สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผง รสช็อคโกแลต และอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีโดยวิธีเติมสารมาตรฐาน

นางสาวสุพัตรา ระวังงาน

นางสาวอภิรดา เลาะผู้ดี

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 107883
วัน,เดือน,ปี - 8 มิ.ย. 2553

b 12213512
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Miss Supattra Ravangngan

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

โครงงานพิเศษ	การตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีโดยวิธีเติมสารมาตรฐาน
นักศึกษา	นางสาวสุพัตรา ระวังงาน
	นางสาวอภิรดา เลาะผู้ดี
ภาควิชา	เคมี คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
กรรมการ ผศ.นงนุช ศิวะภิญโญยศ	.....
กรรมการ รศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์	.....
กรรมการ ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น	.....

.....

(ผศ.ดร.ชลอ จารุสุทธิรักษ์)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ การตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีโดยวิธีเติมสารมาตรฐาน

นักศึกษา นางสาวสุพัตรา ระวังงาน

นางสาวอภิรดา เลาะผู้ดี

ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์

ปีการศึกษา 2550

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.คณิตา ดังคณานุรักษ์

บทคัดย่อ

วิตามินบี 2 เป็นสารอาหารที่มีความสำคัญในการป้องกันการสะสมไขมันในร่างกายมนุษย์ วิตามินบี 2 มักจะอยู่ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีโดยวิธีเติมสารมาตรฐาน วิตามินบี 2 จะถูกสกัดโดยใช้กรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์และตรวจวัดปริมาณด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีโดยวิธีเติมสารมาตรฐาน ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นที่ใช้ปลดปล่อย (λ_{em}) ของเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์คือ 326.0 และ 499.0 นาโนเมตรตามลำดับ วิธีการวิเคราะห์นี้ถูกทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยมีความเที่ยงของการตรวจวัดวิตามินบี 2 อยู่ในรูปของร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 11.1067 ความแม่นจะแสดงในรูปของร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) อยู่ในช่วง 102-110 % ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R^2) ของกราฟมาตรฐานแบบเติมสารมาตรฐานมีค่าอยู่ในช่วง 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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Determination of Vitamin B2 in instant chocolate beverages and breakfast cereal flakes by Fluorescence Spectroscopy with standard addion 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 for 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 detcrmined the quantity by Fluorescence Spectroscopy with standard addion method. Optimum exitation (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 express 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 metod. The means 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำโครงงานพิเศษนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี สืบเนื่องมาจากความร่วมมือ การได้รับการดูแล เอาใจใส่ ช่วยเหลือ แนะนำ และความกรุณาของทุกๆท่าน ทั้งอาจารย์ที่ปรึกษา คณะกรรมการ และผู้ที่เกี่ยวข้องที่กรุณาติดตาม ตรวจสอบ และแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณรศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์ เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษา ช่วยแก้ไขปัญหา เอาใจใส่ดูแล ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษนี้มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผศ.นงนุช ศิวะภิญโญยศ และดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น คณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษที่กรุณาแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่านที่คอยช่วยเหลือให้การทำโครงงานพิเศษนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณสุรินทร์ เหล่าพระจันทร์ที่ช่วยดูแลเรื่องการใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์ให้การทำโครงงานพิเศษนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี รวมทั้งแม่บ้านที่คอยให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ญาติพี่น้อง เพื่อนๆ รวมถึงรุ่นพี่ รุ่นน้องทุกๆคนที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือในทุกๆด้านทำให้โครงงานพิเศษนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ที่ช่วยทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวสุพัตรา ระวังงาน
นางสาวอภิรดา เลาะผู้ดี
คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 : บทนำ	
1.1 ความสำคัญ และที่มาของโครงงาน	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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ ก.1 : แสดงปริมาตร (มิลลิลิตร) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A 36

ตารางที่ ก.2 : แสดงปริมาตร (มิลลิลิตร) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B 37

ตารางที่ ก.3 : แสดงปริมาตร (มิลลิลิตร) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C 37

ตารางที่ ก.4 : แสดงปริมาตร (มิลลิลิตร) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D 38

ตารางที่ ก.5 : แสดงปริมาตร (มิลลิลิตร) และค่าความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E 38

ตารางที่ ก.6 : ความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด 39

ตารางที่ ก.7 : แสดงผลการวัดหาปริมาณวิตามินบี 2 ใน originaled 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 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ 44

ตารางที่ ก.12 : แสดงปริมาณของวิตามินบี 2 ที่หาได้จากการเตรียมตัวอย่าง 1 กรัม 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงาน

เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบเป็นอาหารที่นิยมรับประทานแทนอาหารเช้า เนื่องจากมีคุณค่าทางสารอาหารที่มีประโยชน์และสะดวกต่อการรับประทานสำหรับชีวิตประจำวันที่เร่งรีบในปัจจุบัน โดยในเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบจะมีการเติมแร่ธาตุและวิตามินต่างๆลงไปเพื่อเพิ่มคุณค่าทางสารอาหารจากเดิมที่อาจมีไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย

ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบส่วนใหญ่มักจะมีวิตามินบี 2 เป็นส่วนประกอบ เนื่องจากวิตามินบี 2 ได้ชื่อว่าเป็นวิตามินป้องกันไขมันคือ วิตามินบี 2 จัดว่าเป็นวิตามินที่มีความจำเป็นต่อการเผาผลาญกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นต่อเอนไซม์และกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารอาหารต่างๆในร่างกายโดยเฉพาะไขมัน ป้องกันไขมันอุดตันในเส้นเลือดอันเป็นสาเหตุให้เส้นเลือดแข็งตัว ขจัดไขมันชนิดอิ่มตัวในเส้นเลือด

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมานี้ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบประเภทต่างๆจึงมีการแข่งขันในด้านของการตลาด โดยประเด็นที่สำคัญที่นำมาใช้ในการประชาสัมพันธ์คือ ปริมาณวิตามินบีที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งบนฉลากของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบจะมีการแสดงปริมาณของวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ แต่เนื่องจากวิตามินนั้นจะสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อถูกแสงทำให้ปริมาณของวิตามินที่ได้รับจริงอาจมีค่าน้อยกว่าที่ได้แสดงไว้บนฉลากผลิตภัณฑ์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญของการตรวจวัดวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปี เพื่อคำนวณหาปริมาณที่มีอยู่จริงของวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบประเภทต่างๆให้เป็นข้อมูลสำหรับผู้บริโภคต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการหาปริมาณวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปี

2. เพื่อคำนวนหาปริมาณวิตามินบี 2 ที่ใช้ในการบ่งบอกคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบประเภทต่างๆ

3. ต้องการทราบปริมาณวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบเพื่อเปรียบเทียบกับฉลากบนผลิตภัณฑ์

4. เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพและความใช้ได้ของเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีและวิธีเติมสารมาตรฐานในการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาการเตรียมสารละลายตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ

2. ศึกษาการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบประเภทต่างๆ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปี

3. ศึกษาประสิทธิภาพและความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยศึกษาข้อมูลทางสถิติเพื่อบ่งบอกถึงความเที่ยง ความถูกต้อง ความสัมพันธ์เชิงเส้น ขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้

4. เป็นการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 2 ที่ได้จากการตรวจวัดกับปริมาณวิตามินบี 2ที่แสดงบนฉลากผลิตภัณฑ์

1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีดำเนินงาน

1. ค้นคว้าหาข้อมูลที่น่าสนใจและมีความเกี่ยวข้องกับหัวข้อโครงงานพิเศษ

2. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการค้นคว้าและวางแผนการดำเนินงานคือ เตรียมสารเคมีและสารมาตรฐานต่างๆที่ต้องใช้รวมถึงอุปกรณ์และเครื่องมือการทดลองที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

3. ดำเนินการทดลองโดยปฏิบัติตามแผนการดำเนินงานที่ได้เตรียมไว้สำหรับการศึกษาค้นคว้า

- การเตรียมสารละลายมาตรฐาน
- การเตรียมกราฟมาตรฐานแบบเติมสารมาตรฐาน
- การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- หาความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นและใช้ปลดปล่อยวิตามินบี 2 ที่เหมาะสมของเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์
- ตรวจวัดความเข้มแสงในสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง
- ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโดยหาค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ร้อยละของการคืนกลับได้ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบปริมาณที่ได้รับจริงของวิตามินบี 2 ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบประเภทต่างๆ ซึ่งสามารถบ่งบอกคุณภาพของผลิตภัณฑ์และใช้เป็นข้อมูลในการเลือกบริโภค
2. ทราบขั้นตอนการใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์ และสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องในการตรวจวัดปริมาณของวิตามินบี 2
3. ทราบถึงประโยชน์ของวิตามินบี 2 ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบประเภทต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 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) สูตรเอมไพริคัลน้ำหนักโมเลกุล $C_{17}H_{20}N_4O_6$ 376.371. มีคุณลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองถึงสีส้มและจะมีสีเหลืองแกมเขียวเรืองแสงในสารละลายไรโบฟลาวิน มีกลิ่นเล็กน้อย ละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์และด่างที่เจือจาง 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 และช่วยให้เม็ดเลือดแดงคงสภาพ เมื่อขาดจะกลายเป็นคนแคระแกรน มีความจำเป็นต่อเอนไซม์และกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารอาหารต่างๆในร่างกายโดยเฉพาะไขมัน ป้องกันไขมันอุดตันในเส้นเลือดอันเป็นสาเหตุให้เส้นเลือดแข็งตัว ขจัดไขมันชนิดอิ่มตัวในเส้นเลือด ด้วยเหตุนี้เองวิตามินบี 2 จึงได้สมญาว่า "วิตามินป้องกันไขมัน" วิตามินบี 2 ช่วยระงับอาการตาแฉะได้จึงใช้เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา

วิตามินบี 2 เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ (water soluble) ทนต่อกรด อากาศ ความร้อน และปฏิกิริยาทางเคมีต่อออกซิเจน แต่จะถูกทำลายหรือสลายตัวได้เร็วในด่างและเมื่อโดนแสงอาทิตย์หรือจากการล้างน้ำ เมื่อถูกดูดซึมแล้วจะเปลี่ยนเป็น active form ที่ผนังลำไส้ในรูปของ Flavine adenine dinucleotide (FAD) และ Flavin mononucleotide (FMN) ทำหน้าที่เป็น co-enzyme เกี่ยวกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอน biological oxidation-reduction จึงมีความจำเป็นต่อการหายใจของเซลล์ เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็น co-enzyme ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนวิตามินบี 6 และกรดโฟลิกให้อยู่ในรูป active ทั้งยังทำหน้าที่รักษาสภาพของเยื่อบุผิวและ mucosa โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงที่มิวโคซ่าเซลล์ (mucosa) และผิวหนัง ถ้าผ่าสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิดการขาดวิตามินบี 2 จะพบว่ามีไขมันสะสมตามทิชชูต่าง ๆ เช่น ตับ ไต ต่อมอะดรีนาล และผนังเส้นเลือด ทั้งนี้เพราะ ไรโบฟลาวิน เกี่ยวข้องกับขบวนการ B-oxidation ของกรดไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 ปริมาณวิตามินบี 2 ที่แนะนำของคนแต่ละวัย

<u>วัยเด็ก</u>

- 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

<u>วัยหนุ่มสาว</u>

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

<u>วัยผู้ใหญ่</u>

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

<u>หญิงตั้งครรภ์</u>

- หญิงตั้งครรภ์ ประมาณ 1.4 มิลลิกรัมต่อวัน
- หญิงให้นมบุตร ประมาณ 1.6 มิลลิกรัมต่อวัน

<u>หมายเหตุ</u> : กลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการขาดวิตามินบี 2 ได้แก่ ผู้สูงอายุ ผู้ที่เจ็บป่วยเรื้อรัง คนยากจน และผู้ที่ติดสุรา

2.1.2 แหล่งที่พบ

ยีสต์ (บริวเวอร์ยีสต์) จมูกข้าวสาลี ข้าวซ้อมมือ ข้าวแดง รำข้าว ข้าวโอ๊ต แป้งถั่วเหลือง ถั่วเมล็ดแห้ง ถั่วงอก ถั่วเขียว ยอดแค ปลาทู ปลาหมึกแห้ง หอยนางรม ตับ เครื่องในสัตว์ ไข่ นม ผักใบเขียว โดยทั่วไปแล้วคนปกติมักจะไม่ขาดวิตามินนี้ยกเว้นแต่ในบุคคลที่รับประทานอาหารไม่ถูกส่วน หรือในรายที่เป็นโรคพิษสุราเรื้อรัง

<u>อาหารที่เสริมฤทธิ์วิตามินบี 2</u>

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. วิตามินซี ช่วยป้องกันวิตามินบี 2 รวมตัวกับออกซิเจน

6. วิตามินบี 5 ช่วยในการใช้วิตามินบี 2 ให้เกิดประโยชน์เต็มที่และมีประสิทธิภาพ

<u>อาหารหรือสารที่ต้านฤทธิ์ต่อวิตามินบี 2</u>

1. สุรา
2. ยาประเภทปฏิชีวนะ
3. ยาคุมกำเนิดชนิดรับประทาน

2.1.3 ประโยชน์และหน้าที่สำคัญของวิตามินบี 2

- ทำหน้าที่เป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องในการแตกตัว และการใช้ให้เกิดประโยชน์ของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน
- ทำให้ร่างกายเติบโต ตามปกติ และเพิ่มความทนทานให้แก่ร่างกาย
- ช่วยให้จำนวนเม็ดโลหิตแดงอยู่ในระดับปกติ
- ป้องกันอันตรายจากมลภาวะและ ยาต่างๆ
- ช่วยป้องกันโรคต้อกระจก หรือยืดเวลาเป็นให้ช้าลง

2.1.4 ผลของการขาดวิตามินบี 2

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

จะมีอาการแสดงทางตา ริมฝีปาก และผิวหนัง เริ่มแรกนั้นริมฝีปากจะอักเสบ แห้ง และแตก มุมปากจะซีด แตก เรียกลักษณะดังกล่าวว่าปากนกกระจอก (Angular stomatitis) และเมื่อเป็นมากขึ้นจะมีอาการทางผิวหนัง ใบหน้ามีสะเก็ดมันๆ ต่อมาจะมีอาการอักเสบของตา ตาสู้แสงไม่ได้ คันตาและแสบลูกตา จะทำให้เกิดโรคปากนกกระจอก ลิ้น มุมปาก และริมฝีปากอักเสบ ผิวเป็นตุ่มหนอง ตาแดง สายตาผิดปกติ เคืองตาเมื่อถูกแสง เหนื่อยง่าย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผิวหนังมัน เป็นผื่นคัน ผิวหนังอักเสบ
- ผมแห้งและร่วง ผลจากการวิจัยพบว่าทำให้ผมหงอกก่อนวัย ถ้าได้รับวิตามินบี 2 เพียงพอ (สำหรับผู้ใหญ่ 1.2-1.7 มิลลิกรัม) จะทำให้ผมหงอกกลับเป็นเป็นปกติได้

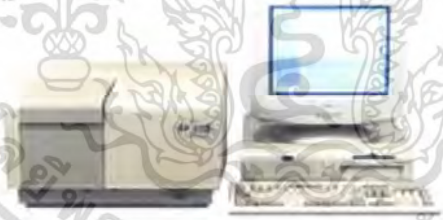
2.1.5 ผลของการได้รับวิตามินบี 2 มากเกินไป

โดยทั่วไปแล้วการได้รับวิตามินบี 2 ในปริมาณที่สูงกว่าค่า RDA มักไม่พบความเป็นพิษ อย่างไรก็ตามอาจมีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้จากการได้รับวิตามินบี 2 ในปริมาณที่สูงมากๆได้แก่ โรคหิด หมดสติ รู้สึกแสบร้อน และปัสสาวะมีสีเหลือง

2.1.6 ตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 2

1. ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต
2. อาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ

2.2 ฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปี



รูปที่ 2.1 เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์

ฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีจะใช้โฟตอนพลังงานสูงไปกระตุ้นตัวอย่างซึ่งจะปล่อยพลังงานต่ำสุดออกมาและตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์โดยใช้ลำแสง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแสงอัลตราไวโอเลตโดยจะกระตุ้นอิเล็กตรอนในโมเลกุลของสารประกอบทำให้เกิดการปลดปล่อยแสงที่ระดับพลังงานต่ำโดยจะกระตุ้นครั้งแรกโดยการดูดกลืนโฟตอนของแสงที่ ground electronic state ของตัวมันเองไปสู่ excited electronic state และเกิดการชนกันกับโมเลกุลอื่นเป็นเหตุให้โมเลกุลที่ถูกกระตุ้นจะสูญเสียพลังงานจนอยู่ในสภาวะการสั่นสะเทือนต่ำที่สุดของ excited electronic state ดังนั้นโมเลกุลจึงตกมาอยู่ในระดับการสั่นสะเทือนของ ground electronic state อีกครั้ง ซึ่งจะอยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

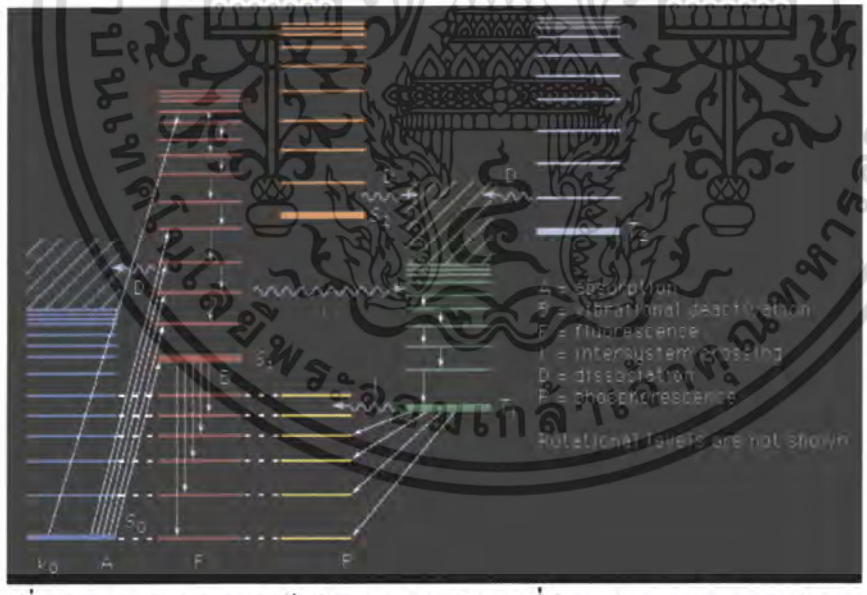
ระดับการสั่นสะเทือนต่างๆกันจึงเกิดความแตกต่างของพลังงานขึ้นเป็นความถี่ โดยจะทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของความถี่ของแสงที่ถูกปล่อยออกมาโดยจะสัมพันธ์กับค่าความเข้มแสง

เมื่อโมเลกุลดูดกลืนแสง ยูวี หรือ วิสิเบิล จะถูกกระตุ้นให้ขึ้นไปอยู่ใน excited state เมื่อโมเลกุลตกกลับสู่ ground state จะคายพลังงานส่วนเกินออกมาเรียกว่า Luminiscence ถ้าโมเลกุลถูกกระตุ้นด้วยแสง พลังงานที่คายออกมาเรียกว่า Photoluminiscence ถ้าโมเลกุลถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคพลังงานสูง พลังงานที่คายออกมาเรียกว่า Radioluminescence ถ้าถูกกระตุ้นด้วยปฏิกิริยาเคมี พลังงานที่คายออกมาเรียกว่า Chemiluminescence ซึ่ง Luminiscence แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

1. Fluorescence มี life time 10^{-8} – 10^{-5} วินาทีเกิดจากโมเลกุลที่อยู่ใน electronic state ตกกลับสู่ ground electronic state แล้วคายแสง

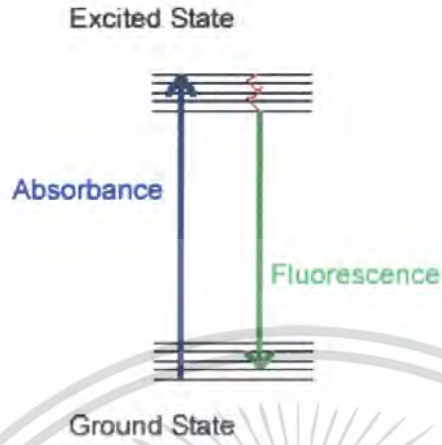
2. Phosphorescence มี life time 10^{-4} - 20 วินาที เกิดจากโมเลกุลเคลื่อนจาก single first excited state ไปยัง metastable triple state แล้วคายแสงออกมา

ส่วนใหญ่โมเลกุลที่ดูดกลืนแสง UV หรือ Vis จะสูญเสียพลังงานส่วนเกินในรูปของความร้อน มีโมเลกุลบางชนิดเท่านั้นที่ให้ Fluorescence ส่วนโมเลกุลที่ให้ Phosphorescence จะมีจำนวนน้อย



รูปที่ 2.2 แสดงการถูกกระตุ้นโดยแหล่งพลังงานที่ต่างๆกัน และจะคายพลังงานที่แตกต่างกันตามแหล่งพลังงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แสดงการถูกกระตุ้นให้ขึ้นไปอยู่ใน excited state และตกกลับสู่ ground state

โดยที่สภาวะพื้น โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเป็นจำนวนคู่จะจัดเรียงใน โมเลกุล ออร์บิทัลเป็นคู่ และมีสปินสวนทางกันจาก

$$M = 2S + 1$$

เมื่อ M = ค่าทวีคูณ

S = เลขสปิน ควันตัม

ดังนั้น $M = 2[(+1/2)+(-1/2)]+ 1 = 1$ เรียกว่า singlet state

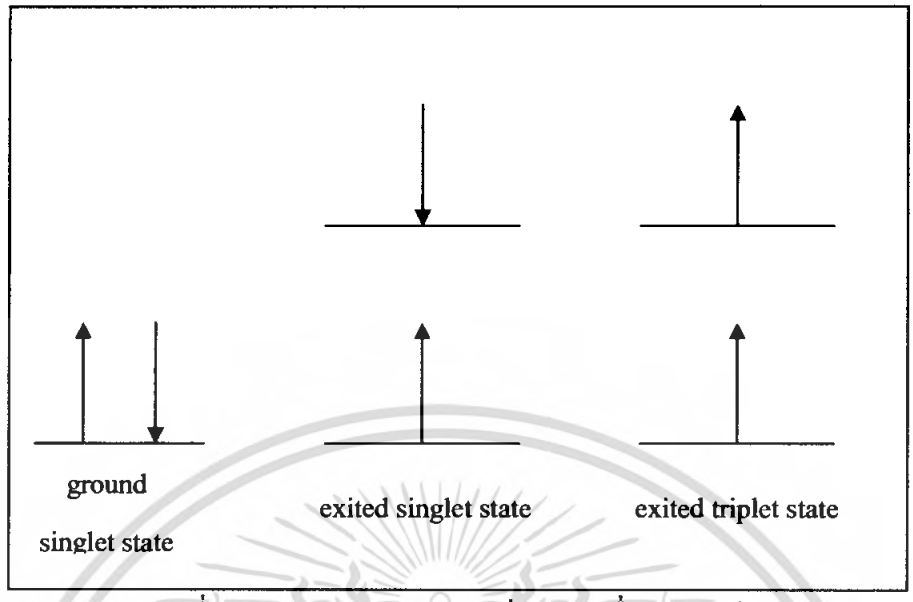
ถ้าอยู่ใน สภาวะพื้น เรียกว่า ground singlet state (S_0)

ถ้าอยู่ที่ สภาวะกระตุ้น เรียกว่า exited singlet state (S_1, S_2,...)

แต่ถ้าการสปินของอิเล็กตรอนเมื่อถูกกระตุ้นเป็นทางเดียวกันจะได้ว่า $M = 2 (½ + ½)+ 1 =3$

เรียกว่า Triplet state (T_1 = excited triplet state)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงการสปินของอิเล็กตรอนเมื่อถูกกระตุ้น

โดยที่โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเป็นจำนวนคู่จะไม่มี ground triplet state เพราะว่าอิเล็กตรอนเข้าคู่กันหมด ส่วนโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเป็นเลขคี่จะอยู่ใน double state

<u>กระบวนการกระตุ้น</u>

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

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

<u>กระบวนการลดการกระตุ้น</u>

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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เกิด radiationless deactivation โดยสูญเสีย electronic energy เมื่อชนกับโมเลกุลอื่น และสูญเสียพลังงานไปในรูปความร้อน
- คาย Fluorescence (ในช่วงยูวี หรือ วิสิเบิล)
- เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยัง exited triplet state แล้วกลับสู่สภาวะพื้นพร้อมกับให้ 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

โมเลกุลที่มีหมู่ฟังก์ชันวงแหวนเบนซิน และกลุ่มฟังก์ชันอะโรมาติก ที่มีระดับพลังงานต่ำจะให้ฟลูออเรสเซนส์ดี ส่วน aliphatic และ alicyclic carbonyl หรือ มีพันธะคู่ที่สามารถเกิดเรโซแนนซ์ได้จะให้ฟลูออเรสเซนต์ได้แต่ไม่ดีเท่ากับโครงสร้างอะโรมาติก แต่สารที่มีโครงสร้างแบบสารประกอบเฮทเทอโรไซคลิกจะไม่ให้ฟลูออเรสเซนส์

3. อุณหภูมิ และผลจากตัวทำละลาย : ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นฟลูออเรสเซนส์จะน้อย เนื่องจากโมเลกุลมีโอกาสชนกันมาก ถ้าตัวทำละลายมีความหนืดน้อย และมีขั้วทำให้ค่าฟลูออเรสเซนต์ลดลง

4. ผลจากค่าpH : หากเป็นสารละลายกรดจะไม่สามารถตรวจวัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลจากความเข้มข้น : ความเข้มของฟลูออเรสเซนต์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร

$$F = k\phi_f P_0 (2.303\ \varepsilon bc)$$

$$P = k\phi_f P_0 (2.303\ \varepsilon bc)$$

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. Exitation spectrum

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

b. Emission spectrum

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

<u>อุปกรณ์ที่ใช้บรรจุสาร</u>

เซลล์ทำจากแก้ว เป็นทรงจัตุรัส หรือทรงกระบอกต้องใสทั้ง 4 ด้าน การออกแบบเซลล์ต้องไม่ให้เกิด Scattered radiation ไปตกกระทบเครื่องวัดสัญญาณ

<u>เครื่องตรวจวัดสัญญาณ</u>

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Aranda, Mario and Morlock, Gertrud การพัฒนาวิธีการหาปริมาณไรโบฟลาวิน ไพริดอกซิน นิโคตินามีด คาเฟอีน และทอรีนในเครื่องดื่มชูกำลัง เพื่อให้ได้ข้อมูลในเวลาเดียวกันโดยใช้เครื่องตรวจวัดหลายชนิด (multipledetection) ทำการเตรียมตัวอย่างเครื่องดื่มชูกำลังจำนวน 10 ตัวอย่างและตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีคาเฟอีนจำนวน 6 ตัวอย่างด้วยการไล่ฟองอากาศ (degassing) ในอ่างน้ำคลื่นความถี่สูง (ultrasonicbath) เป็นเวลา 20 นาที ดำเนินการตรวจวัดความยาวคลื่นจำนวนมากอย่างละเอียดหลังจากทำการแยกโครมาโทกราฟี ด้วยเครื่องตรวจวัด (1) เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV-absorbancemeasurement) ที่ 261 nm สำหรับนิโคตินามีดและ 275 nm สำหรับคาเฟอีน (2) การวัดความวาวแสง (fluorescence measurement) ที่ 366/>400 และ 313/>340 nm สำหรับไรโบฟลาวิน และไพริดอกซิน 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% สำหรับนิโคตินามีด 2.5 และ 4.4% สำหรับคาเฟอีน 2.1 และ 2.9% สำหรับทอรีน 0.5 และ 4.0% สำหรับไพริดอกซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน การพิสูจน์ยืนยันมวลโดยใช้ singlequadrupole MS ในการตรวจอย่างละเอียดในช่วง positive electrospray ionization (ESI) สำหรับสารทั้งหมด ยกเว้นทอรีน (negative mode) วิธีนี้ได้เสนอเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับใช้วิเคราะห์ในงานประจำซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย น่าเชื่อถือและสามารถทำได้ในเวลาเดียวกัน

บุญสม เหลี่ยวเรืองรัตน์, สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์, ธีรพันธ์ มาจันทร์ และ เฉลิมพร ทองพูน ได้วิเคราะห์หาปริมาณไรโบฟลาวินในพืชสมุนไพรไทย 18 ชนิด (มะแว้งต้น ใบคัดเค้า เหงือกปลาหมอ ทองพันชั่ง หญ้าหนวดแมว และ พญาไร้ใบ) โดยวิธีโพลาโรกราฟี ชั่งพืชแต่ละชนิด 10 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือดจำนวน 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที นำสารสกัดจากพืชสมุนไพรจำนวน 10 มิลลิลิตร ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณและได้ใช้วิธีแสตนดาร์ด แอดดิชัน แล้วบันทึกโพลาโรแกรมจาก -300 มิลลิโวลต์ ถึง -700 มิลลิโวลต์ โดยวัดเทียบกับ Ag/AgCl reference electrode วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย มีความแม่นยำดี ได้ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.80-99.69 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์เท่ากับ 1.56-1.87 เรียงตามลำดับ

กิติพงศ์ ศิริสุทธานันท์ และ พิไล กวิศราศัยการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้าซึ่งมีรำข้าวสาลีเป็นสื่อด้วยเครื่อง HPLC โดยการใช้คอลัมน์ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spherisorb Octylsilane mobile phase เป็น Methanol : น้ำขจัดไอออน (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 % โดยมีความเที่ยงและความแม่นในส่วนของ System suitability ได้ค่าจำนวนเพลทตามทฤษฎีเท่ากับ 2,077 ความสมมาตรของพีค ที่ความสูง 5% เท่ากับ 1.12 ค่าปัจจัยความจุเท่ากับ 6.10 และค่าการแยกของวิตามินบี 2 กับวิตามินบี 1 เท่ากับ 2.70 สามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์วิตามินบี 2 ในสารผสมล่วงหน้าซึ่งมีรำข้าวสาลีเป็นสื่อได้

สมศักดิ์ ศิริไชย ได้มีการศึกษาการวิเคราะห์ไทเอมีน (บี 1) และไรโบฟลาวิน (บี 2) ในวิตามินบีรวมโดยอาศัยแคปปิลารี อิเล็กโทรโฟรีซีสชิพ ในการตรวจวัดวิตามินทั้งสองพร้อมกันภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันต้องใช้บอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.2 ภายใต้สภาวะนี้การวิเคราะห์สามารถทำได้ภายในเวลา 10 วินาที ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของไทเอมีนและไรโบฟลาวินเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ วิธีนี้ได้ประยุกต์ใช้การวิเคราะห์วิตามินในวิตามินบีรวม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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. ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบมี 5 ตัวอย่างดังนี้

- ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ A (ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต)
- ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ B (ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต)
- ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ C (อาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ)
- ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ D (อาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ)
- ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ E (อาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารละลาย

3.2.1.1 สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์

ปิเปตสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 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 บันทึกน้ำหนักละเอียดใส่บีกเกอร์ละลายด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ แล้วนำไปถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.1.3 สารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 เข้มข้น 1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 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

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

3.2.1.5 สารละลายตัวอย่าง

- <u>สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตมี 2 ตัวอย่างคือ A และ B</u>

1. ชั่งเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่งจำนวน 1.0000 กรัม บันทึกน้ำหนักละเอียดใส่บีกเกอร์ละลายด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์
2. กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2 ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3. ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

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

- <u>สารละลายตัวอย่างอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบมี 3 ตัวอย่างคือ C, D และ E</u>

1. ชั่งอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบที่บดละเอียดแล้วด้วยเครื่องชั่งละเอียด 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 สภาวะของเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์

ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น	: 326.0 นาโนเมตร
ความยาวคลื่นที่ใช้ปลดปล่อย	: 499.0 นาโนเมตร
การตอบสนอง	: 0.50 วินาที
ความกว้างพีคที่ใช้กระตุ้น	: 5 นาโนเมตร
ความกว้างพีคที่ใช้ปลดปล่อย	: 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

107883

3. ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4. นำสารละลายที่ได้ทั้ง 6 ขวดไปวัดค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์ โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์บริสุทธิ์เป็นสารละลายแบลงค์ ทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง

5. สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงและความเข้มข้นของวิตามินบี 2 โดยให้แกน y เป็นความเข้มแสงและแกน x เป็นปริมาตรของวิตามินบี 2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ppm

6. คำนวณความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในสารละลายตัวอย่างด้วยสมการดังต่อไปนี้

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

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

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

เมื่อ $\overline{C}_{\text{Spike sample}}$ คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยของวิตามินบี 2 ในสารละลาย Spiked sample

$\overline{C}_{\text{Sample}}$ คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยของสารละลายตัวอย่าง

C_{Standard} คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้เติม

* เกณฑ์การยอมรับของค่า %Recovery อยู่ในช่วง 90-110 %

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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) ด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์ โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์บริสุทธิ์เป็นสารละลายแบลงค์ 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. ปิเปตสารละลายตัวอย่างอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบที่เตรียมได้จากข้อ 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 ที่เตรียมได้ไปวัดค่าความเข้มแสงด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์ โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์บริสุทธิ์เป็นสารละลายแบลงค์ โดยแต่ละตัวอย่างทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าไปเทียบหาความเข้มข้นของวิตามินบี 2 จากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้างต้น จะได้ $\overline{C}_{\text{Spiked sample}}$

4. ปิเปตตัวอย่างผลิตภัณฑ์ E ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัดค่าความเข้มแสงและเทียบหาความเข้มข้นของวิตามินบี 2 จากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้างต้น จะได้ $\overline{C}_{\text{Sample}}$

5. คำนวณร้อยละของการคืนกลับได้ (%Recovery) จากสมการข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.2 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์

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

$$\overline{X} = \frac{\Sigma x_i}{n}$$

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

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

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, 8.0และ 10.0 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นทำการวัดซ้ำ 3 ซ้ำโดยเรียงลำดับความเข้มข้น นำค่าความเข้มแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ แล้วนำมาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่เตรียมได้ และนำค่าจุดตัดแกนตั้งและค่าความชันมาคำนวณค่า LOD และ LOQ จากสมการ

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

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

โดย $S_{x/y}$ คือ จุดตัดแกน y ของกราฟ

Slope คือ ความชันของกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.4 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

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

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

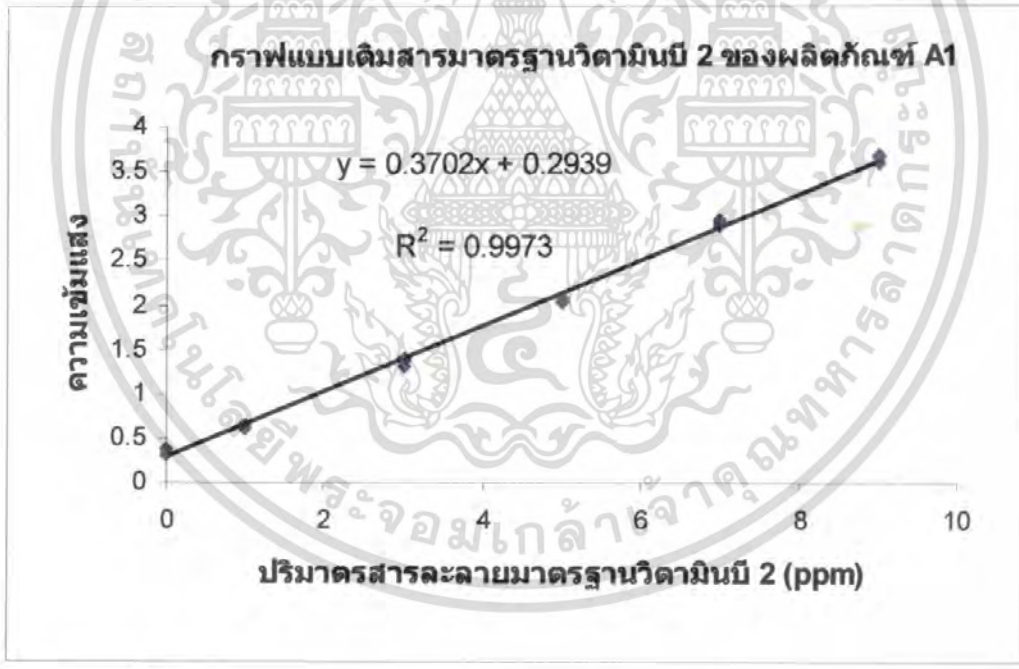
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

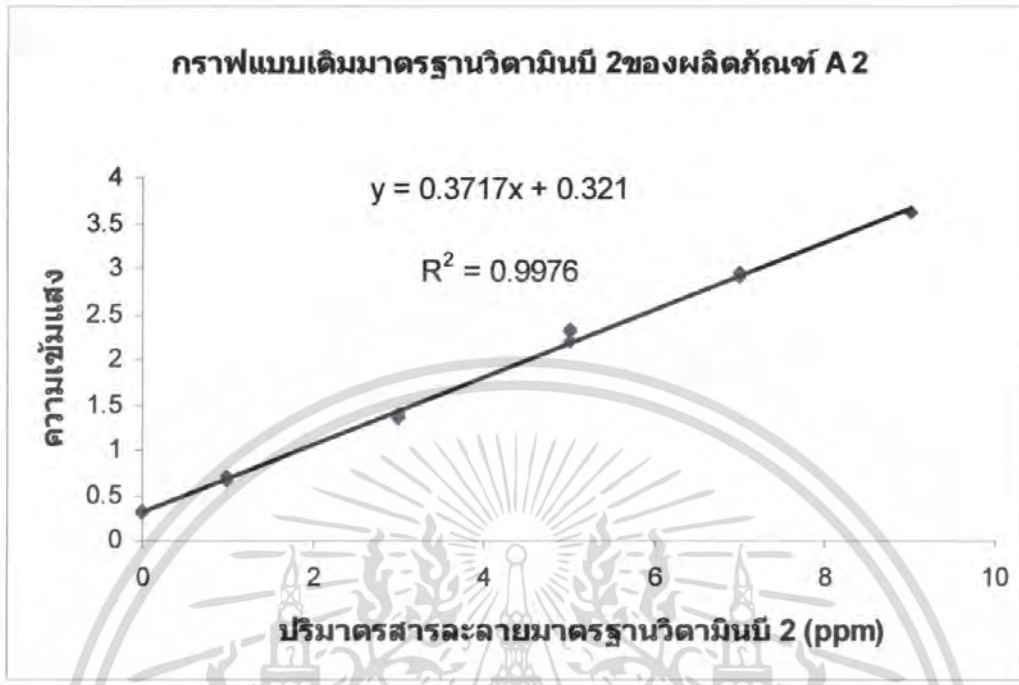
4.1 กราฟแบบเติมสารมาตรฐานวิตามินบี 2

กราฟแบบเติมมาตรฐานวิตามินบี 2 เตรียมได้จากการนำสารละลายมาตรฐานวิตามิน 2 ที่ความเข้มข้น 0.1 ppm ในปริมาตรต่างๆกัน (0.0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 และ 9.0 มิลลิลิตร) เติมลงในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มแสง และนำค่าความเข้มแสงที่ได้มาพลอตกับปริมาตรสารละลายมาตรฐานวิตาบินบี 2 เข้มข้น 0.1 ppm ที่เติมลงในตัวอย่างจะได้กราฟแบบเติมสารมาตรฐานวิตามินบี 2 จำนวน 15 กราฟ ดังต่อไปนี้ และสามารถคำนวณความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดได้ดังแสดงในภาคผนวก ก.1.1

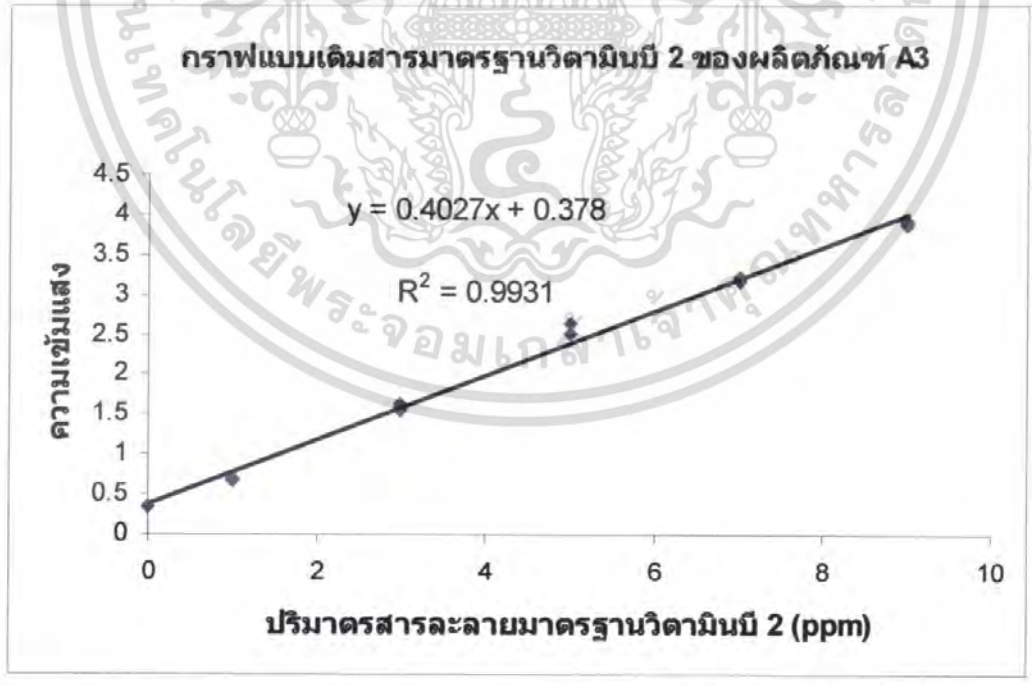


รูปที่ 4.1 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

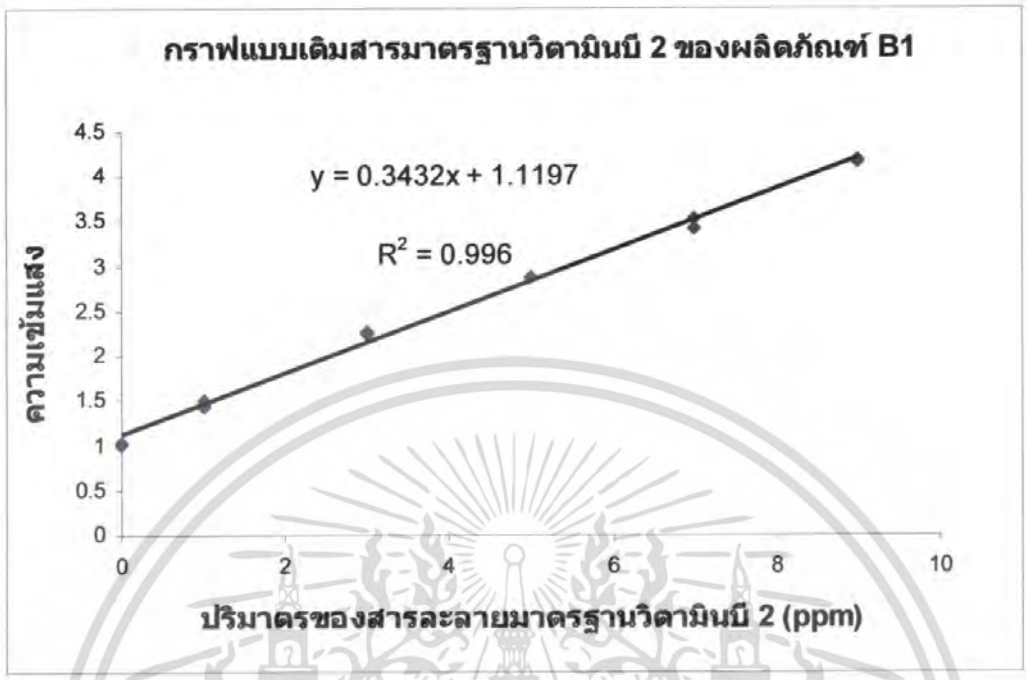


รูปที่ 4.2 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A2

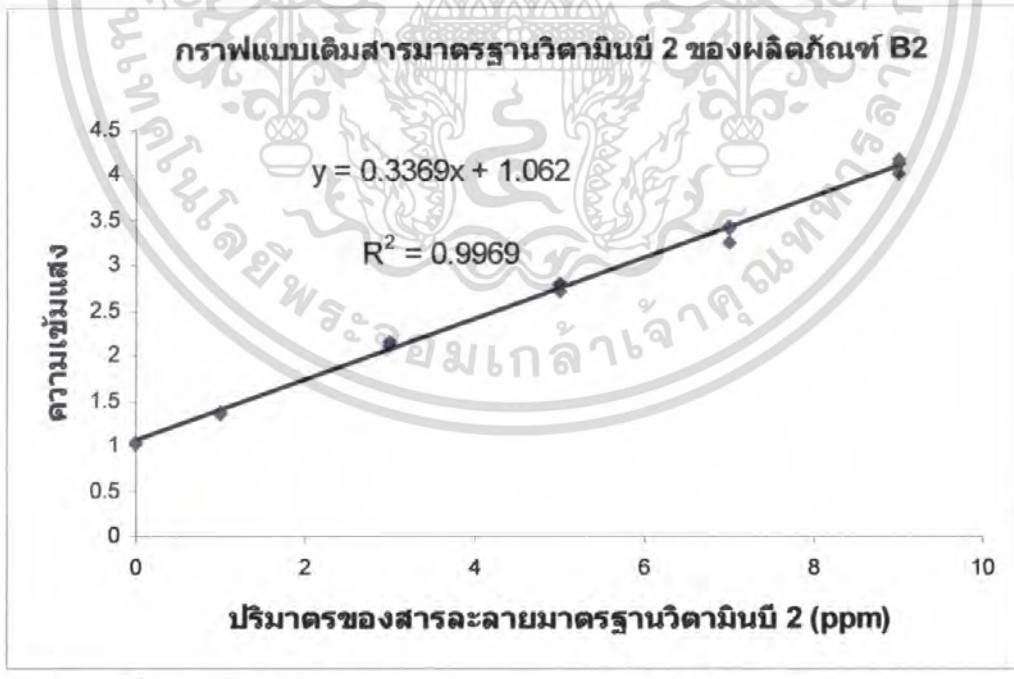


รูปที่ 4.3 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ A3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

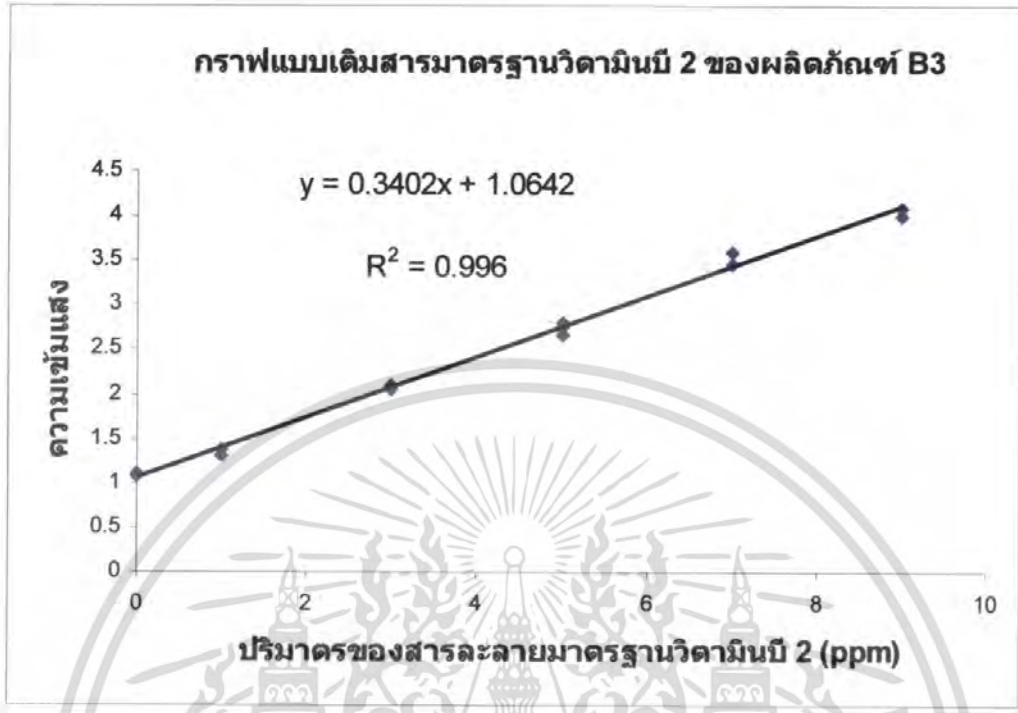


รูปที่ 4.4 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B1

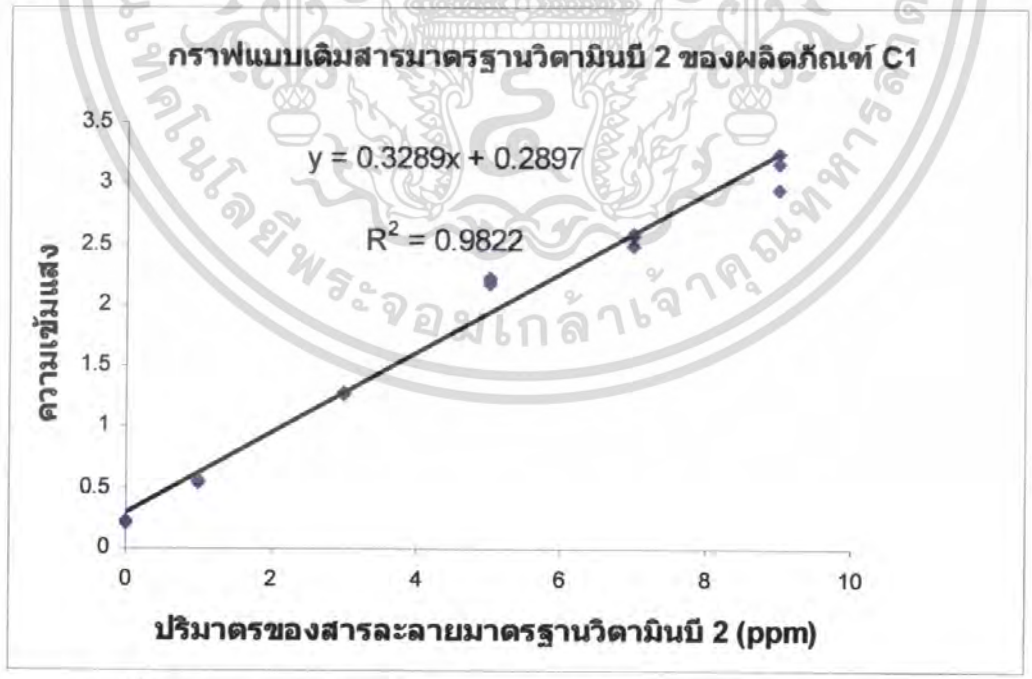


รูปที่ 4.5 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

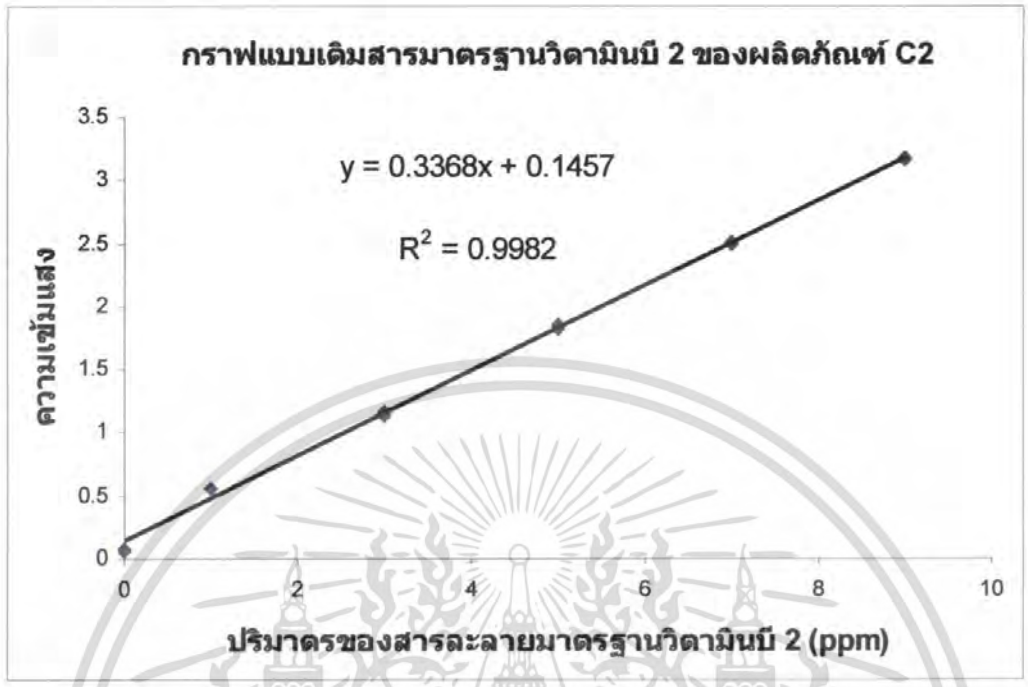


รูปที่ 4.6 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ B3

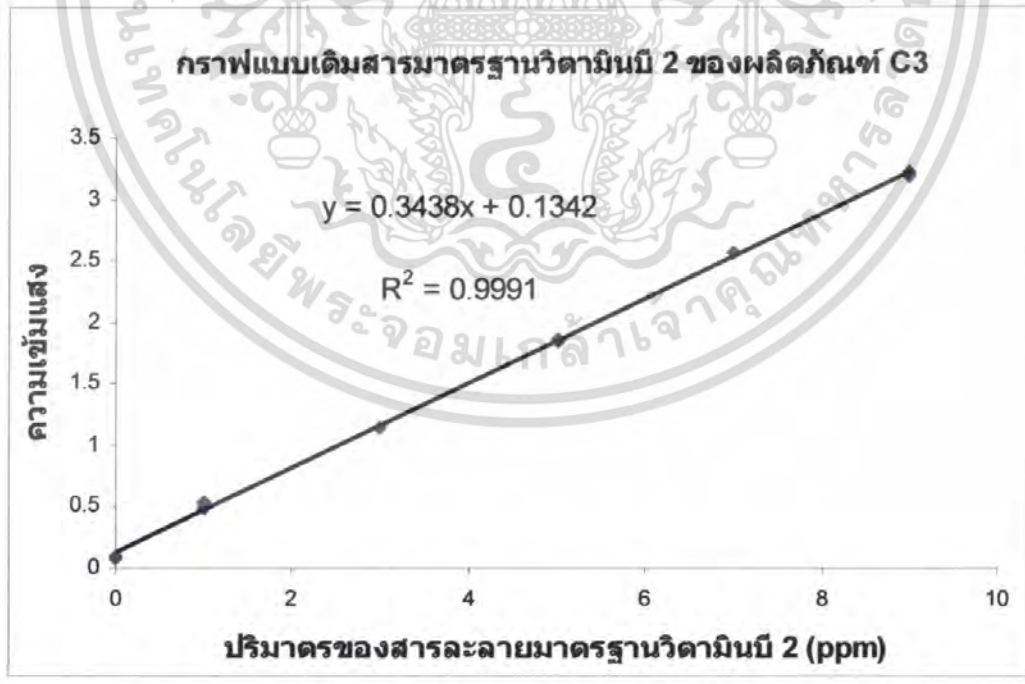


รูปที่ 4.7 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

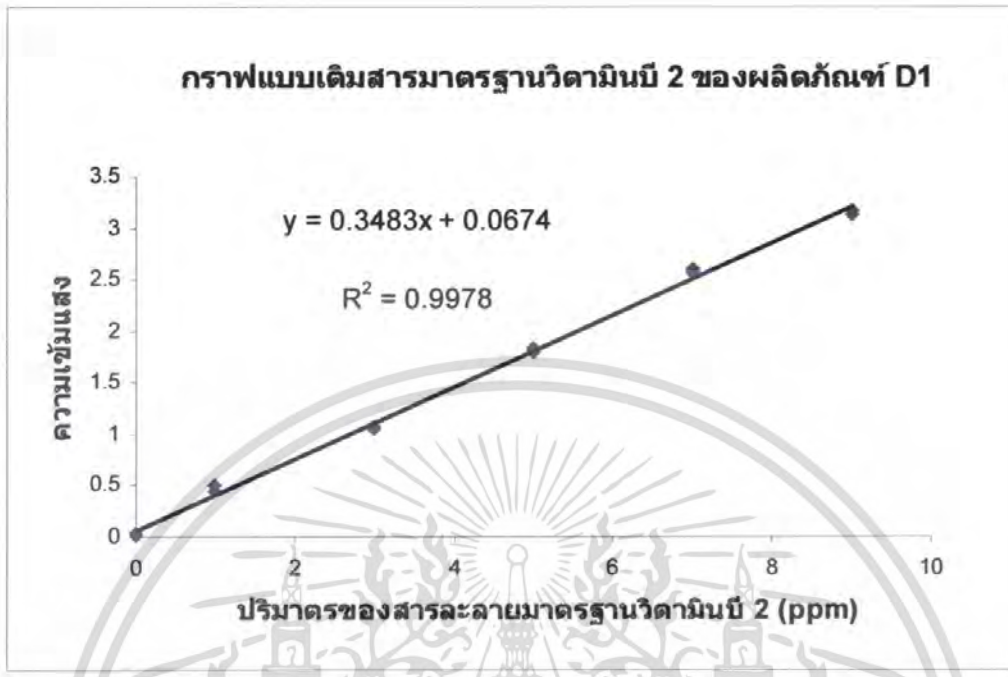


รูปที่ 4.8 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C2

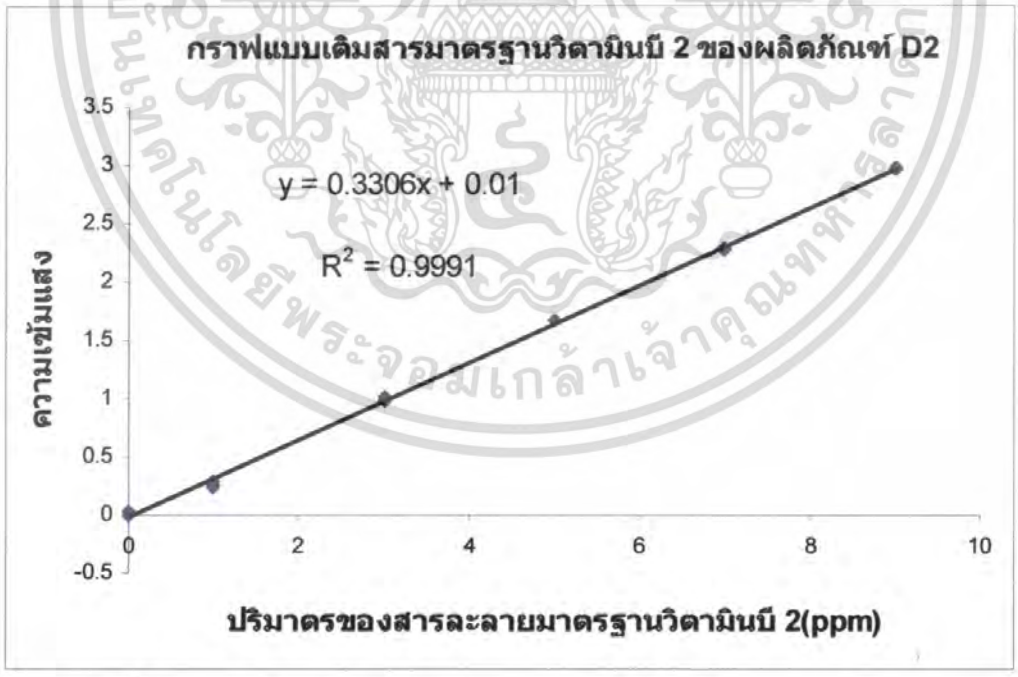


รูปที่ 4.9 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ C3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

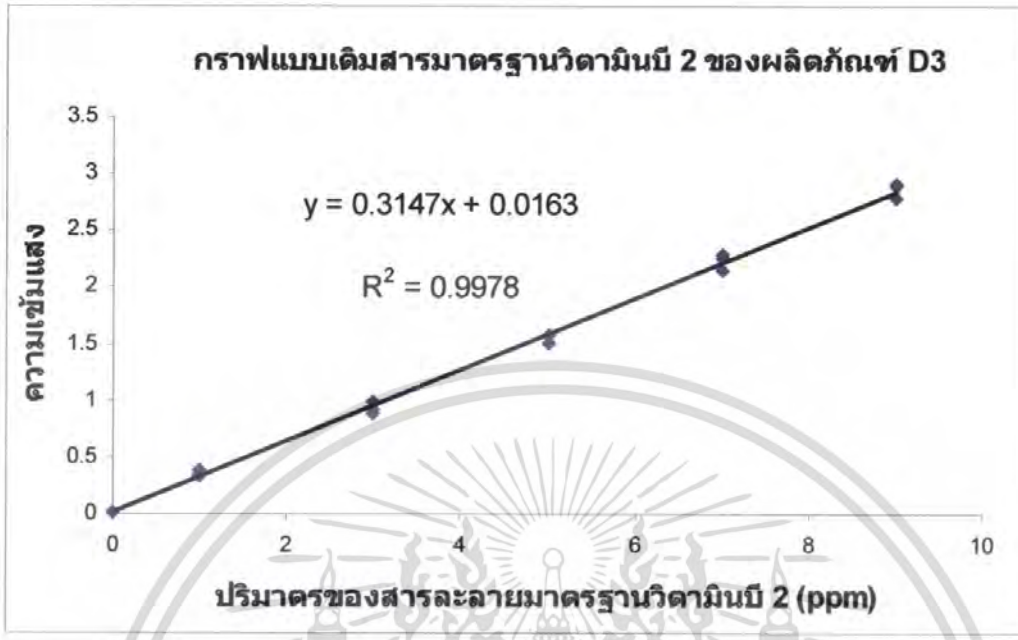


รูปที่ 4.10 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D1

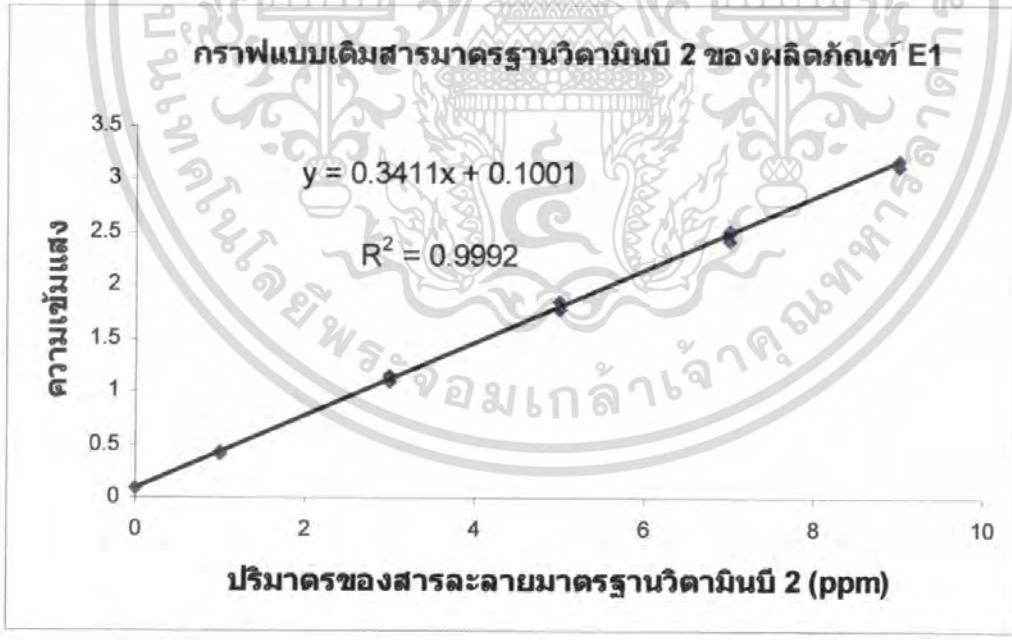


รูปที่ 4.11 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

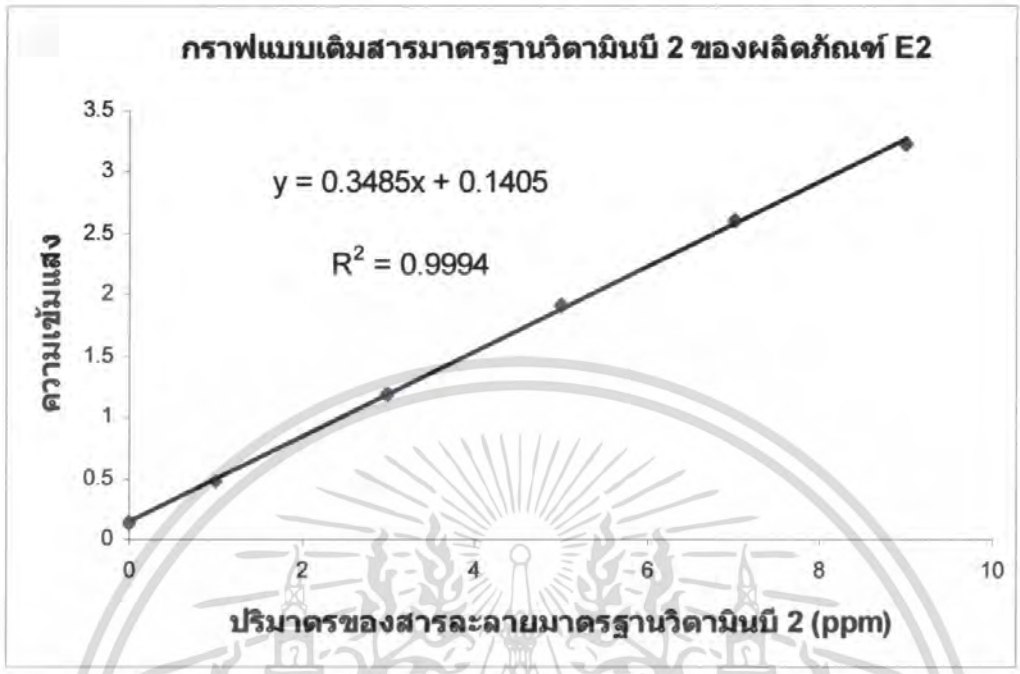


รูปที่ 4.12 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ D3

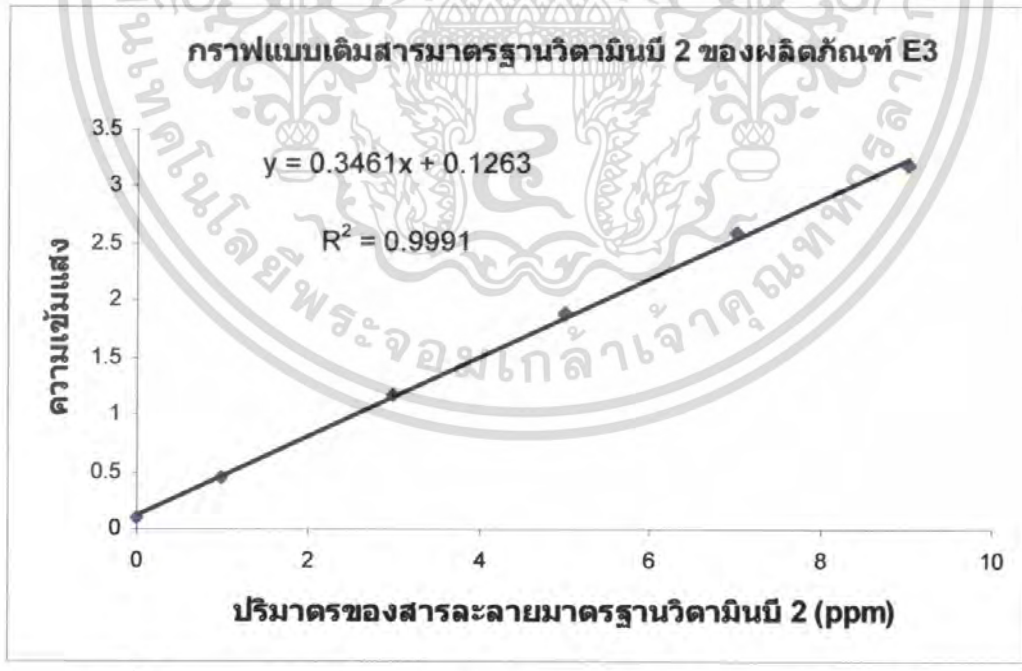


รูปที่ 4.13 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E2



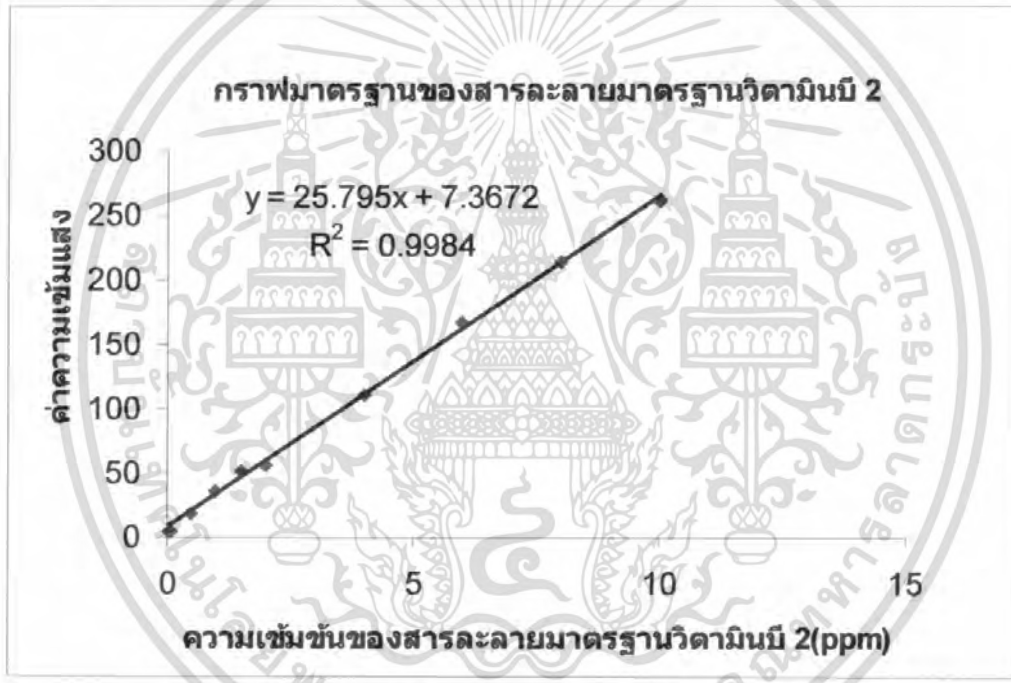
รูปที่ 4.15 กราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ของผลิตภัณฑ์ E3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การประเมินผลความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Validation of analytical method) โดยใช้หลักทางสถิติประเมินได้ผลดังนี้

4.2.1 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีศึกษาได้โดยการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 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

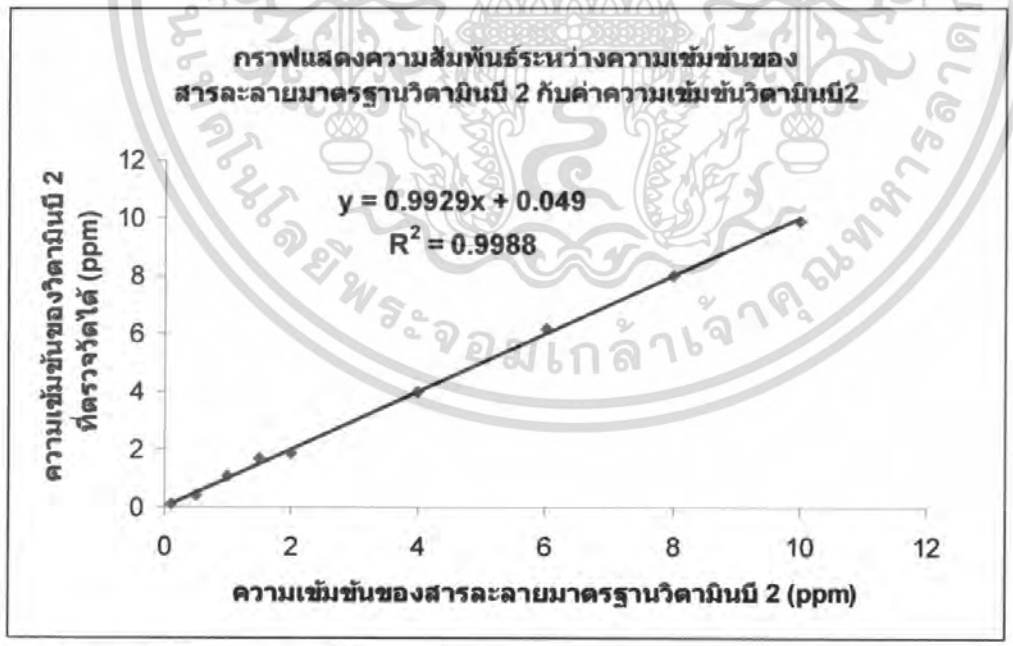
ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีศึกษาได้โดยการนำสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 2.0 ppm มาทำการตรวจวัดซ้ำ 7 ซ้ำ แล้วนำผลมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean; $\overline{X}$) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) และร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ 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 ความเข้มข้นต่างๆในช่วง 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 กับค่าความเข้มข้นวิตามินบี 2 ที่ตรวจวัดได้ (Detector response)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาการตรวจวัดหาปริมาณวิตามินบี 2 ใน ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณวิตามินบี 2 ที่ใช้ในการบ่งบอกคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบประเภทต่างๆตามท้องตลาดที่มีการโฆษณาสินค้าในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังต้องการตรวจสอบประสิทธิภาพ และความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีแบบเติมสารมาตรฐาน ว่าเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยง และความแม่นยำในการให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ และยอมรับได้หรือไม่ ซึ่งสามารถสรุปผลการวิเคราะห์ได้ดังนี้

สภาวะสำหรับเครื่องที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ ตั้งความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้นเท่ากับ 326.0 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่ใช้ปลดปล่อยคือ 499.0 นาโนเมตร ระยะเวลาในการตอบสนองคือ 0.50 วินาที ความกว้างพีคที่ใช้กระตุ้นคือ 5 นาโนเมตร ความกว้างพีคที่ใช้ปลดปล่อยคือ 5 นาโนเมตร

ตัวอย่างที่นำมาทำการวิเคราะห์เป็นการนำตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบมาละลายด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ แล้วทำการกรองสารละลายตัวอย่างให้ได้สารละลายใส ทำการเจือจางให้เหมาะสมและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 2 โดยวิธีเติมสารมาตรฐานวิตามินบี 2 เพื่อลดปัญหาเกี่ยวกับเมทริกซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง ทำโดยนำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรมาเติมสารละลายมาตรฐานและนำมาเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 ที่ความเข้มข้น 0.1 ppm ที่ปริมาตรต่างๆ หลังจากนั้นนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์ ซึ่งสามารถวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบตัวอย่างผลิตภัณฑ์ A, B, C, D และE เท่ากับ 0.0866, 0.3180, 0.0568, 0.0092 และ 0.0354 มิลลิกรัมต่อตัวอย่างหนึ่งกรัมตามลำดับ

จากผลการประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์พบว่า

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 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 ความแม่น ความเที่ยง และความสัมพันธ์เชิงเส้นของวิธีวิเคราะห์จัดว่าอยู่ในเกณฑ์ดี และยังสามารถตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ได้ในระดับต่ำ (ppm) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโคปีแบบเติมสารมาตรฐานที่มีความเหมาะสมในการหาปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างที่สามารถวาวแสงได้เป็นอย่างดี และยังเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วให้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือได้

ข้อเสนอแนะ

1. เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์จะใช้เซลล์เฉพาะในการตรวจวัดปริมาณสารคือ ควอทเซลล์ ที่ใสทั้ง4 ด้าน ไม่สามารถใช้เซลล์ชนิดอื่นได้
2. สารละลายที่เตรียมมาตรวจวัดจะต้องเป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอนเจือปนทำได้โดยการกรองสารละลายกับกระดาษกรองเบอร์ 2 เพราะจะทำให้ไม่สามารถตรวจวัดค่าได้หรือเกิดการผิดพลาดของค่าที่ตรวจวัด
3. ก่อนการตรวจวัดทุกครั้งจะต้องมีการวัดแบลงค์เพื่อเป็นการตรวจสอบเครื่องและความบริสุทธ์ของแบลงค์ที่ใช้
4. ก่อนการวัดสารตัวอย่างจะต้องมีการกลั้วล้างเซลล์ด้วยตัวทำละลายอะซิติก 0.02 โมลาร์ก่อนทุกครั้งที่จะทำการตรวจวัด
5. อุปกรณ์ที่ใช้ควรมีการกลั้วด้วยตัวทำละลายอะซิติก 0.02 โมลาร์ก่อนการใช้งานทุกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

คณิตา ตังคณานุรักษ์ เอกสารประกอบการเรียนการสอนวิชาปฏิบัติการวิเคราะห์สาร 2

สุวรรณ ไชยสิทธิ์ เอกสารประกอบการเรียนการสอนวิชาการประยุกต์ใช้เครื่องมือ 2

http://www.aseabiodiversity.info

http://www.sciso.or.th

http://www.sportronfamily.com

http://wwwdld.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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
แสดงผลการวิเคราะห์

ก.1 การตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

ก.1.1 ตารางแสดงผลค่าความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

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

ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 (mL)	ความเข้มแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X} \pm SD$
0	1.0268	1.0428	1.0964	1.0553 ± 0.0365
1	1.4714	1.3688	1.3825	1.4076 ± 0.0557
3	2.2598	2.1414	2.0834	2.1615 ± 0.0899
5	2.8785	2.7724	2.7485	2.7998 ± 0.0692
7	3.4902	3.3684	3.5459	34682 ± 0.0613
9	4.1722	4.1213	4.0635	4.119 ± 0.0544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 (mL)	ความเข้มแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X} \pm SD$
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

ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 (mL)	ความเข้มแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\overline{X} \pm SD$
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

ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 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

ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 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 อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.6 แสดงความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ	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 originaled sample กับ spiked sample และค่า%Recovery

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย</u> : ทำเช่นเดียวกับข้อ ก.1.3

<u>คำนวณหาค่าร้อยละของการกลับได้คืน (%Recovery)</u> ตัวอย่างที่ 1

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

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

$\%Recovery = 109.902$

* ตัวอย่างอื่นๆทำเช่นเดียวกัน

ก.1.3 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของการวิเคราะห์

ตารางที่ ก.8 แสดงค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์

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

<u>คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย</u>

จาก $\overline{x} = \frac{\sum x_i}{n}$

$\overline{x} = \frac{56.1561 + 56.1865 + 56.1923 + 56.1621 + 56.1747 + 56.1844 + 56.1654}{7}$

$\overline{x} = 56.1745$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</u>

จาก

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

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

SD = 0.0137

<u>คำนวณร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์</u>

จาก

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

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

%RSD = 0.0245

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ตารางที่ ก.9 แสดงผลการวัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพื่อหาค่า LOD และLOQ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 (ppm)	ความเข้มข้นที่วัดได้			ความเข้มข้นเฉลี่ย (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

<u>คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย</u> : ทำเช่นเดียวกับข้อ ก.1.3

<u>คำนวณLODและLOQ</u>

นำค่าเฉลี่ยมาสร้างกราฟดังรูปที่ 4.1 ที่มีสมการเส้นตรงเท่ากับ y = 0.9929x + 0.049

จาก $$LOD = \frac{3S_{x/y}}{slope}$$

$$LOD = \frac{3 \times 0.049}{0.9929}$$

$$LOD = 0.1481$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

$$LOQ = \frac{10 \times 0.049}{0.9929}$$

$$LOQ = 0.4935$$

ก.1.5 การศึกษาการตอบสนองความเป็นเส้นตรง(Linearity)

ตารางที่ ก.10 แสดงความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 2 (ppm)	ความเข้มแสงของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 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 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ

ตารางที่ ก.11 แสดงผลการตรวจวัดปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ

ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลตและอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ในสารละลายตัวอย่าง	ปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่าง 1 กรัม (มิลลิกรัม)	$\overline{X} \pm SD$
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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณวิตามินบี 2 ในตัวอย่าง 1 กรัม : ตัวอย่าง A

จากผลการตรวจวัดที่ได้จากสมการในกราฟแบบเติมสารละลายมาตรฐาน โดยชั่งตัวอย่างมา 1.0004 วัดครั้งที่ได้ 0.0794 ppm แสดงว่า

ในตัวอย่าง 1.0004 กรัม มีปริมาณวิตามินบี 2 0.0794

ในตัวอย่าง 1.0000 กรัม มีปริมาณวิตามินบี 2 $\frac{0.0794}{1.0004} \times 1 = 0.00794$ มิลลิลิตร

* ตัวอย่างอื่นๆทำเช่นเดียวกัน

ตารางที่ ก.12 ปริมาณของวิตามินบี 2 ที่หาได้จากการเตรียมตัวอย่าง 1 กรัม

ตัวอย่างเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ	$\overline{X} \pm SD$ (มิลลิกรัม/กรัม)
A	0.0866 ± 0.0073
B	0.3181 ± 0.0072
C	0.0568 ± 0.0272
D	0.0092 ± 0.0089
E	0.0354 ± 0.0056

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

เมื่อคำนวณปริมาณวิตามินบี 2 ในเครื่องดื่มสำเร็จรูปชนิดผงรสช็อคโกแลต และอาหารเช้าธัญพืชอบกรอบ 1 กรัมทั้งหมดแล้ว คำนวณค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดทั้ง 3 ครั้งจากการชั่งตัวอย่าง 1 ครั้ง นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวมของตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้