สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์วิตามินอีในน้ำมันพืช

น.ส. กมลมาศ ศรีขวัญ
น.ส. วิมลวรรณ แก้วอุ่นเรือน

วิ.
ก136ก
2548

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 107708
วัน,เดือน,ปี 10 พ.ค. 2553

b.12211096
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม – เครื่องมือวิเคราะห์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Determination of Vitamin E in Vegetable Oil

Kamonmas Srikwan

Wimonwan Keawaunrean

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Degree of Bachelor of Science

Industrial Chemistry – Analytical Instrumentation

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การวิเคราะห์วิตามินอีในน้ำมันพืช
นักศึกษา	น.ส. กมลมาศ ศรีขวัญ รหัส 45050666
	น.ส. วิมลวรรณ แก้วอุ่นเรือน รหัส 45050698
ภาควิชา	เคมี
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม – เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2548
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อ. พรทิพย์ ศัพทอนันต์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังอนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ดร. วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ	.....
กรรมการ	รศ. สิริภัค สระตันตี์	.....
กรรมการ	รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล	.....
กรรมการ	อ. พรทิพย์ ศัพทอนันต์	.....

.....

(ผศ.ดร. ประยงค์ ดวงดี)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การวิเคราะห์วิตามินอีในน้ำมันพืช

นักศึกษา น.ส. กมลมาศ ศรีขวัญ รหัส 45050666

น.ส. วิมลวรรณ แก้วอุ่นเรือน รหัส 45050698

ภาควิชา เคมี

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม – เครื่องมือวิเคราะห์

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อ. พรทิพย์ ศัพทอนันต์

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้เป็นการวิเคราะห์วิตามินอีในน้ำมันพืชโดยเทคนิค HPLC และเทคนิคโวลแทมเมทรี การศึกษาวิตามินอีในน้ำมันพืชโดยเทคนิคโวลแทมเมทรีจะใช้ขั้วทำงาน glassy carbon electrode ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง Ag-AgCl-3 M KCl และแพลทินัมเป็นขั้วไฟฟ้าช่วย พีกของวิตามินอีจากเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรี เป็นพีกของ α-tocopherol ที่ศักย์ไฟฟ้า -650 mV การวิเคราะห์วิตามินอีโดยเทคนิค HPLC ละลายตัวอย่างน้ำมันใน 2-propanol แล้วฉีดเข้าสู่ระบบ โดยใช้สารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ ที่อัตราส่วน 1 : 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลคือ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัด α-tocopherol ด้วยเครื่องตรวจวัดยูวี-วิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

ผลที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0—100 ppm และจากกราฟการเติมสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0—40 ppm โดยเทคนิค HPLC ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9948 และ 0.9994 ตามลำดับ มีปริมาณวิตามินอีในน้ำมันพืชจากการทำกราฟมาตรฐานได้ค่าเท่ากับ 0.010±0.002 % w/w และจากกราฟการเติมสารมาตรฐาน เท่ากับ 0.011±0.002 % w/w และคำนวณขีดจำกัดการตรวจหาและปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ได้จากกราฟมาตรฐานได้ค่าเท่ากับ 8.446 ppm และ 16.8251 ppm ตามลำดับ และจากกราฟการเติมสารมาตรฐาน ได้ค่าเท่ากับ 1.1927 ppm และ 3.9755 ppm ตามลำดับ และจากเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรีเมื่อนำมาทำกราฟมาตรฐานและกราฟการเติมสารมาตรฐาน ที่ช่วงความเข้มข้น 2—10 ppm ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9994 และ 0.9984 ตามลำดับ มีปริมาณวิตามินอีในน้ำมันพืชจากกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และกราฟการเติมสารมาตรฐาน ได้ค่าเท่ากับ 0.0412 % w/w และ 0.0346 % w/w ตามลำดับ คำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจหาและปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานได้ค่าเท่ากับ 0.3094 ppm และ 1.0312 ppm ตามลำดับ และจากกราฟการเติมสารมาตรฐานได้ค่าเท่ากับ 0.5195 ppm และ 1.7317 ppm ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project title DETERMINATION OF VITAMIN E IN VEGETABLE OIL

Student Miss Kamonmas Srikwan ID 45050666

Miss Wimonwan Keawaunrean ID 45050698

Department Chemistry

Major Industrial Chemistry – Analytical Instrumentation

Year 2005

Project advisor Assoc. Prof. Arunee Kongsakpaisal

Ajarn. Porntip Subta-arnan

Abstract

The voltammetric behavior of vitamin E in vegetable oil has been studied at the glassy carbon, as a working electrode, Ag-AgCl-3 M KCl (reference electrode) and a platinum-wire counter electrode. Voltammetric peaks is obtained for α-tocopherol at -650 mV. The HPLC behavior of vitamin E in vegetable oil has been studied by dissolved the vegetable oil in 2–propanol and injected directly onto C-18 column, with methanol and acetonitrile (1:1) as mobile phase, using UV – Visible detector at the wavelength 295 nm.

The standard calibration curve obtained from HPLC technique at range of 0-100 ppm and standard addition at calibration was 0-40 ppm. The linear correlation coefficient (r^2) are 0.9948 and 0.9994, respectively. We found that the vitamin E in vegetable oil are 0.010±0.002 % w/w (standard calibration) and 0.011±0.002 % w/w (standard addition) The detection limit (DL) and quantitation limit (QL) are 1.1927 ppm and 3.9755 ppm, respectively. The concentration range of 2 – 10 ppm are obtained from voltammetry technique, the linear correlation coefficient of standard calibration and standard addition technique are 0.9994 and 0.9984, respectively and the vitamin E in vegetable oil are 0.0412 % w/w and 0.0346 % w/w (standard addition), the detection limit and quantitation limit are 1.1927 ppm and 3.9755 ppm, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะ ช่วยแก้ปัญหา ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีในการทำงาน

ขอขอบพระคุณ ดร. วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ ผศ. คณิตา ตังคณานุรักษ์ รศ. สิริภัค สระตันติ์ อ. พรทิพย์ ศัพทอนันท์ กรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนข้อชี้แนะ จนในที่สุดทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณ คุณกัญญา มงคลโภชน์ และคุณสุภัทร บานเย็น ที่กรุณาสอนวิธีใช้งานเครื่อง HPLC และ Voltammetry ซึ่งมีส่วนสำคัญในการทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณ คุณสุพจน์ ศิวาคม และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่อการทำงานอย่างยิ่ง

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากโครงงานพิเศษเล่มนี้ ขอมอบให้กับบิดามารดาซึ่งเป็นที่เคารพรักยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้ ซึ่งมีค่าอย่างยิ่งต่อการดำรงชีวิตในอนาคต

น.ส. กมลมาศ ศรีขวัญ

น.ส. วิมลวรรณ แก้วอุ่นเรือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญรูป	VI
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**5**
2.1 วิตามินอี	5
2.1.1 หน้าที่ของวิตามินอี	7
2.1.2 ประโยชน์ของวิตามินอี	7
2.1.3 ปริมาณที่แนะนำให้รับประทาน	8
2.1.4 ผลของการได้รับวิตามินอีน้อยเกินไป	9
2.1.5 ผลของการได้รับวิตามินอีมากเกินไป	10
2.1.6 แหล่งอาหารที่มีวิตามินอีมาก	10
2.1.7 ผลของการหุงต้ม	10
2.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	
2.2.1 หลักการ	12
2.2.2 ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC	15
2.2.3 การวิเคราะห์วิตามิน	25
2.2.4 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.5 การใช้ HPLC ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ	27
2.2.6 การเลือกใช้และการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีของเหลว	27
2.2.7 ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการวิเคราะห์	28
2.3 โวลแทมเมทรี	32
2.3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำโวลแทมเมทรี	32
2.3.2 เทคนิคที่สำคัญในการวิเคราะห์โดยโวลแทมเมทรี	34
2.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค solid phase extraction ในการเตรียมตัวอย่างวิตามินอี	40
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	46
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	**48**
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	48
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	49
3.2.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง	49
3.2.1.1 การเตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm	49
3.2.1.2 การเตรียม stock solution ของสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm	49
3.2.1.3 การเตรียม stock solution ของสารละลายกรดซัลฟิวริค 0.1 โมลาร์ในเอทานอล	49
3.2.1.4 การเตรียม stock solution ของสารละลายเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ในเอทานอล	49
3.2.1.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 0.5 ppm	49
3.2.1.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm	50
3.2.1.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm	50
3.2.1.8 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm	50
3.2.1.9 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 20 ppm	50
3.2.1.10 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 40 ppm	50
3.2.1.11 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 60 ppm	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.1.12 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 80 ppm	50
3.2.1.13 การเตรียมสารละลาย standard addition 0 ppm	51
3.2.1.14 การเตรียมสารละลาย standard addition 1 ppm	51
3.2.1.15 การเตรียมสารละลาย standard addition 5 ppm	51
3.2.1.16 การเตรียมสารละลาย standard addition 10 ppm	51
3.2.1.17 การเตรียมสารละลาย standard addition 20 ppm	51
3.2.1.18 การเตรียมสารละลาย standard addition 40 ppm	51
3.2.1.19 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm	51
3.2.1.20 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 2 ppm	51
3.2.1.21 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 4 ppm	52
3.2.1.22 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 8 ppm	52
3.2.1.23 การเตรียมสารละลาย standard addition 0 ppm	52
3.2.1.24 การเตรียมสารละลาย standard addition 1 ppm	52
3.2.1.25 การเตรียมสารละลาย standard addition 2 ppm	52
3.2.1.26 การเตรียมสารละลาย standard addition 4 ppm	52
3.2.1.27 การเตรียมสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล เพื่อใช้เป็นส่วนเคลื่อนที่ สำหรับเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	53
3.2.2 การศึกษาด้วยโวลแทมเมทรี	53
3.2.3 การศึกษาด้วยเทคนิค HPLC ตรวจวัดด้วยยูวี วิสิเบิล ดีเทคเตอร์	54
3.2.4 วิธีการทดลอง	55
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	**56**
4.1 การวิเคราะห์วิตามินอีโดยเทคนิค HPLC	56
4.1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินอี	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.1.1 ศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่	56
4.1.1.2 ศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และเวลารีเทนชัน	57
4.1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี	58
4.1.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน standard addition	59
4.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างน้ำมันพืช	61
4.2 การวิเคราะห์วิตามินอีโดยเทคนิคโวลแทมเมทรี	63
4.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี	63
4.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน standard addition	64
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	69
5.1 สรุปผลการวิจัย	69
5.2 ข้อเสนอแนะ	70
บรรณานุกรม	71
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก ก.	75
ตัวอย่างโครมาโทแกรมและโวลแทมโมแกรม	75
ภาคผนวก ข.	85
การคำนวณขีดจำกัดการตรวจหา	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณวิตามินอีในอาหารที่รับประทานได้ 100 กรัม	10
2.2 เปรียบเทียบสารธรรมชาติที่ต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ	11
2.3 เปรียบเทียบจุดเกิดควันของน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ	11
4.1 แสดงค่าที่ได้จากการคำนวณในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างน้ำมันพืช	65
4.2 แสดงค่าที่ได้จากการคำนวณในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างน้ำมันพืช	66
4.3 แสดงค่าที่ได้จากการคำนวณในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างน้ำมันพืช โดยเทคนิคโวลแทมเมทรี	67
4.4 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการคำนวณหาปริมาณ α– tocopherol ในน้ำมันพืช โดยเทคนิค HPLC และโวลแทมเมทรี	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงโครงสร้างของวิตามินอีจากธรรมชาติและวิตามินอีจากการสังเคราะห์	5
2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไอโซเมอร์ต่าง ๆ ของวิตามินอี	6
2.3 แสดงการเกิด interaction ระหว่างโมเลกุลสาร	13
2.4 แสดงการแยกสารประกอบ 2 ชนิดในตัวอย่าง	13
2.5 เครื่อง HPLCแบบ automatic sampler injector	14
2.6 ภาชนะบรรจุส่วนเคลื่อนที่	15
2.7 แสดงการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC	18
2.8 แสดงคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ	19
2.9 แสดงปฏิกิริยาของ silanol group ที่ผิวของซิลิกากับคลอโรไดเมทิลไซเลน	20
2.10 แสดง endcapping ของ silanol group ด้วย chlorotrimethylsilane	20
2.11 silanol groupsในรูปต่าง ๆ	21
2.12 แสดงการใช้หมู่ฟังก์ชันที่ใหญ่กว่า methyl group เพื่อคลุมปฏิกิริยาของตัวถูกละลาย กับ silanol groups	22
2.13 แสดง hydrophilic group ที่เติมเข้าไปใน alkyl chain ตรงส่วนที่ใกล้ผิวซิลิกาทำปฏิกิริยา กับ silanol group	22
2.14 แสดง Ultraviolet-Visible detector	
2.15 แสดงเครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์	
2.16 แสดงเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์	
2.17 แสดงการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายต่าง ๆ	28
2.18 แสดงกราฟการดูดกลืนแสงของน้ำปราศจากไอออนและน้ำกลั่น	29
2.19 แสดงส่วนเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างสารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายอินทรีย์และสารละลายอนินทรีย์	30
2.20 แสดงขั้วไฟฟ้าใช้งานแบบต่าง ๆ	33
2.21 แสดงการเปิดปิดวาล์วซึ่งควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2.22 แสดงขั้วไฟฟ้าช่วยแพลตินัม	34
4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี	56
4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี	57
4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ช่วงความเข้มข้น 0.49-98.00 ppm	58
4.4 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีช่วงความเข้มข้น 0.49-98.00 ppm	59
4.5 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ช่วงความเข้มข้น 0-39.20 ppm	60
4.6 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานstandard addition ช่วงความเข้มข้น0 – 39.20 ppm	61
4.7 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำมันพืชปริมาตร 20 มิลลิลิตร	62
4.8 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำมันพืชปริมาตร 25 มิลลิลิตร	62
4.9 แสดงโวลแทมโมแกรมของสารละลามาตรฐานวิตามินอีช่วงความเข้มข้น 1.96 – 9.80 ppm	63
4.10 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ช่วงความเข้มข้น1.96 – 9.80 ppm	63
4.11 แสดงโวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐาน standard addition ช่วงความเข้มข้น 0 – 3.92 ppm	64
4.12 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน standard addition ช่วงความเข้มข้น 0 – 3.92 ppm	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

หลายปีมานี้ สารต้านอนุมูลอิสระเริ่มเป็นที่รู้จักกันมากขึ้น จากการโฆษณาขายผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทางโทรทัศน์ ทางวิทยุ อินเทอร์เนต หรือจากสื่อสิ่งพิมพ์ต่าง ๆ เนื่องจากประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีมากมายและตอบสนองความต้องการของมนุษย์ได้ เช่น ในเรื่องของการช่วยชะลอการเกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้าและส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย ช่วยลดความเสี่ยงเกี่ยวกับโรคทางประสาท ระบบภูมิคุ้มกัน การเกิดโรคหัวใจและป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง ทั้งนี้เนื่องมาจากคนในยุคปัจจุบันมีพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่ให้พลังงานสูงและไม่นิยมออกกำลังกาย ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุหลักของการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจและโรคมะเร็งต่าง ๆ

ในโมเลกุลของสารเคมีจะมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ แต่เมื่ออิเล็กตรอนได้รับการกระตุ้นจากสิ่งเร้าก็อาจแปรเปลี่ยนจนเกิดการแยกคู่ได้ โดยสิ่งเร้าที่ทำให้อิเล็กตรอนเกิดการแยกออกจากกันได้เช่น มลพิษในอากาศ, แสง ความร้อนหรือพลังงานอื่น ๆ, การออกกำลังการอย่างหักโหม, ยาบางชนิด เช่น ดอกโซรูบิซิน, เพนิซิลลามิน, พาราเซตามอล, และคาร์บอนเททระคลอไรด์ ซึ่งเป็นผลให้โมเลกุลมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ อิเล็กตรอนที่เกิดการแยกออกจากกันนี้ทำให้โมเลกุลถูกเรียกว่า **อนุมูลอิสระ** ซึ่งมีอายุสั้นมาก ประมาณ $10^{-3} - 10^{-10}$ วินาที มีความว่องไวต่อการดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียง ทำให้โมเลกุลที่ถูกดึงอิเล็กตรอนไปกลายเป็นอนุมูลอิสระ และจะไปดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงต่อ ๆ กันไปกลายเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่

การเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระในร่างกาย เป็นผลทำให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ของอวัยวะในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผนังเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ตายหรือทำงานไม่ได้ จนอาจถึงขั้นเกิดมะเร็ง อนุมูลอิสระจึงเป็นสารพิษต่อเซลล์ ถ้ามีมากในเซลล์ก็เป็นอันตรายได้ โดยจะทำลายดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์ แต่เซลล์เม็ดเลือดขาวจะใช้อนุมูลอิสระในการกำจัดแบคทีเรีย หลังจากที่เซลล์กินแบคทีเรียเข้าไปในเซลล์แล้ว

ตัวอย่างของอนุมูลอิสระมีดังนี้

Superoxide anion radical	$O^{\bullet}_2$
Hydroxyl radical	$HO^{\bullet}$
Peroxide radical	$ROO^{\bullet}$
Peroxyl radical	$LOO^{\bullet}$
Hydrogen peroxide	H_2O_2
Ozone	O_3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singlet oxygen	$^1O_2$
Hydrogen radical	$H^{\bullet}$
Methyl radical	$CH^{\bullet}_3$

การทำลายโมเลกุลที่เป็นต้นเหตุการเกิดอนุมูลอิสระนับเป็นกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญกลไกหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่อาศัยเอนไซม์หรือไม่ก็ได้

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายและจัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่

Superoxide dismutase (SOD)

Catalase (CAT)

Glutathione peroxidase (GPX)

Glutathione reductase (GR)

Glutathione S-transferase (GST)

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายและไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่

Glutathione

Lipoic acid

Ceruloplasmin

Albumin

Transferrin

Haptoglobin

Hemopexin

Uric acid

Bilirubin

Cysteine

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารและไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่

Tocopherols (vitamin E)

Carotenoids

Ascorbic acid

Steroids

Ubiquinones

Thiols

Inosine

Taurine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pyruvate

Gallic acid

Flavonoids

Trolox

BHT

BHA

สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำลายอนุมูลอิสระโดยการจับกับอนุมูลอิสระ ลดการเกิดปฏิกิริยา ณ จุดตั้งต้นหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ในโครงงานพิเศษนี้จะวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารและไม่จัดเป็นเอนไซม์คือ Tocopherols หรือ วิตามินอี ซึ่งพบในน้ำมันพืชต่าง ๆ ผัก เมล็ดพืช ข้าวโพด ถั่ว แป้งสาลี เนยเทียม เนื้อสัตว์ และนม

จากรายงานการวิจัยพบว่าการรับประทานผักและผลไม้ที่มีวิตามินอีสูงสามารถลดการเกิดมะเร็งเต้านมได้จริงในสตรีวัยเจริญพันธุ์ จากการติดตามคนไข้ 83234 คน เป็นเวลา 14 ปี

นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากได้พยายามศึกษาและรายงานผลของการรับประทานสารต้านอนุมูลอิสระ คือ วิตามินอี เพื่อดูว่าสามารถลดความเสี่ยงจากโรคต่าง ๆ ได้จริงหรือไม่ โดยมีทั้งรายงานที่สนับสนุนว่าได้ผลดีและรายงานที่บอกว่าไม่ได้ผล เช่น การรับประทานวิตามินอีโดยตรงสามารถลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งได้แต่ไม่มากนัก

จากการวิเคราะห์โดยรวบรวมเฉพาะการวิจัยที่ติดตามผลหรือมีการทดลองที่ชัดเจนพบว่า มีเพียงวิตามินอีเท่านั้นที่มีบทบาทในการป้องกันโรคหัวใจขาดเลือดและลดอัตราการเสียชีวิต โดยทดลองในคนไข้ 2000 คนเป็นเวลาปีกว่า พบว่าวิตามินอีลดการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดได้จริงแต่ก็ได้ผลไม่มาก

กล่าวโดยสรุปแล้ว สารต้านอนุมูลอิสระน่าจะมีผลดีต่อร่างกาย อาจลดการเกิดโรคต่าง ๆ ได้จริง แต่กลับพบว่าฤทธิ์เด่นชัดกลับอยู่ในรูปของผักสดและผลไม้มากกว่าสารสกัดหรือตัววิตามินโดยตรง ดังนั้นการรับประทานผักและผลไม้จึงเป็นสิ่งที่ทำได้ง่ายและส่งผลดีต่อสุขภายอย่างแท้จริง

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการวิเคราะห์วิตามินอีในน้ำมันพืชโดยใช้เทคนิค HPLC และโพลาโรกราฟี
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์วิตามินอีโดยเทคนิค HPLC และโพลาโรกราฟี
3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของผลการวิเคราะห์วิตามินอีเมื่อใช้เทคนิค HPLC และโพลาโรกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาวิธีการวิเคราะห์วิตามินอีโดยใช้เทคนิค HPLC และเทคนิคโพลาโรกราฟี
2. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์วิตามินอีของเทคนิคทั้งสอง

1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีดำเนินงาน

1. สืบค้นข้อมูลจากแหล่งข้อมูล
2. ศึกษาข้อมูลที่ได้และวางแผนการดำเนินงาน โดยจัดเตรียมสารเคมี สารมาตรฐาน อุปกรณ์ เครื่องมือที่ต้องใช้
3. ดำเนินการทดลองตามแผนงานที่วางไว้ โดยเตรียมตัวอย่างและนำไปวิเคราะห์วิตามินอีโดยใช้เทคนิคที่ต่างกัน แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกัน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบวิธีการเตรียมตัวอย่างและเทคนิคการเตรียมตัวอย่างวิตามินอีก่อนนำไปวิเคราะห์
2. เพื่อทราบผลของการวิเคราะห์วิตามินอีเมื่อใช้เทคนิคที่ต่างกัน ว่าเทคนิคใดให้ผลการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า
3. เพื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินอี
4. เพื่อทราบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์วิตามินอี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

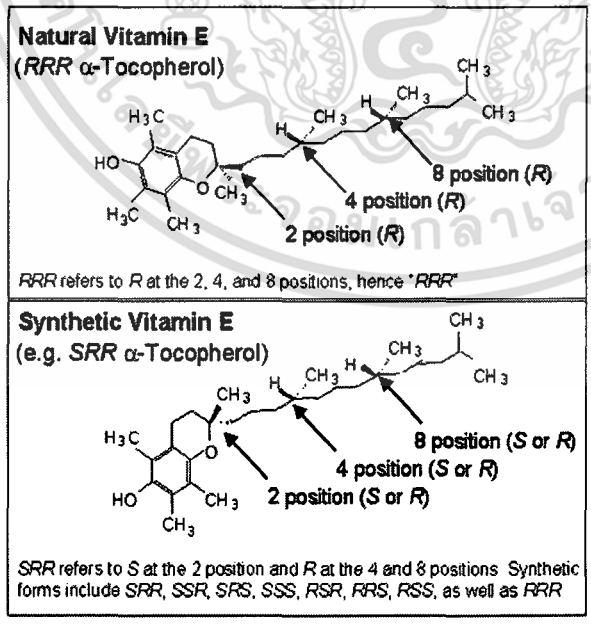
บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วิตามินอี

มีสูตรทั่วไปคือ $C_{29}H_{50}O_2$ มีลักษณะเป็นน้ำมันข้นสีเหลือง ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในไขมันและตัวทำละลายไขมันเป็นสารที่สามารถรวมตัวกับออกซิเจนได้รวดเร็ว จึงใช้เป็นสารกันการเติมออกซิเจน (antioxidant) หรือใช้ป้องกันไม่ให้ไขมันเหม็นหืนและไม่ให้วิตามินเอและวิตามินซีสลายตัว

ในปี ค.ศ. 1920 มีผู้สังเกตว่าหนูที่กินนมวัวอย่างเดียวไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ตามปกติ ใน 2-3 ปีต่อมามีผู้ทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างอาหารและการสืบพันธุ์ พบว่าน้ำมันพืชโดยเฉพาะน้ำมันที่สกัดจากจมูกข้าวสาลี (wheat germ oil) มีสารประกอบซึ่งช่วยให้สัตว์สืบพันธุ์ได้ตามปกติ ดังนั้นจึงได้ทำการแยกหรือสกัดสารนี้จากน้ำมันดังกล่าวในปี ค.ศ.1936 และให้ชื่อว่า **วิตามินอี** หรือ **tocopherol** ซึ่งแปลว่า เกี่ยวข้องกับการให้กำเนิดบุตร

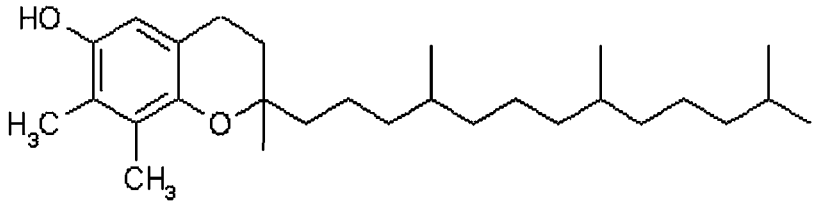
tocopherol มีอยู่หลาย isomer ได้แก่ alpha , beta , gamma ,และ zigma tocopherol ในกลุ่ม alpha-tocopherol มีประสิทธิภาพสูงสุด วิตามินอีธรรมชาติอยู่ในรูปของ dl-alpha-tocopherol ซึ่งเป็นรูปแบบที่จำหน่ายในชื่อ " Natural Vitamin E" ส่วนวิตามินอีที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ d- alpha- tocopherol หน่วยของวิตามินอี เรียกว่า -tocopherol equivalent [T.E.] โดยที่1 IU = 1 มิลลิกรัม dl-alpha-tocopheryl acetate = 0.6 มิลลิกรัม d-alpha- tocopherol



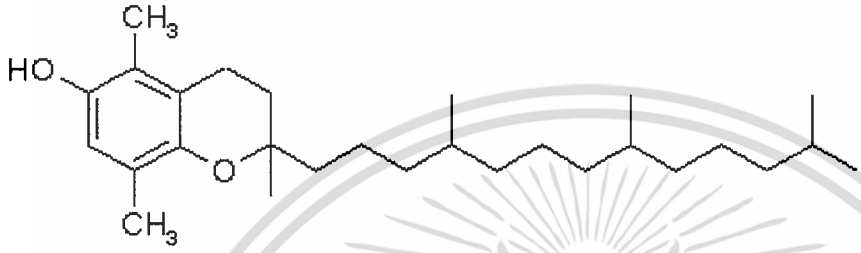
รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของวิตามินอีจากธรรมชาติ (รูปบน) และวิตามินอีจากการสังเคราะห์ (รูปล่าง)

[http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/other/kbs3/vit4.htm]

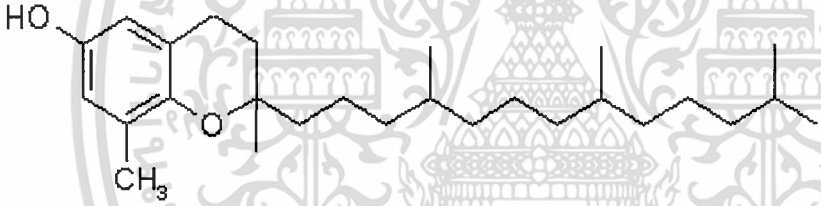
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



γ- tocopherol



β– tocopherol



δ– tocopherol

รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไอโซเมอร์ต่าง ๆ ของวิตามินอี

[http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/other/kbs3/vit4.htm]

เมื่อร่างกายได้รับวิตามินอีพร้อมกับอาหาร วิตามินอีจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายที่ผนังลำไส้เล็ก พร้อมกับไขมันและวิตามินที่ละลายในไขมันอื่น ๆ เช่น วิตามินเอ วิตามินดี และวิตามินเค ปกติเมื่อร่างกายได้รับวิตามินอีแล้วจะเก็บสะสมไว้ในไขมันในร่างกาย แต่พบว่าคนที่รับประทานกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) หรือฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) เช่น ยาเม็ดคุมกำเนิด (contraceptive pill) จะมีผลทำให้วิตามินอีที่สะสมในร่างกายถูกขับออก (depletion) จนอาจทำให้เกิดภาวะขาดวิตามินอีได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 หน้าที่ของวิตามินอี

ในปัจจุบันวิตามินอีเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันรักษาสุขภาพ รักษาความคงทนของเนื้อเยื่อและเซลล์ของร่างกาย เนื้อเยื่อของร่างกายประกอบด้วยสารจำพวกฟอสโฟลิปิด (ไขมันชนิดหนึ่ง) กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว แรงยึดเหนี่ยวของกรดไขมันชนิดนี้ถูกออกซิเจนทำลายได้โดยง่าย ทำให้เซลล์ของร่างกายสูญเสียความคงทน และสลายตัวกลายเป็นกรดไขมันชนิดใหม่ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ของร่างกาย กรดไขมันที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของร่างกายนี้เป็นสารพวกเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยก็ขึ้นกับปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเนื้อเยื่อ ตัวอย่างการเกิดสารเปอร์ออกไซด์ทั่วไปคือ เนยและน้ำมันพืชที่มีกลิ่นเหม็นหืน วิตามินอีจะป้องกันไม่ให้ออกซิเจนไปทำลายแรงยึดเหนี่ยวของกรดไขมันนี้โดยผ่านกระบวนการทางเอนไซม์ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของร่างกายเป็นสารที่ไม่อยู่ตัว สารเหล่านี้จะทำปฏิกริยากับสารอื่น ๆ ได้รวดเร็ว อนุมูลอิสระหรือที่เรียกว่าอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ สามารถผลิตขึ้นได้ในเซลล์ของร่างกายด้วยวิธีออกซิไดซ์ตัวมันเอง หรือผ่านกระบวนการทางเอนไซม์ สารเหล่านี้เป็นพิษต่อเซลล์ของร่างกาย ทำให้เซลล์สูญเสียความคงทน แต่ก็มีประโยชน์อยู่บ้าง เช่น เม็ดเลือดขาวในร่างกายใช้สารนี้ทำลายเชื้อโรคและตอบสนองต่อการอักเสบ อย่างไรก็ตามถ้าเกิดสารนี้มากเกินไปโดยไม่มีการควบคุม ก็จะทำลายเนื้อเยื่อและดีเอ็นเอให้เสื่อมสลายได้

2.1.2 ประโยชน์ของวิตามินอี

วิตามินอีเป็นเป็นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดีเลิศ ให้ผลในการป้องกันการทำลายเซลล์ หรือลดความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ (free radical)

นักวิทยาศาสตร์พบว่าการรับประทานไขมันโดยเฉพาะชนิดที่มีการเติมสารไฮโดรเจน (hydrogenated oil) เพื่อเปลี่ยนกรดไขมันไม่อิ่มตัวให้เป็นกรดไขมันอิ่มตัว และการรับประทานไขมันที่มีกลิ่นเหม็นหืน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระจากกรดไขมันดังกล่าวในร่างกายจำนวนมาก ชั้นอนุมูลอิสระนี้จะมีผลทำให้เนื้อเยื่อระคายเคืองและโดนทำลาย ก่อให้เกิดอาการอักเสบเรื้อรังตามมา ซึ่งมักเกิดกับเซลล์ผนังหลอดเลือด มีผลทำให้เกิดภาวะผนังหลอดเลือดแข็งตัว โรคหัวใจ ภาวะความดันโลหิตสูง ภาวะปวดอักเสบข้อ ความแก่ ภาวะมะเร็งตามมาได้ในระยะยาว ดังนั้นการรับประทานวิตามินอีก็จะสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อภาวะดังกล่าวได้

มีรายงานเกี่ยวกับประโยชน์ของการใช้วิตามินอีเป็นอาหารเสริมในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และศึกษาผลกระทบต่อปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจล้มเหลวในผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวาน จากผลการทดลองพบว่าผู้ป่วยจะมีโอกาสเสี่ยงของโรคลดลงตามรายงานของ Technion-Israel Institute of Technology และตีพิมพ์ในวารสาร “ Diabetes care ปี 2004 ” ผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวานมีแนวโน้มการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สะสมอนุมูลอิสระจำนวนมาก จึงเป็นไปได้ที่วิตามินอีจะไปช่วยลดอนุมูลอิสระดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามการใช้วิตามินอีเสริมนั้นมีประโยชน์กับผู้ป่วยเท่านั้น ไม่มีประโยชน์ที่จะเสริมวิตามินอีในคนปกติทั่วไปที่ไม่เป็นโรค และวิตามินอียังให้ผลในการลดการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด และยังส่งผลทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีประสิทธิภาพการทำงานดีขึ้น โดยใช้ก๊าซออกซิเจนน้อยลง ซึ่งช่วยลดอัตราเสี่ยงการเป็นโรคระบบหลอดเลือดและหัวใจ

นอกจากวิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีต่อเซลล์แล้ว วิตามินอียังมีผลในการช่วยปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ที่อวัยวะต่าง ๆ เช่น เซลล์ของผิวพรรณ ตา ตับ หน้าอก และลูกอัณฑะ ทำให้อวัยวะต่าง ๆ ดังกล่าวมีประสิทธิภาพการทำงาน และอายุการใช้งานนานขึ้น

ประโยชน์ของการทาครีมที่มีส่วนผสมของวิตามินอีในการป้องกันและรักษาผิวพรรณ ได้แก่

- ช่วยลดอัตราการทำลายของแสงแดดที่ทำให้เซลล์เกิดรอยดงไหม้
- ลดอัตราการเกิดมะเร็งผิวหนังจากแสงแดด
- ช่วยลดริ้วรอยเหี่ยวย่น
- ลดความหยาบกร้านของผิวพรรณ

2.1.3 ปริมาณที่แนะนำให้รับประทาน

การวิจัยในทารกพบว่า วิตามินอีซึมผ่านรกได้น้อยมากในระหว่างที่เด็กอยู่ในครรภ์ ดังนั้นเด็กหรือสัตว์แรกเกิดจึงมีวิตามินอีในร่างกายต่ำ การกินวิตามินอี 2-10 หน่วยสากลจะช่วยป้องกันการสลายตัวของเม็ดเลือดแดงในทารกได้ (1 หน่วยสากล = 1 มิลลิกรัม) โดยทารกที่คลอดก่อนกำหนดต้องการวิตามินอีสูงกว่านี้ ทารกที่กินนมมารดามักไม่มีปัญหาการขาดวิตามินอี เพราะนมมารดามีวิตามินอีสูง (ลิตรละ 2-5 หน่วยสากล) งานวิจัยปัจจุบันพบว่ามีสารพวกซีลีเนียม และสารกันการเติมออกซิเจนประเภทอื่น อาจจะใช้แทนวิตามินอีบางส่วนได้

ในผู้ชายพบว่าถ้ากินอาหารมีไขมันร้อยละ 25 ของแคลอรีทั้งหมดและมีวิตามินอีวันละ 3 หน่วยสากลจะเกิดการขาดวิตามินอี เมื่อกินไขมันหรือกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงเพิ่มขึ้นจะต้องการวิตามินอีมากขึ้น เช่น ถ้ากินกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงน้อยกว่าวันละ 7 กรัม จะต้องการวิตามินอีวันละ 10 หน่วยสากล แต่ถ้ากินมากกว่าวันละ 35 กรัม และกินไขมันทั้งหมดร้อยละ 40 ของแคลอรีทั้งหมดจะต้องการวิตามินอีวันละ 30 หน่วยสากล โดยทั่วไปความต้องการวิตามินอีไม่ขึ้นกับน้ำหนักร่างกายหรือปริมาณแคลอรีที่รับประทาน อาหารทั่วไปมีวิตามินอีประมาณ 2-66 หน่วยสากลซึ่งถือว่าเพียงพอกับความต้องการของร่างกาย

ปริมาณวิตามินอีที่แนะนำให้การรับประทาน (ในหน่วยสากล) สามารถแบ่งได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ปริมาณต่ำสุด	ปริมาณทั่วไป
ทารก (infants)	5-7	30
เด็ก (children)	8-12	30
วัยรุ่น (adolescent)	12-15	30-50
ชายวัยทำงาน (adult Males)	15	100
หญิงวัยทำงาน (adult Females)	12	50-100
หญิงระยะตั้งครรภ์ (pregnant)	15	100
หญิงระยะให้นมบุตร (lactation)	18	100

หมายเหตุ วิตามินอี ชนิด d-alpha-tocopherol 1 มิลลิกรัม = 1.49 Ius

คำแนะนำในการรับประทานวิตามินอี

สำหรับการรับประทานเพื่อป้องกันแนะนำให้รับประทาน วันละ 400-600 IUs ขนาดรับประทาน วันละ 800-1600 หน่วยสากล แพทย์จะจ่ายสำหรับการรักษาอาการผิดปกติกับระบบหลอดเลือดและหัวใจ ซึ่งในขนาดการรักษานี้ ควรอยู่ในความดูแลของแพทย์เท่านั้น เนื่องจากจำเป็นต้องมีขั้นตอนและระยะเวลาการเพิ่มในปริมาณต่ำ ๆ

การรับประทานวิตามินอีในขนาดสูง ๆ ต้องอยู่ในความดูและของแพทย์ เพราะอาจทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูง (hypertersion) ได้

ผู้ที่อยู่ในมลภาวะ รับประทานไขมัน น้ำมัน ฮอร์โมนเพศหลั่งเอสโตรเจน ผู้ที่ดื่มชา กาแฟ ควรรับประทานวิตามินอีเป็นประจำ

การรับประทานวิตามินอีร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ เช่น วิตามินซี บีต้าแคโรทีน กลูตาไทโอน และซีลิเนียม จะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของวิตามินอีดีขึ้นหลายเท่าอีกด้วย

2.1.4 ผลของการได้รับวิตามินอีน้อยเกินไป

วิตามินอีจำเป็นสำหรับการสืบพันธุ์ของสัตว์ ถ้าขาดจะทำให้เป็นหมัน แท้งบุตรได้ง่าย เพราะเซลล์สืบพันธุ์สลายตัว หนูที่ขาดวิตามินอีจะมีครีเอทีน (creatine) ในปัสสาวะสูงผิดปกติ แสดงว่าเกิดการสลายตัวของกล้ามเนื้อหลอดไตอักเสบ ขนเปลี่ยนสี ในกระต่ายมีอาการเจ็บปวดกล้ามเนื้อและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ในลิงมีอาการคล้ายกันและมีโรคโลหิตจางเกิดขึ้นด้วย ในไก่จะมีอาการเลือดไหลไม่หยุด และไข่ไม่ฟักเป็นตัว คนที่เป็นโรคเกี่ยวกับตับอ่อนหรือท่อน้ำดี การรับประทานน้ำมันแร่ เช่น น้ำมันพาราฟีนเป็นประจำมีผลทำให้วิตามินอีดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้น้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 ผลของการได้รับวิตามินอีมากเกินไป

วิตามินอีที่มากเกินไปจะไม่สะสมที่ตับ แต่จะไปสะสมในกล้ามเนื้อและไขมันในร่างกาย พบว่าต่อมใต้สมองและต่อมหมวกไตจะมีวิตามินอีมากกว่าต่อมไม่มีท่ออื่น ๆ

การศึกษาของ Edgar R. Miller ในการประชุมของ “America Heart Association” ใน New Orleans และจะตีพิมพ์ในวารสาร “Annuals of Internal Medicine” ทำการทดลองโดยให้วิตามินอีแก่อาสาสมัคร มากว่า 130,000 คน โดยระดับวิตามินอีที่ทดลองอยู่ในช่วง 16.5 หน่วยสากล ถึง 2000 หน่วยสากล ผลการทดลองพบว่าระดับวิตามินอี ที่ 150 หน่วยสากล หรือต่ำกว่า จะไม่มีผลเสียต่อร่างกาย และยังช่วยทำให้สุขภาพดีขึ้นด้วย ในขณะที่ระดับวิตามินอีที่ 400 หน่วยสากล หรือมากกว่า 400 หน่วยสากล จะมีโอกาสเสี่ยงอย่างมีนัยสำคัญต่อร่างกาย เช่น ก่อโรคเรื้อรังต่อร่างกายได้ แต่ยังไม่มีรายงานการเสียชีวิตจากการใช้ วิตามินอีในระดับที่สูงขึ้น

2.1.6 แหล่งอาหารที่มีวิตามินอีมาก

น้ำมันสกัดจากจมูกข้าวสาลี และน้ำมันพืชอื่น ๆ เช่น น้ำมันรำ น้ำมันข้าวโพด เป็นน้ำมันที่มีวิตามินอีมากที่สุด อาหารที่มีวิตามินอีรองมาคือ ถั่วเมล็ดแห้ง ผักใบเขียว ธัญพืชที่ขัดสีแต่น้อย ไข่ตับ เนยเหลว และผักอื่น ๆ น้ำมันพืชมีวิตามินอีมากกว่าไขมันจากสัตว์จึงเหม็นหืนน้อยกว่า

2.1.7 ผลของการหุงต้ม

ในที่ที่ไม่มีอากาศหรือออกซิเจน วิตามินอีจะทนต่อความร้อนและกรด แต่วิตามินอีจะสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสงอัลตราไวโอเลต ออกซิเจนและด่าง ดังนั้นการหุงต้มปกติ ไม่ทำให้เสียวิตามินอี การสูญเสียวิตามินอีอาจมีบ้างในกระบวนการเก็บและผลิตอาหารทางอุตสาหกรรม เช่น การแช่แข็ง

ตารางที่ 2.1 ปริมาณวิตามินอีในอาหารที่รับประทานได้ 100 กรัม

อาหาร	มิลลิกรัม	อาหาร	มิลลิกรัม
น้ำมันรำ	264	น้ำมันดอกคำฝอย	89
น้ำมันถั่วเหลือง	194	น้ำมันข้าวโพด	87
น้ำมันถั่วลิสง	130	เนยเทียม	54
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	90	น้ำมันมะพร้าว	26

[เสาวนีย์ จักรพิทักษ์. หลักโภชนาการปัจจุบัน. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช, 2532.]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบสารธรรมชาติที่ต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ

น้ำมันพืชต่าง ๆ	วิตามินอี กลุ่มโทโคฟีรอล (ppm)	วิตามินอี กลุ่มโทโคไตรอีนอล (ppm)	โอรีซานอล (ppm)	รวมปริมาณ สารต้านอนุมูลอิสระ (ppm)
น้ำมันรำข้าว[1]	81	336	2, 000	2, 417
น้ำมันมะกอก[2]	51	-	-	51
น้ำมันคาโนลา[2]	650	-	-	650
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน[3]	487	-	-	487
น้ำมันถั่วเหลือง[2]	1,000	-	-	1,000
น้ำมันปาล์ม[3]	256	149	-	405

[[1] ผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการ บริษัท น้ำมันบริโภคไทย จำกัด]

[[2] Eitenmiller. R., Ronald 1997. Vitmain E Content of Fats and Oils Nutritional Implications. **Food Technology**. 51 (5): 80 (ข้อมูลน้ำมันถั่วเหลืองในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของ 960 -1,150 ppm.)]

[[3] Hamm, W. and R. J. Hamilton. 2000. **Edible Oil Processing**. Sheffield Academic Press Ltd, UK.]

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบจุดเกิดควันของน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ

น้ำมันพืชต่าง ๆ	จุดเกิดควัน (องศาเซลเซียส)	จุดเกิดควัน (องศาฟาเรนไฮต์)
น้ำมันรำข้าว[1]	251	484.0
น้ำมันมะกอก[2]	234	453.2
น้ำมันคาโนลา[3]	204	399.2
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน[3]	227	440.6
น้ำมันถั่วเหลือง[2]	230	446.0
น้ำมันปาล์มโอเลอีน[4]	216	420.8

[[1] ผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการ บริษัท น้ำมันบริโภคไทย จำกัด ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของ 245-257 องศาเซลเซียส หรือ 473-495 องศาฟาเรนไฮต์]

[[2] http://www.indiaagronet.com/indiaagronet/Foods%20Technology/Fats%20and%20Oils.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[March2005]]

[[3] http://www.cookingforengineers.com/article.php?id=50 [March2005]]

[[4] Razail, I and Badri, M., Oil Absorption, Polymer and Polar Compounds Formation During Deep Frying of French Fries in Vegetable Oils, Malaysian Palm Oil Board, Malaysia.]

นอกจากน้ำมันรำข้าวจะมีสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติอันเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพแล้ว น้ำมันรำข้าวยังมีจุดเกิดควันสูง (High Smoke Point) ถึง 245 - 257 องศาเซลเซียส หรือ 473 - 495 องศาฟาเรนไฮต์อีกด้วย จึงเหมาะกับการประกอบอาหารทุกประเภท ไม่ว่าจะเป็นอาหารที่ใช้ความร้อนสูง หรือความร้อนต่ำ และมีอายุการเก็บก่อนเปิดใช้งานได้นานถึง 18 เดือน โดยไม่จำเป็นต้องใส่สารกันหืนสังเคราะห์

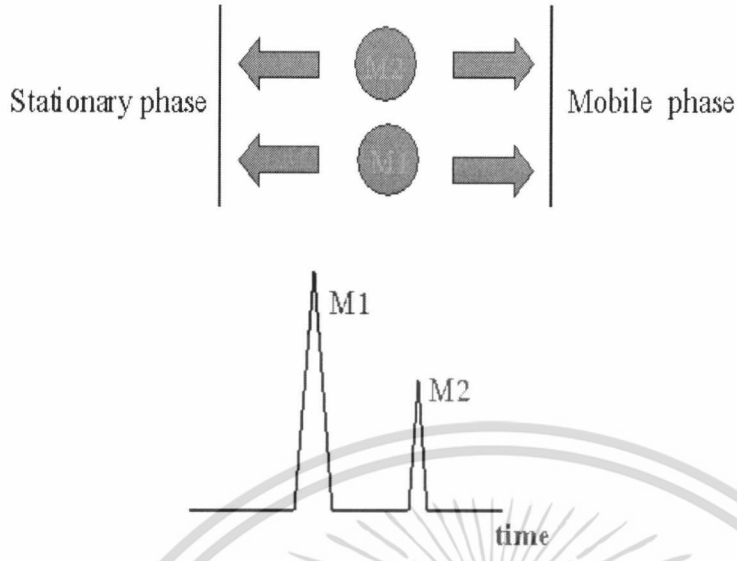
2.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.2.1 หลักการ

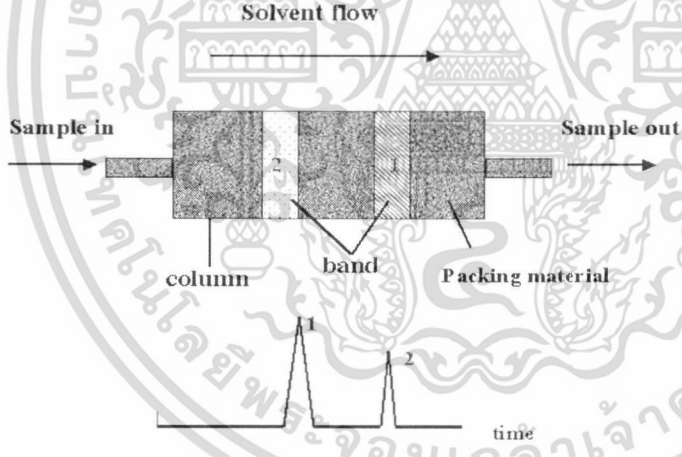
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) หรือที่นิยมเรียกว่า HPLC เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quatitative analysis) ที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่นในการวิเคราะห์ทางอาหาร ยา ยาฆ่าแมลง ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก หรือสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารในระดับไมโครกรัม (μg) ในกรณีทั่ว ๆ ไป หรือละเอียดถึงพิโคกรัม (pg) โดยเลือกหน่วยตรวจวัดที่เหมาะสม

เทคนิคการแยกสารผสมคือ ใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบของเหลวหรือตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นส่วนคงที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) สัญญาณที่ตรวจวัดได้อยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ โดยสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ แสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรมซึ่งประกอบด้วยพีกของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แสดงการเกิด interaction ระหว่างโมเลกุลสาร M1 และ M2 กับส่วนเคลื่อนที่และส่วนคงที่ในคอลัมน์ โดยอาศัยหลักการละลายที่แตกต่างกันระหว่างโมเลกุลสาร M1 และ M2 กับส่วนเคลื่อนที่และส่วนคงที่ ทำให้ใช้เวลาในการแยกที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2.4 แสดงการแยกสารประกอบ 2 ชนิดในตัวอย่าง

ส่วนประกอบพื้นฐานสำคัญในระบบการแยกคือ

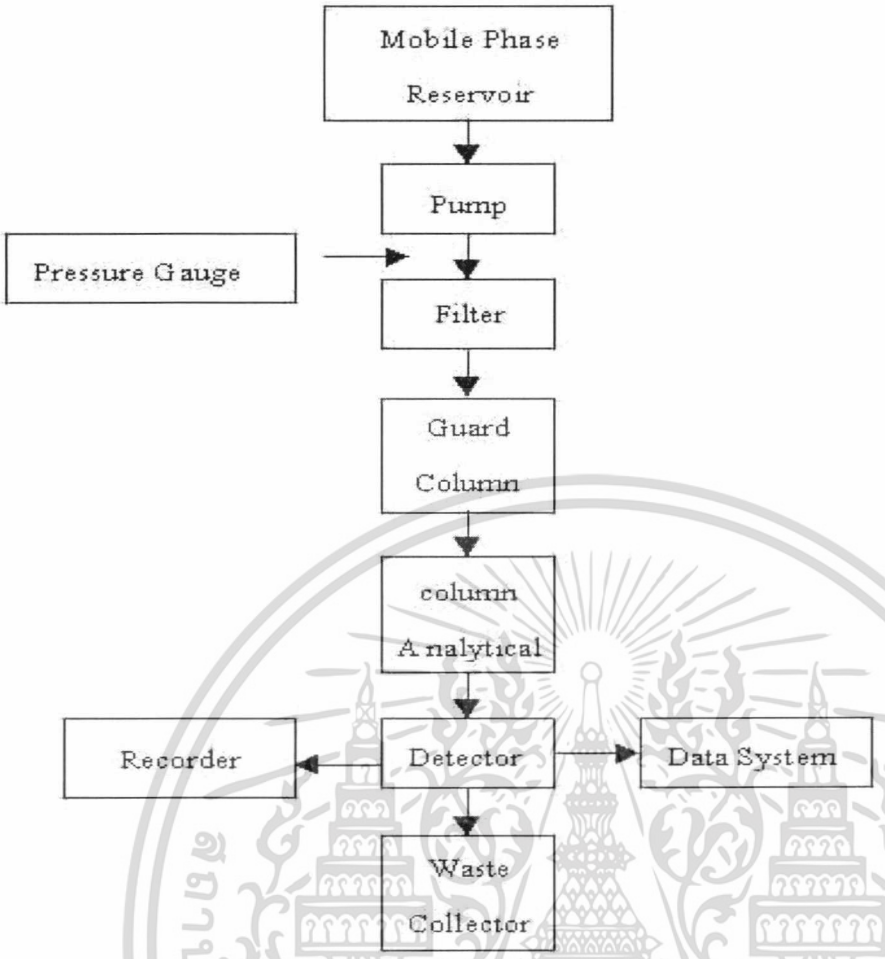
ส่วนคงที่หรือไม่เคลื่อนที่ (stationary phase)

อาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ยึดแน่นบนตัวค้ำจุน (supporting media)

ส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase)

เป็นของเหลวผสม ซึ่งจะทำหน้าที่ชะแยกสารออกจากส่วนคงที่ หรือจากจุดเริ่มต้นไปตามทิศทางการเคลื่อนที่ของส่วนเคลื่อนที่นั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แผนภาพแสดงองค์ประกอบต่าง ๆ ที่สำคัญของ HPLC

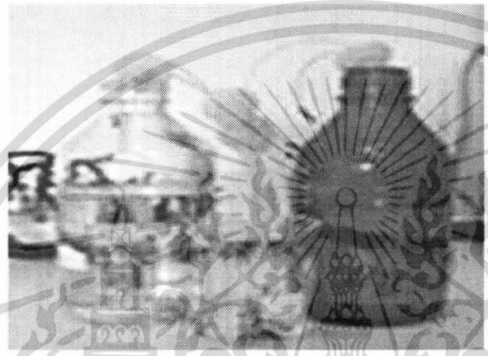
รูปที่ 2.5 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แบบ automatic sampler injector

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC

2.2.2.1 ภาชนะบรรจุส่วนเคลื่อนที่

เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นส่วนเคลื่อนที่ทำจากแก้วหรือสเตนเลสสตีล ความจุประมาณ 1 ลิตร แต่ใน preparative HPLC ความจุของขวดควรจะมากกว่านี้ มีเครื่องกรองฝุ่นหรือสิ่งสกปรก และมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ จุดประสงค์ของการไล่อากาศคือ ต้องการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับส่วนเคลื่อนที่บางชนิดได้ การไล่ก๊าซทำเมื่อตัวทำละลายเป็นสารมีขั้ว



รูปที่ 2.6 ภาชนะบรรจุส่วนเคลื่อนที่

ข้อควรระวังในการใช้ส่วนที่เคลื่อนที่

1. ส่วนเคลื่อนที่ควรเป็นเกรดHPLCและน้ำจะต้องเป็นน้ำปราศจากไอออนมีค่าความต้านทาน 18 mΩ

2. ส่วนเคลื่อนที่ต้องผ่านการกรอง โดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 หรือ 0.45ไมครอน เลือกใช้แผ่นกรองให้เหมาะสมกับชนิดของส่วนที่เคลื่อนที่ และกำจัดก๊าซก่อนใช้งาน ซึ่งมีหลายวิธี เช่น การใช้ sonicator ร่วมกับปั๊มดูดอากาศ การใช้ก๊าซฮีเลียมพ่นไล่อากาศ การใช้ inline degasser ซึ่งอาศัยการทำงานของ vacuum pump ร่วมกับแผ่นกรอง

3. ในกรณีที่ต้องใช้ส่วนเคลื่อนที่มากกว่า 1 ชนิด จะต้องคำนึงถึงสภาพขั้วของส่วนเคลื่อนที่แต่ละชนิดว่าสามารถผสมกันได้หรือไม่ และมีค่า UV-Cut off เท่าใดเพื่อหลีกเลี่ยงความยาวคลื่นนั้น

4. ในกรณีที่มีการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราและแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.2 ปั๊ม

ในระบบ HPLC มีความต้านทานการไหลของส่วนเคลื่อนที่ที่ไหลผ่านคอลัมน์ เนื่องจากภายในคอลัมน์มีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลนี้จะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็ก ๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็ก จึงจำเป็นต้องใช้ระบบปั๊มความดันสูงเพื่อให้ส่วนเคลื่อนที่ไหลไปได้ ปั๊มที่ใช้ควรทำให้เกิดความดันได้สูงประมาณ 6000 psi (lbs / in^2) และมีอัตราการไหลอยู่ในระหว่าง 0.1-10 มิลลิลิตร / นาที ปั๊มสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

1. Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่มีค่าคงที่
2. Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันการไหลของส่วนเคลื่อนที่มีค่าคงที่

หลักการเลือกระบบปั๊มเพื่อใช้กับ HPLC ควรพิจารณาจากสมบัติต่อไปนี้

1. ปั๊มและส่วนประกอบควรจะทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนจากตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้เป็นส่วนเคลื่อนที่ ทั้งนี้รวมทั้งท่อ ข้อต่อ และ flow cell ด้วย เช่น ทำด้วยเหล็กไร้สนิมคุณภาพสูง เช่น polytetrafluoroethylene (PTFE) ruby และ sapphire
2. สามารถปั๊มส่วนเคลื่อนที่ปริมาณมาก ๆ ได้อย่างต่อเนื่อง
3. สามารถให้ความดันได้ถึง 4000 - 6000 psi เพื่อปั๊มให้ส่วนเคลื่อนที่ไหลผ่านคอลัมน์ขนาดเล็ก ยาว 30 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้ และอย่างน้อยต้องให้ความดันได้ขนาด 500 psi
4. สามารถให้อัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ได้สูงถึง 3 มิลลิลิตร / นาที เป็นอย่างน้อยและคงที่
5. ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของส่วนที่เคลื่อนที่ต้องไม่เกิน 1-2 %
6. ควรมีปริมาตรภายในต่ำเพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการเปลี่ยนส่วนเคลื่อนที่
7. ต้องไม่มีพัลส์หรือตัวที่ใช้ลดพัลส์ หรือไม่ทำให้เกิด dectector noise

ข้อควรระวังในการใช้ปั๊ม

1. หากระหว่างใช้เครื่องพบว่ามีการแกว่งของความดันช่วงกว้างมากหรือไม่มีการไหลของส่วนเคลื่อนที่ อาจเป็นเพราะมีฟองก๊าซเกิดขึ้นในปั๊ม ซึ่งสังเกตได้จากการตั้งค่าอัตราการไหลที่ 5.0 มิลลิลิตร/นาที เมื่อไม่ได้ต่อคอลัมน์จะเห็นว่าการไหลของส่วนเคลื่อนที่ออกมาจากท่อไม่สม่ำเสมอ ต้องปรับปั๊มใหม่
2. กรณีปั๊มรั่ว อาจเกิดจากอายุการใช้งาน ซึ่งทำให้ระบบ seal ต่าง ๆ เสื่อมสภาพ หรือการใช้ส่วนเคลื่อนที่พวกบัฟเฟอร์ดังนั้นหลังการใช้งานบัฟเฟอร์ทุกครั้งจะต้องทำการล้างระบบและคอลัมน์โดยล้างด้วยน้ำต่อตัวทำละลายอินทรีย์อัตราส่วน 9 ต่อ 1 ก่อน แล้วจึงล้างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปั๊มสามารถล้างด้วยน้ำ 100 เปอร์เซ็นต์ได้เลย และควรล้างให้นานพอเพื่อให้กำจัดบัฟเฟอร์ออกได้หมด แล้วจึงล้างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 100 เปอร์เซ็นต์ต่อไป และเก็บระบบไว้ในเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์ตรวจวัดความดัน (Pressure Monitoring Devices)

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดความดันซึ่งอยู่ระหว่างทางเข้าของคอลัมน์กับปั๊ม อุปกรณ์นี้จะบอกความดันของส่วนเคลื่อนที่ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ บ่งบอกได้ว่ามีการอุดตันหรือไม่ หรือการทำงานของปั๊มล้มเหลวหรือไม่ นอกจากนี้การทราบความดันของเครื่องจะช่วยทำให้การปรับพารามิเตอร์ต่าง ๆ เป็นไปอย่างเหมาะสม

อุปกรณ์ทำ Gradient Elution แบ่งได้ 2 แบบคือ

1. แบบ low pressure gradient ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศและถูกปั๊มด้วยความดันสูงเข้าสู่คอลัมน์

2. แบบ high pressure gradient ตัวทำละลายที่ใช้ใน gradient elution จะถูกปั๊มผ่านปั๊มแรงดันสูงเข้าสู่ low volume mixing chamber ก่อนเข้าสู่คอลัมน์

2.2.2.3 ระบบการฉีดสารตัวอย่าง

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยังคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวนั้นมีความสำคัญมากในการแยกสาร เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ควรจะอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นได้ ดังนั้นวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้มีหลายวิธีได้แก่

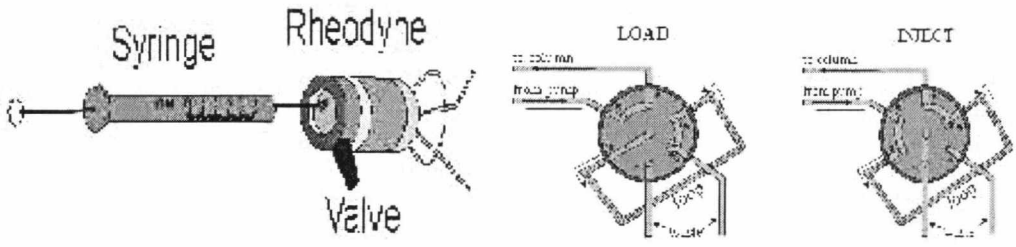
- การใช้ microsyring เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดโดยฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ควรระวังเนื่องจากความดันภายในสูง

- การใช้ microsampling valve เป็นวิธีที่นิยมใช้โดยการผ่านสารเข้าคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลว สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ในท่อซึ่งอยู่ภายนอกที่ต่อเข้ากับ valve นี้ microsampling valve ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันสามารถนำมาใช้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5 มิลลิลิตร และสามารถใช้งานได้ที่ความดันสูงถึง 5 ,000 - 6,000 psi โดยไม่เกิดการรั่วไหล

- การใช้ automatic sampler injector คือ ระบบฉีดสารตัวอย่างได้โดยอัตโนมัติ

107708

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 แสดงการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC

ข้อควรระวังในระบบการฉีดสารตัวอย่าง

1. ระบบการฉีดสารตัวอย่างมีทั้งแบบที่เป็น manual และแบบอัตโนมัติ ซึ่งอาจเกิดปัญหาอุดตันได้ โดยหากเป็น manual จะต้องเลือกใช้เข็มฉีดให้ถูกต้อง ซึ่งเป็นเข็มที่ไม่มีปลายแหลม ส่วนแบบอัตโนมัตินั้นมักมีระบบล้างเข็มและมีเข็มฉีดในตัวต้องเลือกสารละลายสำหรับล้างเข็มให้เหมาะสม หลังใช้งานแล้วจะต้องล้างเข็มด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล ทุกครั้ง

2. ในการฉีดแบบ manual ต้องเลือกใช้ sample loop ให้เหมาะกับปริมาณที่ฉีด และควรฉีดสารเต็มปริมาตร loop

3. ตัวอย่างที่จะฉีดจะต้องผ่านการกรองทุกครั้ง โดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 หรือ 0.45 ไมครอน ซึ่งช่วยกำจัดอนุภาคปนเปื้อนและป้องกันการอุดตันเพื่อยืดอายุการใช้งานคอลัมน์

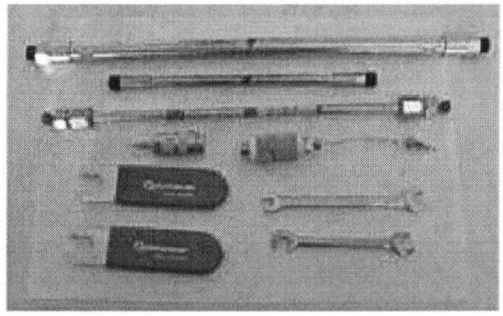
2.2.2.4 คอลัมน์ มี 2 ชนิดคือ

1. คอลัมน์ในการวิเคราะห์ ความยาว 10-30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-10 มิลลิเมตร วัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์ได้แก่ สเตนเลสสตีล พอลิเอทิลีน แก้ว PEEK วัสดุที่บรรจุอยู่ภายในคอลัมน์ได้แก่ ซิลิกา เรซิน เจล bonded phases

2. guard column นิยมใช้ต่อก่อนเข้าคอลัมน์ในการวิเคราะห์เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ในการวิเคราะห์ทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับตัวทำละลาย ส่วนประกอบของวัสดุบรรจุจะคล้ายคลึงกับคอลัมน์ในการวิเคราะห์แต่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าและราคาไม่แพง

ภายในคอลัมน์บรรจุด้วยอนุภาคของแข็งจนเต็ม ซึ่งอนุภาคนี้จะต้องบรรจุให้แน่นและไม่มีช่องว่าง อุณหภูมิของคอลัมน์สามารถควบคุมได้โดยการติดตั้งคอลัมน์ไว้ใน heater column ปัจจุบันคอลัมน์มีขนาดเล็กลงเรียกว่า microbore column

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 แสดงคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ

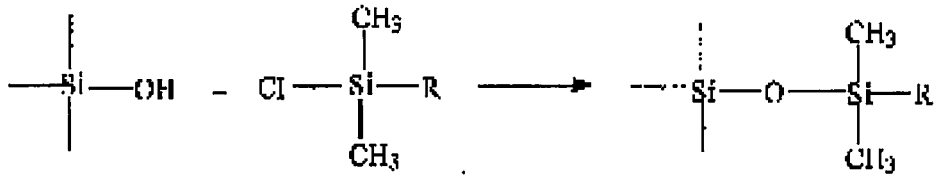
สิ่งสำคัญที่สุดอย่างหนึ่งที่ทำให้ผลการวิเคราะห์ออกมาดีหรือไม่คือ คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร ปัจจุบันวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์เพื่อการแยกมีการพัฒนาขึ้นเรื่อย ๆ เพื่อให้ได้คอลัมน์ที่เหมาะสมกับงานต่าง ๆ

ในระยะแรก โครมาโทกราฟีของเหลวนั้นใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกาธรรมดาเป็นส่วนคงที่ และใช้ส่วนเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซนผสมกับเมทิลีนคลอไรด์ โครมาโทกราฟีของเหลวแบบนี้เรียกว่า **normal phase HPLC** วิธีนี้ควบคุมยากเนื่องจากถ้าปริมาณน้ำในส่วนที่เคลื่อนที่เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจะมีผลต่อการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังยากต่อการวิเคราะห์สารที่ละลายในน้ำได้ดี อย่างไรก็ตาม normal phase HPLC ยังใช้กันในปัจจุบันสำหรับการวิเคราะห์สารที่ไวต่อน้ำ (water sensitive sample) หรือสารที่ไม่ละลายในน้ำ หรือใช้แยก geometric isomer

ต่อมามีการเคลือบสารพวกน้ำมันเช่น ออกซีไดโพรพิโอไนไทรล์บนผิวของซิลิกาแล้วใช้ส่วนเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายมีขั้วเช่น เมทานอลกับน้ำ กรณีนี้จำเป็นต้องเติมออกซีไดโพรพิโอไนไทรล์ ในส่วนเคลื่อนที่ เพื่อให้มีออกซีไดโพรพิโอไนไทรล์เคลือบอยู่บนผิวของซิลิกตลอดเวลา เทคนิคนี้เรียกว่า **reverse phase HPLC** เนื่องจากชนิดของส่วนคงที่และส่วนเคลื่อนที่กลับกันกับ normal phase HPLC

การเคลือบสารพวกน้ำมันบนผิวซิลิกา มีข้อเสียคือ ผลการวิเคราะห์มักไม่คงที่เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการแยกของสารเช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของออกซีไดโพรพิโอไนไทรล์ และองค์ประกอบของส่วนเคลื่อนที่ ตลอดจนมีปัญหาของออกซีไดโพรพิโอไนไทรล์ปนมาใน fractions ที่เก็บ ในการทำ preparative analysis stationary phase ได้การพัฒนาต่อไปเป็น bonded phase เพื่อให้คงทนไม่หลุดง่าย โดยใช้ silane reagent ทำปฏิกิริยากับ silanol group ที่ผิวของซิลิกา ชนิดของ silane reagent ที่นิยมใช้คือ คลอโรไดเมทิลไซเลนที่มี R-group เป็นหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ถ้าเป็น $C_{18}H_{37}$ ก็คือคอลัมน์ C_{18} หรือเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่น ๆ เช่น C_8 cyano หรือ phenyl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



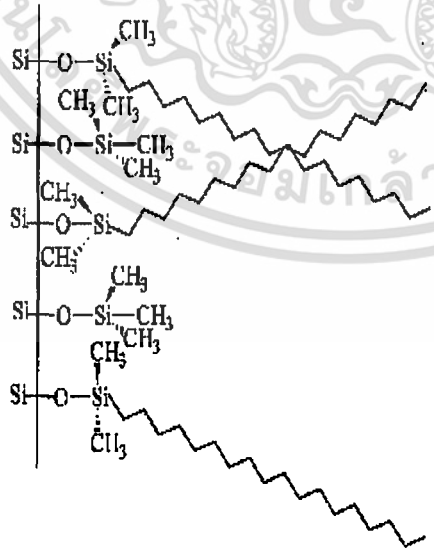
รูปที่ 2.9 แสดงปฏิกิริยาของ silanol group ที่ผิวของซิลิกากับคลอโรไดเมทิลไซเลน

ปัญหาของ bonded phase

เนื่องจาก R-group มีขนาดใหญ่ ทำให้ไม่มีช่องว่างพอที่ silanol group ที่อยู่บนผิวทั้งหมดจะทำปฏิกิริยาสมบูรณ์กับ silane reagent ได้ และ silanol group อิสระมีคุณสมบัติเป็นกรด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีโลหะ เช่นเหล็ก แมกนีเซียม อลูมีเนียม ปนอยู่ในเนื้อแก้ว โลหะเหล่านี้จะดึงอิเล็กตรอน จาก silanol group ทำให้แสดงคุณสมบัติเป็นกรด ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ basic solutes เช่น เอมีน เกิดเป็นปรากฏการณ์ที่เรียกว่า tailing นอกจากนี้โลหะเหล่านี้ยังอาจทำปฏิกิริยาโดยตรงกับตัวถูกละลายบางชนิดเกิดเป็น tailing เช่นกัน

การปรับปรุงวัสดุที่บรรจุภายใน

1) endcapping คือการใช้ คลอโรไตรเมทิลไซเลนทำปฏิกิริยาต่อจากsilane reagent โดยที่คลอโรไตรเมทิลไซเลน มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า silane reagent จึงสามารถแทรกเข้าไปในช่องว่างและทำปฏิกิริยากับ silanol group อิสระได้ (รูปที่ 2) แต่อย่างไรก็ตาม วิธีนี้แก้ปัญหา tailing ได้บ้าง แต่ silanol อิสระก็ยังคงเหลืออยู่



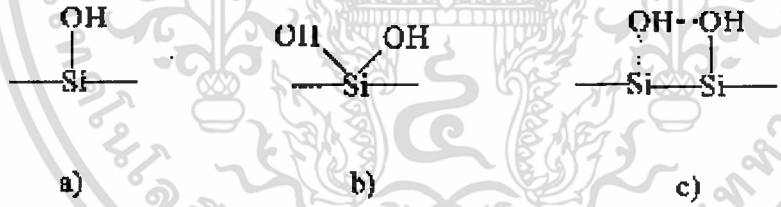
รูปที่ 2.10 แสดง endcapping ของ silanol group ด้วย chlorotrimethylsilane

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อควรระวังในการใช้คอลัมน์ ที่มีวัสดุที่บรรจุภายในเป็นซิลิกา คือจะใช้งานได้เฉพาะในช่วง pH 2 - 8 เนื่องจากที่ pH ต่ำกว่า 2 การเกิดพันธะจะไม่คงตัว และที่ pH สูงกว่า 8 การเกิดพันธะคงตัวดีแต่ซิลิกาจะละลาย นอกจากนี้ ที่ pH ต่ำ ๆ พวกที่มีสายโซ่สั้นจะคงตัวน้อยกว่าพวกที่มีสายโซ่ยาว ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ endcapped column กับส่วนเคลื่อนที่ที่มี pH ต่ำกว่า 4 เพราะจะมีปัญหาเรื่อง reproducibility สำหรับ pH ที่สูงกว่านี้ endcapped column จะใช้ได้ดี

2) ใช้สารที่บรรจุเป็นพวกพอลิเมอร์ แทนซิลิกา วิธีนี้สามารถแก้ปัญหาเรื่อง tailing และการละลายของซิลิกา ที่ pH สูงได้ ทำให้สามารถใช้งานได้ที่ pH สูงถึง 10 หรือมากกว่า แต่คอลัมน์ ที่ใช้พอลิเมอร์ จะให้จำนวนเพลทที่ต่ำกว่าคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกา เป็นผลให้คุณภาพการแยกของ polymer-based column ต่ำกว่า silica-based column ปัจจุบัน polymer-based column ใช้มากสำหรับ ion-exchange และ size-exclusion chromatography

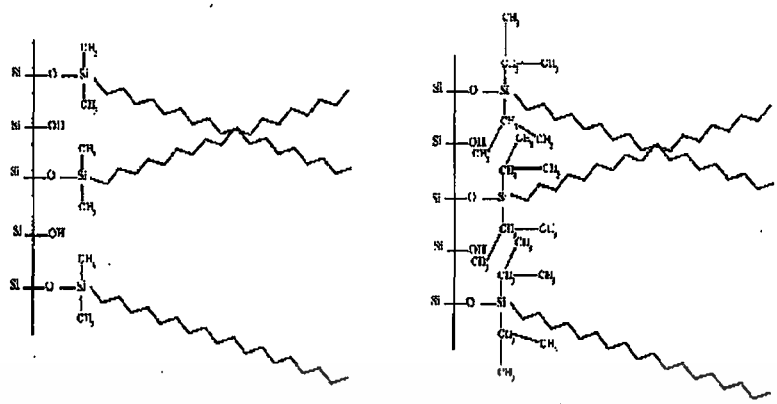
3) การปรับสภาพผิวของซิลิกา ทำให้เนื้อซิลิกามีความบริสุทธิ์สูง โดยลดจำนวนโลหะที่ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อซิลิกา หรือลดความเป็นกรดโดยเปลี่ยน silanol อิสระให้อยู่ในรูปของ geminal silanol (รูปที่ 3b) และในรูป complex(รูปที่ 3c) ซึ่งทั้งสองรูปจะมีความเป็นกรดน้อยกว่า silanol อิสระ คอลัมน์แบบนี้เรียกว่า **basic** หรือ **type B packing** ในขณะที่คอลัมน์ที่ใช้ซิลิกาธรรมดาเรียกว่า **acidic** หรือ **type A packing** ตัวอย่างของคอลัมน์ type B ได้แก่ Hypersil BDS (base-deactivated silica) คอลัมน์ชนิดนี้ใช้ได้ดีกับตัวถูกละลายทั่วไป แต่คอลัมน์ชนิดนี้ก็ยังคงเหลือ silanol อิสระ



รูปที่ 2.11 silanol groups ในรูปต่าง ๆ **a)** free silanol **b)** geminal silanol **c)** associated complex silanol

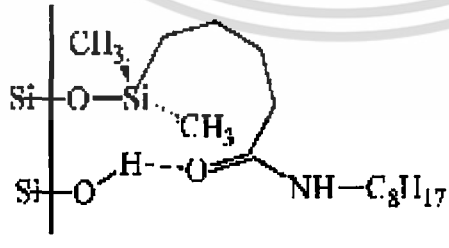
4) การเปลี่ยน methyl group ของ silane reagent เป็น group ที่โตขึ้น เช่น isopropyl group กรณีนี้ group ที่ใหญ่ขึ้นจะคลุมผิวของซิลิกา ทำให้ลดการสัมผัสของตัวถูกละลายกับ silanol อิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 แสดงการใช้หมู่ฟังก์ชันที่ใหญ่กว่า methyl group เพื่อคลุมปฏิกิริยาของตัวถูกละลายกับ silanol groups **a)** bonded phase ที่เตรียมจาก silane reagent **b)** bonded phase ที่เตรียมจากคลอโรไดไอโซโพรพิลออกเทต

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนารูปแบบใหม่ของคอลัมน์ โดยการเติมหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้วเช่น เอไมด์ หรือ carbamate group ที่ alkyl chain ตรงส่วนที่ใกล้กับผิวของซิลิกาหรือ endcapped ด้วยหมู่ฟังก์ชันที่เป็น hydrophilic group column ซึ่งสามารถลด tailing ของ basic solutes ได้ โดยมีข้อสันนิษฐานว่าเอไมด์ หรือ carbamate หรือกลุ่ม hydrophilic ที่อยู่ใกล้ผิวซิลิกาจะแย่งกับตัวถูกละลายมีขั้วเพื่อทำปฏิกิริยากับ silanol group หรือ hydrophilic group ทำปฏิกิริยากับตัวถูกละลายมีขั้วเสียเอง นอกจากนี้ การเติมหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้วยังทำให้คอลัมน์ทำงานได้ดีกับส่วนเคลื่อนที่ที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบในปริมาณสูง โดยทำให้วัสดุที่บรรจุภายในเปียกน้ำหรือเข้ากับตัวทำละลายมีขั้วได้ดีขึ้น ซึ่งโดยปกติสำหรับ reverse phase ที่มีความเป็น hydrophobic สูง ถ้าใช้ ส่วนเคลื่อนที่ที่มีปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ต่ำกว่า 10 เปอร์เซนต์จะทำให้เกิดปัญหาเรื่อง retention time เปลี่ยนแปลง หรือเกิดการดูดซับของตัวถูกละลายในคอลัมน์



รูปที่ 2.13 แสดง hydrophilic group ที่เติมเข้าไปใน alkyl chain ตรงส่วนที่ใกล้ผิวซิลิกาทำปฏิกิริยากับ silanol group

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อควรระวังในการใช้คอลัมน์

1. ต้องทราบคุณสมบัติของวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์และข้อห้ามในการใช้งานต่าง ๆ เช่น ห้ามใช้กับส่วนเคลื่อนที่ใดบ้าง มีช่วง pH การใช้งานเท่าใด มีการจำกัดความดันใช้งานเท่าใด ซึ่งดูได้จากคู่มือของแต่ละคอลัมน์หรือจากผู้ผลิต

2. ในการปรับเพิ่มลดอัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ ต้องค่อย ๆ ทำเพื่อยืดอายุการใช้งานคอลัมน์ โดยทั่วไปอัตราการเพิ่มและลดเป็น 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที

3. เก็บรักษาคอลัมน์ในที่ที่ไม่ให้ถูกแสงแดดโดยตรง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากและป้องการไม่ให้กระทบกระเทือน

4. คอลัมน์แต่ละชนิดจะต้องเก็บอยู่ในส่วนที่เคลื่อนที่ที่เหมาะสมคอลัมน์ชนิด reverse phase เช่น คอลัมน์ ODS หรือ C_{18} มักเก็บในเมทานอลหรืออะซีโตไนไทรล์

5. ในการฉีดสารต้องคำนึงถึงความสามารถในการรองรับสารของคอลัมน์ เพื่อป้องกันการเกิด column overloading

6. ในการใช้คอลัมน์เพื่อการแยกจะต้องใช้ guard column ทุกครั้งเพื่อช่วยป้องกันการอุดตันและช่วยยืดอายุการใช้งานคอลัมน์

2.2.2.5 เครื่องตรวจวัด

คุณสมบัติสำคัญของเครื่องตรวจวัดคือ ความไวของเครื่องตรวจวัดที่สามารถตรวจวัดสิ่งที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นเครื่องตรวจวัดควรมีลักษณะดังนี้

- มีความไวสูงและให้สัญญาณตอบรับที่คาดคะเนได้
- ให้สัญญาณตอบรับได้กับสารทุกชนิด
- ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและอัตราการไหลของส่วนที่เคลื่อนที่
- เชื่อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน
- ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัดควรมีสภาพเชิงเส้นตรงในช่วงกว้าง
- ไม่ทำลายสาร
- ให้ข้อมูลเชิงคุณภาพวิเคราะห์สำหรับพีคที่ต้องการตรวจสอบ

เครื่องตรวจวัดโครมาโทกราฟีของเหลวสามารถแบ่งได้ 2 ชนิด

1. เครื่องตรวจวัดทั่วไป เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของส่วนเคลื่อนที่รวมกับตัวถูกละลาย เช่น ตรวจสอบความแตกต่างของดัชนีหักเห (refractive index) เครื่องตรวจวัดการนำกระแสไฟฟ้า

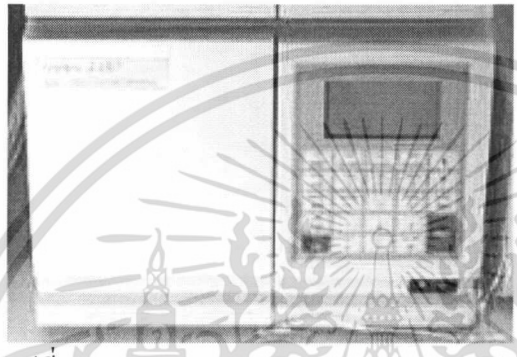
2. เครื่องตรวจวัดเฉพาะ เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น UV-VIS ฟลูออเรสเซนส์ หรือ เครื่องตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องตรวจวัดสำหรับ HPLC ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่

1. Ultraviolet-Visible detector อาศัยการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง เช่น diode array detector ลักษณะพิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์ UV - visible ที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งเป็น 3 ชนิด

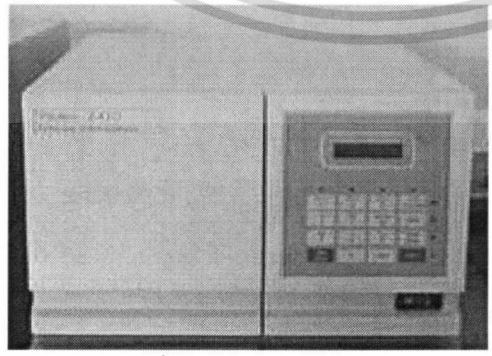
1. Fixed-wavelength UV detector
2. Variable UV-VIS detector
3. Photodiode-array detector



รูปที่ 2.14 แสดง Ultraviolet-Visible detector

2. เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์ (Differential Refractometers) นิยมใช้รองจากเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดรรชนีหักเหอย่างต่อเนื่องระหว่างส่วนเคลื่อนที่กับส่วนเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายละลายอยู่ ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ สามารถให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ตราบที่ตัวถูกละลายมีค่าดรรชนีหักเหต่างจากส่วนเคลื่อนที่ เครื่องตรวจสอบความแตกต่างของดรรชนีหักเหที่สำคัญมีอยู่ 3 ชนิด

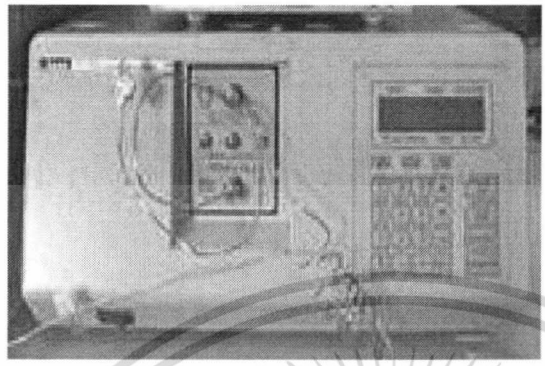
1. Fresnel Refractometer
2. Deflection Refractometer
3. Interferometric Refractometer



รูปที่ 2.15 แสดงเครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Fluorescence detector มีสภาพไวสูงเฉพาะ เนื่องจากมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้จากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง ยูวีดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีประโยชน์มากในการตรวจหาสารในตัวอย่างทางชีวภาพ (biological samples) ต่าง ๆ ที่มีปริมาณน้อย



รูปที่ 2.16 แสดงเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์

4. Electrochemical detectors ใช้วัดการสูญเสียหรือการได้รับอิเล็คตรอนของสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์

5. Conductivity detectors ใช้วัดความสามารถในการนำกระแสไฟฟ้า

ข้อควรระวังในการใช้เครื่องตรวจวัด

1. กรณีที่ใช้เครื่องตรวจวัดจำพวก UV-detector ควรหลีกเหลี่ยงการตรวจวัดที่ UV-Cut off ของส่วนเคลื่อนที่

2. ระวังไม่ให้มีฟองก๊าซไหลผ่านเข้าเครื่องตรวจวัด และไม่ควรให้ความดันใช้งานเกินกว่าความสามารถที่ flow cell สามารถรองรับได้

3. การต่อท่อเข้ากับส่วน inlet และ outlet ของเครื่องตรวจวัด ต้องไม่แน่นเกินไป ในการใช้เครื่องตรวจวัดหลายชนิดร่วมกัน ต้องคำนึงถึงลำดับการต่อเชื่อมของเครื่องตรวจวัดแต่ละชนิด

2.2.3 การวิเคราะห์วิตามิน

การวิเคราะห์วิตามินสามารถทำได้หลายวิธี ควรเลือกเครื่องมือในการวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับลักษณะของตัวอย่างและคุณสมบัติของวิตามินว่าเป็นชนิดละลายน้ำหรือละลายในไขมัน เนื่องจากวิตามินเป็นสารกลุ่มที่สามารถดูดกลืนแสงได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการวิเคราะห์มักต้องเกี่ยวข้องกับเครื่องสเปกโทโฟโตมิเตอร์ ไม่ว่าจะเป็นยูวีสเปกโทโฟโตมิเตอร์หรือฟลูออเรสเซนส์โฟโตเมทรี การเลือกใช้นอกจากขึ้นอยู่กับชนิดของวิตามินแล้วยังต้องคำนึงถึงปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์บางครั้งต้องมีการทำปฏิกิริยาก่อนทำการวิเคราะห์ เพื่อเพิ่มสภาพไวในการวัด หรือเพื่อให้เกิดความคงตัวก่อนวิเคราะห์ ซึ่ง HPLC มักจะเป็นวิธีที่ถูกเลือกมาใช้ในการวิเคราะห์สารผสม

การวิเคราะห์วิตามินด้วย HPLC

ขึ้นกับชนิดของวิตามิน สำหรับวิตามินชนิดละลายในไขมันนิยมเลือก reversed phase chromatography ในการแยก แต่ในกรณีแยกสารที่เป็นไอโซเมอร์ หรือโฮโมลอค มักใช้ absorption chromatography ตัวอย่างคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกวิตามินชนิดละลายในไขมัน ได้แก่- Shim-pack CLC-ODS (M) (250 มิลลิเมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร)

- Inertsil ODS-3V (250 มิลลิเมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร)

- Shim-pack CLC-NH_2 (150 มิลลิเมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร)

ส่วนวิตามินชนิดละลายในน้ำ สามารถใช้ Ion exchange chromatography ในการแยกได้แต่มักมีการรบกวนจากความแรงของไอออนและ pH ทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่แม่นยำเท่าที่ควร โดยเฉพาะในแง่ของการทำ reproducibility ปัจจุบัน Ion-pair reversed phase chromatography เป็นที่นิยมมากกว่าเพราะได้ผลการวิเคราะห์ที่ดี โดยเฉพาะการวิเคราะห์กลุ่มวิตามินบี โดยวัดที่ 270 นาโนเมตร (ในกรณีนี้การวัด pantothenic acid ซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงประมาณ 210 นาโนเมตร ไม่สามารถทำได้) ดังนั้นในกรณีที่ต้องการการตรวจวัดที่มีความไวสูงสำหรับทุกสาร ควรใช้เครื่องตรวจวัดที่สามารถวัดแบบหลาย ๆ ความยาวคลื่นได้ เพราะสารแต่ละตัวมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน ตัวอย่างของคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกวิตามินชนิดละลายในน้ำ ได้แก่

- Shim-pack CLC-ODS (150 มิลลิเมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร)

- STR ODS-M (150 มิลลิเมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร)

- STR ODS-II (150 มิลลิเมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6มิลลิเมตร)

- Inertsil ODS-3V (150 มิลลิเมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร)

- Shim-pack SRC-101N (300 มิลลิเมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.9 มิลลิเมตร)

- Asahipak NH_2-P50 4E (250 นาโนเมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 นาโนเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ พอลิเมอร์ คู่อิแนนทิโอเมอร์ สารประกอบที่เสียสภาพได้ง่าย สารประกอบระเหยยาก ไอออนขนาดเล็กระดับไมโครโมเลกุล ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลวละลายได้ 100 เปอร์เซนต์ การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ โดยมีส่วนเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป

2.2.5 การใช้ HPLC ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ

2.2.5.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative analysis)

ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมา ทำได้โดยเปรียบเทียบค่า retention time กับสารมาตรฐาน โดยต้องทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างและสารมาตรฐานในสภาวะเดียวกัน เช่น อุณหภูมิ ชนิดของคอลัมน์และอัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ ถ้าสารตัวอย่างและสารมาตรฐานมีค่า retention time เท่ากัน แสดงว่าเป็นสารเดียวกัน สามารถวิเคราะห์เพิ่มเติมได้โดยเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ ชนิดของส่วนเคลื่อนที่

2.2.5.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis)

หลังจาก HPLC แยกสารออกมาเป็นพีกต่าง ๆ สามารถวัดปริมาณของสารในแต่ละพีกได้โดย

1. วัดความสูงของพีกเทียบกับความสูงของพีกของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ
2. วัดพื้นที่พีกเทียบกับพื้นที่ของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป

2.2.6 การเลือกใช้และการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีของเหลว

การจะเลือกเทคนิคใดในการแยกสารตัวอย่างนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ที่ต้องพิจารณาดังนี้

1. ธรรมชาติของสารตัวอย่าง
2. วิธีที่ใช้แยกสารตัวอย่าง
3. ความสะดวกในการทดลอง
4. ประสบการณ์กับวิธีที่ใช้แยกสารตัวอย่าง

การพัฒนาวิธีการแยกสารที่เฉพาะ ควรพิจารณาปัจจัยดังนี้

1. การเลือกวิธีของโครมาโทกราฟีของเหลว
2. การเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม
3. การกำหนดสภาวะการทดลองที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

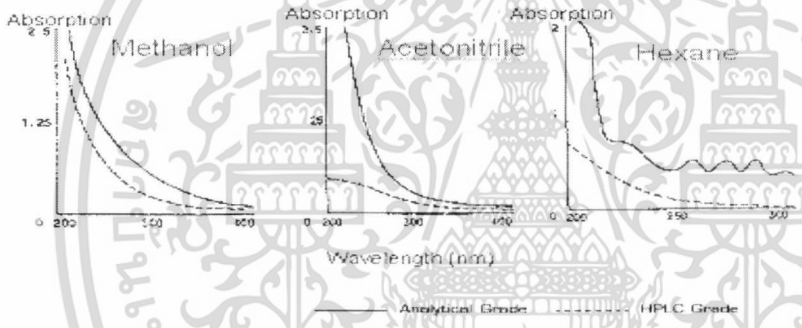
4. การพิจารณาการใช้เทคนิคบางเทคนิคเพื่อแก้ปัญหาการแยกให้ดีขึ้น

2.2.7 ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการวิเคราะห์

ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการวิเคราะห์คือ ปัจจัยทางเคมี เช่น การดูดกลืน ความเสถียรของสารในตัวอย่าง รวมไปถึงการเตรียมส่วนเคลื่อนที่ ล้วนแต่มีผลต่อสภาพไวและ การวัดซ้ำในการวิเคราะห์เมื่อพิจารณาส่วนเคลื่อนที่ เพื่อให้การวิเคราะห์ประสบความสำเร็จ และยืดอายุการทำงานขององค์ประกอบต่าง ๆ ของ HPLC ต้องคำนึงถึงสิ่งต่างคือ

2.2.7.1 เกรดตัวทำละลาย

ควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่เป็นเกรด HPLC เนื่องจากมี cut off point ที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า เกรดวิเคราะห์ทั่วไป และควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มี cut off point ต่ำกว่าความยาวคลื่นที่จะทำการวิเคราะห์ เพราะถ้าตัวทำละลายมี background absorption จะทำให้ noise มีค่าสูง baseline ไม่คงที่ และช่วงความเป็นเส้นตรงจะแคบลง



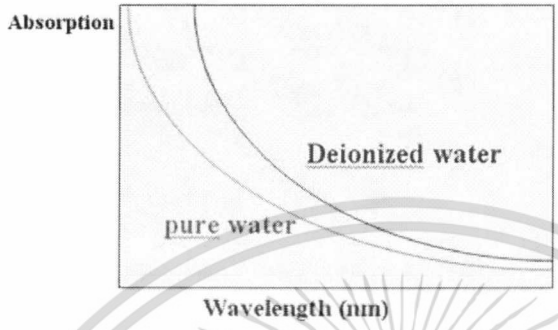
รูปที่ 2.17 แสดงการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ เมทานอล อะซีโทไนไทรล์ และน้ำ

นอกจากนี้ตัวทำละลายบางตัวก็มีข้อจำกัดอื่น ๆ เช่น tetrahydrofuran (THF) ในเกรดวิเคราะห์จะมีการเติม butylated hydroxytolune (BHT) เพื่อทำหน้าที่เป็น oxidation inhibitor สารเคมีตัวนี้มีการดูดกลืนที่สูงมากในช่วง UV ทำให้ไม่สามารถใช้กับ UV-detector ได้ แต่ไม่มีการเติมสารนี้ในเกรด HPLC ดังนั้นในการใช้ THF ที่เป็นเกรด HPLC จะต้องทำการเก็บ THF ไว้ในที่มืดและเย็นหลังจากการเปิดเพื่อป้องกันการระเบิด เช่นเดียวกับคลอโรฟอร์ม ถ้าเป็นเกรดวิเคราะห์จะมีการเติม 3 เปอร์เซนต์เอทานอล เพื่อป้องกันการ generation ของ phosgene ซึ่งเป็นก๊าซพิษ แต่การมีเอทานอลในคลอโรฟอร์มนี้มีผลต่อการแยกของสารใน normal phase ในเกรด HPLC จะไม่มีการเติมเอทานอล ดังนั้นเมื่อทำการเปิดขวดก็ควรจะเก็บในที่มืดและเย็นเพื่อป้องกันการเกิด generation

การเลือกใช้เกรดตัวทำละลายรวมไปถึงการเลือกใช้น้ำให้เหมาะสม พิจารณาดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมีให้เลือกด้วยกัน 3 เกรด คือ น้ำบริสุทธิ์ น้ำกลั่น และน้ำปราศจากไอออน มีการวัดการดูดกลืนของน้ำปราศจากไอออน เทียบกับน้ำบริสุทธิ์ จากกราฟจะเห็นว่า น้ำปราศจากไอออนให้การดูดกลืนที่สูงกว่า และอาจเป็นสาเหตุของการเกิด ghost peak เมื่อทำการวิเคราะห์แบบ gradient elution



รูปที่ 2.18 แสดงกราฟการดูดกลืนแสงของน้ำปราศจากไอออนและน้ำบริสุทธิ์ที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ

2.2.7.2 สารละลายบัฟเฟอร์ สำหรับส่วนเคลื่อนที่ที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ ในการเตรียมมีสิ่งที่ต้องระวังเช่น

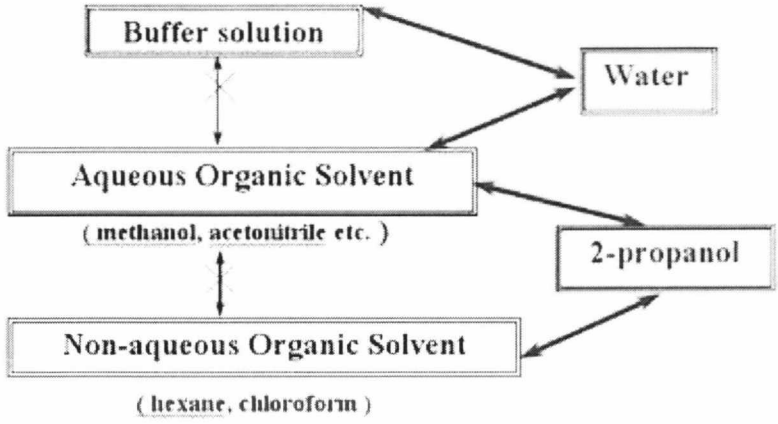
- การเลือกชนิดของเกลือให้เหมาะสมกับช่วงของ pH ที่ใช้ และต้องเลือกชนิดของเกลือที่ไม่มีการดูดกลืนที่ความยาวคลื่นที่ต้องการวิเคราะห์จนมีปัญหากับ baseline noise หรือ ช่วงความเป็นเส้นตรง

- เรื่อง ionic strange และความจุของบัฟเฟอร์

2.2.7.3 การเปลี่ยนส่วนเคลื่อนที่

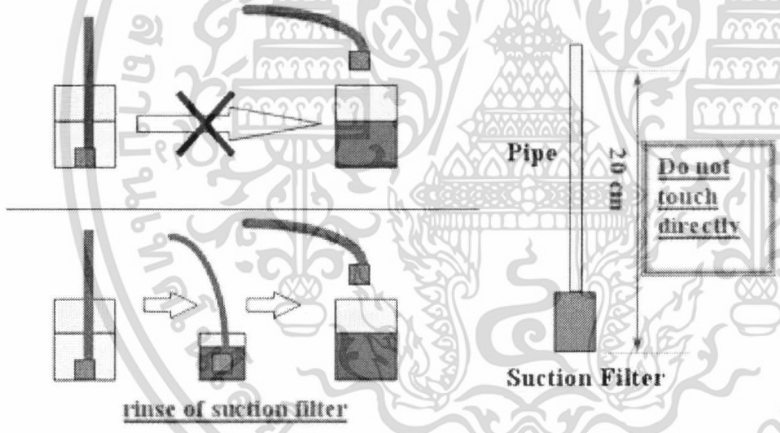
สำหรับการเปลี่ยนส่วนเคลื่อนที่ต้องคำนึงถึงความสามารถในการละลายและต้องเปลี่ยนแบบค่อยเป็นค่อยไป เพื่อให้สามารถเปลี่ยนเฟสได้อย่างสมบูรณ์และไม่ก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างซึ่งจะเป็นปัญหาในการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.19 แสดงส่วนเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างสารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายอินทรีย์ และสารละลายอนินทรีย์

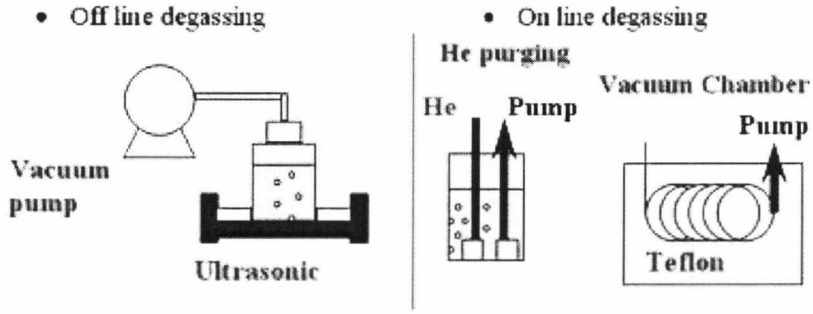
และต้องระวังเรื่องการปนเปื้อนระหว่างส่วนเคลื่อนที่เดิมและส่วนเคลื่อนที่ใหม่ในการเปลี่ยนส่วนเคลื่อนที่ด้วย



2.2.8.4 การไล่ฟองอากาศ

ปริมาณของอากาศที่ละลายอยู่ในส่วนเคลื่อนที่เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อความคงที่ของ เครื่องตรวจวัด baseline และสภาพไวของเครื่องตรวจวัด การไล่ฟองอากาศในระบบ HPLC มี 2 แบบคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ปัญหาที่เกิดจากการมีอากาศในส่วนเคลื่อนที่

การมีอากาศในส่วนเคลื่อนที่สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ การเกิดฟองอากาศในส่วนเคลื่อนที่และการมีอากาศในส่วนเคลื่อนที่โดยไม่เป็นฟอง

1. การเกิดฟองอากาศในส่วนที่เคลื่อนที่ : ปัญหาที่เกิดตามมาคือฟองอากาศเป็นสาเหตุให้อัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ไม่คงที่ทำให้ retention time พื้นที่พีคของสารไม่คงที่ ถ้ามีฟองอากาศในคอลัมน์จะทำให้ได้พีคที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์ และถ้ามีการสะสมของฟองอากาศที่เครื่องตรวจวัดก็จะเป็นสาเหตุของการเกิด noise ของ baseline

2. การมีอากาศในส่วนเคลื่อนที่โดยไม่เป็นฟอง : อาจเกิดมาจากการที่ออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ ทำการออกซิไดซ์ตัวอย่างหรือสารที่เป็นองค์ประกอบในส่วนเคลื่อนที่หรือส่วนที่คงที่ นอกจากนี้การมีออกซิเจนละลายอยู่ในส่วนเคลื่อนที่ในปริมาณมากจะทำให้สภาพไวของเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์ลดลง ใน UV-detector บางสภาวะอาจเป็นสาเหตุของการเกิด noise และทำให้ baseline ไม่คงที่ และผลกระทบของออกซิเจนต่อเครื่องตรวจวัดรีแฟรคโทรมิเตอร์คือการเพิ่ม drift และ baseline มีลักษณะเป็นคลื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 โวลแทมเมทรี

โวลแทมเมทรีเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีที่ให้ศักย์คงที่เข้าไปในวงจร และวัดกระแสที่เกิดขึ้น เซลล์ไฟฟ้าเคมีของเทคนิคโวลแทมเมทรีจัดเป็นเซลล์อิเล็กโทรไลต์ สำหรับขั้วไฟฟ้าที่ใช้สำหรับเทคนิคนี้จะต่างจากเทคนิคโพเทนชิออเมทรี คือ มีการใช้ขั้วไฟฟ้าช่วย (auxiliary electrode) โดยส่วนมากมักเป็นขั้วไฟฟ้าช่วยแพลตินัม (platinum wire auxiliary electrode) ขั้วไฟฟ้าใช้งานสำหรับเทคนิคนี้มักเป็นขั้วไฟฟ้าจุลภาค (microelectrode) ทั้งนี้เพื่อให้เกิดโพลาไรเซชันที่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน

2.3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำโวลแทมเมทรี อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำโวลแทมเมทรีมีดังนี้

2.3.1.1 เซลล์โวลแทมเมทรี

2.3.1.2 ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ได้แก่

- ขั้วไฟฟ้าคาโลเมล
- ขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์ – ซิลเวอร์คลอไรด์

2.3.1.3 ขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าใช้งานสำหรับเทคนิคโวลแทมเมทรี นิยมใช้ขั้วไฟฟ้าจุลภาค ได้แก่

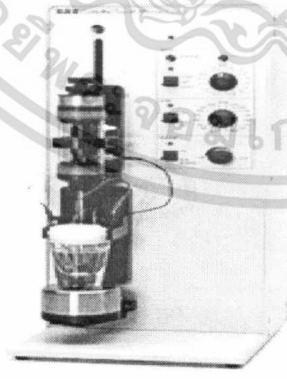
- ขั้วไฟฟ้าแบบดิสก์ (disc electrode) ขั้วไฟฟ้าชนิดนี้มีขนาดเล็กและใช้งานง่าย ซึ่งถูกสร้างไว้ในพลาสติกขนาดกว้างคูณสูง (6 มิลลิเมตร x 7.5 เซนติเมตร) และถูกตรึงไว้กับแผ่นดิสก์ของวัสดุที่ต่างกันไป เช่น ทอง แพลตินัม นิเกิล เงิน หรือ glassy carbon เส้นผ่านศูนย์กลางของขั้วไฟฟ้าแบบดิสค์มีขนาดเท่ากับ 1.6 มิลลิเมตร หรือ 3.0 มิลลิเมตรขึ้นกับชนิดของวัสดุที่เลือกใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.20 แสดงขั้วไฟฟ้าใช้งานแบบต่าง ๆ

จากรูป ภายในพลาสติกจะมีแท่งโลหะเล็ก ๆ สอดเข้าไปเพื่อทำการเชื่อมขั้วไฟฟ้ากับอุปกรณ์อื่น ๆ เช่น คลิปปากจระเข้ หรือ gold-plated female connector ด้านนอกของพลาสติกจะมีซิลิกอนรูปวงแหวนครอบไว้เพื่อปรับระดับความลึกที่จะจุ่มขั้วไฟฟ้าชนิดนี้ลงในเซลล์โวลแทมเมทรีได้

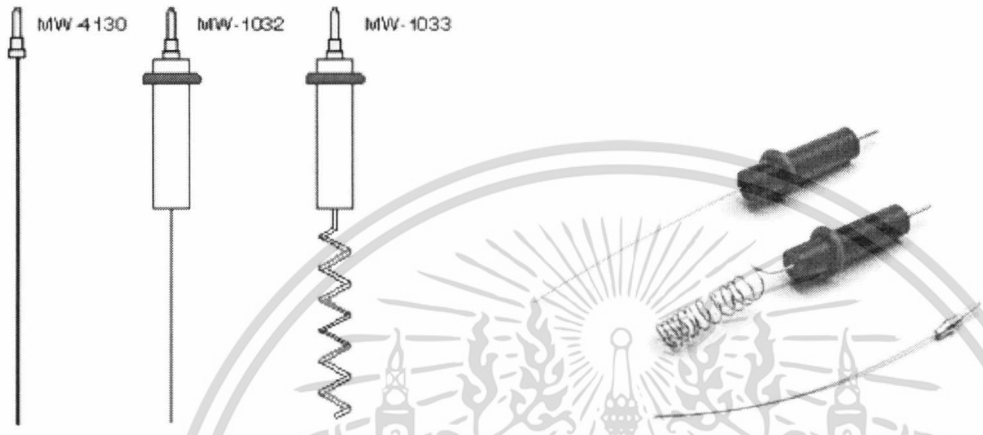
- ขั้วไฟฟ้าหยดปรอท (dropping mercury electrode; DME) ขั้วไฟฟ้าชนิดนี้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากปรอทมีศักย์เกินตัวของการเกิดรีดักชันของไอออนไฮโดรเจนค่อนข้างสูง ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้โดยไม่ถูกรบกวนจากการเกิดแก๊สไฮโดรเจน นอกจากนี้ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าใหม่อยู่ตลอดเวลาเนื่องจากมีการสร้างหยดปรอทใหม่ ๆ ตลอดเวลา และแต่ละหยดปรอทที่เกิดขึ้นใหม่มีผลต่อการเกิดกระแสไฟฟ้าโดยไม่ถูกรบกวนจากหยดปรอทเดิม ปัจจุบันมีการนำ CGME (controlled growth mercury drop electrode) มาใช้เป็นขั้วไฟฟ้าซึ่งสามารถควบคุมขนาดของหยดปรอทแต่ละหยดโดยใช้วาล์วซึ่งตอบสนองต่อการโตของหยดปรอทได้อย่างดี



รูปที่ 2.21 แสดงการเปิดปิดวาล์วซึ่งควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ ขนาดของหยดปรอทสามารถปรับได้โดยการเปลี่ยนจำนวนของพัลส์หรือความกว้างของพัลส์ CGME

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.4 ขั้วไฟฟ้าช่วย ทำหน้าที่เป็นตัวนำไฟฟ้าได้ดี เป็นขั้วที่รับพลังงานไฟฟ้าจากขั้วไฟฟ้าอ้างอิง ส่งต่อผ่านสารละลายไปยังขั้วไฟฟ้าใช้งานเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารตัวอย่างที่ขั้วไฟฟ้าจุ่มอยู่โดยขั้วไฟฟ้าร่วมนี้ไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง หรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น ตัวอย่างขั้วไฟฟ้าช่วย เช่น ขั้วไฟฟ้าช่วยแพลตินัม ดังรูป



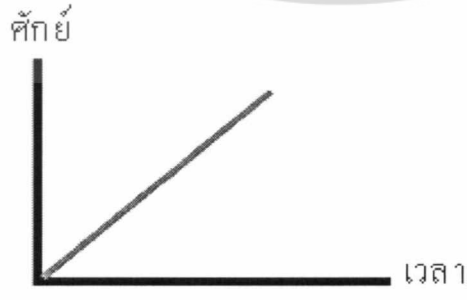
รูปที่ 2.22 แสดงขั้วไฟฟ้าช่วยแพลตินัม

2.3.1.5 Votametric analyzer สำหรับควบคุมศักย์ไฟฟ้าและวัดกระแสไฟฟ้า

2.3.2 เทคนิคที่สำคัญในการวิเคราะห์โดยโวลแทมเมทรี ได้แก่

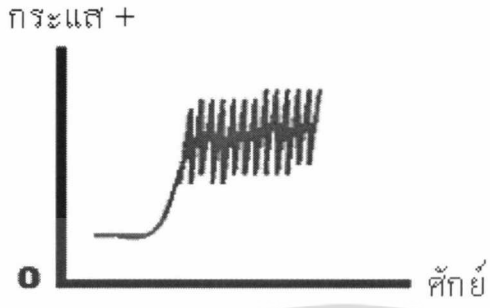
2.3.2.1 โพลาโรกราฟี (polarography) เป็นเทคนิคแรกของการวิเคราะห์ มีการใช้ขั้วไฟฟ้าแบบหยดปรอทเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน เทคนิคนี้เป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย และเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด

สำหรับการวิเคราะห์โดยโพลาโรกราฟีนี้ ศักย์ที่ให้กับขั้วไฟฟ้าจะเป็นแบบ linear -scan คือ ให้ศักย์กับวงจรในอัตราเร็วที่คงที่หรือเป็นการเพิ่มศักย์อย่างเป็นเส้นตรงตามเวลา ดังรูป

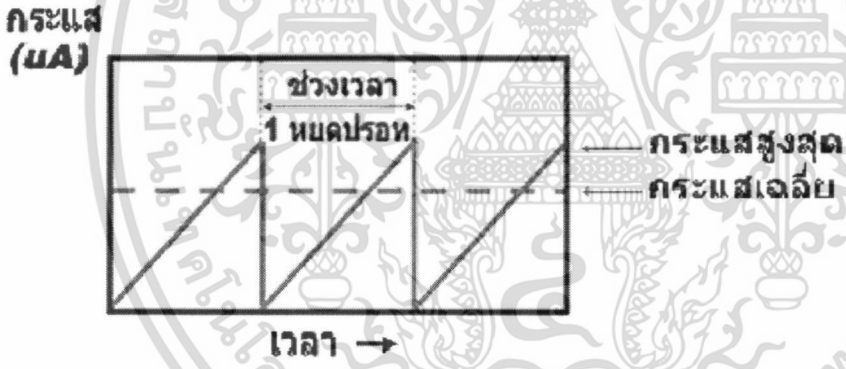


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

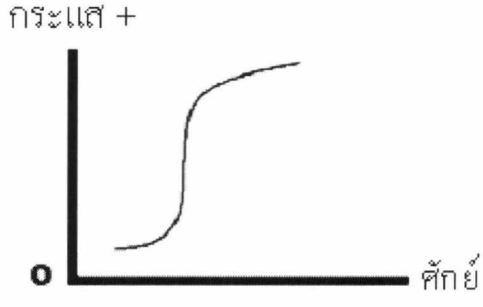
สำหรับศักย์ที่ให้กับวงจร ต้องเลือกให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมโดยใช้ votametric analyzer เป็นตัวควบคุม รวมถึงวัดกระแสที่เกิดขึ้นด้วย โพลาโรแกรมของวิธีโพลาโรกราฟี แสดงได้ดังรูป



สาเหตุที่โพลาโรแกรมที่ได้เป็นแบบฟันเลื่อย เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของกระแสระหว่างการหยดปรอทเกิดการกวัดแกว่งของกระแสขึ้น โดยกระแสเริ่มเกิดเมื่อมีการปล่อยปรอทจากปลายหลอดรูเล็กและกระแสขึ้นสูงสุด เมื่อปรอทถูกปล่อยออกมาเต็มหยด พร้อมที่จะหยดลงในสารละลาย ดังรูป

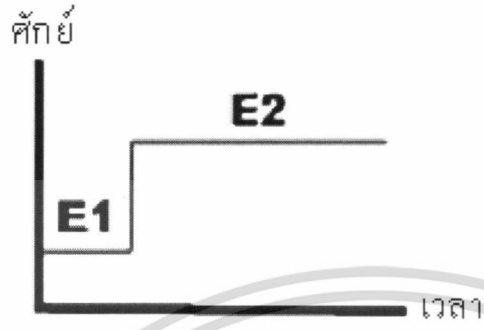


เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว จึงมีการพัฒนาวิธีโพลาโรกราฟีแบบใหม่ที่เรียกว่า การทำแทสท์โพลาโรกราฟี โดยควบคุมบันทึกกระแส ก่อนที่จะหยดออกมาจากปลายหลอดรูเล็กในแต่ละหยด ทำให้โพลาโรแกรมที่ได้ไม่เกิดสภาพของฟันเลื่อย ดังรูป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2 แอมแปโรเมทรี (amperometry) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์โดยให้ศักย์คงที่แก่ขั้วไฟฟ้าใช้งาน โดยค่าศักย์ที่ให้แก่วงจรนั้นต้องมีค่าเพียงพอที่จะทำให้สารตัวอย่างสามารถเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าของขั้วไฟฟ้าได้ สำหรับค่าศักย์ที่ให้แก่วงจรแสดงได้ดังรูป



กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคแอมแปโรเมทรี แสดงได้ดังรูป

จากรูป จะเห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไปกระแสจะลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นลดลง หรืออาจไม่มีสารตั้งต้นเหลืออยู่เลยก็เป็นได้ ความสัมพันธ์ของค่ากระแสที่ลดลงต่อเวลาที่เพิ่มขึ้น แสดงความสัมพันธ์ทางคณิตศาสตร์ได้ดังสมการ

$$i(t) = kt^{-1/2}$$

เมื่อ i = กระแส

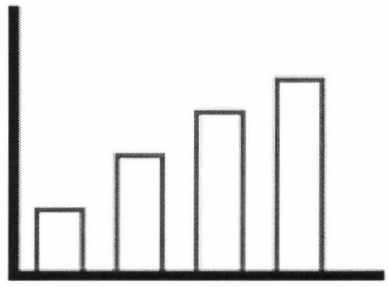
t = เวลา

k = ค่าคงที่

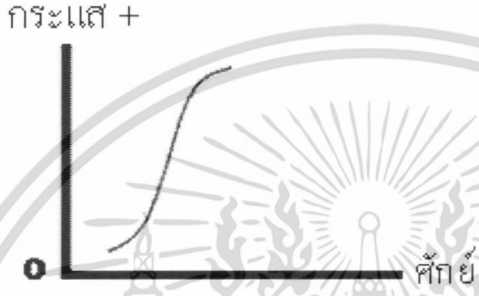
2.3.2.3 พัลส์โวลแทมเมทรี (pulse votametry) ได้แก่

2.3.2.3.1 พัลส์ปรกติ (normal pulse) เป็นการให้ศักย์กับวงจรไฟฟ้าในช่วงเวลาสั้น ๆ ต่อทุกหยดของปรอท โดยศักย์ที่ให้นี้มีขนาดเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอกับเวลา สำหรับการวัดกระแสต้องวัดในช่วงเวลาที่หยดปรอทใกล้จะหยดออกจากปลายแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

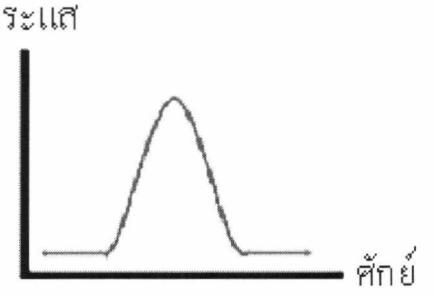


พัลส์โวลแทมโมแกรมที่ได้จะคล้ายกับโพลาโรแกรมจากวิธีแทสท์ ดังรูป



2.3.2.3.2 ดิฟเฟอร์เรนเชียสพัลส์ (differential-pulse voltametry) เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างมากในการตรวจวัดสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่มีปริมาณน้อย ๆ สำหรับสัญญาณกระตุ้นในลักษณะของดิฟเฟอร์เรนเชียสพัลส์ เป็นการเพิ่มศักย์ที่คงที่ในลักษณะของพัลส์ให้กับขั้วไฟฟ้าที่รับศักย์ปกติในรูปลิเนียร์ - สแกนอยู่แล้ว ดังรูป

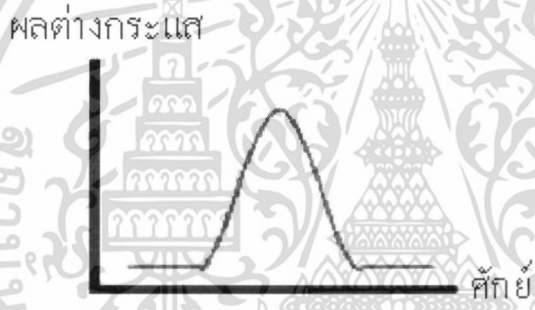
พัสส์โวลแทมโมแกรมที่ได้ มีลักษณะเป็นพีค ดังรูป



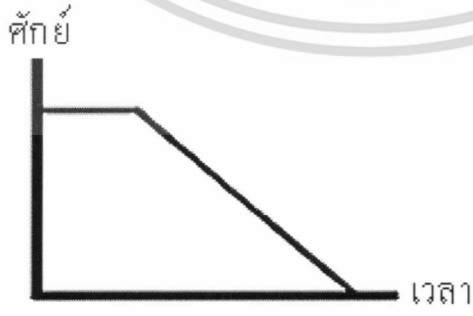
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.4 สแควร์-เวฟ (square-wave) สแควร์-เวฟโวลแทมเมทรี จะให้สัญญาณกระตุ้นศักย์ที่ต่างจากแบบพัลส์ทั้งสองแบบที่กล่าวมาคือ ให้สัญญาณกระตุ้นกับวงจรไฟฟ้าเป็นช่วง ๆ สำหรับวิธีนี้จะให้หยดปรอทแค่หนึ่งหยด เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นช่วงเวลาสั้น ๆ รูปแบบสัญญาณกระตุ้นแบบพัลส์สแควร์-เวฟ แสดงได้ดังรูป

โวลแทมโมแกรมที่ได้ แสดงได้ดังรูป

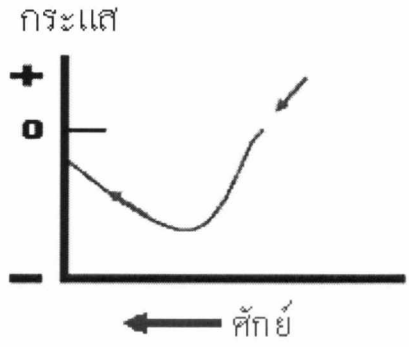


2.3.2.5 สทริปปิงโวลแทมเมตรี (stripping voltametry) เป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าสูงมาก คือสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างโลหะปริมาณน้อย ๆ ได้ โดยเทคนิคนี้จะเพิ่มขั้นตอนที่ทำให้สารตัวอย่างมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์โดยวิธีโวลแทมเมทรีต่อไป รูปแบบสัญญาณกระตุ้นแบบสทริปปิง แสดงได้ดังรูป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โวลแทมโมแกรมที่ได้ แสดงดังรูป



เทคนิคสทริปปิงโวลแทมเมทรี ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค Solid Phase Extraction ในการเตรียมตัวอย่างวิตามินอี

การเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้ าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และ Gas Chromatography (GC) เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากสิ่งสกปรกในตัวอย่างสามารถทำให้คอลัมน์ที่มีราคาแพงและระบบอุดตันได้ ถ้าคอลัมน์ของระบบ GC อุดตัน เราสามารถล้างด้วยตัวทำละลายแล้วทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์นั้นกลับดีขึ้นได้ ส่วนคอลัมน์ของระบบ HPLC นั้นทำได้ยากกว่า เพราะฉะนั้นวิธีที่สุดคือ การป้องกันไม่ให้สิ่งสกปรกเข้าไปสะสมในระบบ หรือคอลัมน์ได้ โดยมีการเตรียมตัวอย่างที่ดีและถูกต้องนั่นเอง การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่ต้องใช้เวลามาก ประมาณได้เป็น 60-80% ของเวลาทั้งหมดที่ใช้ไปกับการวิเคราะห์ นอกเหนือจากเวลาที่ต้องเสียไปแล้ว เรายังสูญเสียตัวทำละลายไปอีกด้วย จากการประเมินทั่วไปพบว่าเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างที่ใช้กันมากที่สุดคือ Liquid-Liquid Extraction (LLE) LLE มีข้อเสียตรงที่อาจเกิดอีมัลชันกรณีใช้ กับตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อ การที่ต้องใช้ เครื่องแก้วจำนวนมาก ทำให้เป็นการเพิ่มสิ่งสกปรกต่าง ๆ ที่จะมารบกวนการวิเคราะห์ ให้มากขึ้น ผลที่ได้อาจไม่ถูกต้อง ตัวทำละลายที่ใช้มีราคาแพงและใช้ในปริมาณมาก ดังนั้นเราควรลดปริมาณการใช้ลง และควรคำนึงถึงการทิ้งตัวทำละลายเหล่านั้นหลังการใช้งานว่ามีผลต่อสิ่งแวดล้อมอย่างไรด้วย

Solid Phase Extraction (SPE) เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่สามารถนำมาใช้แทน LLE ได้โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก วิธีของ SPE มีหลักการคล้ายกับ LLE ตรงที่ใช้ หลักการ partition เหมือนกัน แต่ทว่า partition ไม่ได้เกิดระหว่างของเหลวกับของเหลวเหมือนกับของ LLE แต่จะเกิดระหว่างของแข็ง (คือ absorbent ที่อยู่ ในแท่ง SPE) กับของเหลวหรือตัวทำละลาย

ข้อดีของ SPE มีอยู่มากแต่ ที่สามารถสรุปให้เห็นเด่นชัดมีดังนี้คือ

1. ลดปริมาณตัวทำละลายที่จำเป็นต้องใช้ลง
2. ประหยัดเวลา
3. ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้น้อยลงหรือเหลือขั้นตอนเดียว
4. สามารถใช้กับระบบการเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติได้
5. เลือกใช้ได้กับตัวทำละลายหลายชนิด

ดังนั้นจะเห็นว่า SPE เป็นเทคนิคที่ปัจจุบันนิยมใช้กันมากที่สุดในการเตรียมตัวอย่าง การใช้ SPE ไม่เพียงแต่ทำความสะอาดตัวอย่างขจัดสารที่รบกวนการวิเคราะห์ ออกเท่านั้น แต่ยังเป็นการช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการใช้ SPE

มีขั้นตอนง่าย ๆ 4 ขั้นตอนตามลำดับดังนี้คือ

1. condition เป็นการเตรียม sorbent หรือ packing ที่บรรจุอยู่ในแท่ง SPE ให้ พร้อมรองรับตัวอย่าง
2. load เป็นการใส่ตัวอย่างลงไปเพื่อให้จับกับ sorbent
3. rinse เป็นการขจัดเอาสารที่จับกับ sorbent ได้น้อยหรือจับอยู่ที่ส่วนผิวของ sorbent ออก
4. elution เป็นการดึงเอาสารที่เราสนใจที่เกาะกับ sorbent ออกเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

วิธีเลือก SPE

ที่จริงแล้วการเลือก SPE ไม่ยากอย่างที่คิด หลักการเลือก sorbent นั้นให้ดูว่าสารที่เราสนใจเป็นพวกที่ละลายน้ำหรือไม่ละลายน้ำ (hydrophilic หรือ hydrophobic) ให้เลือก sorbent ที่มีความมีขั้วตรงกับสารที่เราจะแยกตัวอย่างเช่น

ถ้ามีสารที่ละลายได้ดีในน้ำเป็นพวกที่มีประจุคือสามารถแตกตัวที่ค่า pH หนึ่ง ตัวอย่างนี้จะใช้ sorbent เป็น ion exchanger โดยใช้ anion สำหรับสารที่มีประจุลบ และ cation สำหรับสารที่มีประจุบวก

ตัวอย่างการเลือก cartridge หรือตัวทำละลายแสดงดังนี้

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : C_{18}

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophobic bonded silica

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - แยกสาร hydrophobic ออกจากสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย
- ยาและ metabolite ของยาในเลือดน้ำเหลืองและปัสสาวะ
- สารอินทรีย์ปริมาณต่ำๆในตัวอย่างน้ำ น้ำเสีย
- กรดอินทรีย์ในพวกเครื่องดื่มและไวน์
- เปปไทด์ในตัวอย่างเลือด น้ำเหลือง และของเหลวในร่างกาย

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : C_8

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophobic non-polar bonded

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - แยกสาร hydrophobic ออกจากสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย
- ใช้เมื่อต้องการให้สาร retain น้อยลงกว่าแบบ C_{18}
- ยาและ metabolite ของยาในเลือด น้ำเหลืองและปัสสาวะ
- เปปไทด์ในตัวอย่างเลือด น้ำเหลือง และของเหลวในร่างกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : silica

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophilic polar (neutral)

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - แยกสารละลายที่มีขั้วน้อยถึงปานกลางออกจากสารละลายที่ไม่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย
- วิตามิน A D E K
- ยาฆ่าแมลง
- ไขมันชนิดต่างๆ
- สารสกัดจากธรรมชาติ พิกเมนต์จากพืช
- สารอินทรีย์สังเคราะห์

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : florisil

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophilic polar (slightly basic)

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - แยกสารละลายที่มีขั้วน้อยถึงปานกลางออกจากสารละลายที่ไม่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย
- วิธีตาม AOAC และ EPA
- ตัวอย่างที่มีไขมันสูง
- ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช ในอาหารคนและอาหารสัตว์
- สาร polychlorinatd biphenyls ใน transformer oil

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : alumina A

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophilic polar (acidic)

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - แยกสาร hydrophilic ออกจากสารละลาย non-aqueous
- มีสมบัติเป็น cation exchanger เล็กน้อย
- แยกน้ำตาล คาเฟอิน ในเครื่องดื่มประเภทโคลา
- วิตามินในอาหารคนและอาหารสัตว์
- ยาปฏิชีวนะ
- สารผสมในอาหารคนและอาหารสัตว์

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : alumina N

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophilic polar (neutral)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - แยกสาร hydrophilic ออกจากสารละลายที่ไม่มีน้ำเป็นตัวทำ
ละลาย
- ยาฆ่าวัชพืช
- ปิโตรเลียมและน้ำมัน
- สารผสมในอาหาร
- สารอินทรีย์สังเคราะห์

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : alumina B

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophilic polar (basic)

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - แยกสาร hydrophilic ออกจากสารละลายที่ไม่มีน้ำเป็นตัวทำ
ละลาย
- มีสมบัติเป็น cation exchanger เล็กน้อย
- ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช น้ำเสีย
- พวกสเตียรอยด์ต่าง ๆ

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : accell plus CM

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophilic polar (acidic) cation exchange

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - แยกพวกไอออนที่มีประจุบวก ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายหรือไม่มี
น้ำเป็นตัวทำละลาย
- สกัดโปรตีนเอนไซม์ และ immunoglobulin ต่างๆที่มีสภาวะเป็นด่างอ่อน
- สารอินทรีย์สังเคราะห์
- แยกเปปไทด์ขนาดต่างๆ

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : accell Plus QMA

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophilic polar (basic) anion exchange

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - แยกไอออนที่มีประจุลบในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายหรือไม่มี
น้ำเป็นตัวทำละลาย
- สกัดโปรตีน เอนไซม์ ที่มีฤทธิ์เป็นกรดและกรดอ่อน
- แยก immunoglobulin ต่างๆ
- แยกเปปไทด์ขนาดต่างๆ
- แยกพิกเมนต์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดจากไวน์ น้ำผลไม้ อาหาร
- แยกสารพวกฟีโนลิกต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : aminopropyl NH_2

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophilic moderately polar (slightly basic)

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - ใช้เป็น weak anion exchanger
- ยาและ metabolite ของยา
- อุตสาหกรรมปิโตรเลียมและน้ำมันหล่อลื่น
- แซคคาไรด์
- สารพวกฟีนอลและพิกเมนต์พวกฟีโนลิก

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : cyanopropyl CN

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophobic moderately non-polar (neutral)

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - วิเคราะห์สารที่ละลายในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายหรือสารอินทรีย์
- ยาและ metabolite ของยา จากน้ำในส่วนต่างๆของร่างกาย
- metabolite จากเชื้อราและผลิตภัณฑ์จากการหมัก
- ยาฆ่าแมลง
- เปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นสารไฮโดรโฟบิค

การเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges Sorbent หรือ Packing Material : diol

คุณสมบัติที่ผิว : hydrophobic moderately non-polar neutral phase

การวิเคราะห์ที่ใช้ : - วิเคราะห์สารที่ละลายในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายหรือสารอินทรีย์
- ธาตุที่มีปริมาณน้อยในน้ำ
- ยาปฏิชีวนะในเครื่องสำอาง
- แยกเปปไทด์และโปรตีนต่างๆ

การเลือกตัวทำละลาย

การเลือกตัวทำละลายจะมีผลต่อการเตรียมตัวอย่างในแง่ที่ว่าจะได้ตัวอย่างออกมาสะอาดแค่ไหนและได้ค่า recovery เป็นอย่างไร ถ้าเราเลือกตัวทำละลายได้เหมาะสมสำหรับ rinse หรือชะตัวอย่าง ตัวอย่างก็จะสะอาด และได้ค่า recovery ดี การเลือกสามารถทำได้ง่ายด้วยการทดลองใช้ ตัวทำละลายที่มี strength ต่าง ๆ กันเหมือนกับหลักการเลือกตัวทำละลายและคอลัมน์ ในระบบ HPLC เราจะ load สารที่เราสนใจลงไปบน sorbent สารที่เราสนใจควรมีความเข้มข้นพอเหมาะต่อไปจะเลือกใช้ตัวทำละลายเป็นชุดๆที่ทราบปริมาตร แล้วค่อยๆเพิ่ม strength ขึ้นเรื่อย ๆ แล้วเก็บแต่ละส่วนมาตรวจสอบว่าสารที่เราสนใจถูกชะออกมาเท่าใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการไหล

การที่จะปรับสภาพของ sorbent ให้เรียบร้อยก่อน load ตัวอย่าง การ load ตัวอย่างและขบวนการชะสาร จะต้องทำที่อัตราการไหลของตัวทำละลายที่หมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาจากตัวอย่างตกค้างหรือ retain อย่างสมบูรณ์ หรือไม่ถึงสมดุลโดยทั่วไปแล้ว เราสามารถปรับสภาพ cartridge ได้โดยใช้อัตราการไหลสูงถึง 25 มิลลิลิตร / นาที ส่วนการ loadตัวอย่างและการชะสารนั้นจะดีที่สุดเมื่อเราใช้อัตราการไหลไม่เกิน 10 มิลลิลิตร / นาที แต่ก็เป็นไปได้ที่ว่าค่า recovery อาจจะยอมรับได้ เมื่อเราใช้ อัตราการไหลสูงถึง 20 มิลลิลิตร / นาที (ซึ่งควรตรวจสอบโดยใช้สารมาตรฐานเสียก่อน) กรณีใช้ sorbent ซึ่งเป็นพวก ion exchange จะแนะนำให้ใช้อัตราการไหลต่ำกว่า เช่น 1-2 มิลลิลิตร / นาที Sep- Pak บางชนิด เช่น Sep-Pak light จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าแบบอื่น ก็ให้ลดอัตราการไหลลง 3 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Anna Gliszczynska – Swiglo , Ewa Sikorska [1] ได้ใช้เทคนิค reverse – phase HPLC หาปริมาณ tocopherols (α - , ($\beta + \gamma$) , δ -) ในน้ำมันพืชที่ทานได้ mobile phase ที่ใช้คือ เมทานอล : อะซีโตไนไทรล์ ในอัตราส่วน 1 : 1 ใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่นที่สภาวะถูกกระตุ้น 295 นาโนเมตร และที่สภาวะการคายแสงที่ 325 นาโนเมตร โดยวิธีนี้มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (R.S.D.) ไม่น้อยกว่า 2.24 เปอร์เซนต์ , ขีดความไวที่ต่ำสุดในการตรวจวัด (DL) ของ δ - tocopherol และ γ - tocopherol คือ 8 นาโนกรัม / มิลลิลิตร และ 28 นาโนกรัม / มิลลิลิตร สำหรับ α - tocopherol

T. Galeano Diaz , I. Duran Meras , A. Guiberteau Cabanillas , M.F. Alexandre Franco [2] ได้ใช้เทคนิคโวลแทมเมทริกในการหาปริมาณ tocopherols โดยศึกษาโวลแทมเมทริกเทคนิคในการใช้ glassy carbon electrode ในสารตัวกลางเฮกเซน-เอธานอล ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น วิธีการวัดกระแสตรงของสารตัวอย่าง , วิธีดิฟเฟอเรเชียลพัลส์ และสแควร์เวฟโวลแทมเมทรี ศึกษาอิทธิพลของส่วนผสมเฮกเซน – เอทานอล , ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกและสภาวะของเครื่องมือ จะได้พีคของ α - ocopherol และ δ - tocopherol แต่พีค β-tocopherol และ γ-tocopherol จะเกิดการซ้อนทับกัน ในการวิเคราะห์ปริมาณ α- ,β- ,γ- และ δ-tocopherol ในน้ำมันพืชจะใช้วิธีสร้างเคอร์ฟมาตรฐาน partial least square type 1 (PLS-1) นำผลที่ได้จากการวัดโดยวิธีกระแสตรงและวิธีดิฟเฟอเรเชียลพัลส์โวลแทมโมแกรมมาเปรียบเทียบกัน ซึ่งจะพบว่าการทำแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์จะให้ข้อมูลดีที่สุด วัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หา tocopherols ในน้ำมันพืชต่างๆ โดยสารตัวอย่างน้ำมันมะกอกต้องทำการกำจัดสิ่งรบกวนด้วย solid-phase extraction โดยใช้ silica cartridge ผลการวิจัยที่ได้เป็นที่ยอมรับ

M. Masin Sanagi, H.H See, Wan Aini Wan Ibrahim, Ahmedy Abu Naim [3] ใช้เทคนิคการสกัด Pressurized liquid extraction (PLE) ด้วย normal phase liquid chromatography (NPLC) สำหรับวิเคราะห์เบต้าแคโรทีนและวิตามินอีในกากน้ำมันจาก palm pressured fiber (PPF) โดยใช้การสกัดแบบซอล์กเลต โดยใช้สารตัวอย่าง 5 กรัม ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 1500 psi 2 x 10 นาที การสกัดแบบคงที่ด้วยปริมาตร 50 % ซึ่งจากการสกัดจะพบว่ามีวิตามินอีอยู่ 3.7 – 4.0 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร , เบต้า – แคโรทีน 3.3 – 3.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ซึ่งในการสกัดด้วยวิธีนี้นั้นจะใช้เวลาในการสกัดสั้นกว่า และให้ปริมาณวิตามินอีและเบต้า – แคโรทีน มากกว่าการใช้ n – hexane และคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายในการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dagmar Pollok, Hans-Ulrich Melchert [4] ได้พัฒนาเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์แบบ on – line post – column derivatization ในการวิเคราะห์ α - , $\beta + \gamma$ - , และ δ - tocopherolquinone (TQ) โดยใช้คอลัมน์ RP – 18 ขนาด 250 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร มี LOD 250 pq เทคนิคนี้นำไปวิเคราะห์ปริมาณ α - TQ ในสารตัวอย่างเซรุ่มในมนุษย์ ค่า recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ spike เท่ากับ 99 $\pm$ 5 % ในขณะที่ได้ค่า recovery ของ β - , γ - และ δ - TQ เท่ากับ 28 $\pm$ 4 , 63 $\pm$ 8 % และ น้อยกว่า 20 % โดยใช้ความยาวคลื่นที่สภาวะถูกกระตุ้น 294 นาโนเมตร , ความยาวคลื่นที่สภาวะคายแสงที่ 331 นาโนเมตร ในการใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์เป็นเครื่องตรวจวัดและใช้ความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร ในการใช้เครื่องตรวจวัดยูวี

Salvatore Fanail, Emanuele Camera, Bezhan Chankevtadze, Giovanni D'Orazio, Maria Giovanna Quaglia [5] ใช้ nanoliquid chomtigraphy (nano-LC) ที่ใช้ในการแยก tocopherols (δ -, γ - ,α -TOH), α -tocopherol acetate (α -TOH-Ac) และสารประกอบสาร antioxidant โดย BHT (butylated hydroxytoluene) ใช้ในการป้องกัน TOHs autooxidant ในการแยกจะใช้ fused silica ซึ่งมี I.D ขนาด 100 ไมโครเมตรและ O.D ขนาด 375 ไมโครเมตรด้วย RP_{18} silica ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 หรือ 3 ไมโครเมตรเป็น stationary phase และใช้ mobile phase เป็นเมทานอล, อะซิโตไนไตรล์และน้ำ เวลที่ใช้ในการวิเคราะห์สารผสมใช้เวลาประมาณ 6-9 นาที เมื่อใช้ RP_{18} ขนาด 3 ไมโครเมตร จะมีประสิทธิภาพและการแยกที่ดีซึ่งมีผลต่อขนาดของอนุภาคของเส้นผ่านศูนย์กางและความสูง Rs และค่า N/m จากการทดลองโดยใช้ capillary แบบ pack RP_{18}ขนาด 3 ไมโครเมตร จะให้ค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ) ที่ดี (สำหรับ δ -, γ - TOH,α - TOH-Ac จะมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน α -TOH จะมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 6 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

1. วิตามินอีบริสุทธิ์ ($C_{29}H_{50}O_2$) > 98% HPLC
   - มวลโมเลกุล : 430.72
   - Analysis No. : 286955 589
   - d_4^{28} 0.950 ; n_D^{20} 1.506 ; 1.1 units / mg
   - เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 – 4 °C ในที่ทึบแสง
2. น้ำมันพืช (Vegetable oil)
3. เอทานอลบริสุทธิ์ (Ethyl Alcohol Absolute, C_2H_6O), A.R. gradeของบริษัทCarloerba
4. เททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (tetramethylammoniumchloride, $C_4H_{12}ClN$), ของบริษัท Fluka
5. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. Sulfuric acid, H_2SO_4)
6. ไอโซโพรพานอล (isopropanol, $CH_3CHOHCH_3$)
7. อะซีโทไนไทรล์ (acetonitrile, CH_3CN), HPLC grade ของบริษัท Fisher
8. เมทานอล (methanol, CH_3OH), HPLC grade ของบริษัท Fisher
9. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC รุ่น Waters 486
2. คอลัมน์ HIQ Sil C_{18} ขนาด 4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร ของบริษัท KYA TECH Corporation
3. ปั๊มของระบบลิควิดโครมาโทกราฟี (รุ่น Water 510) ของบริษัท Millipore
4. คอลัมน์ C-18 5.0 ไมโครเมตร 4.6*150 มิลลิเมตร ของบริษัท KYA TECH Corporation
5. Guard column Nova – Pak C_{18} ของบริษัท Millipore
6. UV detector ของเครื่อง HPLC รุ่น Water 486 ของบริษัท Waters
7. กระดาษกรองเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore
8. เครื่อง Voltammetry ขั้วไฟฟ้า (electrode) เป็นระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า
   - glassy carbon electrode เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ขั้วซิลเวอร์ – ซิลเวอร์คลอไรด์ – 3 โมลาร์โพแทสเซียมคลอไรด์ (Ag – AgCl – 3MKCl) เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode)
- ขั้วแพลทินัมแผ่นบาง (platinum disk auxiliary electrode) เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย (counter electrode)

9. เครื่องกรองแบบลดความดัน
10. เครื่องไล่ฟองอากาศ
11. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analysis balance) Precisa 205A
12. เครื่องแก้วที่จำเป็น

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1.1 การเตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm

ชั่งวิตามินอีบริสุทธิ์มา 0.1 กรัมหรือปิเปตมา 0.105 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.2 การเตรียม stock solution ของสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm

ชั่งน้ำมันพืชมาประมาณ 0.6 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.3 การเตรียม stock solution ของสารละลายกรดซัลฟิวริค 0.1 โมลาร์ในเอทานอล

ปิเปตสารละลายกรดซัลฟิวริคเข้มข้นมา 0.55 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล

3.2.1.4 การเตรียม stock solution ของสารละลายเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ในเอทานอล

ชั่งเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์มา 5.48 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล

3.2.1.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 0.5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 0.125 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 1.25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.8 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.9 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 20 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.10 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 40 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.11 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 60 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 15 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.12 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 80 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.13 การเตรียมสารละลาย standard addition 0 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.14 การเตรียมสารละลาย standard addition 1 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm มา 10 มิลลิลิตรและปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.15 การเตรียมสารละลาย standard addition 5 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm มา 10 มิลลิลิตรและปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 1.25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.16 การเตรียมสารละลาย standard addition 10 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm มา 10 มิลลิลิตรและปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.17 การเตรียมสารละลาย standard addition 20 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm มา 10 มิลลิลิตรและปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.18 การเตรียมสารละลาย standard addition 40 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm มา 10 มิลลิลิตรและปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.19 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริค 0.1 โมลาร์ในเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ในเอทานอล 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.20 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 2 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริค 0.1 โมลาร์ในเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ในเอทานอล 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.21 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 4 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริค 0.1 โมลาร์ในเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ในเอทานอล 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.22 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 8 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริค 0.1 โมลาร์ในเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ในเอทานอล 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.23 การเตรียมสารละลาย standard addition 0 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm มา 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริค 0.1 โมลาร์ในเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ในเอทานอล 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.24 การเตรียมสารละลาย standard addition 1 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm มา 20 มิลลิลิตร , ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริค 0.1 โมลาร์ในเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ในเอทานอล 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.25 การเตรียมสารละลาย standard addition 2 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm มา 20 มิลลิลิตร , ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริค 0.1 โมลาร์ในเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ในเอทานอล 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

3.2.1.26 การเตรียมสารละลาย standard addition 4 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm มา 20 มิลลิลิตร , ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริค 0.1 โมลาร์ในเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ในเอทานอล 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยไอโซโพรพานอล เก็บไว้ในภาชนะทึบแสงในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.27 การเตรียมสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล เพื่อใช้เป็นส่วนเคลื่อนที่สำหรับเทคนิค HPLC

กรองอะซีโทไนไทรล์และเมทานอลด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ แล้วนำไปเตรียมสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 : 50 60 : 40 40 : 60 ปริมาตรโดยปริมาตร

3.2.2 การศึกษาด้วยโวลแทมเมทรีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์

3.2.2.1 ขั้วไฟฟ้าใช้งานคือ glassy carbon electrode เตรียมได้ดังนี้

ใช้สำลีชุบไดเมทิลฟอร์มาไมด์ให้ชุ่มค่อย ๆ ซับที่ glassy carbon electrode ประมาณ 2 นาที จากนั้นใช้สำลีชุบน้ำกลั่นให้ชุ่มค่อย ๆ ซับที่ glassy carbon electrode อีกครั้งหลาย ๆ นาที

3.2.2.2 ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงคือ ซิลเวอร์ – ซิลเวอร์คลอไรด์ – 3M โพแทสเซียมคลอไรด์

3.2.2.3 ขั้วไฟฟ้าช่วยคือ แพลทินัม

3.2.2.4 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

Instruction	t / s	Main parameters		Recognition	
D SMLP / M		V. fraction	mL	U. verify	650 mv
C (CAL		Rot. speed	2000 / นาที	U. tol (+ / -)	80 mv
PURGE	60.0	Segm. Name	asv	U. width min	10 mv
STIR	10.0	Cycles	1	U. width max	400 mv
SEGMENT				I. threshold	200 pA
RINSE					
C CAL3)					
END					

Display / Plot		Baseline		Evaluation	
I. scale	auto	Type	linear	Mode	VA
U. div	50.00 mv / cm	Scope	whole	Quantity	I. peak
U. begin	400 mv	dU. front	auto	Sign . digits	4
U. end	900 mv	s. front	auto		
		dU. rear	auto		
		s. rear	auto		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.5 ทดสอบเพื่อยืนยันตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา (การทำ spiking)

ตัวอย่างแรกเตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm ปริมาตร 20 ไมโครลิตรตัวอย่างที่สองเตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm ปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่เติมด้วยสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

วิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ตัวอย่างละ 1 นาที

3.2.2.6 สภาพเชิงเส้น (linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอีความเข้มข้น 0.5 – 100 ppm และสารละลาย standard addition ความเข้มข้น 0 – 40 ppm วิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเคมี ตัวอย่างละ 1 นาที แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างกระแสที่ได้กับความเข้มข้น นำช่วง linearity ของกราฟแต่ละกราฟมาใช้คำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด

3.2.3 การศึกษาด้วยเทคนิค HPLC ตรวจวัดด้วยยูวี วิสิเบิล ดีเทคเตอร์

3.2.3.1 ทดสอบหาอัตราส่วนของส่วนเคลื่อนที่

ทดสอบหาอัตราส่วนของส่วนเคลื่อนที่คือ สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล ที่อัตราส่วน 50 : 50 60 : 40 40 : 60 ปริมาตรโดยปริมาตร ด้วยคอลัมน์ C-18 5.0 ไมโครเมตร 4.6*150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

3.2.3.2 ทดสอบอัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่

นำสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล ที่ได้จากการทดสอบขั้นต้นมาทดสอบหาอัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยทดสอบอัตราการไหลที่ 0.8 1.0 และ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ปริมาตรฉีดวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

นำสภาวะที่ให้การแยกวิเคราะห์ที่ดีที่สุดมาใช้ในการวิเคราะห์วิตามินอี

3.2.3.3 ทดสอบเพื่อยืนยันตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา (การทำ spiking)

ตัวอย่างแรกเตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตัวอย่างที่สองเตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำมันพืช 100 ppm ปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่เติมด้วยสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ฉีดวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ตัวอย่างละ 15 นาที ตามสภาวะที่ได้จากการทดสอบข้างต้น

3.2.3.4 สภาพเชิงเส้น (linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอีความเข้มข้น 0.5 – 100 ppm และสารละลาย standard addition ความเข้มข้น 0 – 40 ppm ฉีดวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ตัวอย่างละ 15 นาที แล้วสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ที่ได้กับความเข้มข้น นำช่วง linearity ของกราฟแต่ละกราฟมาใช้คำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด

3.2.4 วิธีการทดลอง

3.2.4.1 วิธีการทดลองด้วยเทคนิค HPLC

3.2.4.1.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี

ฉีดสารละลายมาตรฐานวิตามินอีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ได้แก่ 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, และ 100 ppm ปริมาณ 20 ไมโครลิตรเข้าสู่ระบบ โดยใช้ส่วนเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลอัตราส่วน 1:1 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร โดยวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นละ 20 นาที

3.2.4.1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย standard addition

ฉีดสารละลาย standard addition ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ได้แก่ 0, 1, 5, 10, 20, และ 40 ppm ปริมาณ 20 ไมโครลิตรเข้าสู่ระบบ โดยใช้ส่วนเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลอัตราส่วน 1:1 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร โดยวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นละ 20 นาที

3.2.4.2 วิธีการทดลองด้วยเทคนิคโวลแทมเมทรีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์

3.2.4.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี

นำสารละลายมาตรฐานวิตามินอีที่เตรียมไว้ 2 ชุด ที่ความเข้มข้นต่างกันคือ ชุดที่ 1 ความเข้มข้น 1, 2, 4, และ 8 ppm ชุดที่ 2 ความเข้มข้น 2, 4, 8, และ 10 ppm นำมาวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นละ 1 นาทีตามสภาวะดังกล่าวข้างต้น

3.2.4.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย standard addition

นำสารละลายมาตรฐานวิตามินอีที่เตรียมไว้ 2 ชุด ที่ความเข้มข้นต่างกันคือ ชุดที่ 1 ความเข้มข้น 0, 1, 2, และ 4 ppm ชุดที่ 2 ความเข้มข้น 2, 4, 8, และ 10 ppm นำมาวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นละ 1 นาทีตามสภาวะดังกล่าวข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

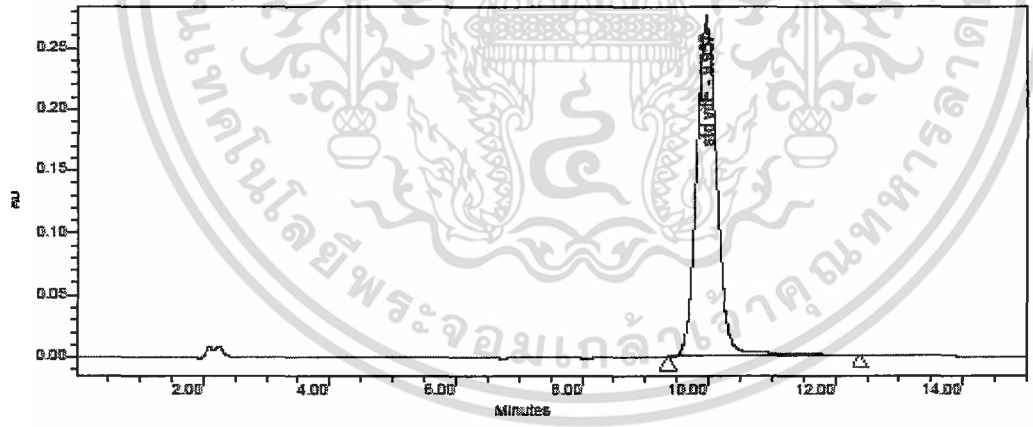
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การวิเคราะห์วิตามินอีโดยเทคนิค HPLC

4.1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วิตามินอี

4.1.1.1 ศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

การทดสอบใช้สารละลายมาตรฐานวิตามินอีความเข้มข้น 10 ppm วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ HIQ Sil C_{18} ขนาด 4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน โดยให้อัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์เป็น 20 ไมโครลิตร ส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 , 60 : 40 และ40 : 60 โดยให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร จากการทดสอบพบว่า เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 60 : 40 และ 40 : 60 ปริมาตร / ปริมาตร พบว่าจะให้ผลการวิเคราะห์แยกช้ากว่าที่ควรเป็น ทำให้เกิดการแยกที่ไม่สมบูรณ์ ลักษณะดังกล่าวเกิดจากการที่ส่วนที่เคลื่อนที่ยังไม่เหมาะสมเพียงพอ และเมื่อทดสอบส่วนเคลื่อนที่สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินอี พบว่าจะให้ผลการวิเคราะห์ในการแยกรวดเร็วเป็นที่น่าพอใจ แสดงดังรูป



รูปที่ 4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 100 ppm โดยใช้ส่วนเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 และอัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

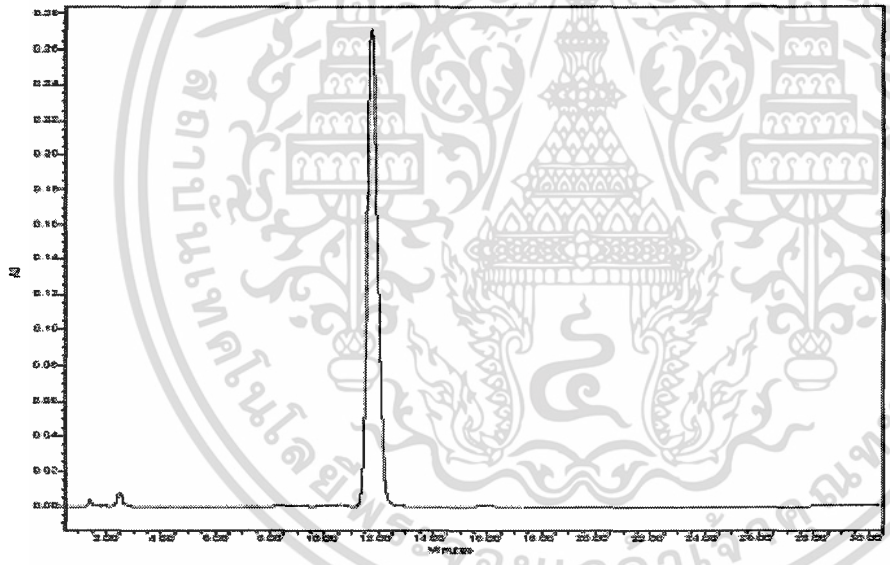
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเฟสเคลื่อนที่ สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาสารละลายวิตามินอีที่เหมาะสมที่สุดคือสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 ซึ่งสามารถแยกสารละลายวิตามิอีออกมาได้ดีที่สุด และใช้เวลาในการแยก 9.957 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1.2 ศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และเวลารีเทนชัน (retention time)

ทดสอบหาอัตราการไหลที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการแยกสารประกอบของวิตามินอีได้ดี โดยใช้ส่วนเคลื่อนที่ที่ได้จากการศึกษาข้างต้นนั่นคือ สารละลายสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร สำหรับอัตราการไหลที่ใช้ศึกษาคือ 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

จากการทดสอบพบว่าเมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้สารละลายวิตามินอีรวมทั้งส่วนเคลื่อนที่ มีเวลาอยู่ในคอลัมน์นานเพียงพอที่จะทำให้การแยกสารประกอบของสารละลายวิตามินอีเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่การใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.8 และ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ไม่สามารถแยกสารประกอบของสารละลายวิตามินอีออกจากกันได้ดีและเวลาที่ใช้ในการแยกนั้นใช้เวลานานกว่า ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งสามารถช่วยให้เกิดการแยกสารประกอบของสารละลายวิตามินอีได้ดี และเวลาที่ใช้ในการแยกคือ 11.228 นาที แสดงดังรูป



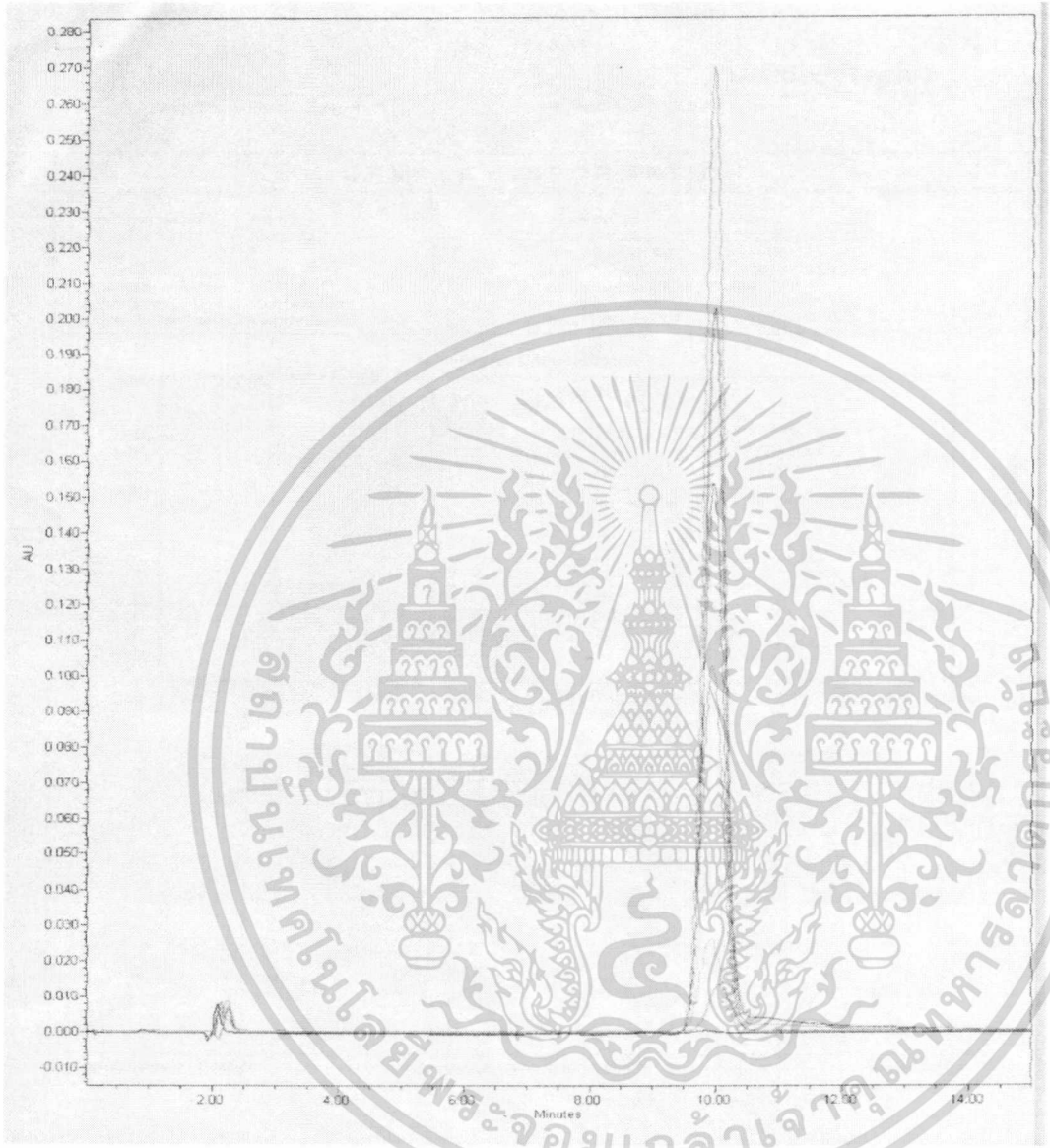
รูปที่ 4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี โดยใช้ส่วนเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 และอัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

4.1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดสอบข้างต้นมาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี โดยทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.49-98.00 ppm ในสารละลายส่วนเคลื่อนที่ของสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 อัตราการไหลของส่วน

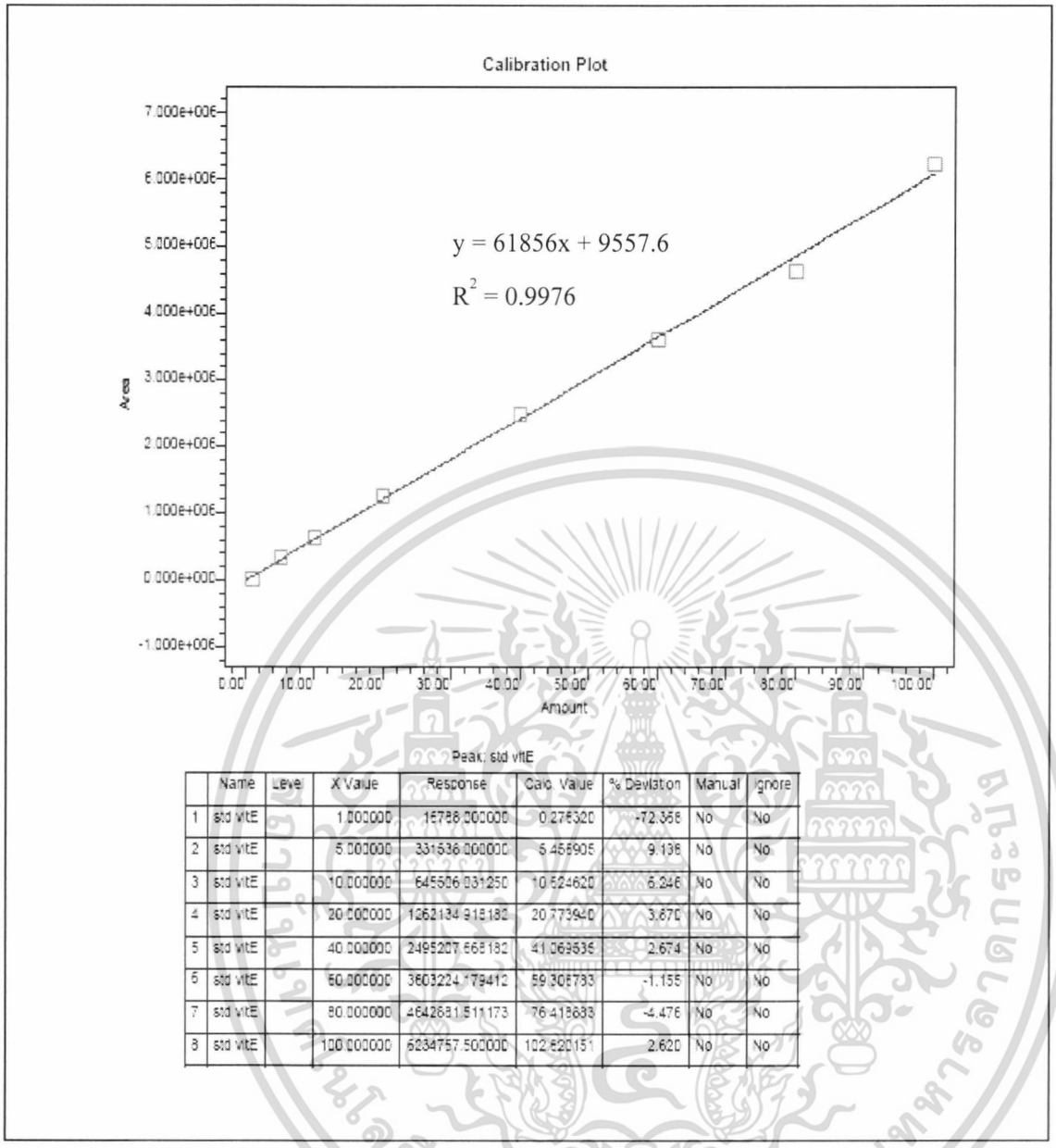
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 295 นาโนเมตร ซึ่งผลจากการทดสอบได้ดังในรูป 4.3



รูปที่ 4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ช่วงความเข้มข้น 0.49-98 ppm ส่วนเคลื่อนที่คือสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 295 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Peak: std vitE

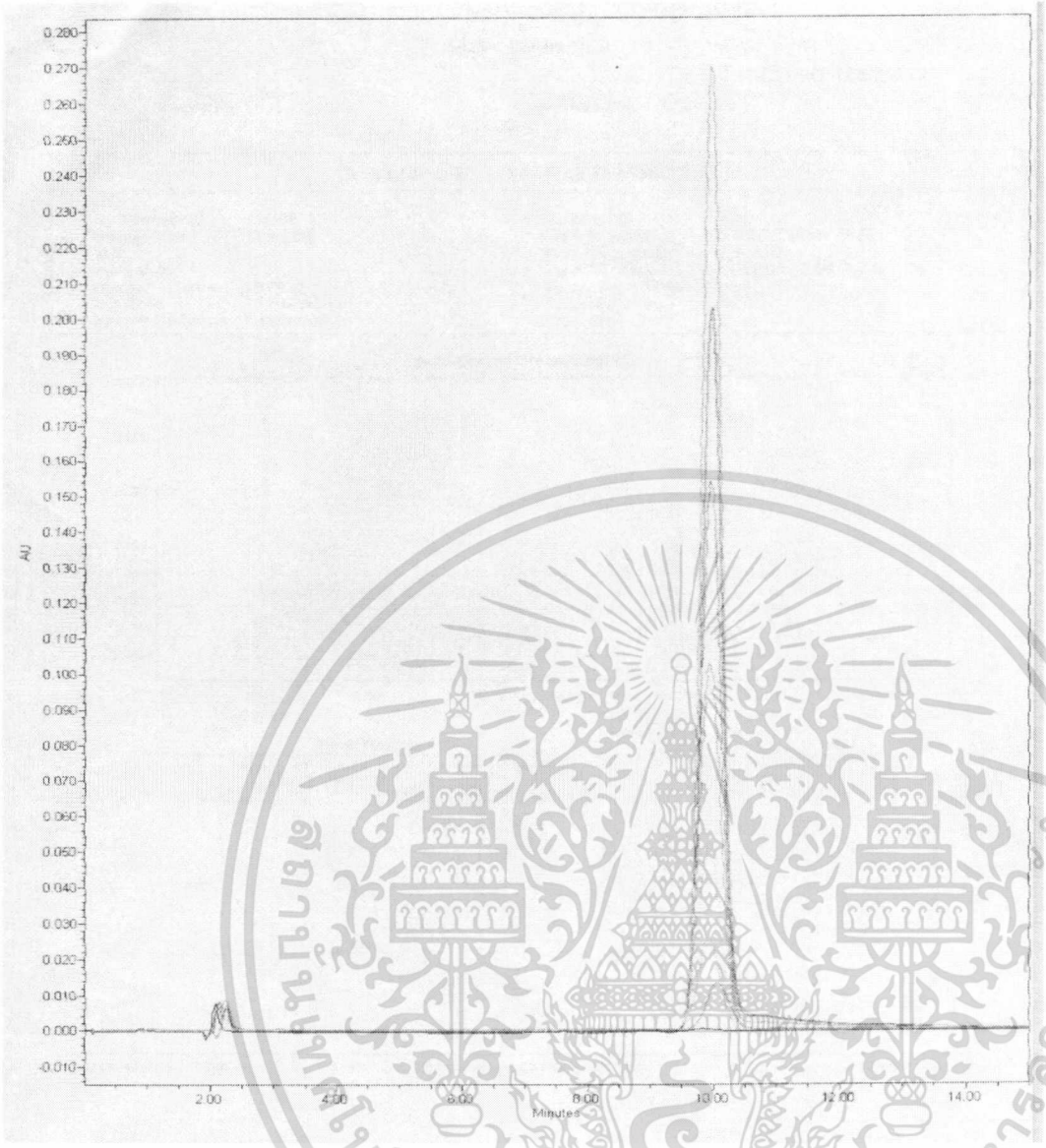
	Name	Leve	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	std vitE		1.000000	15786.000000	0.276320	-72.368	No	No
2	std vitE		5.000000	331536.000000	5.456905	9.138	No	No
3	std vitE		10.000000	645506.031250	10.524620	5.246	No	No
4	std vitE		20.000000	1262134.818182	20.773940	3.870	No	No
5	std vitE		40.000000	2495207.668182	41.069535	2.674	No	No
6	std vitE		60.000000	3603224.179412	59.305733	-1.155	No	No
7	std vitE		80.000000	4642681.511173	76.413633	-4.476	No	No
8	std vitE		100.000000	6234757.500000	102.620151	2.620	No	No

รูปที่ 4.4 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีช่วงความเข้มข้น 0.49-98 ppm เมื่อนำผลที่ได้จากการทดสอบมาสร้างกราฟมาตรฐานจะทำให้ทราบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ คือมีค่าเท่ากับ 0.9976

4.1.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน standard addition

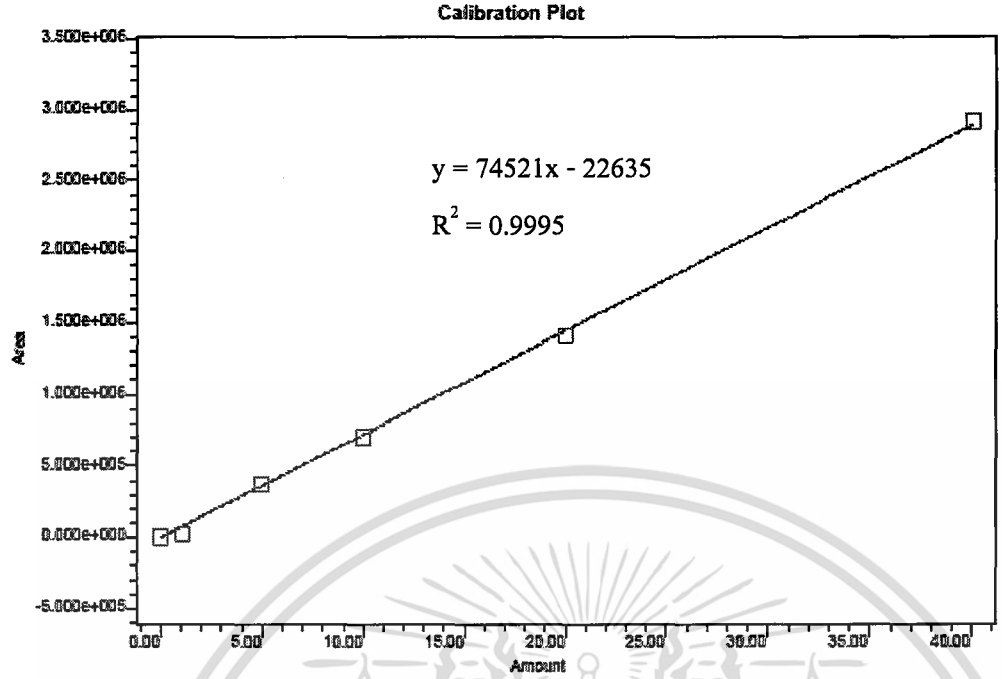
นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดสอบข้างต้นมาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินอี โดยทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0-39.20 ppm ในสารละลายส่วนเคลื่อนที่ของสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 ปริมาตร/ปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 295 นาโนเมตร ซึ่งผลจากการทดสอบได้ดังในรูป 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ช่วงความเข้มข้น 0-39.20 ppm ส่วนเคลื่อนที่คือสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 295 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Peak: std addvitE

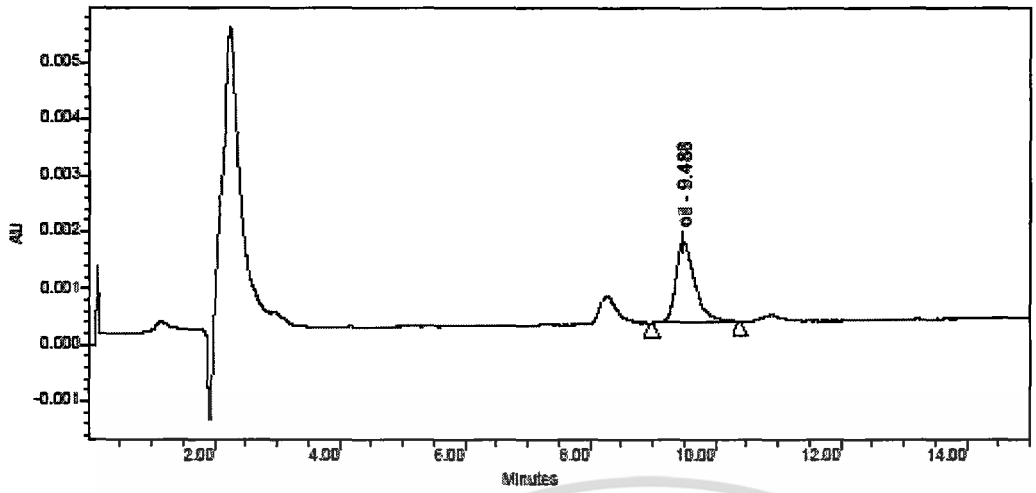
	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	std addvitE		0.000000	2030.000000	0.028108		No	No
2	std addvitE		1.000000	20613.000000	0.268183	-71.182	No	No
3	std addvitE		5.000000	366535.000000	5.075151	1.503	No	No
4	std addvitE		10.000000	702339.000000	9.724792	-2.752	No	No
5	std addvitE		20.000000	1412303.500000	19.555179	-2.224	No	No
6	std addvitE		40.000000	2910458.500000	40.299619	0.749	No	No

รูปที่ 4.6 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานstandard addition ช่วงความเข้มข้น0 – 39.20 ppm เมื่อนำผลที่ได้จากการทดสอบมาสร้างกราฟทำให้ทราบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ คือมีค่าเท่ากับ 0.9993

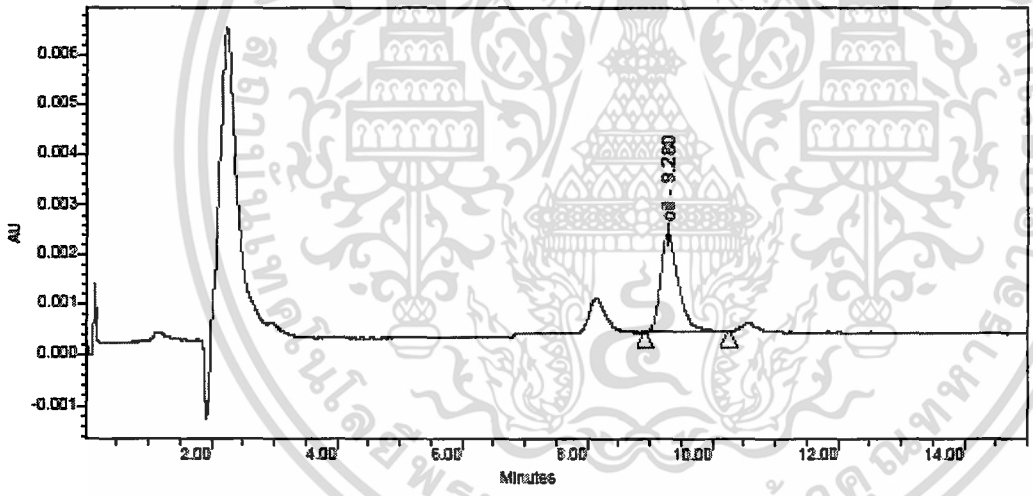
4.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างน้ำมันพืช

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดสอบข้างต้นมาทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 40, 80 และ 100 ppm ในสารละลายส่วนเคลื่อนที่ของสารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 295 นาโนเมตร ซึ่งผลจากการทดสอบได้ดังในรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำมันพืชปริมาตร 20 มิลลิลิตร ส่วนเคลื่อนที่คือ สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 295 นาโนเมตร



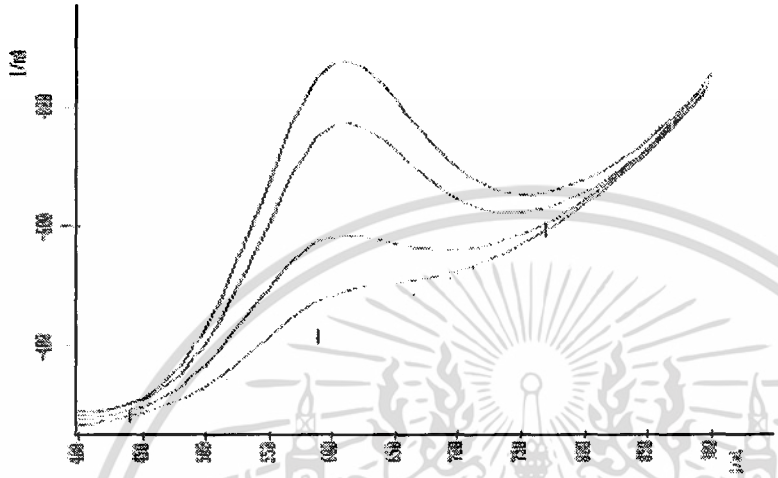
รูปที่ 4.8 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำมันพืชปริมาตร 25 มิลลิลิตร ส่วนเคลื่อนที่คือ สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลที่อัตราส่วน 50 : 50 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่นที่ 295 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

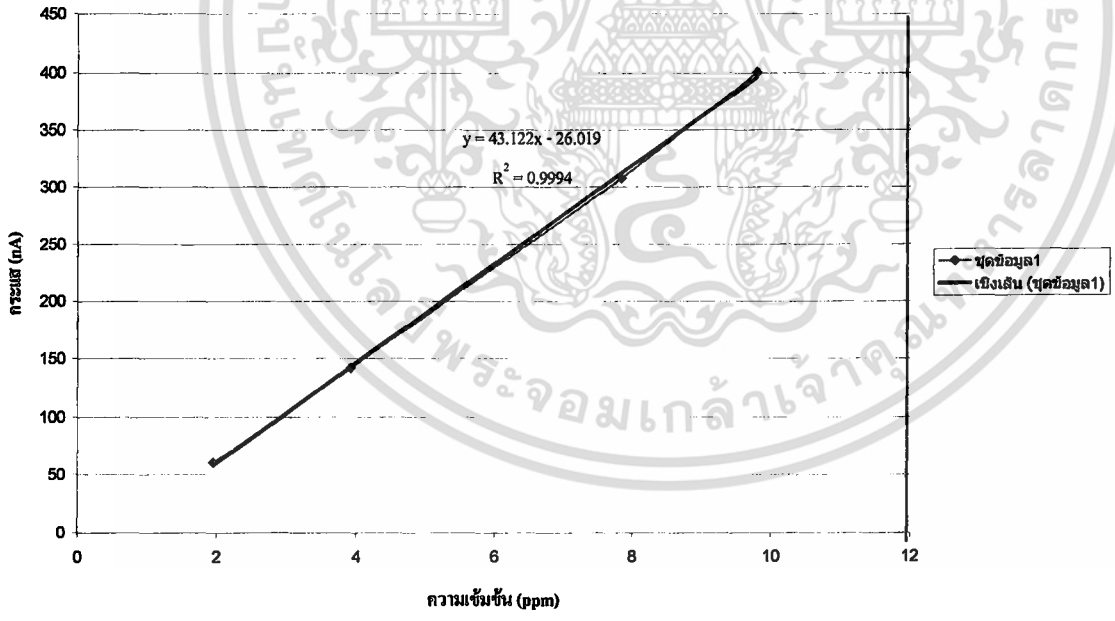
4.2 การวิเคราะห์วิตามินอีโดยเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรี

4.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี

สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี โดยทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 1.96 – 9.80 ppm



รูปที่ 4.9 แสดงโวลแทมโมแกรมของสารละลามาตรฐานวิตามินอีช่วงความเข้มข้น 1.96 – 9.8 ppm

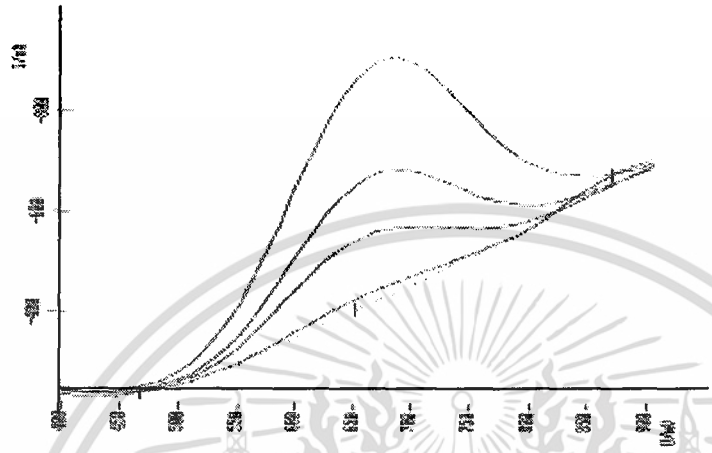


รูปที่ 4.10 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ช่วงความเข้มข้น1.96 – 9.80 ppm เมื่อนำผลที่ได้จากการทดสอบมาสร้างกราฟมาตรฐานจะทำให้ทราบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ คือมีค่าเท่ากับ 0.9994

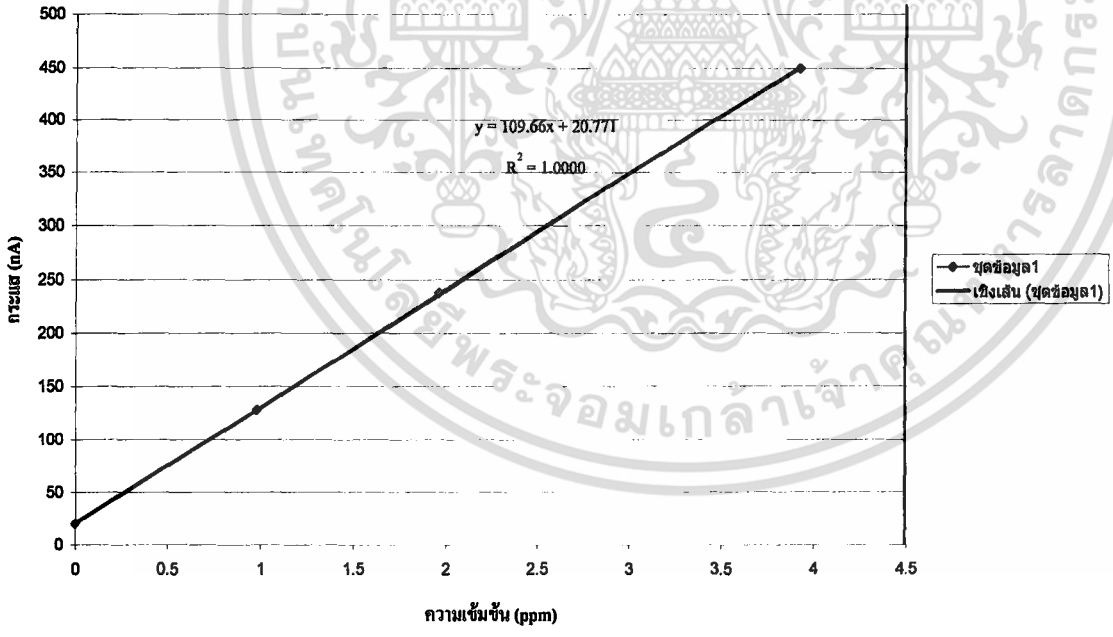
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน standard addition

สร้างกราฟมา[illegible]นของสารละลายมาตรฐาน standard addition โดยทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0 – 3.92 ppm



รูปที่ 4.11 แสดงโวลแทมโมแกรมของสารละลายมาตรฐาน standard addition ช่วงความเข้มข้น 0 – 3.92 ppm



รูปที่ 4.12 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน standard addition ช่วงความเข้มข้น 0 – 3.92 ppm เมื่อนำผลที่ได้จากการทดสอบมาสร้างกราฟมาตรฐานจะทำให้ทราบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ คือมีค่าเท่ากับ 1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 สรุปผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC

ตารางที่ 4.3.1 แสดงค่าที่ได้จากการคำนวณในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างน้ำมันพืช ที่ปริมาตร 20 และ 25 มิลลิลิตร

ปริมาตรตัวอย่างน้ำมันพืชใน 25 ml (ml)	พื้นที่พีก (AU)		ค่าเฉลี่ย	SD	RSD (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2			
20	30032	31032	30532	707.1068	2.3159
25	38437	36243	37340	1551.3923	4.1578

ตารางที่ 4.3.2 แสดงค่าที่ได้จากการคำนวณในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างน้ำมันพืช จากการทำ Standrad calibration

Standard linearity

Range 4.9-98.00 ppm

R^2 0.9948

Precision (n = 2)

Sensitivity

DL^a 8.4446 ppm

QL^b 16.8251 ppm

ปริมาณตัวอย่างน้ำมันใน 25 ml (ml)	พื้นที่ (AU)		ปริมาณเฉลี่ยของวิตามินอี (%w/w)	$\bar{X} \pm SD$	RSD (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2			
20	30032	31032	0.0103	0.0103 ± 0.00014	1.36
25	38437	36243	0.0104	0.0104 ± 0.00036	3.46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นมีปริมาณวิตามินอีเฉลี่ยเท่ากับ 0.010±0.002 % w/w

a – ค่าที่ได้จากการคำนวณของอัตราส่วน S/N

b – ค่าที่ได้จากการคำนวณ 10×DL

ตารางที่ 4.3.3 แสดงค่าที่ได้จากการคำนวณในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างน้ำมันพืช จากการทำ Standard addition

Standard linearity

Range 0-39.20 ppm

R^2 0.9994

Precision (n = 2)

Sensitivity

DL^a 1.1927 ppm

QL^b 3.9755 ppm

ปริมาณตัวอย่างน้ำมันใน 25 ml (ml)	พื้นที่ (AU)		ปริมาณเฉลี่ยของวิตามินอี (%w/w)	$\overline{X} \pm SD$	RSD (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2			
20	30032	31032	0.0114	0.0114 ±0.0011	9.65
25	38437	36243	0.0109	0.0109±0.0011	10.09

ดังนั้นมีปริมาณวิตามินอีเฉลี่ยเท่ากับ 0.011±0.002 % w/w

a – ค่าที่ได้จากการคำนวณของอัตราส่วน S/N

b – ค่าที่ได้จากการคำนวณ 10×DL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 สรุปผลการวิเคราะห์โดยเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรี

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าที่ได้จากการคำนวณในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างน้ำมันพืช

Standard calibration	Standard addition
Standard linearity Range : 1.96-9.80 R^2 : 0.9994 ppm ปริมาณวิตามินอี (% wt / wt) : 0.0412 RSD : 0 % DL[a] : 0.3094 ppm QL[b] : 1.0312 ppm	Standard linearity Range : เมื่อใช้น้ำมันพืช 10 mlใน 25 ml 1.96-9.80 ppm R^2 : เมื่อใช้น้ำมันพืช 10 ml ใน 25 ml 0.9984 ปริมาณวิตามินอี (% wt / wt) : 0.0346 RSD เมื่อใช้น้ำมันพืช 10 ml ใน 25 ml : 0 % DL[a] เมื่อใช้น้ำมันพืช 10 ml ใน 25 ml : 0.5195 ppm QL[b] เมื่อใช้น้ำมันพืช 10 ml ใน 25 ml : 1.7317 ppm

a – ค่าที่ได้จากการคำนวณของอัตราส่วน S/N

b – ค่าที่ได้จากการคำนวณ 10×DL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 สรุปผลการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบเทคนิค HPLC และเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรี

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการคำนวณหาปริมาณ α – tocopherol ในน้ำมันพืช โดยเทคนิค HPLC และดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรี

ปริมาณ α – tocopherol โดยเทคนิค HPLC		ปริมาณ α – tocopherol โดยเทคนิคโวลแทมเมทรี	
Standard calibration	Standard addition	Standard calibration	Standard addition
าณวิตามินอี (% wt / wt)	ปริมาณวิตามินอี (% wt /wt)	ปริมาณวิตามินอี (% wt / wt)	ปริมาณวิตามินอี (% wt / wt)
: 0.011±0.002	: 0.011±0.002	: 0.0412	: 0.0346
: 5.0475 ppm	DL[a] : 1.1927 ppm	DL[a] : 0.3094 ppm	DL[a] : 0.5195 ppm
:16.8251 ppm	QL[b] : 3.9755 ppm	QL[b] : 1.0312 ppm	QL[b] : 1.7317 ppm

a – ค่าที่ได้จากการคำนวณของอัตราส่วน S/N

b – ค่าที่ได้จากการคำนวณ 10×DL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารมาตรฐานวิตามินอีและตัวอย่างน้ำมันพืชโดยเทคนิค HPLC เมื่อใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล ที่อัตราส่วน 50 : 50 60 : 40 และ 40 : 60 ปริมาตร / ปริมาตรเป็นส่วนเคลื่อนที่ พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้วิเคราะห์คือ สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล ที่อัตราส่วน 50 : 50 เนื่องจากมีความแรงของตัวทำละลายสำหรับการแยกชะที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 9 – 10 นาที ขณะที่การใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอลในอัตราส่วนอื่น ๆ จะใช้เวลาในการวิเคราะห์อย่างน้อย 12 นาทีขึ้นไป

จากการเปรียบเทียบผลการแยกเมื่อใช้อัตราการไหลของส่วนที่เคลื่อนที่เป็น 0.8 , 1.0 และ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาทีนั้น พบว่าการใช้อัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ที่เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้วิตามินอีมีเวลาอยู่ในคอลัมน์นานเพียงพอที่จะทำให้การวิเคราะห์แยกเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ขณะที่การใช้อัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนเคลื่อนที่ใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานเกินไปทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในเวลาที่กำหนด และการใช้อัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่เป็น 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนเคลื่อนที่ใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์สั้นเกินไปทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในเวลาที่เหมาะสม

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์วิตามินอีโดยเทคนิค HPLC คือ ใช้ส่วเคลื่อนที่เป็น สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 : 50 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารมาตรฐานวิตามินอีและตัวอย่างน้ำมันพืชโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์คือที่ช่วงศักย์ไฟฟ้า - 650 U /mV โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 1 นาที การที่ใช้ศักย์ไฟฟ้าต่ำ ๆ ก็เพื่อให้วิตามินอีเกิดปฏิกิริยารีดักชันและสามารถวัดกระแสที่เกิดขึ้นได้ การใช้ศักย์ไฟฟ้าสูงจะทำให้ไม่สามารถตรวจวัดกระแสที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากอาจเกิดกระแสของ background หรืออาจเกิดการรบกวนจากสารอื่นที่ปนอยู่ในสารละลายได้ เช่น พวกสารอินทรีย์อาจเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้นได้

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์วิตามินอีจากทั้งเทคนิค HPLC และเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรี แล้วพบว่าเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรีจะใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่าเทคนิค HPLC มากและเมื่อนำผลที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0—100 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจากกราฟการเติมสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0—40 ppm โดยเทคนิค HPLC ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9948 และ 0.9994 ตามลำดับ มีปริมาณวิตามินอีในน้ำมันพืชจากการทำกราฟมาตรฐานได้ค่าเท่ากับ 0.010±0.002 % w/w และจากกราฟการเติมสารมาตรฐานเท่ากับ 0.011±0.002 % w/w และคำนวณขีดจำกัดการตรวจหาและปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ได้จากกราฟมาตรฐานได้ค่าเท่ากับ 8.446 ppm และ 16.8251 ppm ตามลำดับ และจากกราฟการเติมสารมาตรฐาน ได้ค่าเท่ากับ 1.1927 ppm และ 3.9755 ppm ตามลำดับ และจากเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์โวลแทมเมทรีเมื่อนำมาทำกราฟมาตรฐานและกราฟการเติมสารมาตรฐาน ที่ช่วงความเข้มข้น 2—10 ppm ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9994 และ 0.9984 ตามลำดับ มีปริมาณวิตามินอีในน้ำมันพืชจากกราฟมาตรฐานและกราฟการเติมสารมาตรฐาน ได้ค่าเท่ากับ 0.0412 % w/w และ 0.0346 % w/w ตามลำดับ คำนวณค่าขีดจำกัดการตรวจหาและปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานได้ค่าเท่ากับ 0.3094 ppm และ 1.0312 ppm ตามลำดับ และจากกราฟการเติมสารมาตรฐานได้ค่าเท่ากับ 0.5195 ppm และ 1.7317 ppm ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาวิธีเก็บรักษาวิตามินอีให้มีอายุยืนยาวขึ้น
2. ควรหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC และโพลาโรกราฟี
3. ควรทำการทดลองตรวจวัดปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างอื่น ๆ เช่น น้ำมันพืชชนิดอื่น เครื่องสำอางต่าง ๆ
4. ควรทำการศึกษาวิธีเก็บรักษาและบำรุงรักษาคอลัมน์ให้มีอายุการใช้งานยืนยาวขึ้น
5. ควรทำการศึกษาระบบการตรวจวัดให้มีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

สุรพจน์ วงศ์ใหญ่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต , HPLC ปัญหาและวิธีแก้ไข , หน้า 39 (2538)

ศุภชัย ใชเทียมวงศ์ , เคมีวิเคราะห์ , พิมพ์ครั้งที่ 5 , 2543.

เสาวนีย์ จักรพิทักษ์ , หลักโภชนาการปัจจุบัน., พิมพ์ครั้งที่ 4 , ไทยวัฒนาพานิช., กรุงเทพฯ, 2532.

Applegate, L.A., et al. "Influence of an antioxidant nutrient fortified food product and strenous exercise on antioxidant enzyme system" Medicine and Science in Sports and Exercise, 28(5) S30, 1996.

A. Weston and P. R. Brown., HPLC and CE: Principles and Practice, Academic Press., 1997.

D. A. Skoog and J. J. Leary., Principles of Instrumental Analysis., Saunders College Publishing., later edition.

D. A. Skoog., D. M. West and F. J. Holler, Analytical Chemistry: An Introduction, 6th Edition., 1994.

D. M. Ruthven (editor)., Encyclopedia of Separation Technology., New York, 1997.

Dolan JW., Column packing-what's at the bottom of it LC-GC International 1998, 11(5): 292-297.

DOMPERT ., W : BERINGER., H : MICHAEL., G. Z PFLANZENERNAEHR BOOENKO 1975 : 141 Chemical Abstracts Vol. 83., 1975

HENDLER.,S.S., The Docter's Vitamin and Mineral Enclycopedia 106. 1990.

E. M. Thurman and M. S. Mills., Solid-Phase Extraction: Principles and Practice., John-Wiley & Sons, Inc., 1998.

F. Rouessac and A. Rouessac., Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques., John Wiley & Sons., Ltd, 2000.

F. W. Fifield and D. Kealey., Principles and Practice of Analytical Chemistry., Blackie Academic & Professional., 4 th edition, 1995.

Hauglum K., Vendataramani A., Pilot study of the effects of d-alpha-tocopherol an hepatic stellate all activation in chronic hepatitis C. Gastromterology 1997, Oct , 133(4) : 1063- 73.

H. M. McNair and J. M. Miller., Basic Gas Chromatography., John Wiley & Sons, Inc., 1998.

Institute of Medicine., Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids., A report of the Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds., Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes Food Nutrition Board. Washington, DC: National Academies Pr; 2000.

J. A. Dean., Analytical Chemistry Handbook, London., 1995.

J. A. Dean., Chemical Separation Methods, D. Van Nostrand Company., 1969.

J. E. Willett., Gas Chromatography (ACOL series)., John Wiley & Sons., Inc., 1991 or later edition.

J. Mendham., D. Dodd and D. Cooper., Classical Methods: volume 2 (ACOL series), London, 1987.

J. S. Fritz., Analytical Solid-Phase Extraction., Wiley-VCH, Inc., 1999.

K. Robards., P. R. Haddad., and P. E. Jackson., Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods., Academic Press, 1994.

Morris CD., Carson S.. Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular disease: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med., 2003;139:56-70. [PMID: 12834320].[Abstract/Free Full Text].

N. J. K. Simpson., **Solid-Phase Extraction**: Principles, Techniques, and Applications., Marcel Dekker., Inc., 2000.

P. A. Sewell and B. Clarke., Chromatographic Separations (ACOL series)., John Wiley & Sons, Inc., 1991.

R. Anderson., Sample Pretreatment and Separation (ACOL series), London,1987.

S. Lindsay., High Performance Liquid Chromatography (ACOL series)., John Wiley & Sons, Inc., 1991 or later edition.

Tribble DL., AHA Science Advisory., Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Circulation., 1999;99:591-5.

Vivekananthan DP., Penn MS., Sapp SK., Hsu A., Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. Lancet., 2003;361:2017-23. [PMID: 12814711].[Medline].

http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=1466

http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=1872%20

http://www.annals.org/cgi/content/full/0000605-200501040-00110v1

http://brunswicklabs.com/

http://www.diabetes.org/uedocuments/ADACardioReview4.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.fao.org/WAICENT/OIS/PRESS_NE/PRESSENG/2000/pren0017.htm

http://www.ipst.ac.th/ThaiVersion/publications/in_sci/vitaminB.html

http://www.nature.com/dynasearch/app/dynasearch.taf

http://www.tatnews.org/emagazine/1941.asp

http://www2.sat.psu.ac.th/centrallab/instru%20HPLC.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] Anna Gliszczynska – Swiglo , Ewa Sikorska., " Simple reverse – phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils ". **Journal of Chromatography A**, 1048 (2004) 195 – 198.

[2] T. Galeano Diaz , I. Duran Meras , A. Guiberteau Cabanillas , M.F. Alexandre Franco., Voltammetric behavior of tocopherols with partial least squares calibration : analysis in vegetable oil samples ". **Analytica Chimica Acta** 511 (2004) 231 – 238.

[3] M. Masin Sanagi, H.H See, Wan Aini Wan Ibrahim, Ahmedy Abu Naim ., " Determination of carotene, tocopherols and tocotrienols in residue oil from palm pressed fiber using pressurized liquid extraction – normal phase liquid chromatography ". **Analytica Chimica Acta** 538 (2005) 71 – 76.

[4] Dagmar Pollok, Hans-Ulrich Melchert , " Determination of α - tocopherolquinone in human serum samples by liquid chromatography with fluorescence detection and on – line post – column derivartization ". **Journal of Chromatography A**, 1056 (2004) 257 – 262 .

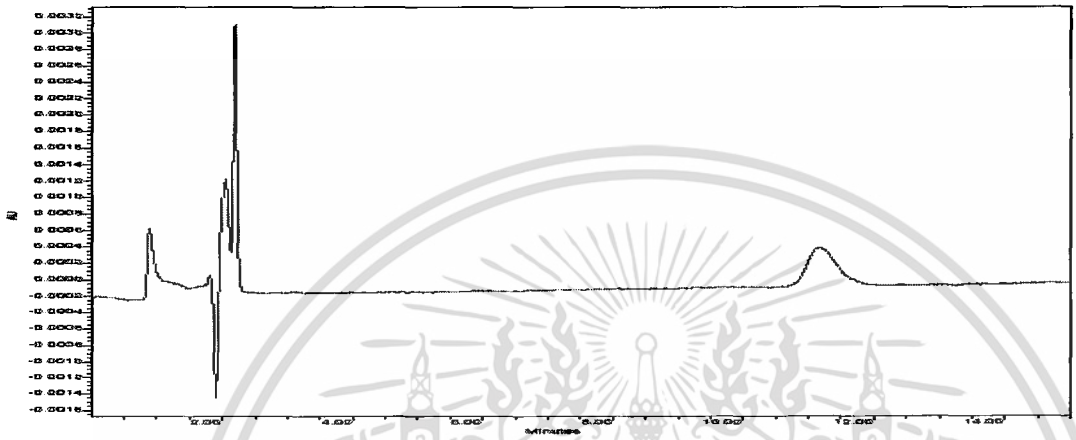
[5] Salvatore Fanail, Emanuele Camera, Bezhan Chankevtadze, Giovanni D'Orazio, Maria Giovanna Quaglia , " Separation of tocopherols by nano – liquid chromatography ". **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 35 (2004) 331 – 337 .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

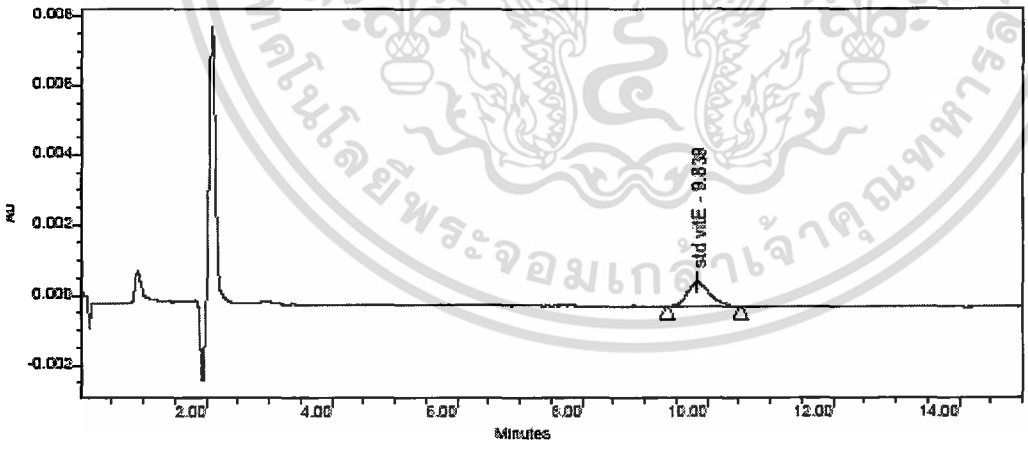
ภาคผนวก ก.

ตัวอย่างโครมาโทแกรมและโวลแทมโมแกรม

โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานวิตามินอีและตัวอย่างน้ำมันพืช แสดงได้ดังนี้

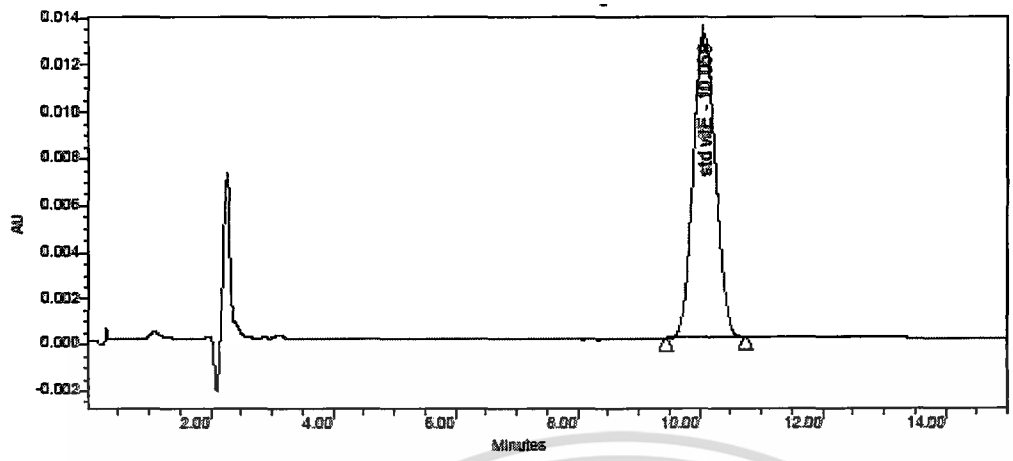


รูปที่ ก.1 โครมาโทแกรมของสารละลายวิตามินอีมาตรฐาน 0.5 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

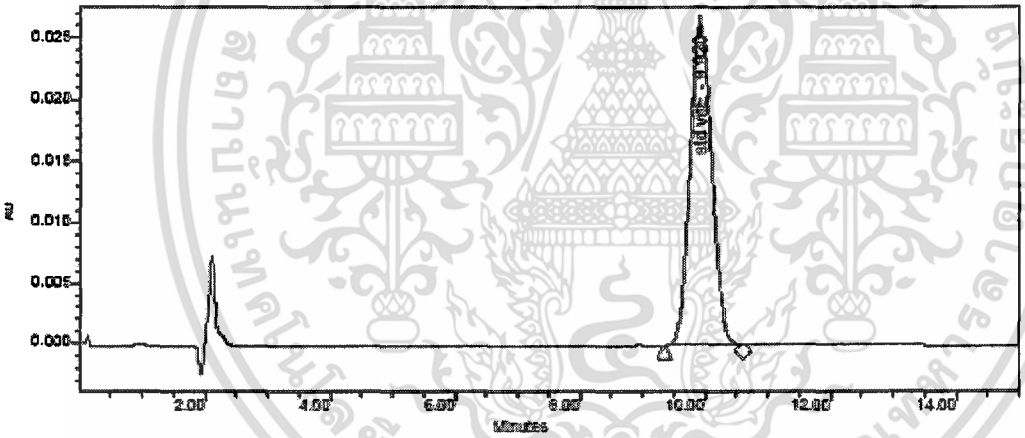


รูปที่ ก.2 โครมาโทแกรมของสารละลายวิตามินอีมาตรฐาน 1 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

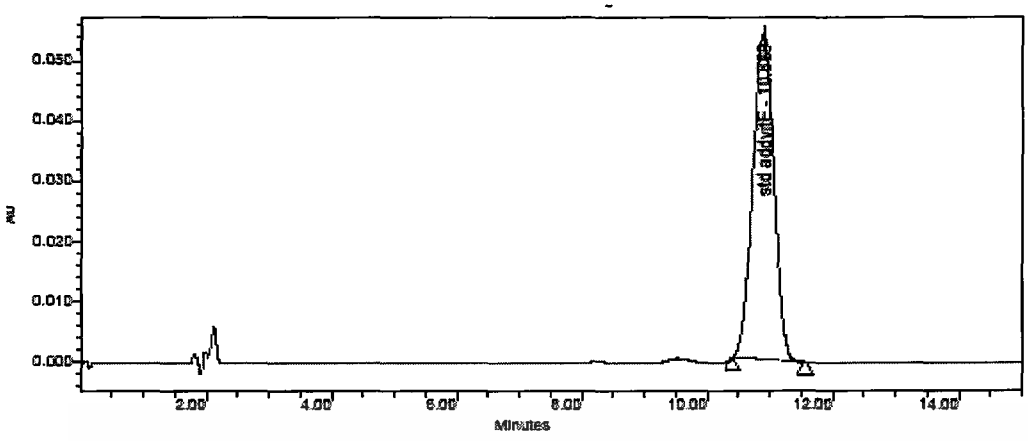


รูปที่ ก.3 โครมาโทแกรมของสารละลายวิตามินอีมาตรฐาน 5 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

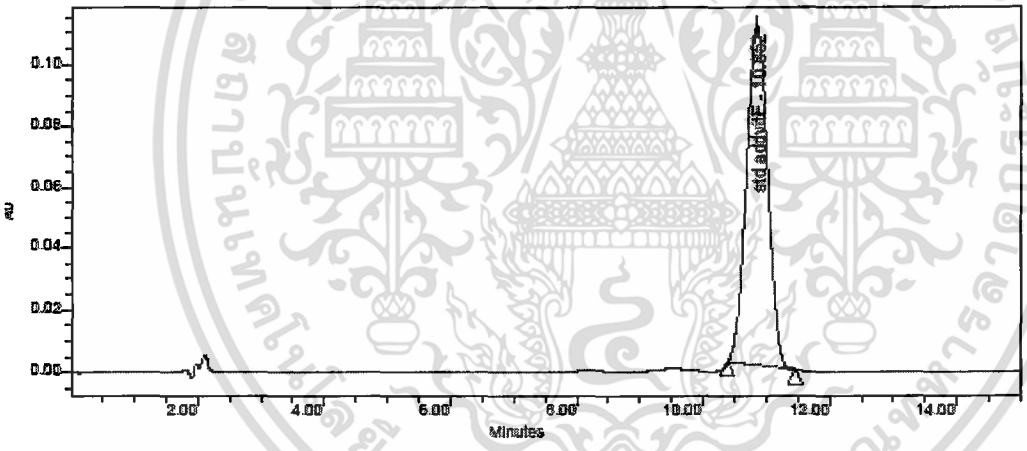


รูปที่ ก.4 โครมาโทแกรมของสารละลายวิตามินอีมาตรฐาน 10 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

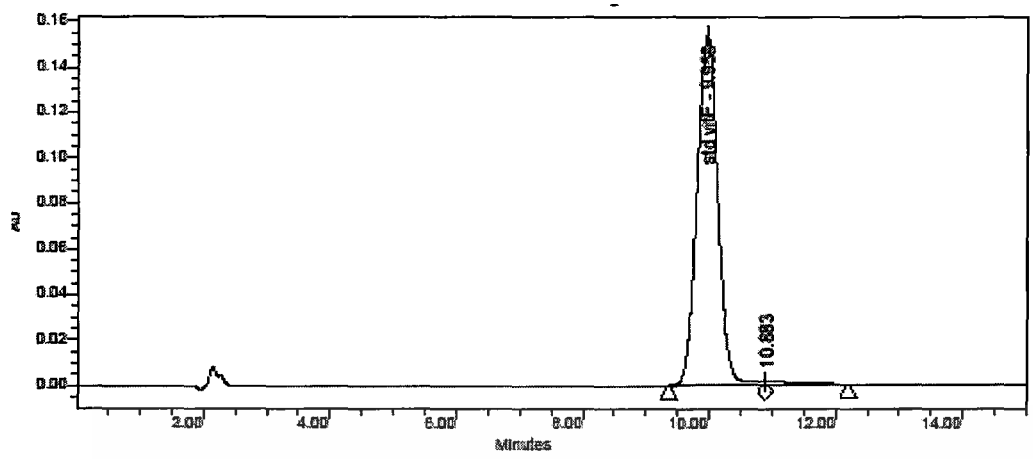


รูปที่ ก.5 โครมาโทแกรมของสารละลายวิตามินอีมาตรฐาน 20 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

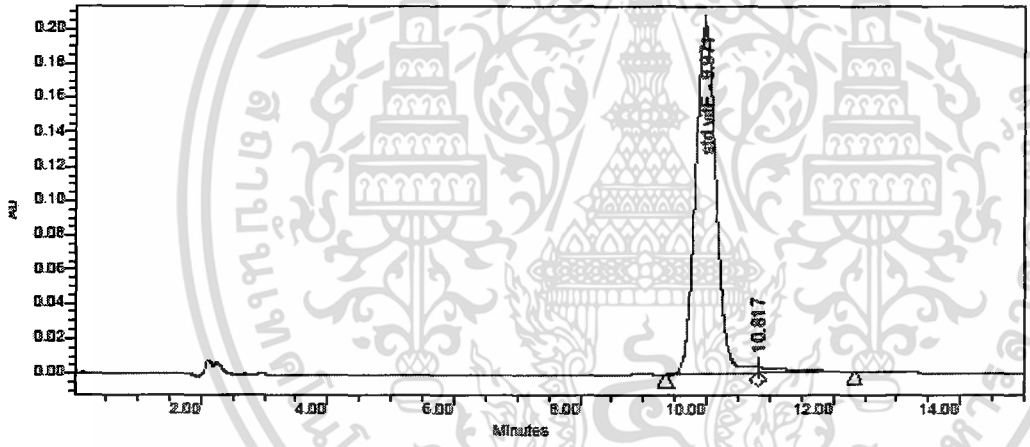


รูปที่ ก.6 โครมาโทแกรมของสารละลายวิตามินอีมาตรฐาน 40 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

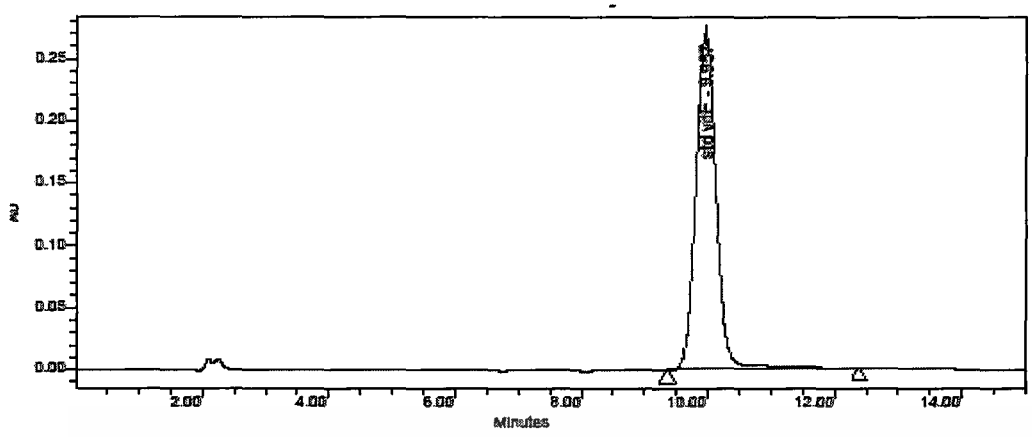


รูปที่ ก.7 โครมาโทแกรมของสารละลายวิตามินอีมาตรฐาน 60 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

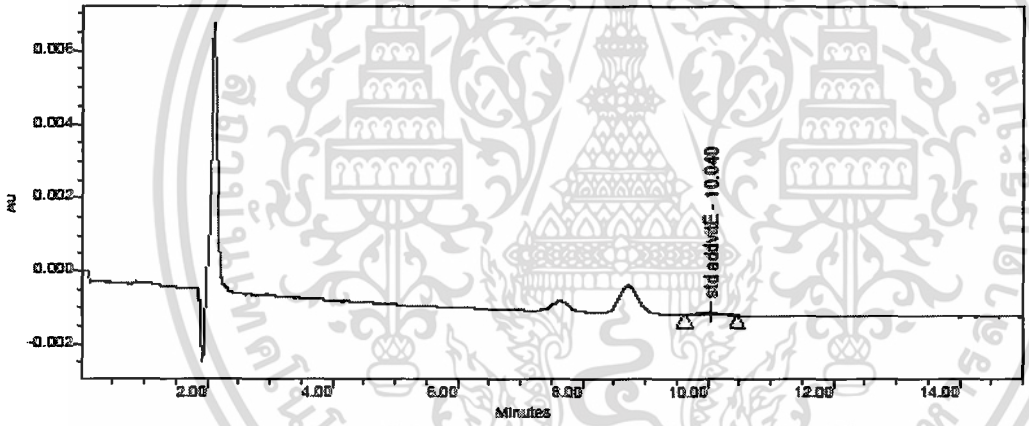


รูปที่ ก.8 โครมาโทแกรมของสารละลายวิตามินอีมาตรฐาน 80 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

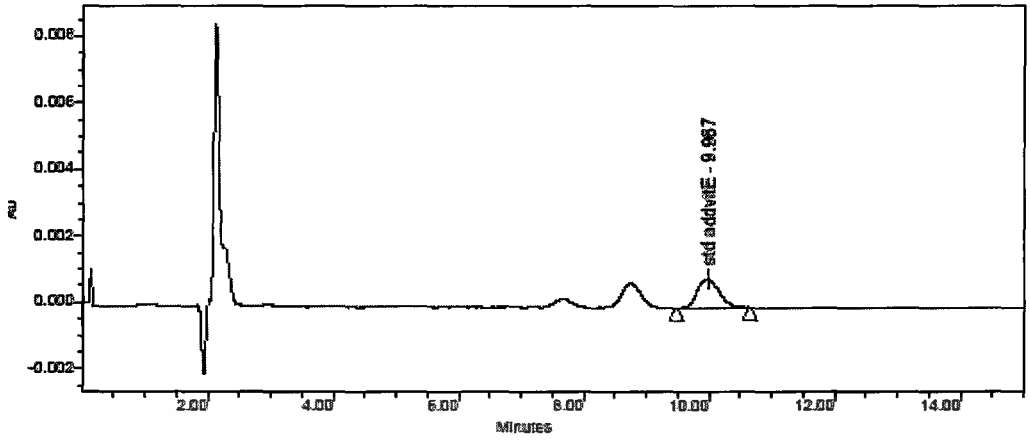


รูปที่ ก.9 โครมาโทแกรมของสารละลายวิตามินอีมาตรฐาน 100 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

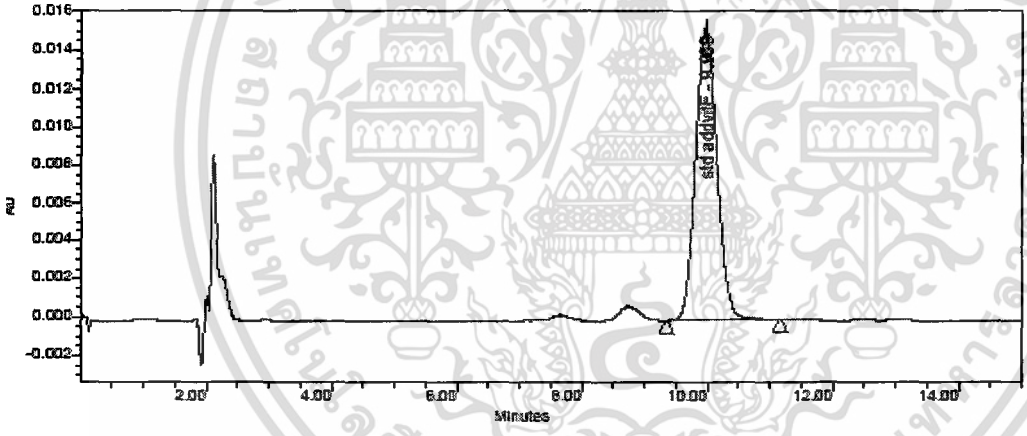


รูปที่ ก.10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน standard addition 0 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

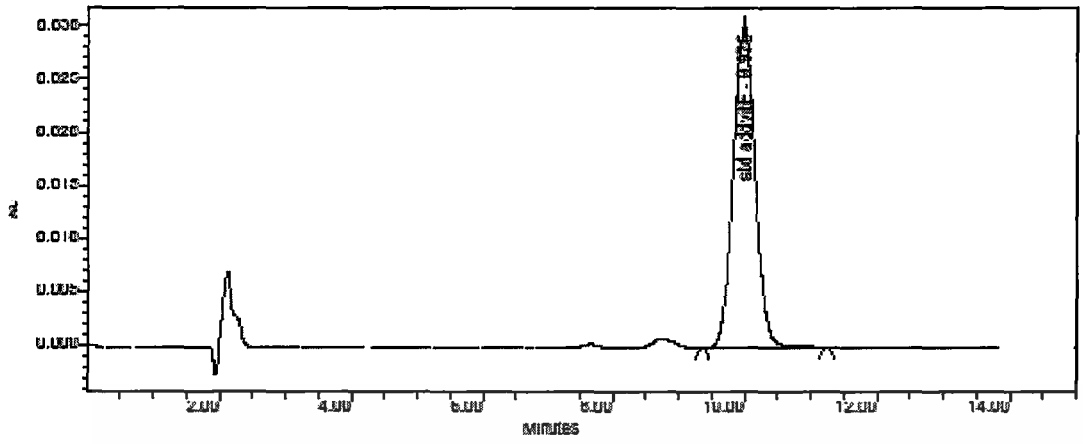


รูปที่ ก.11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน standard addition 1 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

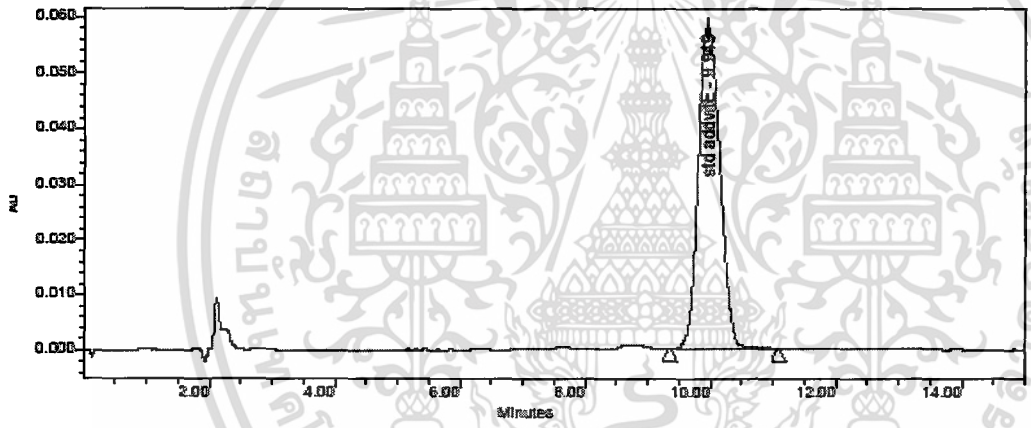


รูปที่ ก.12 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน standard addition 5 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

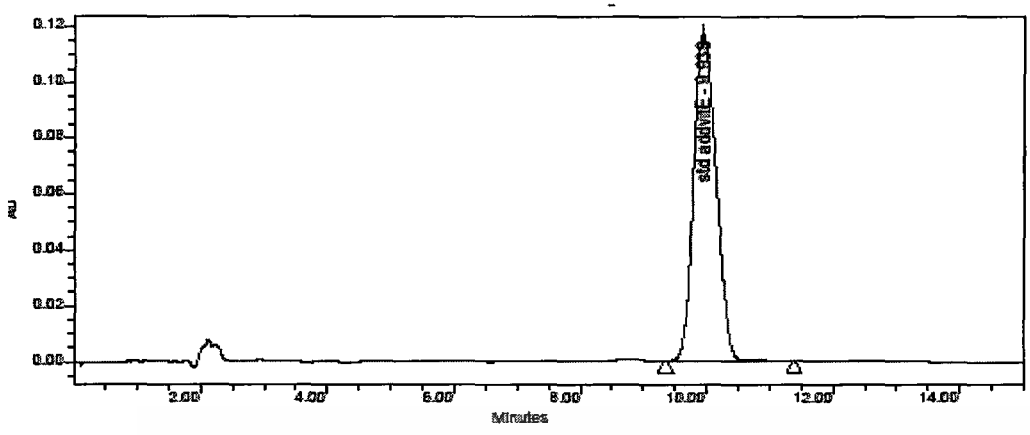


รูปที่ ก.13 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน standard addition 10 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร



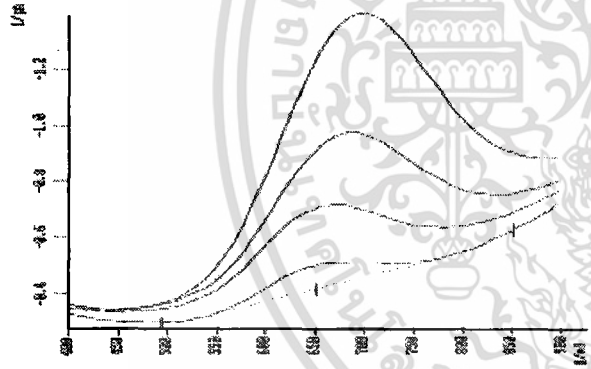
รูปที่ ก.14 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน standard addition 20 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน standard addition 40 ppm จากการใช้สารละลายอะซีโทไนไทรล์ : เมทานอล อัตราส่วน 50 :50 เป็นส่วนเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

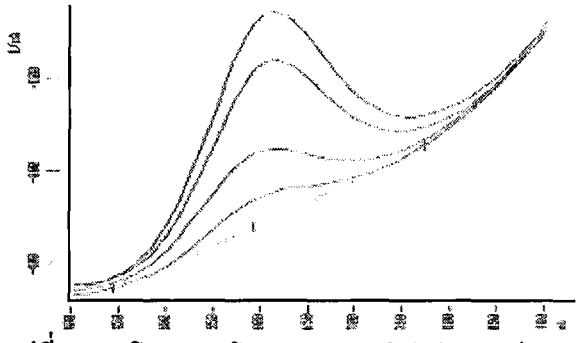
โวลแทมโมแกรมแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ของสารมาตรฐานวิตามินอีและตัวอย่างน้ำมันพืช แสดงได้ดังนี้



ความเข้มข้น (ppm)	กระแส (nA)
1	85.430
2	214.521
4	409.465
8	752.567

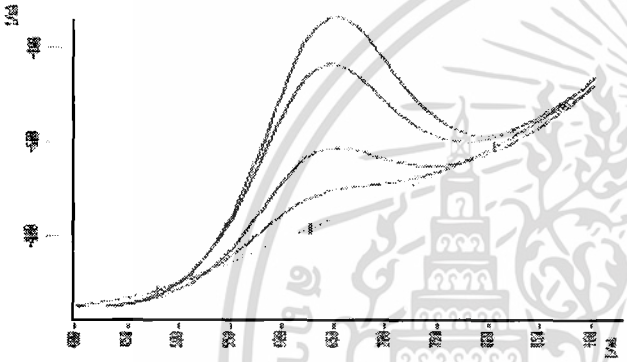
รูปที่ ก.16 โวลแทมโมแกรมแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีที่ความเข้มข้น 1, 2, 4 และ 8 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



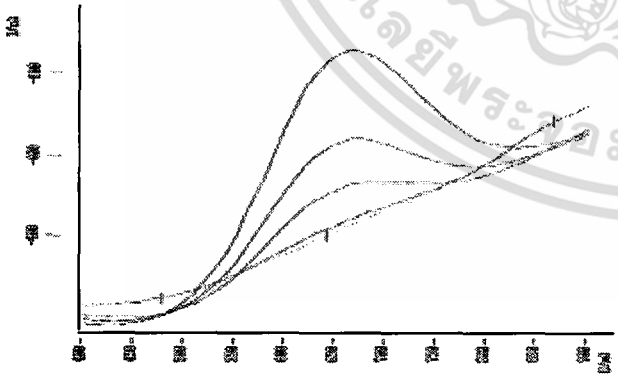
ความเข้มข้น (ppm)	กระแส (nA)
2	60.474
4	141.907
8	307.503
10	400.274

รูปที่ ก.17 โวลแทมโมแกรมแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีที่ความเข้มข้น 2, 4, 8 และ 10 ppm



ความเข้มข้น (ppm)	กระแส (nA)
2	63.438
4	161.300
8	321.870
10	419.002

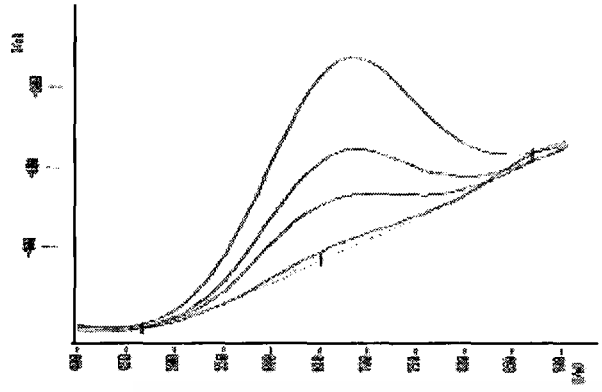
รูปที่ ก.18 โวลแทมโมแกรมแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ของสารละลายมาตรฐาน standard addition โดยมีตัวอย่างน้ำมันพืช 10 มิลลิลิตรที่ 2 , 4, 8 และ 10 ppm



ความเข้มข้น (ppm)	กระแส (nA)
0	16.908
1	129.483
2	238.758
4	451.151

รูปที่ ก.19 โวลแทมโมแกรมแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ของสารละลายมาตรฐาน standard addition โดยมีตัวอย่างน้ำมันพืช 20 มิลลิลิตรที่ 0, 1, 2 และ 4 ppm ครั้งที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ความเข้มข้น (ppm)	กระแส (nA)
0	22.814
1	127.209
2	235.965
4	448.414

รูปที่ ก.20 โวลแทมโมแกรมแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ของสารละลายมาตรฐาน standard addition โดยมีตัวอย่างน้ำมันพืช 20 มิลลิลิตรที่ 0, 1, 2 และ 4 ppm ครั้งที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การคำนวณขีดจำกัดการตรวจหา

การทดสอบและการคำนวณเพื่อหาขีดจำกัดการตรวจหา ทำการทดสอบและคำนวณตามวิธีของ International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)

สูตรการคำนวณและวิธีทดสอบ

1. เตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่แน่นอนต่าง ๆ กัน แล้วนำไปทำการทดลอง นำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นกับกระแสที่วัดได้ ในกรณีทดลองโดยเทคนิคโพลาโรกราฟี และสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ที่วัดได้ ในกรณีทดลองโดยเทคนิค HPLC จะได้กราฟเป็นเส้นตรง สามารถหาความชันของกราฟได้จากสมการ

$$Y = bX + a$$

เมื่อ b คือ ความชันของกราฟ

a คือ จุดตัดแกน y

2. เมื่อหาความชันของกราฟได้แล้ว นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าสัญญาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้และขีดจำกัดการตรวจหาจากสูตร

สัญญาณต่ำสุดที่วัดได้ $Y = Y_B + 3S_B$

เมื่อ 3 คือ ค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 99.86% เมื่อ $Y \geq Y_B + 3S_B$

ขีดจำกัดการตรวจหา $LOD = Y - Y_B / b$

หรือ $LOD = 3S_B / b = 3S_{y/x} / b$

เมื่อ Y คือ สัญญาณต่ำสุดที่วัดได้

Y_B คือ ค่าเฉลี่ยของสัญญาณจาก Blank

S_B คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Blank

LOD คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้

b คือ ความชันของกราฟ (สภาพไว)

3. เมื่อคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจหาได้แล้ว นำค่าที่ได้มาหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ โดยที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (Limit of quantitation , LOQ) จากสูตร

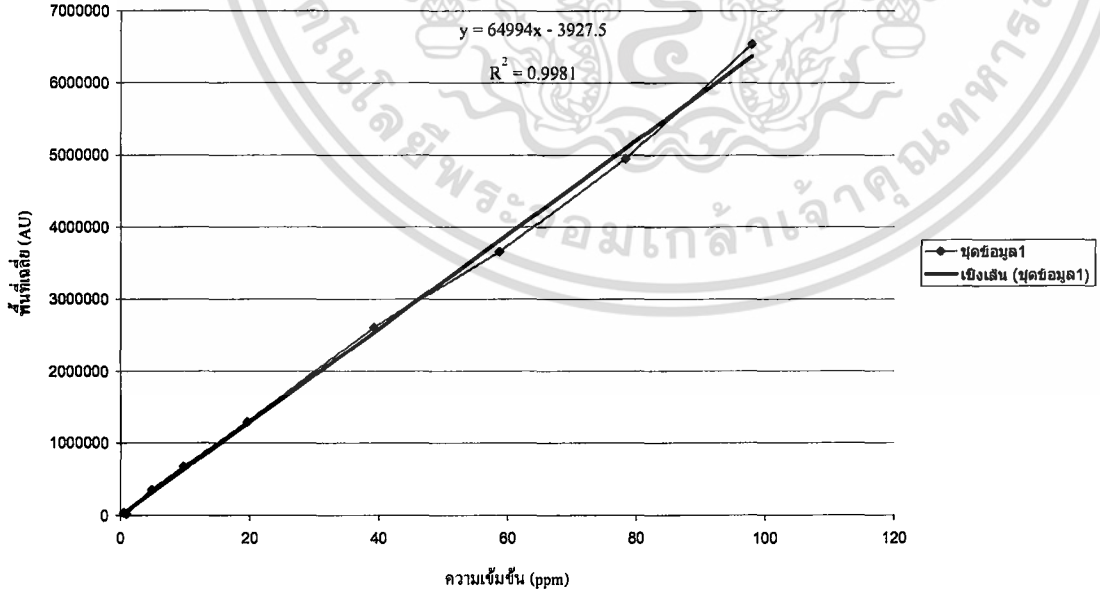
$$LOQ = 10 S_{y/x} / b$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณขีดจำกัดการตรวจหาสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และโพลาโรกราฟี เมื่อทำการวัดสารมาตรฐานวิตามินอีและตัวอย่างน้ำมันพืชที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สรุปเป็นตารางได้ดังนี้

ตารางที่ ข.1 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ด้วยเทคนิค HPLC

ความเข้มข้น (ppm)	ความเข้มข้นที่แท้จริง (x 0.98) (ppm)	พื้นที่ของพีก (AU)		ค่าเฉลี่ย $(\overline{X})$	SD	RSD (%)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2			
0.5	0.49	36302.0000	37341.0000	36821.5000	734.6839	1.9953
1	0.98	16788.0000	20383.0000	18585.5000	2542.0489	13.6776
5	4.90	331538.0000	362417.0000	346977.5000	21834.7503	6.2928
10	9.80	645506.0313	695171.5000	670338.5155	35118.4362	5.2389
20	19.60	1262134.9182	1322488.0000	1292311.4590	42676.0734	3.3023
40	39.20	2495207.6682	2727846.5000	2611527.0840	164500.4957	6.2990
60	58.80	3603224.1794	3721068.8122	3662146.4960	83328.7391	2.2754
80	78.40	4642881.5112	5252778.5000	4947830.0060	319832.6789	6.4641
100	98	6234757.5000	6839907.0000	6537332.2500	427905.3151	6.5456



รูปที่ ข.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีกับพื้นที่เฉลี่ยโดยเทคนิค HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีกับพื้นที่เฉลี่ยโดยเทคนิค HPLC

Xi	Xi^2	Yi	$\hat{Y}i$	$\lvert Yi - \hat{Y}i \rvert$	$(Yi - \hat{Y}i)^2$
0.49	0.2401	36821.5000	27919.5600	8901.9400	79244535.7600
0.98	0.9604	18585.5000	59766.6200	41181.1200	1695884644
4.90	24.01	346977.5000	314543.1000	32434.4000	1051990303
9.80	96.04	670338.5155	633013.7000	37324.8155	1393141852
19.60	384.16	1292311.4590	1269954.9000	22356.5590	499815730.3000
39.20	1536.64	2611527.0840	2543837.3000	67689.7840	4581906858
58.80	3457.44	3662146.4960	3817719.7000	155573.2040	$2.42030218 \times 10^{10}$
78.40	6146.56	4947830.0060	5091602.1000	143772.0940	$2.067041501 \times 10^{10}$
98	9604	6537332.2500	6365484.5000	171847.7500	$2.953164918 \times 10^{10}$
$\sum Xi^2 = 21250.05$				$\sum(Yi - \hat{Y}i)^2 = 8.370706991 \times 10^{10}$	

เมื่อ Xi คือ ความเข้มข้นที่แท้จริง

$\hat{Y}i = 64994Xi - 3927.5$

ขีดจำกัดการตรวจหา : $LOD = 3S_{y/x} / b$

$$S_{y/x} = \left[\sum (Yi - \hat{Y}i)^2 / n - 2 \right]^{1/2}$$

$$= \sqrt{8.370706991 \times 10^{10} / 7}$$

$$= 109353.3394$$

เพราะฉะนั้น $LOD = 3 \times 109353.3394 / 64994$

$LOD \cong 5.0475$

ปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ : $LOQ = 10S_{y/x} / b$

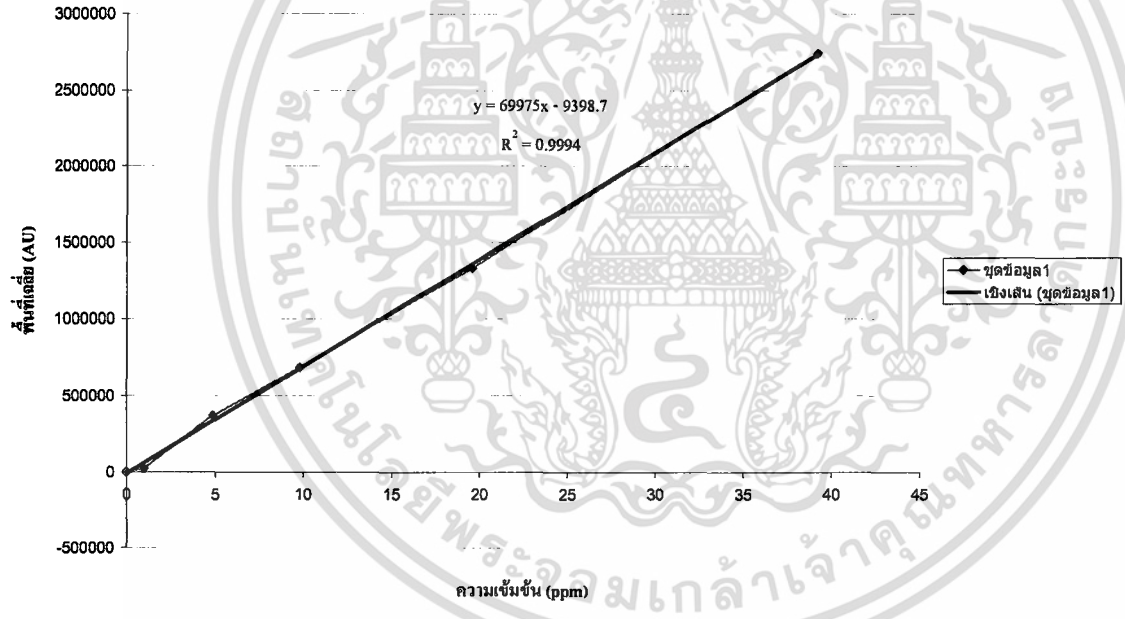
$LOQ = 10 \times 109353.3394 / 64994$

$= 16.8251$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน standard addition ด้วยเทคนิค HPLC

ความเข้มข้น ppm)	ความเข้มข้นที่แท้จริง (x 0.98) (ppm)	พื้นที่ของพีก (AU) ครั้งที่ 1	พื้นที่ของพีก (AU) ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\overline{(X)}$	SD	RSD (%)
0	0	2187.5	2030	2108.7500	111.3693	5.2813
1	0.98	27448	20813	24130.5000	4691.6535	19.4428
5	4.90	366535	366535	366535	0	0
10	9.80	664828.5000	702339	683583.7500	26523.9289	3.8801
20	19.60	1265180	1412303.5000	1338741.7500	104032.0245	7.7709
40	39.20	2569975.7500	2910498.5000	2740237	240786.1224	8.7871



รูปที่ ข.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย standard addition กับพื้นที่เฉลี่ยโดยเทคนิค HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน standard addition กับพื้นที่เฉลี่ยโดยเทคนิค HPLC

Xi	Xi^2	Yi	$\hat{Y}i$	$\lvert Yi - \hat{Y}i \rvert$	$(Yi - \hat{Y}i)^2$
0	0	2108.75	-9398.7	11507.45	132421405.50
0.98	0.9604	24130.5	59176.8	35046.3	1228243144
4.90	24.01	366535	333478.8	33056.2	1092712358
9.80	96.04	683583.75	676356.3	7227.45	52236033.5
19.60	384.16	1338741.75	1362111.3	23369.55	546135867.20
39.20	1536.64	2740237	2733621.3	6615.7	43767486.49
$\sum Xi^2 = 2041.8104$				$\sum(Yi - \hat{Y}i)^2 = 3095516295$	

เมื่อ Xi คือ ความเข้มข้นที่แท้จริง

$\hat{Y}i = 69975Xi - 9398.7$

ขีดจำกัดการตรวจหา : $LOD = 3S_{y/x} / b$

$$S_{y/x} = \left[\sum (Yi - \hat{Y}i)^2 / n - 2 \right]^{1/2}$$

$$= \sqrt{3095516295 / 4}$$

$$= 27818.6821$$

เพราะฉะนั้น $LOD = 3 \times 27818.6821 / 69975$

$LOD \cong 1.1927$

ปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ : $LOQ = 10S_{y/x} / b$

$LOQ = 10 \times 27818.6821 / 69975$

$= 3.9755$

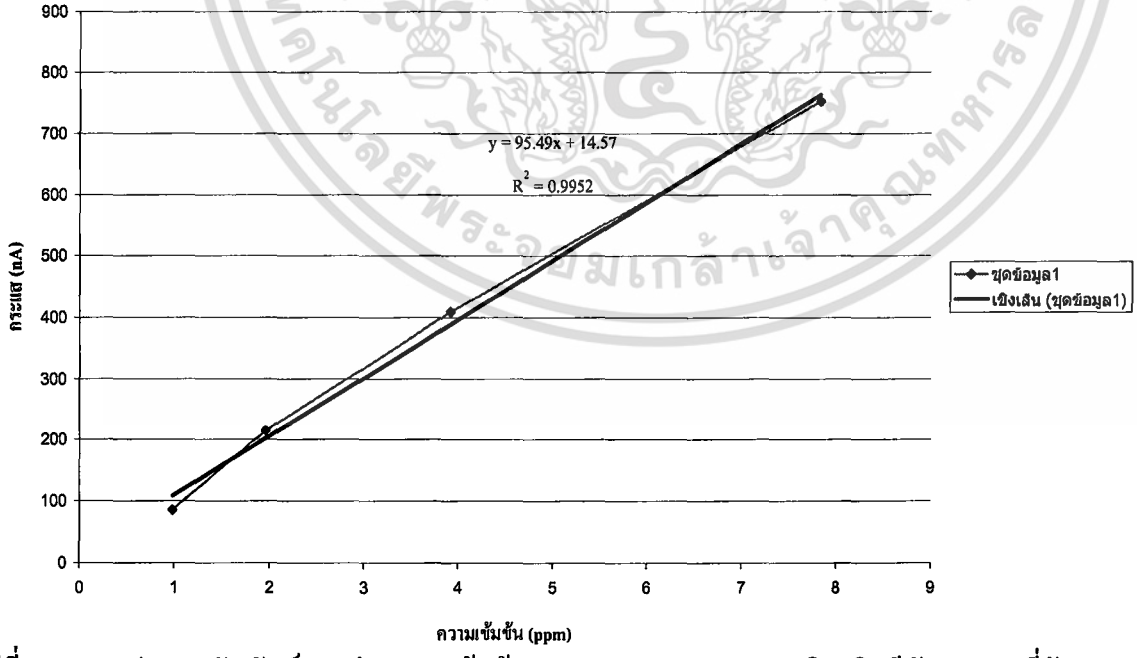
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.5 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างน้ำมันพืชด้วยเทคนิค HPLC

ปริมาณตัวอย่างน้ำมันพืช (มิลลิลิตร)	พื้นที่พีก (AU)		ค่าเฉลี่ย $(\overline{X})$	SD	RSD (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2			
10	2187.5	2030	2108.75	111.369318	5.2813
20	30032	31032	30532	707.1068	2.3159
25	38437	36243	36243	1551.3923	4.1578

ตาราง ข.6 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ด้วยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 1

ความเข้มข้น (ppm)	ความเข้มข้นที่แท้จริง (ppm)	กระแสที่วัดได้ (nA)
1	0.98	85.430
2	1.96	214.521
4	3.92	409.465
8	7.84	752.567



รูปที่ ข.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีกับกระแสที่วัดได้โดยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.7 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีกับกระแสที่วัดได้โดยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 1

Xi	Xi^2	Yi	$\hat{Y}i$	$\lvert Yi - \hat{Y}i \rvert$	$(Yi - \hat{Y}i)^2$
0.98	0.9604	85.430	108.1502	22.7202	516.20749
1.96	3.8416	214.521	201.7304	12.7906	163.5994
3.92	15.3664	409.465	388.8908	20.5742	423.2977
7.84	61.4656	752.567	763.2116	10.6446	113.3075
	$\sum Xi^2 = 81.634$				$\sum(Yi - \hat{Y}i)^2 = 1216.4122$

เมื่อ Xi คือ ความเข้มข้นที่แท้จริง

$\hat{Y}i = 95.49Xi + 14.57$

ขีดจำกัดการตรวจหา : $LOD = 3S_{y/x} / b$

$$S_{y/x} = \left[\sum (Yi - \hat{Y}i)^2 / n-2 \right]^{1/2}$$

$$= \sqrt{1216.4122 / 2}$$

$$= 24.6618$$

เพราะฉะนั้น $LOD = 3 \times 24.6618 / 95.49$

$LOD \cong 0.7748$

ปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ : $LOQ = 10S_{y/x} / b$

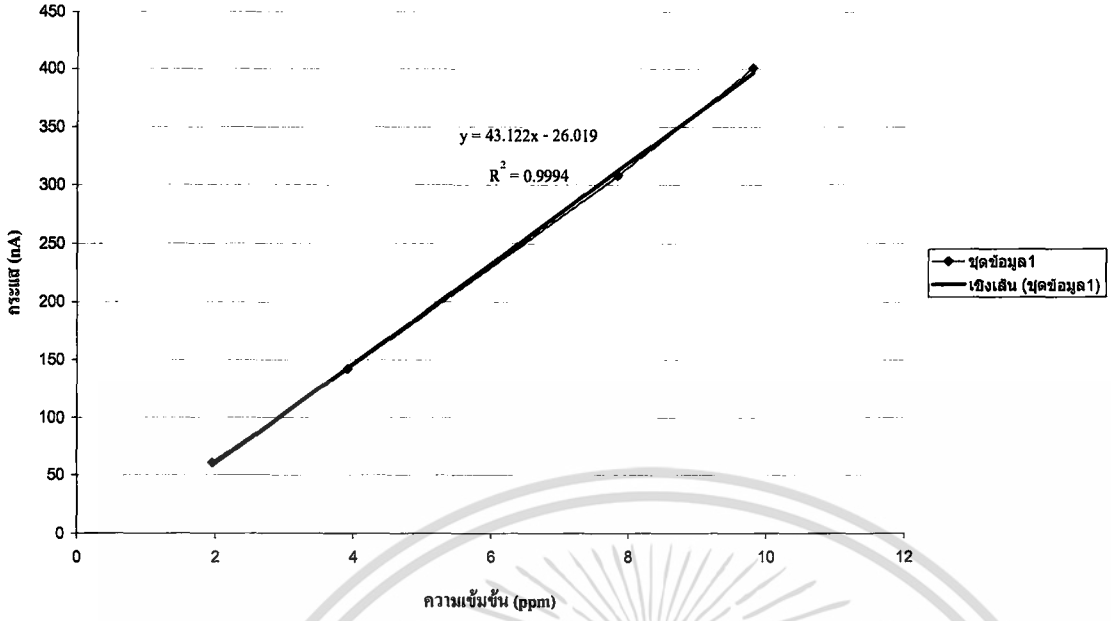
$LOQ = 10 \times 24.6618 / 95.49$

$= 2.5827$

ตาราง ข.8 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ด้วยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 2

ความเข้มข้น (ppm)	ความเข้มข้นที่แท้จริง (ppm)	กระแสที่วัดได้ (nA)
2	1.96	60.474
4	3.92	141.907
8	7.84	307.503
10	9.8	400.274

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีกับกระแสที่วัดได้โดยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 2

ตาราง ข.9 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีกับกระแสที่วัดได้โดยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 2

Xi	Xi^2	Yi	$\hat{Y}i$	$\lvert Yi - \hat{Y}i \rvert$	$(Yi - \hat{Y}i)^2$
1.96	3.8416	60.474	58.5001	1.9739	3.89628121
3.92	15.3664	141.907	143.0192	1.1122	1.23698884
7.84	61.4656	307.503	312.0575	4.5545	20.74347025
9.8	96.0400	400.274	396.5766	3.6974	13.67076676
	$\sum Xi^2 = 176.7136$				$\sum(Yi - \hat{Y}i)^2 = 39.5475$

เมื่อ Xi คือ ความเข้มข้นที่แท้จริง

$\hat{Y}i = 43.122Xi - 26.019$

ขีดจำกัดการตรวจหา : $LOD = 3S_{y/x} / b$

$$S_{y/x} = \left[\sum(Yi - \hat{Y}i)^2 / n - 2 \right]^{1/2}$$

$$= \sqrt{39.5475 / 2}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$= 4.4468$

เพราะฉะนั้น $LOD = 3 \times 4.4468 / 43.122$

$LOD \cong 0.3094$

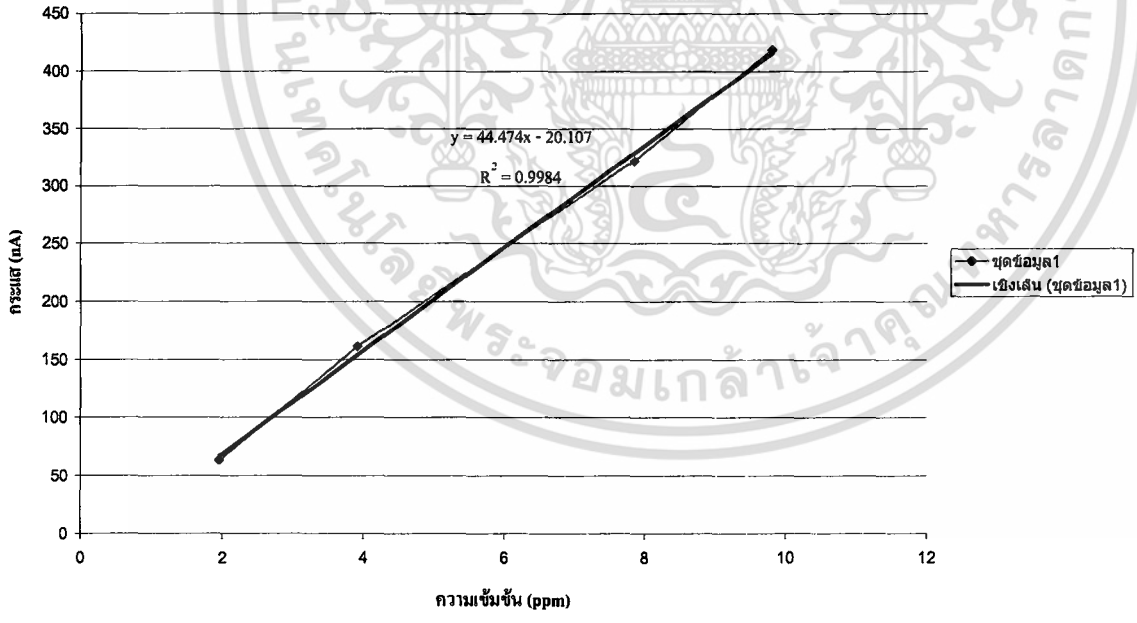
ปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ : $LOQ = 10S_{y/x} / b$

$LOQ = 10 \times 4.4468 / 43.122$

$= 1.0312$

ตารางที่ ข.10 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน standard addition ด้วยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 1 – ตัวอย่างน้ำมันพืช 10 มิลลิลิตร

ความเข้มข้น (ppm)	ความเข้มข้นที่แท้จริง (ppm)	กระแสที่วัดได้ (nA)
2	1.96	63.438
4	3.92	161.300
8	7.84	321.870
10	9.8	419.002



รูปที่ ข.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน standard addition กับกระแสที่วัดได้โดยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 1 – ตัวอย่างน้ำมันพืช 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.11 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน standard addition กับกระแสที่วัดได้โดยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 1 – ตัวอย่างน้ำมันพืช 10 มิลลิลิตร

Xi	Xi^2	Yi	$\hat{Y}i$	$\lvert Yi - \hat{Y}i \rvert$	$(Yi - \hat{Y}i)^2$
1.96	3.8416	63.438	67.0620	3.6240	13.13337600
3.92	15.3664	161.300	154.2311	7.0689	49.96934721
7.84	61.4656	321.870	328.56916	6.69916	44.87874471
9.8	96.0400	419.002	415.7382	3.2638	10.65239044
	$\sum Xi^2 = 176.7136$				$\sum(Yi - \hat{Y}i)^2 = 118.6339$

เมื่อ Xi คือ ความเข้มข้นที่แท้จริง

$\hat{Y}i = 44.474x - 20.107$

ขีดจำกัดการตรวจหา : $LOD = 3S_{y/x} / b$

$$S_{y/x} = \left[\sum (Yi - \hat{Y}i)^2 / n - 2 \right]^{1/2}$$

$$= \sqrt{118.6339 / 2}$$

$$= 7.7017$$

เพราะฉะนั้น $LOD = 3 \times 7.7017 / 44.474$

$LOD \cong 0.5195$

ปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ : $LOQ = 10S_{y/x} / b$

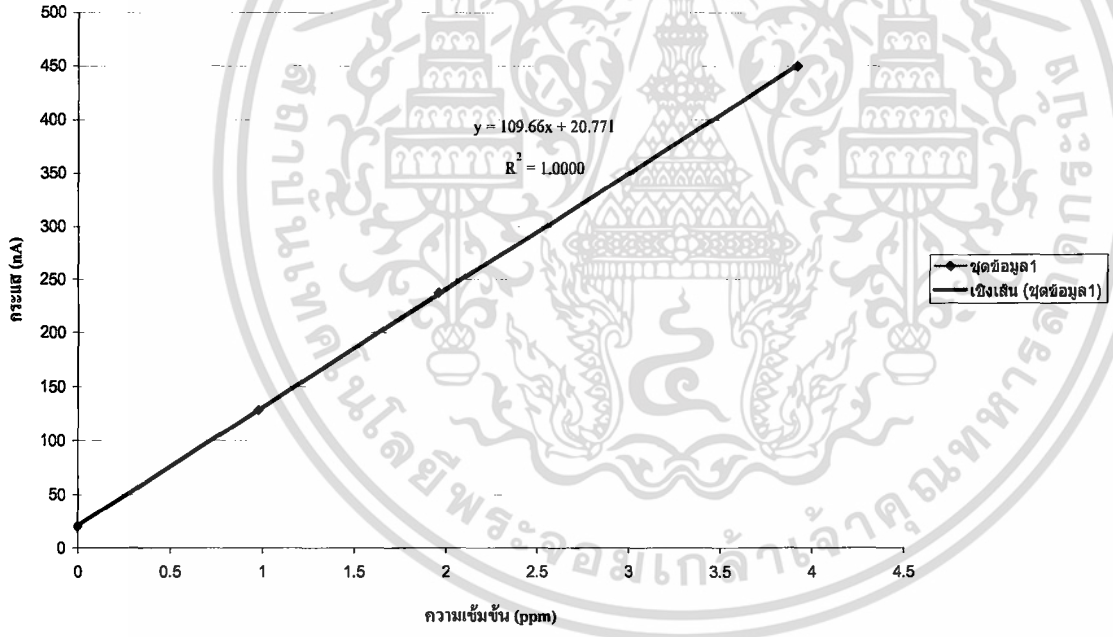
$LOQ = 10 \times 7.7017 / 44.474$

$= 1.7317$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.12 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน standard addition ด้วยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 2 – ตัวอย่างน้ำมันพืช 20 มิลลิลิตร

ความเข้มข้น (ppm)	ความเข้มข้นที่แท้จริง (ppm)	กระแสที่วัดได้ (nA)		ค่าเฉลี่ย $\overline{(X)}$	SD	RSD (%)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2			
0	0	16.908	22.814	19.861	4.1762	21.0271
1	0.98	129.483	127.209	128.346	1.6079	1.2528
2	1.96	238.758	235.965	237.3615	1.9749	0.8320
4	3.92	451.151	448.414	449.7825	1.9354	0.4303



รูปที่ ข.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน standard addition กับกระแสที่วัดได้โดยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 2 – ตัวอย่างน้ำมันพืช 20 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.13 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน standard addition กับกระแสเฉลี่ยโดยเทคนิคโพลาโรกราฟีแบบดิฟเฟอเรนเชียลพัลส์ ชุดที่ 2 – ตัวอย่างน้ำมันพืช 20 มิลลิลิตร

Xi	Xi^2	Yi	$\hat{Y}i$	$\lvert Yi - \hat{Y}i \rvert$	$(Yi - \hat{Y}i)^2$
0	0	19.8610	20.7710	0.9100	0.8281
0.98	0.9604	128.3460	128.2378	0.1082	0.0117
1.96	3.8416	237.3615	235.7046	1.6569	2.7453
3.92	15.3664	449.7825	450.6382	0.8557	0.7322
	$\sum Xi^2 = 20.1684$				$\sum(Yi - \hat{Y}i)^2 = 4.31734734$

เมื่อ Xi คือ ความเข้มข้นที่แท้จริง

$\hat{Y}i = 109.66Xi + 20.771$

ขีดจำกัดการตรวจหา : $LOD = 3S_{y/x} / b$

$$S_{y/x} = \left[\sum (Yi - \hat{Y}i)^2 / n - 2 \right]^{1/2}$$

$$= \sqrt{4.31734734 / 2}$$

$$= 1.4692$$

เพราะฉะนั้น $LOD = 3 \times 1.4692 / 109.66$

$LOD \cong 0.0402$

ปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ : $LOQ = 10S_{y/x} / b$

$LOQ = 10 \times 1.4692 / 109.66$

$= 0.1340$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้