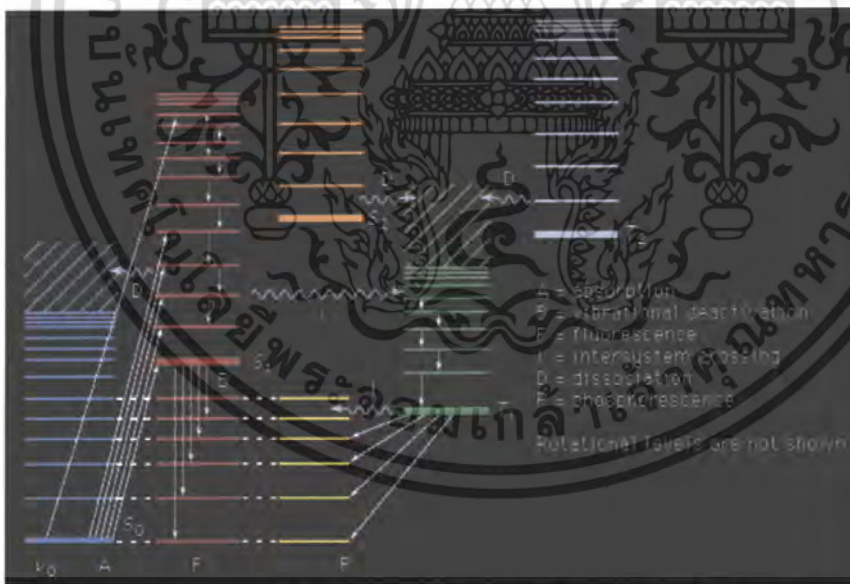
ฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปีจะใช้โฟตอนพลังงานสูงไปกระตุ้นตัวอย่างซึ่งจะปล่อยพลังงานต่ำสุดออกมาและตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์โดยใช้ลำแสง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยจะกระตุ้นอิเล็กตรอนใน โมเลกุลของสารประกอบทำให้เกิดการปลดปล่อยแสงที่ระดับพลังงานต่ำโดยจะกระตุ้นครั้งแรกโดยการดูดกลืน โฟตอนของแสงที่ ground electronic state ของตัวมันเองไปสู่ excited electronic state และเกิดการชนกันกับ โมเลกุลอื่นเป็นเหตุให้โมเลกุลที่ถูกกระตุ้นจะสูญเสียพลังงานจนอยู่ในสภาวะการสั่นสะเทือนต่ำที่สุดของ excited electronic state ดังนั้น โมเลกุลจึงตกมาอยู่ในระดับการสั่นสะเทือนของ ground electronic state อีกครั้ง ซึ่งจะอยู่ใน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับการสั่นสะเทือนต่างๆกันจึงเกิดความแตกต่างของพลังงานขึ้นเป็นความถี่ โดยจะทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของความถี่ของแสงที่ถูกปล่อยออกมาโดยจะสัมพันธ์กับค่าความเข้มแสง

เมื่อโมเลกุลดูดกลืนแสง ยูวี หรือ วิสิบิล จะถูกกระตุ้นให้ขึ้นไปอยู่ใน excited state เมื่อโมเลกุลตกกลับสู่ ground state จะคายพลังงานส่วนเกินออกมาเรียกว่า Luminescence ถ้าโมเลกุลถูกกระตุ้นด้วยแสง พลังงานที่คายออกมาเรียกว่า Photoluminescence ถ้าโมเลกุลถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคพลังงานสูง พลังงานที่คายออกมาเรียกว่า Radioluminescence ถ้าถูกกระตุ้นด้วยปฏิกิริยาเคมี พลังงานที่คายออกมาเรียกว่า Chemiluminescence ซึ่ง Luminescence แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

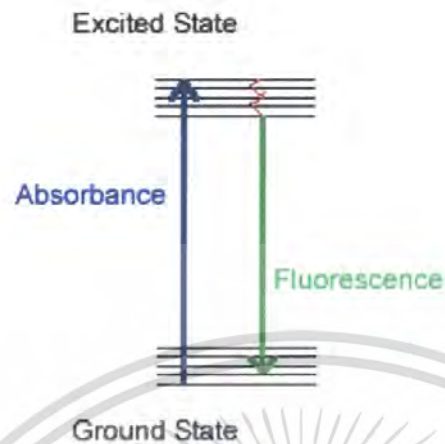
1. Fluorescence มี life time $10^{-8} - 10^{-9}$ วินาทีเกิดจากโมเลกุลที่อยู่ใน electronic state ตกกลับสู่ ground electronic state แล้วคายแสง
2. Phosphorescence มี life time $10^{-1} - 20$ วินาที เกิดจากโมเลกุลเคลื่อนจาก single first excited state ไปยัง metastable triple state แล้วคายแสงออกมา

ส่วนใหญ่โมเลกุลที่ดูดกลืนแสง UV หรือ Vis จะสูญเสียพลังงานส่วนเกินในรูปของความร้อน มีโมเลกุลบางชนิดเท่านั้นที่ให้ Fluorescence ส่วนโมเลกุลที่ให้ Phosphorescence จะมีจำนวนน้อย



รูปที่ 2.2 แสดงการถูกกระตุ้น โดยแหล่งพลังงานที่ต่างๆกัน และจะคายพลังงานที่แตกต่างกันตามแหล่งพลังงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แสดงการถูกกระตุ้นให้ขึ้นไปอยู่ใน excited state และตกกลับสู่ ground state

โดยที่สถานะพื้น โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเป็นจำนวนคู่จะจัดเรียงใน โมเลกุล ออร์บิทัลเป็นคู่ และมีสปินสวนทางกันจาก

$$M = 2S + 1$$

เมื่อ $M =$ ค่าทวีคูณ

$S =$ เลขสปิน คำนวณ

ดังนั้น

$$M = 2[(+1/2) + (-1/2)] + 1 = 1 \text{ เรียกว่า singlet state}$$

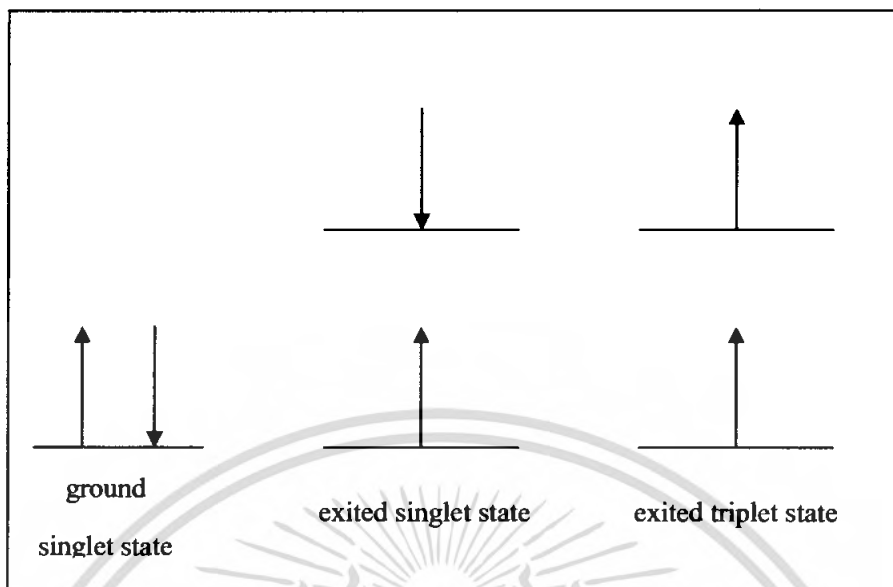
ถ้าอยู่ใน สถานะพื้น เรียกว่า ground singlet state (S_0)

ถ้าอยู่ที่ สถานะกระตุ้น เรียกว่า excited singlet state (S_1, S_2, \dots)

แต่ถ้าการสปินของอิเล็กตรอนเมื่อถูกกระตุ้นเป็นทางเดียวกันจะได้ว่า $M = 2(\frac{1}{2} + \frac{1}{2}) + 1 = 3$

เรียกว่า Triplet state ($T_1 =$ excited triplet state)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงการสปีนของอิเล็กตรอนเมื่อถูกกระตุ้น

โดยที่โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเป็นจำนวนคู่จะไม่มี ground triplet state เพราะว่าอิเล็กตรอนเข้าคู่กันหมด ส่วน โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเป็นเลขคี่จะอยู่ใน double state กระบวนการกระตุ้น

เมื่อโมเลกุลดูดกลืนแสงที่ 10^{-15} วินาที โมเลกุลจะขึ้นไปยัง S1 หรือ S2 ซึ่งขึ้นอยู่กับพลังงานที่ดูดกลืน โดยที่การดูดกลืนเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer) คือ

$$A = \log(I_0/I) = abc$$

กระบวนการลดการกระตุ้น

โมเลกุลที่ถูกกระตุ้นเหล่านี้จะสามารถกำจัดพลังงานส่วนเกินที่ได้รับออกไปบางส่วนหรือทั้งหมด โดยจะเกิดกระบวนการอย่างใดอย่างหนึ่งดังนี้

- โมเลกุลจะคายพลังงานออกมาเท่ากับพลังงานที่ถูกดูดกลืนเข้าไปเรียกว่า Resonance fluorescence
- สูญเสีย Vibration energy โดยคายแสงอินฟราเรด แล้วลงมาอยู่ที่ Vibration level ที่ระดับพลังงานต่ำสุดของ excited electronic state
- เกิด radiationless deactivation โดยสูญเสีย Vibration energy ในรูปของความร้อนขณะชนกับโมเลกุลอื่น แล้วลงมาอยู่ที่ Vibration level ที่ต่ำสุดของ electronic state ขบวนการนี้เรียกว่า vibrational relaxation

เมื่อโมเลกุลมาอยู่ที่ Vibration level ที่มีระดับพลังงานต่ำสุดของสภาวะกระตุ้นจะสูญเสียพลังงานต่อไปในทางใดทางหนึ่งดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เกิด radiationless deactivation โดยสูญเสีย electronic energy เมื่อชนกับ โมเลกุลอื่น และสูญเสียพลังงานไปในรูปความร้อน
 - กาย Fluorescence (ในช่วงยูวี หรือ วิสิเบิล)
 - เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยัง excited triplet state แล้วกลับสู่สถานะพื้นพร้อมกับให้ phosphorescence (ในช่วงยูวี หรือ วิสิเบิล) โดยปกติแล้วพลังงาน T1 จะอยู่ต่ำกว่า S1 เราเรียกกระบวนการนี้ว่า Intersystem crossing
- ตัวแปรที่มีผลต่อ Fluorescence

1. Quantum yield (Quantum efficiency)

เป็นค่าที่บ่งบอกความสามารถว่าสารสามารถดูดกลืนแสงได้ในปริมาณเท่าใดซึ่งจะคำนวณได้จากสมการ

$$\phi_f = \frac{\text{Photon emitted / sec}}{\text{Photon absorbed / sec}} = \frac{\text{Photon emitted}}{\text{Photon absorbed}}$$

ซึ่งหากค่า ϕ_f ที่ได้เข้าใกล้ 1 โมเลกุลจะสามารถวัดฟลูออเรสเซนส์ได้ดี แต่ถ้าหากเข้าใกล้ศูนย์ จะวัดฟลูออเรสเซนส์ได้ไม่ดี

$$\phi_f = \frac{K_f}{K_f + K_i + K_{ic} + K_{ec}}$$

เมื่อ K_f = ค่าคงที่ของอัตราการเกิด Florescence

K_i = ค่าคงที่ของอัตราการเกิด Intersystem crossing+

K_{ic} = ค่าคงที่ของอัตราการเกิด Internal conversion

K_{ec} = ค่าคงที่ของอัตราการเกิด External conversion

2. โครงสร้างโมเลกุล

โมเลกุลที่มีหมู่ฟังก์ชันวงแหวนเบนซีน และกลุ่มฟังก์ชันอะโรมาติก ที่มีระดับพลังงานต่ำจะให้ฟลูออเรสเซนส์ดี ส่วน aliphatic และ alicyclic carbonyl หรือ มีพันธะคู่ที่สามารถเกิดเรโซแนนซ์ได้จะให้ฟลูออเรสเซนส์ได้แต่ไม่ดีเท่ากับโครงสร้างอะโรมาติก แต่สารที่มีโครงสร้างแบบสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกจะไม่ให้ฟลูออเรสเซนส์

3. อุณหภูมิ และผลจากตัวทำละลาย : ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นฟลูออเรสเซนส์จะน้อย เนื่องจากโมเลกุลมีโอกาสชนกันมาก ถ้าตัวทำละลายมีความหนืดน้อย และมีขั้วทำให้ค่าฟลูออเรสเซนส์ลดลง

4. ผลจากค่า pH : หากเป็นสารละลายกรดจะไม่สามารถตรวจวัดได้

5. ผลจากความเข้มข้น : ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เป็นสัดส่วน โดยตรงกับความเข้มข้นของสาร

$$F = k\phi_r P_0 (2.303 \epsilon bc)$$

$$P = k\phi_r P_0 (2.303 \epsilon bc)$$

เมื่อ k = Proportionality constant

ϕ = Quantum yield

ฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีจะสามารถใช้กับสารละลายที่มีความเข้มข้นน้อยๆ ในระดับหนึ่งส่วนในล้านส่วน (ppm) ได้ ซึ่งถ้าสารละลายมีความเข้มข้นมาก กราฟที่ได้จะไม่เป็นเส้นตรง และจะเบี่ยงเบนไปทางลบ

Filter and monochromator

- Excitation monochromator อยู่ระหว่างแหล่งแสงกับตัวอย่าง
- Emission monochromator อยู่ระหว่างตัวอย่างกับเครื่องวัดสัญญาณ

ทำให้การบันทึกค่า Spectrum มี 2 แบบคือ

a. Excitation spectrum

บันทึกค่า Intensity กับความยาวคลื่นของ excitation radiation โดยตั้ง emission monochromator ไว้ที่ความเข้มข้นหนึ่งที่ทำให้ฟลูออเรสเซนส์แล้วสแกน excitation monochromator ซึ่งในที่นี้จะใช้ความยาวคลื่นที่ 326.0 นาโนเมตร

b. Emission spectrum

บันทึกค่า Intensity กับความยาวคลื่นของ fluorescence radiation โดยตั้ง excitation monochromator ไว้ที่ความยาวคลื่นที่สารนั้นดูดกลืนแล้วสแกน emission monochromator ซึ่งในที่นี้จะใช้ความยาวคลื่นที่ 499.0 นาโนเมตร

อุปกรณ์ที่ใช้บรรจสาร

เซลล์ทำจากแก้ว เป็นทรงจตุรัส หรือทรงกระบอกต้องใส่ทั้ง 4 ด้าน การออกแบบเซลล์ต้องไม่ให้เกิด Scattered radiation ไปตกกระทบเครื่องวัดสัญญาณ

เครื่องตรวจวัดสัญญาณ

ใช้ Photomultiplier tube (PMT) โดยวางทำมุม 90° กับทิศทางที่แสงตกกระทบ เพื่อลด scattering และหลีกเลี่ยงการวัดแสงที่เหลือจากการดูดกลืน

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Aranda, Mario and Morlock, Gertrud การพัฒนาวิธีการหาปริมาณไรโบฟลาวิน ไพรดอกซิน นิโคตินามิด คาเฟอีน และทอรีนในเครื่องคั่วกาแฟ เพื่อให้ได้ข้อมูลในเวลาเดียวกันโดยใช้เครื่องตรวจวัดหลายชนิด (multipledetection) ทำการเตรียมตัวอย่างเครื่องคั่วกาแฟจำนวน 10 ตัวอย่างและตัวอย่างเครื่องคั่วที่มีคาเฟอีนจำนวน 6 ตัวอย่างด้วยการไล่ฟองอากาศ (degassing) ในอ่างน้ำคลื่นความถี่สูง (ultrasonicbath) เป็นเวลา 20 นาที ดำเนินการตรวจวัดความยาวคลื่นจำนวนมากอย่างละเอียดหลังจากทำการแยกโครมาโทกราฟี ด้วยเครื่องตรวจวัด (1) เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV-absorbancemeasurement) ที่ 261 nm สำหรับนิโคตินามิดและ 275 nm สำหรับคาเฟอีน (2) การวัดความยาวแสง (fluorescence measurement) ที่ 366/>400 และ 313/>340 nm สำหรับไรโบฟลาวิน และไพรดอกซิน ตามลำดับ (3) การวัดการดูดกลืนแสงในช่วงการมองเห็น (Vis-absorbance measurement) ที่ 525 nm สำหรับทอรีนทำการสร้างอนุพันธ์ (derivatization) ด้วยสาร ninhydrin หลังจากแยกโครมาโทกราฟีแล้ว การเทียบมาตรฐานเป็นเส้นตรงได้ค่าสัมประสิทธิ์ $r^2 > 0.999$ เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recoveries) ของสารประกอบทั้งห้าชนิดอยู่ระหว่าง 81-106 ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับที่แตกต่างกัน ค่าความแม่นยำจากการทำซ้ำ (%RSD) ของสารทั้งหมดในเมทริกซ์มีค่าอยู่ระหว่าง 0.8 และ 1.5% %RSD ที่ระดับกลางมีค่าอยู่ระหว่าง 3.6 และ 7.4% สำหรับไรโบฟลาวิน 2.8 และ 6.3% สำหรับนิโคตินามิด 2.5 และ 4.4% สำหรับคาเฟอีน 2.1 และ 2.9% สำหรับทอรีน 0.5 และ 4.0% สำหรับไพรดอกซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน การพิสูจน์ยืนยันมวลโดยใช้ singlequadrupole MS ในการตรวจอย่างละเอียดในช่วง positive electrospray ionization (ESI) สำหรับสารทั้งหมด ยกเว้นทอรีน (negative mode) วิธีนี้ได้เสนอเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับใช้วิเคราะห์ในงานประจำซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย น่าเชื่อถือและสามารถทำได้ในเวลาเดียวกัน

บุญสม เหลี้ยวเรืองรัตน์, สายสุนีย์ เหลี้ยวเรืองรัตน์, ชีรพันธ์ มาจันทร์ และ เฉลิมพร ทองพูน ได้วิเคราะห์หาปริมาณไรโบฟลาวินในพืชสมุนไพรไทย 18 ชนิด (มะแว้งคัน ใบคัดเค้า เหงือกปลาหมอ ทองพันชั่ง หนุ่ยหนวดแมว และ พญาไร้ใบ) โดยวิธีโพลารोगราฟี ชั่งพืชแต่ละชนิด 10 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือดจำนวน 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที นำสารสกัดจากพืชสมุนไพรจำนวน 10 มิลลิลิตร ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณและได้ใช้วิธีแสดนคาร์ด แอดดิชัน แล้วบันทึกโพลารแกรมจาก -300 มิลลิโวลต์ ถึง -700 มิลลิโวลต์ โดยวัดเทียบกับ Ag/AgCl reference electrode วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย มีความแม่นยำดี ได้ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.80-99.69 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์เท่ากับ 1.56-1.87 เรียงตามลำดับ

กิตพงษ์ ศิริสุทธานันท์ และ พิไล กวีศราศัยการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน บี 2 ในสารผสมล่วงหน้าซึ่งมีรำข้าวสาลีเป็นสื่อด้วยเครื่อง HPLC โดยการใช้อนุพันธ์ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spherisorb Octylsilane mobile phase เป็น Methanol : น้ำจืดไอออน (200 mL:800 mL) ปรับ pH เป็น 3.2 ด้วย glacial Acetic acid ตรวจวัดด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 271 nm และอัตราการไหลของ mobile phase เท่ากับ 0.5 mL/min ศึกษาสารมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.01-20.00 mg/L ได้ Calibration curve เป็นเส้นตรง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9998 ค่าLimit of detection เท่ากับ 1.10 mg/kg และค่า Limit of Quantitation เท่ากับ 3.13 mg/kg ค่าร้อยละการกลับคืนได้ ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 3.13-1,000.00 mg/kg ได้เท่ากับ 92.40-97.93 % โดยมีความเที่ยงและความแม่นยำในส่วนของ System suitability ได้ค่าจำนวนเพลทตามทฤษฎีเท่ากับ 2,077 ความสมมาตรของพีก ที่ความสูง 5% เท่ากับ 1.12 ค่าปัจจัยความจุเท่ากับ 6.10 และค่าการแยกของวิตามินบี 2 กับวิตามินบี 1 เท่ากับ 2.70 สามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์วิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้าซึ่งมีรำข้าวสาลีเป็นสื่อได้

สมศักดิ์ ศิริไชย ได้มีการศึกษาการวิเคราะห์ไทอามีน (บี 1) และไรโบฟลาวิน (บี 2) ในวิตามินบีรวมโดยอาศัยแคปิลารี อิเล็กโทรโฟรีซิสซิส ในการตรวจวัดวิตามินทั้งสองพร้อมกัน ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันต้องใช้บอเรนัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.2 ภายใต้สภาวะนี้การวิเคราะห์สามารถทำได้ภายในเวลา 10 วินาที ซึ่งจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของไทอามีนและไรโบฟลาวินเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ วิธีนี้ได้ประยุกต์ใช้การวิเคราะห์วิตามินในวิตามินบีรวม

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

1. สารมาตรฐานวิตามินบี 2 (Riboflavin 98 %) เกรดวิเคราะห์ บริษัท ACROS Organics
2. กรดอะซิติก (Acetic acid) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Mallinckrodt Chemical
3. น้ำกลั่น (Distillation water)
4. ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อกโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบมี 5 ตัวอย่างดังนี้
 - ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ A (ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อกโกแลต)
 - ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ B (ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อกโกแลต)
 - ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ C (อาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ)
 - ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ D (อาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ)
 - ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ E (อาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ)

3.1.2. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์ บริษัท Jasco FP-6300 พร้อมเซลล์ควอท
2. เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง บริษัท Denver Instrument Company รุ่น TC-254
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
4. กระดาษกรองเบอร์ 2
5. กระบอกน้ำกลั่น
6. แท่งคนสาร
7. ช้อนตักสาร
8. จุกยาง

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารละลาย

3.2.1.1 สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์

เปิดสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 65% (Gracial acetic) ปริมาตร 2.85 มิลลิลิตรใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 2.5 ลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.1.2 สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 100 ppm

ชั่งสารมาตรฐานวิตามินบี 2 ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่งจำนวน 0.1000 กรัม บันทึกน้ำหนักละเอียดใส่ปิเปตเตอร์ละลายด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ แล้วนำไปถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.1.3 สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 1 ppm

เปิดสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตรใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.1.4 สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 0.1 ppm

เปิดสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 1 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.1.5 สารละลายตัวอย่าง

- สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตมี 2 ตัวอย่างคือ A และ B

1. ชั่งเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่งจำนวน 1.0000 กรัม บันทึกน้ำหนักละเอียดใส่ปิเปตเตอร์ละลายด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์

2. กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2 ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3. ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

- สารละลายตัวอย่างอาหารเข้าัญที่ขอบกรอบมี 3 ตัวอย่างคือ C, D และ E

1. ชั่งอาหารเข้าัญที่ขอบกรอบที่บดละเอียดแล้วด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่งจำนวน 1.0000 กรัม บันทึกน้ำหนักละเอียดใส่บีกเกอร์ละลายด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์

2. กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2 ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

3. ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.2 สภาวะของเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์

ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น : 326.0 นาโนเมตร

ความยาวคลื่นที่ใช้ปลดปล่อย : 499.0 นาโนเมตร

การตอบสนอง : 0.50 วินาที

ความกว้างฟิคที่ใช้กระตุ้น : 5 นาโนเมตร

ความกว้างฟิคที่ใช้ปลดปล่อย : 5 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน : ตามสัดส่วน

ค่าที่แสดง : ความเข้มแสง = ค่าการดูดกลืนแสง × ค่าความเข้มข้น

3.2.3 การเตรียมกราฟแบบเติมสารมาตรฐาน (Standard addition curve)

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ A ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรจำนวน 6 ขวด

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 0.1 ppm ปริมาตร 0, 1.00, 3.00, 5.00, 7.00 และ 9.00 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรแต่ละขวด

3. ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
4. นำสารละลายที่ได้ทั้ง 6 ขวดไปวัดค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์บริสุทธิ์เป็นสารละลายแบลนด์ ทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง
5. สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงและความเข้มข้นของวิตามินบี 2 โดยให้แกน Y เป็นความเข้มแสงและแกน X เป็นปริมาตรของวิตามินบี 2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ppm
6. คำนวณความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในสารละลายตัวอย่างด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$C_{\text{unk}} = \frac{b \cdot C_{\text{std}}}{m \cdot V_{\text{unk}}}$$

นำสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ B, C, D และ E เช่นเดียวกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ A

3.2.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Validation of analytical method) โดยใช้หลักทางสถิติประเมินผลดังนี้

3.2.4.1 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์

ศึกษาโดยนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์การตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในสารละลาย spiked sample และสารละลายตัวอย่างแล้วนำมาคำนวณหาค่าร้อยละของการคืนกลับได้ (% Recovery) จากสมการ

$$\% \text{Recovery} = \frac{(\bar{C}_{\text{Spiked sample}} - \bar{C}_{\text{Sample}})}{C_{\text{Standard}}} \times 100$$

เมื่อ	$\bar{C}_{\text{Spike sample}}$	คือ	ความเข้มข้นเฉลี่ยของวิตามินบี 2 ในสารละลาย Spiked sample
	\bar{C}_{Sample}	คือ	ความเข้มข้นเฉลี่ยของสารละลายตัวอย่าง
	C_{Standard}	คือ	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้เดิม

* เกณฑ์การยอมรับของค่า %Recovery อยู่ในช่วง 90-110 %

ค่า $\bar{C}_{\text{Spike sample}}$ และค่า \bar{C}_{Sample} สามารถหาได้จากการทดลองดังต่อไปนี้

- การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 0.10, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00 และ 10.00 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของวิตามินบี 2 มาตรฐาน 0.10, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00 และ 10.00 ppm ตามลำดับ
4. นำสารละลายที่เตรียมได้ทั้ง 9 ขวดไปวัดค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์บริสุทธิ์เป็นสารละลายเบสลงค์ ทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง
5. สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงและความเข้มข้นของวิตามินบี 2 โดยให้แกน Y เป็นความเข้มแสงและแกน X เป็นความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จากกราฟมาตรฐานและกราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการทดลองนำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R^2) จากสมการเส้นตรงของการวิเคราะห์

- การตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในสารละลาย spiked sample

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างอาหารเข้าธัญพืชขอบกรอบที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.5 (sample E) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 1.0 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีสารละลายตัวอย่าง ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. นำสารละลาย spiked sample ที่เตรียมได้ไปวัดค่าความเข้มแสงด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์บริสุทธิ์เป็นสารละลายเบสลงค์ โดยแต่ละตัวอย่างทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าไปเทียบหาความเข้มข้นของวิตามินบี 2 จากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้างต้น จะได้ $\bar{C}_{\text{Spiked sample}}$
4. ปิเปตตัวอย่างผลิตภัณฑ์ E ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัดค่าความเข้มแสงและเทียบหาความเข้มข้นของวิตามินบี 2 จากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้างต้น จะได้ \bar{C}_{Sample}
5. คำนวณร้อยละของการคืนกลับได้ (%Recovery) จากสมการข้างต้น

3.2.4.2 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์

ศึกษาโดยการนำสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 2.0 ppm มาทำการตรวจวัดซ้ำ 7 ซ้ำ แล้วนำผลมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean; \bar{X}) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) และร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation; %RSD) ของแต่ละความเข้มข้นจากสมการ

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

3.2.4.3 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้ (Limit of Quantitation; LOQ)

นำสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นทำการวัดซ้ำ 3 ซ้ำโดยเรียงลำดับความเข้มข้น นำค่าความเข้มแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ แล้วนำมาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่เตรียมได้ และนำค่าจุดตัดแกนตั้งและค่าความชันมาคำนวณค่า LOD และ LOQ จากสมการ

$$LOD = \frac{3S_{x/y}}{\text{slope}}$$

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

โดย $S_{x/y}$ คือ จุดตัดแกน y ของกราฟ
Slope คือ ความชันของกราฟ

3.2.4.4 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

จากกราฟแบบเติมสารมาตรฐาน และกราฟมาตรฐานจากการทดลองในข้อที่ 3.2.3 และข้อที่ 3.2.4.1 ตามลำดับ นำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R^2) จากสมการต่อไปนี้

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}}$$



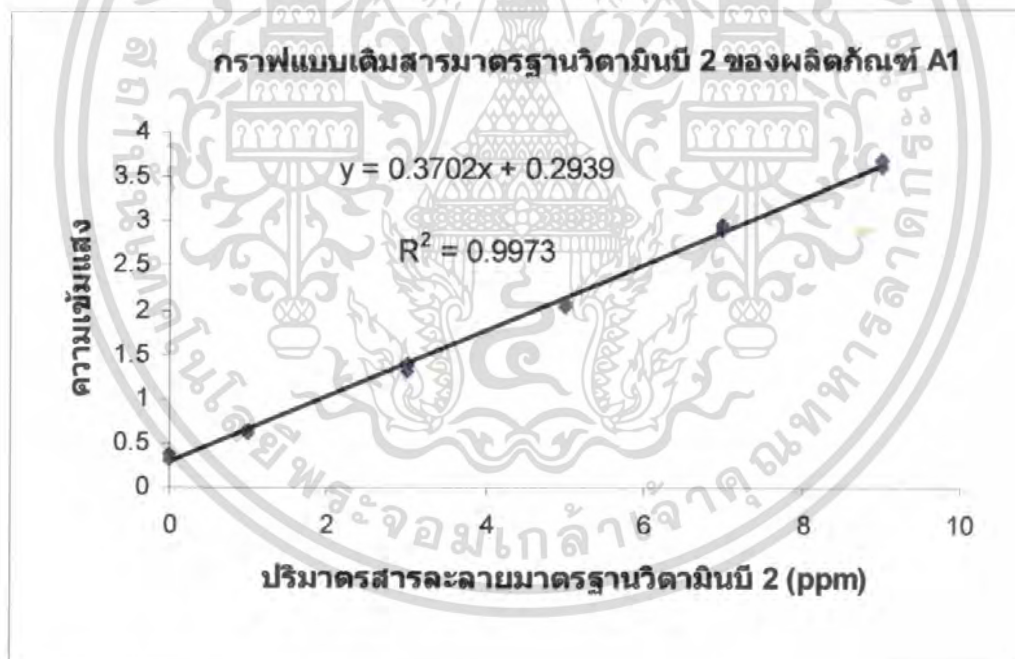
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

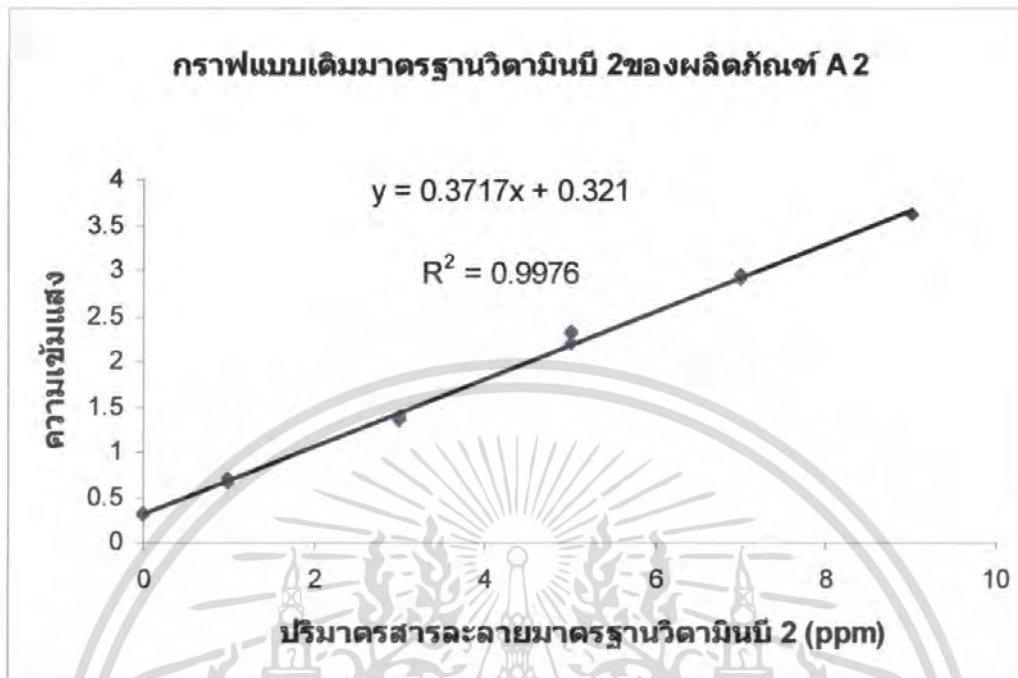
4.1 กราฟแบบเติมสารมาตรฐานวิตามินบี 2

กราฟแบบเติมมาตรฐานวิตามินบี 2 เตรียมได้จากการนำสารละลายมาตรฐานวิตามิน บี 2 ที่ความเข้มข้น 0.1 ppm ในปริมาตรต่างๆกัน (0.0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 และ 9.0 มิลลิลิตร) เติมลงในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มแสง และนำค่าความเข้มแสงที่ได้มาพลอตกับปริมาตรสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 0.1 ppm ที่เติมลงในตัวอย่างจะได้กราฟแบบเติมสารมาตรฐานวิตามินบี 2 จำนวน 15 กราฟดังต่อไปนี้ และสามารถคำนวณความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดได้ดังแสดงในภาคผนวก ก.1.1

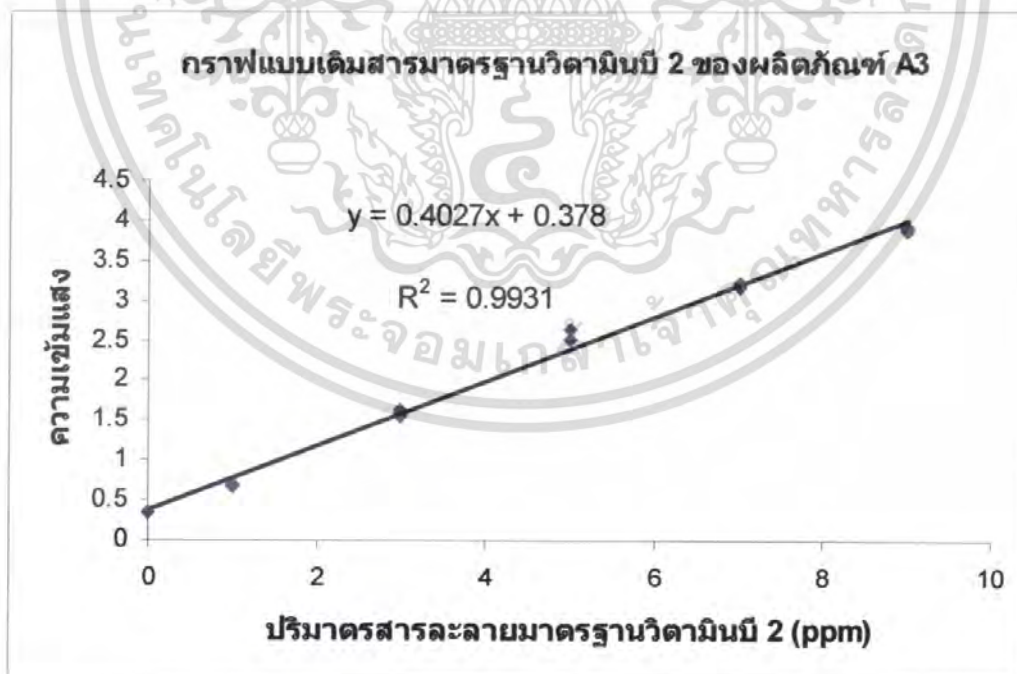


รูปที่ 4.1 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

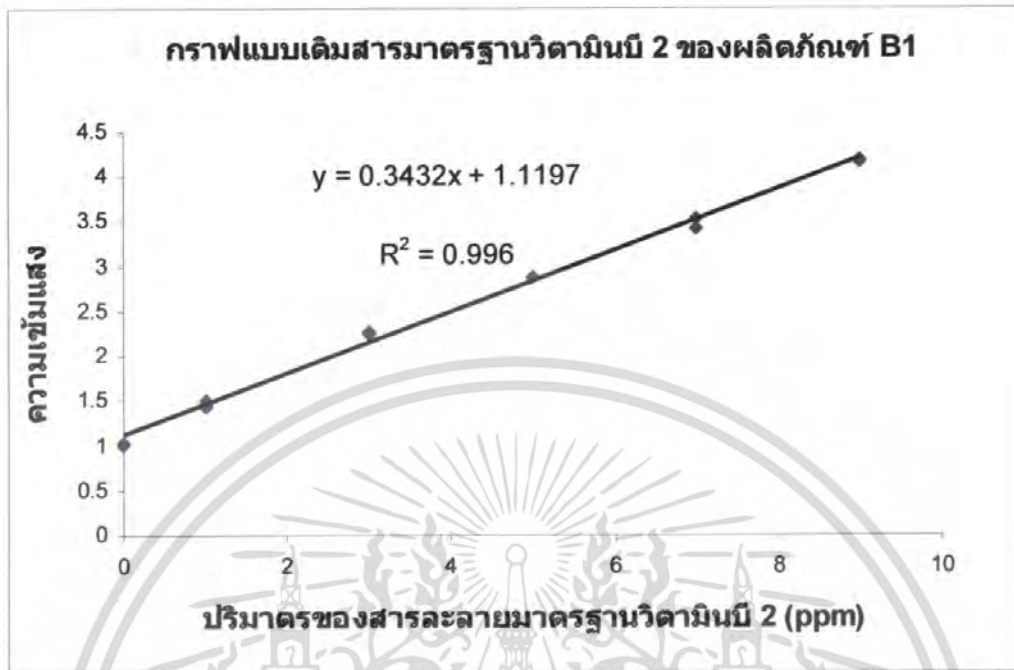


รูปที่ 4.2 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A2

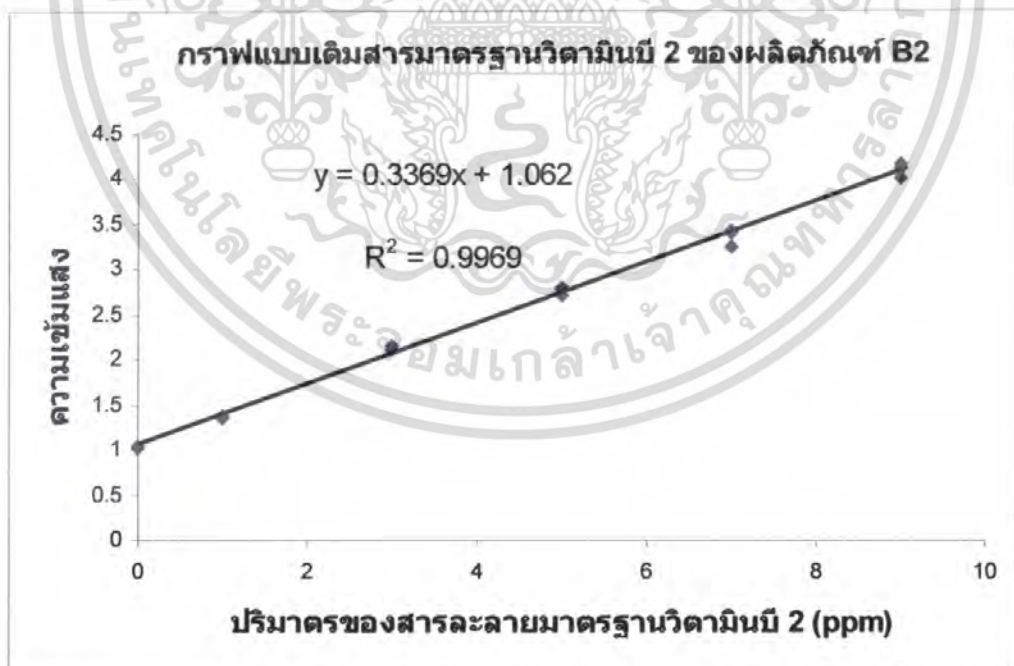


รูปที่ 4.3 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

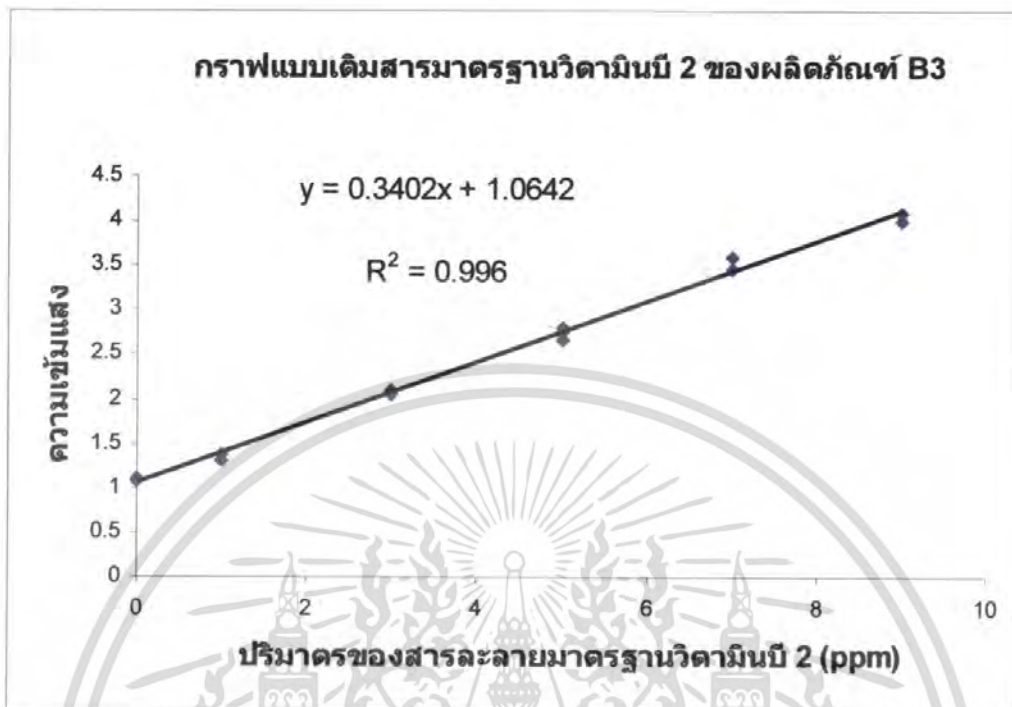


รูปที่ 4.4 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B1

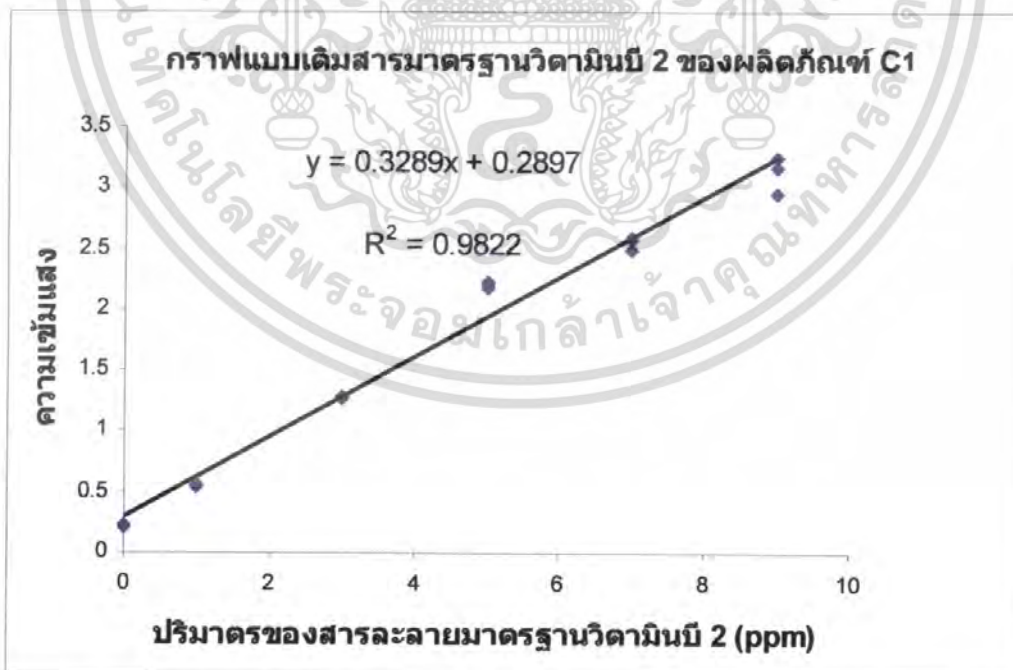


รูปที่ 4.5 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

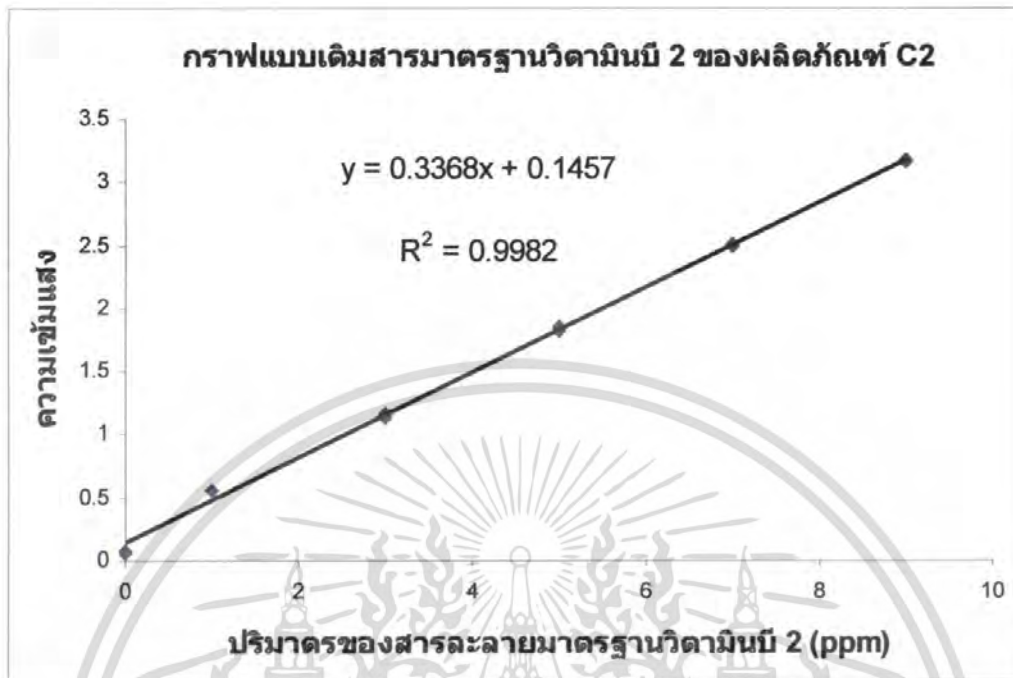


รูปที่ 4.6 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B3

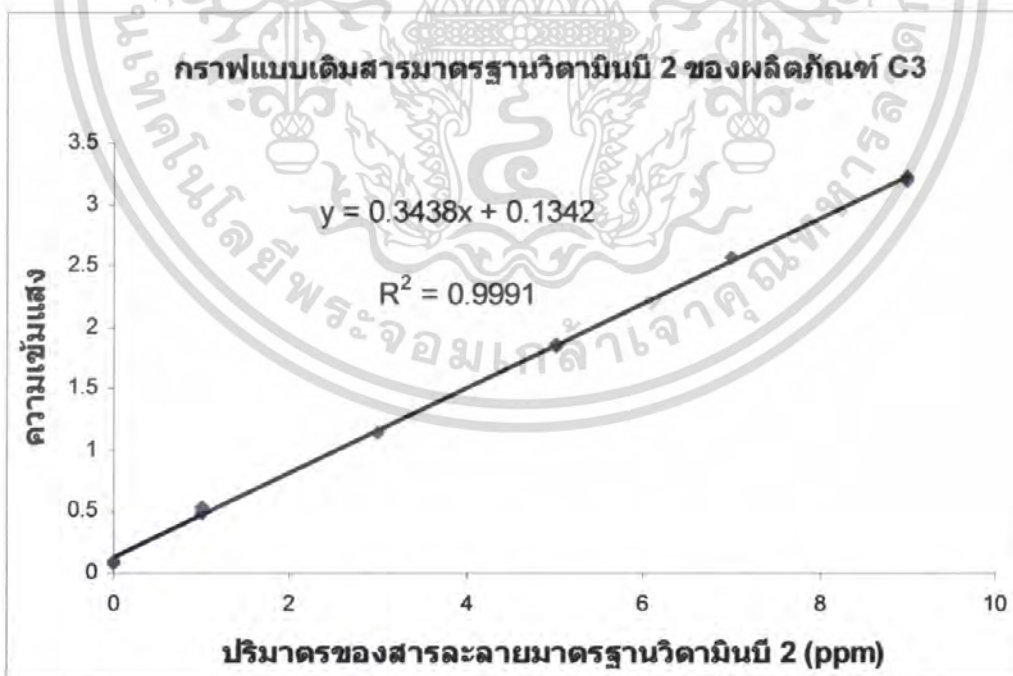


รูปที่ 4.7 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

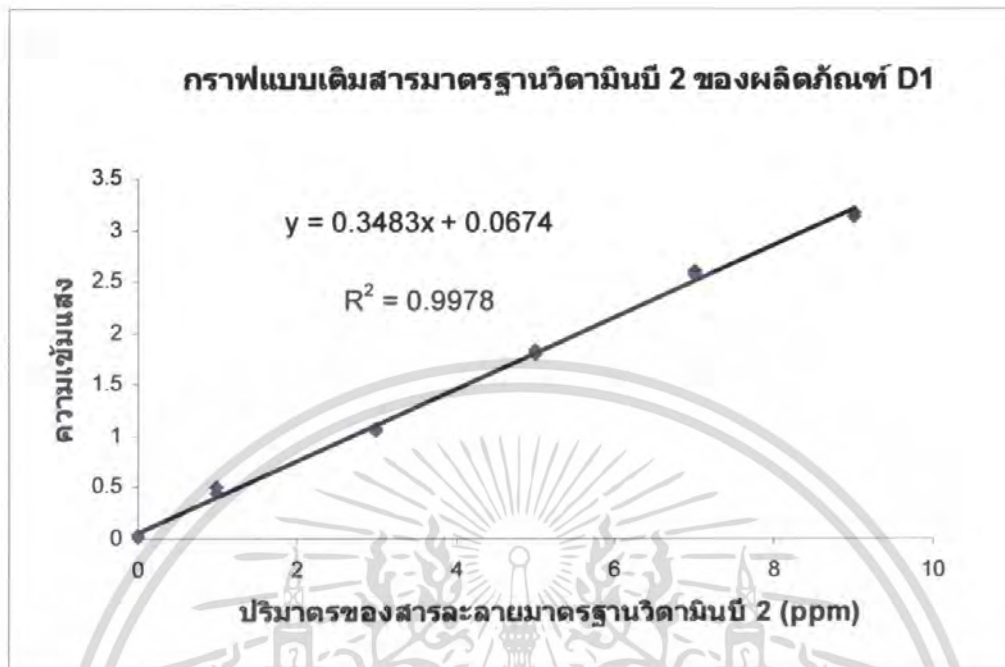


รูปที่ 4.8 กราฟแบบเดิมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C2

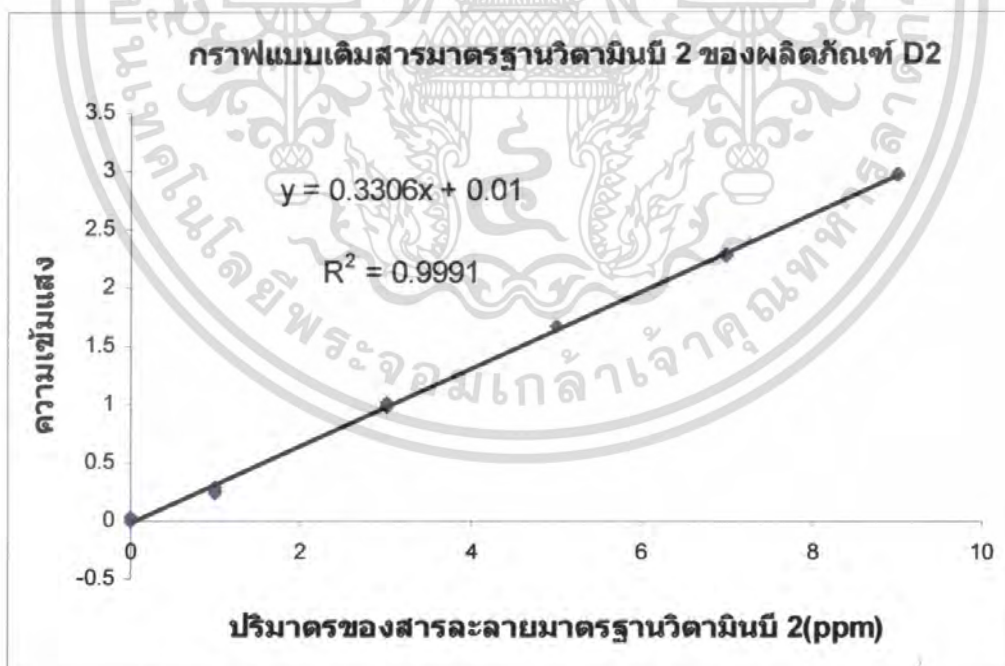


รูปที่ 4.9 กราฟแบบเดิมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

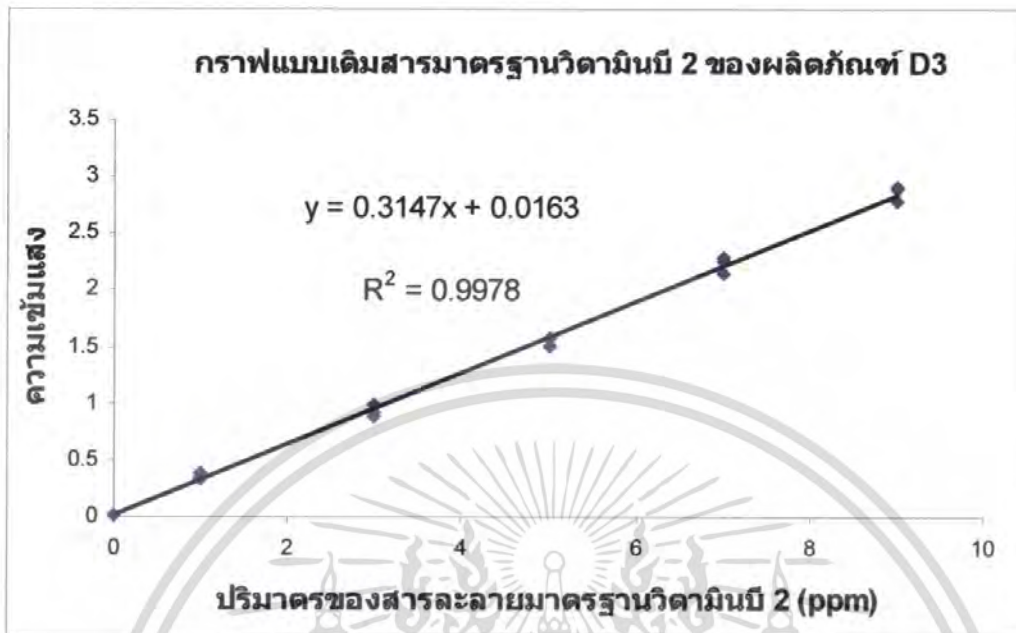


รูปที่ 4.10 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D1

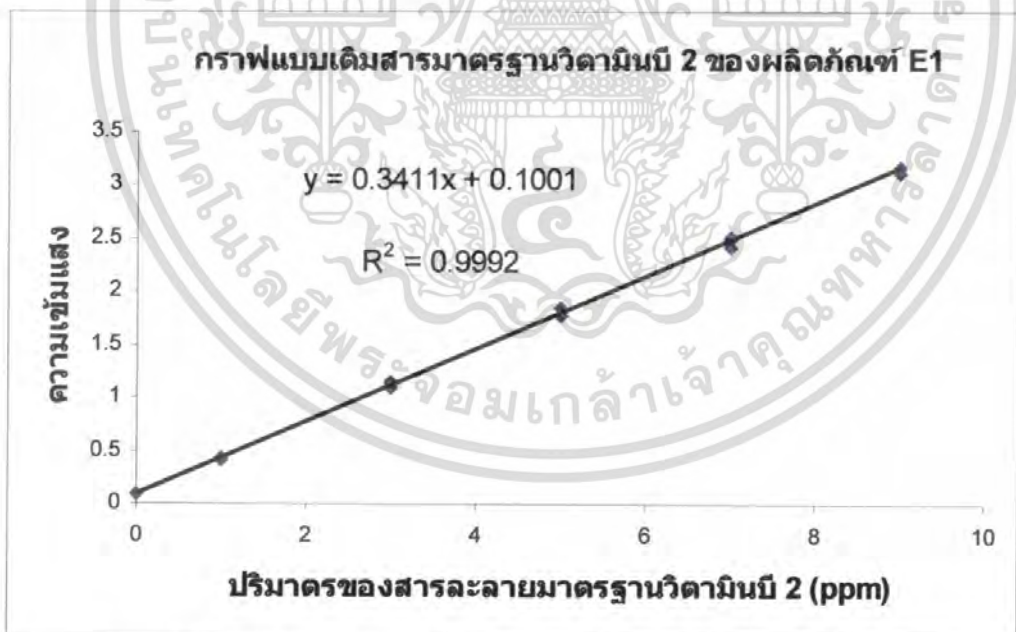


รูปที่ 4.11 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

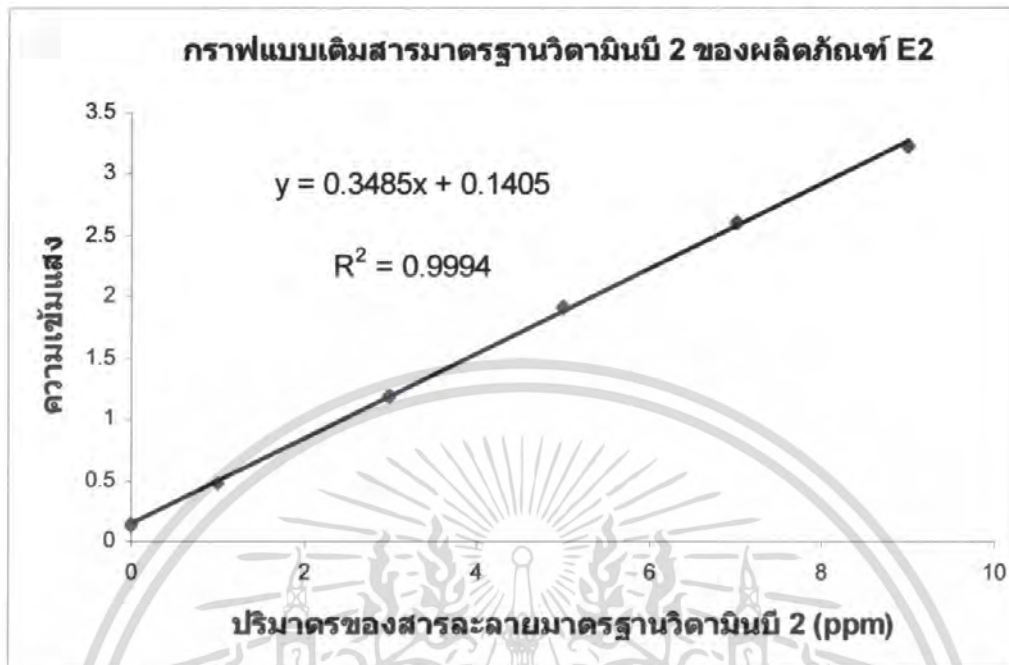


รูปที่ 4.12 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D3

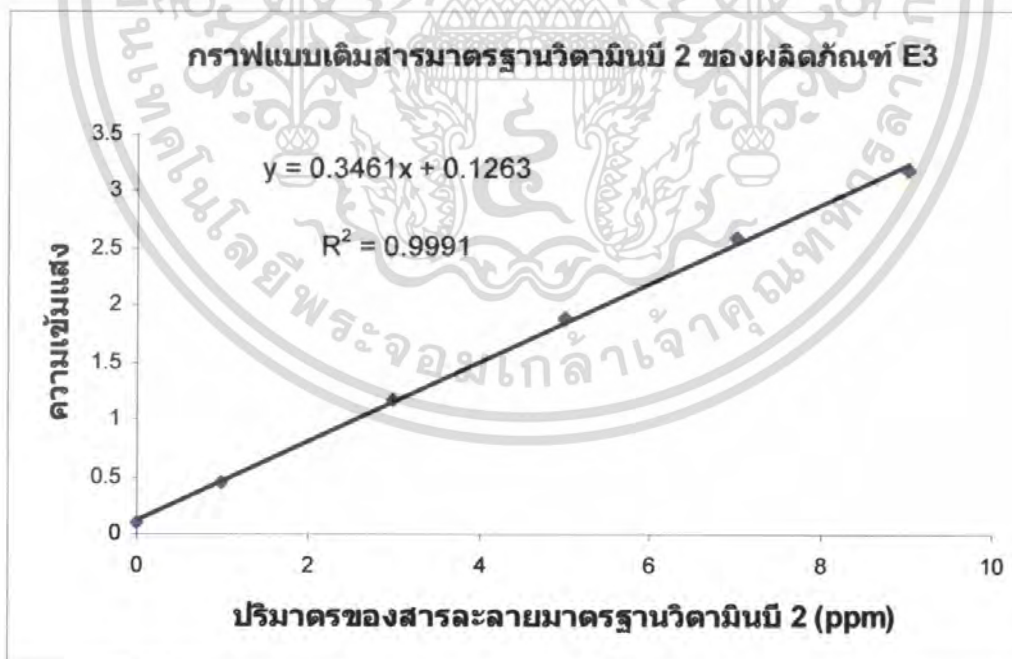


รูปที่ 4.13 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E2



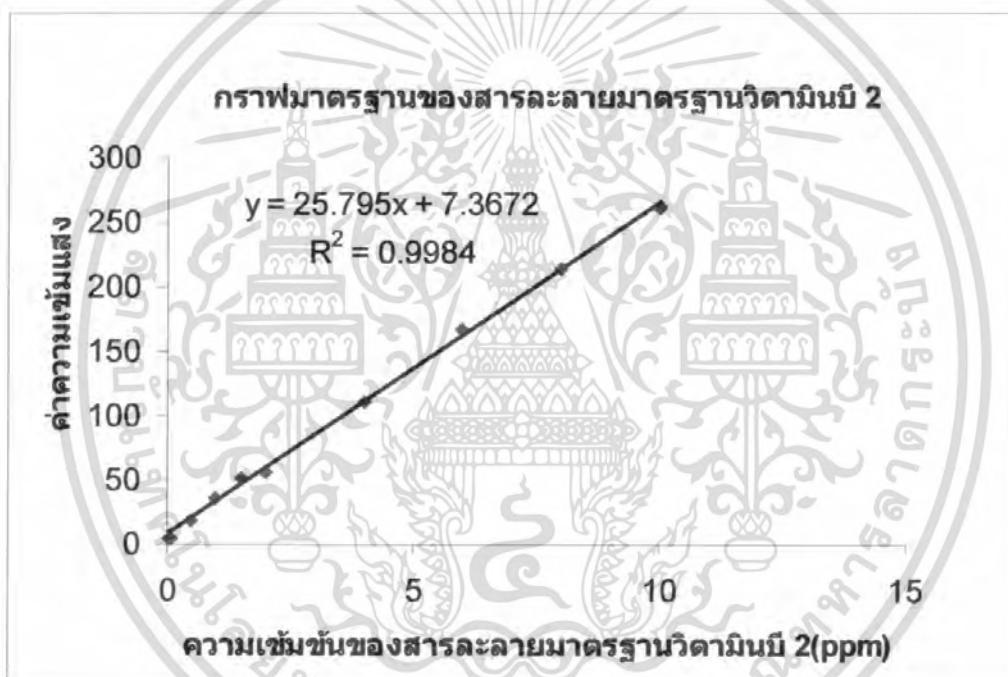
รูปที่ 4.15 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การประเมินผลความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Validation of analytical method) โดยใช้หลักทางสถิติประเมินได้ผลดังนี้

4.2.1 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปีศึกษาได้โดยการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในสารละลาย spiked sample และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานลงไป แต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำผลมาคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับได้ (% Recovery) ดังแสดงภาคผนวกที่ ก.1.2



รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2

4.2.2 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์

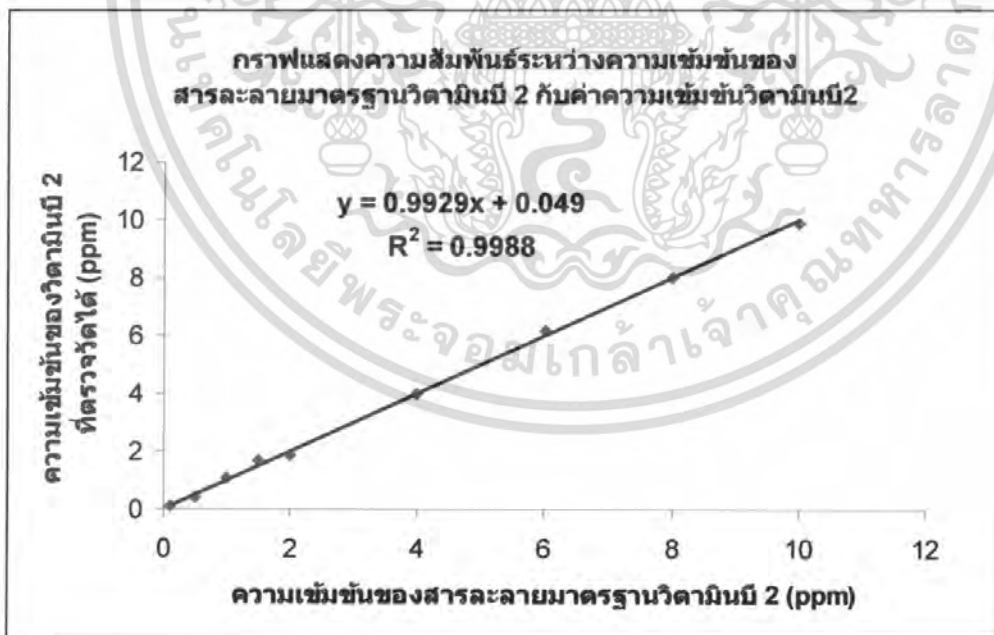
ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปีศึกษาได้โดยการนำสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 2.0 ppm มาทำการตรวจวัดซ้ำ 7 ซ้ำ แล้วนำผลมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean; \bar{X}) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) และร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation; %RSD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่นำมาศึกษาหาความเที่ยง คือ สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 2 ppm ผลที่ได้จากการวัดซ้ำ 7 ครั้ง แสดงไว้ในภาคผนวก ก.1.3 ซึ่งค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 2 เท่ากับ 56.1745 ppm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.0137 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.0245%

4.2.3 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้ (Limit of Quantitation; LOQ)

ค่า LOD และ LOQ ศึกษาได้โดยการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 0.1-10.0 ppm โดยแต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้งจะได้ค่าความเข้มแสงเฉลี่ย แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานจะได้ค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้และนำมาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 4.17 นำค่าที่ได้จากกราฟ (ค่าจุดตัดบนแกนตั้งและค่าความชัน) มาคำนวณค่า LOD และ LOQ ได้ดังแสดงในภาคผนวกที่ ก.1.4 ซึ่งได้ค่า LOD เท่ากับ 0.1481 และ LOQ เท่ากับ 0.4935



รูปที่ 4.17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 กับค่าความเข้มแสงที่ตรวจวัดได้ (Detector response)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

จากกราฟแบบเติมสารมาตรฐานรูปที่ 4.1 - 4.15 เมื่อนำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) จะมีค่าเท่ากับ 0.9973, 0.9976, 0.9931, 0.996, 0.9969, 0.996, 0.9822, 0.9982, 0.9991, 0.9978, 0.9991, 0.9978, 0.9992, 0.9994 และ 0.9991 ตามลำดับ และจากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 รูปที่ 4.16 จะมีค่าเท่ากับ 0.9984 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ (R^2 ไม่น้อยกว่า 0.99)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาการตรวจวัดหาปริมาณวิตามินบี 2 ใน ตัวอย่างเครื่องคั้นสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณวิตามินบี 2 ที่ใช้ในการบ่งบอกคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องคั้นสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบประเภทต่างๆตามท้องตลาดที่มีการโฆษณาสินค้าในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังต้องการตรวจสอบประสิทธิภาพ และความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปีแบบเดิมมาตรฐาน ว่าเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยง และความแม่นยำในการให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ และยอมรับได้หรือไม่ ซึ่งสามารถสรุปผลการวิเคราะห์ได้ดังนี้

สภาวะสำหรับเครื่องที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องคั้นสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ ตั้งความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นเท่ากับ 326.0 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่ใช้ปลดปล่อยคือ 499.0 นาโนเมตร ระยะเวลาในการตอบสนองคือ 0.50 วินาที ความกว้างพิคที่ใช้กระตุ้นคือ 5 นาโนเมตร ความกว้างพิคที่ใช้ปลดปล่อยคือ 5 นาโนเมตร

ตัวอย่างที่นำมาทำการวิเคราะห์เป็นการนำตัวอย่างเครื่องคั้นสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบมาละลายด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ แล้วทำการกรองสารละลายตัวอย่างให้ได้สารละลายใส ทำการเจือจางให้เหมาะสมและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 2 โดยวิธีเดิมมาตรฐานวิตามินบี 2 เพื่อลดปัญหาเกี่ยวกับเมทริกซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง ทำโดยนำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรมาเติมสารละลายมาตรฐานและนำมาเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 0.1 ppm ที่ปริมาตรต่างๆ หลังจากนั้นนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ ซึ่งสามารถวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องคั้นสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบตัวอย่างผลิตภัณฑ์ A, B, C, D และ E เท่ากับ 0.0866, 0.3180, 0.0568, 0.0092 และ 0.0354 มิลลิกรัมต่อตัวอย่างหนึ่งกรัมตามลำดับ

จากผลการประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์พบว่า

- ความเที่ยงของวิธีที่สามารถบ่งบอกได้ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งมีค่าเท่ากับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.0137 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.0245%
- ความแม่นยำของวิธี ซึ่งสามารถบอกได้ด้วยร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 103-110%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นกราฟแบบเติมสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9973, 0.9976, 0.9931, 0.996, 0.9969, 0.996, 0.9822, 0.9982, 0.9991, 0.9978, 0.9991, 0.9978, 0.9992, 0.9994 และ 0.9991 ตามลำดับ และจากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 มีค่าเท่ากับ 0.9984
- ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 0.1481 และค่าขีดการจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้ มีค่าเท่ากับ 0.4935

สรุปได้ว่า ความแม่นยำ ความเที่ยง และความสัมพันธ์เชิงเส้นของวิธีวิเคราะห์จัดว่า อยู่ในเกณฑ์ดี และยังสามารถตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ได้ในระดับต่ำ (ppm) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปีแบบเติมสารมาตรฐานที่มีความเหมาะสมในการหาปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างที่สามารถวางแสงได้เป็นอย่างดี และยังเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ให้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือ ได้

ข้อเสนอแนะ

1. เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์จะใช้เซลล์เฉพาะในการตรวจวัดปริมาณสารคือ ควอทเซลล์ ที่ใส่ทั้ง 4 ด้าน ไม่สามารถใช้เซลล์ชนิดอื่นได้
2. สารละลายที่เตรียมมาตรวจวัดจะต้องเป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอนเจือปนทำไม่ได้โดยการกรองสารละลายกับกระดาษกรองเบอร์ 2 เพราะจะทำให้ไม่สามารถตรวจวัดค่าได้หรือเกิดการผิดพลาดของค่าที่ตรวจวัด
3. ก่อนการตรวจวัดทุกครั้งจะต้องมีการวัดแบลนด์เพื่อเป็นการตรวจสอบเครื่องและความบริสุทธิ์ของแบลนด์ที่ใช้
4. ก่อนการวัดสารตัวอย่างจะต้องมีการกลั้วล้างเซลล์ด้วยตัวทำละลายอะซิติก 0.02 โมลาร์ก่อนทุกครั้งที่จะทำการตรวจวัด
5. อุปกรณ์ที่ใช้ควรมีการกลั้วด้วยตัวทำละลายอะซิติก 0.02 โมลาร์ก่อนการใช้งานทุกครั้ง

บรรณานุกรม

คณิตา ตังคณานุรักษ์ เอกสารประกอบการเรียนการสอนวิชาปฏิบัติการวิเคราะห์สาร 2

สุวรรณ ไชยสิทธิ์ เอกสารประกอบการเรียนการสอนวิชาการประยุกต์ใช้เครื่องมือ 2

<http://www.aseabiodiversity.info>

<http://www.sciso.or.th>

<http://www.sportronfamily.com>

<http://www.dld.go.th/qcontrol/organizdata/research>

<http://lib3.dss.go.th/fulltext>

<http://janburi.buu.ac.th>

<http://www.geocities.com/vitandmin/Riboflavin.htm>

<http://www.thaigoodview.com/library/student show>

<http://www.iss.com>

<http://fluorescence.net>

<http://elchem.kaist.ac.kr/vt/ch>

<http://colla.genaplus.igetweb.com>

<http://www.faculty.kutztown.edu/betts/htm/Fluorescence.htm>

<http://www.wikipedia.org>

<http://www.phys.educ.ksu.edu/vqm/htm>

<http://www.chemistry.rutgers.edu/grad/chem585/lecture z.htm>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
แสดงผลการวิเคราะห์

ก.1 การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

ก.1.1 ตารางแสดงผลค่าความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

ตารางที่ ก.1 แสดงปริมาตร (มิลลิลิตร) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A

ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐานวิตามินบี 2 (mL)	ความเข้มแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
0	1.0268	1.0428	1.0964	1.0553 \pm 0.0365
1	1.4714	1.3688	1.3825	1.4076 \pm 0.0557
3	2.2598	2.1414	2.0834	2.1615 \pm 0.0899
5	2.8785	2.7724	2.7485	2.7998 \pm 0.0692
7	3.4902	3.3684	3.5459	3.4682 \pm 0.0613
9	4.1722	4.1213	4.0635	4.119 \pm 0.0544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 แสดงปริมาตร (มิลลิลิตร) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B

ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐานวิตามินบี 2 (mL)	ความเข้มแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
0	0.3943	0.3224	0.3563	0.3577 ± 0.0360
1	0.6405	0.6835	0.6967	0.6736 ± 0.0294
3	1.3641	1.3755	1.5921	1.4439 ± 0.1285
5	2.0639	2.2823	2.6044	2.3169 ± 0.2718
7	2.9311	2.9264	3.1867	3.0147 ± 0.1490
9	3.6509	3.6268	3.8991	3.7256 ± 0.1507

ตารางที่ ก.3 แสดงปริมาตร (มิลลิลิตร) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C

ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐานวิตามินบี 2 (mL)	ความเข้มแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
0	0.2246	0.0740	0.0979	0.1322 ± 0.0809
1	0.5078	0.5636	0.5176	0.5297 ± 0.0298
3	1.2809	1.1544	1.1402	1.1918 ± 0.0775
5	2.2133	1.8328	1.8642	1.9701 ± 0.211
7	2.5561	2.5017	2.5688	2.5422 ± 0.0356
9	3.1274	3.1684	3.2045	3.1668 ± 0.0386

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.4 แสดงปริมาตร (มิลลิลิตร) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D

ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐานวิตามินบี 2 (mL)	ความเข้มแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
0	0.0241	0.0219	0.0226	0.0229 ± 0.0011
1	0.4689	0.2674	0.3554	0.3639 ± 0.1010
3	1.0724	0.9966	0.9380	1.0023 ± 0.0674
5	1.8238	1.6681	1.5545	1.6821 ± 0.1349
7	2.5778	2.2788	2.2291	2.3619 ± 0.1887
9	3.1453	2.9722	2.8644	2.9940 ± 0.1418

ตารางที่ ก.5 แสดงปริมาตร (มิลลิลิตร) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E

ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐานวิตามินบี 2 (mL)	ความเข้มแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
0	0.0930	0.1334	0.1100	0.1121 ± 0.0203
1	0.4313	0.4734	0.4561	0.4536 ± 0.0212
3	1.1347	1.1854	1.1746	1.1649 ± 0.0267
5	1.8264	1.9152	1.8814	1.8743 ± 0.0449
7	2.4821	2.6114	2.5912	2.5616 ± 0.0709
9	3.1595	3.2359	3.1883	3.1946 ± 0.0386

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.6 แสดงความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเข้าธัญพืชกรอบ	ความเข้มข้นวิตามินบี 2 เฉลี่ย (ppm)
A	0.0879
B	0.3189
C	0.0561
D	0.0074
E	0.0354

ก.1.2 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์

ตารางที่ ก.7 แสดงผลการวัดหาปริมาณวิตามินบี 2 ใน original sample กับ spiked sample และค่า %Recovery

ตัวอย่างอาหาร เข้าธัญพืช กรอบ(E)	C_{standard} (ppm)	$C_{\text{spiked sample}}$ (ppm)	$C_{\text{spiked sample}}$ เฉลี่ย (ppm)	C_{sample} (ppm)	C_{sample} เฉลี่ย (ppm)	%Recovery
1	1.0	1.21064	1.20762	0.10732	0.10860	109.9020
		1.20570		0.10935		
		1.20651		0.10914		
2	1.0	1.14570	1.14218	0.11165	0.1099	103.2300
		1.13883		0.11003		
		1.14201		0.10792		
3	1.0	1.13603	1.13469	0.10848	0.10735	102.7400
		1.13412		0.10604		
		1.13391		0.10752		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย : ทำเช่นเดียวกับข้อ ก.1.3

คำนวณหาค่าร้อยละของการกลับได้คืน (%Recovery) ตัวอย่างที่ 1

จาก
$$\%Recovery = \frac{(C_{spiked-sample} - C_{sample})}{C_{standard}} \times 100$$

$$\%Recovery = \frac{(1.20762 - 0.10860)}{1.0} \times 100$$

1.0

$$\%Recovery = 109.902$$

* ตัวอย่างอื่นๆทำเช่นเดียวกัน

ก.1.3 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของการวิเคราะห์

ตารางที่ ก.8 แสดงค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์

ความเข้มข้นที่ใช้ (ppm)	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ppm)	ค่าเฉลี่ย (ppm)	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน	%RSD
2	56.1561	56.1745	± 0.0137	± 0.0245
	56.1865			
	56.1923			
	56.1621			
	56.1747			
	56.1844			
	56.1654			

คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย

จาก
$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{56.1561 + 56.1865 + 56.1923 + 56.1621 + 56.1747 + 56.1844 + 56.1654}{7}$$

7

$$\bar{X} = 56.1745$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จาก

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{(56.1561-56.1745)^2 + (56.1865-56.1745)^2 + (56.1923-56.1745)^2 + (56.1621-56.1745)^2 + (56.1747-56.1745)^2 + (56.1844-56.1745)^2 + (56.1654-56.1745)^2}{7-1}}$$

$$SD = 0.0137$$

คำนวณร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

จาก

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

$$\bar{x}$$

$$\%RSD = \frac{0.0137}{56.1745} \times 100$$

$$56.1745$$

$$\%RSD = 0.0245$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1.4 การศึกษาค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection ; LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้ (Limit of Quantitative ; LOQ)

ตารางที่ ก.9 แสดงผลการวัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพื่อหาค่า LOD และ LOQ

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานวิตามินบี 2 (ppm)	ความเข้มข้นที่วัดได้			ความเข้มข้น เฉลี่ย (ppm)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0.1	0.1093	0.1083	0.1073	0.1084
0.5	0.4234	0.4270	0.4277	0.4260
1.0	1.0949	1.0941	1.0955	1.0948
1.5	1.7036	1.7007	1.7024	1.7022
2.0	1.8914	1.8926	1.8928	1.8923
4.0	4.0089	4.0219	4.0234	4.0181
6.0	6.2035	6.2045	6.2103	6.2061
8.0	7.9897	7.9983	8.0031	7.9970
10.0	9.8540	9.8571	9.8666	9.8592

คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย : ทำเช่นเดียวกับข้อ ก.1.3

คำนวณ LOD และ LOQ

นำค่าเฉลี่ยมาสร้างกราฟดังรูปที่ 4.1 ที่มีสมการเส้นตรงเท่ากับ $y = 0.9929x + 0.049$

จาก

$$LOD = \frac{3S_{xy}}{\text{slope}}$$

slope

$$LOD = 3 \times 0.049$$

$$0.9929$$

$$LOD = 0.1481$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$LOQ = 10S_{xy}$$

slope

$$LOQ = 10 \times 0.049$$

0.9929

$$LOQ = 0.4935$$

ก.1.5 การศึกษาการตอบสนองความเป็นเส้นตรง(Linearity)

ตารางที่ ก.10 แสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2

ความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐาน วิตามินบี 2 (ppm)	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$
0.1	4.5476	4.5747	4.5993	4.5739 ± 0.0254
0.5	18.2893	18.3825	18.3986	18.3568 ± 0.0590
1.0	35.6121	35.5890	35.6245	35.6085 ± 0.0180
1.5	51.3125	51.2357	51.2811	51.2764 ± 0.0386
2.0	56.1561	56.1865	56.1923	56.1783 ± 0.1280
4.0	110.7760	111.1140	111.1150	111.0020 ± 0.1957
6.0	167.3870	167.4110	167.5610	167.4530 ± 0.0944
8.0	213.4610	213.6830	213.8080	213.3651 ± 0.3914
10.0	261.5160	261.6310	261.8770	261.6747 ± 0.1844

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 การตรวจวัดหาปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผง

รสช็อคโกแลต และอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ

ตารางที่ ก.11 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผง

รสช็อคโกแลต และอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ

ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเข้าธัญพืชอบกรอบ	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในสารละลายตัวอย่าง	ปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่าง 1 กรัม (มิลลิกรัม)	$\bar{X} \pm SD$
A	1.0004	0.0794	0.0794	0.0866 ± 0.0073
	1.0005	0.0864	0.0864	
	1.0007	0.0939	0.0939	
B	1.0004	0.3263	0.3263	0.3181 ± 0.0072
	1.0002	0.3152	0.3152	
	1.0000	0.3128	0.3128	
C	1.0003	0.0881	0.0881	0.0568 ± 0.0272
	1.0000	0.0433	0.0433	
	1.0004	0.0390	0.0390	
D	1.0003	0.0194	0.0194	0.0092 ± 0.0089
	1.0006	0.0030	0.0030	
	1.0000	0.0052	0.0052	
E	1.0000	0.0293	0.0293	0.0354 ± 0.0056
	1.0001	0.0403	0.0403	
	1.0001	0.0365	0.0365	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่าง 1 กรัม : ตัวอย่าง A

จากผลการตรวจวัดที่ได้จากสมการในกราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐาน โดยชั่งตัวอย่าง มา 1.0004 วัดครั้งที่ได้ 0.0794 ppm แสดงว่า

ในตัวอย่าง 1.0004 กรัม มีปริมาณวิตามินบี 2 0.0794

ในตัวอย่าง 1.0000 กรัม มีปริมาณวิตามินบี 2 $0.0794 \times 1 = 0.00794$ มิลลิกรัม
1.0004

* ตัวอย่างอื่นๆทำเช่นเดียวกัน

ตารางที่ ก.12 ปริมาณของวิตามินบี 2 ที่หาได้จากการเตรียมตัวอย่าง 1 กรัม

ตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดผงรศช็อคโกแลต และอาหารเข้ารัญพิชอบกรอบ	$\bar{X} \pm SD$ (มิลลิกรัม/กรัม)
A	0.0866 \pm 0.0073
B	0.3181 \pm 0.0072
C	0.0568 \pm 0.0272
D	0.0092 \pm 0.0089
E	0.0354 \pm 0.0056

* $\bar{X} \pm SD$ คือ ปริมาณวิตามินบี 2 เฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อคำนวณปริมาณวิตามินบี 2 ในเครื่องสำอางชนิดผงรศช็อคโกแลต และอาหารเข้ารัญพิชอบกรอบ 1 กรัมทั้งหมดแล้ว คำนวณค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดทั้ง 3 ครั้ง จากการชั่งตัวอย่าง 1 ครั้ง นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวมของตัวอย่าง