สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การศึกษาหาชนิดและปริมาณของวิตามินบีหกโดย HPLC

นายประพจน์ ศรีนุวัตติวงศ์

จุฬาลงกรณ์ พ.
จ 2977
2535
เลขที่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....
ล12547915

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Determination and separation of vitamin $B_6$ components by High Performance Liquid Chromatography

Mr.Prapoj Srinuwattiwong

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | **การหาชนิด และ ปริมาณของวิตามินบีหกโดย HPLC** |
| **โดย** | **นายประพจน์ ศรีนุวัตติวงศ์** |
| **ภาควิชา** | **ชีววิทยาประยุกต์** |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | **อ.อรไท สุขเจริญ** |

**ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต**

_____ **หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์**

**(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม)**

**คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ**

_____ **ประธานกรรมการ**

**(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม)**

_____ **กรรมการ**

**(รศ.ดร. ดุษฎี ธนะบริพัฒน์)**

_____ **กรรมการ**

**(อ.อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)**

**ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์**

**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า


| | | |
|---|---|---|
| บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย | | ก |
| บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ | | ค |
| กิตติกรรมประกาศ | | จ |
| สารบัญตาราง | | ฉ |
| สารบัญรูป | | ช |
| บทที่ 1 | บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 | ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง | |
| | ก. ความหมายของวิตามินบีหก | 3 |
| | ข. ประวัติความเป็นมา | 3 |
| | ค. วิธีการแยกวิตามินบีหก | 4 |
| | ง. คุณสมบัติของวิตามินบีหก | 6 |
| | จ. การสังเคราะห์วิตามินบีหก | 8 |
| | ฉ. ความเฉพาะเจาะจง | 12 |
| | ช. ปริมาณวิตามินบีหกในอาหารชนิดต่าง ๆ | 15 |
| | ซ. แหล่งของวิตามินบีหกในอาหาร | 17 |
| | ฌ. ความผิดปกติที่เกิดกับสัตว์ทดลองเมื่อขาดวิตามินบีหก | 25 |
| | ญ. ความเป็นพิษเนื่องจากการได้รับวิตามินบีหกมากเกินไป | 27 |
| | ฏ. การวิเคราะห์วิตามินบีหก | 28 |
| | ฏ. การนำไปใช้ | 30 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี 31

3.2 อุปกรณ์ 32

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การศึกษาสัดส่วนของเมทานอลที่ใช้เป็น
สารละลายในระบบตัวพา 33

3.3.2 การศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพา
ที่เหมาะสม 34

3.3.3 การทำกราฟมาตราฐาน 35

3.3.4 การศึกษาหาวิธีการสกัดวิตามินบีหกที่เหมาะสม 36

3.3.5 การศึกษาปริมาณและชนิดของวิตามินบีหก 38

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาสัดส่วนของเมทานอลที่ใช้เป็น
สารละลายในระบบตัวพา 39

4.2 ผลการศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพา
ที่เหมาะสม 42

4.3 ผลของกราฟมาตราฐาน 45

4.4 ผลของการศึกษาหาวิธีการสกัดวิตามินบีหกที่เหมาะสม 49

4.5 ผลของการศึกษาปริมาณ และชนิดของวิตามินบีหก
ในตัวอย่างอาหารชนิดต่าง ๆ 50

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 51

ภาคผนวก 52

เอกสารอ้างอิง 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| หัวข้อโครงงานพิเศษ | การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวิตามินบีหกโดย HPLC |
| นักศึกษา | นายประพจน์ ศรีนุวัตติวงศ์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | อาจารย์อรไท สุขเจริญ |
| ภาควิชา | ชีววิทยาประยุกต์ |
| ปีการศึกษา | 2535 |

## บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวิตามินบีหก โดยใช้วิธีวิเคราะห์โดย HPLC(High Performance Liquid Chromatography) ซึ่งมีการทดลองหาสภาวะ (condition) เหมาะสมต่อการทดลอง โดยเริ่มจากการหาสารละลายระบบตัวพา (Solvent Mobile Phase) ที่เหมาะสม มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเมทานอลในสารละลายระบบตัวพาซึ่งเป็นสารผสมของโซเดียมเปอร์คลอเรต 0.12 M และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 M ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เมื่อไม่มีการใช้เมทานอลเป็นส่วนผสมในสารละลายระบบตัวพาเลย จะให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด หลังจากนั้นศึกษาถึงอัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสมของการทดลองในเครื่อง HPLC ซึ่งทำการเปลี่ยนแปลงของอัตราการไหลดังนี้ 0.4 , 0.6 , 0.8 และ 1.0 มล/นาทีจะพบว่าอัตราการไหลของสารละลายระบบตัวพาที่เหมาะสม คือ 0.8 มล./นาที และจากผลการทดลอง ทำให้สามารถทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณวิตามินบีหก โดยใช้วิธีวิเคราะห์โดย HPLC ซึ่งสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์วิตามินบีหกคือที่ความยาวคลื่นของแสงอัลตร้าไวโอเล็ทเท่ากับ 210 นาโนเมตร , ค่า Sensitivity เท่ากับ 0.08 , อัตราการไหลของสารละลายระบบตัวพาคือ 0.8 มล/นาที สารละลายระบบตัวพาที่ใช้คือ สารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 M และ โซเดียมเปอร์คลอเรต 0.12 M ซึ่งค่า retention time ของอนุพันธ์ของวิตามินบีหกที่ได้จะมีค่าจากมากไปหาน้อย คือ ไพริดอกซิน , ไพริดอกซาล , ไพริดอกซาลฟอสเฟส ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพริดอกซามีน , ไพริดอกซามีนฟอสเฟส และนอกจากนี้ยังได้ศึกษาค่ากราฟมาตราฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (area)กับปริมาณของอนุพันธ์มาตราฐานของวิตามินบีหก เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ และชนิดของอนุพันธ์วิตามินบีหกที่เป็นส่วนประกอบของสารตัวอย่าง

โดยมากแล้ว มักจะไม่ค่อยพบสารไพริดอกซาลฟอสเฟส เนื่องจากการที่ไพริดอกซาลฟอสเฟตจะสลายตัวได้เร็วมากเมื่อถูกแสง ซึ่งมักจะเกิดขึ้นขณะทำการสกัดวิตามินบีหกจากสารตัวอย่าง ดังนั้นในกระบวนการทั้งหมดของวิธีการวิเคราะห์นี้จะเน้นมากโดยเฉพาะเรื่องแสงมากกว่าเรื่องอุณหภูมิ หรือความเป็นกรด-ด่าง นอกจากนี้แล้วการสกัดที่เหมาะสมจะใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ทำการแยกวิตามินบีหกออกจากสารตัวอย่างเป็นเวลา 10 นาที ที่อัตราการเหวี่ยงที่ 1,000 * g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Special Project Title** | **Determination and seperation of vitamin $B_6$ components by high performance liquid chromatography (HPLC)** |
| **Name** | **Mr.Prapoj Srinuwattiwong** |
| **Special Project Advisor** | **Miss Oratai Sukcharoen** |
| **Department** | Applied Biology |
| **Acedemic Year** | 1992 |


## ABSTRACT

This reseach involed the studies on the optimum conditions for determining and seperating vitamin $B_6$ components by HPLC. The specefic mobile phase solvent system was first to be found by varying the concentration of methanol in the mixed buffer mobile solvent of sodium perchlorate ( $NaClO_4$ ) 0.12 M. and potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ ) 0.05 M. The result showed that the best mobile phase solvent system was without methanol. The flow rate of the buffer mobile solution at 0.4 , 0.6 , 0.8 and 1.0 ml/min. was examined respectively. It was found that at 0.8 ml/min. gave the best resulting flow rate and the best condition for analysing the vitamers by HPLC was at 280 nm. and sensitivity was at 0.08 . The suitable mobile solvent for this condition was the mixed buffer of $KH_2PO_4$ 0.05 M. and $NaClO_4$ 0.12 M. with its flow rate at 0.08 ml/min. The retention time value of vitamin $B_6$ derivatives was as followed; pyridoxine , pyridoxal , pyridoxal-5-phosphate , pyridoxamine , pyridoxamine-5-phosphate respectively.


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

In addition, the standard curve between the area of the chromatogram and of each vitamin $B_6$ derivatives in the samples were determined. In general, the amount of pyridoxal-5-phosphate was rarely found because of rapid decomposition in the light during the extraction process. The analysis of vitamins had to be carried out in darkness and the preparation of the sample had to be done in an ice bath. The extraction for vitamin $B_6$ by the centrifugation at 1,000*g for 10 minutes showed to be the suitable procedure.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความร่วมมือ และช่วยเหลือของบุคคลต่อไปนี้

1. อ.อรไท สุขเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาผู้ซึ่งให้ความรู้และคำแนะนำ อันเป็นประโยชน์ตลอดจนช่วยดูแลเอาใจใส่ในการทำโครงงานพิเศษเรื่องนี้เป็นอย่างดี
2. ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ผู้ซึ่งให้ความสะดวกเรื่องสถานที่ที่ใช้ทำการทดลอง ตลอดจนเครื่องมือที่ใช้ทำการทดลองต่าง ๆ
3. รศ.ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมผู้ซึ่งให้ความคิด และแนะแนวการทำโครงงานพิเศษนี้ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขเอกสารให้
4. อ.อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษนี้ ซึ่งให้การเอาใจใส่เป็นอย่างดียิ่งด้านความคืบหน้าของโครงงานพิเศษฉบับนี้
5. เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความสะดวกในด้านต่าง ๆ
6. นายฆรงค์ชัย ประภากรวิริยะ , นางสาวกิตตินุช แน่นหนา ,นางสาววีรวรรณา ไชยรส นางสาววลีย์ จันทวิบูลย์ และน้อง ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลองตลอดจนให้กำลังใจ ทำให้โครงงานพิเศษสำเร็จได้ด้วยดี

โดยผู้จัดทำต้องขอขอบคุณท่านทั้งหลายมา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้จัดทำ

มีนาคม 2536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | แสดง activity ของรูปแบบวิตามินบีหกต่าง ๆ ในจุลินทรีย์ | 15 |
| 2.2 | แสดงปริมาณวิตามินบีหกที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อ | 16 |
| 2.3 | แสดงปริมาณวิตามินบีหกที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อปลา | 20 |
| 2.4 | แสดงปริมาณวิตามินบีหกที่เป็นองค์ประกอบของไข่ไก่ | 21 |
| 2.5 | แสดงปริมาณวิตามินบีหกที่ในเนื้อที่ผ่านกรรมวิธีการปรุง | 21 |
| 2.6 | แสดงปริมาณวิตามินบีหกในน้ำนมสด | 22 |
| 4.1 | แสดงการเปรียบเทียบเวลาของอนุพันธ์วิตามินบีหก เมื่อใช้สัดส่วนของเมทานอลในสารละลายตัวพาต่าง ๆ กัน | 40 |
| 4.2 | แสดงการเปรียบเทียบเวลาของอนุพันธ์วิตามินบีหก เมื่อใช้อัตราการไหลของระบบตัวพาที่ต่าง ๆ กัน | 43 |
| 4.3 | แสดงปริมาณพื้นที่ใต้กราฟ และปริมาณสารอนุพันธ์ของวิตามินบีหกชนิดต่าง ๆ กัน | 45 |
| 4.4 | แสดงการเปรียบเทียบวิธีการสกัดชนิดต่าง ๆ ของปริมาณ และชนิดของอนุพันธ์วิตามินบีหกชนิดต่าง ๆ โดยใช้นมผงเป็นสารตัวอย่าง | 49 |
| 4.5 | แสดงชนิด และปริมาณวิตามินบีหก ในตัวอย่างอาหารชนิดต่าง ๆ | 50 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | การ condensation ของ ethoxyacetylacetone กับ cyanoacetamide | 8 |
| 2.2 | การสังเคราะห์วิตามินบีหกโดยวิธี Kuhn process | 9 |
| 2.3 | การสังเคราะห์วิตามินบีหกโดยวิธี Diel-Alder condensation | 10 |
| 2.4 | สูตรโครงสร้างของไพริดอกซามีน และไพริดอกซาล | 12 |
| 2.5 | การเกิด phosphorylation ของไพริดอกซาลโดยตรง | 14 |
| 4.1 | แสดงการเปรียบเทียบเวลาของอนุพันธ์วิตามินบีหก เมื่อใช้สัดส่วนของเมทานอลในสารละลายตัวพาต่าง ๆ กัน | 41 |
| 4.2 | แสดงการเปรียบเทียบเวลาของอนุพันธ์วิตามินบีหก เมื่อใช้สัดส่วนของอัตราการไหลระบบตัวพาที่ต่าง ๆ กัน | 44 |
| 4.3.1 | กราฟมาตราฐานระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟ และปริมาณไพริดอกซิน | 46 |
| 4.3.2 | กราฟมาตราฐานระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟ และปริมาณไพริดอกซาล | 47 |
| 4.3.3 | กราฟมาตราฐานระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟ และปริมาณไพริดอกซาลฟอสเฟต | 47 |
| 4.3.4 | กราฟมาตราฐานระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟ และปริมาณไพริดอกแซมมิน | 48 |
| 4.3.5 | กราฟมาตราฐานระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟ และปริมาณไพริดอกแซมมินฟอสเฟต | 48 |
| ข.1 | เครื่อง HPLC ที่ใช้ในการทดลอง | 53 |
| ข.2 | ชุดเครื่องกรองและชนิดของกระดาษกรอง | 54 |
| ข.3 | อ่าง ultrasonic cleaner | 55 |
| ข.4 | เครื่องวัดพีเอช (pH meter) | 56 |
| ข.5 | เครื่องระเหยแห้ง (evaporator) | 57 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

ปัจจุบันวิตามินเป็นสารชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อร่างกายมนุษย์ เพราะเป็นสารที่มีความสำคัญต่อ การดำรงชีพ การเจริญเติบโต และมีบทบาททางเมแทบอลิซึมของสารอาหารในร่างกาย ดังนั้นการศึกษาถึงความสำคัญขององค์ประกอบของวิตามินจึงเป็นเรื่องที่มีความจำเป็น อีกทั้งวิตามินยังมีหลายชนิดที่แตกต่างกันทางด้านส่วนประกอบทางเคมี ประโยชน์ในการศึกษา และวิธีการในการวัดหาค่าของวิตามินนั้นก็ มีหลายวิธีเช่นกันแล้วแต่จะเลือกใช้ เช่น Chromatography Bioassay เป็นต้น

วิตามินบีหก (Pyridoxine)เป็นวิตามินอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาในโครงงานพิเศษนี้ เนื่องจากวิตามินนี้มีความสำคัญต่อร่างกาย โดยจะมีบทบาทต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน และโปรตีนซึ่งวิตามินบีหกนี้สามารถพบได้ในผัก ผลไม้ ตับ อาหารบางชนิด หรือแม้กระทั่งเลือดด้วย

วิตามินบีหก เป็นวิตามินที่ละลายน้ำได้และเป็นวิตามินที่มีความสำคัญทางการแพทย์ โภชนาการของ มนุษย์ และสัตว์ เนื่องจากวิตามินนี้เป็นสารที่มีโครงสร้างที่เกิดขึ้นหรือเปลี่ยนแปลงในร่างกายได้หลายรูปเช่น Pyridoxine , Pyridoxamine , Pyridoxal , Pyridoxal-5-phosphate , Pyridoxamine-5-phosphate ( Morita & Mizuno, 1980) ซึ่ง Pyridoxal-5-phosphate จะเป็นวิตามินบีหกที่มีความสำคัญมาก เพราะเป็นโคเอนไซม์ที่สำคัญต่าง ๆ ในกระบวนการสลายกรดอะมิโนทั้งกระบวนการ transamination decarboxylation และ deamination นอกจากนี้ยังสามารถแยกชนิดของวิตามินบีหกได้ ดังนั้นการศึกษาถึงวิธีการวิเคราะห์ชนิด และปริมาณวิตามินบีหกโดยเครื่องไฮเปอร์ฟอร์เมนลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถแยก และวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีหกชนิดต่าง ๆ ทั้งในอาหาร และกระบวนการต่าง ๆ ในทางชีวเคมีได้ ( Tedera & Naka ,1991) จึงเป็นประโยชน์อย่างมาก สำหรับการศึกษาโภชนาการของอาหารแต่ละชนิด และเป็นการศึกษาเมแทบอลิซึมทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับวิตามินบีหก และผลของการบกพร่องของวิตามินบีหกที่เกิดขึ้นในร่างกายได้ ตลอดจนใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีหกในยาที่ผลิตขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาถึงชนิด และปริมาณของวิตามินบีหกในสารอาหารชนิดต่าง ๆ
2. ศึกษาถึงขั้นตอน และกรรมวิธีการสกัดวิตามินบีหกจากอาหารที่นำมาเป็นตัวอย่าง
3. ศึกษาถึงวิธีการวิเคราะห์ทาง HPLC
4. ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ชนิด และปริมาณวิตามินบีหกโดยวิธี HPLC จากโครมาโตแกรมที่ได้

## 3. ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดวิตามินบีหกจากสารอาหารชนิดต่าง ๆ
2. สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำหนดชนิดและปริมาณของวิตามินบีหกโดยวิธี HPLC

## 4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจถึงเทคนิคในการวิเคราะห์สารโดยวิธี HPLC
2. ทราบถึงข้อแตกต่างของการวิเคราะห์วิตามินบีหกโดยวิธีทาง HPLC และ Bioassay
3. สามารถใช้เป็นวิธีการหาชนิด และ ปริมาณวิตามินบีหกเพื่อการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับชีวเคมี อาหาร และยา หรือทางเภสัชกรรม

## 5. ขั้นตอนในการดำเนินการ

1. วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้ได้สารตัวอย่างที่เหมาะสมก่อนจะผ่านเข้าไปใช้วิเคราะห์ชนิดและปริมาณวิตามินบีหก
2. หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณวิตามินบีหกโดยการศึกษาระบบตัวพา (Mobile Phase) ที่เหมาะสม
3. หาปริมาณที่เหมาะสมกับการวัดปริมาณวิตามินบีหกแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎี และหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

## ก. ความหมายของวิตามินบีหก

วิตามินบีหกหมายถึง กลุ่มของสารประกอบ 3 ชนิด ได้แก่ ไพริดอกซิน (pyridoxin) หรือ ไพริดอกซอล (pyridoxol) , ไพริดอกแซมมิน (pyridoxamine) และไพริดอกซาล (pyridoxal)

โดยทั่วไป วิตามินบีหกมักจะหมายถึงไพริดอกซินเพียงอย่างเดียว เพราะว่าเป็นวิตาเมอร์ในกลุ่มนี้ที่พบเป็นครั้งแรก (Wiardi,1932) และมีชื่อพ้องอย่างอื่นคือ adermine อนุพันธ์ที่สำคัญทางชีววิทยาของวิตามินบีหกคือ ไพริดอกซาลฟอสเฟต และไพริดอกแซมมินฟอสเฟต ซึ่งถือได้ว่าเป็น วิตาเมอร์ที่มีประสิทธิภาพ

## ข. ประวัติความเป็นมา

ในปี ค.ศ.1934 Gyorgy ได้รายงานว่ามีสารชนิดหนึ่งซึ่งปนอยู่ใน วิตามินบีที่ละลายน้ำได้ ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างจากวิตามินชนิดอื่นที่สามารถใช้รักษาอาการผิดปกติของประสาท และโรคผิวหนังซึ่งเกิดจากการขาดวิตามินได้ดี จึงได้ตั้งชื่อว่า "วิตามินบีหก" เพื่อให้แตกต่างจากวิตามินบีหนึ่ง-สอง ที่รู้จักดีอยู่แล้ว

ในปีค.ศ.1938 ได้มีการแยกวิตามินนี้จากข้าวและยีสต์ให้เป็นสารบริสุทธิ์ได้เป็นครั้งแรก โดยนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่ม และก็ได้มีการหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของไพริดอกซิน , ไพริดอกแซมมิน และ ไพริดอกซาล

ในปี ค.ศ.1944 Gunsalus ได้อธิบายถึงบทบาทของวิตามินบีหกในเมแทบอลิซึมว่า ไพริดอกซาลฟอสเฟต เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกระบวนการ non-oxidative carboxylation ของกรดอะมิโน

มีการสังเคราะห์ทางเคมีของไพริดอกซินเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1939 โดย Harris และ Folkers ในสหรัฐอเมริกา และโดย Kuhn และคณะในเยอรมัน ในระยะนั้น Kuhn ได้ตั้งชื่อวิตามินบีหกนี้ว่า Adermine เพราะว่ามีคุณสมบัติทางชีวภาพในการรักษาโรคผิวหนังอักเสบในหนูทดลอง อย่างไรก็ตามก็ไม่มีผู้ใดเห็นด้วย จนกระทั่งในปี 1940 Council of Pharmacy and Chemistry of the American Medical Association จึงประกาศให้ชื่อ วิตามินบีหก อย่างเป็นทางการว่า ไพริดอกซิน (Pyridoxine)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ค. วิธีการแยกวิตามินบีหก (Method of isolation)

### 1. วิธีทั่ว ๆ ไป

ตามรายงานการวิจัยของ Lepkovsky และคณะ(1938) พบว่า วิธีการแยกวิตามินบีหกจากเมล็ดข้าวที่สีแล้ว และยีสต์ จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติบางประการของไพริดอกซิน เช่น

1.1 ความสามารถในการดูดซับกับถ่าน หรือ fuller 's earth

1.2 ความสามารถในการละลายในเอทานอล หรือ อะซิโตน

1.3 ความสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรด และด่าง

1.4 ไม่สามารถตกตะกอนด้วยเกลือของโลหะหนักได้

1.5 การรวมตัวกับอนุพันธ์ของ อะซิเตต

1.6 ความสามารถในการตกตะกอนกับกรด phosphotungstic

### 2. วิธีของ Kuhn และ Wendt (1938)

จะเป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ purification ของสารประกอบโปรตีนที่มีความไวต่อความร้อนและความเป็นด่างในน้ำ Lebedew juice หรือ Muncher Lowenbrau yeast ซึ่งพบว่า สารปนเปื้อนที่มีค่ามวลโมเลกุลต่ำจะสลายไปได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 3 องศาเซลเซียส และหลังจากทำการ purification ของสารประกอบโปรตีนต่อไป จะได้กลุ่ม prosthetic ของโปรตีน ซึ่งจะถูกขับออกโดยความร้อน แล้วเติมสาร acetic anhydride จะได้ค่าของอนุพันธ์ acyl ของสารละลาย chloroform ซึ่งจะตกผลึก หลังจากทำการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก จะได้รูปของผลึกโปรตีน

### 3. วิธีของ Lepkovsky (1938)

เป็นการสกัดข้าวที่สีแล้วจาก fuller's earth ด้วย barium hydroxide ซึ่ง Lepkovsky ได้ทำการ purification ต่อไปกับความเข้มข้นขององค์ประกอบที่ 1(factorI) โดยการกำจัดเกลือทองแดงที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ ออกก่อนแล้วจึงกำจัดเกลือของตะกั่วที่ไม่สามารถละลายน้ำตามแล้วทำการตกตะกอนวิตามินด้วยกรด phosphotungstic acid จะได้เกลือ phosphotungstate ซึ่งเป็นผลึก แล้วแยกวิตามินออกโดยการสลายผลึกด้วยสารละลาย barium hydroxide และสุดท้ายทำการตกผลึกเอา ไพริดอกซิน ออกมาในรูปของเกลือซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วิธีของ Gyorgy (1933)

วัตถุดิบเริ่มต้นในการแยกไพริดอกซินของ Gyorgy นั้นเป็นสารที่แยกเอา thiamine ออกจากยีสต์ และเปลี่ยนเป็นรูปของ thiamine chloride ซึ่งจะเตรียมโดยใช้ barium hydroxide ที่ผ่านการดูดซับของ fuller's earth แล้ว ซึ่งจะปลอดจากสิ่งปนเปื้อนที่ไม่สามารถละลายได้ใน alcohol ethyl acetate แล้วทำการ purification ต่อไปโดยใช้สารละลาย platinic chloride ในการตกตะกอนสารปนเปื้อน แล้วเพิ่มความเข้มข้นขึ้นด้วยการเติมกรด phosphotungstic และวิตะมินจะตกตะกอนออกมา ซึ่งผลจากการสลายเกลือ phosphotungstate นี้จะได้สารไพริดอกซิน ตกตะกอนออกมาจากสารละลายแอลกอฮอล์ ที่มีอีเทอร์ ซึ่งวิตามินนี้จะถูกแยกออกมาในรูปของผลึก

5. วิธีของ Keresztesy และ Stevens (1943)

เป็นการย่อยสลาย สารที่ปล่อยออกจากตัวดูดซับ fuller's earth จากการสกัดข้าวที่สีแล้วด้วยกรดไฮโดรคลอริก และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และหลังจากขจัดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ละลายในอะซีโตนหมดแล้วความเข้มข้นจะถูกแยกออกเป็น acetylate และอนุพันธ์ของ acetyl ที่ถูกย่อยสลายโดยกรด phosphotunstic ไพริดอกซินที่อยู่ในรูปของกรดไฮโดรคลอริก จะถูกตรวจพบจากเกลือ phosphotunstate ที่มีอะซีโตน จากสารละลาย alcohol

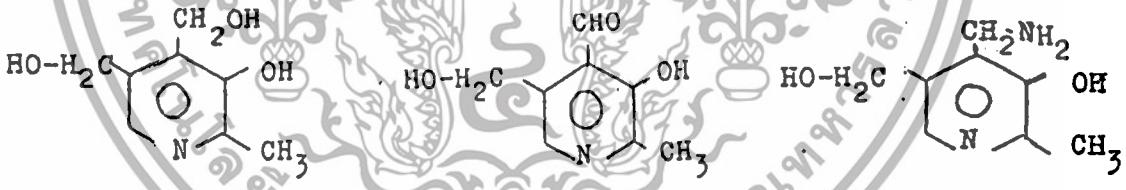
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ง. คุณสมบัติของวิตามินบีหก

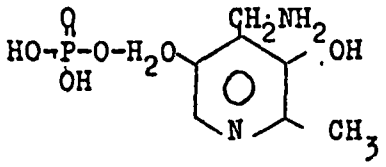
### 1. คุณสมบัติทางเคมี

ไพริดอกซินจะประกอบด้วย N-base ที่มีหมู่ hydroxy group ที่มีความเสถียร ซึ่ง Birch และ Gyorgy(1938)ได้พบว่าสารไพริดอกซินจะไม่ตกตะกอนจากสารละลายที่เกลือของโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว ทองแดง , เงิน หรือทองคำขาว และสารละลายกรด pieric แต่จะสามารถตกตะกอนได้โดยกรด phosphotungstic และไพริดอกซินจะไม่ active ในสารละลายกรดไนตรัส สาร hydrolytic เช่น กรดเกลือแร่หรือสารละลายด่าง ความร้อนหรือความเย็น จะไม่มีผลต่อวิตามิน และมีความสามารถคงทนต่อสาร ethyl nitrile และสารละลาย Fehling ไพริดอกซิน จะสามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่เป็น phenolic ในสารละลาย ferric chloride ให้สีน้ำตาลแดง และ เมื่อใส่สาร 2,6-dichlorimide ในสารละลายไพริดอกซินสภาพที่เป็นด่าง จะเกิดสีน้ำเงินทันที และจะจางลงเป็นสีน้ำตาลแดงในที่สุด ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบวิตามินบีหก เรียกว่า color test

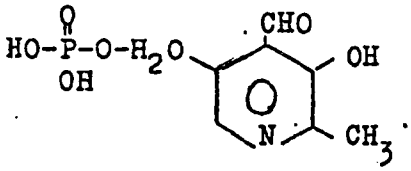
สูตรโครงสร้างของวิตาเมอร์ทั้ง 3 ชนิด และอนุพันธ์ได้แสดงไว้ดังต่อไปนี้



ไพริดอกซิน (หรือไพริดอกซาล) ไพริดอกซาล ไพริดอกแซมมิน



ไพริดอกแซมมินฟอสเฟต



พัยริดอกซาลฟอสเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. คุณสมบัติทางฟิสิกส์

Pyridoxine hydrochloride , $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ จะมีลักษณะเป็นเกล็ดสีขาว และมีรสขมซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่ 204-206 ซ และเฉพาะไพริดอกซิน $C_8H_{11}NO_3$ จะมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 160 ซ ซึ่งสารประกอบนี้จะเป็นพวก inactive optical และไพริดอกซินและสารละลายกรดไฮโดรคลอริกของไพริดอกซิน ไพริดอกซินจะสามารถระเหิดได้โดยไม่ต้องผ่านสภาวะการเป็นของเหลว

Pyridoxine hydrochloride จะสามารถละลายได้ในน้ำ และในเมทานอล แต่จะละลายได้ยากในสารละลาย alcohol และ acetone และจะไม่สามารถตกตะกอนได้ในสารละลายเมทานอลที่มี เอทิลอีเทอร์

ข้อสำคัญของไพริดอกซินคือจะถูกทำลายได้อย่างรวดเร็วเมื่อถูกแสงแดดในสภาพสารละลายที่เป็นกลาง หรือด่าง ซึ่งในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มัลจะมีการถูกทำลายได้น้อยที่สุด และมีความสามารถในการเรืองแสงในบัฟเฟอร์ของฟอสเฟตที่พีเอชเท่ากับ 6.75 ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งการให้แสงเรืองและ excitation โดย ไพริดอกซิน , ไพริดอกซาล และไพริดอกแซมมิน จะมีช่วงคลื่นที่ 340 , 330 และ 315 นาโนเมตรตามลำดับ

ค่าคงที่ของความเป็นด่างของไพริดอกซิน จะเท่ากับ $6.2 * 10^{-10}$

## 3. คุณสมบัติทางชีววิทยา

เมแทบอลิซึมของวิตามินบีหก

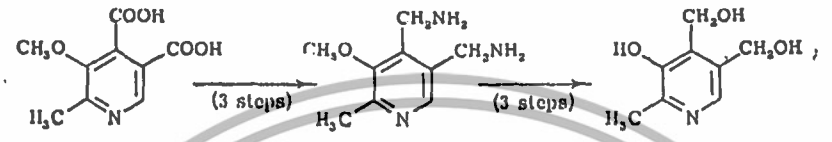
วิตามินบีหกทั้ง 4 ชนิดของวิตามินบีหกอาจเปลี่ยนแปลงไปมาหากันได้โดยอาศัยเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา ดังสมการข้างล่างนี้ จะเห็นว่าวิตะมินบีหกเหล่านั้นจะถูกเมตะบอไลท์ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตกลายเป็น pyridoxal phosphate (PLP) ในที่สุด PLP เป็นเมแทบอไลท์ที่สำคัญมากต่อเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน โดยเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีของกรดอะมิโน บางส่วนของไพริดอกซาลถูกเปลี่ยนเป็น 4-pyridoxic acid ซึ่งจะถูกขับออกทางปัสสาวะ กรดไพริดอกซิลนี้ไม่มีฤทธิ์ของวิตามินบีหกเลย เพราะมันไม่สามารถเปลี่ยนเป็น PLP ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ. การสังเคราะห์วิตามินบีหก สามารถทำได้หลายวิธีเช่น

1. วิธีของ Kuhn , Westphal , Wendt และ Westphal (1939)

การสังเคราะห์ไพริดอกซินเริ่มต้นจาก กรด methoxydicarboxylic ซึ่ง Kuhn และคณะได้ทำการเปลี่ยน กรด decarboxylic ไปเป็น 2-methyl-3-methoxy-4 , 5-di-cyanopyridine ตามสมการ

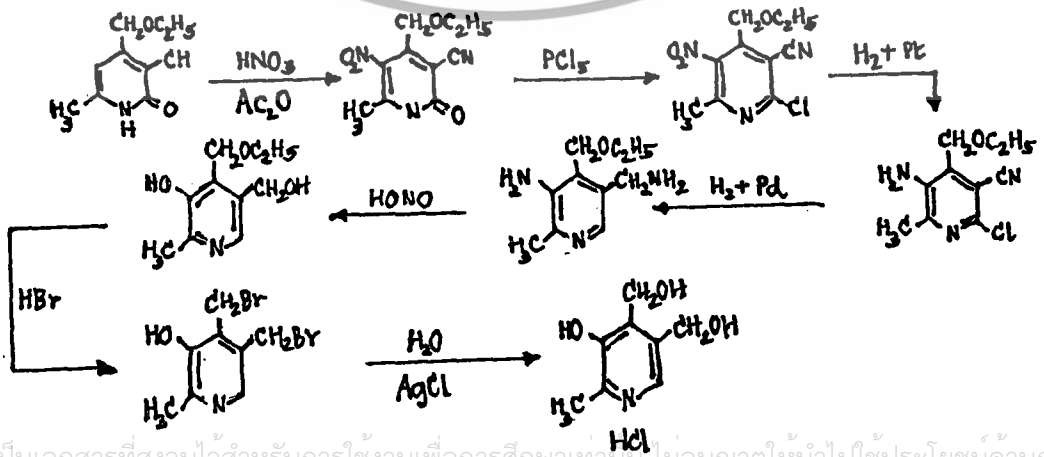



โดยการเร่งปฏิกิริยา hydrogenation ซึ่งกรด nitrous จะเปลี่ยนกลุ่ม aminomethyl ไปเป็นกลุ่ม hydroxymethyl ซึ่งผลที่ได้จะมีเฉพาะสารประกอบวิตามินที่มี methoxy เท่านั้น

Kuhn และ Wendtได้แสดงให้เห็นว่าการเติม HBr ใน methyl ether ของไพริดอกซินนั้นไม่เพียงแต่จะทำให้เกิด hydrolyse ether เท่านั้นแต่ยังทำให้กลุ่ม hydroxy หลุดออกจากกลุ่มhydroxymethyl แล้วถูกแทนที่ด้วย Br แต่จะสามารถถูกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกไซด์ ซึ่งถ้าใช้สารsilver acetate ซึ่งไพริดอกซินที่อยู่ในรูปของกรดไฮโดรคลอริกนั้น จะถูกทำให้ตกผลึกจากสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง โดยการเติม acetone

2. วิธีของ Harris และ Folkers (1939)

เป็นวิธีที่ได้ปรับปรุงมาจากวิธีการแรกโดยการ condensation ของ ethoxyacetylacetone กับ cyanoacetamide และจะได้ 3-cyano-4-ethoxymethyl-6-methyl-2-pyridone ดังรูปที่ 2.1



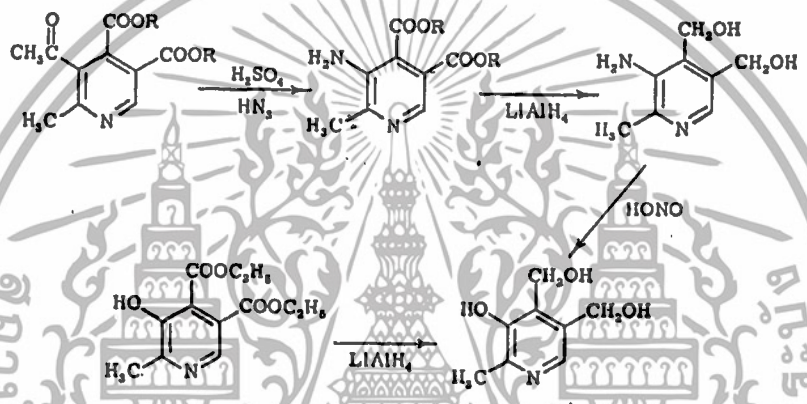

รูปที่ 2.1 แสดงการ condensation ของ ethoxyacetylacetone กับ cyanoacetamide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วิธีอื่น ๆ

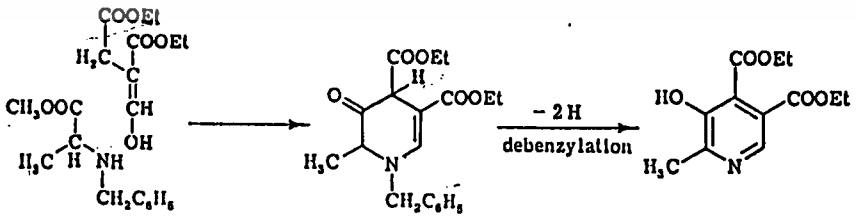
- วิธีของ Morii และ Makino (1939) ได้ทำการวิเคราะห์ไพริดอกซินโดยวิธีที่คล้ายคลึงกับ Harris และ Folkers (1939) และต่อมา Mowat และคณะ(1943) ทำการสังเคราะห์โดยใช้สารประกอบเริ่มต้นคือ 2-methyl-4-carboxy-5-cyano-6-pyridone

- วิธีของ Jones (1951) ทำการสังเคราะห์กรด 2-methyl-3-acetyl-4,5-pyridoxine dicarboxylic acid จาก hydroxymethyl oxalacetate และ imino acetylacetone โดยการใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ในการเชื่อมวงแหวน ซึ่งสารประกอบนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไพริดอกซินตามสมการดังนี้




- วิธีของ Jones และ Kornfeld (1951) เป็นการลดรูปของ pyridine carboxylic ester ไปเป็น methylol ซึ่งให้ค่าที่ดีถึงแม้ว่าในขั้นตอนสุดท้ายจะสิ้นเปลืองทำการสังเคราะห์ในห้องทดลอง แต่มันก็ใช้กับทางการค้าได้ด้วย

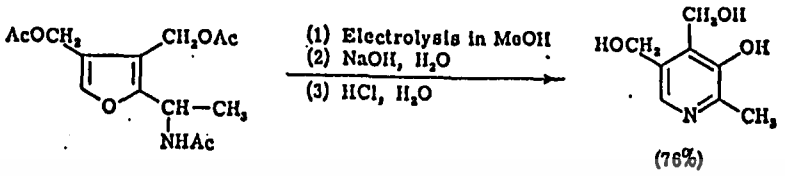
- วิธีของ Cohen และคณะ (1952) เป็นการสังเคราะห์วิตามินบีหก dicarboxylic acid ester จาก alanine , succinic ester และ formaldehyde ตามสมการจะเห็นได้ว่า diester ถูกเปลี่ยนไพริดอกซินโดย Kuhn process หรือ $LiAlH_4$ ซึ่งถูกใช้โดย Jones และ Kornfeld (1951) ดังรูปที่ 2.2



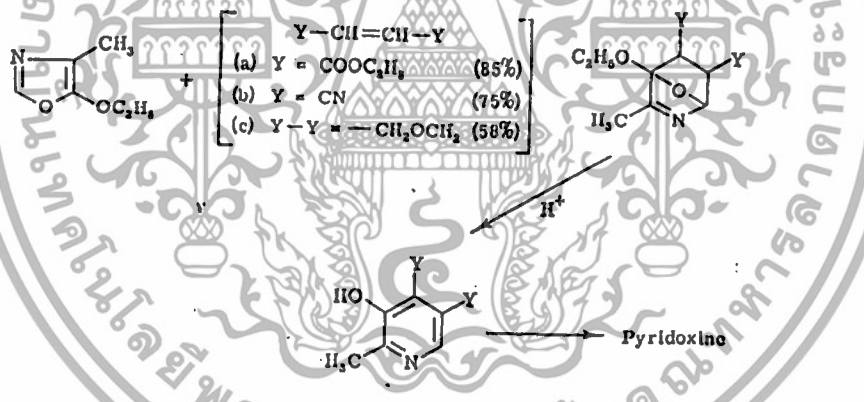

รูปที่ 2.2 แสดง Kuhn process

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- วิธีของ Elming และ Kaas มี 3 ขั้นตอนของการสังเคราะห์ไพริดอกซินจาก 2-(α-acetamidoethyl)-3,4-bis(acetoxymethyl)-furan :




ซึ่งวัตถุดิบเริ่มต้นจะถูกเตรียมโดยใช้ furan 30% จากการสังเคราะห์ 5 ขั้นตอน อย่างไรก็ดีวิธีนี้ก็ยังใช้สาร $LiAlH_4$ ซึ่งมีราคาแพงในการลดรูปของ furane-3,4-dicarboxylic ester ไปเป็นdimethylol ซึ่งวิธีการสังเคราะห์โดยตรงของสารประกอบ diester , dinitrile และ epoxydimethyl จะดูได้จากวิธีของ Harris และคณะ (1962) โดยวิธี Diel-Alder condensation ของ 4-methyl-5-ethoxy-oxazone กับ diethyl maleate,fumaronitrile หรือ 2,5-dihydrofurane ตามลำดับดังรูปที่ 2.3




รูปที่ 2.3 แสดงวิธี Diel-Alder

ซึ่งจะเห็นได้ว่า diester ถูกเปลี่ยนไปเป็นไพริดอกซิน โดยวิธีของ Cohen (1952) หรือวิธีของ Jones (1951) ซึ่งต่างก็ใช้ $LiAlH_4$ ทั้งคู่ สาร dinitrile จะถูกลดรูปโดยตรงไปเป็นสารประกอบ bis-aminomethyl และ diazotize จะได้ค่าของไพริดอกซิน 41% จากผลิตภัณฑ์ทั้งหมดและวงของอีเทอร์ Y-Y = $CH_2OCH_2$ จะถูกเชื่อมด้วย HBr และจะถูกย่อยสลายไปเป็น ไพริดอกซินอีก 48% ตามวิธีของ Harris และ Folkers (1939) สาร 4-methyl-5-ethoxy oxazole จะถูกเตรียมโดย ethyl-N-formyl-DL-alaminate โดยการ reflux ในสารละลาย คลอโรฟอร์มที่มี phosphorus pentoxide ซึ่งค่าทั้งหมดจาก ethyl-DL-alaminate HCl คือ 48%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การสังเคราะห์ที่คล้าย ๆ กันนี้ของ diester ได้ทำที่อัฟริกาใต้ โดยการใช้ 4-methyloxazole และ diethyl maleate ซึ่งการสังเคราะห์นี้เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา dehydrogenation ใน nitrobenzene แทนที่จะเกิดจากปฏิกิริยา การกำจัดอีเทอร์ ตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

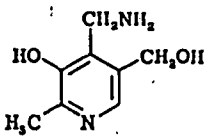
**ฉ. ความเฉพาะเจาะจง (Specificity)**

1. ลักษณะทั่วไปของวิตามินบีหก

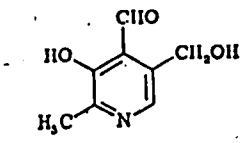
จากรายงานของ คณะกรรมการบัญญัติศัพท์ทางชีวเคมีของสมาคมนักเคมีชีวภาพ ประเทศอเมริกา ( Committee on Biochemical Nomenclature of the American Society of Biological Chemists ) พบว่า ไพริดอกซินจะอยู่ในรูปของ 2-methyl-3-hydroxy-4,5-di(hydroxymethyl)pyridine และสารธรรมชาติที่สำคัญของวิตามินบีหกมีอีก 2 ตัว คือ ไพริดอกซาล ( 2-methyl-3-hydroxy-4-formyl-5-hydroxymethyl pyridine ) และ ไพริดอกแซมมิน ( 2-methyl-3-hydroxy-4-aminomethyl-5-hydroxymethyl pyridine )

2. ไพริดอกซาล และ ไพริดอกแซมมิน

รูปแบบอื่น ๆ ของไพริดอกซินที่ได้ถูกค้นพบโดย Snell และคณะ (1942) ซึ่งเป็นผลจากการเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดย การสกัดของสารธรรมชาติโดย เมื่อไพริดอกซินถูกเติมด้วยสาร oxidizing agent พบว่าจะเกิดค่า activity สูง สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobaccillus caseii* และSnell (1942-1944) ได้สังเกตว่า เมื่อทำการนึ่งฆ่าเชื้อ สารไพริดอกซินที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สังเคราะห์ หรือกรดอะมิโน จะพบว่า มีการเพิ่มค่า activity ของไพริดอกซินสูงมากเมื่อใช้เชื้อ *Streptococcus faecalis* และสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเติมสาร animating agent และ oxidizing agent ตามลำดับในไพริดอกซินคือ อนุพันธ์ของ อะมิโน และอัลดีไฮด์ ของพีอริดอกซิน โดยการอนุมานมีนดูเหมือนว่ากลุ่มของ hydromethylene ที่ตำแหน่งที่ 4 หรือ 5 จะมีการเพิ่มวิธีการทดสอบสารประกอบที่ถูกสังเคราะห์โดย Harris และคณะ (1944) แสดงให้เห็นได้ว่า สารประกอบที่เกิดขึ้นคือ 2-methyl-3-hydroxy-4-aminomethyl-5-hydroxy-methylpyridine และ 2-methyl-3-hydroxy-4-formyl-5-hydroxymethyl pyridine ตามรูปที่ 2.4



Pyridoxamine



Pyridoxal

**รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของไพริดอกซามีน และไพริดอกซาล**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพริดอกแซมมินจะถูกเตรียมโดยการเพิ่มหมู่ไนโตรเจนใน acylated pyridoxine หรือจะให้ผลดีก็ต้องใช้ 2-methyl-3-hydroxy-4-methoxymethyl-5-hydroxymethyl pyridine ซึ่งจะให้ค่าของปฏิกิริยาที่มากกว่าของกลุ่ม methylene ที่ตำแหน่งที่ 4 ซึ่งจะเกิดสาร isomeric-5-aminomethylpyridine ถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วย

ทำการ ออกซิเดชัน ของไพริดอกซินด้วย โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต จะได้ค่าของอัลดีไฮด์ ซึ่งสามารถถูกแยกออกจากปฏิกิริยาผสมเป็น oxime ซึ่งจะถูกสลายโดยกรดไนตรัส และเมื่อเติมด้วย เอทานอล และ กรดไฮโดรคลอริก จะได้ cyclic acetol ซึ่งจะง่ายต่อการถูกย่อยสลายไปเป็น อัลดีไฮด์ ที่ต้องการได้

วิธีพิสูจน์ว่ากลุ่ม formyl นั้นอยู่ที่ตำแหน่งที่ 4 จะทำโดยการเปลี่ยน oxime ไปเป็นสารประกอบ 4-amino โดยการเร่งปฏิกิริยาการลดรูป (reduction)

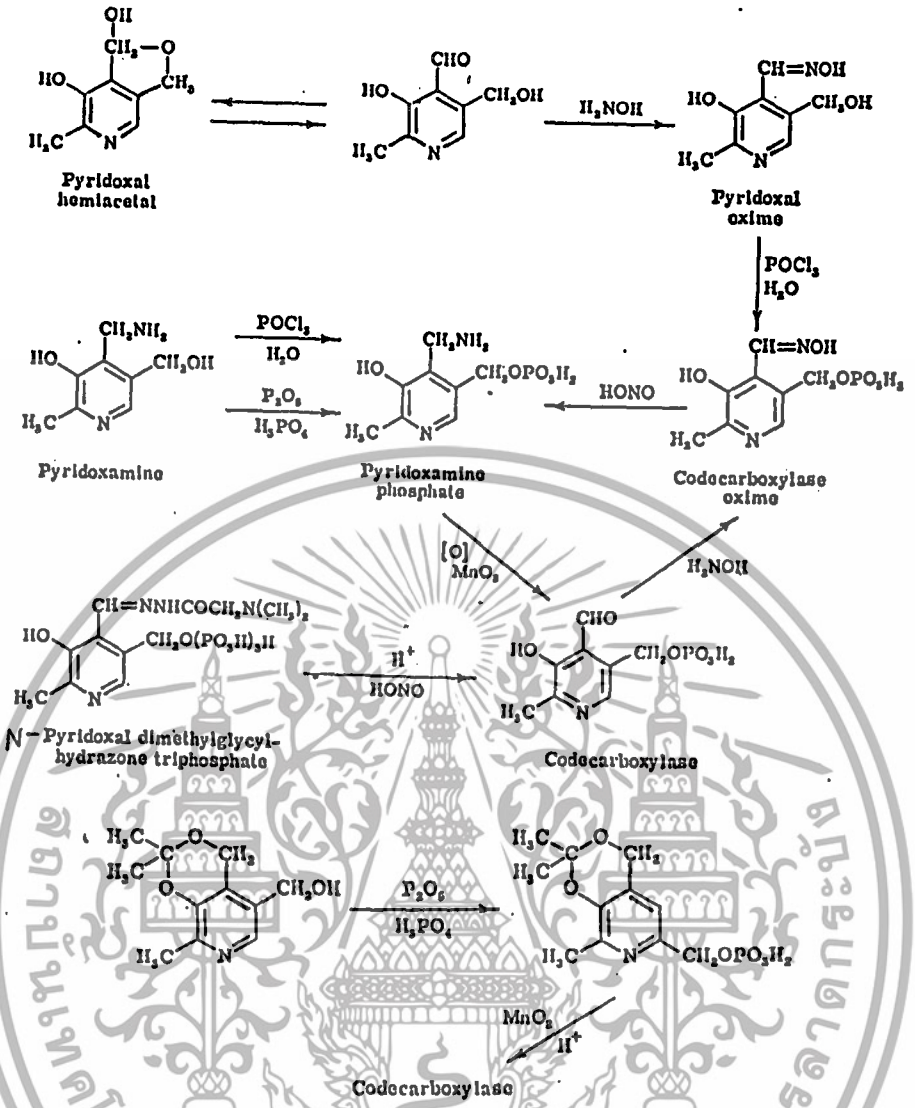
3. ไพริดอกซาล ฟอสเฟต (codecarboxylase) และ ไพริดอกแซมมิน ฟอสเฟต

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการ phosphorylation ของไพริดอกซาล ซึ่งสันนิฐานว่าเกิดจากphosphoric acid ester ที่ตำแหน่งที่ 5

สารประกอบซึ่งรู้จักในชื่อว่า codecarboxylase นั้นถูกสังเคราะห์โดยเกิดจากปฏิกิริยาของphosphorus oxychloride ในสารละลายของไพริดอกซินโดย codecarboxylase จะก่อตัวเป็น monophosphate ของไพริดอกซาล โดยดูที่หมู่ oxime และ 3-phosphate ของไพริดอกซินจะถูกสังเคราะห์ โดยดูที่หมู่ oxime ซึ่งพบว่ามันไม่เหมือนกับ codecarboxylase oxime

การเกิด phosphorylation โดยตรงของไพริดอกซาลที่กลายเป็น codecarboxylase จะเกิดค่าต่ำ เพราะ ไพริดอกซาลจะพบอยู่มากในรูปของ hemiacetal form ดังรูปที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 2.5 แสดงการเกิด phosphorylation ของไพริดอกซาล

กรณีที่ต้องการจะหลีกเลี่ยงรูปของ hemiacetal ทำได้โดยตอนแรกทำการ phosphorylation ของไพริดอกแซมมินด้วย phosphorus pentoxide ในสารละลายเหนียวของกรด phosphoric ไพริดอกแซมมินฟอสเฟตจะถูก ออกซิไดส์ ทันทีในด่างหรือ manganese dioxide กลายเป็นไพริดอกซาลฟอสเฟต (codecarboxylase) ซึ่งถูกแยกเป็นเกลือแคลเซียม

Viscontini และคณะ (1951) ได้เตรียม N-dimethylglycylhydrazone ของไพริดอกซาล และทำการเติมหมู่ฟอสเฟตด้วยกรด metaphosphoric และสารตัวกลาง polyphosphate จะถูกย่อยสลาย และทำปฏิกริยาด้วยกรดไนตรัส ให้ได้ codecarboxylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ช. ปริมาณวิตามินบีหกในอาหารชนิดต่าง ๆ**

วิตามินบีหกมักจะพบได้ในอาหารตามธรรมชาติในรูปแบบต่าง ๆ ซึ่งรูปแบบส่วนมากที่พบคือ ไพริดอกซิน , ไพริดอกแซมมิน , ไพริดอกซาล , ไพริดอกแซมมิน-5-ฟอสเฟต และ ไพริดอกซาล-5-ฟอสเฟต สำหรับการเสริมคุณค่าของอาหารที่ใช้ทั่วไปมักจะใส่พวกไพริดอกซินเท่านั้น ซึ่งวิธีการวิเคราะห์นั้นก็มีด้วยกันหลายวิธี เช่น วิธีทางโครมาโตรกราฟี , การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

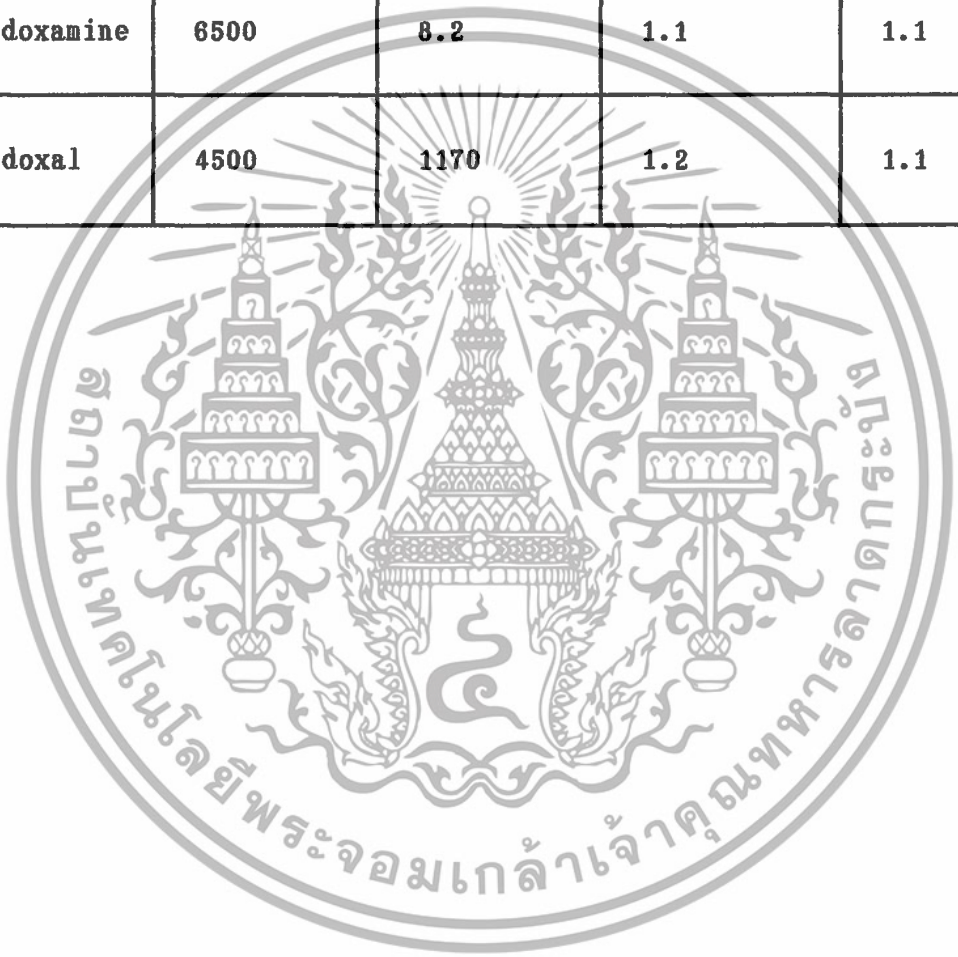
โดยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา จะมีข้อดีคือมีความสะดวกและเป็นวิธีที่นิยมกันอย่างแพร่หลายกว่า โครมาโตรกราฟี โดยจะใช้บอกปริมาณองค์ประกอบของวิตามินบีหกในอาหารทั่วไปได้ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์จะมีการตอบสนองต่อรูปแบบของวิตะมินบีหกที่เกิดขึ้นได้แตกต่างกันจากตารางนี้เราจะเห็นได้ว่า ไพริดอกซิน , ไพริดอกแซมมิน และไพริดอกซาล จะมีค่าความสามารถในการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกันของ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Neurospora sitophila* ดังนั้นจึงสามารถกำหนดปริมาณรวมทั้งหมดของวิตามินบีหกได้ วิธีการทดสอบเพิ่มเติมอีกวิธีโดยใช้ *Streptococcus faecalis* และ *Lactobacillus casei* ใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่าง ไพริดอกซิน , ไพริดอกซาล และไพริดอกแซมมินได้ นอกจากนี้ยังจำแนกชนิดของวิตามินได้จากวิธีของ โครมาโตรกราฟีได้ด้วย

ปัจจุบันนี้มีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีสำหรับวิตามินบีหก ซึ่งก็มีวิธีหนึ่งคือการเปลี่ยนรูปของไพริดอกซิน , ไพริดอกซาล และไพริดอกแซมมินไปเป็นรูปของกรด pyridoxic แล้วยังมีอีกวิธีคือ ปฏิกิริยาระหว่างไพริดอกซาล กับ cyanide และเกิด cyanhydrin ขึ้น ซึ่งไพริดอกซิน หรือ ไพริดอกแซมมิน สามารถใช้วิธีวิเคราะห์เหมือนกันได้ภายหลังจากที่ทำการเปลี่ยนรูปไปเป็นไพริดอกซาลแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดง activity ของรูปแบบวิตามินบีหกต่าง ๆ ในจุลินทรีย์

| | *Streptococcus faecalis* | *Lactobacillus casei* | *Saccharomyces carlsbergensis* | *Neurospora sitophila* |
|---|---|---|---|---|
| Pyridoxine | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Pyridoxamine | 6500 | 8.2 | 1.1 | 1.1 |
| Pyridoxal | 4500 | 1170 | 1.2 | 1.1 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



**ช. แหล่งของวิตามินบีหกในอาหาร**

การวัดปริมาณวิตามินบีหกในอาหาร มักใช้วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ซึ่งมักใช้เชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* ซึ่งวิตามินที่แตกต่างกันเช่น ไพริดอกซิน , ไพริดอกซาล และไพริดอกแซมมิน ย่อมเกิดจากการตอบสนองที่ต่างกันของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต่างกันจากหัวข้อที่กล่าวมาแล้ว

ผลจากตารางที่ 2.2 – 2.5 เป็นปริมาณวิตามินบีหกที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อ , ปลา และไข่ได้จากการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดยใช้เชื้อ *Saccharomyces calsbergensis* ซึ่งจะได้ค่าที่บอกถึงปริมาณทั้งหมดของวิตามินบีหกรวมทั้งอนุพันธ์ต่าง ๆ ด้วยซึ่งได้ศึกษาโดยการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของหนู เปรียบเทียบกับค่าการวิเคราะห์ที่ได้ทางจุลินทรีย์

ส่วนวิธีการแยกโดยใช้โครมาโตกราฟีนั้นวิตามินบีหกที่ถูกพบในเนื้อ และไข่ มากคือ ไพริดอกซาลและไพริดอกแซมมิน ซึ่งในตับวัวพบ 80% และตับลูกวัว 90% แต่การวัดทางการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ไม่สามารถตรวจพบไพริดอกซินได้ในตับวัว

จากตารางที่ 2.5 จะสามารถพิจารณาได้ว่าการขาดวิตามินบีหกจะเกิดระหว่างการปรุงเนื้อ

ผลที่ได้จากนมสดในตารางที่ 2.6 โดยการวัดปริมาณของเชื้อ *S. carlsbergensis* กับ *N. sitophila* จะให้ค่าที่เหมือน ๆ กันคือ นมในเดือนแรกของการ lactation จะมีค่าวิตามินบีหกสูงกว่าปริมาณโดยเฉลี่ยทั้งหมด และวิธีการถนอมนมก็มีผลต่อความแตกต่างของปริมาณวิตามินบีหกด้วย แต่เมื่อเติมสาร hydrogen peroxide กลับไม่มีผลต่อปริมาณวิตามิน หรือหลังจากอัดก๊าซ ออกซิเจนด้วยความดันหลาย ๆ วัน อย่างไรก็ตามการถูกแสงแดดแม้เพียงระยะเวลาสั้น ๆ ก็จะทำให้ปริมาณวิตามินบีหกสูญหายไปได้ ซึ่งถ้าถูกแสงแดดสัก 2 ชม. ปริมาณวิตามินอาจสูญหายไปถึง 50 % ก็ได้ และเมื่อสังเกตุเห็นได้ว่าเมื่อนำนมมาทำแห้งจะทำให้สูญเสียวิตามินถึง 31% และเมื่อทำการควบแน่นนมจะสูญเสียวิตามินถึง 30% และถ้าทำการกลั่นนม หรือ นึ่งฆ่าเชื้อจะทำให้สูญเสียวิตามินมากกว่าถึง37-70% ซึ่งยังไม่อาจตรวจวัดการสูญเสียวิตามินได้เลยแต่ต้องรออีก 2-3 วัน หลังจากวันที่ทำขบวนการต่าง ๆ จึงจะเห็นผลของการสูญเสียวิตามินบีหก ที่มักพบในนมจะอยู่ในรูปของไพริดอกซาล และไพริดอกแซมมิน และถ้าทำการกลั่นแห้ง (evaporator) สารไพริดอกซินที่เติมเข้าไปทีหลังจะสามารถทนอยู่ได้

เนยจะไม่มีวิตามินบีหก แต่จะตรงข้ามกับเนยแข็งที่มีการเจริญของเชื้อราอย่างกว้างขวางที่จะพบวิตามินบีหกเป็นองค์ประกอบอยู่

เมล็ดพืช และผลิตภัณฑ์จากเมล็ดพืช จะเป็นแหล่งของวิตามินบีหกที่ดี ซึ่งปริมาณวิตามินที่มีอยู่จะขึ้นอยู่กับอัตราการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในแป้งที่ทำปฏิกิริยากับ ethylene oxide จะอยู่ในรูปของ choline chloride ซึ่งจะถูกทำลายวิตามินบีหกถึง 71%

ในผลิตภัณฑ์ผักนั้น จะพบรูปแบบของไพริดอกซินอยู่มากอย่างโดดเด่น แต่ผักและผลไม้สดมีอยู่น้อย

ในข้าวสาลี ปริมาณวิตามินบีหกจะพบมากถึง 1/4 - 1/3 ของทั้งหมดซึ่งจะพบในรูปของไพริดอกซาลและไพริดอกแซมมิน

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงปริมาณวิตามินบีหกที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อ

| เนื้อ | มก/100กรัม เนื้อสด |
|---|---|
| Beef | |
| Standing rib roast | 0.32 |
| Standing rib roast (cooked) | 0.28 |
| Standing rib roast | 0.59[a] |
| Standing rib roast (cooked) | 0.40[a] |
| Boston cut | 0.38 |
| Boston cut (cooked) | 0.25 |
| Boston cut | 0.54[a] |
| Boston cut (cooked) | 0.46[a] |
| Lean | 0.50 |
| Beef | 0.15-0.33 (c)[b] |
| Tongue | 0.13 |
| Heart | 0.25 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงปริมาณวิตามินบีหกที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อ (ต่อ)

| | |
|---|---|
| Liver | 0.71 |
| | 1.00 |
| | 3.80 |
| | 1.42[a] |
| | 0.74 |
| | 0.45 |
| | 0.38 (c) |
| Brain | 0.13 (c) |
| Veal | |
| Leg | 0.33 |
| Leg (cooked) | 0.29 |
| Leg | 0.57[a] |
| Leg (cooked) | 0.44[a] |
| Leg | 0.37 |
| Leg (roasted) | 0.20 |
| Shoulder | 0.30 |
| Shoulder (roasted) | 0.14 |
| Chops (sirloin) | 0.41 |
| Chops (braised) | 0.11 |
| | 0.12 |
| Chops (shoulders) | 0.35 |
| Stew meat | 0.33 |
| Stew meat (cooked) | 0.10 |
| Liver | 0.90 |
| | 0.55 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงปริมาณวิตามินบีหกที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อ (ต่อ)

| | |
|---|---|
| **Pork** | |
| **Lean** | **0.40** |
| | **0.20 - 0.35 (c)** |
| **Liver** | **1.11[a]** |
| | 0.51 |
| | 0.35 (c) |
| Wholly fatty tissue | 0.05 |
| Kidney | 0.30 - 0.32 (c) |
| **Lamb** | 0.2 |
| Leg | 0.29 |
| Leg (roasted) | 0.12 |
| Sirloin chop | 0.22 |
| Sirloin chop (broiled) | 0.11 |
| Leg | 0.25 |
| Leg (cooked) | 0.16 |
| Leg | 0.52[a] |
| Leg (cooked) | 0.43[a] |
| Stew meat | 0.23 |
| Stew meat (cooked) | 0.06 |
| **Ham** | 0.33 |
| Smoked | 0.40 |
| **Cured** | 0.19 |
| **Frankfurters** | 0.15 |
| | 0.13 |
| | 0.15 |
| | 0.31[a] |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงปริมาณวิตามินบีหกที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อ (ต่อ)

| | |
|---|---|
| Pork sausage | 0.20 |
| Liver sausage | 0.45[b] |
| | 0.23 |
| Liver paste | 0.20 |

a = Rat growth assay

[b](c) = chemical assay method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ปริมาณวิตามินบีหกในปลา

| ปลา | มก/100กรัม เนื้อปลาสด |
|---|---|
| Cod | 0.2 |
| | 0.34[a] |
| | 0.51 (c)[b] |
| Eel | 0.28 |
| Eel (smoked) | 0.15 |
| Flounder | 0.25 |
| Herring | 0.45 |
| Herring (pickled fillets) | 0.15 |
| Herring (salted) | 0.22 |
| Herring (smoked) | 0.35 |
| Mackerel | 0.70 |
| Mackerel (Atlantic) | 0.21 |
| Mackerel (Pacific) | 0.27 |
| Mackerel (smoked) | 0.50 |
| Sardine (Atlantic) | 0.16 |
| Sardine (Pacific) | 0.28 |
| Salmon | 0.59[a] |
| Salmon (canned,wet solids) | 0.45 |
| Tuna (canned,wet solids) | 0.44 |

a = Rat growth assay

[b](c)= chemical assay method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 แสดงปริมาณวิตามินบีหกในไข่ไก่

| ไข่ไก่ | มก/100กรัม |
|---|---|
| Whole | 0.12 |
| Yolk | 0.30 |
| | 0.66 - 0.67 (c)[a] |
| White | 0.02 |
| | 0.11 (c) |
| Whole | 0.68 |
| Yolk | 1.50 |

[a](c) = chemical assay method

ตารางที่ 2.5 แสดงปริมาณวิตามินบีหกในเนื้อที่ผ่านกรรมวิธีการปรุง

| เนื้อ | % ของการสูญเสีย |
|---|---|
| Veal | |
| By roasting | 34 |
| By braising | 19 |
| By stewing | 18 |
| Lamb | |
| By roasting | 29 |
| By braising | 34 |
| By stewing | 16 |
| Ham | |
| By curing | 57 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 แสดงปริมาณวิตามินบีหกในนมสด

| น้ำนม | ปริมาณวิตามินบีหก |
|---|---|
| Fresh | 0.41and0.37mg/100gm |
| | 0.1,0.2 mg/100ml |
| | 0.023 mg/100ml |
| | 0.041 mg/100ml |
| | 0.033 mg/100ml |
| | 0.035 mg/100ml |
| | 0.050 mg/100gm |
| | 0.035 mg/100gm |
| | 0.18,0.23 mg/100gm |
| Shop-bought (average of January-December) | 0.036,0.046 mg/100ml |
| Average of 40 cows | |
| 1st month of lactation | 0.081 mg/100ml |
| 5th-11th month of lactation | 0.035 mg/100ml |
| Sample taken under aseptic conditions | 0.147 mg/100ml |

a = *Saccharomyces carlsbergensis.*

b = *Neurospora sitophila*

[c](c) = Chemical assay method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ๔. ความผิดปกติที่เกิดกับสัตว์ทดลองเมื่อขาดวิตามินบีหก

### 1. ความผิดปกติทางผิวหนัง

ผิวหนังจะอักเสบ มีสะเก็ด บริเวณปลายเท้า อุ้งเท้า ริมใบหู ปลายจมูก บางทีมีอาการบวมแดงเป็นแผลที่ปากและลิ้น

### 2. ความผิดปกติของเมแทบอลิซึมของไขมัน

มีการลดปริมาณและส่วนประกอบของ steroid esters และฟอสโฟลิปิดในตับ โดยเฉพาะพวกกรดสเตียริก และกรดลิโนเลอิก มีการลดปริมาณไขมันทั้งหมดในร่างกาย แต่มีไขมันตั้งในตับ มีการเพิ่มโคเลสเตอรอลในเซรุ่ม และบางครั้งเส้นเลือดอาจจะแข็งตัวได้

### 3. ความผิดปกติทางต่อมไร้ท่อ

Growth hormone จะลดลงในต่อม pituitary gland และปริมาณ insulin ในพลาสม่าลดลงด้วย มีการทำลายของเซลล์ที่ adrenal cortex

อาจจะอธิบายว่าการขาดวิตะมินบีหกมีผลกระทบต่อระดับฮอร์โมนในร่างกายได้ เพราะสาร dopamine และ dopa จะลดลงด้วยเนื่องจากขาดกระบวนการ carboxylation ปกติ dopamine และ dopa มีหน้าที่ควบคุมการหลั่งของฮอร์โมน และสาร hormone releasing factors หลายชนิดในสมอง มีหลักฐานว่า ถ้าทดลองให้ยาต้านฤทธิ์ dopamine ในคนหรือสัตว์จะพบการเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมนดังกล่าวเช่นกัน

### 4. ความผิดปกติทางโลหิต

เนื่องจากวิตามินบีหกจำเป็นต่อการสร้าง porphyrin และ haemoglobin ในขั้นตอนของการสังเคราะห์ δ-amino-levulinic acid ดังนั้นการขาดวิตามินบีหกจึงทำให้เกิดโลหิตจางชนิด microcytic และ hypochromic ซึ่งรักษาด้วยการให้ธาตุเหล็กจะไม่ได้ผล เม็ดเลือดขาวก็มีการเปลี่ยนแปลงในภาวะการขาดวิตามินบีหกเช่นมีการเพิ่มจำนวนของ neutrophil ในกระแสเลือด และมีจำนวนของ granulocyte และ lymphocyte ลดลง ประสิทธิภาพในการจับสารแปลกปลอมกิน(phagocytosis) ของเม็ดเลือดขาวลดลงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ความผิดปกติทางระบบประสาท

การขาดวิตามินบีหกทำให้ มีอาการชักคล้ายลมบ้าหมูเนื่องจาก ระดับของสาร neurotransmitter ชนิด ɣ-amino-butylic acid ( GABA ) ในสมองลดลง และ glutamic acid decarboxylase ไม่ทำงาน เนื่องจากการขาดโคเอนไซม์ PLP จึงทำให้ไม่มีการสร้าง GABA ยับยั้งการส่งกระแสสัญญาณทางประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง

นอกจากนี้การสังเคราะห์ของสารตัวส่งสัญญาณประสาทชนิดอื่น ๆ ก็พลอยกะทบกระเทือนด้วย เช่น dopamine , noradrenaline และ serotonin

การเปลี่ยนแปลงทางอารมณ์ จิตใจ และความรู้สึกทางประสาทในระยะก่อนที่ประจำเดือนจะมา เริ่มมีครรภ์หรือในสตรีที่กินยาคุมกำเนิด อาจมีสาเหตุมาเนื่องจากการลดระดับของวิตามินบีหก การให้วิตามินบีหกเสริมจะช่วยลด หรือควบคุมการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้

6. การเพิ่มออกซาเลตในปัสสาวะ (oxaluria)

สารออกซาเลตเป็น metabolite สุดท้ายของเมแทบอลิซึมของ glycine โดยกระบวนการออกซิเดชัน การขาด PLP ทำให้ไม่มีกระบวนการ reamination หรือ transamination ของสารตัวกลาง glyoxalate ได้ เพราะฉะนั้นจึงทำให้ออกซาเลตถูกสะสมมากขึ้น และขับออกทางปัสสาวะมันอาจรวมกับ calcium ion กลายเป็น calcium oxalate แล้วตกตะกอนกลายเป็นก้อนนิ่วในทางเดินปัสสาวะได้ แต่ยังไม่มีหลักฐานใด ๆ ยืนยันหรือสนับสนุนเหตุผลที่ว่าการขาดวิตามินบีหกจะทำให้เกิดโรคนิ่วในทางเดินปัสสาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ฌ. ความเป็นพิษเนื่องจากการได้รับวิตามินบีหกมากเกินไป**

การให้วิตามินบีหกในขนาดสูงเป็นเวลานาน (2-3 กรัมไพริดอกซินนาน 2 -40 เดือน) อาจไม่เป็นการปลอดภัย เคยมีรายงานจากผู้ป่วยผู้ใหญ่หลายรายที่ได้รับวิตามินบีหกขนาดสูงและนานดังกล่าวว่ามีอาการทางประสาท กล่าวคือรู้สึกร้อนผ่าว , ชาผิวหนังบริเวณแขนขา , ลิ้นและริมฝีปาก และอ่อนเพลีย เคลื่อนไหวได้ยาก อาจเป็นเพราะสารไพริดอกซินที่มากเกินไป และยังไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็น PLPนั้นกลายเป็นสาร competitive inhibitor กับ PLP แล้วยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในประสาทส่วนปลาย และเนื่องจากไพริดอกซินไม่สามารถผ่านซึมเข้าไปในสมองได้ จึงไม่มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ฎ. การวิเคราะห์วิตามินบีหก** สามารถทำได้ 4 วิธีคือ

1. การใช้สัตว์ทดลอง

เป็นการวัดปริมาณวิตาเมอร์ทั้งหมดที่มีในอาหาร ถ้าไม่ถูกย่อยสลายเสียก่อน ค่าที่ได้จะเป็นค่าของวิตามินที่สัตว์สามารถนำไปใช้ได้ ผลที่ได้จากการใช้สัตว์ทดลองจะมีค่าสูง เนื่องจากค่าของวิตามินจากการสังเคราะห์ของจุลินทรีย์ในลำไส้ร่วมด้วย

1.1 The rat acrodynia test

1.2 Rat and chick growth test

1.3 Modified tryptophan loading test

2. การใช้จุลินทรีย์

โดยการใช้จุลินทรีย์ที่จำเป็นต้องได้รับวิตามินบีหกในการเจริญเติบโตคือ Saccharomyces carlsbergensis , Streptococcus faecalis , S. faecium , Lactobacillus casei และ Neuspora sitophila

การใช้ *L. casei* เป็นที่นิยมที่สุด เพราะจะให้ความจำเพาะเจาะจงสูงสุดเนื่องจากเชื้อจะใช้เฉพาะไพริดอกซิน ส่วน *S. faecalis* , *S. faecium* จะใช้ไพริดอกซิน และไพริดอกซาลซึ่ง ยีสต์และรา จะใช้ทั้ง 3 วิตาเมอร์

การวิเคราะห์โดยทั่วไปไม่สามารถแยกวิตาเมอร์อิสระและวิตาเมอร์ที่จับกับฟอสเฟตได้รวมทั้งการหาปริมาณวิตาเมอร์แยกกันโดยใช้เชื้อหลายชนิดก็ไม่ดีจะได้ผล จึงนิยมใช้หาปริมาณวิตามินทั้งหมดในอาหาร โดยจะมีความไว 5-50 นาโนกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การใช้วิธีทางเคมีและฟิสิกส์ เป็นวิธีที่สะดวกได้ผลดี สามารถทำได้หลายทางเช่น

3.1 Colorimetric method

ไพริดอกซินในตำรับยา สามารถทำปฏิกิริยากับสารบางชนิดเกิดสี ซึ่งความเข้มข้นขึ้นกับปริมาณไพริดอกซินที่มี เช่นกับ 2,6-dichloroquinone-chlorimide ใน acetate bufferได้สีน้ำเงิน และวิธีนี้มีความไวเท่ากับ 250 นาโนกรัม

3.2 Titrimetric Method

เป็นวิธีที่ได้ระบุไว้ใน USP. โดยจะออกซิไดส์ไพริดอกซินด้วย Mercuric acetate ก่อน จากนั้นทำการไทเทรตด้วยกรด perchloric ในกรดน้ำส้มเข้มข้น โดยใช้ crystal violet เป็น อินดิเคเตอร์

3.3 Spectrophotometric assay

วิตาเมอร์ทั้งหลายในน้ำ จะถูกดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตสูงสุดที่ 291 นาโนเมตร

3.4 Fluorometric method

มีความไวสูงกว่า colorimetry สามารถทำได้หลายแบบคือ

- Native fluorescence of $B_6$ vitamers
- Pyridoxic acid lactone fluorescenceวัดเฉพาะกรดไพริดอกซินที่มีความไว 10-120 นาโนกรัม
- Cyanohydrin fluorescence assay วัดไพริดอกซาล และอนุพันธ์ฟอสเฟตของมัน มีความไว 10-120 นาโนกรัม

4. การใช้เอนไซม์ (Enzyme reactivation method)

เป็นวิธีใหม่มีความจำเพาะเจาะจงสูง และไม่แพร่หลายนัก ซึ่งจะไม่ขอกล่าวถึง ณ ที่นี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ก. การนำไปใช้**

Pyridoxine HCl USP. จะใช้ป้องกัน และรักษาการขาดวิตามินบีหก และวิตามินบีรวม โดยใช้ป้องกันในขนาด 2 มิลลิกรัมต่อวัน และใช้รักษาในขนาด 10-50 มิลลิกรัมต่อวัน รวมทั้งใช้แก้อาการชักในเด็ก (convulsive seizure due to pyridoxine dependency) ในขนาด 100 มิลลิกรัมต่อวัน และใช้รักษาโรคโลหิตจางชนิด refractory hypochromic หรือ megaloblastic anemia ในหมู่ผู้ป่วยที่ไม่ได้ขาดธาตุเหล็ก และรักษาโดยสารอื่นไม่ได้ผล จะใช้ 100-200 มิลลิกรัมต่อวัน นอกจากนี้ยังใช้ป้องกัน และรักษาโรค peripheral neuritis ในผู้ป่วยวัณโรคซึ่งรับ isoniazid ได้ด้วย ในขนาด 100-200 มิลลิกรัมต่อวัน

การใช้ควบคุมการคลื่นไส้อาเจียน ในสตรีมีครรภ์ หรือในกรณีของ radiation sickness การใช้รักษาสิว , ป้องกัน artherosclerosis ฯลฯ ยังไม่ยืนยัน

เนื่องจากวิตามินบีหกต่อต้านฤทธิ์ของ Levodopa ดังนั้นผู้ป่วยโรค Parkinson's ที่รับยานี้จึงไม่ควรใช้วิตามินที่มีไพริดอกซินรวมอยู่ด้วย

รูปแบบที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนี้คือ ยาเม็ด และ ยาฉีด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# การดำเนินการวิจัย และงานวิจัย

## 3.1 วัตถุดิบ และสารเคมี

วัตถุดิบมีดังนี้

- นมผงพร้อมมันเนย
- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)
- น้ำส้มคั้น
- ตับบด
- ข้าวสาลี

สารเคมีได้แก่

- เมทานอล ความเข้มข้น 1% และ 3 % โดยปริมาตร
- โซเดียมเปอร์คลอเลต 0.12 โมลาร์
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส 0.05โมลาร์
- ไพริดอกซิน-5-ฟอสเฟต
- ไพริดอกซามีน-5-ฟอสเฟต
- ไพริดอกซิน
- ไพรีดอกซาล
- ไพรีดอกซามีน
- โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50% โดยปริมาตร
- กรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 อุปกรณ์

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด
- High Performance Liquid Chaomatography (HPLC) Model LC-6AD Shimadzu
- Sonicator bath
- Filtration pump
- Vortex
- บิวเรต
- ฟลาสก์
- บีกเกอร์
- ปิเปต
- ชุดกรอง
- กระดาษกรอง
- แท่งแก้ว
- กรวยกรอง
- ขวดวัดปริมาตร
- กระบองตวง
- Evaporator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.3.1. การศึกษาสัดส่วนของเมทานอล ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของสารละลายระบบตัวพาในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีหก โดยวิธี HPLC

1. กำหนดสภาวะการทดสอบโดยตั้งความยาวคลื่นที่ 210 นาโนเมตร,sensivityเท่ากับ 0.08 และค่าอัตราการไหลของสารละลายตัวพาเท่ากับ 1.0 มล/นาที
2. เตรียมสารละลายมาตราฐานของ ไพริดอกซิน , ไพริดอกซามีน , ไพริดอกซาล , ไพริดอกซาล-5-ฟอสเฟส , ไพริดอกซามีน-5-ฟอสเฟต ในรูปของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล โดยมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. เตรียมสารละลายระบบตัวพาที่ประกอบด้วย โซเดียมเปอร์คลอเรต 0.12 โมลาร์ , โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส 0.05 โมลาร์ และเมทานอล (HPLC grade) ที่มีความเข้มข้น 0 , 1 , 3 เปอร์เซนต์ตามลำดับ
4. ฉีดสารละลายอนุพันธ์วิตามินมาตราฐานที่อยู่ในรูปกรดไฮโดรคลอริกทั้ง 5 ชนิดโดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สำหรับสารละลายระบบตัวพาที่มีเมทานอล 0 , 1 และ 3 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตรตามลำดับ
5. บันทึกค่าที่ได้จาก data processor โดยบันทึกค่าระหว่าง Retention time และชนิดของสารละลายระบบตัวพาที่มีเมทานอล 0 , 1 , 3 เปอร์เซนต์ตามลำดับ
6. เลือกสารละลายระบบตัวพาที่ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.3.2. การศึกษาหาอัตราการไหลของสารละลายระบบตัวพาที่เหมาะสม ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาวิตามินบีหก โดย HPLC**

1. กำหนดสภาวะการทดสอบโดยตั้งความยาวคลื่นที่ 210 นาโนเมตร,ค่า sensitivity เท่ากับ 0.08 และค่าอัตราการไหลของสารละลายระบบตัวพาที่ 0.4 , 0.6 , 0.8 , 1 มล.ต่อนาที ตามลำดับ
2. ใช้สารละลายไฮโดรคลอไรด์ของอนุพันธ์ของวิตามินบีหกทั้ง 5 ชนิดคือ ไพริดอกซิน , ไพริดอกซาล , ไพริดอกซามีน , ไพริดอกซาล-5-ฟอสเฟต และไพริดอกซามีน-5-ฟอสเฟต ที่ได้จากการทดลองในตอนที่ 3.3.1
3. ใช้สารละลายระบบตัวพาที่ประกอบด้วย โซเดียมเปอร์คลอเรต 0.12 โมลาร์ , โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 โมลาร์ และเมทานอลที่เหมาะสมที่หาได้จากการทดลองตอนที่ 3.3.1
4. ฉีดสารละลายมาตรฐานของอนุพันธ์วิตามินบีหกทั้ง 5 ชนิดที่ปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยปรับอัตราการไหลของสารละลายระบบตัวพาของเครื่อง HPLC ที่ 0.4 , 0.6 , 0.8 , 1.0 มล.ต่อนาที ตามลำดับ
5. บันทึกค่าที่ได้จาก data processor โดยบันทึกค่าระหว่าง retention time และอัตราการไหลของสารละลายระบบตัวพาต่าง ๆ
6. เลือกสภาวะที่ทำให้ chromatogram แยกจากกันได้ดีที่สุด และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.3. การทำกราฟมาตราฐานในการวิเคราะห์หาวิตามินบีหกโดยวิธี HPLC

1. กำหนดสภาวะการทดลองโดยใช้ความยาวคลื่นที่ 210 นาโนเมตร, ค่าsensitivity เท่ากับ 0.08 และ อัตราการไหลของสารละลายระบบตัวพาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในตอนที่แล้ว
2. ใช้สารละลายระบบตัวพาที่เหมาะสมที่หาได้จากการทดลองในข้อที่ 1
3. ฉีดสารละลายมาตราฐานของไพริดอกซินเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ปริมาณ 2 , 4 , 6 , 8 , 10 , 12 , 14 และ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ
4. บันทึกค่าที่ได้จาก data processor
5. นำค่าข้อมูลที่ได้สร้างกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ ( area ) กับ ปริมาณไพริดอกซิน (ไมโครกรัม)
6. ทำซ้ำจากข้อ 1-5 สำหรับ ไพริดอกซาล , ไพริดอกแซมมิน , ไพริดอกซาล-5-ฟอสเฟต , ไพริดอกแซมมิน-5-ฟอสเฟต ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.4. ศึกษาหาวิธีการสกัดวิตามินบีหกที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วย HPLC

1. ใช้นมผงพร้อมมันเนยจำนวน 2 กรัมละลายในกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 6 มิลลิลิตร โดยทำในสภาวะที่เย็นและไม่มีแสง (หรือสลัว ๆ)
2. นำสารละลายที่ได้ไปทำการปั่นด้วยเครื่องปั่น (vortex) อย่างแรงเป็นเวลา 5 นาที
3. ปรับพีเอชของสารละลายที่ได้ด้วย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 50 % ให้ได้ค่าพีเอช เท่ากับ 3.5 โดยวัดจากเครื่อง pH meter
4. ทิ้งสารละลายที่ได้ไว้ค้างคืน
5. นำสารละลายมากรองด้วยกระดาษกรองหยาบ (whatman เบอร์ 1) และกรองละเอียด (cellulose acetate) ตามลำดับ
6. ทำการระเหยแห้งสารละลายนั้นด้วยเครื่องระเหยแห้ง (evaporator) โดยใช้อุณหภูมิประมาณไม่เกิน 75 องศาเซลเซียส
7. นำสารที่ได้จากการระเหยแห้งมาเติมกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล และมีปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร
8. กรองสารละลายกรดไฮโดรคลอริกด้วย กระดาษกรองละเอียดมาก (cellulose nitrate) ที่มีขนาดของรูผ่านขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยผ่านเข็มฉีดยา (syringe)
9. นำสารที่ได้ฉีด (injection) เข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะ (condition) ที่เลือกแล้วจากตอนที่ 3.3.2 และสารละลายตัวพาที่เหมาะสมที่เลือกแล้วจากตอนที่ 3.3.1
10. ดูค่า retention time จาก data processor โดย retention time ตัวใดที่มีค่าเท่ากับค่า retention time ของสารอนุพันธ์มาตราฐานของวิตามินบีหกทั้ง 5 ตัวบ้าง บันทึกค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area) จาก data processor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. ถ้าสารละลายตัวอย่างมีค่า retention time ตรงกับของสารอนุพันธ์มาตราฐานตัวใด ให้นำสารละลายของสารอนุพันธ์ตัวนั้น ผสมกับสารละลายตัวอย่างแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC
12. ถ้าช่วงของ retention time ของสารละลายผสมนี้มีปริมาณพื้นที่ใต้กราฟเพิ่มขึ้น ณ จุดที่สงสัยแสดงว่า สารละลายตัวอย่างมีอนุพันธ์ของวิตามินบีหกชนิดนั้น ๆ อยู่
13. อ่านค่าพื้นที่ใต้กราฟจากข้อ 10 เป็นปริมาณของวิตามินบีหกโดยกราฟมาตราฐานจากตอนที่ 3.3.3
14. ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นแต่ใช้การแปรผันของการ vortex ที่เวลา 10 และ 15 นาที และการ centrifuge ที่เวลา 5 , 10 และ 15 นาที ตามลำดับ
15. เลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.3.5. ศึกษาชนิดและปริมาณของวิตามินบีหก ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี HPLC**

1. เตรียมตัวอย่างสารสกัดจากยีสต์ , น้ำส้มคั้น , ตับบด , ข้าวสาลี ปริมาณอย่างละ 2 กรัม หรือ 2 มิลลิลิตร
2. สกัดวิตามินบีหกโดยใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในตอนที่ 3.3.4
3. ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของวิตามินบีหก เช่นเดียวกับข้อ 9-13 ในตอนที่ 3.3.4
4. บันทึกชนิดและปริมาณของวิตามินบีหก จากสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดรวมทั้งนมผงพร้อมมันเนยจากตอนที่ 3.3.4 ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการวิจัย และวิจารณ์

## 4.1 การศึกษาสัดส่วนของเมทานอลที่ใช้เป็นสารละลายของระบบตัวพาในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบีหก โดยใช้วิธีไฮเปอร์ฟอร์เมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC)

จากผลการทดลองที่ได้ (จากตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1) พบว่า อนุพันธ์ของวิตามินบีหกที่เป็น PN , PM และ PL เมื่อเพิ่มสัดส่วนของเมทานอลในสารละลายตัวพา จากจำนวนสัดส่วนของเมทานอลร้อยละ 3 นั้นจะทำให้อนุพันธ์ดังกล่าว หลุดออกจากคอลัมน์เร็วขึ้นตามลำดับ ในขณะที่อนุพันธ์ของวิตามินบีหกที่เป็น PLP และ PMP เมื่อเพิ่มสัดส่วนของเมทานอลจาก 0 เป็น 1 นั้นจะมีผลทำให้อนุพันธ์ดังกล่าวออกจากคอลัมน์เร็วขึ้นในขณะที่มีการเพิ่มสัดส่วนของเมทานอลมากกว่าร้อยละ 1 นั้นจะกลับทำให้สารอนุพันธ์ดังกล่าวนี้อยู่ในคอลัมน์นานยิ่งขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจาก

1. ความสามารถในการละลายของอนุพันธ์วิตามินบีหกในสารละลายตัวพา
2. ความสามารถในการยึดเกาะกับคอลัมน์

และจากผลการทดลองนี้ จึงเลือกสารละลายตัวพาที่มีสัดส่วนของเมทานอล ในสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 0 % ในการศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสม ต่อการวิเคราะห์อนุพันธ์ของวิตามินบีหกในสารอาหารต่าง ๆ เนื่องมาจาก สารละลายตัวพาที่ประกอบด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริกอย่างเดียวสามารถแยกสารอนุพันธ์วิตามินบีหกออกจากกันได้มากกว่าสารละลายตัวพาที่มีสัดส่วนของเมทานอลอื่น ๆ ประกอบกับสารละลายตัวกล่าวมีราคาถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบเวลาของอนุพันธ์วิตามินบีหก ที่มีอยู่ในคอลัมน์ $C_{18}$ เมื่อใช้สัดส่วนของเมทานอลในสารละลายตัวพาต่าง ๆ กัน

| retention time / condition | PN | PL | PLP | PM | PMP |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.12N $NaClO_4$ 0.05N $KH_2PO_4$ | 21.430 | 14.100 | 11.800 | 6.105 | 3.912 |
| 1% Methanol 0.12N $NaClO_4$ 0.05N $KH_2PO_4$ | 17.083 | 11.550 | 10.800 | 5.472 | 3.692 |
| 3% Methanol 0.12N $NaClO_4$ 0.05N $KH_2PO_4$ | 15.230 | 10.483 | 11.325 | 4.967 | 4.975 |

หมายเหตุ: PN คือ Pyridoxine (ไพริดอกซิน)

PL คือ Pyridoxal (ไพริดอกซาล)

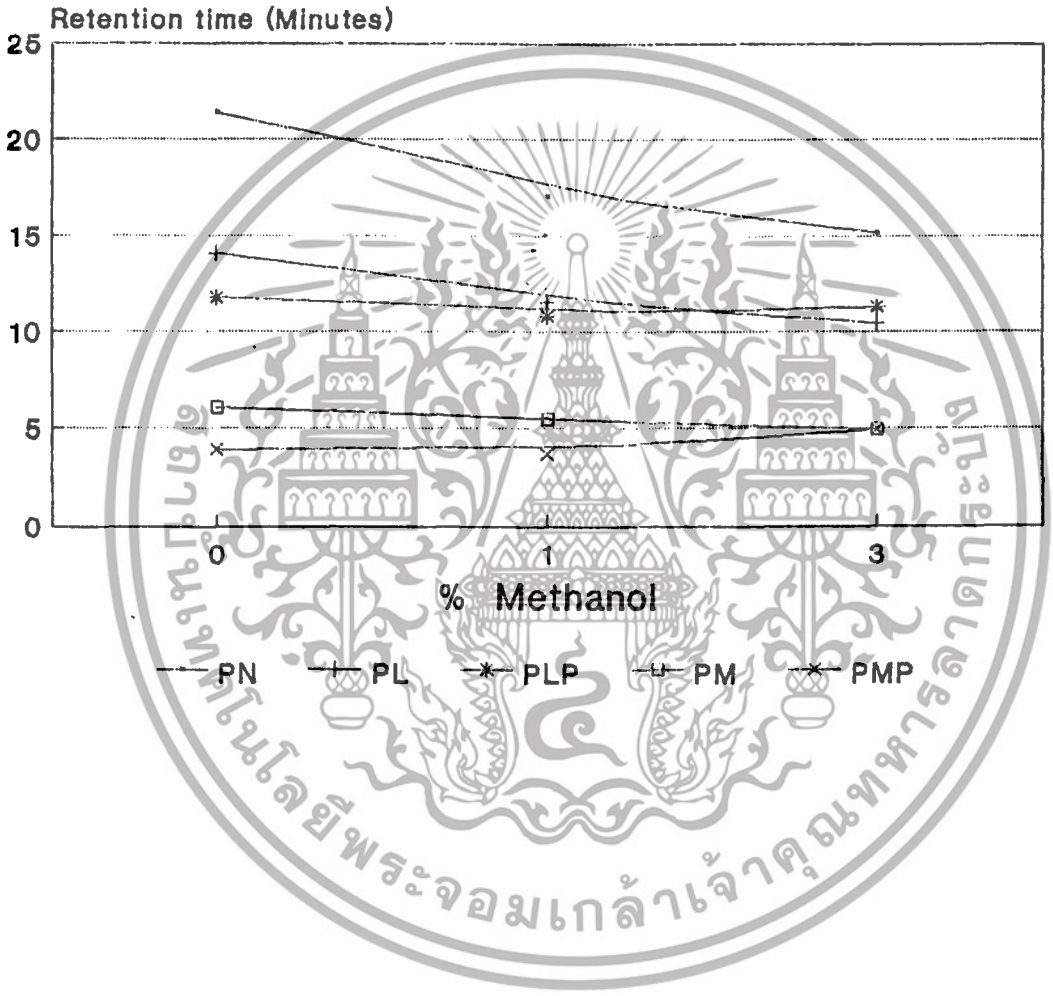
PM คือ Pyridoxamine (ไพริดอกซามีน)

PLP คือ Pyridoxal-5-phosphate (ไพริดอกซาล-5-ฟอสเฟต)

PMP คือ Pyridoxmine-5-phosphate (ไพริดอกซามีน-5-ฟอสเฟต)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบเวลาของอนุพันธ์วิตามินบีหกที่อยู่ในคอลัมน์ $C_{18}$ เมื่อใช้สัดส่วนของเมทานอลในสารละลายตัวพาต่าง ๆ กันที่อัตราการไหลของตัวพาที่ 1 มล.ต่อนาที




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การศึกษาอัตราการไหลของสารละลายตัวพาที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์วิตามินบีหก โดยใช้วิธีไฮเปอร์ฟอร์เมนซ์โครมาโตรกราฟี (HPLC)

จากผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2) พบว่า อนุพันธ์มาตราฐานต่าง ๆของวิตามินบีหกเมื่อเพิ่มอัตราความเร็วของการไหลระบบตัวพาที่ประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์อย่างเดียวจาก 0.4 เป็น 0.6 , 0.8 และ 1มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ เราจะพบว่ายิ่งอัตราการไหลของระบบตัวพาลดลงจะทำให้สารละลายอนุพันธ์มาตราฐานของวิตามินบีหกมีเวลาอยู่ในคอลัมน์นานยิ่งขึ้น และจะได้โครมาโตรแกรมชัดเจนยิ่งขึ้น แต่จากการทดลองพบว่า ถ้าอัตราการไหลเป็น 0.4 และ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาทีจะทำให้ เวลาของสารอนุพันธ์มาตราฐานของวิตามินบีหกอยู่ในคอลัมน์นานเกินไป ทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์ แต่ถ้าอัตราการไหลเป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จะทำให้โครมาโตรแกรมไม่ชัดเจนเท่าที่ควร ดังนั้นอัตราการไหลที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาทีจึงเป็นอัตราการไหลที่เหมาะสม และเร็วที่สุดที่ให้ค่าโครมาโตรแกรมได้ชัดเจนสุด

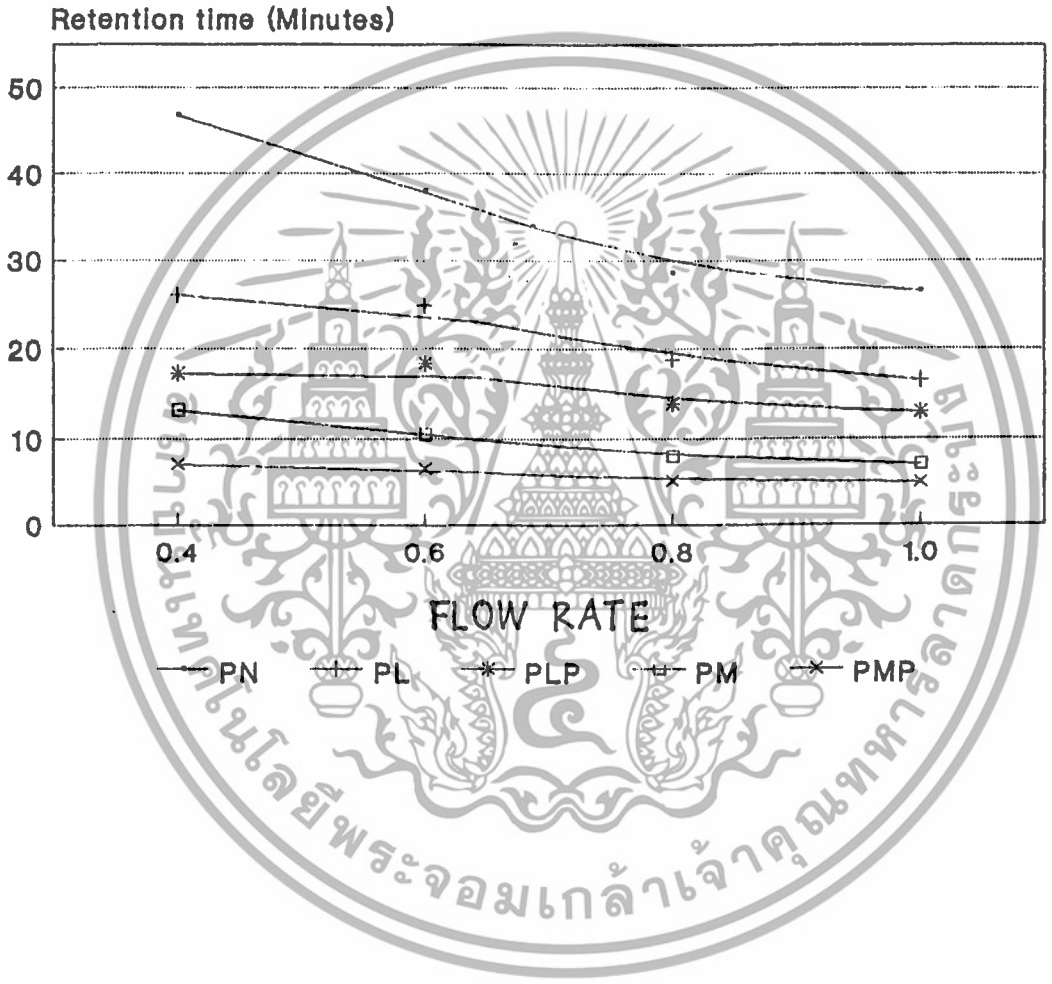
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบเวลาของอนุพันธ์วิตามินบีหกที่อยู่ในคอลัมน์ $C_{18}$ เมื่อใช้อัตราการไหลของระบบตัวพาที่ต่าง ๆ กัน

| flow rate | Retention time (minute) | | | |
|---|---|---|---|---|
| standard | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| Pyridoxine | 46.857 | 38.005 | 28.497 | 26.491 |
| Pyridoxal | 25.910 | 24.777 | 18.790 | 16.492 |
| Pyridoxal 5-phosphate | 17.263 | 18.357 | 13.982 | 12.967 |
| Pyridoxamine | 13.186 | 10.460 | 7.973 | 7.055 |
| Pyridoxamine 5-phosphate | 7.013 | 6.570 | 5.010 | 4.937 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบเวลาของอนุพันธ์วิตามินบีหก ที่อยู่ในคอลัมน์ $C_{18}$ เมื่อใช้อัตราการไหลของระบบตัวพาที่ต่าง ๆ กัน




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.3 การทำกราฟมาตราฐาน ( standard curve ) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีหกโดยวิธีไฮเปอร์ฟอร์เมนซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟี (HPLC)**

จากการทดลองในตอนที่ 3 สามารถบันทึกค่าระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟและปริมาณของอนุพันธ์ของวิตามินบีหกในการฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในแต่ละครั้งได้ตามตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณพื้นที่ใต้กราฟและปริมาณสารอนุพันธ์ของวิตามินบีหกชนิดต่าง ๆ

| ปริมาณสาร (ไมโครกรัม) | พื้นที่ใต้กราฟ (area) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | PN | PL | PLP | PM | PMP |
| 2 | 541495 | 102638 | 48492 | 14262 | 261293 |
| 4 | 587123 | 166219 | 81273 | 17249 | 294138 |
| 6 | 600116 | 200119 | 76442 | 199360 | 320010 |
| 8 | 621009 | 280012 | 94137 | 201267 | 341129 |
| 10 | 665485 | 294489 | 115457 | 236921 | 377895 |
| 12 | 685291 | 314276 | 131123 | 241122 | 389131 |
| 14 | 709216 | 324116 | 162365 | 253129 | 401176 |
| 20 | 731628 | 331496 | 192199 | 279913 | 421132 |

หมายเหตุ PN คือ Pyridoxine (ไพริดอกซิน)

PL คือ Pyridoxal (ไพริดอกซาล)

PLP คือ Pyridoxal-5-phosphate (ไพริดอกซาล-5-ฟอสเฟต)

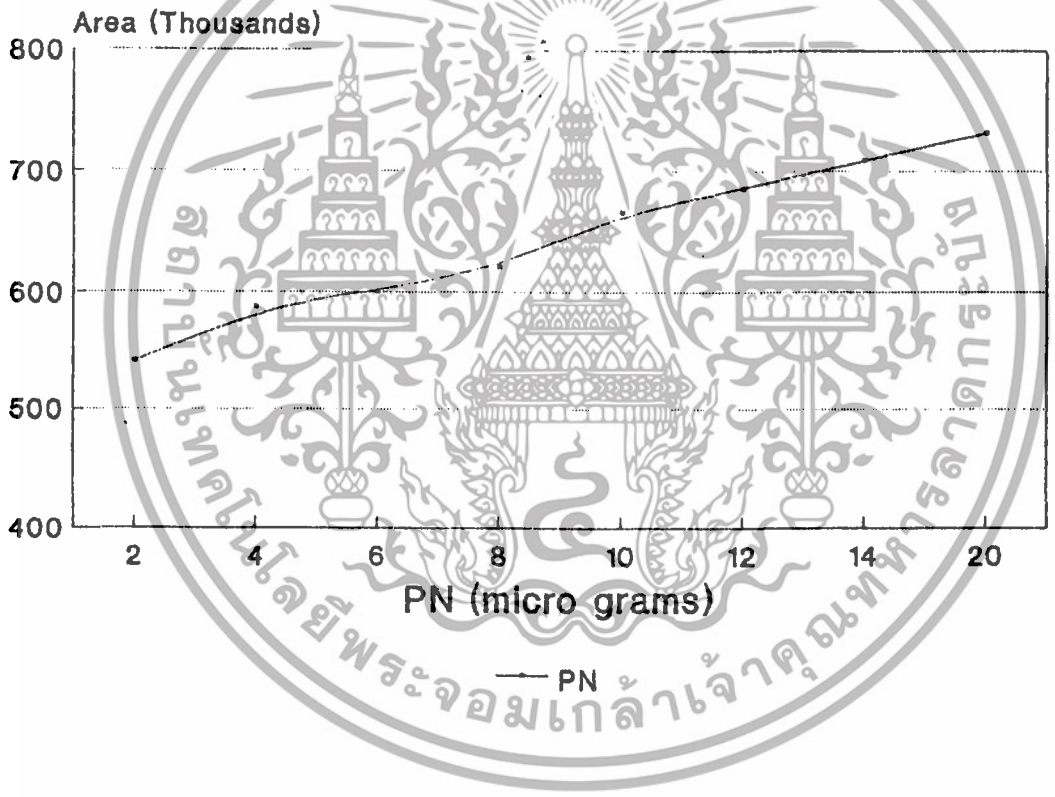
PM คือ Pyridoxamine (ไพริดอกแซมมิน)

PMP คือ Pyridoxamine-5-phosphate (ไพริดอกแซมมิน-5-ฟอสเฟต)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

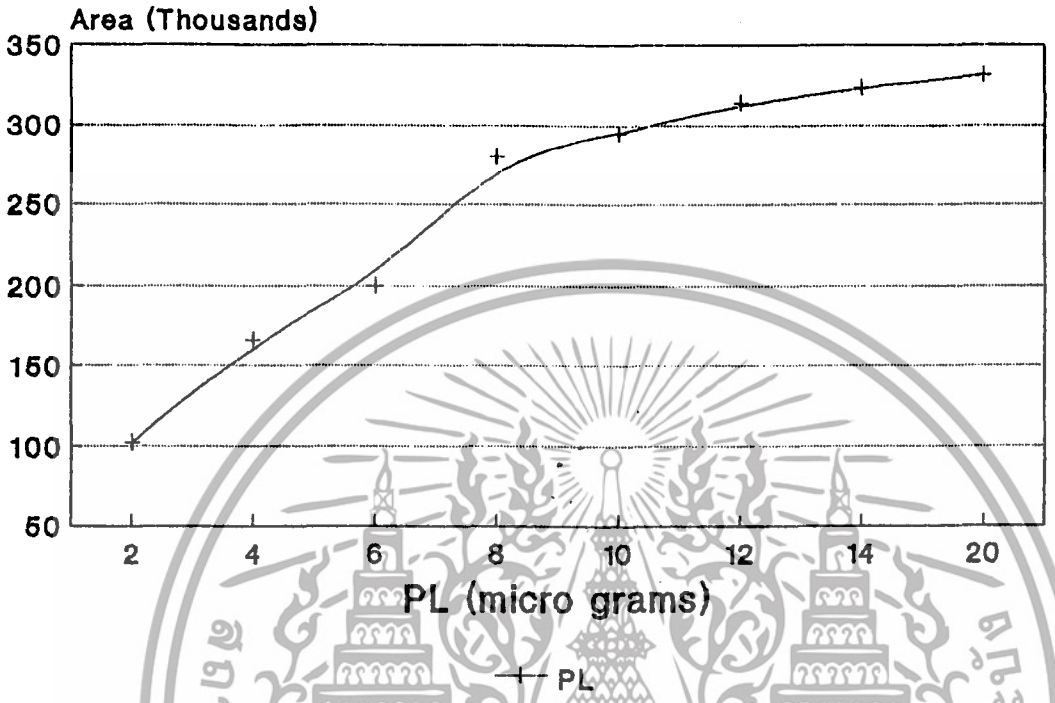
จากตารางที่ 4.3 สามารถหากราฟมาตราฐานระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟและปริมาณอนุพันธ์วิตามินบีหกชนิดต่าง ๆ ได้ดังรูปที่ 4.3.1 , 4.3.2 , 4.3.3 , 4.3.4 และ 4.3.5 ตามลำดับ

รูปที่ 4.3.1 กราฟมาตราฐานระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟและปริมาณไพริดอกซิน (ไมโครกรัม)

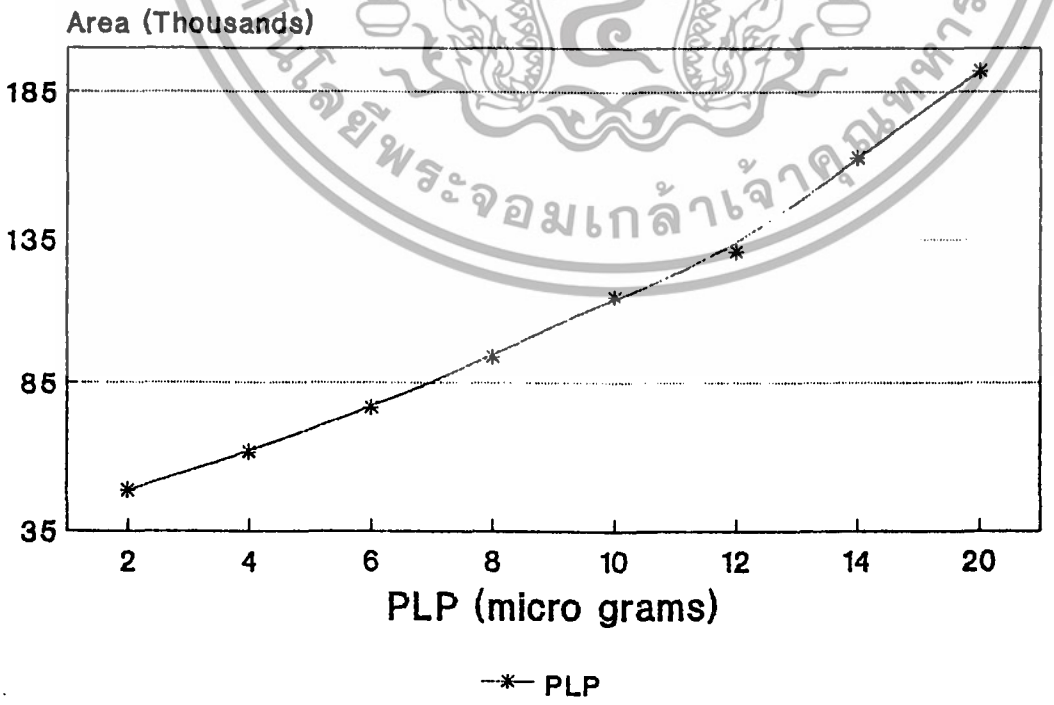



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3.2 กราฟมาตราฐานระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟและไพริดอกซาล (ไมโครกรัม)

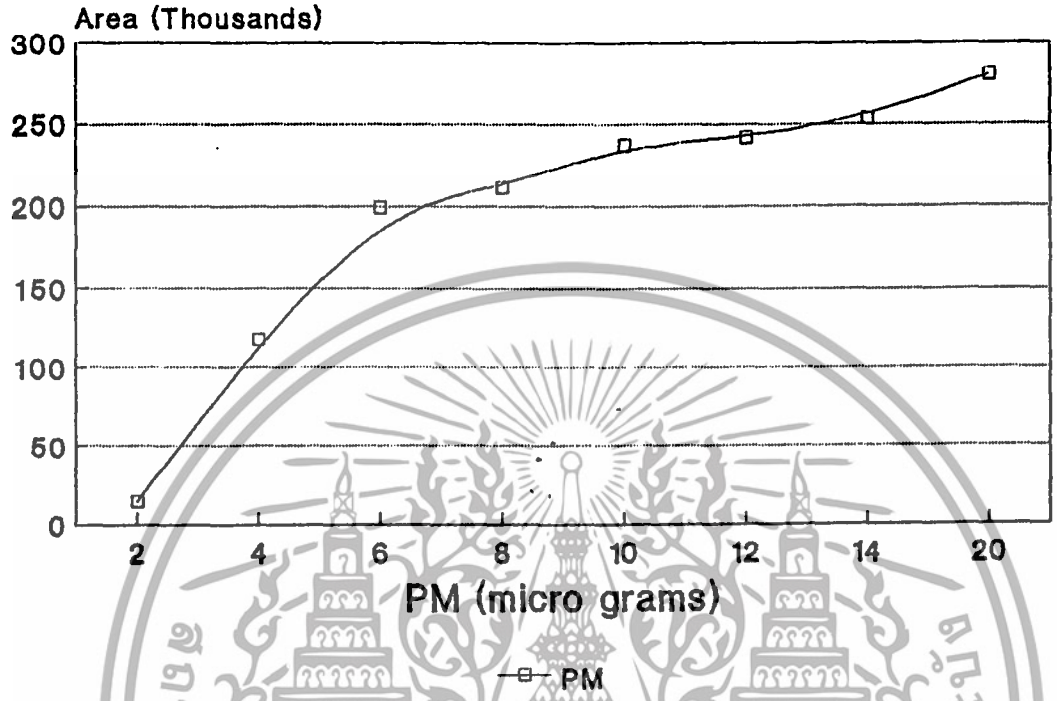



รูปที่ 4.3.3 กราฟมาตราฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและปริมาณไพริดอกซาลฟอสเฟต (ไมโครกรัม)

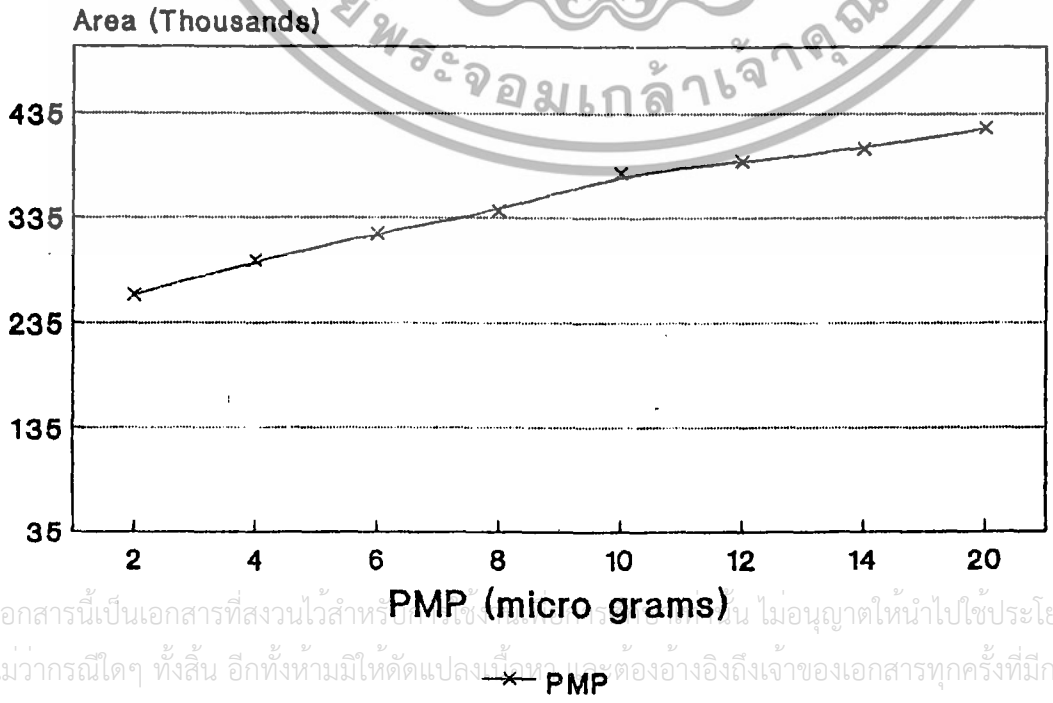



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3.4 กราฟมาตราฐานระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟและปริมาณไพริดอกแซมมิน (ไมโครกรัม)




รูปที่ 4.3.5 กราฟมาตราฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและปริมาณไพริดอกแซมมินฟอสเฟต(ไมโครกรัม)




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.4.การศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมของวิตามินบีหกโดยวิธีไฮเปอร์ฟอร์เมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC)**

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าการสกัดโดยการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่เวลา 10 นาที สามารถสกัดปริมาณอนุพันธ์วิตามินบีหก ออกมาได้มากกว่าที่จะสกัดโดยใช้ เครื่องปั่นและการสกัดโดยการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่เวลา 10 นาทีก็เพียงพอต่อการสกัดแล้ว

ดังนั้นการสกัดโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่เวลา 10 นาที จึงเป็นวิธีการสกัดที่เหมาะสม ซึ่งจะเห็นได้ว่า ยิ่งใช้ความแรงของการสกัดมากเท่าใด ความสามารถในการสกัดสารก็มีมากขึ้นตามไปด้วย และนอกจากนี้ยังพบว่า ในนมผงพร้อมมันเนยที่ได้ทำการทดลองไปแล้วนั้น จะพบแต่อนุพันธ์ของวิตามินบีหกชนิดไพริดอกซาล ซึ่งโดยทั่วไปแล้วนมผงพร้อมมันเนยทั่ว ๆ ไปควรจะพบ ไพริดอกซามีน และไพริดอกซินด้วยแต่อาจพบในปริมาณน้อยอาจมีสาเหตุมาจากการสูญเสียสภาพ และการถูกทำลายไประหว่าง กระบวนการสกัดวิตามินบีหกโดยการผ่านการระเหยแห้ง (Hodson, 1956)

ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบวิธีการสกัดชนิดต่าง ๆ ของปริมาณ และชนิดของอนุพันธ์วิตามินบีหกชนิดต่าง ๆ โดยใช้นมผงพร้อมมันเนยเป็นสารตัวอย่าง

| วิธี | เวลา (นาที) | ปริมาณวิตามิน (มก.ต่อ100 มล. PN | PL |
|---|---|---|---|
| การปั่น | 5 | 6.91 | 2.12 |
| | 10 | 7.30 | 4.99 |
| | 15 | 9.20 | 6.31 |
| การหมุนเหวี่ยง | 5 | 7.60 | 5.29 |
| | 10 | 10.01 | 7.10 |
| | 15 | 10.20 | 7.30 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.5 การศึกษาปริมาณ และชนิดของอนุพันธ์วิตามินบีหกในตัวอย่างอาหารชนิดต่าง ๆ โดยวิธีทางไฮเปอร์ฟอร์เมนซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟี (HPLC)

จากตารางที่ 4.5 จะพบว่าตับบดจะมีปริมาณอนุพันธ์ของวิตามินบีหกมากที่สุด โดยมีปริมาณของไพริดอกซิน , ไพริดอกซาล และ ไพริดอกซามีน มากตามลำดับ ส่วนตัวอย่างอาหารชนิดอื่น เช่น ข้าวสาลี และ สารสกัดจากยีสต์ มีอนุพันธ์วิตามินบีหกเพียงชนิดเดียว สำหรับนมผงขาดมันเนย และน้ำส้มคั้นจะมีอนุพันธ์วิตามินบีหกเพียง 2 ชนิด จะเห็นได้ว่าปริมาณและชนิดของอนุพันธ์วิตามินบีหกจะมีมากหรือน้อยนอกจากจะขึ้นกับชนิดของอาหารแล้ว ยังขึ้นอยู่กับกรรมวิธีการสกัดว่ามีการสัมผัสแสงมากน้อยเพียงใดเพราะวิตามินบีหกจะสลายเมื่อถูกแสง โดยเฉพาะไพริดอกซาล-5-ฟอสเฟต นอกจากนี้แล้วยังขึ้นกับวิธีและกรรมวิธีการผลิตของตัวอย่างอาหารชนิดนั้น ๆ อีกด้วย

ตารางที่ 4.5 แสดงชนิด และปริมาณวิตามินบีหก ในตัวอย่างอาหารชนิดต่าง ๆ

| ตัวอย่างอาหาร | ปริมาณของวิตามิน (mg/100ml) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | PN | PM | PL | PLP | PMP |
| นมผงพร้อมมันเนย | 10.01 | – | 7.10 | – | – |
| ตับบด | 21.96 | 3.67 | 12.19 | – | – |
| น้ำส้มคั้น | 2.10 | – | 0.98 | – | – |
| ข้าวสาลี | – | 2.01 | – | – | – |
| สารสกัดจากยีสต์ | 2.16 | – | – | – | – |

หมายเหตุ : PN คือ Pyridoxine (ไพริดอกซิน)

PM คือ Pyridoxamine (ไพริดอกซามีน)

PMP คือ Pyridoxamine-5-phosphate (ไพริดอกซามีน-5-ฟอสเฟต)

PL คือ Pyridoxal (ไพริดอกซาล)

PLP คือ Pyridoxal-5-phosphate (ไพริดอกซาล-5-ฟอสเฟต)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสภาวะ วิธีการสร้าง ชนิดและปริมาณของวิตามินบีหกโดยวิธีไฮเปอร์ฟอร์เมนซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟี (HPLC) นั้นสามารถจะบ่งบอกได้ว่า

1. สภาวะในการสกัด ควรจะมีการสกัดโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) เนื่องจากความแรงของเครื่องหมุนเหวี่ยงจะทำให้การสกัดสามารถสกัดออกมาได้มากที่สุด และควรใช้เวลาประมาณ 10 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่เหมาะสม
2. สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC นั้นควรวัดปริมาณวิตามินที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร , ค่า sensitivity เท่ากับ 0.08 , ค่าอัตราการไหลของระบบตัวพาคือ 0.08 มล.ต่อนาที และสารละลายระบบตัวพาที่ใช้คือโซเดียมเปอร์คลอเรต 0.12 โมลาร์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 โมลาร์ ซึ่งก็ถือได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการวิเคราะห์วิตามินด้วยเครื่อง HPLC
3. จากการทดลองจะทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบีหกโดยเครื่อง HPLC ได้โดยวิเคราะห์ปริมาณสารวิตามินบีหกจากกราฟมาตราฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ และปริมาณสารที่ได้จากการทดลอง
4. ชนิดของตัวอย่างอาหารจะมีวิตามินบีหกทั้งปริมาณ และชนิดของอนุพันธ์แตกต่างกันไป ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด ความร้อน แสง กระบวนการผลิตตัวอย่างอาหารชนิดนั้น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แสง จัดได้ว่าเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้อนุพันธ์ของวิตามินบีหกสลายไป โดยเฉพาะไพริดอกซาล-5-ฟอสเฟต จะสลายตัวได้เร็วกว่าอนุพันธ์ตัวอื่น จึงไม่ค่อยตรวจพบในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก

## การเตรียมสารละลายเคมีต่าง ๆ

### สารละลายที่ใช้เป็นสารละลายระบบตัวพา (Mobile Phase)

1.1 สารละลายเมทานอลที่มีความเข้มข้น 1% และ 3%

เตรียมโดย ละลายสารละลายเมทานอลที่ผ่านการกรองแล้ว 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น HPLC 99 ส่วนหรือละลายสารละลายเมทานอลที่ผ่านการกรองแล้ว 3 ส่วนต่อน้ำกลั่น HPLC 97 ส่วน ตามลำดับ

1.2 สารละลาย sodium perchlorate ($NaClO_4$) 1M

โดยการชั่งสาร sodium perchlrorate 14.69 กรัม ละลายในน้ำกลั่น HPLC 1 ลิตร

1.3 สารละลาย hydrochloric acid (HCl) 0.01N

โดยการละลายไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 37 % จำนวน 0.82 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.4 สารละลายเข้มข้นของ perchloric acid ($HClO_4$) 1M

ขวดหนึ่งมีฉลากติดอยู่ข้างขวดว่า กรัมน้ำหนักสูตรเท่ากับ 100.46

ถ.พ. = 1.60 และมีปริมาณ $HClO_4$ อยู่ 70% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

ดังนั้นต้องเตรียม $HClO_4$ จำนวน 84.726 มิลลิลิตรแล้วทำให้เป็น 1ลิตรด้วยน้ำ

1.5 สารละลายบัฟเฟอร์ potassium dihydrogenphosphate ($KH_2PO_4$) 0.05M

ละลาย $KH_2PO_4$ จำนวน 68.045 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

1.6 สารละลายด่าง potassium hydroxide (KOH) 50%

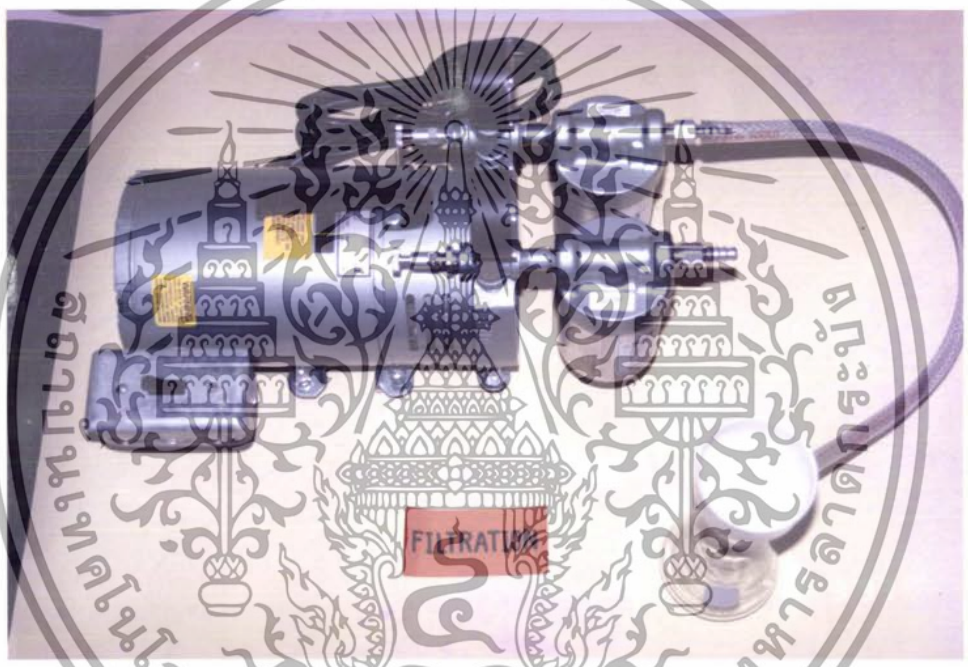
ชั่ง KOH จำนวน 50 กรัมละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข
# ภาพแสดงอุปกรณ์สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ ข.1 เครื่อง HPLC ที่ใช้ในการทดลองรุ่น LC-6AD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ ช.2 ชุดเครื่องกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ข.3 อ่าง ultrasonic cleaner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ข.4 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ข.5 เครื่องระเหยแห้ง (evaporator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง


1. Birch, M., and Gyorgy, J.F., *J.Chromatogr.* 176,109 (1938).
2. Cohen, H., and Lapointe, M., *J.Chromatogr.Sci.* 17, 510 (1952).
3. Elming, K.A., and Kaas, E., *Anal.Biochem.* 51,43 (1938).
4. Gyorgy, J.F., III, *Anal.Biochem.* 102,374-379 (1933).
5. Harris, H.F., *Clin. Endocrinol.5,Suppl.* 979 (1944).
6. Harris, H.F., *Clin. Endocrinol.8,Suppl.* 990 (1962).
7. Harris, H.F., and Folkers, A.C., *Clin.Endocrinol.11,Suppl.* 920 (1939).
8. Hodson, H.R., and D.R. Bakers, *J.Chromatogr.Sci.* 11,618 (1956).
9. Jones, J.A., and Eriksson, M., *Acta.Phram.Suec.*15,274 (1951).
10. Jones, J.A., and Kornfeld, *Acta.phram.Suec.* 19,548 (1951).
11. Keresztesy, G.R., and Stevans, T.D., *J.Chromatogr.*186,259 (1943).
12. Kuhn, M.J., Schmit, J.A., and Bjorgon, H.R., *J.Chromatogr.* 200, 293 (1939).
13. Kuhn, M.J., and Wendt, D.I., *J.Pharmacol.Exp.Ther.*209,330 (1938).
14. Lepkovsky, P.C., *J.Chromatogr.* 176,488 (1938).
15. Lepkovsky, P.C., and McMurray, C.H., *J.Chromatogr.* 187,55 (1938).
16. Morita, E., and Mizuno, (N.Y), *J.Chromatogr.* 202,134-138 (1980).
17. Morri, K., and Makins, I.S., *Anal.Chem.* 51,43 (1939).
18. Mowat, J.A.F., and Tartiva, K.A., *J.Phram.Soc.* 65,204 (1943).
19. Snell, R., Matsuayama, N., and Okano, T., *J.Nutr.Sci.Vitaminol.* 25,469 (1942).
20. Tadera, K.J., and Naka, Y.C., *Agric.Biol.Chem.* 55(2) 563-564 (1991).
21. Viscontini, Y., and Alicino, N.J., *J.Vit.Nutr.Res.* 49,35 (1951).
22. Wiardi, N.Y.K., *J.Chromatogr.* 55,272 (1936).


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้