การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี ในข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

DETERMINATION OF VITAMIN E IN BROWN RICE AND GERMINATE BROWN RICE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

นางสาว ชุฑามาศ โรจน์สัตตรัตน์
นาย บรรเจิดศิลป์ พูนทอง

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม - เครื่องมือวิเคราะห์
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาภรณ์โปลิศพระจอมเกล้าจุฬาภรณราชนครินทร์
ปีการศึกษา 2551

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี ในข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

DETERMINATION OF VITAMIN E IN BROWN RICE AND GERMINATE BROWN RICE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

นางสาว จุฑามาศ โรจน์สัตตรัตน์
นาย บรรเจิดศึกษ์ พูนทอง

วพ.
จ624 ก
2551
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 108554
วัน,เดือน,ปี - 5 ก.ค. 2553
b. 12225198
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม – เครื่องมือวิเคราะห์
คณะวิทยาศาตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DETERMINATION OF VITAMIN E IN BROWN RICE AND GERMINATE BROWN RICE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

JUTAMART ROJSATRATS

BANGERDSUK POONTONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL CHEMISTRY – ANALITICAL INSTRUMENTATION

FACULITY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก
ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง
Determination of Vitamin E in Brown Rice and Germ Brown Rice
by High Performance Liquid Chromatography

ชื่อนักศึกษา นางสาวจุฑามาศ โรจน์สัตตรัตน์
นาย บรรเจิดศึกษ์ พูนทอง

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์

ปีการศึกษา 2551

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อ.พรทิพย์ ศัพท์อนันต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์ ประจำปีการศึกษา 2551

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ	
อ.สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล	
รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล	

.....

(ผศ.ดร.ชลอ จารุสุทธิรักษ์)
ปฏิบัติหน้าที่ประธานสาขาวิชา

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก
ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ชื่อนักศึกษา นางสาวจุฑามาศ โรจน์สัตตรัตน์
นายบรรเจิดศึกษ์ พูนทอง

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา 2551

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อ.พรทิพย์ ศัพท์อนันต์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปริมาณวิตามินอีในข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกด้วยการสกัดแบบซอกห์เลตที่มีตัวทำละลายเป็นเฮกเซน ในการทดลองจะใช้เวลาในการสกัด 60 นาทีต่อตัวอย่าง องค์ประกอบของวิตามินอี (อัลฟาโทโคฟีรอล) จะถูกแยกด้วยระบบ HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวีตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ HiQ Sil C_{18}HS อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล : แอซิโทไนไทรล์ 50:50 ปริมาตรโดยปริมาตร ใช้อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที จากกราฟมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 0-10 ppmได้สมการเชิงเส้นและสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของกราฟมาตรฐานจากชุดการทดลองที่หนึ่งเป็นดังนี้ ($y = 6628.8x - 89.368$, $R^2 = 0.9991$) และจากการเติมสารมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 0-5 ppm ได้สมการเชิงเส้นและสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของกราฟมาตรฐานจากชุดการทดลองที่หนึ่งเป็นดังนี้ ($y = 10869x - 1850.7$, $R^2 = 0.9990$) ตามลำดับ ขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ 0.41, 0.42 mg/L ตามลำดับ และขีดจำกัดต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ 1.36, 1.40 mg/L ตามลำดับ

ปริมาณวิตามินอีเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1, ดอกมะลิ 105, กข 23 คือ 0.43, 0.25, 0.11 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1, ดอกมะลิ 105, กข 23 คือ 0.47, 0.27, 0.14 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ

การวิเคราะห์เชิงปริมาณวิตามินอีโดยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน (External Standard Method) และการวิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน(Standard Addition Method) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจที่ 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Determination of Vitamin E in Brown Rice and Germinate Brown Rice by High Performance Liquid Chromatography
Students	Ms. Jutamart Rojsatrats
	Mr. Bangerdsuk Poontong
Degree	Bachelor of Science
Major	Industrial Chemistry – Analytical Instrumentation
Academic Year	2008
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Arunee Kongsakphaisal
Special Project co-advisor	Ajarn. Porntip Subta-arnan

ABSTRACT

This methods are studies contents vitamins E in Brown Rice and Germinate Brown Rice was extracted by soxhlet extraction with hexane solvent. The experiments were used total extraction time of 60 min/sample. Viamin E (α-tocopherol) components were separated by isocratic reverse phase HPLC and quantified with a Turnable Absorbance detector at 295 nm. Separation performed Stationary phase on HiQ Sil C_{18}HS columns. Mobile phase were used MeOH : Acetronitrile 50:50 (v/v) at flow rate 0.8 mL/min. The standard calibration curve obtained at range 0-10 ppm and standard addition calibration was 0-5 ppm. The linear regression equation and Coefficient of Determination at calibration curve in two experiment lot 1 and 2 were ($y = 6628.8x - 89.368$, $r^2 = 0.9991$), ($y = 10869x - 1850.7$, $r^2 = 0.9990$) spectively.

The mean content vitamins E in Chinart 23, Dok-Mali 105, Kgo-Koo 23 Brown Rice were 0.43, 0.25, 0.11 mg/100g, respectively and Germinate Brown Rice were 0.47, 0.27, 0.14 mg/100g, respectively.

In quantitative analysis of total vitamin E between the external standard method and standard addition method do not give significantly different value at 99% confidence interval.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้อย่างดี เนื่องจากด้วยคำแนะนำ คำปรึกษาและแนวทางการแก้ไขปัญหาที่ดีจาก รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและควบคุมโครงงาน และ อ.พรทิพย์ ศัพทอนันต์ กลุ่มผู้วิจัยซาบซึ้งในความกรุณาและความอนุเคราะห์ จึงขอกราบขอบพระคุณทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ และ อ.สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล กรรมการการสอบโครงงาน ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการเป็นกรรมการพิจารณาโครงงาน พร้อมกับให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ ตลอดจนในการช่วยตรวจรายละเอียดต่างๆในโครงงานฉบับนี้ให้เป็นไปอย่างถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี ตึกวิทยาศาสตร์ ที่ช่วยแนะนำเทคนิคการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ และที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมี เครื่องมือและสถานที่สำหรับการการทำการวิเคราะห์

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากโครงงาน ฉบับนี้ กลุ่มผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาวจุฑามาศ โรจน์สัตตรัตน์
นายบรรเจิดศึกษ์ พูนทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ข้าวและความสำคัญของข้าว	5
2.2 วิตามินอี	13
2.3 เทคนิค High Performance Liquid (HPLC)	21
2.4 ระบบซอกห์เลต	33
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	34
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 ตัวอย่างและสารเคมี	36
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	36
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	37
3.3.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องงอก	37
3.3.2 การสกัดวิตามินอีจากข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก	37
3.3.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง	38
3.3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอี ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.5 การทำกราฟมาตรฐาน 39

3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี ในตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก 40

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอี ด้วยเทคนิค HPLC 42

4.1.1 ศึกษาหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 42

4.1.2 ศึกษาหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ 44

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 45

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก 47

4.3.1 การวิเคราะห์โดยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน 47

4.3.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน 47

4.3.3 ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด 49

4.3.4 การเปรียบผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
ในตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก 49

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย 52

5.2 ข้อเสนอแนะ 54

เอกสารอ้างอิง 55

ภาคผนวก ก.ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลอง 57

ภาคผนวก ข.การคำนวณปริมาณวิตามินอี ด้วยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน 77

ภาคผนวก ค.การคำนวณปริมาณวิตามินอี ด้วยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน 82

ภาคผนวก ง.การคำนวณขีดจำกัดการตรวจวัด 90

ภาคผนวก จ.การคำนวณค่า t-test จากผลการวิเคราะห์ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สัดส่วนโครงสร้างของเมล็ดข้าว 7

2.2 การเปรียบเทียบคุณค่าสารอาหารของข้าวกล้องและข้าวขาว 11

2.3 ประโยชน์ของสารอาหารที่ได้รับจากข้าวกล้องงอก 12

2.4 ปริมาณวิตามินอีที่ได้รับจากอาหารประจำวัน (มก./100กรัม) 15

2.5 คุณสมบัติของตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ 28

2.6 แสดงปัญหาและสาเหตุที่พบได้บ่อยในเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง 31

4.1 แสดงค่าเวลารีเทนชัน (retention time) ในการแยกสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ที่อัตราส่วนต่างๆ 42

4.2 แสดงอัตราส่วนในการแยกสารละลายมาตรฐานวิตามินอีที่อัตราส่วนต่างๆ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร 45

4.3 แสดงผลจากการสร้างกราฟมาตรฐานที่ชุดการทดลองต่างๆ ค่าพิสัยเชิงเส้น และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ 45

4.4 แสดงผลการวิเคราะห์วิตามินอีในตัวอย่างด้วยเทคนิค External Standard Method 47

4.5 แสดงผลการวิเคราะห์วิตามินอีในตัวอย่าง Standard Addition Method 48

4.6 แสดงผลของค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD,LOQ) 49

4.7 ผลการการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างทั้ง 2 วิธี 50

4.8 แสดงผลการวิเคราะห์ t-test ในตัวอย่างข้าวกล้อง 50

4.9 แสดงผลการวิเคราะห์ t-test ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก 51

ข.1 พื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีชุดการทดลองที่ 1 ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm 77

ข.2 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 78

ข.3 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 79

ข.4 พื้นที่พีคเฉลี่ยของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีชุดการทดลองที่ 2 ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm 79

ข.5 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105 และ กข 23 80

ข.6 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ข.7 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวพันธุ์กข 23 81
ค.1 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 82
ค.2 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 84
ค.3 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 84
ค.4 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 85
ค.5 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 85
ค.6 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 86
ค.7 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 86
ค.8 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 87
ค.9 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 87
ค.10 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 88
ค.11 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 88
ค.12 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน 89
ง.1 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินอีของชุดการทดลองที่ 1 91
ง.2 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น
ของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีกับพื้นที่พีคเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ 1 92
ง.3 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินอีของชุดการทดลองที่ 2
โดยทำการ ทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm 93
ง.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 93
ง.4 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย
มาตรฐานวิตามินอีกับพื้นที่เฉลี่ยของชุดการทดลองที่ 2 94
จ.1 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องที่วิเคราะห์ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว 6
2.2 โครงสร้างของอะมิโลสและอะมิโลแพคติน 8
2.3 ปริมาณสารอาหารของข้าวกล้องงอกเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวขาว 12
2.4 โครงสร้างทางเคมีของ tocopherols 14
2.5 โครงสร้างทางเคมีของ tocotrienols 14
2.6 การเกิด interaction ระหว่างโมเลกุลสาร M1 และ M2 ของ Mobile phase และStationary phase ใน column 22
2.7 เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง 23
2.8 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC 24
2.9 ระบบการฉีดสารตัวอย่างชนิด rotary 26
2.10 คอลัมน์ (column) 26
2.11 ระบบซอกห์เลต 33
4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ความเข้มข้น 5 ppm อัตราการไหลของ ส่วนเคลื่อนที่ เป็น 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที 43
4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ความเข้มข้น 5 ppm อัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที 43
4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ความเข้มข้น 5 ppm อัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 43
4.4 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50:50 ปริมาตรโดยปริมาตร 44
4.5 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีชุดการทดลองที่ 2 ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm 46
4.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีชุดการทดลองที่ 2 ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ก.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105
โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 60 : 40 ปริมาตรโดยปริมาตร
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที 57
ก.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105
โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 60 : 40 ปริมาตรโดยปริมาตร
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 57
ก.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105
โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 40 : 60 ปริมาตรโดยปริมาตร
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที 58
ก.4 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105
โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 40 : 60 ปริมาตรโดยปริมาตร
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 58
ก.5 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105
โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที 59
ก.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105
โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 59
ก.7 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1
ความเข้มข้น 0.5 ppm 60
ก.8 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1
ความเข้มข้น 1 ppm 60
ก.9 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1
ความเข้มข้น 2.5 ppm 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ก.10 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 5 ppm 61
ก.11 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 10 ppm 62
ก.12 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้น 0.5 ppm 62
ก.13 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้น 1 ppm 63
ก.14 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้น 2.5 ppm 63
ก.15 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้น 5 ppm 64
ก.16 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้น 10 ppm 64
ก.17 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 65
ก.18 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm 65
ก.19 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm 66
ก.20 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm 66
ก.21 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 67
ก.22 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ก.23 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm 68
ก.24 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm 68
ก.25 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 69
ก.26 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm 69
ก.27 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm 70
ก.28 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm 70
ก.29 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 71
ก.30 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm 71
ก.31 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm 72
ก.32 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm 72
ก.33 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 73
ก.34 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm 73
ก.35 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm 74
ก.36 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm 74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ก.37 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 75
ก.38 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm 75
ก.39 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm 76
ก.40 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm 76
ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีชุดการทดลองที่ 1 ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm 77
ค.1 กราฟการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 จากการฉีดครั้งที่ 1 83
ง.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 91
ง.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับสามของโลกรองจากข้าวสาลี และข้าวโพดซึ่งใช้ในการบริโภคของมนุษย์ โดยพลังงานที่ได้จากข้าวคิดเป็น 22 เปอร์เซ็นต์ ของพลังงานทั้งหมดที่มนุษย์ได้รับจากการบริโภค [1] ในทั่วโลกนั้นมีมากกว่า 100 ประเทศที่ปลูกและบริโภคข้าว โดย 92 เปอร์เซ็นต์ของประเทศที่ผลิตและบริโภคข้าวอยู่ในทวีปเอเชีย และสำหรับประเทศไทยข้าวไม่ได้เป็นเพียงอาหารหลักเท่านั้น แต่ข้าวยังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประทศ

ประเทศไทยถือเป็นผู้ผลิตข้าวอันดับต้นๆ ของโลก ซึ่งมีวิธีการปลูกและสายพันธุ์ข้าวที่หลากหลาย ในกระบวนการสีข้าวนั้นถ้ามีการแยกเฉพาะเปลือกข้าวออก จะได้ข้าวกล้องซึ่งยังมีส่วนของจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว และเป็นแหล่งรวมสารอาหารที่มีคุณค่าและประโยชน์ต่อร่างกายสูง ขณะที่ข้าวที่บริโภคกันส่วนมากเป็นข้าวที่ถูกขัดสีหลายครั้งจนเหลือแต่เนื้อข้าวสีขาวที่แทบจะไม่มีคุณค่าและประโยชน์ทางโภชนาการ เนื่องจากมีส่วนประกอบของแป้งเป็นส่วนใหญ่ สารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายส่วนใหญ่ จะอยู่ในส่วนของรำข้าวซึ่งถูกขัดทิ้งไปในการขัดขาว ได้แก่ วิตามินอี (tocopherol และ tocotrienol) วิตามินบี โอรีซานอล (oryzanols) และกรดแกมมาอะมิโนบิวทิริค (γ-aminobutyric acid หรือ GABA) ผู้บริโภคทั่วไปมีความคุ้นเคยและติดใจในความนุ่มและสีขาวน่ารับประทาน จนมองข้ามคุณค่ามหาศาลของข้าวกล้องไป

ข้าวกล้องงอก (germinated brown rice) เป็นข้าวกล้องที่ผ่านกระบวนการงอกในระยะเวลาสั้นๆ โดยการนำข้าวกล้องมาแช่น้ำในระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้ข้าวกล้องซึ่งยังมีส่วนของคัพภะติดอยู่เริ่มกระบวนการงอก จากนั้นนำไปลดความชื้น หรือนำข้าวเปลือกมาแช่น้ำเพื่อให้เกิดการงอก จากนั้นจึงนำไปลดความชื้นและทำการกะเทาะเปลือกออกด้วยกระบวนการเดียวกับข้าวกล้องปกติ [2]

สารอนุมูลอิสระ หมายถึง สารซึ่งมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ในโมเลกุลโดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว โดยเฉพาะเวลามีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิเกิล อยู่เป็นจำนวนน้อยๆ มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และร่างกายก็จะมีระบบของแอนติออกซิแด้นท์ขจัดออกไป แต่ถ้าร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไป ตัวอย่างเช่น ได้รับจากอาหารบางชนิด จากขบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูงๆ มาใช้อีก หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสี ultraviolet การแผ่รังสี (radiation) รังสี x-ray หรือจากมลพิษ เช่น ควันบุหรี่ ก๊าซจากท่อไอเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รถยนต์ ถ้าสารเหล่านี้มีมากกว่าความสามารถของแอนตี้ออกซิแด้นท์ในร่างกายจะขจัดหมด หรือในภาวะที่จำนวนแอนติออกซิแด้นท์ในร่างกายลดลง เช่น ผู้สูงอายุ ก็จะทำให้มีสารอนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระเช่น ไฮโดเจนเพอออกไซด์ ซึ่งมีออกซิเจนเป็นศูนย์กลางเช่นกัน โดยรวมเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) มากเกินไปก่อให้เกิดอันตรายได้

อนุมูลอิสระมีหลายชนิด สารประกอบออกซิเจน หรือ ไนโตรเจน หรือคลอรีนซึ่งสามารถเป็นสารอนุมูลอิสระ เช่น

- อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$)
- อนุมูลอิสระไฮดรอกซี ($OH^{\cdot}$)
- อนุมูลไขมันเปอร์ออกซี ($LOOH^{\cdot}$)
- ซิงเกล็ทออกซิเจน ($O^{\cdot}$)
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

} REACTIVE OXYGEN SPECIES

- กรดไฮโปคลอรัส (HClO)
- ไนตริคออกไซด์ (NO)

อนุมูลอิสระ มีที่มาทั้งแหล่งภายนอกร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือธาตุเหล็กมากกว่าปกติ แสงแดด ความร้อน รังสีแกมม่า ยาบางชนิด เช่น Doxorubicin , Penicillamine, paracetamol, CCl_4 เป็นต้น และแหล่งภายในร่างกายได้แก่ ออกซิเจน ในกระบวนการเผาผลาญสารอาหารของร่างกาย ซึ่งมีความจำเป็นต้องอาศัยออกซิเจนช่วย จะเกิดผลพลอยได้ คือ ออกซิเจนที่มีประจุลบ (O_2) ซึ่งก็คืออนุมูลอิสระ (free radicals) สารตัวนี้นอกจากจะรวมตัวกับ LDL(Low density lipoprotein) ยังสามารถไปรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกาย แล้วก่อให้เกิดเป็นสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ที่ปกติแปรสภาพ ไปเป็นเซลล์มะเร็ง

ร่างกายก็มีกลไกที่จะกำจัด อนุมูลอิสระ เหล่านี้โดย 2 วิธี คือ ใช้เอนไซม์ต่างๆในร่างกายเช่น Superoxide dismultase (SOD) และไม่ใช้เอนไซม์ ได้แก่ วิตามิน อี (tocopherol และ tcotrienol) เบตาคาโรทีน (Betacarotene) และ วิตามิน ซี เนื่องจากเอนไซม์ต่างๆที่ใช้กำจัด อนุมูลอิสระ เช่น SOD มีได้จำกัด แต่สารอาหารที่สามารถทานเสริมได้แก่ วิตามิน อี วิตามิน ซี เบต้าคาโรทีน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือมีอีกชื่อว่า Antioxidant นั้นสามารถหารับประทานได้จากผลไม้ และธัญพืช ต่างๆได้

จากรายงานการวิจัยค้นพบว่าวิตามิน อี มีผลต่อการลดความเสี่ยงของโรคหัวใจขาดเลือดโดยลดอัตราตายได้เริ่มมีการวิจัยโดยมีการทดลองที่มากขึ้นโดยทดลองในคนไข้ 2000 คนเป็นเวลาปีกว่า ก็พบว่าวิตามิน อี ลดอุบัติการของโรคหัวใจขาดเลือดได้จริง แต่ก็มีผลน้อยมาก และจากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในรายงานหลังก็พบว่า เบต้าคาโรทีนกลับไม่มีผลดีอันนี้ [3] ในโครงงานพิเศษนี้จวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารและไม่จัดเป็นเอนไซม์ คือ วิตามิน อี ซึ่งพบในผลไม้ เนื้อสัตว์ นม และธัญพืช

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาวิธีการวิเคราะห์วิตามิน อี ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก
2. ศึกษาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง
3. ศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์วิตามินอี จากการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์วิตามิน อี ในข้าวกล้องงอกโดยใช้เทคนิค HPLC
3. เปรียบเทียบปริมาณวิตามินในข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน

1. สืบค้นข้อมูลจากแหล่งข้อมูล
2. ศึกษาข้อมูลที่ได้และวางแผนการดำเนินงาน โดยจัดเตรียมสารเคมี สารมาตรฐาน อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้
3. ดำเนินการทดลองตามแผนงานที่วางไว้ โดยเตรียมตัวอย่างและนำไปวิเคราะห์วิตามินอี โดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันในการสกัด แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกัน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบปริมาณวิตามิน อี ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระว่ามีมากน้อยเพียงใดในตัวอย่างข้าวกล้องงอก
2. เพื่อทราบวิธีการเตรียมตัวอย่างและเทคนิคการเตรียมตัวอย่างวิตามินอีก่อนนำไปวิเคราะห์
3. เพื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินอี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เพื่อทราบผลของการวิเคราะห์วิตามิน อี ของข้าวแต่ละพันธุ์ว่ามีความแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าวและความสำคัญของข้าว

ข้าว (rice ; *Oryza sitva* L.) เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับสามของโลกรองลงมาจากข้าวสาลีและข้าวโพด พลังงานที่ได้จากข้าวคิดเป็น 22 เปอร์เซ็นต์ ของพลังงานทั้งหมดที่มนุษย์ได้รับจากการบริโภค [2] โดยทั่วโลกมีมากกว่า 100 ประเทศที่ปลูกและบริโภคข้าว ซึ่งในปี 2006/2007 มีพื้นที่ปลูกข้าวทั่วโลกประมาณ 153.25 ล้านเฮกตาร์ และผลิตข้าวได้ประมาณ 417.54 ล้านเมตริกตัน ซึ่งประมาณ 92 เปอร์เซ็นต์ ของการผลิตและการบริโภคข้าวจะอยู่ในทวีปเอเชีย สำหรับประเทศไทยข้าวไม่ได้เป็นเพียงอาหารหลักเท่านั้น แต่ข้าวยังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ ถึงแม้ประเทศไทยจะผลิตข้าวได้เป็นอันดับ 6 ของโลก แต่ประเทศไทยสามารถส่งออกข้าวได้เป็นอันดับ 1 ของโลกยาวนานต่อเนื่องกว่า 20 ปี และปัจจุบันมีสัดส่วนการตลาดประมาณเกือบ 30 เปอร์เซ็นต์ ในปี 2548 พบว่าการส่งออกข้าวทั้งหมดยกเว้นข้าวหอมมะลิมีปริมาณ 7,537,341 ตัน คิดเป็นมูลค่า 93,547.59 ล้ายบาท ส่วนข้าวหอมมะลิมีปริมาณการส่งออก 2,325,621 ตัน คิดเป็นมูลค่า 35,165.29 ล้านบาท [4]

2.1.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

เมล็ดข้าวเรียกว่า คารีออพซิส (caryopsis) เมื่อนำข้าวไปผ่าตัดตามความยาวและศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าเมล็ดข้าวประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ [5]

1. แกลบ (hull หรือ husk) เป็นส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าว ประกอบด้วยเปลือกใหญ่ (lemma) เปลือกเล็ก (palae) หาง (awn) ขั้วเมล็ด (rachilla) และกลีบรองเมล็ด (sterile lemma)

2. ข้าวกล้อง (brown rice) เป็นส่วนที่ใช้บริโภค ซึ่งประกอบด้วย

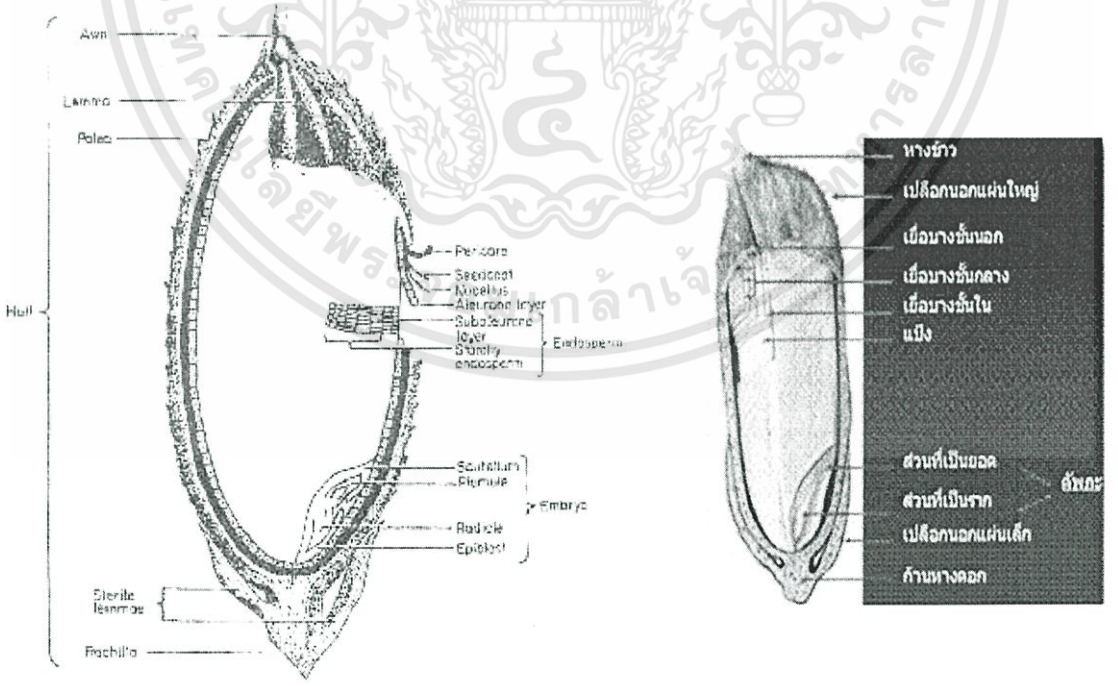
2.1 เยื่อข้าวกล้อง (caryopsis coat) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ได้แก่ เยื่อชั้นนอก (pericarp) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่มีผนังเส้นใย 6 ชั้น มีสารสีหรือรงควัตถุปนอยู่ ทำให้ข้าวกล้องมีสีต่างๆ เช่น น้ำตาลอ่อน น้ำตาลแก่ น้ำตาลแดง น้ำตาลม่วง น้ำตาลจนเกือบดำ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีโปรตีน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบสำคัญ เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มผลเข้ามา ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชั้นรูปยาวเรียวตามขวางประกอบด้วยไขมันและสารสีเช่นกัน และเยื่อคั่น (nucellus) เป็นเซลล์ที่ติดกับเยื่อหุ้มเมล็ด แต่พันธะระหว่างเยื่อคั่นกับเยื่อหุ้มเมล็ดไม่ติดแน่นจึงแยกจากกันได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เยื่อหุ้มชั้นใน (aleurone layer) อยู่ด้านในต่อจากเยื่อคั่น เป็นเนื้อเยื่อชนิดเดียวกับเนื้อเมล็ด (endosperm) เซลล์ของเยื่อหุ้มเนื้อเมล็ดประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน

2.3 ส่วนสะสมอาหาร (starchy endosperm) เรียกว่า เอนโดสเปิร์ม เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ (ประมาณ 83 เปอร์เซ็นต์) ของข้าวกล้อง เอนโดสเปิร์มจะถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มชั้นใน (aleurone layer) และตัวเอนโดสเปิร์มเองจะประกอบไปด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cells) ที่มีผนังบางซึ่งบรรจุเม็ดแป้ง (compound starch granules) ไว้เต็มโดยมีโปรตีนแทรกอยู่รอบนอกใกล้ๆ กับชั้นของเยื่อหุ้มชั้นใน

2.4 คัพภะ (embryo) เป็นส่วนที่จะเจริญเป็นต้นอ่อนต่อไป ดังนั้นจึงประกอบด้วยส่วนของต้นอ่อน (plumule) รากแรกเกิด (radicle) โดยมีส่วนของลำต้นอ่อนสั้นๆ (mesocotyl) เชื่อมอยู่ตรงกลางระหว่างส่วนของใบและราก ส่วนของใบจะถูกห่อหุ้มด้วยปลอกหุ้มต้นอ่อน (coleoptile) และส่วนของรากก็จะถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มรากอ่อน (coleorhiza) ส่วนของปลอกหุ้มต้นอ่อนนั้นจะถูกล้อมรอบด้วยชั้นของเซลล์ท่อน้ำท่ออาหาร (epiblast) และใบเลี้ยง (scutellum) ซึ่งเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว คัภพะเป็นแหล่งสะสมอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจึงอุดมด้วยโปรตีนและไขมัน โครงสร้างของเมล็ดข้าวดังแสดงในภาพที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 สัดส่วนโครงสร้างของเมล็ดข้าว

จากโครงสร้างของเมล็ดข้าว ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ แกลบและข้าวกล้อง เมื่อเปรียบเทียบส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าวจากน้ำหนักเมล็ดข้าว(ข้าวเปลือก) 100 เปอร์เซ็นต์ มีสัดส่วนดังแสดงในตารางที่ 2.1 จะเห็นว่าสัดส่วนของน้ำหนักข้าวเปลือก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นสัดส่วนของแกลบประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และข้าวกล้องประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบน้ำหนักข้าวกล้องให้เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จะมีสัดส่วนของเยื่อหุ้มต่างๆ รวมประมาณ 6.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของคัภพะ 3 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อเมล็ดประมาณ 90.5 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของคัภพะจะประกอบด้วยใบเลี้ยงมากที่สุด (1.18-1.4 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสัดส่วนต่างๆ ในข้าวเปลือกนี้ จะมีผลต่อกระบวนการแปรรูปข้าวเปลือกเป็นข้าวกล้อง และข้าวสารในปริมาณผลผลิตที่ได้ [6]

ตารางที่ 2.1 สัดส่วนโครงสร้างของเมล็ดข้าว [6]

โครงสร้างของเมล็ดข้าว	สัดส่วน(เปอร์เซ็นต์)	
	ค่าเฉลี่ย	ช่วงสัดส่วน
ข้าวเปลือก	100	-
แกลบ	20	16 - 18
ข้าวกล้อง	80	72 - 84
ข้าวกล้อง	100	-
เยื่อหุ้มเมล็ด	5	4 - 6
เยื่อหุ้มผล	1.5	1 - 2
เนื้อเมล็ด	90.5	89 - 94
คัภพะ	3	2 - 3
คัภพะ	3	-
รากอ่อน	0.18	-
ต้นอ่อน	0.34	-
เยื่อหุ้มรากอ่อน	0.18	-
ใบเลี้ยง	1.29	1.18 - 1.40
ท่อน้ำ ท่ออาหาร	0.26	-
อื่นๆ	0.75	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

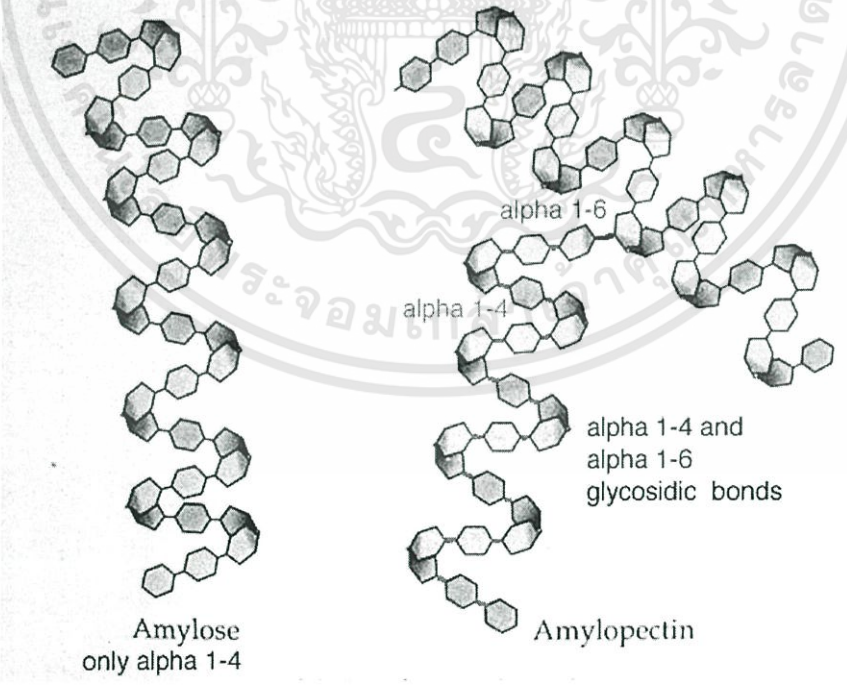
2.1.3 องค์ประกอบทางเคมีของข้าว

ข้าวที่บริโภคจะอยู่ในรูปของข้าวสารขาวและข้าวกล้อง ซึ่งมีองค์ประกอบหลักทางเคมีดังนี้

1. คาร์โบไฮเดรต ที่พบมากในข้าวจะอยู่ในรูปของแป้ง (starch) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็คคาไรด์จะพบมากที่สุด ประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ จึงมีผลต่อคุณภาพข้าวมากที่สุด โมเลกุลของแป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ อะมิโลส และอะมิโลเพคติน ซึ่งโมเลกุลแป้งทั้ง 2 ชนิด รวมกันแน่นจนเป็นเม็ดแป้ง [7]

1.1 อะมิโลส (amylose) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสจัดเรียงตัวเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้น (linear chains) ด้วยพันธะ α-1,4 glucoside bond [7] เมื่อย้อมสีด้วยสารละลายไอโอดีนจะมีสีน้ำเงิน และละลายน้ำได้ ในแป้งจะมีอะมิโลสเป็นส่วนรองโดยอยู่ปะปนกับอะมิโล-เพคติน [8]

1.2 อะมิโลสเพคติน (amylopetin) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสที่จัดเรียงตัวเป็นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเกลียวคู่โซ่กิ่งเป็นแขนงมากประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์ โดยโมเลกุลของกลูโคสจะต่อกันด้วยพันธะα-1,4 glucoside bond และพันธะα-1,6 glucoside bond [7] เมื่อย้อมสีด้วยสารละลายไอโอดีนจะมีสีน้ำตาลแดง และไม่สามารถละลายน้ำได้ [8] โครงสร้างของอะมิโลสและอะมิโลแพคตินดังแสดงในภาพที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของอะมิโลสและอะมิโลแพคติน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. โปรตีน ในข้าวมีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว โดยโปรตีนจะเกิดขึ้นตามส่วนต่างๆ ของเมล็ด มีมากในชั้นเปลือกหุ้มเมล็ด และเนื้อเมล็ดด้านนอกมีโปรตีนมากกว่าใจกลางเมล็ด ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในโปรตีนของข้าวเปลือกไม่ต่างจากข้าวกล้องและข้าวสารมากนัก เพราะในส่วนเปลือกมีโปรตีนน้อยมาก (2-6 เปอร์เซ็นต์) จึงได้รับโปรตีนจากเนื้อเมล็ดมาก เนื่องจากสัดส่วนของเนื้อเมล็ดมีมากกว่าส่วนอื่น และแหล่งที่มีโปรตีนมากอีกส่วนหนึ่งคือ ชั้นถัดจากแอลิวโรนและชั้นแอลิวโรนโดยจะสะสมเป็นกลุ่มโปรตีน (protein bodies) [7]

โมเลกุลของโปรตีนจะรวมตัวกันเป็นรูปร่างโปรตีนที่มีกลูเตลลินเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ภายใน ซึ่งมี 3 รูปแบบ คือ แบบผลึก (crystalline) แบบรูปร่างกลมขนาดเล็ก และรูปร่างกลมขนาดใหญ่ โดยโปรตีนที่แทรกอยู่ในเมล็ดจะแทรกอยู่ระหว่างเม็ดแป้งที่เชื่อมโยงกับเม็ดแป้ง ซึ่งอาจมีผลต่อการเกิดเจลาทิไนซ์ทำให้การพองตัวของเม็ดแป้งเสียรูปร่างได้ง่าย และโมเลกุลของอะมิโลสไม่ซึมผ่านออกมา มีผลต่อลักษณะความอ่อนหรือแข็งเมื่อเย็นลง ซึ่งส่งผลต่อข้าวสุกที่มีลักษณะนุ่มเหนียวหรือร่วน [7] โปรตีนในเมล็ดข้าวสามารถแบ่งเป็น 4 ชนิด ตามคุณสมบัติในการละลาย ได้แก่

2.1 อัลบลูมิน (alblumin) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำ (water soluble protein)

2.2 โกลบูลิน (globulin) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำเกลือ (salt soluble protein)

2.3 โปรลามิน (prolamin) มีคุณสมบัติละลายได้ในแอลกอฮอล์ (alcohol soluble protein)

2.4 กลูเตลลิน (glutelin) มีคุณสมบัติละลายได้ในกรดกรือด่าง (acid or alkali soluble protein)

ในข้าวกล้องมีโปรตีนชนิดที่ละลายน้ำ (alblumin) และละลายได้ในเกลือ (globulin) มากกว่าในข้าวสาร ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ส่วนใหญ่อยู่ในเนื้อเยื่อหุ้มเมล็ดและคัภพะ ส่วนโปรตีนที่ละลายได้ทั้งในกรดและด่าง (glutelin) เป็นโปรตีนหลักที่พบทั้งในเมล็ดข้าวกล้องและข้าวสาร และในรำข้าวก็มีความแตกต่างกันของชนิดของโปรตีนเช่นกัน

3. ไขมัน ข้าวมีปริมาณไขมันประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของข้าวทั้งเมล็ด คล้ายกับธัญพืชอื่นและมีอยู่ในส่วนของรำข้าวมากกว่าเนื้อเมล็ด การสีข้าวให้ขาวทำให้มีไขมันเหลืออยู่เพียง 0.3-0.5 เปอร์เซ็นต์ ประเภทไขมันในข้าวส่วนใหญ่คือ ไตรกลีเซอไรด์ รองลงมาคือ ฟอสฟอลิพิด (phospholipids) ไกลโคลิพิด (glycolipids) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) (Henry and Kettlewell. 1996) องค์ประกอบของไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกายประเภทกรดไขมันไม่อิ่มตัวและกรดไขมันอิ่มตัวซึ่งอยู่มาก ได้แก่ กรดโอลิอิก 4.25 เปอร์เซ็นต์ ลิโนเลอิก 39.1 เปอร์เซ็นต์ ปาลมิติก 15 เปอร์เซ็นต์ ไมรีสติก 0.2 เปอร์เซ็นต์ และบีเฮนิก 0.2 เปอร์เซ็นต์

4. แร่ธาตุในเมล็ดข้าวที่สำคัญมี 9 ชนิด ได้แก่ แคลเซียม (calciam) แมกนีเซียม (magnesium) ฟอสฟอรัส (phosphorus) โพแทสเซียม (potassium) เหล็ก (iron) สังกะสี (zinc) แมงกานีส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(manganese) ซีลีเนียม (selenium) และกาบา หรือ GABA (gamma-amino butyric acid) ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นในเมล็ดข้าวขณะที่ข้าวเริ่มงอก [9]

5. วิตามิน (vitamin) ในเมล็ดข้าวมีวิตามินที่สำคัญ ได้แก่

5.1 กลุ่มวิตามินที่ละลายในน้ำ ประกอบด้วย วิตามินบี 1 (thiamine) วิตามินบี 2 (riboflavin) วิตามินบี 3 (niacin) วิตามินบี 5 (pathothenic acid) วิตามินบี 6 (pyridoxine) วิตามินบี 9 (folic acid) วิตามินบี 12 (cyanocobalamin) โคลีน (chlorine) และอีโนซิทอล (inosital) (ฉัตรชัย วงษ์รักษา. 2546)

5.2 กลุ่มวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน ประกอบด้วยวิตามิน 4 ชนิด ได้แก่ วิตามินเอ (retinol) วิตามินอี (α-tocopherol) วิตามินเอฟ หรือที่รู้จักกันในชื่อ กรดไลโนเลอิค (linoleic acid) และแคโรทีน (carotene)

2.1.4 ข้าวกล้องงอก

ข้าวกล้องมีคุณค่าทางสารอาหารสูงกว่าข้าวขัดขาวดังแสดงในตารางที่ 2.2 ข้าวกล้องคือ ข้าวที่กะเทาะเอาเปลือกหรือแกลบออก โดยผ่านการขัดสีเพียงครั้งเดียว ข้าวที่ได้จะมีสีขุ่น และยังคงส่วนของจมูกข้าว เยื่อหุ้มเมล็ด และแอลิวโรน (aleurone) หรือรำข้าวที่หุ้มเมล็ดอยู่ซึ่งอุดมไปด้วยสารที่มีประโยชน์ แต่ถึงแม้ข้าวกล้องจะมีคุณค่าสารอาหารที่ดีแต่พื้นผิวที่ล้อมรอบเมล็ดชั้นนอกจะแข็งอุดมไปด้วยน้ำมันและเส้นใย ซึ่งเป็นส่วนที่ป้องกันการแทรกผ่านของความร้อนและการดูดซับน้ำ ทำให้การหุงข้าวภายใต้แรงดันบรรยากาศเกิดการเจลาติไนซ์ของเม็ดแป้ง และการอ่อนตัว หรือการสลายตัวของเนื้อเยื่อชั้นนอกได้ไม่ดีพอ จึงทำให้ข้าวกล้องที่หุงสุกภายใต้ ความดันปกติมีความแข็งและร่วน คุณภาพในการรับประทานต่ำเมื่อเทียบกับข้าวขาว ฉะนั้นเพื่อให้ข้าวกล้องมีลักษณะนุ่มอร่อย และสามารถหุงได้ง่ายเช่นเดียวกับข้าวขาว จึงได้มีการพัฒนาเป็นข้าวกล้องงอก [10]

ข้าวกล้องงอก (germinate brown rice : GBR) คือ ข้าวกล้องที่ผ่านกระบวนการงอกในระยะเวลาสั้นๆ โดยนำข้าวกล้องมาแช่น้ำในระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 -24 ชั่วโมง จนส่วนของจมูกข้าวงอกมีความยาวประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร แล้วจึงนำไปลดความชื้น โดยเมล็ดธัญพืชงอก เช่น ข้าวบาเลย์ ข้าวสาลี และข้าว จะสร้างเอนไซม์ hydrolytic ย่อยสลายแป้ง โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งและโปรตีน ทำให้มีโอลิโกแซคคาไรด์และกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น ซึ่งช่วยให้ข้าวกล้องงอกหุงง่ายขึ้น มีรสชาติดีขึ้น เนื้อสัมผัสนุ่มและมีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเพิ่มขึ้น [1]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเทียบกับข้าวขาวแล้ว ข้าวกล้องงอกจะมีปริมาณกรดแกมมาอะมิโนบิวทิริก (GABA) มากกว่า 10 เท่า มีใยอาหาร วิตามินอี ไนอะซิน และไลซีนมากกว่าประมาณ 4 เท่า และมีวิตามินบี 1 บี 6 และแมกนีเซียมมากกว่าข้าวขาวประมาณ 3 เท่า [11] ดังแสดงในภาพที่ 2.3

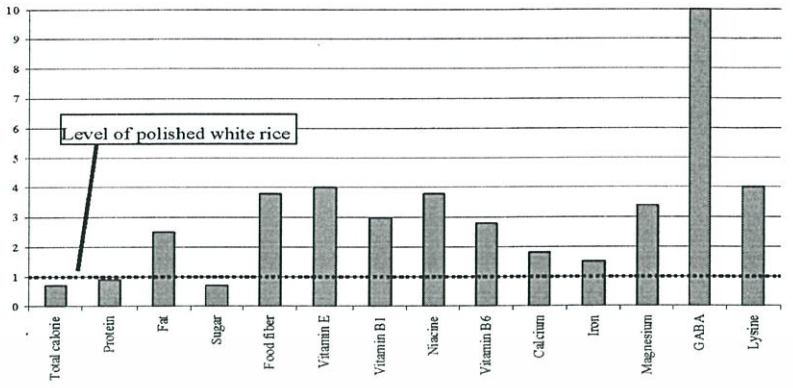
ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบคุณค่าสารอาหารของข้าวกล้องและข้าวขาว

สารอาหารและวิตามิน	ข้าวกล้อง (brown rice)	ข้าวขัดขาว (milled rice)
โปรตีน (protein) (เปอร์เซ็นต์)	7.1 - 8.3	6.3 - 7.1
ไขมัน (crude) (เปอร์เซ็นต์)	1.6 - 2.8	0.3 - 0.5
เส้นใย (crude fibers) (เปอร์เซ็นต์)	0.6 - 1.0	0.2 - 0.5
เถ้า (ash) (เปอร์เซ็นต์)	1.0 - 1.5	0.3 - 0.8
แป้ง (carbohydrate) (เปอร์เซ็นต์)	75.9	76.7 - 78.4
วิตามินเอ (retinol) (mg)	0.11	Tr
วิตามินบี 1 (thiamine) (mg)	2.9 - 6.1	0.2 - 1.1
วิตามินบี 2 (riboflavin) (mg)	0.4 - 1.4	0.2 - 0.6
วิตามินบี 3 (niacin) (mg)	35 - 53	13 - 24
วิตามินบี 5 (pathothenic acid) (mg)	9 - 15	3 - 7
วิตามินบี 6 (pyridoxine) (mg)	5 - 9	0.4 - 1.2
วิตามินบี 9 (folic acid) (mg)	0.1 - 0.5	0.03 - 0.14
วิตามินบี 12 (cyanocobalamin) (mg)	0 - 0.004	0 - 0.001
โคลีน (chlorine) (mg)	950	390 - 880
อีโนซิทอล (inositol) (mg)	1,000	90 - 110
วิตามินอี (α-tocopherol) (mg)	9.25	Tr – 3

หมายเหตุ - Tr = น้อยมาก

- คุณค่าสารอาหารตามธรรมชาติของข้าวกล้องเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสาร คิดเป็นคุณค่าสารอาหารต่อน้ำหนักข้าวสาร 100 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ปริมาณสารอาหารของข้าวกล้องงอกเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวขาว [11]
แกน x คือ ชนิดของสารอาหารที่พบ แกน y คือ จำนวนเท่าของสารอาหารที่พบ

2.1.5 ประโยชน์ของสารอาหารในข้าวกล้องงอกที่มีต่อร่างกาย

ประโยชน์ของสารอาหารที่ได้รับจากข้าวกล้องงอก ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ประโยชน์ของสารอาหารที่ได้รับจากข้าวกล้องงอก

สารอาหาร	ประโยชน์ของสารอาหาร
สารกลุ่มวิตามินอี	- เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากอนุมูลอิสระเป็นตัวการทำให้เซลล์เสียหายและแก่ก่อนวัย - มีคุณประโยชน์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน - ป้องกันผิวจากรังสีอัลตราไวโอเลต
แกมมาโอรีซานอล (γ-oryzanol)	- เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องการเหี่ยวย่น - ปรับระดับคลอเลสเตอรอล
กรดแกมมาอะมิโนบิวทิวริก (γ-aminobutyric acid : GABA)	- เป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง - เป็นสารสื่อประสาทประเภทสารยับยั้ง รักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้น ช่วยให้สมองเกิดการผ่อนคลายและนอนหลับสบาย - ช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อ ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโตทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ กล้ามเนื้อเกิดความกระชับ - เกิดสาร lipotropic เป็นสารป้องกันการสะสมไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

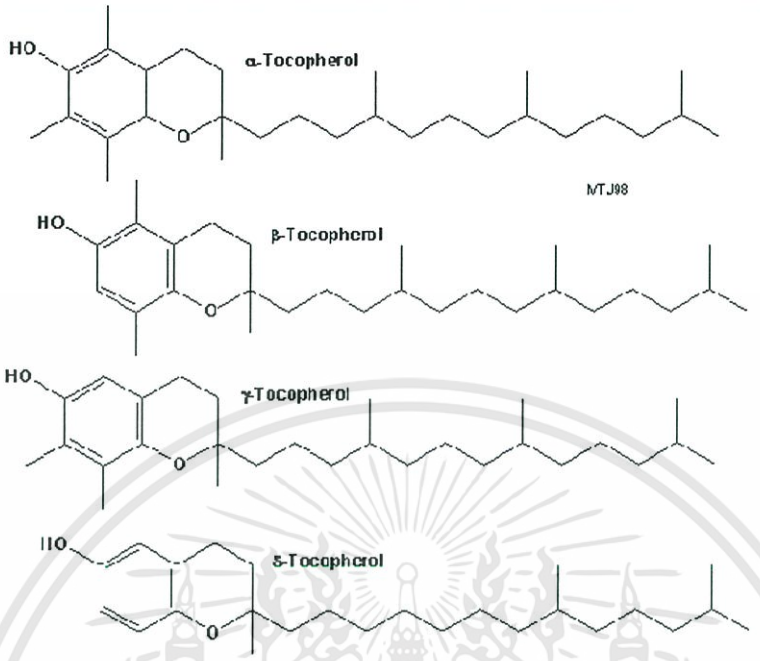
สารอาหาร	ประโยชน์ของสารอาหาร
ใยอาหาร (food fiber)	- บรรเทาอาการท้องผูก ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ - ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด
อินโนซิทอล (inositols)	- เร่งกระบวนการเผาผลาญไขมันป้องกันการสะสมไขมันที่ตับ - ป้องกันผนังหลอดเลือดแดงหนาและแข็งตัว
กรดเฟอร์รูลิก (ferulic acid)	- ทำลายสาร oxides ที่ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระได้ง่าย - ระงับการสร้างเม็ดเลือดสีของผิว
กรดไฟติก (phytic acid)	- เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ - ป้องกันโรคทางหัวใจและหลอดเลือด เช่น ความดัน ป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด
แมกนีเซียม (magnesium)	- ป้องกันโรคหัวใจ
โพแทสเซียม (potassium)	- ลดระดับความดันเลือด
สังกะสี (zinc)	- กระตุ้นการทำงานของระบบสืบพันธุ์ - ป้องกันภาวะเส้นเลือดแดงหนาและแข็งตัวจากการที่คลอเลสเตอรอลไปเกาะที่ผนังเส้นเลือด

2.2 วิตามินอี

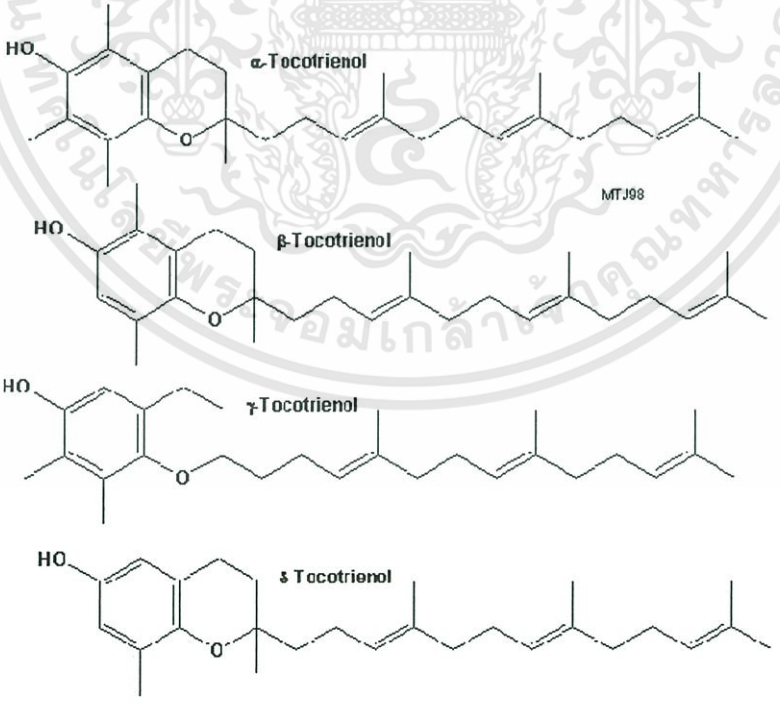
วิตามินอีสูตรทั่วไปคือ $C_{29}H_{50}O_2$ มีชื่อทั่วไปว่า tocopherol มาจากภาษากรีก 2 คำ คือ “tokos” มีความหมายว่า ให้กำเนิดลูก และ “phero” มีความหมายว่า นำพา การทำให้มี และมีการเติม -ol แสดงว่าเป็นพวกแอลกอฮอล์ วิตามินอีเป็นชื่อรวมซึ่งหมายถึงกลุ่มสาร 2 กลุ่มคือ tocopherols และ tocotrienols แต่ละกลุ่มมีไอโซเมอร์ 4 ไอโซเมอร์ คือ α-tocopherol, β-tocopherol, γ- tocopherol, δ- tocopherol และ α-tocotrienol, β-tocotrienol, γ-tocotrienol, δ-tocotrienol ดังแสดงในภาพที่ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ

มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน ไม่ละลายในน้ำ ละลายได้ดีในไขมัน และตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เบนซิน คลอโรฟอร์ม อะซิโตน แอลกอฮอล์ ถูกทำลายได้ง่ายที่สภาวะอุณหภูมิสูงด่าง แสงอัลตราไวโอเลต เมื่อสัมผัสกับน้ำมันหรือไขมันที่เหม็นหืน และสารออกซิไดส์อื่นๆ แต่ทนต่อกรดและสารรีดิวซ์ มีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันการออกซิเดชัน (antioxidant) ของสารอื่น เช่น วิตามินเอ และแคโรทีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ tocopherols



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ tocotrienols

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อร่างกายได้รับวิตามินอีมาพร้อมกับอาหาร วิตามินอีจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายไปพร้อมกับไขมัน และพร้อมกับวิตามินที่ละลายในไขมันชนิดอื่นๆ เช่น วิตามินเอ, วิตามินดี และวิตามินเค ปกติเมื่อร่างกายได้รับวิตามินอีเข้ามาจะเก็บสะสมในไขมันภายในร่างกาย แต่พบว่าในคนที่รับประทานกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) หรือฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) เช่น ยาเม็ดคุมกำเนิด (contraceptive pill) จะมีผลทำให้วิตามินอีที่สะสมไว้ใช้ประโยชน์ในร่างกายนั้นถูกขับ (depletion) ออกจากแหล่งสะสมจนอาจทำให้เกิดภาวะขาดวิตามินอีได้

2.2.1 แหล่งอาหารที่พบวิตามินอี

วิตามินอีพบได้มากในเมล็ดพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนที่กำลังจะเจริญเป็นต้นใหม่ (germ) ซึ่งนิยมนำมาสกัดเป็นน้ำมันต่างๆ เช่น จมูกข้าวสาลี ดอกคำฝอย รำ เมล็ดข้าวโพด เมล็ดฝ้าย ถั่ว-ลิสง ถั่วเหลือง ปาล์ม ดอกทานตะวัน มะกอก มะพร้าว เป็นต้น และยังพบได้ในน้ำนม ไข่ ปลา เนื้อสัตว์ ตับ ผักใบเขียว และผลไม้อีกด้วย ปริมาณวิตามินอีที่ได้รับจากอาหารประจำวันดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ปริมาณวิตามินอีที่ได้รับจากอาหารประจำวัน (มก./100กรัม)

อาหาร		วิตามินอี
ไขมันสัตว์	น้ำมันหมู	0.6-1.3
	เนย	1-5
น้ำมันพืช	รำ	264
	ถั่วเหลือง	194
	จมูกข้าวสาลี	189
	ถั่วลิสง	130
	เมล็ดฝ้าย	90
	ดอกคำฝอย	89
	ปาล์ม	79
	ข้าวโพด	72
	ดอกทานตะวัน	55
น้ำนม	นมมารดาหลังคลอด	1,480
	นมวัว	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร		วิตามินอี
อาหารประจำวัน	เนื้อสัตว์	0.5-1.6
	สัตว์ปีก	1.6-4.0
	ปลา	6-10
	ผลไม้	2.3-7.2
	ผัก	0.5-4.5
	มาการีน	280

หมายเหตุ มก./100กรัม หมายความว่า ในอาหาร 100 กรัม มีปริมาณวิตามินอีอยู่ 1 กรัม

2.2.2 หน้าที่ของวิตามินอี

วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันรักษาสุขภาพ รักษาความคงทนของเนื้อเยื่อและเซลล์ในร่างกาย เนื้อเยื่อของร่างกายประกอบด้วยเซลล์ต่างๆ ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นโครงสร้างหลัก กรดไขมันชนิดนี้จะถูกทำลายได้ง่ายด้วยกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ทำให้เซลล์สูญเสียความคงทน และสลายตัวกลายเป็นกรดไขมันชนิดใหม่ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ในร่างกาย กรดไขมันที่อันตรายต่อร่างกายจะเป็นสารพวกเปอร์ออกไซด์หรือที่เรียกว่า อนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเปอร์ออกซี เป็นต้น อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเนื้อเยื่อ อนุมูลอิสระภายในร่างกาย เช่น ออกซิเจน และอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกายด้วย เช่น มลพิษในอากาศ โอโซน ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว หรือมีธาตุเหล็กมากกว่าปกติ แสงแดด ความร้อน รังสีแกมม่า ยาบางชนิด เช่น ยาเม็ดคุมกำเนิด (contraceptive pill) เป็นต้น

กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระมี 2 วิธี คือ ใช้เอนไซม์ต่างๆ ในร่างกาย เช่น Superoxide dismultase (SOD) และไม่ใช้เอนไซม์ในร่างกาย ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี และเบตาคาโรทีน แต่เนื่องจากเอนไซม์ในร่างกายมีจำกัด จึงต้องกำจัดโดยการทานพวกวิตามินเสริมเข้าไป เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระได้มากขึ้น วิตามินอีจะช่วยปกป้องเซลล์ในร่างกายจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น โดยไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของสารในร่างกาย โดยอาศัยคุณสมบัติของมันเองที่มีความไวต่อการถูกออกซิไดส์ได้ง่าย จึงเป็นตัวที่ถูกออกซิไดส์แทนสารตัวอื่นๆ ในร่างกายที่มีความไวต่อการถูกออกซิไดส์ได้ยากกว่า ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในร่างกาย และถูกขับออกในที่สุด เช่น ทางน้ำดี ลมหายใจ ผิวหนัง ปัสสาวะ และอุจจาระ เป็นต้น ดังนั้นอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

จึงเป็นสารพิษต่อเซลล์ร่างกาย ถ้ามีมากเกินไปในเซลล์โดยไม่มีการควบคุมก็อาจไปทำลายเนื้อเยื่อดีเอ็นเอและอื่นๆ ให้เสื่อมสลายได้ แต่อนุมูลอิสระก็มีประโยชน์อยู่บ้างโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวจะใช้สารพวกนี้กำจัดแบคทีเรีย หลังจากที่เซลล์กินแบคทีเรียเข้าไปในตัวแล้ว และใช้ในการตอบสนองต่อการอักเสบด้วย

2.2.3 ประโยชน์ของวิตามินอี

วิตามินอีสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ มากมาย ดังนี้

1. อาหาร หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

ใช้เป็นสารกันหืนในอาหารในขนาด 0.15-0.2 มก./กก.นน. ตัว/วัน (WHO) และใช้เติมเพื่อเสริมวิตามินในอาหาร

การใช้วิตามินอีที่ได้จากธรรมชาติในรูปของ α-tocopherol หรือที่สังเคราะห์ขึ้นในรูปของ dl-α-tocopherol เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมักจะอาศัยคุณสมบัติที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพเป็นหลักสำคัญ เช่น ใช้ป้องกันการขาดวิตามินในผู้ที่รับกรดไขมันจำเป็นปริมาณสูง ซึ่งทำให้เกิดภาวะ oxidative stress มีการใช้ตัวต้านออกซิเดชันมาก ใช้ป้องกันการเสื่อมสภาพของร่างกาย การเกิดโรคต่างๆ เนื่องจากวิตามินอีมีผลในการป้องกันการทำลายเซลล์ หรือลดความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้ และอื่นๆ อีก ดังนี้

- ชะลอความชรา
- กระตุ้นสมรรถภาพทางเพศ ช่วยทำให้ระบบสืบพันธุ์ปกติ
- เพิ่มประสิทธิภาพนักกีฬา
- เสริมความจำสมอง ลดความเสี่ยงของโรคสมองเสื่อม
- ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือดแข็งตัว แต่ไม่สามารถป้องกันภาวะหัวใจล้มเหลวได้
- การบำบัดโรค Parkinson's disease
- ลดหรือป้องกันการเกิดตะคริวของกล้ามเนื้อ
- ลดปริมาณน้ำตาลและความดันโลหิต รวมทั้งป้องกันตาเป็นต้อในผู้ป่วยเบาหวาน
- การลดกรดไขมันและโคเลสเตอรอลในเลือด
- รักษาโรคของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ
- ลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก ในกลุ่มคนสูบบุหรี่
- ช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน

108554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ลดการอักเสบซึ่งจะทำให้ลดการทำลายระบบภูมิคุ้มกันโรค เช่น ไตอักเสบ หลอดเลือดอักเสบ โรคภูมิคุ้มกันในร่างกายผิดปกติ

- ช่วยทำให้เอนไซม์และโปรตีนต่าง ๆ ในร่างกายทำงานได้ตามปกติ

2. ยา

- ทางเภสัชกรรม ใช้เป็นตัวต้านออกซิเดชันในการเตรียมยาวิตามินเอ, methionine, cystine, cysteine, PUFA

- ใช้ป้องกันโรคโลหิตจาง (hemolytic anemia) ในทารก

- ใช้รักษาหรือป้องกันการขาดวิตามินอีในทารกซึ่งมีการดูดซึมไม่ดี ทำให้เกิดภาวะอุจจาระมีไขมันมาก (steatorrhea)

- ใช้ในทารกที่คลอดก่อนกำหนด เพื่อลดผลเสียที่ไม่พึงประสงค์ของการรักษาโดยการใช้ออกซิเจน ในภาวะที่ปอดเด็กยังไม่พร้อมที่จะทำงาน (bronchopulmonary dysplasia)

- ป้องกันภาวะซีดเนื่องจากเม็ดเลือดแตก

- ป้องกันตาพิการเนื่องจากภาวะ retrolental fibroplasias

อาการข้างเคียงจะพบเมื่อได้รับวิตามินอีที่สูงเกินขนาด ซึ่งมีการทดลองใช้วิตามินอีในขนาดสูงในกรณีต่างๆ เช่น

- ช่วยรักษาโรคโลหิตจางชนิดเม็ดเลือดแดงโตจากการขาดอาหาร ซึ่งรักษาโดยกรดโฟลิก วิตามินบี 12 วิตามินซี หรือเหล็ก แล้วไม่ได้ผล

- ป้องกันและลดอัตราความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจขาดเลือด อย่างไรก็ตามจากการรายงานของโครงการประเมินผลการป้องกันและการรักษาเบื้องต้นของโรคหัวใจ (Heart Outcomes Prevention Evaluation and Primary Prevention Project) ในสหรัฐอเมริกา ผู้ป่วยโรคหัวใจมากกว่า 25,000 คน ยืนยันว่า การให้วิตามินอีอย่างเดียวไม่สามารถป้องกัน หรือชะลอการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดจากภาวะเส้นเลือดแข็งตัว ภาวะเส้นเลือดตีบตัน และภาวะขาดเลือดได้ วิธีที่ดีที่สุดคือการได้รับวิตามินและสารอาหารสำคัญจากพืชผัก ผลไม้ และธัญพืชเป็นประจำ พร้อมกับลดอาหารเนื้อสัตว์ อาหารที่มีไขมัน และแคลอรีสูง

3. เครื่องสำอาง

วิตามินอีเป็นวิตามินที่มีการนำมาใช้มากที่สุดในเครื่องสำอางสำหรับผิว ทั้งในด้านการเป็นสารกันหืนสำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเนื่องจากคุณสมบัติอื่นๆ (ซึ่งบางอย่างยังไม่ยืนยันผล) เช่น ช่วยกระตุ้นการไหลเวียนโลหิต ช่วยสมานแผล ป้องกันการทำลายโดยอนุมูลอิสระ ป้องกันผิวจากการถูกแสงแดด หรือรังสีอัลตราไวโอเลต ชะลอความชราของผิว อาจใช้ร่วมกับวิตามินเอ เพื่อช่วยเสริมคุณสมบัติกันได้ด้วย แม้คุณสมบัติบางอย่างยังไม่แน่ชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว พบว่า α-tocopherol และ α-tocopheryl acetate สามารถดูดซึมผ่านผิวหนังได้ จึงให้ความชุ่มชื้นแก่ภายใน (ต่างจากพวกไขมันซึ่งช่วยเคลือบผิวกันการระเหยของน้ำ) นิยมใช้ในรูปครีมหรือเจลทาผิว

วิตามินอีขนาด 5% ช่วยลดปฏิกิริยา phospholipids peroxidation ดังนั้น จึงป้องกันผิวหยาบกร้านจากแสงแดด โดยใช้ในรูปวิตามินอีอะซิเตต ซึ่งมีความคงตัวสูงกว่าวิตามินอิสระ นอกจากนี้วิตามินอียังใช้ผสมในครีมพวก after-sun preparations โดยเร่งการทำงานของ เอนไซม์ที่ช่วยลดความเกรียมแดดของผิวหนัง และช่วยสมานผิวหนังได้

2.2.4 ความต้องการวิตามินอีของร่างกาย

ความต้องการวิตามินของร่างกาย มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มที่กินเข้าไป กล่าวคือ ถ้ากินกรดไขมันไม่อิ่มตัวเข้าไปมาก ความต้องการวิตามินอีจะมากตามไปด้วย โดยเฉพาะหญิงตั้งครรภ์และให้นมบุตรร่างกายจะต้องการวิตามินอีมากขึ้น รวมถึงสภาวะแวดล้อมและอาหารมีสารพิษ เช่น อนุมูลอิสระ ไนโตรซามีน สารก่อมะเร็ง โอโซน ไนโตรเจนออกไซด์ กัมมันตภาพรังสี เป็นต้น จะทำให้ความต้องการวิตามินอีอาจเพิ่มขึ้น เพื่อป้องกันสารพิษและการเสริมสุขภาพของร่างกาย

ปกติจะไม่พบการขาดวิตามินอี เนื่องจากขาดแหล่งอาหาร แต่มักพบจากการดูดซึมไขมันไม่ดี เช่น การทำงานของตับ ตับอ่อน และลำไส้ผิดปกติ หรือมีโรคทางพันธุกรรม เช่น อาการความผิดปกติของระบบประสาท (เดินเซ) ร่วมกับการขาดวิตามินอีในทารกที่คลอดก่อนกำหนดอาจพบ cystic fibrosis ได้

ปริมาณวิตามินอีที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย (ในหน่วยสากล) สามารถแบ่งได้ดังนี้

	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 1 มิลลิกรัม = 1.49 IU

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำแนะนำการรับประทานวิตามินอี

- การรับประทานวิตามินอีเสริมเพื่อป้องกัน ควรแบ่งรับประทานหลายครั้งต่อวันจะได้ผลดีกว่าการกินเพียงครั้งเดียวต่อวัน และควรรับประทานวิตามินพร้อมกับอาหารที่มีไขมัน ซึ่งจะช่วยการดูดซึมและนำไปใช้ได้ดีขึ้น

- การรับประทานวิตามินอีในขนาดสูงๆ ต้องอยู่ในการดูแลของแพทย์ เพราะอาจทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงได้ ส่วนใหญ่แล้วแพทย์จะใช้วิตามินอีในขนาดสูงๆ เพื่อรักษาอาการผิดปกติของระบบหลอดเลือดและหัวใจ ซึ่งจะมีขั้นตอนและระยะเวลาการเพิ่มในปริมาณต่ำๆ

- ผู้ที่ต้องอยู่ในสภาวะแวดล้อมและอาหารมีสารพิษ รับประทานไขมัน น้ำมัน ดื่มชา กาแฟ และฮอร์โมนเพศหลั่งเอสโตรเจน ควรรับประทานวิตามินอีเป็นประจำ

- การรับประทานวิตามินอีร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซี เบตาคาโรทีน กลูตาไทโอน และซีลิเนียม จะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของวิตามินอีดีมากขึ้น

2.2.5 ผลของการได้รับวิตามินอีมากเกินไป

วิตามินอีละลายในไขมันได้ดี สะสมในร่างกายได้เช่นเดียวกับวิตามินเอและดี แต่มีความปลอดภัยสูงกว่าอาจเนื่องมาจากถูกออกซิไดส์อยู่ตลอดเวลาในร่างกาย ตัวอย่างผลจากการได้รับวิตามินอีมากเกินไป ดังนี้

- การเสริมวิตามินอีขนาดสูงในผู้ที่ขาดวิตามินเค เนื่องจากการกินยาต้านเลือดเป็นลิ่มและยาต้านเกล็ดเลือด อาจทำให้เลือดไหลไม่หยุด

- ผู้ที่ใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจน วิตามินอีขนาดสูงอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดเป็นลิ่มได้

- พบอาการผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องอืด ท้องร่วง ปวดท้อง ปวดหัว ตาพร่า อ่อนเพลีย และเมื่อยล้า

- ควรระวังผู้ป่วยโรคหัวใจและความดันโลหิตสูง เนื่องจากการได้รับวิตามินมากกว่า 200 มก. อาจเพิ่มความดันโลหิต และการขับสาร creatin ในปัสสาวะ

- ในทารกที่คลอดก่อนกำหนดน้ำหนักตัวน้อยกว่า 1.5 กก. การได้รับวิตามินอีอาจทำให้มีอาการแทรกซ้อนเนื่องจากลำไส้ขาดเลือดและตายเป็นหย่อมๆ (necrotizing enterocolitis) ได้

- ไม่ควรให้วิตามินอีทางเส้นเลือด อาจเกิดอาการเป็นพิษ ไต และตับถูกทำลายได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6 ผลของการขาดวิตามินอี

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อขาดวิตามินอีจะมีความผิดปกติเกิดขึ้นมากมายทั้งในระบบสืบพันธุ์ กล้ามเนื้อ ประสาท และระบบเลือด ทำให้เป็นหมัน กล้ามเนื้อฝ่อลีบ เนื้อตับตายบางส่วน และเลือดจางเนื่องจากเม็ดเลือดแตกง่าย ในคนปกติทั่วไปไม่จำเป็นต้องเสริมวิตามินอีเพราะได้รับจากอาหารเพียงพอต่อความต้องการของร่างกายอยู่แล้ว และยังไม่มีหลักฐานว่าคนที่มีสุขภาพปกติ สามารถดูดซึมอาหารได้ดีจะมีภาวะขาดวิตามินอี นอกจากทารกที่คลอดก่อนกำหนด จะมีระดับวิตามินอีในเลือดต่ำ มีอาการซีดและบวมเนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตกมากกว่าปกติ ทั้งนี้เป็นเพราะฟอสโฟลิปิดที่เป็นส่วนประกอบของผนังเม็ดเลือดแดงถูกออกซิไดส์ได้ง่าย หรือผู้ที่เป็นโรคที่ทำให้ไม่สามารถดูดซึมวิตามินอีเข้าสู่ร่างกายได้ เช่น โรคลำไส้ โรคตับ โรคตับอ่อน หรือการผ่าตัดเอากระเพาะอาหารออกบางส่วน

การขาดวิตามินอีเกิดขึ้นได้เนื่องจากได้รับเข้าสู่ร่างกายไม่เพียงพอ หรือมีการดูดซึมจากอาหารได้ไม่ดี สาเหตุหนึ่งอาจมาจากความต้องการวิตามินอีที่สัมพันธ์กับปริมาณอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว และสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษเข้าสู่ร่างกาย ปัจจุบันยังพบว่าผู้ที่ขาดกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นส่วนประกอบ ธาตุทองแดง สังกะสี แมงกานีส และไรโบฟลาวิน นั้นร่างกายมีความต้องการวิตามินอีเพิ่มขึ้น พวกสารสังเคราะห์ที่ละลายได้ในไขมัน เช่น butylated hydroxytoluene (BHT), N,N′-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD) และวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ เช่น วิตามินซี สามารถนำมาทดแทนวิตามินอีในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ด้วย

2.3 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เทคนิคที่ใช้แยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างในด้านสมบัติที่ต่างกันของสารที่ต้องการแยก เช่น สมบัติในการละลาย ขนาดโมเลกุล ประจุบนโมเลกุล หมู่สำคัญทางเคมี หรือความจำเพาะตัวทางชีวภาพของสาร หรือกล่าวคือ เป็นเทคนิคที่มีเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่เป็นของเหลวจะถูกปั๊มผ่านคอลัมน์แยกสาร ที่เป็นท่อบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) เมื่อตัวอย่างซึ่งเป็นองค์ประกอบหลายชนิดละลายอยู่ในรูปของเหลวถูกนำเข้าสู่ระบบปกติโดยการฉีดด้วยปริมาตรจำกัดที่จุดฉีด (Injector) ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ และแพร่กระจายเข้าสู่ระบบการไหล โดยที่เฟสเคลื่อนที่จะชะสารตัวอย่างในขณะที่ไหลผ่านคอลัมน์ทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกันอันเนื่องมาจากความแตกต่างของแรงที่เกิดเนื่องด้วย interaction ขององค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ แต่ละองค์ประกอบจะใช้เวลาตั้งแต่เริ่มฉีดจนกระทั่งออกจากปลายคอลัมน์ซึ่งเป็นเวลาส่วนใหญ่ของการเดินทางเป็นช่วงเวลาที่เป็นสมบัติเฉพาะตัวของแต่ละสาร แต่อย่างไรก็ดีต้องระมัดระวังว่าภายใต้สภาวะ

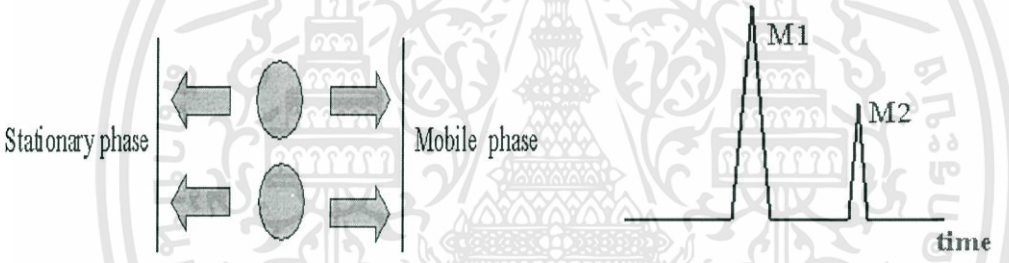
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แวดล้อมของการแยกนั้น สารบางชนิดที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันอาจจะใช้เวลาแยกใกล้เคียงกันจนเกิดการทับซ้อนกันได้ กฎโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการแยก คือ องค์ประกอบใดที่สามารถเกิด interaction หรือสามารถกระจายตัวในชั้นของเฟสอยู่กับที่ได้ดีกว่าก็จะใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่าและในทางตรงกันข้ามสารใดที่มี interaction หรือสามารถกระจายอยู่ในชั้นของเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าก็จะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าหรือใช้เวลาในคอลัมน์น้อย ดังแสดงในภาพที่ 2.6

ส่วนประกอบที่ใช้ในการแยก

1. เฟสไม่เคลื่อนหรือเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) อาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ยึดแน่นบน Supporting media (ตัวค้ำจุน) เช่น น้ำ บัฟเฟอร์ กรดแก่ ด่างแก่ แอลกอฮอล์ ฯลฯ

2. เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นของเหลวผสม ซึ่งจะทำหน้าที่ชะแยกสารออกจากส่วนไม่เคลื่อนที่ หรือจากจุดเริ่มต้นไปตามทิศทางการเคลื่อนที่ของ Mobile phase นั้น



รูปที่ 2.6 การเกิด interaction ระหว่างโมเลกุลสาร M1 และ M2 ของ Mobile phase และStationary phase ใน column

โดยปกติจะใช้เฟสอยู่กับที่ที่มีสภาพขั้วสูงเพื่อแยกสารที่มีสภาพขั้วสูงออกจากกัน และใช้เฟสเคลื่อนที่สภาพขั้วต่ำกว่ามาไล่สารต่างๆออกจากคอลัมน์ โดยสารที่มีสภาพขั้วสูงกว่าจะออกมาทีหลัง เรียกวิธีการนี้ว่า “โครมาโทกราฟีแบบปกติ” หรือ “normal phase chromatography” แต่ในบางกรณีจะใช้เฟสอยู่กับที่ที่มีสภาพขั้วต่ำ ตัวอย่างเช่น สารอินทรีย์ประเภท n-alkyl ซึ่งมีคาร์บอน 8 หรือ 18 เมื่อแยกออกจากคอลัมน์สารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าจะออกมาช้ากว่า ซึ่งเรียกว่า “โครมาโท-กราฟีแบบผันกลับ” หรือ “reversed phase chromatography”

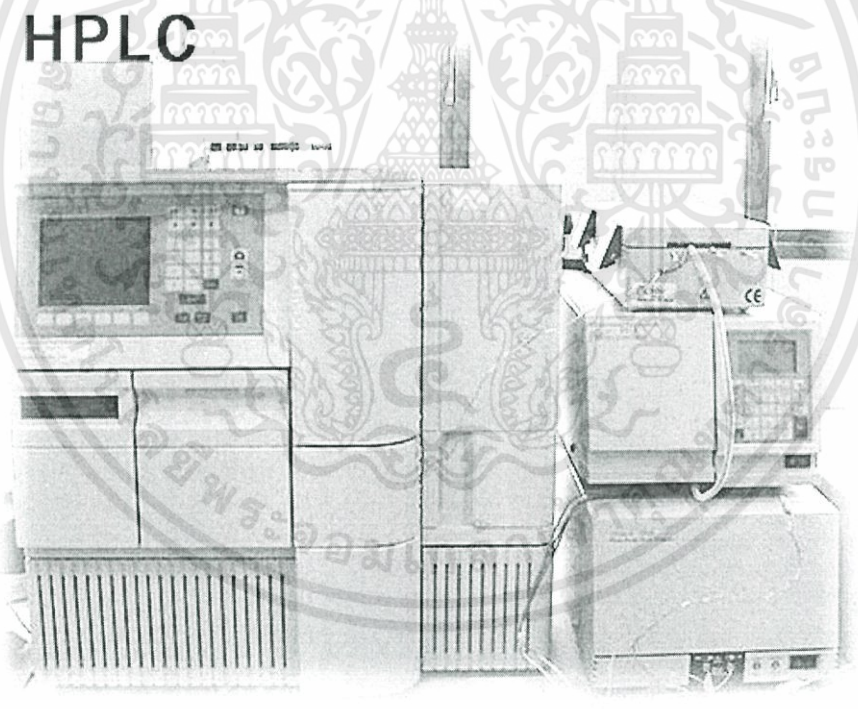
นอกจากนี้ โครมาโทกราฟีทั้งสองชนิดอาจใช้วิธีการเติมสารที่มีประจุตรงข้ามลงในเฟสเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น เติม tetramethyl ammonium chloride, tetrabutyl ammonium chloride ลงในเฟสเคลื่อนที่เมื่อสารตัวอย่างมีประจุบวก หรือเติม perchloric acid, sodium alkyl sulfonate หรือ methanesulfunic acid ลงในเฟสเคลื่อนที่เมื่อสารตัวอย่างมีประจุลบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกสาร เรียกวิธีการนี้ว่า “ion-pair chromatography” สำหรับกลไกที่ทำให้สามารถแยกสารได้เกิดขึ้นจากการที่ไอออนที่มีประจุต่างกันรวมกันกลายเป็นสารที่ไม่มีประจุ หรือประจุลดลงแล้วเคลื่อนตัวเข้าสู่เฟสอยู่กับที่ หรือเฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วต่ำ ทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่ได้ช้าลง

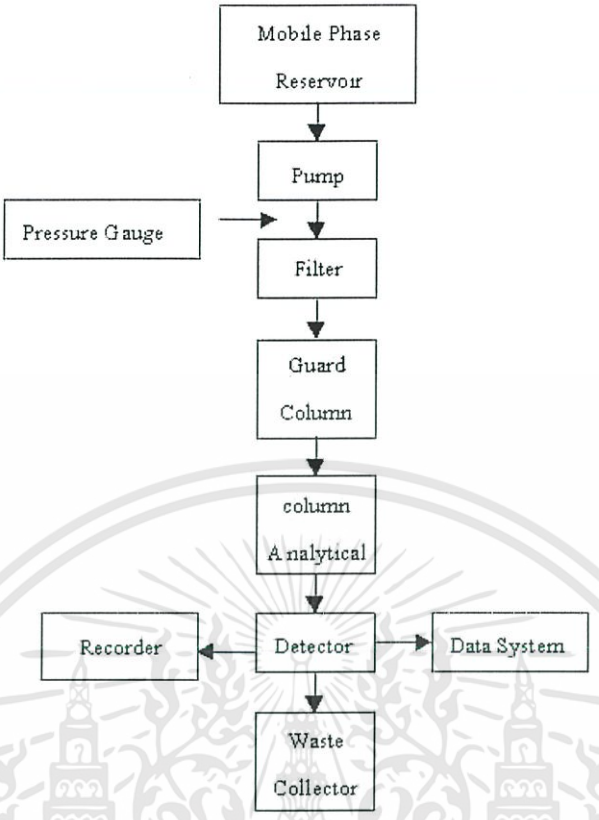
2.3.1 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC

เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูงดังแสดงในภาพที่ 2.7 หรือที่เรียกว่า High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นเครื่องมือที่สามารถแยกสารและวิเคราะห์สารได้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นจำนวนมาก ถึงแม้ว่ารูปร่างของเครื่องมือจะแตกต่างกันไปตามผู้ผลิตแต่มีองค์ประกอบหลักที่สำคัญเหมือนกัน ดังแสดงในภาพที่ 2.8



รูปที่ 2.7 เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC

2.3.1.1 ระบบเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่มีความจำเพาะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยก แต่ควรมีคุณสมบัติพื้นฐานที่เหมือนกันคือ มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากสิ่งเจือปน และไม่ทำปฏิกิริยากับเฟสอยู่กับที่ คอลัมน์ ตัวฉีด ตัวตรวจวัด และสารที่ต้องการแยกจนทำให้สารต้องการแยกเสื่อมสภาพไป นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงความหนืดและความปลอดภัยของสารละลายด้วย การใช้สารละลายไล่สารต่างๆ ออกจากคอลัมน์อาจพบได้ใน 2 ลักษณะ คือ

1. Isocratic elution เป็นการใช้สารละลายเพียง 1 ชนิดไล่สารต่างๆ ออกจากคอลัมน์

2. Gradient elution เป็นการใช้สารละลายมากกว่า 1 ชนิด หรือใช้สารละลายชนิดเดียวแต่มีความเข้มข้นต่างกัน ไล่สารต่างๆ ออกจากคอลัมน์ ซึ่งพบว่ามักมีประสิทธิภาพในการแยกสารต่างๆ ออกจากกันได้ดีกว่า

2.3.1.2 ระบบปั๊ม (pump)

ในระบบ HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ไหลผ่านคอลัมน์ เนื่องจากภายในคอลัมน์มีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ความต้านทานการไหลจึงมีมาก เมื่อใช้อนุภาคขนาดเล็กๆ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอลัมน์ที่มีขนาดเล็กจึงจำเป็นต้องใช้ปั๊มความดันสูงเพื่อให้เฟสเคลื่อนที่ไหลไปได้ ปั๊มที่ใช้ควรมีความดันสูงประมาณ 6000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และมีอัตราการไหลอยู่ในระหว่าง 0.1-10 มิลลิลิตร-ต่อนาที ปั๊มสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

2. Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

หลักการเลือกระบบปั๊มเพื่อใช้กับ HPLC ควรพิจารณาดังต่อไปนี้

1. ส่วนประกอบต่างๆ ของปั๊ม ควรทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนจากตัวทำละลายต่างๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ รวมทั้งท่อ ข้อต่อ และ flow cell ด้วย เช่น ทำด้วยเหล็กไร้สนิมคุณภาพสูง

2. สามารถปั๊มเฟสเคลื่อนที่ปริมาณมากๆ ได้อย่างต่อเนื่อง

3. สามารถให้ความดันได้ถึง 4000-6000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เพื่อปั๊มให้เฟสเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ขนาดเล็กซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้ และต้องให้ความดันได้อย่างน้อย 500 ปอนด์ต่อ-ตารางนิ้ว

4. สามารถให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่อย่างน้อย 3 มิลลิลิตร/นาที และคงที่

5. ความคลาดเคลื่อนในการควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต้องไม่เกิน 1-2 %

6. ต้องไม่มีพัลส์ หรือตัวที่ใช้ลดพัลส์ หรือไม่ทำให้เกิด detector noise

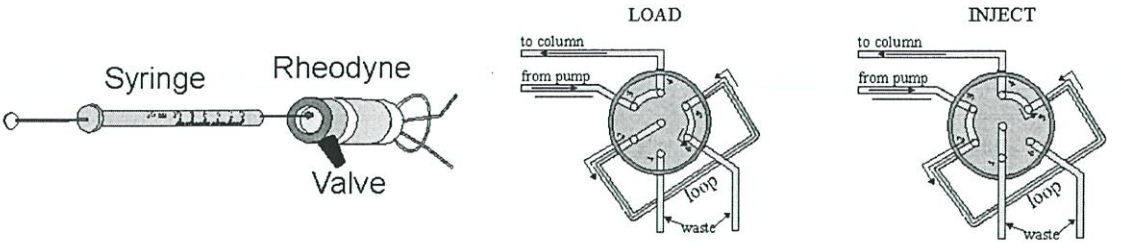
2.3.1.3 ระบบการฉีดสารตัวอย่าง (injector)

เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ควบคุมปริมาตรของสารตัวอย่างที่ไหลเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 0.5-10 ไมโครลิตร สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ชนิดไซริงก์ เป็นชนิดที่ใช้ไซริงก์ขนาดเล็กดูดสารตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการฉีด ผ่านเยื่อกั้น (septum) ซึ่งจะมักเป็นยางซิลิโคนอยู่ด้านบนคอลัมน์ ตัวฉีดชนิดนี้อาจมีการรั่วบริเวณรูที่ฉีดเพราะคอลัมน์มีความดันสูง

2. ชนิดโรตารี่ (rotary type) เป็นชนิดที่ใช้ลิ้นควบคุมการฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์โดยในขั้นตอนแรกจะใช้ไซริงก์ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่าง (sample loop) ซึ่งมีปริมาตรคงที่ (fixed loop injector) หลังจากนั้นจึงหมุนลิ้นให้เฟสเคลื่อนที่ไล่ของเหลวทั้งหมดเข้าสู่คอลัมน์ นอกจากนี้ยังสามารถดูดสารตัวอย่างเข้าไปในปริมาตรที่ต้องการฉีดเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่างที่มีเฟสเคลื่อนที่อยู่ก่อนแล้วบางส่วน เมื่อหมุนลิ้นไปที่ตำแหน่งฉีดเฟสเคลื่อนที่จะพาสารตัวอย่างทั้งหมดเข้าไปในคอลัมน์ ดังแสดงในภาพที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ระบบการฉีดสารตัวอย่างชนิด rotary

ข้อควรระวังในระบบการฉีดสารตัวอย่าง

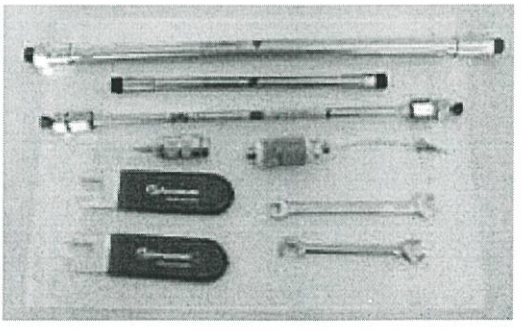
1. ระบบการฉีดสารตัวอย่างมีทั้งแบบที่เป็น manual และแบบ automatic ซึ่งอาจเกิดปัญหาอุดตันได้ โดยหากเป็นแบบ manual จะต้องเลือกใช้เข็มให้ถูกต้อง ซึ่งจะเป็นเข็มที่ไม่มีปลายแหลม ส่วนแบบ automatic นั้นจะมีระบบล้างเข็มและฉีดสารตัวอย่างในตัว จึงต้องเลือกสารละลายสำหรับล้างเข็มให้เหมาะสมกับการใช้งาน หลังใช้งานต้องล้างเข็มด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล ทุกครั้ง

2. ในการฉีดแบบ manual ต้องเลือกใช้ sample loop ให้เหมาะสมกับปริมาณที่ฉีด และควรฉีดสารเต็มปริมาตร loop

3. ตัวอย่างที่จะฉีดต้องผ่านการกรองทุกครั้ง โดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 หรือ 0.45 ไมครอน ซึ่งจะช่วยกำจัดอนุภาคปนเปื้อนและป้องกันการอุดตันเพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์

2.3.1.4 คอลัมน์ (column)

อาจทำจากแก้ว พลาสติก หรือเหล็กกล้าไร้สนิม มีความยาวการใช้งานตั้งแต่ 10-150 เซนติเมตร ดังแสดงในภาพที่ 2.9 กรณีที่มีความยาวมากเกินอาจขดคอลัมน์เป็นวง แต่จะพบว่าประสิทธิภาพในการแยกสารลดลง คอลัมน์มีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่น้อยกว่า 1 มิลลิเมตร จนถึงหลายมิลลิเมตร สามารถทนแรงดันได้สูงถึง 6,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์



รูปที่ 2.10 คอลัมน์ (column)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) สารที่นำมาทำเป็นเฟสอยู่กับที่มักมีขนาดที่คงที่สม่ำเสมอ อยู่ในช่วง 5-10 μm แต่เนื่องจากเฟสอยู่กับที่แต่ละชนิดมีพื้นที่ผิว ขนาดรูและสภาพขั้วที่ต่างกันจึงจำเป็นต้องเลือกให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างแต่ละประเภท เฟสอยู่กับที่ที่นิยมใช้ ได้แก่ silica gel, alumina และcelite (diatomaceous earth) แต่อาจพบเฟสอยู่กับที่อีกชนิดหนึ่งคือ pellicular partical ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดแก้วขนาดประมาณ 40 μm เคลือบด้วย alumina หรือซิลิกาให้มีความหนาประมาณ 1-3 μm หรือเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ได้เร็วแต่มีความจุของเฟสอยู่กับที่ต่ำ

ข้อควรระวังในการใช้คอลัมน์

1. ต้องทราบคุณสมบัติของวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์ และข้อห้ามในการใช้งานต่างๆ เช่น ห้ามใช้กับเฟสเคลื่อนที่ใดบ้าง มีช่วง pH การใช้งานเท่าไหร่ มีการจำกัดความดันใช้งานเท่าใด ซึ่งทราบได้จากคู่มือการใช้งานของคอลัมน์แต่ละชนิด หรือจากบริษัทผู้ผลิต

2. ในการปรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต้องค่อยๆ ลดหรือเพิ่มเพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ โดยทั่วไปจะลดหรือเพิ่มครั้งละ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที

3. เก็บรักษาคอลัมน์ในสภาวะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมาก ไม่ถูกแสงแดดโดยตรง และป้องกันไม่ให้กระทบกระเทือน

4. คอลัมน์แต่ละชนิดจะเก็บในเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมกับคอลัมน์ชนิดนั้น ตัวอย่างเช่น คอลัมน์ชนิด reverse phase เช่น คอลัมน์ ODS หรือ C_{18} มักเก็บในเมทานอลหรืออะซีโตไนไทรล์

5. ในการฉีดสารต้องคำนึงถึงความสามารถในการรองรับสารของคอลัมน์ เพื่อป้องกันการเกิด column overloading

6. ในการใช้คอลัมน์เพื่อการแยกจะต้องใช้ guard column ทุกครั้งเพื่อช่วยป้องกันการอุดตันและช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์

2.3.1.5 ชุดควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์สารส่วนใหญ่สามารถกระทำได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่เครื่อง HPLC บางแบบจะมีชุดควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ให้คงที่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกหรือวิเคราะห์สารต่างๆ

2.3.1.6 ตัวตรวจวัด (detector)

มีหน้าที่วัดปริมาณของสารเพื่อส่งให้เครื่องบันทึกค่าและแสดงกราฟของสารชนิดต่างๆ คุณสมบัติที่สำคัญของตัวตรวจวัดคือ ความไวของเครื่องตรวจวัด

ตัวตรวจวัดมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับประเภทของสารที่ต้องตรวจวัด ตัวอย่างเช่น

- ตัวไวแสง (photo detector) ใช้สำหรับการวัดสารที่มีสีหรือความขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตัววัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) ใช้สำหรับวัดปริมาณสารที่สามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้

- ตัววัดดัชนีหักเห (refractive index detector) ใช้สำหรับวัดสารละลายใสและมีตัวถูกละลายอยู่

- ตัววัดกัมมันตภาพรังสี (radioactivity detector) ใช้สำหรับวัดสารกัมมันตรังสี

ตัวตรวจวัดแต่ละชนิดมีความไวและข้อจำกัดในการใช้งานแตกต่างกัน คุณสมบัติของตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ ได้แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติของตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ

ชนิด	ความไว (g/ml)	ผลของอุณหภูมิ	ผลของอัตราการไหล	หมายเหตุ
UV absorption	5×10^{-5}	น้อย	ไม่มีผล	นิยมใช้วัดในช่วง 254-280 nm
IR absorption	10^{-6}	น้อย	ไม่มีผล	-
Fluorometry	10^{-10}	น้อย	ไม่มีผล	-
Refractive index	5×10^{-7}	-	ไม่มีผล	วัดความแตกต่างดรรชนีหักเหของสารตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่
Conductivity	10^{-8}	±1°C	มีผล	-
Flame ionization	10^{-8}	ไม่มีผล	มีผล	สารตัวอย่างถูกเผาให้เป็นไอออนและถูกจับโดยแอโนดเพลท
Mass Spectrometry	10^{-10}	ไม่มีผล	ไม่มีผล	วิเคราะห์สารได้ถึง 0.2-1.0 ng

ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบันเป็นการวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต เนื่องจากสารส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยหมู่ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวได้ดีเนื่องจากการทดลองในที่นี้ใช้ UV-detector หลักการทำงานของเครื่องตรวจวัดชนิดนี้จะอาศัยการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง เช่น diode array detector ลักษณะพิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างมีความไวสูงต่อสารประกอบอินทรีย์ ในปัจจุบัน ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) Fixed-wavelength UV detector

2) Variable UV detector

3) Photodiode array detector

2.3.1.7 เครื่องบันทึกผล (data system)

ใช้สำหรับแสดงตำแหน่งของสารที่ออกมาจากคอลัมน์เพื่อประโยชน์ในการจำแนกชนิดของสารหรือคำนวณหาปริมาณสาร ซึ่งสามารถคำนวณได้จากความสูงของยอดพีก (peak high) หรือพื้นที่ใต้พีก (peak area) โดยกราฟที่มีลักษณะสมมาตรควรคำนวณค่าจากความสูง แต่ถ้ากราฟเบ้ควรคำนวณจากพื้นที่ใต้พีก

2.3.1.8 ระบบไมโครโพรเซสเซอร์

มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเครื่องมือ เพื่อให้เครื่องมือใช้งานได้สะดวก ลดอันตรายและทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์สูงขึ้น

2.3.2 เทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณ

สารละลายมาตรฐาน ใช้สำหรับเป็นตัวเปรียบเทียบหาปริมาณในสารตัวอย่าง สารละลาย-มาตรฐานอาจใช้งานใน 2 ลักษณะ คือ

1. สารมาตรฐานภายนอก (external standard)

นิยมใช้สารบริสุทธิ์ชนิดเดียวกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์จะทำให้สามารถหาปริมาณของสารตัวอย่างได้จากการอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน หรือใช้วิธีคำนวณเปรียบเทียบหาปริมาณของสารจากความสูงของกราฟ หรือพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งอาจจะอ่านค่าได้คลาดเคลื่อนไปจากความจริง ถ้าสภาพของคอลัมน์ หรือเครื่องมือในขณะทำกราฟมาตรฐานและการวิเคราะห์สารตัวอย่างแตกต่างกันมาก

2. สารมาตรฐานภายใน (internal standard)

เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ใช้เติมลงในสารมาตรฐานภายนอกและสารตัวอย่างในปริมาณที่คงที่ ก่อนทำการวิเคราะห์ ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์ จะปรากฏเป็นกราฟอ้างอิงในตำแหน่งที่คงที่ในเครื่องบันทึกผล ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการตรวจสอบหาความผิดปกติของเครื่องมือ โดยการดูการเปลี่ยนแปลงตำแหน่ง หรือเวลาหน่วง (retention time) ของสารมาตรฐานภายใน นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน Y เป็นสัดส่วนระหว่างความสูงของกราฟของสารมาตรฐานภายนอกและความสูงของกราฟของสารมาตรฐานภายใน ส่วนแกน X เป็นค่าความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของสารมาตรฐาน แล้วจึงนำค่าอัตราส่วนระหว่างความสูงของกราฟของสารตัวอย่างและความสูงของสารมาตรฐานภายในมาอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟดังกล่าว วิธีนี้มีข้อดีตรงที่สามารถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง ถึงแม้ว่าเครื่องมือจะมีความผิดปกติในการวิเคราะห์บ้าง เพราะเป็นการหาค่าที่เทียบสัดส่วนกับสารมาตรฐานภายใน

2.3.3 วิธีใช้

เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูงยี่ห้อต่างๆ มีวิธีการใช้งานคล้ายกัน ตั้งแต่การเตรียมคอลัมน์ การใส่สารตัวอย่าง การไล่สารตัวอย่าง การใส่สารมาตรฐาน การคำนวณและการบันทึกผล ซึ่งผู้ใช้ควรศึกษาคู่มือการใช้งานให้ละเอียดก่อนลงมือใช้งาน

ข้อควรปฏิบัติในการใช้งาน

สิ่งที่ควรระมัดระวังอย่างยิ่งในการเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง คือ การดูแลรักษาคอลัมน์ให้มีอายุการใช้งานนานที่สุด และมีประสิทธิภาพสูงในการแยกสาร การใช้งานที่ผิดหรือขาดการดูแลจะทำให้คอลัมน์ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพงเสียหายแบบถาวร

1. กรองสารตัวอย่างก่อนฉีดเข้าสู่คอลัมน์เพื่อป้องกันคอลัมน์อุดตัน
2. ระวังการเกิดฟองอากาศในเข็มที่ใช้ดูดตัวอย่างและสารมาตรฐาน
3. ล้างเข็มฉีดสารตัวอย่างและสารมาตรฐานทุกครั้งทั้งก่อนและหลังการใช้งาน
4. ใช้เฉพาะสารเคมีเกรด HPLC เท่านั้นสำหรับเป็นเฟสเคลื่อนที่
5. น้ำกลั่นควรมีความบริสุทธิ์สูงโดยการกลั่น 2-3 ครั้ง รวมทั้งภาชนะต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องล้างให้สะอาดจริงๆ
6. สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ควรมีการกรองสิ่งสกปรกออกก่อนใช้งาน
7. สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ควรทำการกำจัดแก๊สออกก่อนใช้งาน โดยใช้อ่างอัลตราโซนิก หรือเครื่องดูดสุญญากาศ
8. ตรวจสอบค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่ให้อยู่ในช่วง pH 2-7 เพื่อป้องกันซิลิกาในคอลัมน์ถูกทำลาย
9. ล้างทำความสะอาดคอลัมน์ทุกๆ ครั้งหลังจากใช้งานเสร็จ
10. ก่อนเก็บคอลัมน์ในระยะยาว ควรล้างทำความสะอาด บรรจุคอลัมน์ด้วยสารละลายที่ผู้ผลิตกำหนด
11. ล้างตัวฉีดทุกครั้งหลังใช้งานเสร็จ
12. ก่อนเลิกใช้งานควรปิดเครื่องมือตามลำดับก่อนหลังดังนี้ ปิดตัวบันทึก ปิดตัวตรวจวัด ปิดตัวฉีด ปิดปั๊ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. ในกรณีที่เปลี่ยนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของคอลัมน์ ต้องปรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อให้ความเร็วของเฟสเคลื่อนที่และเวลาหน่วงมีค่าเดิม

2.3.4 ปัญหาและสาเหตุ

ปัญหาที่พบได้บ่อยในเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง มักจะแสดงออกมาในรูปแบบของการแยกสารที่ต้องการไม่ได้ หรือแยกไม่ดี มักเกิดจากสาเหตุต่างๆ ดังตารางที่ 2.6 และในบางครั้งเกิดจากสาเหตุร่วมกันหลายๆ สาเหตุ ซึ่งต้องพยายามตรวจสอบและแก้ไขทีละสาเหตุจนกว่าเครื่องมือจะกลับสู่สภาพปกติ

ตารางที่ 2.6 แสดงปัญหาและสาเหตุที่พบได้บ่อยในเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง

ปัญหา	สาเหตุ
พีกกว้าง	- ใส่สารตัวอย่างมากเกิน ควรแก้ไขโดยเจือจางสารตัวอย่าง - ฉีดสารตัวอย่างมากเกินไป ควรลดปริมาณสารตัวอย่างลง - ประสิทธิภาพของคอลัมน์ไม่ดี - มีเวลาหน่วง(retention time)นานเกิน - เฟสเคลื่อนที่หนืดเกินไป
พีกมีหาง(tailing)	- ซิลิกาในคอลัมน์ถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C ควรลดอุณหภูมิของคอลัมน์ลง - ซิลิกาในคอลัมน์ถูกทำลายเมื่อพีเอชสูงเกิน ควรลดพีเอชของคอลัมน์ลง
สารตัวอย่างออกมาจากคอลัมน์น้อย (poor recovery)	- เฟสนิ่งหรือส่วนอุปกรณ์ดูดซับสารตัวอย่างไว้มาก
Spike peak	- มีฟองอากาศในเฟสเคลื่อนที่ - มีฟองอากาศในคอลัมน์ควรปิดฝาคอลัมน์ทุกครั้งที่เก็บ
Ghost peak	- มีสารอื่นเจือปนลงไปในคอลัมน์
รั่วบริเวณตัวสูบ ตัวฉีด หรือตัวตรวจวัด	- เปลี่ยนแหวนยางบริเวณข้อต่อและขันให้แน่น
ความไวลดลง (poor sensitivity)	- ใส่สารตัวอย่างน้อย - สายฉีดสารตัวอย่างอุดตัน - เฟสอยู่กับที่หรือส่วนอุปกรณ์อื่นๆ ดูดซับสารตัวอย่างไว้มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าretention time น้อยเกินไป	- อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เร็วเกิน - อุณหภูมิของคอลัมน์ไม่คงที่ - ใส่สารตัวอย่างมากเกินไป
ค่า retention time มากเกินไป	- อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ช้าเกิน - สารตัวอย่างจับกับเฟสอยู่กับที่แน่นมาก
Base line ไม่คงที่	- มีฟองอากาศในตัวตรวจวัด - เครื่องสูบมีอัตราการสูบของเหลวไม่คงที่
ความดันของคอลัมน์สูงเกินไป	- คอลัมน์อุดตัน - จุลินทรีย์เติบโตในคอลัมน์ - เฟสเคลื่อนที่ตกตะกอน
ความดันของคอลัมน์ต่ำเกินไป	- ใช้เฟสเคลื่อนที่ไม่ถูกต้อง - อัตราการไหลออกของเฟสเคลื่อนที่ เคลื่อนที่เร็วเกินไป

2.3.5 เทคนิคการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สารละลายมาตรฐาน ใช้สำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณในสารตัวอย่าง ลักษณะสารละลายมาตรฐานอาจใช้งานได้ 2 ลักษณะ คือ

2.3.5.1 สารมาตรฐานภายนอก (external standard)

นิยมใช้สารบริสุทธิ์ชนิดเดียวกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์จะทำให้สามรถหาปริมาณของสารตัวอย่างได้จากการอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน หรือใช้วิธีคำนวณเปรียบเทียบหาปริมาณสารจากความสูงของกราฟ หรือพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งอาจจะอ่านค่าได้คลาดเคลื่อนไปจากความจริง ถ้าสภาพของคอลัมน์ หรือเครื่องมือในขณะทำกราฟมาตรฐานและการวิเคราะห์สารตัวอย่างแตกต่างกันมาก

2.3.5.2 สารมาตรฐานภายใน (internal standard)

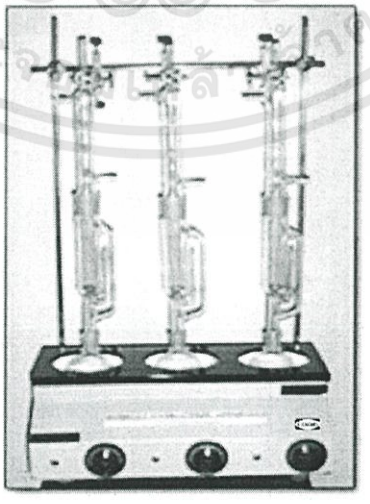
เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ใช้เติมลงในสารมาตรฐานภายนอกและสารตัวอย่างในปริมาณที่คงที่ ก่อนทำการวิเคราะห์ ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์จะปรากฏเป็นกราฟอ้างอิงในตำแหน่งที่คงที่ในเครื่องบันทึกผล ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการตรวจสอบหาความผิดปกติของเครื่องมือ โดยดูการเปลี่ยนแปลงตำแหน่ง หรือเวลาหน่วง (retention time) ของสารมาตรฐานภายใน นอกจากนี้ยังสามรถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน Y เป็นสัดส่วนระหว่างความสูงของกราฟสารมาตรฐานภายนอกและความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงของกราฟสารมาตรฐานภายใน ส่วนแกน X เป็นค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แล้วจึงนำค่าอัตราส่วนระหว่างความสูงของกราฟของสารตัวอย่างและความสูงของสารมาตรฐานภายในมาอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟดังกล่าว วิธีนี้มีข้อดีตรงที่ สามารถคำนวณหาปริมาตรของสารตัวอย่างได้อย่างถูกต้องเพราะเป็นการหาค่าที่เทียบสัดส่วนกับสารมาตรฐานภายใน แม้ว่าเครื่องมือจะมีความผิดปกติในการวิเคราะห์บ้าง

2.4 ระบบซอกห์เลต

ระบบซอกห์เลต เป็นระบบที่ใช้การสกัดสารพวกไขมันออกจากของผสมหรืออาหารอย่างต่อเนื่องด้วยตัวทำละลายที่ละเหยง่าย เช่น เฮกเซน (Hexane) หรือปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) หลักการ คือให้ความร้อนแก่ตัวทำลละลายเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไปและควบแน่นตกลงมาในซอกเลตทิวซึ่งมีของผสมหรือสารที่ต้องการบรรจุอยู่ในหลอดรูพรุน (Thimble) วางอยู่ทำให้ตัวทำละลายสามารถละลายสารที่ต้องการ (ไขมัน) ออกมาจากของผสม และเมื่อตัวทำละลายมีปริมาณมากถึงระดับหนึ่ง ทั้งตัวทำละลายและสารที่ถูกสกัดออกมา (ละลายอยู่ในตัวทำละลาย) ในซอกห์เลตทิวจะถูกไซฟอน (Syphon) ลงมาสู่ขวดก้นกลมด้านล่าง ซึ่งเมื่อสารละลายได้ความร้อนอีก ตัวทำละลายจะระเหยขึ้นไป และควบแน่นกลับลงมาเป็นตัวทำละลายบริสุทธิ์ ทำให้มีความสามารถในการสกัดเหมือนตัวทำละลายใหม่ทุกประการ ซึ่งจะละลายสารที่ต้องการสกัดที่ยังคงค้างเหลืออยู่ในของผสมและไซฟอนกลับลงมาอีก การสกัดวนเวียนอยู่เช่นนี้เรื่อยไปจนกว่าการสกัดสมบูรณ์(ไขมันหรือสารที่ต้องการถูกสกัดออกจากของผสมจนหมด) ไขมันหรือสารที่สกัดได้จะละลายอยู่ในขวดด้านล่าง และเมื่อนำขวดไประเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้ไขมัน และหาน้ำหนักได้โดยการชั่ง



รูปที่ 2.11 ระบบซอกห์เลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบซอกห์เลตนี้ถือเป็นระบบพื้นฐานที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการสกัดสารพวกไขมัน ทั้งนี้เนื่องจากสะดวก ประหยัดตัวทำละลายที่ใช้และมีประสิทธิภาพ สารที่สกัดได้จากการทดลองนี้ถูกเรียกว่าไขมันหยาบ (Crude fat) ซึ่งประกอบไปด้วยไทรกลีเซอไรด์ ฟอสโฟลิปิด สเทียรอล กรดไขมันอิสระ รงควัตถุ และสารอื่นๆ ที่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater [12] วิเคราะห์โดยวิธีตรงที่รวดเร็ว (วิธีที่ 1 การสกัดด้วยเฮกเซน) สำหรับตรวจวัดแกมม่า-โทโคฟีรอลและอัลฟา-โทโคฟีรอลในน้ำนมมนุษย์ได้รับการพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยใช้ RP-HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ตัวอย่างน้ำนมมนุษย์จะถูกละลายด้วยเฮกเซนร่วมกับอัลฟา-โทโคฟีรอลอะซิเตตเป็น internal standard ระบบโครมาโทกราฟีประกอบด้วยคอลัมน์ขนาดสั้น (50 มิลลิเมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.1 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร) สามารถแยกแกมม่า-โทโคฟีรอล และอัลฟา-โทโคฟีรอลในเวลาต่ำกว่า 6 นาที การวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ 1 นำมาเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ วิธีที่ 2 (ปฏิกิริยาสะปอนนิ ฟิเคชั่นร่วมกับการตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิล) มีค่าการวิเคราะห์คืนกลับของแกมม่า-โทโคฟีรอล และอัลฟา-โทโคฟีรอล ลดลง 24% และ 22% ตามลำดับ วิธีที่ 3 (ปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชั่นร่วมกับตัวตรวจวัดปริมาณสารโดยวัดการกระเจิงแสงของสาร) มีค่าการวิเคราะห์คืนกลับของอัลฟา-โทโคฟีรอลใกล้เคียงกับวิธีที่ 2 ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในวิธีที่ 3 สูงกว่าปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในวิธีที่ 2 นอกจากนี้วิธีที่ 1 ใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อยกว่าจึงวิเคราะห์ได้ง่ายและรวดเร็วกว่าวิธีที่ 2 และ 3 ดังนั้น การใช้ตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ทางชีววิทยา

I.G. Zigoneanu, L. Williams, Z. Xu, C.M. Sabliov [13] การวิเคราะห์สารประกอบโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอลในน้ำมันรำข้าวที่ใช้ไมโครเวฟช่วยสกัด โดยใช้ไอโซโพรพานอลและเฮกเซนเป็นตัวสกัดใช้อัตราส่วนตัวทำละลายต่อรำข้าวเป็น 3 : 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก การทดลองทำ 3 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 40, 60, 80, 100, 120 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้เวลาสกัด 15 นาทีต่อตัวอย่าง องค์ประกอบของสารถูกแยกด้วยเทคนิค normal phase HPLC และตรวจวัดด้วย fluorescence การเพิ่มขึ้นของวิตามินอีที่อุณหภูมิ 40 ถึง 120 องศาเซลเซียส ในการใช้ไอโซโพรพานอลเป็น 39.63 % และเฮกเซนเป็น 342.01 % ซึ่งไอโซโพรพานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับการสกัด γ-tocopherol และ γ-tocotrienol เมื่อเปรียบเทียบกับเฮกเซนที่ใช้วิธีไมโครเวฟช่วยสกัดและวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายไอโซโพรพานอลดีกว่าในเรื่องของการได้ oil yield ที่อุณหภูมิสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anna Giliszczynska – Swiglo, Ewa Sikorska [14] ได้ใช้เทคนิค reverse – phase HPLC หาปริมาณ tocopherols (α-, (β +γ), δ-) ในน้ำมันพืชที่ทานได้ mobile phase ที่ใช้คือ เมทานอลต่ออะซีโทไนไทรล์ ในอันตราส่วน 1 : 1 ใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่นที่สภาวะถูกกระตุ้น 295 นาโนเมตร และที่สภาวะการคายแสงที่ 325 นาโนเมตร โดยวิธีนี้มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (R.S.D.) ไม่น้อยกว่า 2.24 เปอร์เซ็นต์, ขีดความไวต่ำสุดในการตรวจวัด (DL) ของ δ-tocopherol และ γ-tocopherol คือ 8 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ 28 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ α- tocopherols

Dagmar Pollok, Hans – Ulrich Melchert [15] ได้พัฒนาเทคนิค HPLC โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์แบบ on – line post column derivatization ในการวิเคราะห์ (α-, (β +γ), δ-) tocopherolquinone (TQ) โดยใช้คอลัมน์ RP – C_{18} ขนาด 250 มิลลิลิตร x 4.6 มิลลิเมตร มี LOD 250 pq เทคนิคนี้นำไปวิเคราะห์ α- TQ ในสารตัวอย่างเซรุ่มในมนุษย์มีค่า recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ spike เท่ากับ 99 ± 5% ในขณะที่ได้ค่า recovery ของ β-, γ- และ δ-TQ เท่ากับ 28±4 %, 63±8 % และน้อยกว่า 20 % โดยการตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนต์ใช้ความยาวคลื่นที่สภาวะกระตุ้น 294 นาโนเมตร, ความยาวคลื่นที่สภาวะคายแสงที่ 331 นาโนเมตร และในการตรวจด้วยวัดยูวี - วิสิเบิล ใช้ความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างและสารเคมี

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 องศาเซลเซียส ในที่ทึบแสง
2. ข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จำนวน 3 พันธุ์ คือ ชัยนาท 1, ดอกมะลิ105 และ กข 23
3. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol, $CH_3CH_2OHCH_3$) เกรด HPLC
4. เฮกเซน (Hexane, $CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$) เกรด AR
5. อะซิโทไนไทรล์ (acetonitrile, CH_3CN) เกรด HPLC
6. เมทานอล (Methanol, CH_3OH) เกรด HPLC
7. โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) เกรด AR

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC ของบริษัท Waters
2. UV detector ของเครื่อง HPLC รุ่น Waters 486 ของบริษัท Waters
3. ปั๊มของระบบลิควิดโครมาโทกราฟี (รุ่น Waters 515) ของบริษัท Waters
4. คอลัมน์ HiQ Sil C_{18}HS ขนาด 4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร ของบริษัท KYA TECH Corporation
5. คอลัมน์ C_{18} 5.0 ไมโครเมตร 4.6 x 150 มิลลิเมตร ของบริษัท KYA TECH Corporation
6. Guard column Nova-Pack C_{18} ของบริษัท Millipore
7. กระดาษกรองเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore
8. ชุดกรองแบบลดความดัน
9. เครื่องไล่ฟองอากาศ (ultrasonic bath)
10. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analysis balance) Precisa 205A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. เครื่องแก้วที่จำเป็น

12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

13. ชุดเครื่องสกัดแบบ Soxhlet รวมทั้งชุดควบแน่น (Allihn condenser) และขวดก้นกลม ขนาด 250 mL

14. หลอดรูพรุนที่ทำด้วยเซลลูโลส (Fat-free extraction thimble)

15. Heating mantle

16. เตาอบ

17. เดซิกเคเตอร์

18. เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator)

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องงอก

การเตรียมข้าวกล้องงอกทำได้ดังนี้ สภาวะในการงอกดัดแปลงตามวิธีของ [16] โดยนำข้าวกล้องล้างแช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 0.1 % เวลา 15 นาที แช่ในน้ำอัตราส่วนข้าว : น้ำ เป็น 1 : 4 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นำมาทำให้งอกที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer (จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.) และนำข้าวกล้องไปบดให้เป็นผง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.2 การสกัดวิตามินอีจากข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก

- นำขวดก้นกลมที่แห้งสนิท (โดยนำขวดไปอบ) มาชั่งน้ำหนักขณะที่เย็น หาค่าน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นวางขวดก้นกลมใน heating mantle ต่อด้วยซอกห์เลตทิว (Soxhlet tube)

- ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกบดละเอียดประมาณ 10 กรัม ใส่ลงในหลอดรูพรุน (Thimble) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน อุดปากหลอดด้วยสำลีแล้วใส่ลงในซอกห์เลต-ทิว จากนั้นต่อด้วย allihn condenser ตรวจเช็ครอยต่อให้แนบสนิท เปิดน้ำเข้า allihn condenser แล้วเติมตัวทำละลายเฮกเซนผ่าน allihn condenser จนกระทั่งตัวทำละลายเฮกเซนถูกไซฟอน (Syphon) ลงมาสู่ขวดก้นกลม 1 ครั้ง

- เติมตัวทำละลายเฮกเซนผ่าน allihn condenser ลงไปอีกจนมีปริมาตรของตัวทำละลายประมาณ 1 ใน 4 ของ soxhlet tube (หรือปริมาตรของตัวทำละลายในขวดต้องไม่เกิน 2 ใน 3 ของปริมาตรขวด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ปรับความร้อนเพื่อทำให้อัตราการเดือดของตัวทำละลายเฮกเซนพอเหมาะและสม่ำเสมอ แล้วทำการสกัดจนไขมันถูกสกัดลงมาในขวดก้นกลมจนหมด (ต้องระวังอย่าให้ขวดก้นกลมแห้ง แต่ถ้าขวดก้นกลมแห้งอาจเติมตัวทำละลายลงไปอีกตามสมควร)

- เมื่อครบเวลา 6 ชั่วโมง ปล่อยให้ตัวทำละลายถูกไซฟอนออกจากซอกห์เลตทิวเป็นครั้งสุดท้ายเอาหลอดรูพรุนออกจากซอกห์เลตทิว แล้วติดตั้งเครื่องมือตามเดิมและทำการ reflux เหมือนเดิมจนตัวทำละลายถูกไซฟอนลงมาอีก 1 ครั้ง

- ถอดคอนเดนเซอร์ และซอกห์เลตทิวออกแล้วนำขวดก้นกลมไปหล่อเย็น ก่อนนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) เมื่อเย็นแล้วนำไปใส่เครื่องระเหยแบบหมุนที่ตั้งอุณหภูมิใน water bath 40-50 °C ทำการระเหยตัวทำละลายเฮกเซนออกมาจนกระทั่งตัวทำละลายในขวดก้นกลมแห้ง (ตัวทำละลายเฮกเซนที่ควบแน่นออกมาสามารถนำกลับไปใช้ใหม่ได้)

- นำหลอดรูพรุนที่มีกากของตัวอย่างข้าวกล้องอยู่ไปอบที่ 80 °C จนตัวทำละลายเฮกเซนระเหยออกหมด แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

- นำน้ำมันที่สกัดได้จากข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกมาละลายในสารละลายไอโซโพรพานอล ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถละลายน้ำมันที่สกัดได้จนหมด ใส่ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสงและเก็บในที่เย็น

3.3.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

3.3.3.1 การเตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 50 ppm

ชั่งวิตามินอีบริสุทธิ์มา 0.005 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรละลายในสารละลายไอโซโพรพานอลและปรับปริมาตรด้วยสารละลายไอโซโพรพานอล เก็บในภาชนะทึบแสงไว้ในตู้เย็น

3.3.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 0.5, 1, 2.5, 5, 10 ppm

ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 50 ppm มา 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5 มิลลิลิตร ตามลำดับใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายในสารละลายไอโซโพรพานอล และปรับปริมาตรด้วยสารละลายไอโซโพรพานอล เก็บในภาชนะทึบแสงไว้ในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอี ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์

เตรียมสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ที่อัตราส่วน 60 : 40 และ 50 : 50 และ 40 : 60 ปริมาตรโดยปริมาตร เพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ แล้วนำสารละลายเมทานอล และอะซีโทไนไทรล์ที่เตรียมได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นนำไปไล่อากาศที่ละลายอยู่ด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนที่อาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ จึงจะนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีโดยใช้ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

3.3.4.1 ศึกษาหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

ทดสอบหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ อัตราส่วน 60 : 40 และ 50 : 50 และ 40 : 60 ปริมาตรโดยปริมาตร ด้วยคอลัมน์ C-18 5.0 ไมโครเมตร 4.6 x 150 มิลลิเมตร โดยใช้ flow rate 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

3.3.4.2 ศึกษาหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

นำสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ ที่ได้จากการทดสอบขั้นต้นข้อ 3.3.4.1 มาทดสอบหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยทดสอบอัตราการไหลที่ 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร จากนั้นเลือกสภาวะที่ให้การแยกที่ดีที่สุดมาใช้ในการวิเคราะห์วิตามินอี

3.3.5 การทำกราฟมาตรฐาน

ฉีดสารละลายมาตรฐานวิตามินอีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ คือ 0.5, 1, 2.5, 5, 10 ppm ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าสู่ระบบ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ ทำการตรวจวัดที่สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.3.4 ซึ่งตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของวิตามินอี ดูช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟ หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ และขีดจำกัดการตรวจวัดของวิตามินอีจากกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี ในตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก

ตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกนำมาศึกษา 3 พันธุ์ คือ ชัยนาท 1, ดอกมะลิ105 และ กข 23 ใช้วิธีการสกัด การเตรียมเป็นสารละลาย และการวิเคราะห์เช่นเดียวกันในทุกพันธุ์ตามข้อ 3.3.2

3.3.6.1 การวิเคราะห์โดยเทคนิค External Standard

นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 มาตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ที่สภาวะเหมาะสมจากการศึกษาข้อ 3.3.4 ใช้ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร วิเคราะห์ผลที่ได้และเทียบหาปริมาณวิตามินอีของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่ได้จากข้อ 3.3.5

3.3.6.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิค standard addition

3.3.6.2.1 การเตรียมสารละลาย standard addition 0 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างข้อ 3.3.2 มา 1 มิลลิลิตร และสารละลายไอโซโพรพานอล 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชาและเก็บในที่ทึบแสงไว้ในตู้เย็น

3.3.6.2.2 การเตรียมสารละลาย standard addition 0.5 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างข้อ 3.3.2 มา 1 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชา เก็บในที่ทึบแสงไว้ในตู้เย็น

3.3.6.2.3 การเตรียมสารละลาย standard addition 2.5 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างข้อ 3.3.2 มา 1 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชา เก็บในที่ทึบแสงไว้ในตู้เย็น

3.3.6.2.4 การเตรียมสารละลาย standard addition 5 ppm

ปิเปตสารละลายตัวอย่างข้อ 3.3.2 มา 1 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชา เก็บในที่ทึบแสงไว้ในตู้เย็น

การเตรียมสารละลาย standard addition เพื่อศึกษา standard addition ของข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกแต่ละพันธุ์นั้นทำเช่นเดียวกัน

วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ตามสภาวะที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.3.4 ฉีดวิเคราะห์ด้วยปริมาตร 20 ไมโครลิตรและตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร วิเคราะห์ผลที่ได้โดยวัดพื้นที่พีคและเขียนกราฟระหว่างพื้นที่พีคที่ได้กับปริมาณสารมาตรฐานที่เติมในปริมาณต่างๆ เพื่อหาปริมาณของวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6.3 การทดสอบยืนยันตำแหน่งที่พีคเกิดขึ้น (การทำ spiking) และการหาเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (% recovery)

เตรียมสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์สองชุดการทดลอง โดยปิเปตสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตรในแต่ละชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองแรกเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอีความเข้มข้นเป็นหนึ่งเท่าของความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง และชุดการทดลองที่สองเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายผสมไอโซโพรพานอลและเฮกเซน

ฉีดและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ตัวอย่างละ 60 นาที ตามสภาวะที่ได้จากการทดสอบข้อ 3.3.4 วิเคราะห์ผลที่ได้หาปริมาณวิตามินอี แล้วหาค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (% recovery)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอี ด้วยเทคนิค HPLC

4.1.1 ศึกษาหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

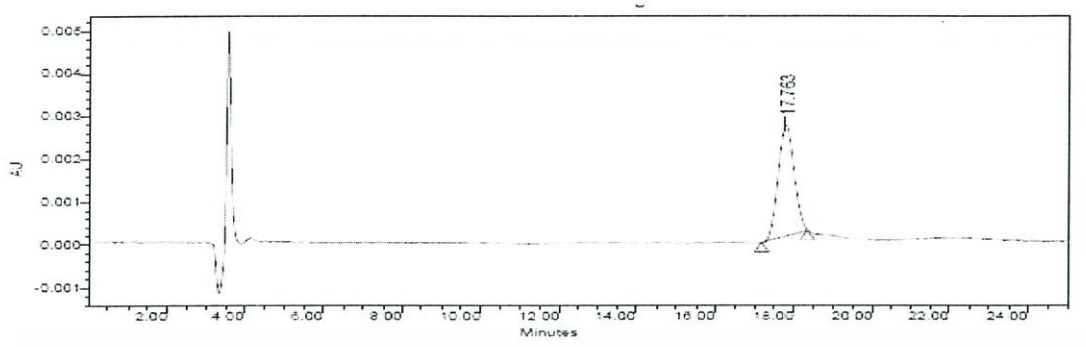
ศึกษาหาอัตราการไหลที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอี โดยใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ สารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้สารละลายมาตรฐานวิตามินอี เมื่อใช้อัตราการไหลที่ 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์วิตามินอี คือ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมเนื่องจากมีเวลารีเทนชันเร็วกว่าอัตราการไหลที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที และมีการซ้อนทับของพีคน้อยกว่าอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เวลารีเทนชันในการแยกสารละลายมาตรฐานวิตามินอีสรุปได้ดังตารางที่ 4.1 (ภาคผนวก ก)

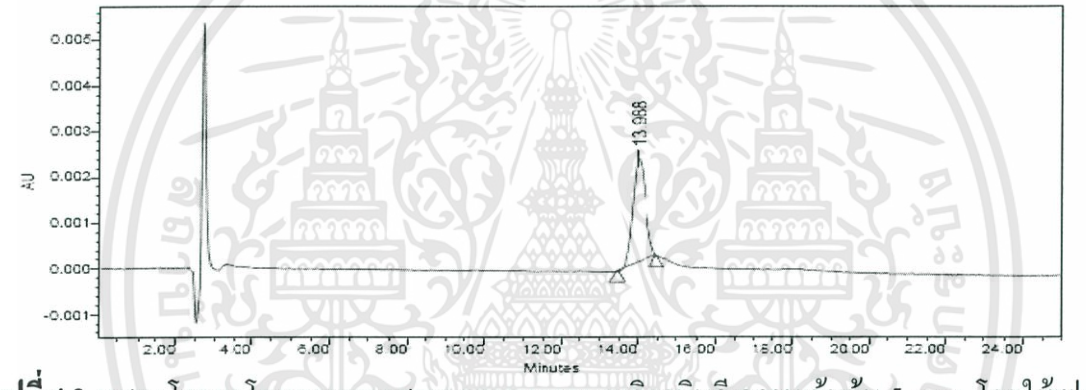
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเวลารีเทนชัน (retention time) ในการแยกสารละลายมาตรฐานวิตามินอีที่อัตราส่วนต่างๆ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตรปริมาตร ในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

อัตราส่วนของเมทานอล : แอซิโทไนไทรล์ (ปริมาตรโดยปริมาตร)	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	เวลารีเทนชัน (นาที)
50:50	0.6	17.763
50:50	0.8	13.988
50:50	1.0	11.223

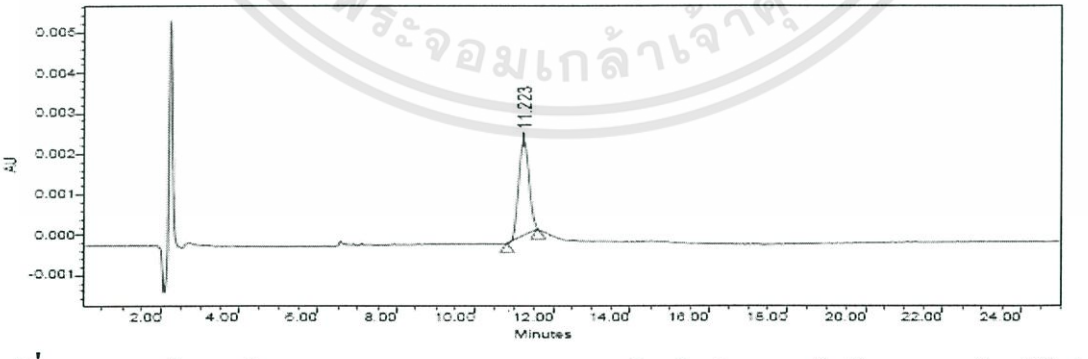
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ความเข้มข้น 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลาย เมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



รูปที่ 4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ความเข้มข้น 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



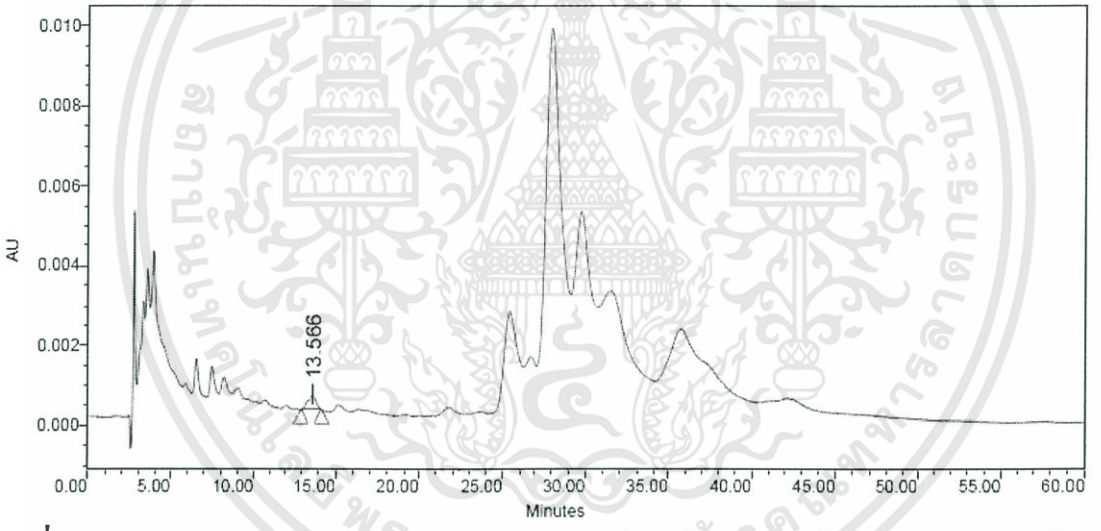
รูปที่ 4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ความเข้มข้น 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลาย เมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ศึกษาหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

ใช้สารละลายตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ HiQ sil C_{18}HS ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน โดยศึกษาจากอัตราการไหลคงที่ที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร และอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษาคือ เมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 60 : 40 และ 50 : 50 และ 40 : 60 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแยกสารละลายตัวอย่างคือ อัตราส่วนเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร จากในรูปที่ 4.4 ให้ผลการแยกที่เวลารีเทนชันที่ 13.566 นาที โดยอัตราส่วน 60 : 40 เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วทำให้การแยกสารตัวอย่างไม่ดี และอัตราส่วน 40 : 60 พบว่าจะให้ผลการวิเคราะห์ช้ากว่าที่ควรจะเป็น ทำให้เกิดการแยกที่ไม่สมบูรณ์ ลักษณะดังกล่าวเกิดจากการเคลื่อนที่ยังไม่เหมาะสมเพียงพอ (ภาคผนวก ก)



รูปที่ 4.4 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเฟสเคลื่อนที่สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุดคือ สารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร ซึ่งสามารถแยกสารประกอบวิตามินอีจากสารตัวอย่างได้เนื่องจากมีความแรงของตัวทำละลายสำหรับการชะที่เหมาะสม อัตราส่วนในการแยกสารละลายวิตามินอีสรุปได้ดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราส่วนในการแยกสารละลายมาตรฐานวิตามินอีที่อัตราส่วนต่างๆ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

อัตราส่วนของเมทานอล : แอซิโทไนไทรล์ (ปริมาตรโดยปริมาตร)	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	เวลารีเทนชัน (นาที)
60:40	0.8	13.210
50:50	0.8	13.566
40:60	0.8	14.212

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี

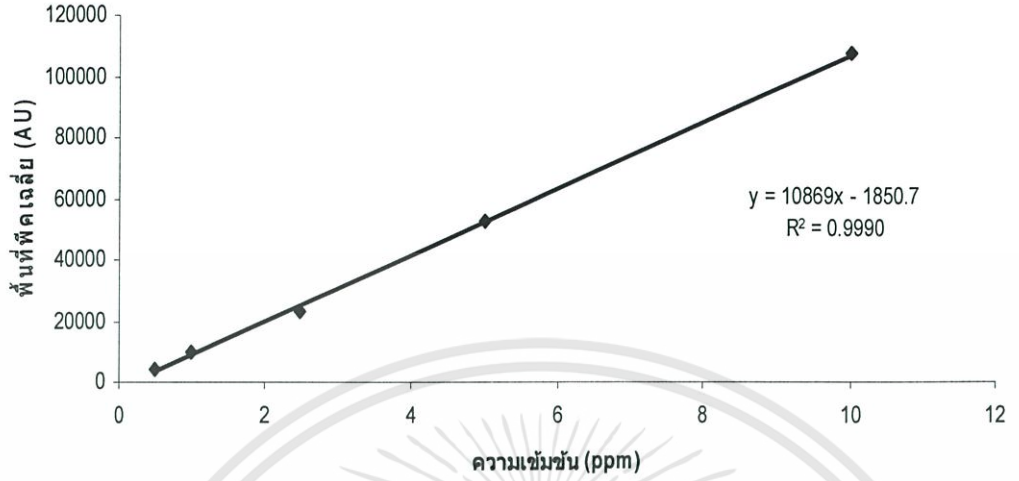
นำสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี โดยทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm ในเฟสเคลื่อนที่สารละลายเมทานอล : แอซิโทไนไทรล์ 50:50 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

การศึกษาทำการเตรียมชุดการทดลองของสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm จำนวนสองชุดการทดลอง (เนื่องจากหากเก็บสารไว้เป็นเวลานานจะทำให้เวลารีเทนชันเปลี่ยนไป จะส่งผลต่อการวิเคราะห์) โดยชุดการทดลองที่หนึ่งใช้สำหรับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ชุดการทดลองที่สองใช้สำหรับข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105 และพันธุ์กข 23 นำไปวิเคราะห์ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 4.3

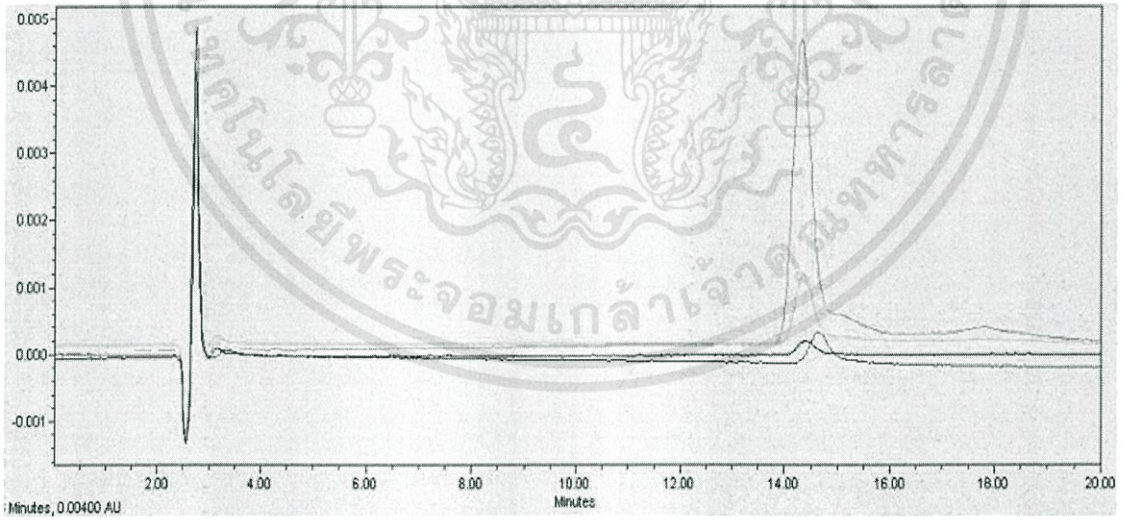
ตารางที่ 4.3 แสดงผลจากการสร้างกราฟมาตรฐานที่ชุดการทดลองต่างๆ ค่าพิสัยเชิงเส้น และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลาย เมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

ชุดการทดลอง	พันธ์ข้าว	ค่าพิสัยเชิงเส้น (mg/L)	สมการเชิงเส้น	สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2)
1	ชัยนาท 1	0.5-20	y = 6628.8x - 89.368	0.9991
2	ดอกมะลิ 105, พันธุ์กข 23	0.5-20	y = 10869x - 1850.7	0.9990

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีชุดการทดลองที่ 2 ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



รูปที่ 4.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีชุดการทดลองที่ 2 ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก

4.3.1 การวิเคราะห์โดยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน (External Standard Method)

นำตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกที่ผ่านการสกัดตามหัวข้อ 3.3.2 ที่สภาวะการทดลองที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ผลที่ได้เทียบหาปริมาณวิตามินอี จากกราฟมาตรฐานของแต่ละชุดการทดลองตามหัวข้อ 4.2 โดยการฉีดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (n=3)

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการวิเคราะห์วิตามินอีในตัวอย่างด้วยเทคนิค External Standard Method

ตัวอย่าง	พันธุ์	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ปริมาณวิตามินอีเฉลี่ย (mg/L)	ปริมาณวิตามินอีเฉลี่ย (mg/15 mL)	ปริมาณวิตามินอีเฉลี่ย (mg/100g)	%RSD
ข้าวกล้อง	ชัยนาท	10.011	2.846	0.043	0.426	0.035
	ดอกมะลิ	10.023	1.659	0.025	0.248	0.450
	กข 23	10.093	0.901	0.014	0.134	1.193
ข้าวกล้องงอก	ชัยนาท	10.012	3.097	0.046	0.464	1.533
	ดอกมะลิ	10.012	1.806	0.027	0.270	0.226
	กข 23	10.062	0.941	0.014	0.140	0.867

จากตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีที่ได้สามารถคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับ แสดงว่าผลการวิเคราะห์มีความเที่ยงที่ยอมรับได้

4.3.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน (Standard Addition Method)

นำสารละลายที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.3.6.2 ที่สภาวะเหมาะสมอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เมทานอล : แอซิโทไนไทรล์ 50:50 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร วัดพื้นที่พีคและเขียนกราฟระหว่างพื้นที่พีคที่กับปริมาณของสารมาตรฐานที่เติมลงไปในปริมาณต่างๆ เพื่อหาปริมาณของวิตามินอีในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง ข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1, ดอกมะลิ 105, กข 23 และข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1, ดอกมะลิ 105, กข 23 ผลที่ได้แสดงในตาราง 4.4

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการวิเคราะห์วิตามินอีในตัวอย่าง Standard Addition Method

ตัวอย่าง	พันธุ์	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ความเข้มข้นสารมาตรฐานที่เติม (mg/L)	ปริมาณวิตามินอีเฉลี่ย (mg/15 mL)	ปริมาณวิตามินอีเฉลี่ย (mg/100)	%RSD
ข้าวกล้อง	ชัยนาท	10.011	0.5 2.5 5.0	0.044	0.438	2.054
	ดอกมะลิ	10.023	0.5 2.5 5.0	0.025	0.249	4.996
	กข 23	10.093	0.5 2.5 5.0	0.008	0.077	7.692
ข้าวกล้องงอก	ชัยนาท	10.012	0.5 2.5 5.0	0.047	0.466	15.056
	ดอกมะลิ	10.012	0.5 2.5 5.0	0.027	0.274	1.672
	กข 23	10.062	0.5 2.5 5.0	0.014	0.140	0.111

จากตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีที่ได้สามารถคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับ แสดงว่าผลการวิเคราะห์มีความเที่ยงที่ยอมรับได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD, LOQ)

สร้างกราฟมาตรฐานวิตามินอี โดยทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm ในเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

จากกราฟมาตรฐานของวิตามินอีคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดตามขั้นตอนในภาคผนวก ข ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงผลของค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD)

พันธุ์ข้าว	กราฟมาตรฐาน	ชุดการทดลอง	LOD(mg/L)	LOQ(mg/L)
ชัยนาท 1	$y = 6628.8x - 89.368$ $R^2 = 0.9991$	1	0.407	1.359
ดอกมะลิ 105 กข 23	$y = 10869x - 1850.7$ $R^2 = 0.9990$	2	0.420	1.401

4.3.4 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณในตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินในตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก โดยตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ตัวตรวจวัดยูวี-วิสิเบิล ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร โดยใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่สารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดย ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลที่ได้และคำนวณปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างแต่ละชนิด โดยทำการวิเคราะห์ 2 วิธีแสดงผลดังตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างทั้ง 2 วิธี

ตัวอย่าง	พันธุ์	ปริมาณวิตามินอี (mg/100g)		
		External Standard Method	Standard Addition Method	ค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินอี
ข้าวกล้อง	ชัยนาท 1	0.426 ± 0.0001	0.438 ± 0.0090	0.432
	ดอกมะลิ 105	0.248 ± 0.0011	0.249 ± 0.0125	0.249
	กข 23	0.134 ± 0.00001	0.077 ± 0.0059	0.106
ข้าวกล้องงอก	ชัยนาท 1	0.464 ± 0.0071	0.466 ± 0.0702	0.465
	ดอกมะลิ 105	0.271 ± 0.0006	0.274 ± 0.0046	0.272
	กข 23	0.140 ± 0.0012	0.140 ± 0.0079	0.140

นำผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีของตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกไปทดสอบโดยวิธี t-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีวิเคราะห์ แสดงผลดังตารางที่ 4.8 (การคำนวณในภาคผนวก ง.)

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการวิเคราะห์ t-test ในตัวอย่างข้าวกล้อง ที่ระดับความมั่นใจ 95%

พันธุ์	ปริมาณวิตามินอี (mg/100g)					
	External Standard			Standard Addition		
	Mean	SD	%RSD	Mean	SD	%RSD
ชัยนาท 1	0.426	0.0001	0.0351	0.438	0.0089	2.0548
ดอกมะลิ 105	0.248	0.0011	0.4496	0.249	0.0125	4.9965
กข 23	0.134	0.0016	1.1930	0.077	0.0059	7.6928

จากผลการคำนวณ t-test ค่า t ที่คำนวณได้ (t_{cal}) น้อยกว่าค่า t จากตาราง (t_{table}) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจที่ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการวิเคราะห์ t-test ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ที่ระดับความมั่นใจ 95%

พันธุ์	ปริมาณวิตามินอี (mg/100g)					
	External Standard			Standard Addition		
	Mean	SD	%RSD	Mean	SD	%RSD
ชัยนาท 1	0.464	0.0071	1.5326	0.466	0.0702	15.0564
ดอกมะลิ 105	0.271	0.0006	0.2259	0.274	0.0046	1.6725
กข 23	0.140	0.0012	0.8667	0.140	0.0079	5.6291

จากผลการคำนวณ t-test ค่า t ที่คำนวณได้ (t_{cal}) น้อยกว่าค่า t จากตาราง (t_{table}) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจที่ 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอี เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ สารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวี ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร พบว่าการใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้วิตามินอีมีเวลาอยู่ในคอลัมน์นานเพียงพอที่จะทำให้การแยกวิเคราะห์เป็นไปอย่างสมบูรณ์ (t_R =13.988 นาที) ขณะที่การใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้วิตามินอีใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานเกินไป (t_R =17.763 นาที) และการใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 ทำให้วิตามินอีใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์สั้นเกินไป (t_R =11.223 นาที) การแยกภายในตัวอย่างยังไม่สมบูรณ์

สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอี จะเปรียบเทียบอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษาคือ สารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 60 : 40 และ 50 : 50 และ 40 : 60 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวี ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ใช้อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร มีความแรงของตัวทำละลายสำหรับการแยกที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้เวลารีเทนชัน 13.566 นาที

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีในช่วงความเข้มข้น 0.5-10 mg/L ทำการเตรียมเป็น 2 ชุดการทดลองเนื่องจากหากเก็บสารไว้เป็นเวลานานจะทำให้เวลารีเทนชันเปลี่ยนไปจะส่งผลต่อการวิเคราะห์อาจเป็นเพราะสิ่งเจือปนในตัวอย่าง หรือองค์ประกอบอื่นๆ เช่น ปริมาณไขมันที่มาจากการสกัด อุณหภูมิในการเก็บรักษา ความบริสุทธิ์ของสาร ฯลฯ ในการทำการวิเคราะห์ได้ กราฟมาตรฐานของชุดการทดลองที่ 1 มีสมการเชิงเส้น $y = 6628.8x - 89.368$ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของกราฟมาตรฐาน เท่ากับ 0.9991 พบว่าปริมาณวิตามินอีต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.407 mg/L และปริมาณวิตามินอีต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) เท่ากับ 1.359 mg/L ส่วนกราฟมาตรฐานของชุดการทดลองที่ 2 มีสมการเชิงเส้น $y = 10869x - 1850.7$ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของกราฟมาตรฐาน เท่ากับ 0.9990 พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณวิตามินอีต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.420และปริมาณวิตามินอีต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) เท่ากับ 1.401 mg/L

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกจำนวน 3 พันธุ์ คือ ชัยนาท 1, ดอกมะลิ 105, กข 23 โดยวิธีเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน (External Standard Method) ทำการฉีดวิเคราะห์สารตัวอย่างซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n = 3) ตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ในเฟสเคลื่อนที่สารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวี ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาณวิตามินอีใน 100 g ของข้าวกล้องพันธุ์ ชัยนาท 1, ดอกมะลิ 105, กข 23 คือ 0.426, 0.248, 0.134 mg ตามลำดับ และ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน (% RSD) มีค่าเท่ากับ 0.035, 0.450, 1.193 % ตามลำดับ และปริมาณวิตามินอีใน 100 g ของข้าวกล้องงอกพันธุ์ ชัยนาท 1, ดอกมะลิ 105, กข 23 คือ 0.464, 0.270, 0.140 mg ตามลำดับ และ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน (% RSD) มีค่าเท่ากับ 1.533, 0.226, 0.867% ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกจำนวน 3 พันธุ์ คือ ชัยนาท 1, ดอกมะลิ 105, กข 23 วิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน(Standard Addition Method) ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n = 3) ตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ในเฟสเคลื่อนที่สารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวี ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาณวิตามินอีใน 100 g ของข้าวกล้องพันธุ์ ชัยนาท 1, ดอกมะลิ 105, กข 23 คือ 0.438, 0.249 , 0.077 mg ตามลำดับ และ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน (% RSD) มีค่าเท่ากับ 2.054, 4.996, 7.692% ตามลำดับ และปริมาณวิตามินอีใน 100 g ของข้าวกล้องงอกพันธุ์ ชัยนาท 1, ดอกมะลิ 105, กข 23 คือ 0.466, 0.274, 0.140 mg ตามลำดับ และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน (% RSD) มีค่าเท่ากับ 15.056, 1.672, 0.111% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ แสดงว่าผลการวิเคราะห์นี้สามารถยอมรับได้

จากการทำการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีทั้ง 2 วิธีผลที่ได้นำไปทดสอบโดยวิธี t-Test โดยการคำนวณ t-test ซึ่งค่า t_c ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า t จากตาราง แสดงว่าแต่ละวิธีวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจที่ 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำการศึกษาสภาวะในการวิเคราะห์ก่อนเพื่อช่วยประหยัดเวลา เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นเมล็ดพันธุ์ต่างๆ

5.2.2 ควรทำการศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติ ทางการเก็บรักษา การทำลายของสารที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อการวิเคราะห์และเก็บรักษาที่ถูกต้อง

5.2.3 ควรตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ก่อนการวิเคราะห์ให้อยู่ในค่าที่เหมาะสมเพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] Ken'ichi Ohtsubo, Keitaro Suzuki, Yuji Yasui, Takafumi Kasumi, 2004, **Original Article**

[2] Shoichi Ito and Yukihiro Ishikawa, 2004, **FAO International Rice Year**, Japan: Tottori University

[3] Jialal I, Devaraj S, 1998, **Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of angina pectoris. A randomized, double-blind, controlled trial**, 19, JAMA: erratum

[4] http://www.riceexporters.or.th/background_th.htm

[5] บุญหงษ์ จงคิด, 2547, **ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต**, 1, กรุงเทพ ฯ: จุฬา

[6] เครื่อวัลย์ อัตตะวิริยะสุข และคณะ, 2535, คุณภาพการขัดสีและคุณสมบัติเมล็ดทางกายภาพบางประการของข้าวขาวดิกมะลิ 105 ซึ่งปลูกโดยใช้วันปลูกและอัตราปุ๋ยเคมีที่แตกต่างกัน, **สถาบันวิจัยข้าว ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี**

[7] อรอนงค์ นัยวิกุล, จันทร์จรัส ศรีศิริ, วราภา มหากาญจนกุล, 2547, **การใช้ประโยชน์จากข้าวในการสร้างมูลค่าเพิ่มเพื่อการส่งออก: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 2**, 2, กรุงเทพ ฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน คณะอุตสาหกรรมเกษตร

[8] งามชื่น คงเสรี, 2545, **คุณภาพข้าวและการตรวจสอบข้าวปนในข้าวหอมมะลิไทย**, กรุงเทพ ฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

[9] ไชยรัตน์ เพ็ชรชลานุวัฒน์ และคณะ, 2543, **วารสารวิชาการเกษตร 18**, 2, กรุงเทพ ฯ

[10] Komatsuzaki *et al*, 2005, Morphological plasticity in the maternal brain: Comment on Kinsley et al.; motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines, **Center for Studies in Behavioral Neurobiology**

[11] Kayahara, Hiroshi and Kikuichi Tsukahara, 2000**, 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies in Hawaii**

[12] M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. Lopez-Sabater, 2006, "Determination of γ- and δ-tocopherols in human milk by a direct high-performance liquid chromatographic method with UV–vis detectionand comparison with evaporative light scattering detection", **Journal of Chromatography A**, (1114): 132-137

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[13] I.G. Zigoneanu a, L. Williams, Z. Xu, C.M. Sabliov, 2008, "Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method", **Bioresource Technology** , (99): 4910-4918

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

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

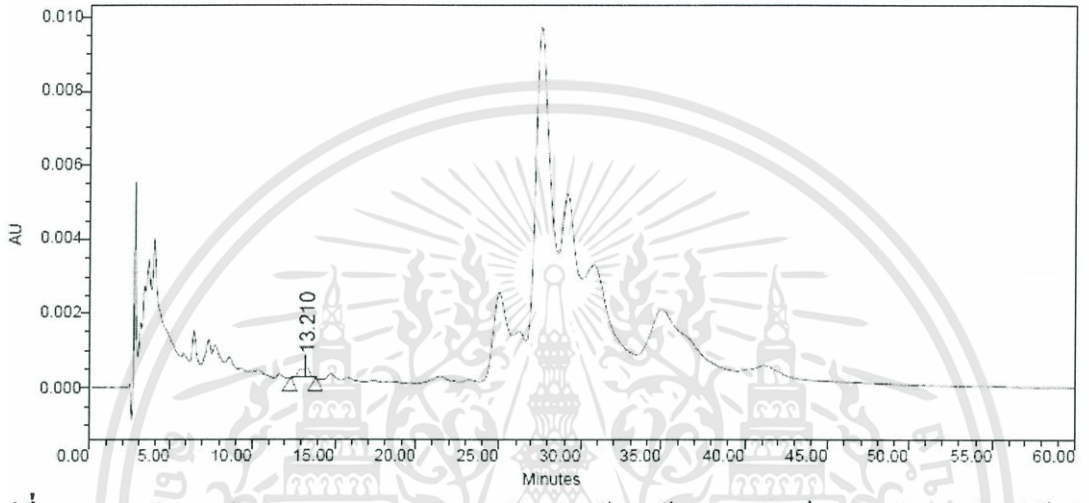
[16] Noriko Yamagishi *et al.*, 2007, **Plant Cell Reports**, 26, Berlin: Springer Berlin / Heidelberg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

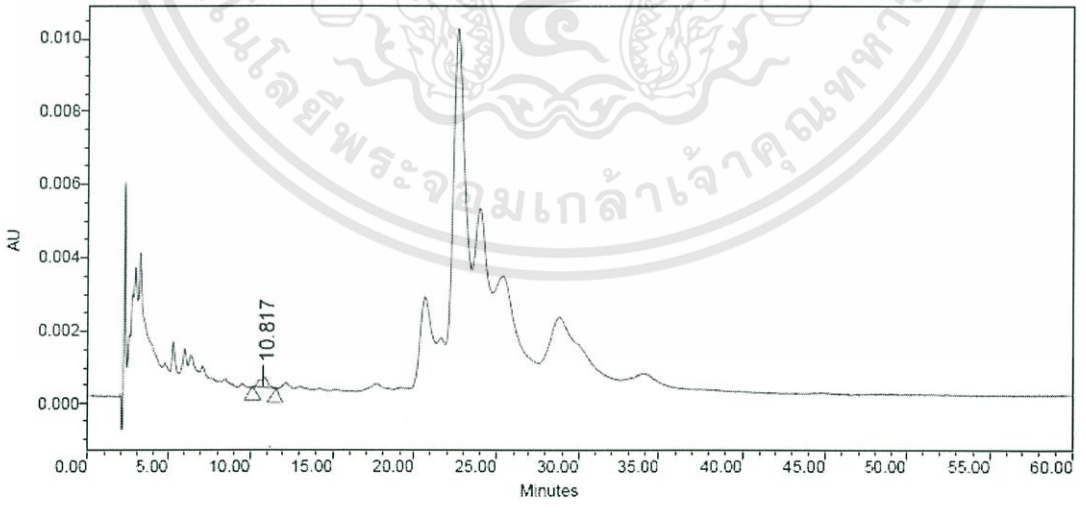
ภาคผนวก ก.

ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลอง

โครมาโทแกรมของตัวอย่างจากการทดสอบหาอัตราส่วนของสารละลายเมทานอล : แอซิโทไนไทรล์ ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ แสดงดังรูปที่ ก.1-ก.6

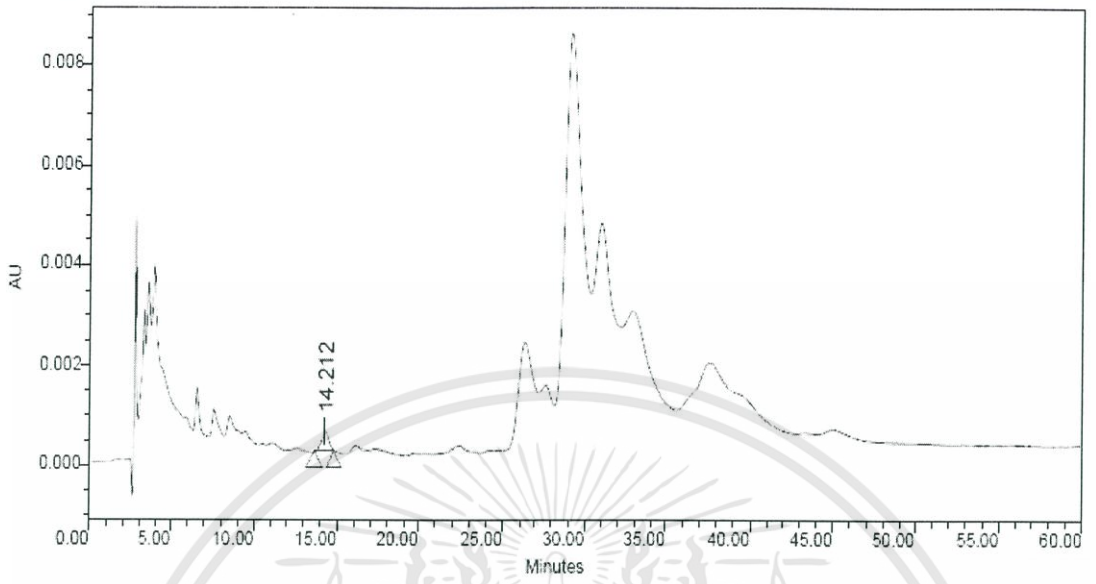


รูปที่ ก.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 60 : 40 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

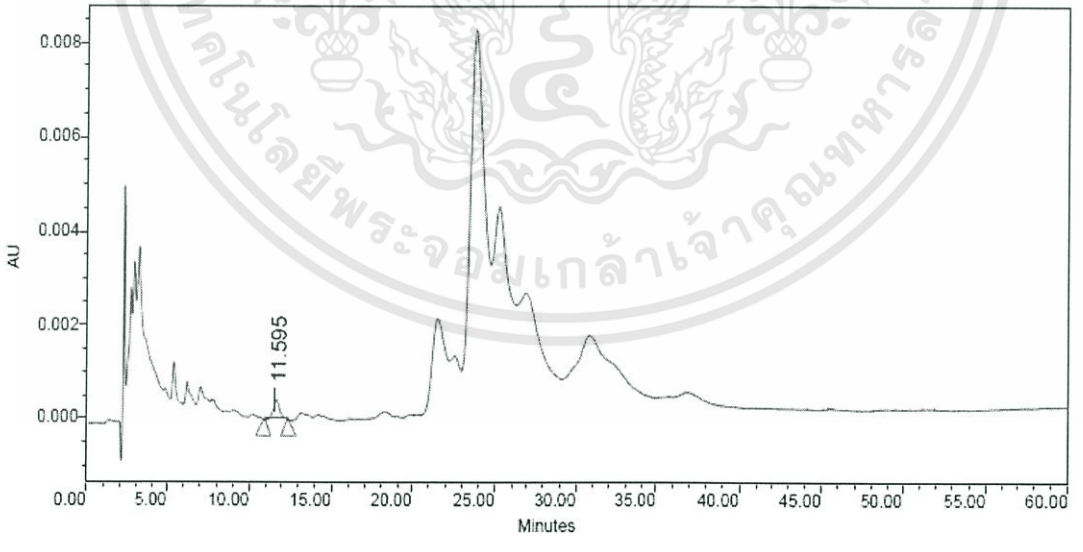


รูปที่ ก.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 60 : 40 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

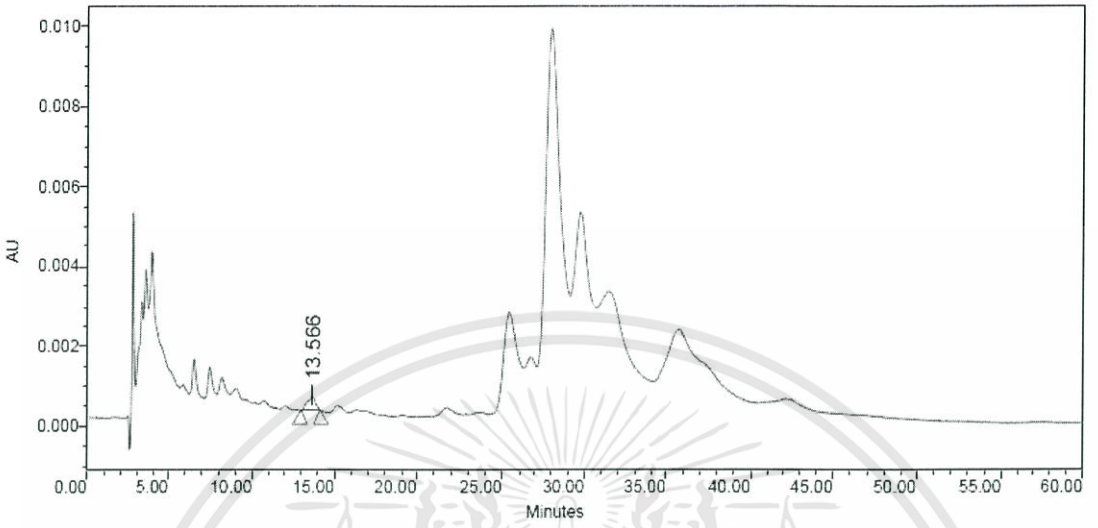


รูปที่ ก.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 40 : 60 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

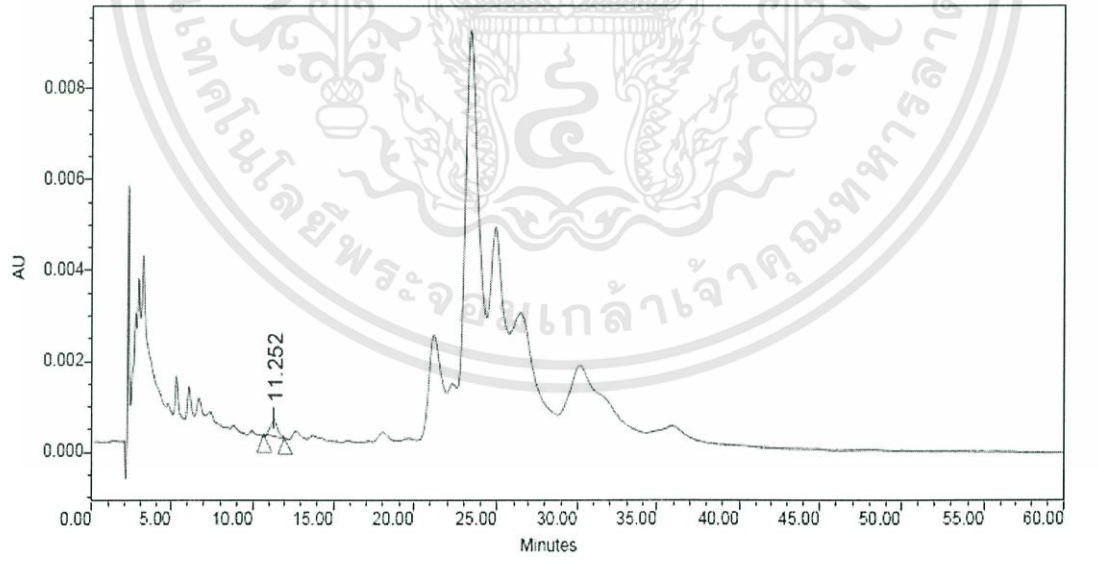


รูปที่ ก.4 แสดงโครมาโทแกรมขอสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 40 : 60 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



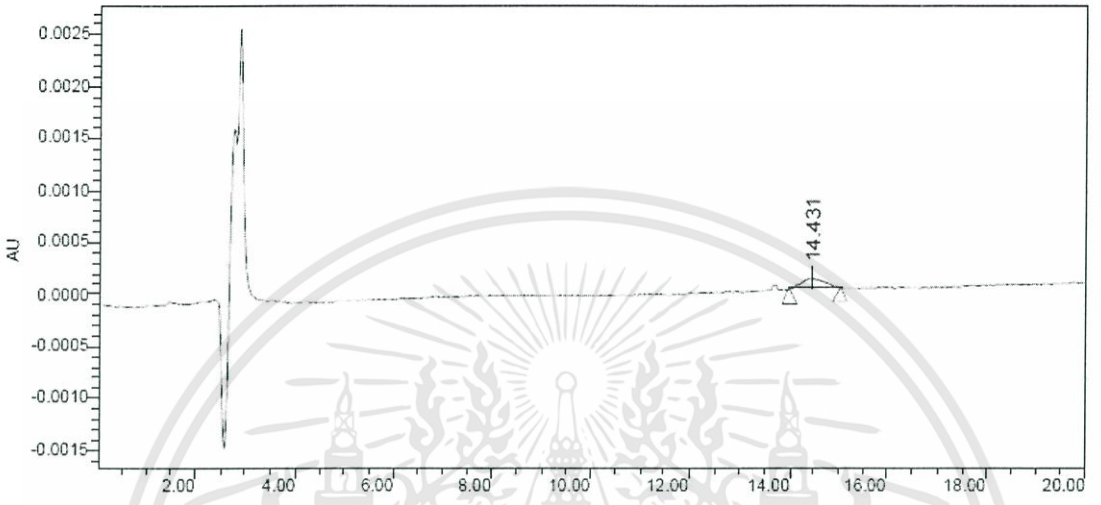
รูปที่ ก.5 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



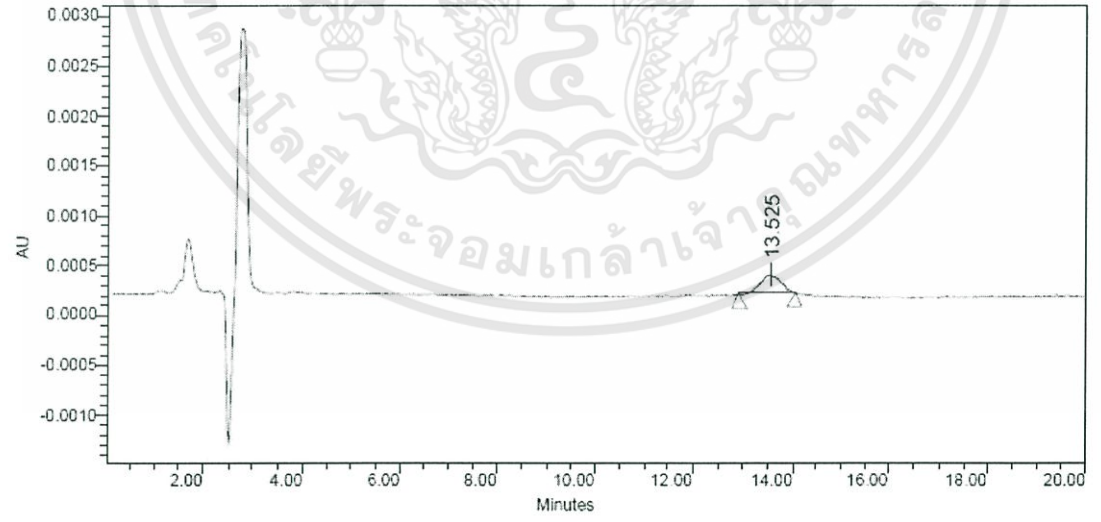
รูปที่ ก.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ที่ความเข้มข้น 0.5-10 ppm แสดงดังรูปที่ ก.7-ก.16

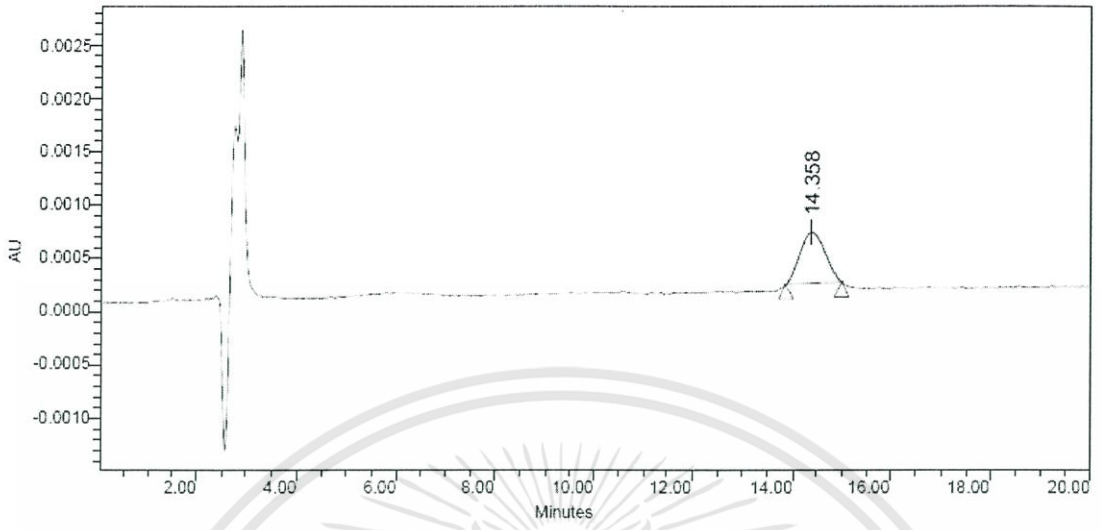


รูปที่ ก.7 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 0.5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

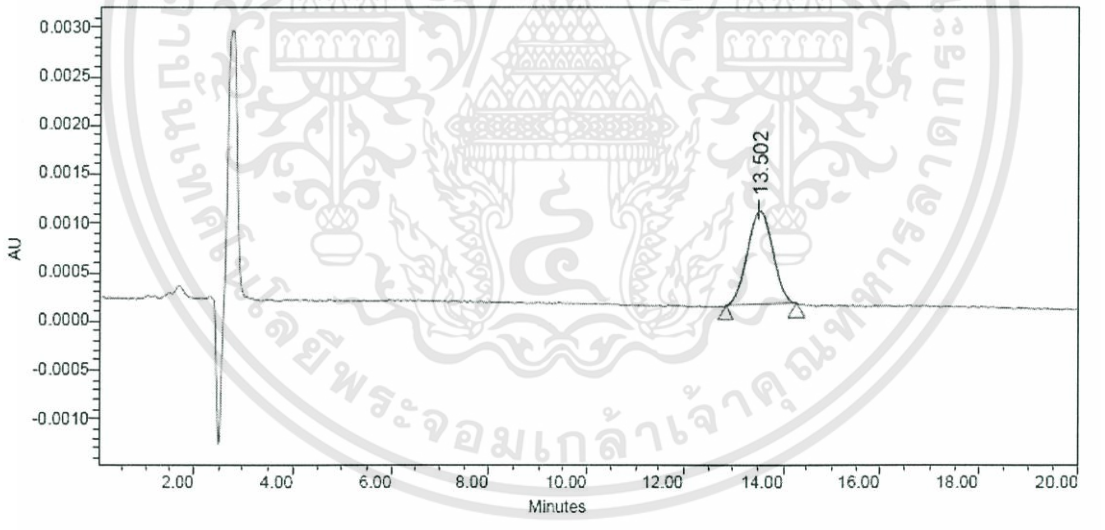


รูปที่ ก.8 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 1 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

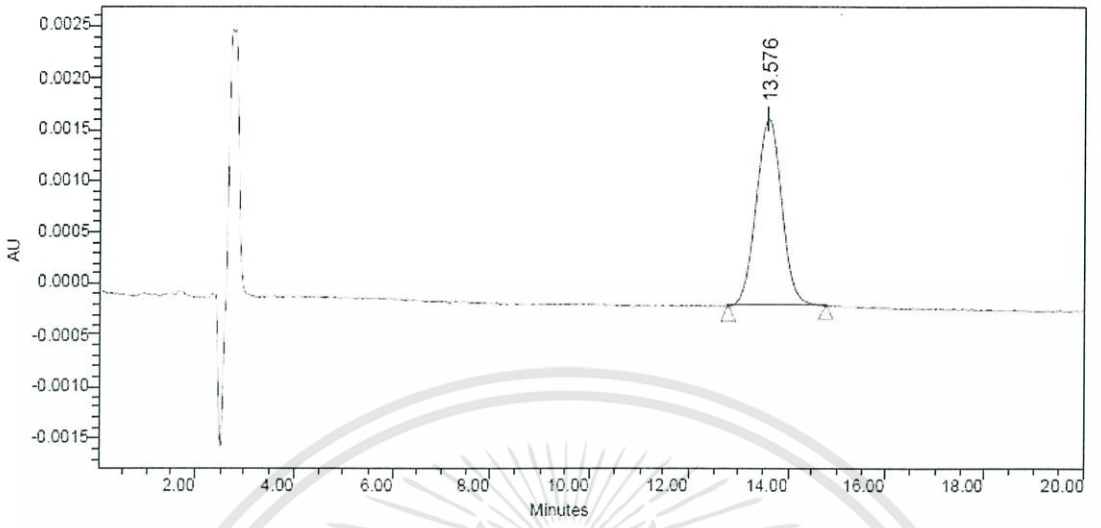


รูปที่ ก.9 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 2.5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

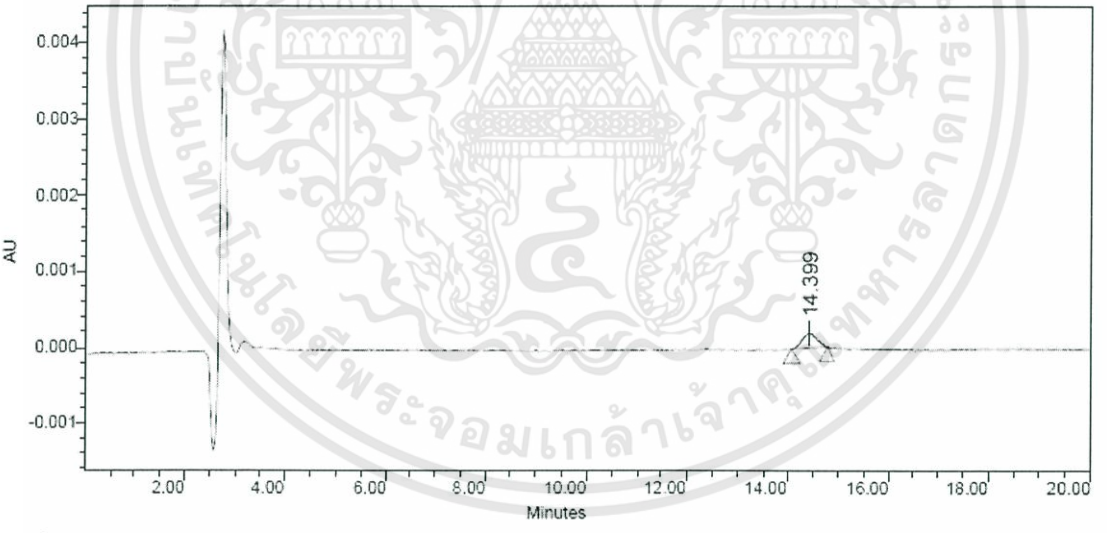


รูปที่ ก.10 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

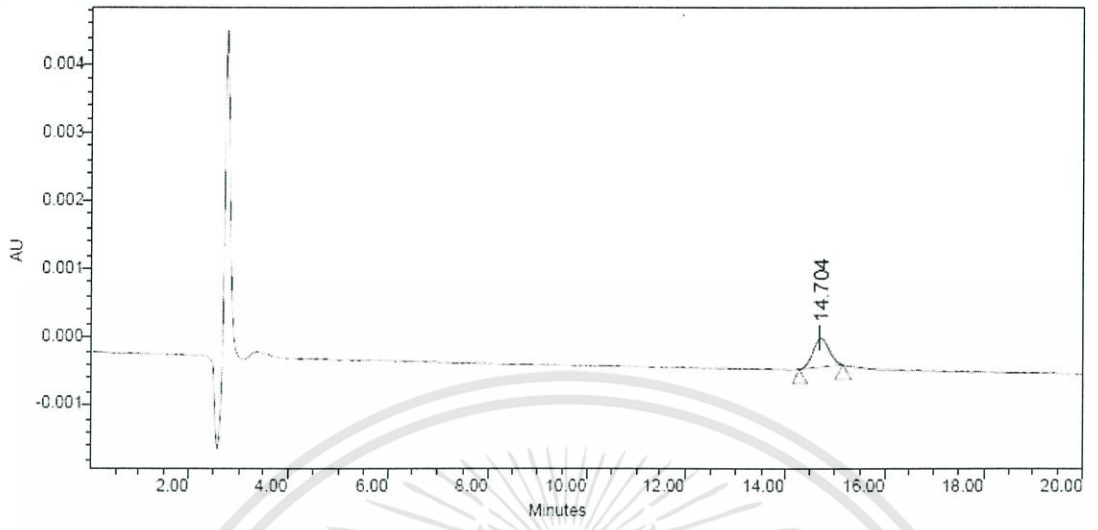


รูปที่ ก.11 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 10 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

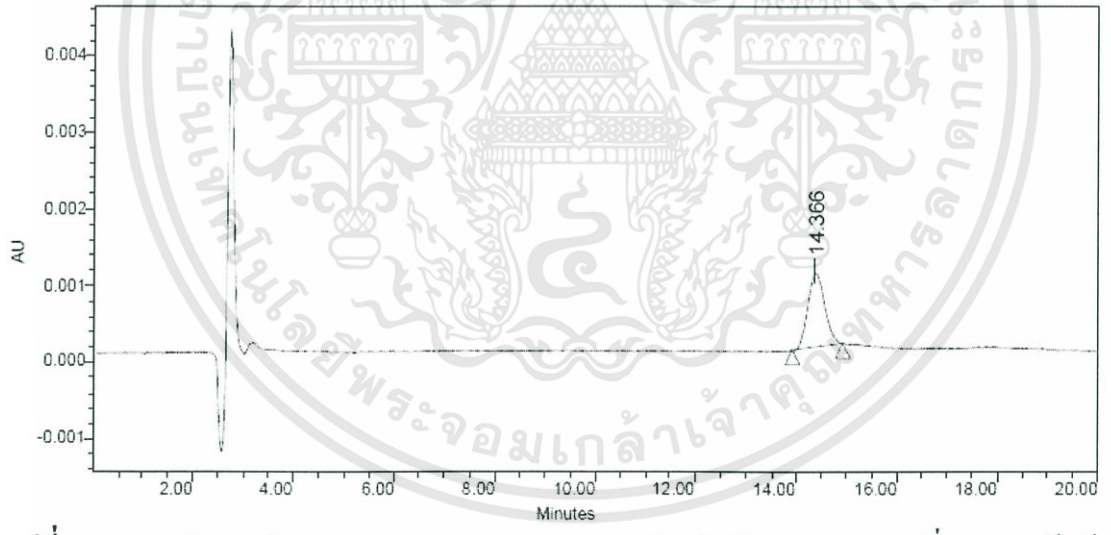


รูปที่ ก.12 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้น 0.5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

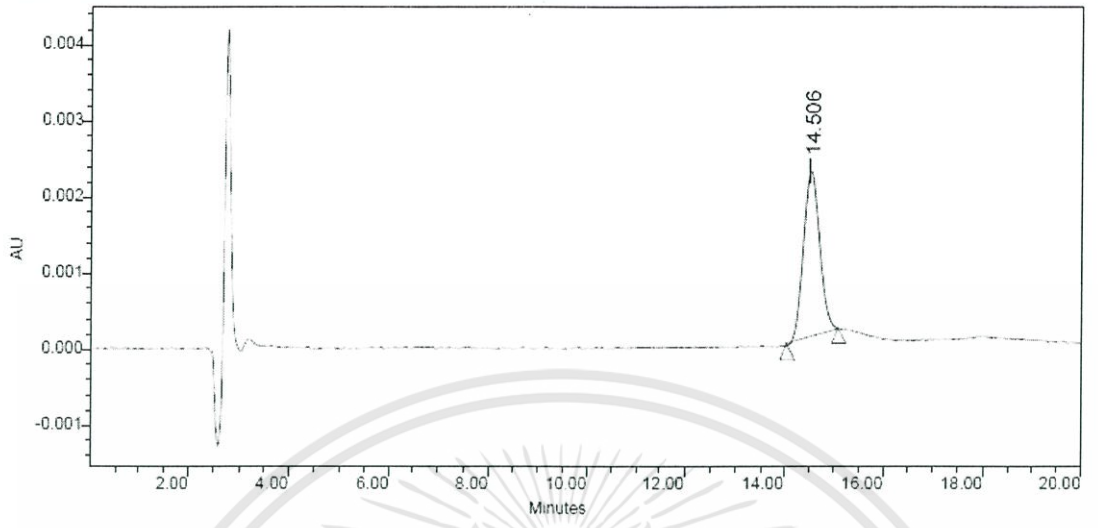


รูปที่ ก.13 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้น 1 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

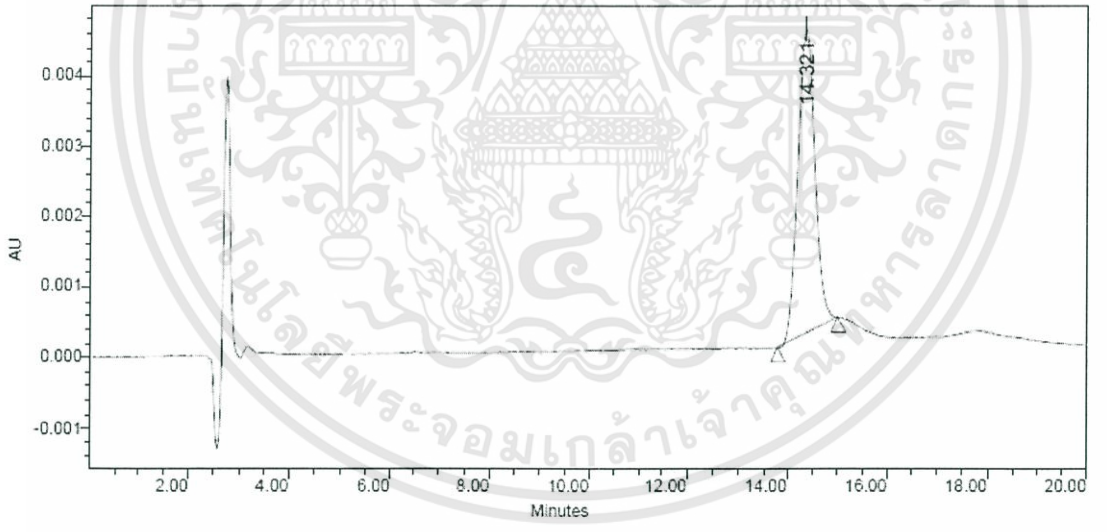


รูปที่ ก.14 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้น 2.5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



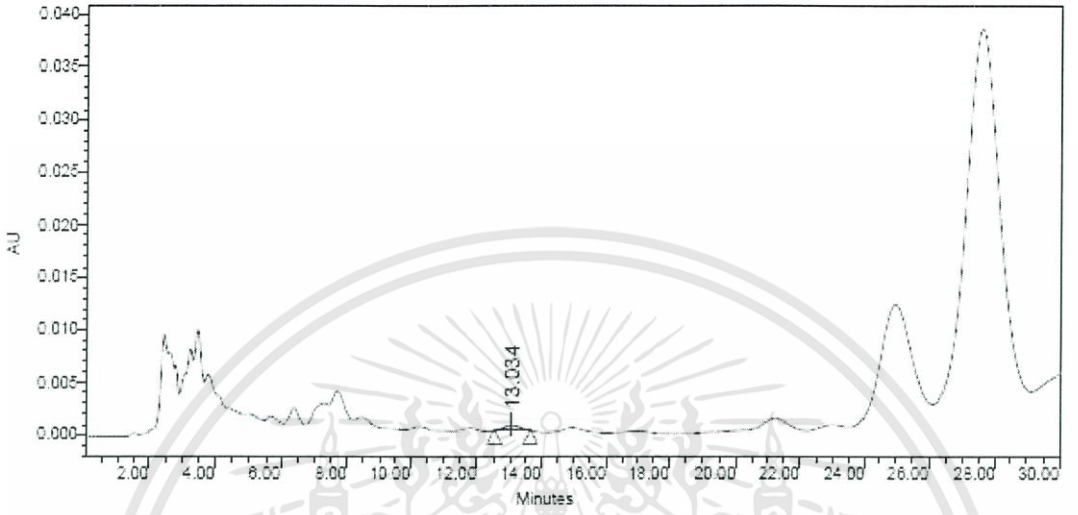
รูปที่ ก.15 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้น 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



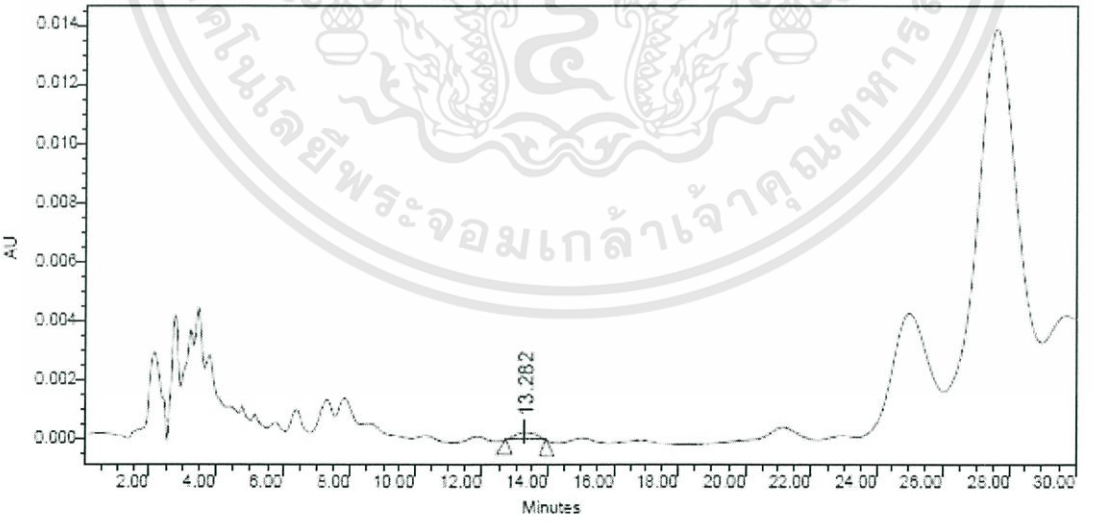
รูปที่ ก.16 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้น 10 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่วิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ ก.17-ก.20

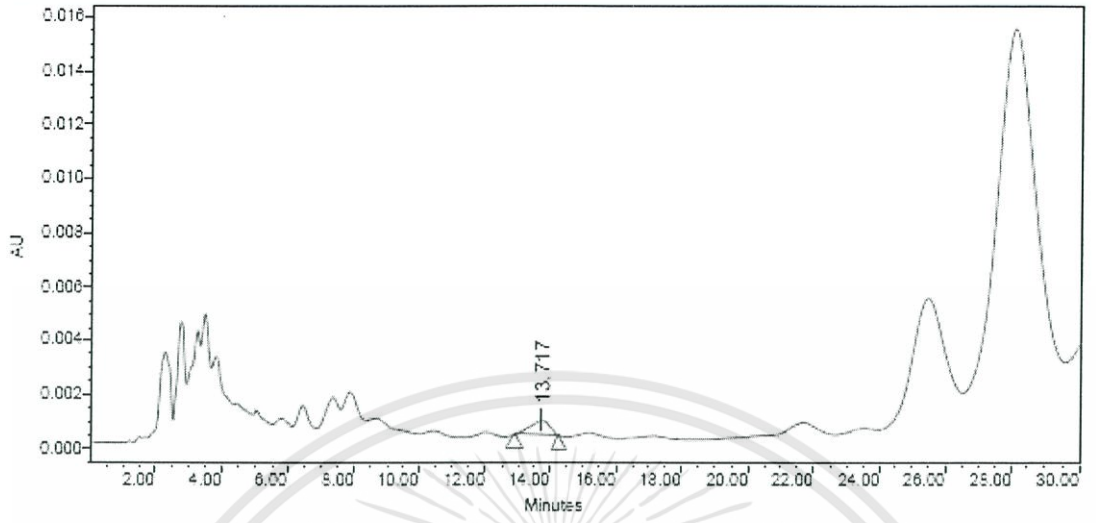


รูปที่ ก.17 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

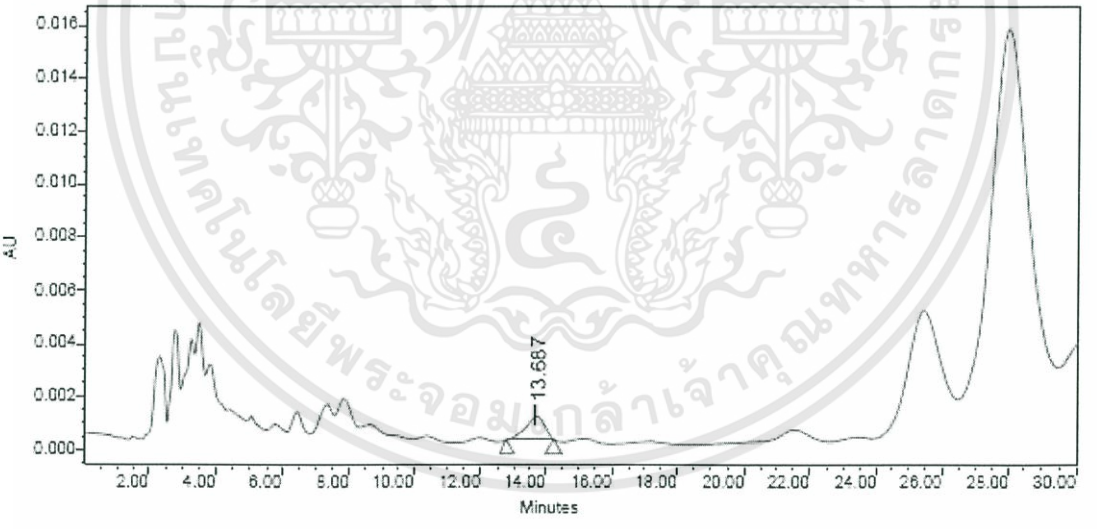


รูปที่ ก.18 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



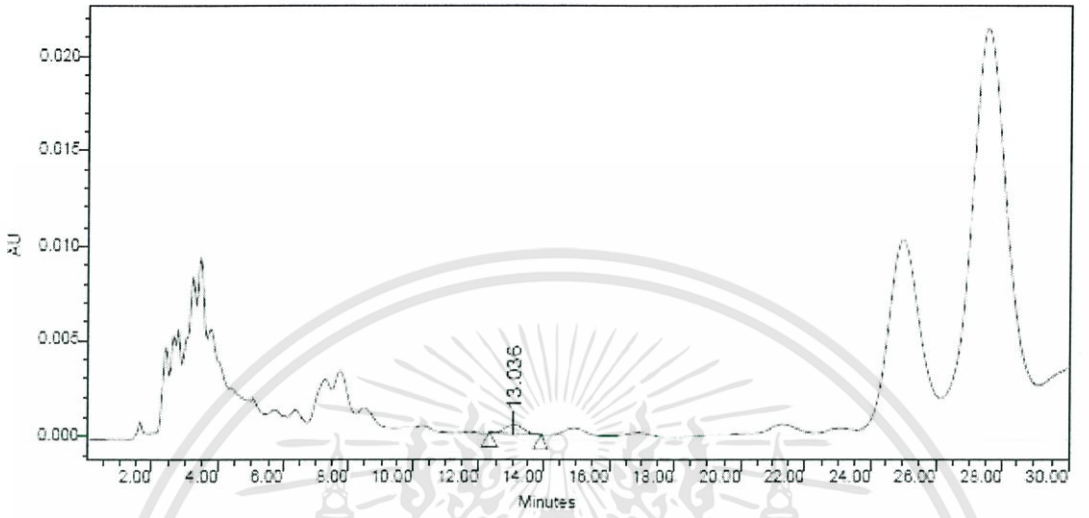
รูปที่ ก.19 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



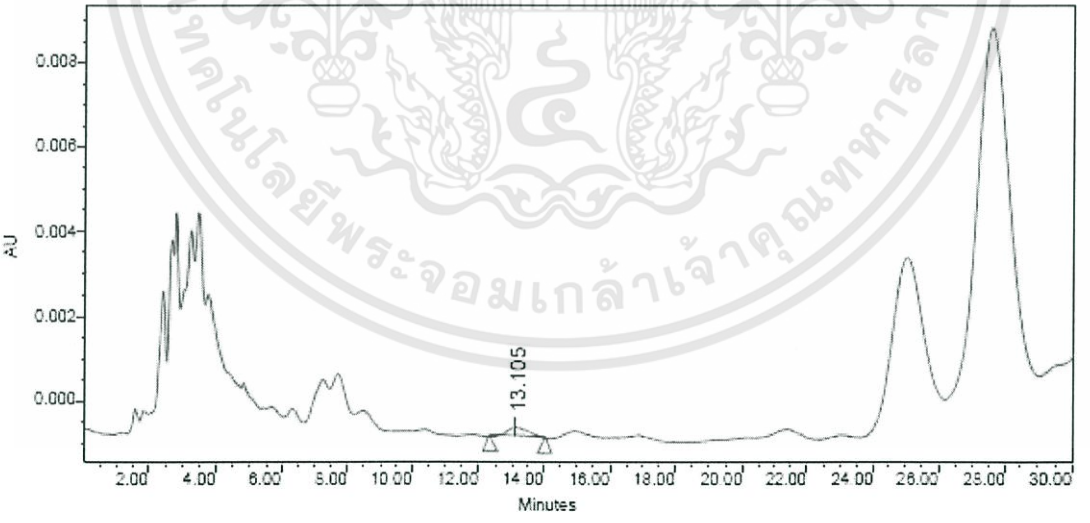
รูปที่ ก.20 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 ที่วิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ ก.21-ก.24

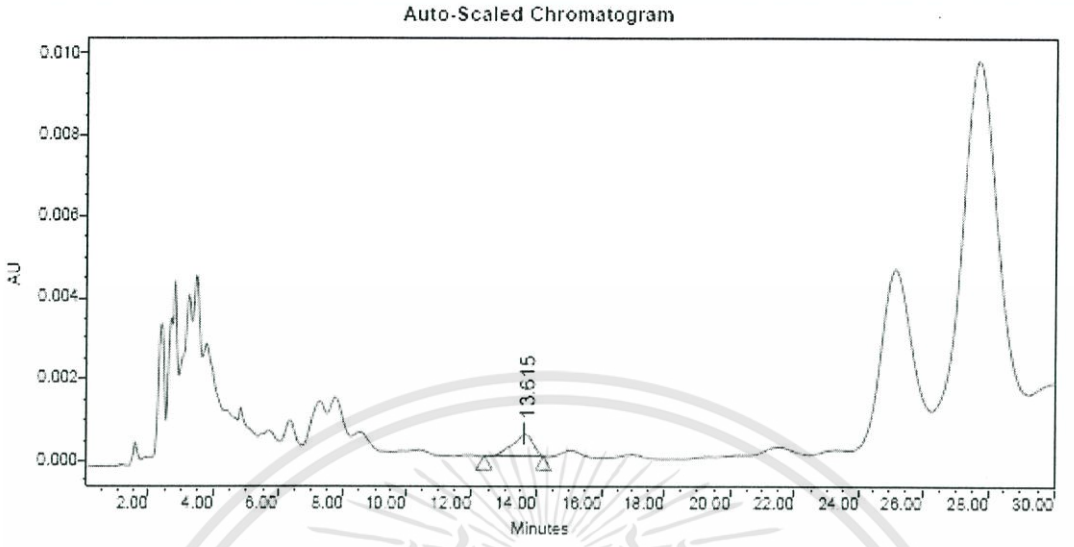


รูปที่ ก.21 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

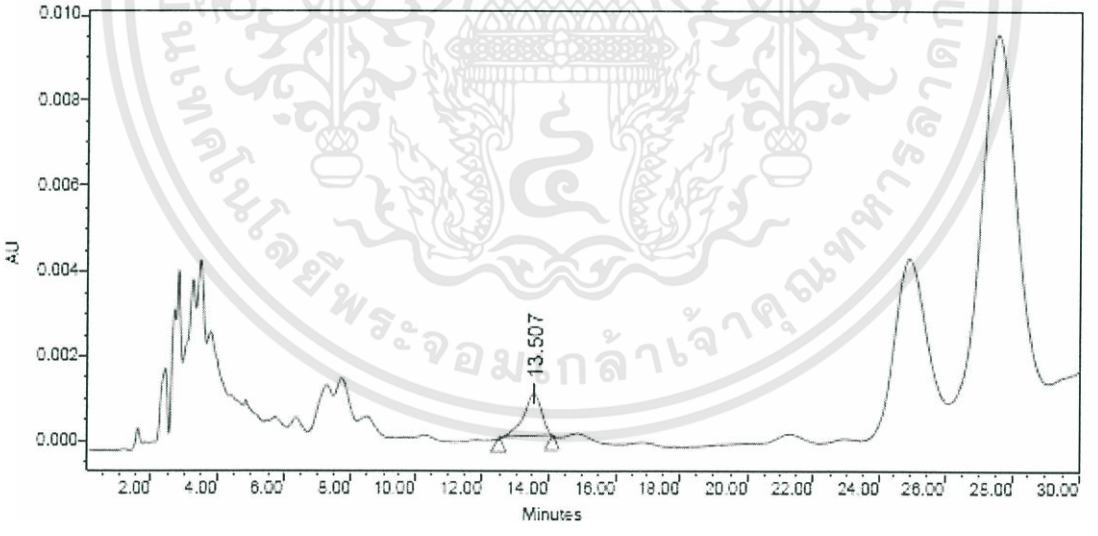


รูปที่ ก.22 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



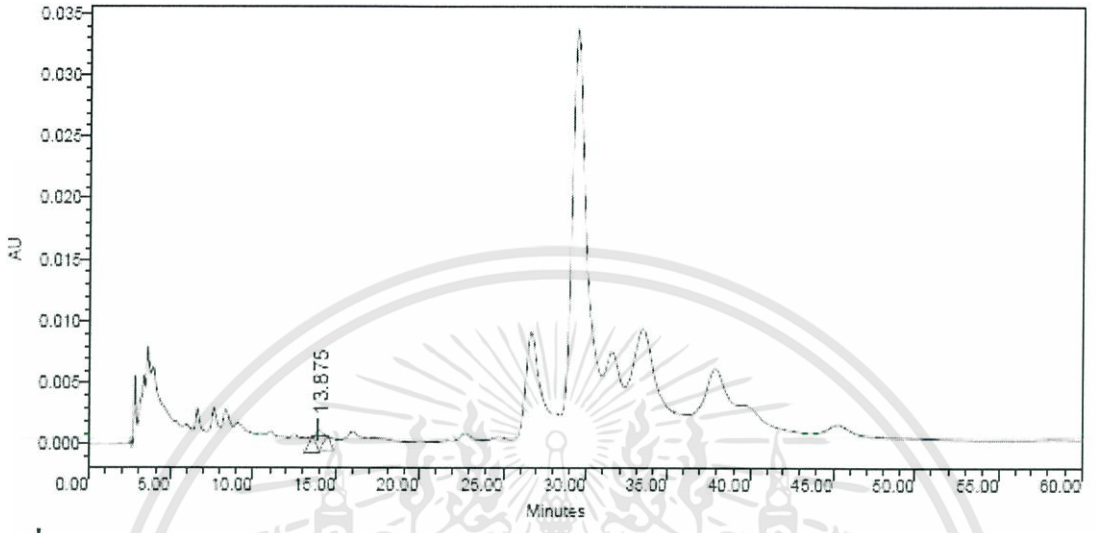
รูปที่ ก.23 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



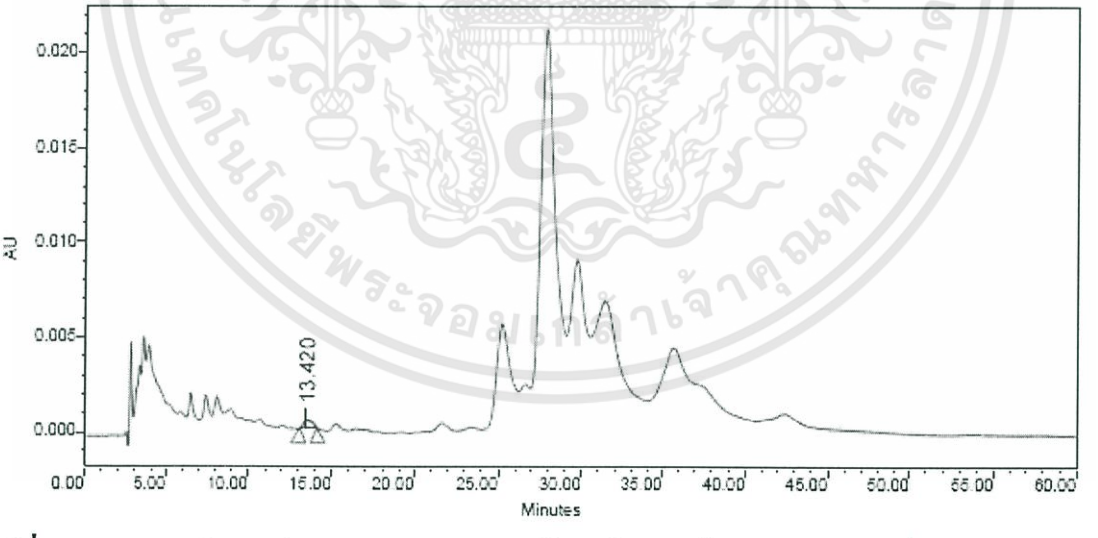
รูปที่ ก.24 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่วิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ ก.25-ก.28

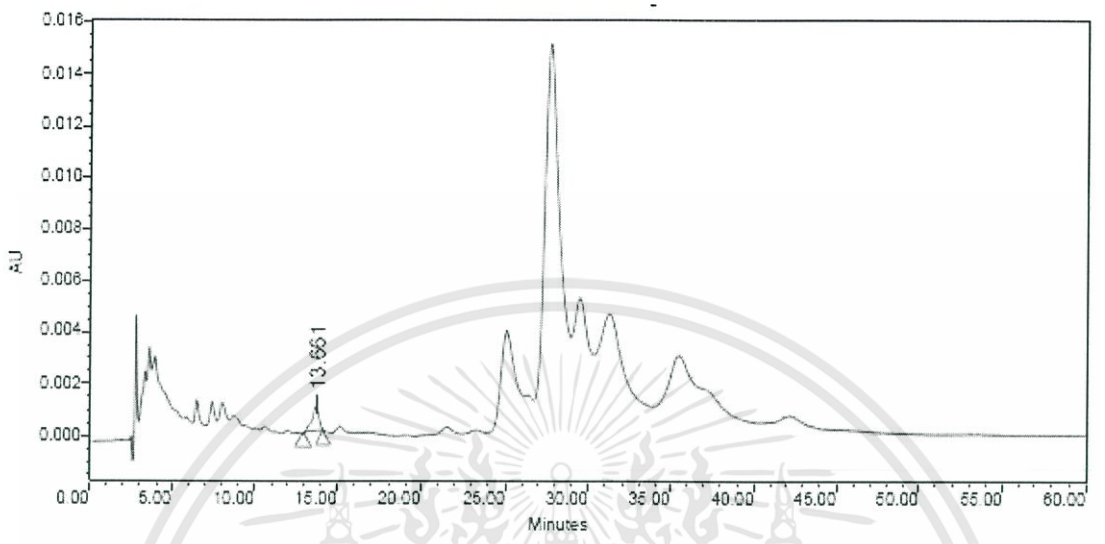


รูปที่ ก.25 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

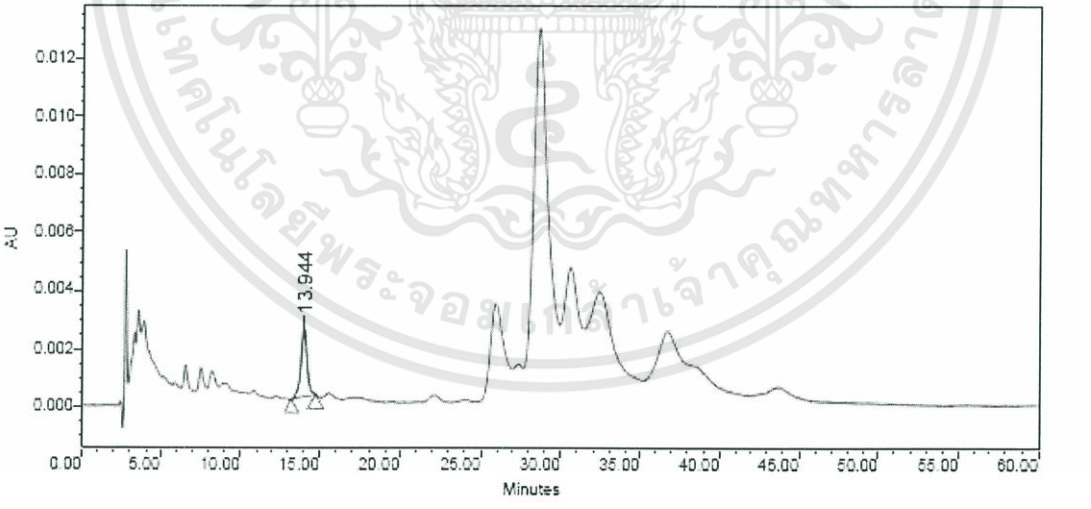


รูปที่ ก.26 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



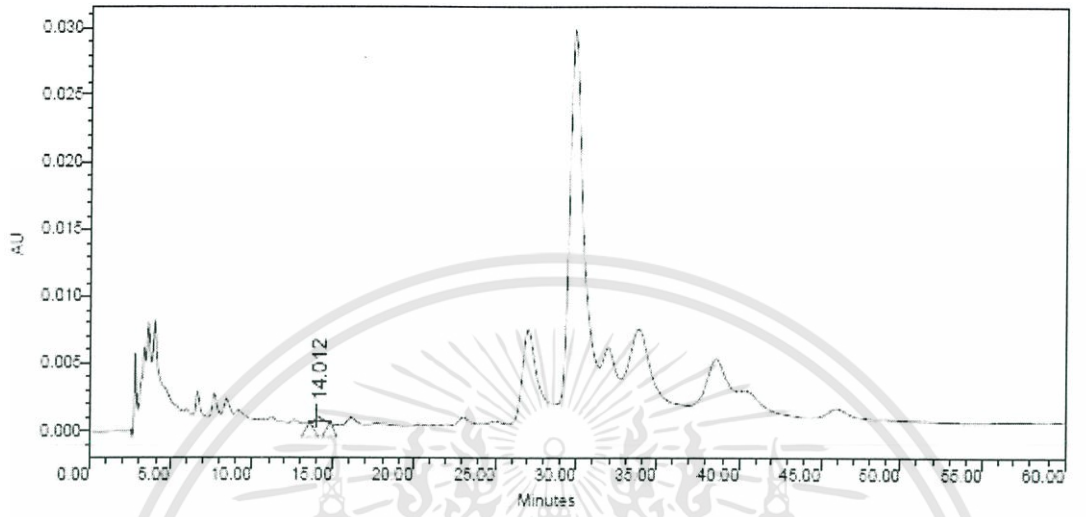
รูปที่ ก.27 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



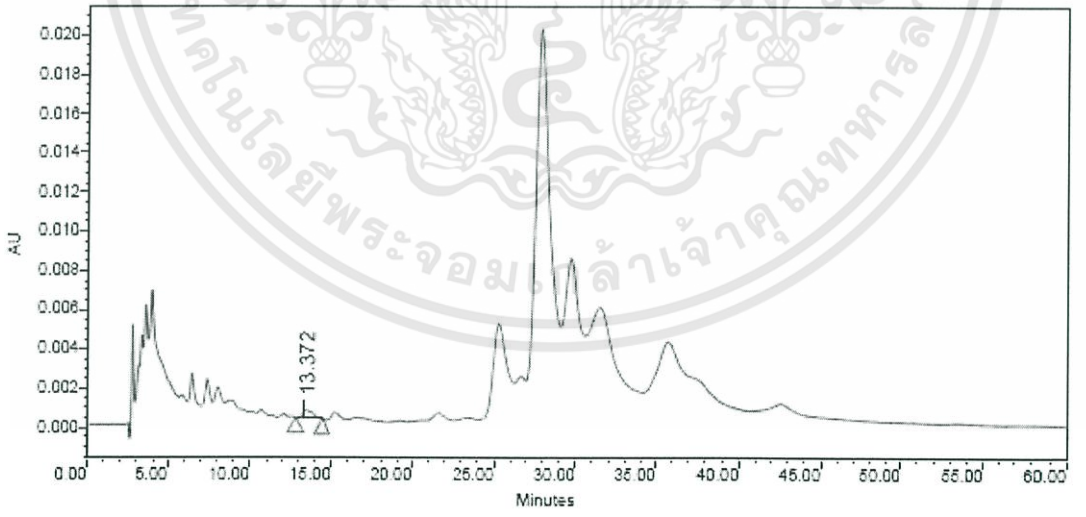
รูปที่ ก.28 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่วิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ ก.29-ก.32

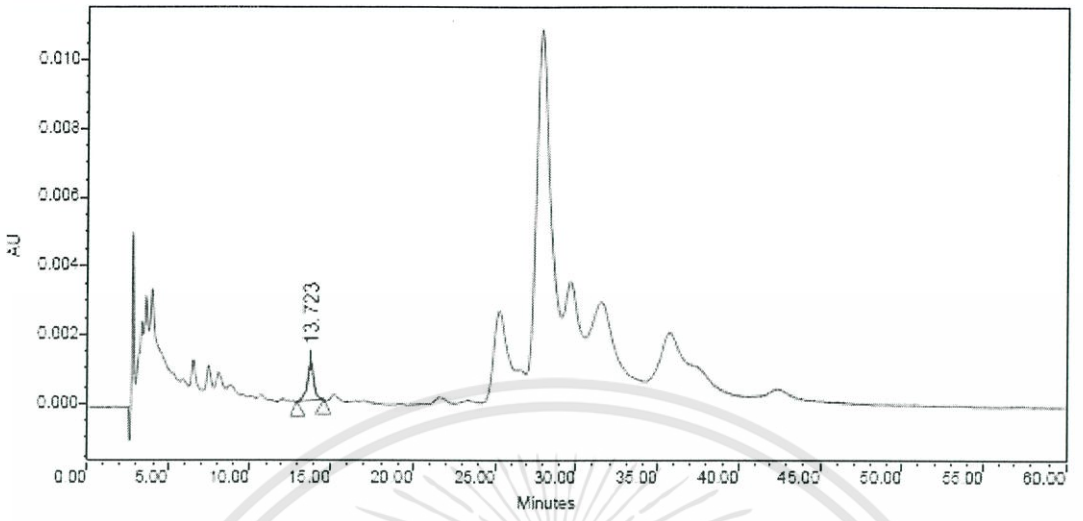


รูปที่ ก.29 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

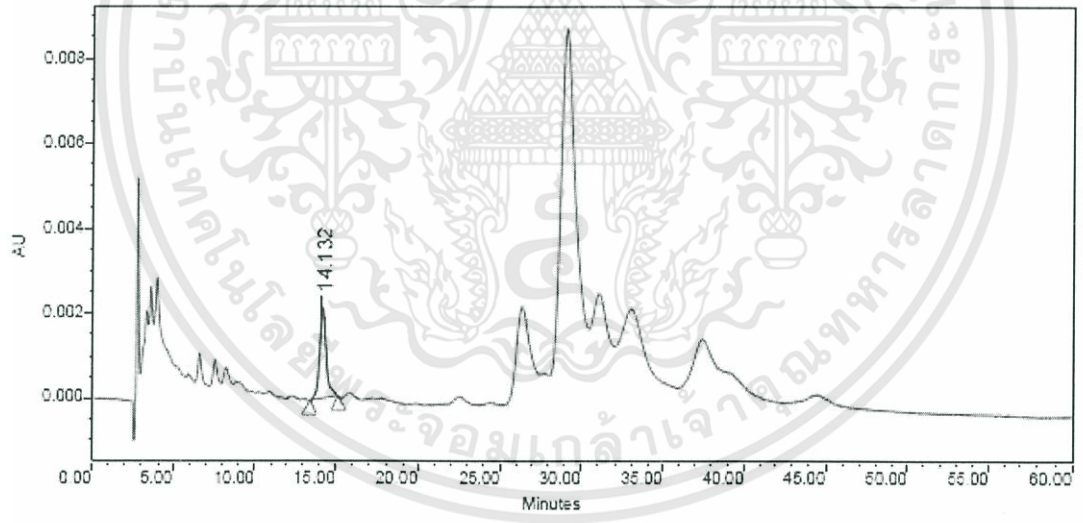


รูปที่ ก.30 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



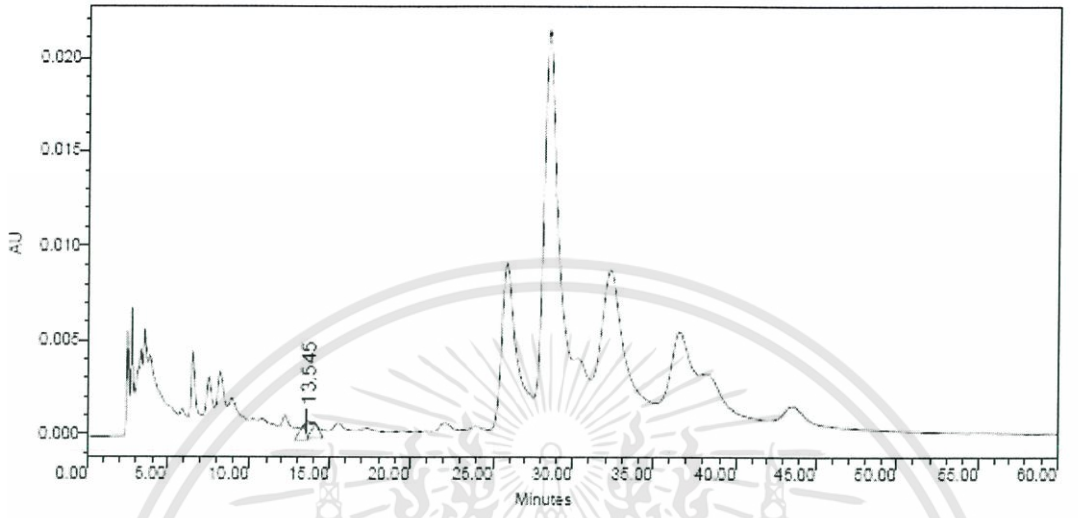
รูปที่ ก.31 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



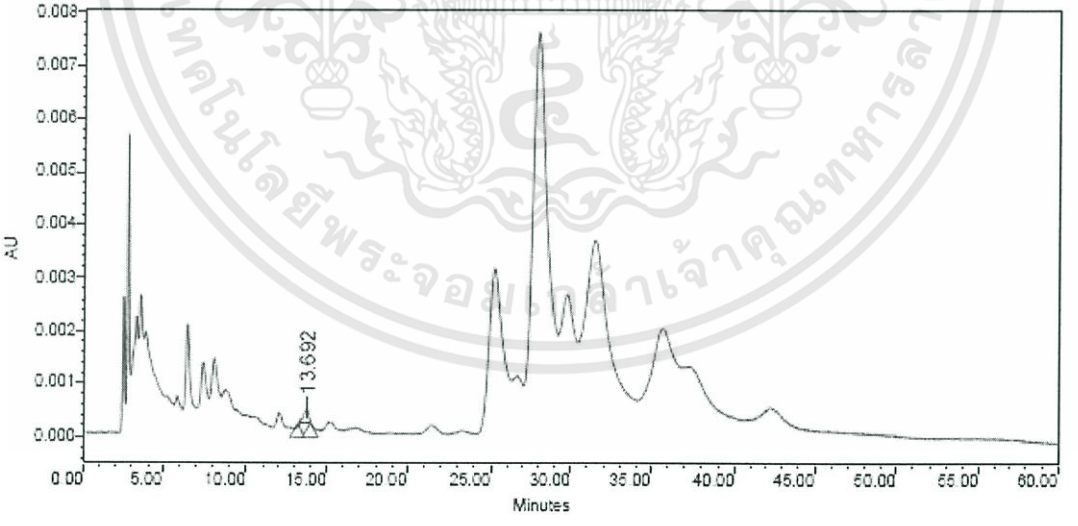
รูปที่ ก.32 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่วิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ ก.33-ก.36

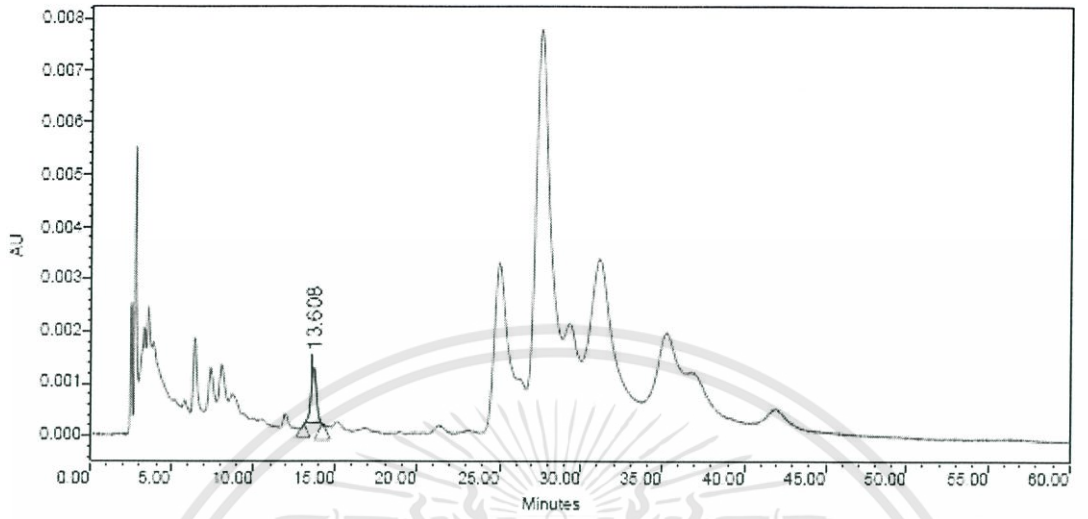


รูปที่ ก.33 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

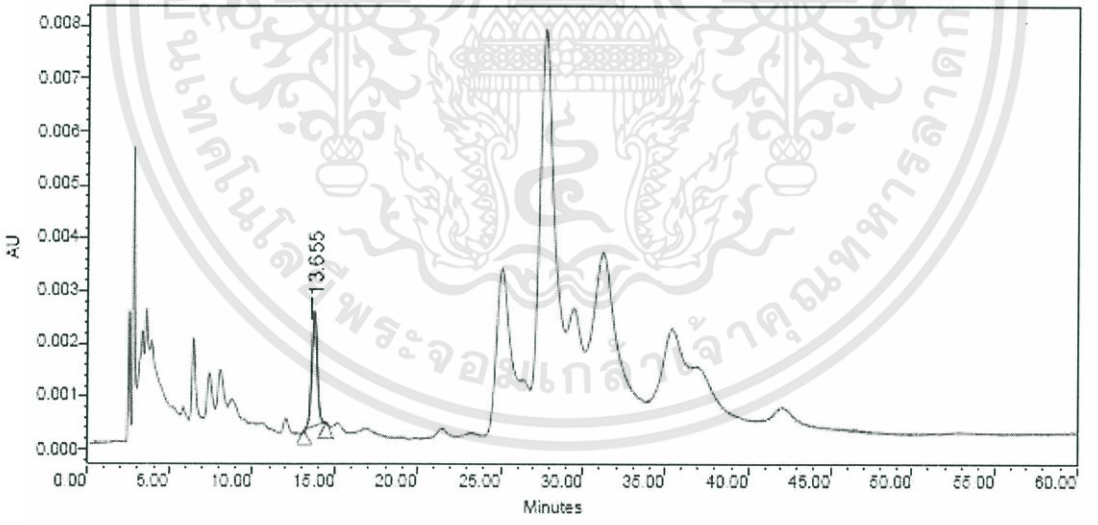


รูปที่ ก.34 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



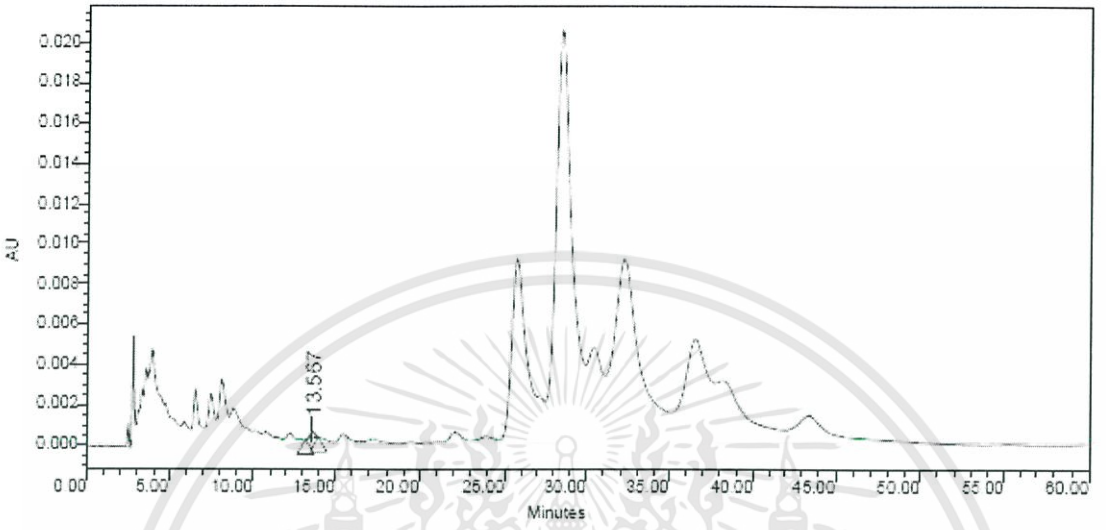
รูปที่ ก.35 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



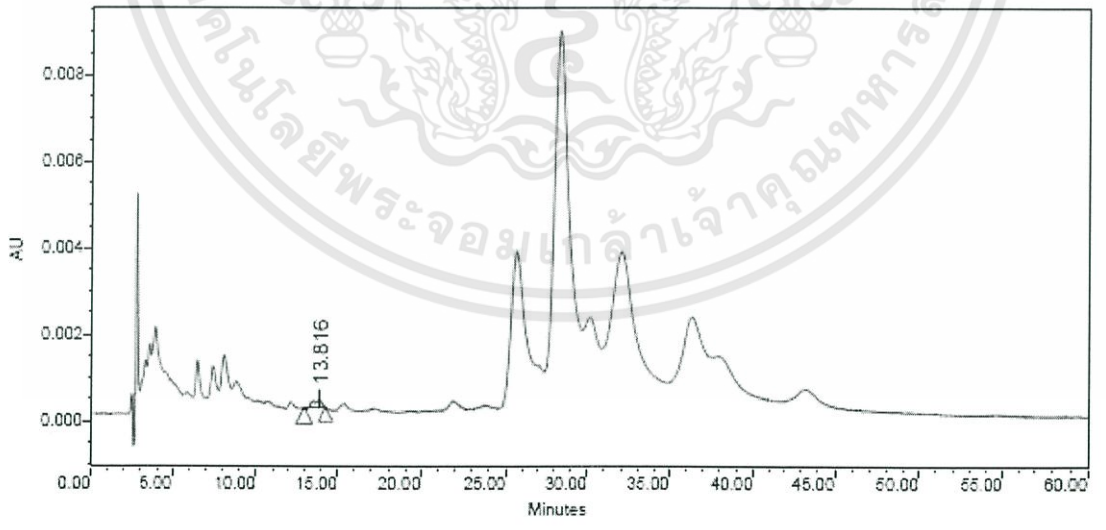
รูปที่ ก.36 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่วิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ ก.37-ก.40

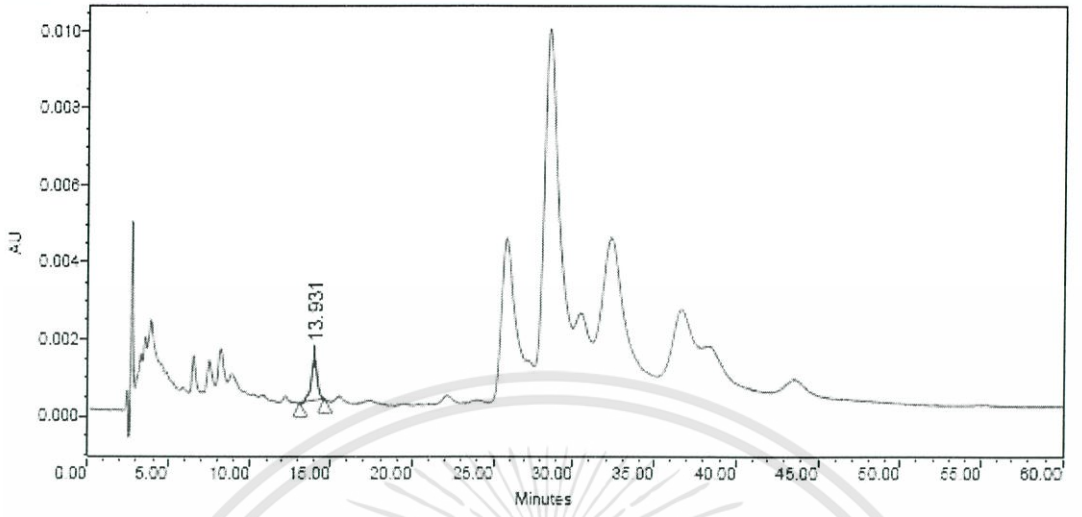


รูปที่ ก.37 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

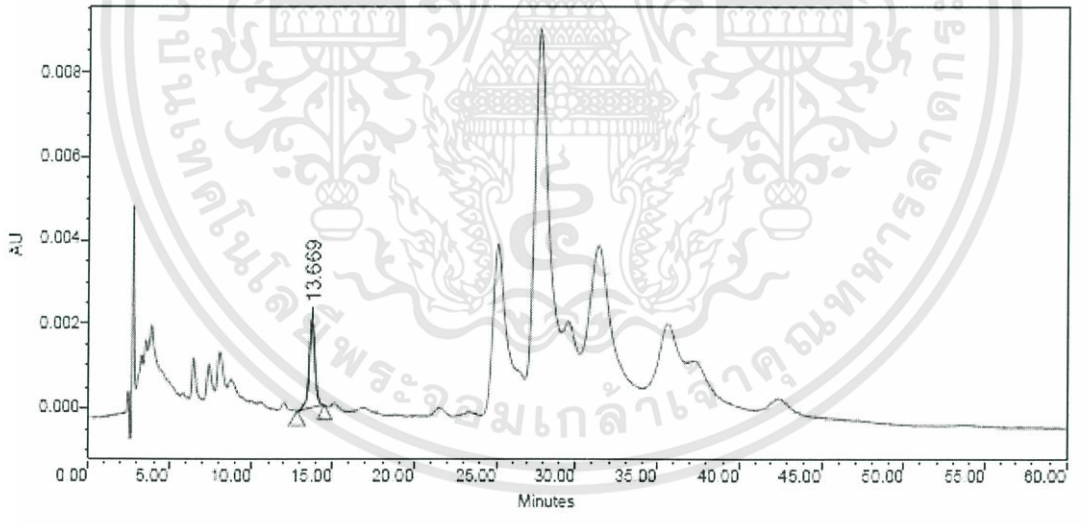


รูปที่ ก.38 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 1 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.39 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 5 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร



รูปที่ ก.40 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินอี 10 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การคำนวณปริมาณวิตามินอี ด้วยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน

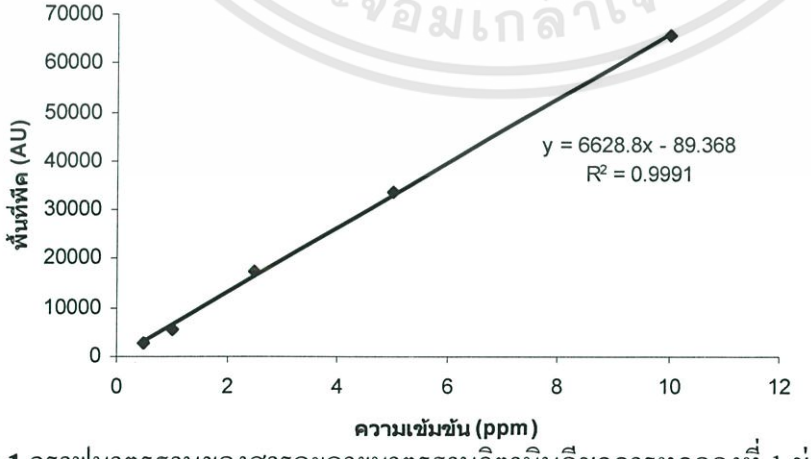
ตัวอย่างการคำนวณปริมาณวิตามินอีจากตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ด้วยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐานที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

ตารางที่ ข.1 พื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีชุดการทดลองที่ 1 ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่พีค (AU)			Mean
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0.5	2936	2953	2917	2935.333
1	5641	5711	5682	5678.000
2.5	17287	17545	17369	17400.333
5	33862	31584	35890	33778.667
10	65531	65490	66101	65707.333

1.สร้างกราฟมาตรฐาน กำหนดให้ แกน x คือ ความเข้มข้น

แกน y คือ พื้นที่พีคเฉลี่ย



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีชุดการทดลองที่ 1 ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.นำพื้นที่พีคของตัวอย่างที่ได้จากการสกัดมาฉีดวิเคราะห์ปริมาตร 20 μL

ตารางที่ ข.2 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1

ข้าวพันธุ์ชัยนาท	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ข้าวกล้อง ตัวอย่างน้ำหนัก 10.011 g	18776	18768	18782
ข้าวกล้องงอก ตัวอย่างน้ำหนัก 10.012 g	20715	20516	20098

นำค่าพื้นที่พีคของตัวอย่างมาแทนในสมการของกราฟมาตรฐาน $y = 6628.8x - 89.368$

<u>ตัวอย่าง</u> หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 จากการฉีดครั้งที่ 1

$$y = 6628.8(18776) - 89.368$$

$$= 2.846 \text{ mg/L}$$

คำนวณหาปริมาณวิตามินอี ใน 15 mL (จากตัวอย่างน้ำหนัก 10.011 g)

ตัวอย่าง 1000 mL มีปริมาณวิตามินอี 2.846 mg

ตัวอย่าง 15 mL มีปริมาณวิตามินอี (2.846)(15)/1000 mg

= 0.4269 mg/15 mL

คำนวณหาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่าง 100 g (จากตัวอย่างที่ชั่งมาน้ำหนัก 10.011 g)

ตัวอย่าง 10.011 g มีปริมาณวิตามินอี 0.04269 mg

ตัวอย่าง 100 g มีปริมาณวิตามินอี (0.04269)(100)/10.011 mg

= 0.4264 mg

* ปริมาณวิตามินอีจากตัวอย่างอื่นสามารถคำนวณได้จากตัวอย่างข้างต้นนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1

ครั้งที่	พันธุ์ชัยนาท 1	
	ข้าวกล้อง	ข้าวกล้องงอก
	mg/100 g	mg/100 g
1	0.4264	0.4701
2	0.4263	0.4656
3	0.4266	0.4562
Mean	0.4264	0.4640
SD	0.0002	0.0071
%RSD	0.0351	1.5326

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณวิตามินอีจากตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 และพันธุ์กข 23 ด้วยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐานที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

ตารางที่ ข.4 พื้นที่พีคเฉลี่ยของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีชุดการทดลองที่ 2 ช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0.5	4104	4458	4231
1	10022	10022	10293
2.5	22953	23354	22850
5	51475	53101	53345
10	104681	111016	105888

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105 และ กข 23

ตัวอย่าง	พันธุ์ข้าว	พื้นที่พีค (AU)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ข้าวกล้อง	ดอกมะลิ 105 ตัวอย่างน้ำหนัก 10.023 g	16094	16256	16182
	กข 23 ตัวอย่างน้ำหนัก 10.093 g	7810	8038	7968
ข้าวกล้องงอก	ดอกมะลิ 105 ตัวอย่างน้ำหนัก 10.012 g	17724	17806	17794
	กข 23 ตัวอย่างน้ำหนัก 10.062 g	8400	8292	8468

* ปริมาณวิตามินอีจากตัวอย่างอื่นสามารถคำนวณได้จากตัวอย่างก่อนหน้านี้

ตารางที่ ข.6 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105

ครั้งที่	พันธุ์ดอกมะลิ 105	
	ข้าวกล้อง	ข้าวกล้องงอก
	mg/100 g	mg/100 g
1	0.2471	0.2698
2	0.2493	0.2710
3	0.2483	0.2708
Mean	0.2482	0.2705
SD	0.0011	0.0006
%RSD	0.4498	0.2257

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวพันธุ์กข 23

ครั้งที่	พันธุ์กข 23	
	ข้าวกล้อง	ข้าวกล้องงอก
	mg/100 g	mg/100 g
1	0.1321	0.1406
2	0.1352	0.1391
3	0.1343	0.1415
Mean	0.1339	0.1404
SD	0.0016	0.0012
%RSD	1.1930	0.8666

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

การคำนวณปริมาณวิตามินอี ด้วยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน

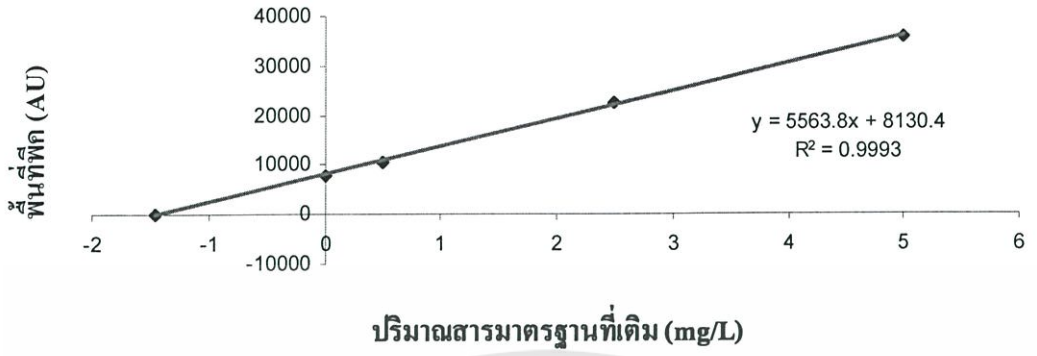
ตัวอย่างการคำนวณปริมาณวิตามินอีจากตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ด้วยเทคนิคการเติมสารมาตรฐานที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

ตารางที่ ค.1 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน

ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (ppm)	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
-1.46	0	0	0
0	7904	7780	7913
0.5	10782	10389	10615
2.5	22650	22804	22434
5	35980	35166	35906
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 1	1.46 mg/L	-	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 2	-	1.49 mg/L	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 3	-	-	1.43 mg/L

1.สร้างกราฟการเติมสารมาตรฐาน กำหนดให้ แกน x คือ ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม
แกน y คือ พื้นที่พีคเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.1 กราฟการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 จากการฉีดครั้งที่ 1

2. คำนวณหาปริมาณวิตามินอี ในหน่วยต่างๆ

ตัวอย่าง หาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 จากการฉีดครั้งที่ 1

คำนวณหาปริมาณวิตามินอี ใน 2 mL

จากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

เมื่อ M_1 คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

V_1 คือ ปริมาตรของรวมของสารมาตรฐานและตัวอย่าง

M_2 คือ ความเข้มข้นของตัวอย่าง

V_2 คือ ปริมาตรของตัวอย่าง

$(1.46\ mg/L)(2\ mL) = (M_2)(1\ mL)$

$M_2 = 2.92\ mg/L$

คำนวณหาปริมาณวิตามินอี ใน 15 mL (จากตัวอย่างน้ำหนัก 10.011 g)

ตัวอย่าง 1000 mL มีปริมาณวิตามินอี 2.92 mg

ตัวอย่าง 15 mL มีปริมาณวิตามินอี (2.92)(15)/1000 mg

= 0.0438 mg/15 mL

คำนวณหาปริมาณวิตามินอีในตัวอย่าง 100 g (จากตัวอย่างที่ชั่งมาน้ำหนัก 10.011 g)

ตัวอย่าง 10.011 g มีปริมาณวิตามินอี 0.0438 mg

ตัวอย่าง 100 g มีปริมาณวิตามินอี (0.0438)(100)/10.011 mg

= 0.4375 mg

* ปริมาณวิตามินอีจากตัวอย่างอื่นสามารถคำนวณได้จากตัวอย่างข้างต้นนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ชัยนาท 1 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน

ครั้งที่	ปริมาณวิตามินอี mg/100 g
1	0.438
2	0.446
3	0.428
Mean	0.438
SD	0.009
%RSD	2.055

ตารางที่ ค.3 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1ที่มีการเติมสารมาตรฐาน จากตัวอย่างน้ำหนัก 10.012

ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (ppm)	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
-1.55	0	0	0
0	8907	8850	8722
0.5	11624	13946	13197
2.5	23753	26134	22134
5	40237	41895	38805
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 1	1.29 mg/L	-	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 2	-	1.73 mg/L	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 3	-	-	1.65 mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.4 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ชัยนาท 1 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน

ครั้งที่	ปริมาณวิตามินอี mg/100 g
1	0.386
2	0.518
3	0.494
Mean	0.466
SD	0.070
%RSD	15.056

ตารางที่ ค.5 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน จากตัวอย่างน้ำหนัก 10.023

ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (ppm)	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
-0.84	0	0	0
0.5	15551	15206	16149
2.5	33568	34006	33344
5	63870	63901	63643
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 1	0.82 mg/L	-	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 2	-	0.80 mg/L	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 3	-	-	0.88 mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.6 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน

ครั้งที่	ปริมาณวิตามินอี mg/100 g
1	0.245
2	0.239
3	0.263
Mean	0.249
SD	0.012
%RSD	4.996

ตารางที่ ค.7 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่มีการเติมสารมาตรฐานจากตัวอย่างน้ำหนัก 10.012

ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (ppm)	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
-0.92	0	0	0
0.5	18286	17949	17504
2.5	36540	36990	37649
5	69907	69899	69793
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 1	0.93 mg/L	-	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 2	-	0.91 mg/L	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 3	-	-	0.90 mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.8 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน

ครั้งที่	ปริมาณวิตามินอี mg/100 g
1	0.279
2	0.273
3	0.270
Mean	0.274
SD	0.004
%RSD	1.672

ตารางที่ ค.9 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่มีการเติมสารมาตรฐานจากตัวอย่างน้ำหนัก 10.093

ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (ppm)	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
-0.26	0	0	0
0.5	6781	6897	6811
2.5	29243	29532	29861
5	52638	52812	52386
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 1	0.24 mg/L	-	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 2	-	0.26 mg/L	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 3	-	-	0.28mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.10 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องพันธุ์กข 23 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน

ครั้งที่	ปริมาณวิตามินอี mg/100 g
1	0.071
2	0.077
3	0.083
Mean	0.077
SD	0.006
%RSD	7.692

ตารางที่ ค.11 พื้นที่พีคของตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่มีการเติมสารมาตรฐานจากตัวอย่างน้ำหนัก 10.062

ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (ppm)	พื้นที่พีค (AU)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
-0.48	0	0	0
0.5	8715	8954	8861
2.5	32066	32468	33612
5	55293	54899	56103
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 1	0.44 mg/L	-	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 2	-	0.49 mg/L	-
ปริมาณวิตามินอีครั้งที่ 3	-	-	0.48 mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.12 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องงอกพันธุ์กข 23 ที่มีการเติมสารมาตรฐาน

ครั้งที่	ปริมาณวิตามินอี mg/100 g
1	0.131
2	0.146
3	0.143
Mean	0.140
SD	0.008
%RSD	0.111

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

การคำนวณขีดจำกัดการตรวจวัด

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

สูตรการคำนวณและวิธีทดสอบ

1.เตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่แน่นอนต่างๆกัน แล้วนำไปทำการทดลองนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่พีคของสารมาตรฐานที่วัดได้ สามารถหาความชันของกราฟได้จากสมการ

$$Y = bX + a$$

เมื่อ b คือ ความชันของกราฟ

a คือ จุดตัดแกน y

2.เมื่อหาความเข้มข้นของกราฟได้แล้ว นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าสัญญาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้และขีดจำกัดการตรวจวัดจากสูตร

สัญญาณต่ำสุดที่วัดได้ $Y = Y_B + 3S_B$

เมื่อ 3 คือ ค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 99% 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 คือ ค่าเฉลี่ยของสัญญาณจาก Blank

S_B คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Blank

LOD คือความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้

b คือ ความชันของกราฟ (สภาพไว)

3.เมื่อคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัดได้แล้ว นำค่าที่ได้มาหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ โดยมีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (Limit Of Quantitation, LOQ)

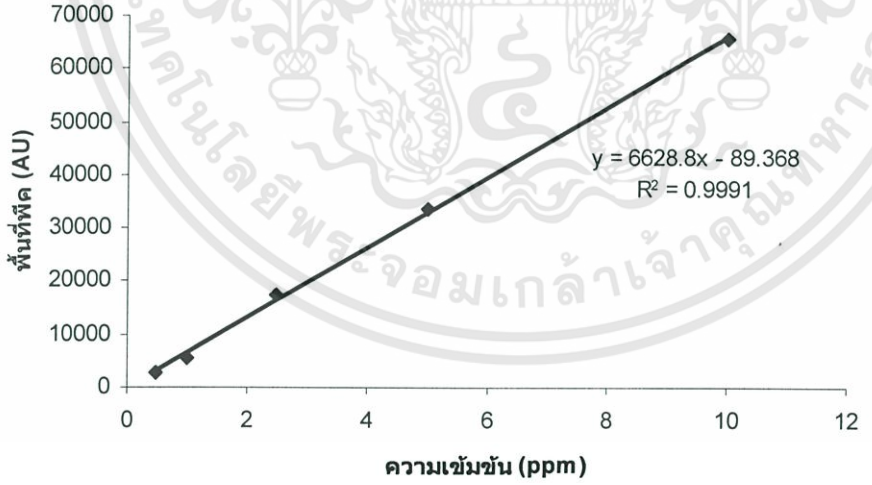
จากสูตร $LOQ = 10S_{y/x} / b$

การคำนวณขีดจำกัดการตรวจวัดสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เมื่อทำการวัดสารมาตรฐานวิตามินอีและตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆสามารถสรุปเป็นตารางได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.1 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินอีของชุดการทดลองที่ 1 โดยทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm ในเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่พีค (AU)			Mean	SD	RSD (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
0.5	2936	2953	2917	2935.3333	18.0093	0.61
1	5641	5711	5682	5678	35.1710	0.62
2.5	17287	17545	17369	17400.3333	131.8231	0.76
5	33862	31584	35890	33778.6667	2154.2092	6.38
10	65531	65490	66101	65707.3333	341.5411	0.52



รูปที่ ง.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีกับพื้นที่พีคเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ 1

Xi	Xi^2	Yi	Y^i	|Yi - Y^i|	$(Yi - Y^i)^2$
0.5	0.25	2935.333	3225.032	-289.699	83925.31766
1	1	5678	6539.432	-861.432	742065.0906
2.5	6.25	17400.33	16482.63	917.7013	842175.7311
5	25	33778.67	33054.63	724.0347	524226.2034
10	100	65707.33	66198.63	-491.299	241374.3831

$\sum Xi^2 = 132.5$ $\sum (Yi - Y^i)^2 = 2433766.726$

เมื่อ Xi คือ ความเข้มข้นที่แท้จริง

$Y^i = 6628.8Xi - 89.368$

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

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

$$= \sqrt{2433766.726 / 3}$$

$$= 900.6973$$

เพราะฉะนั้น $LOD = (3 \times 900.6973) / 6628.3$

ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัดได้ $LOD \cong 0.407$ mg/L

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

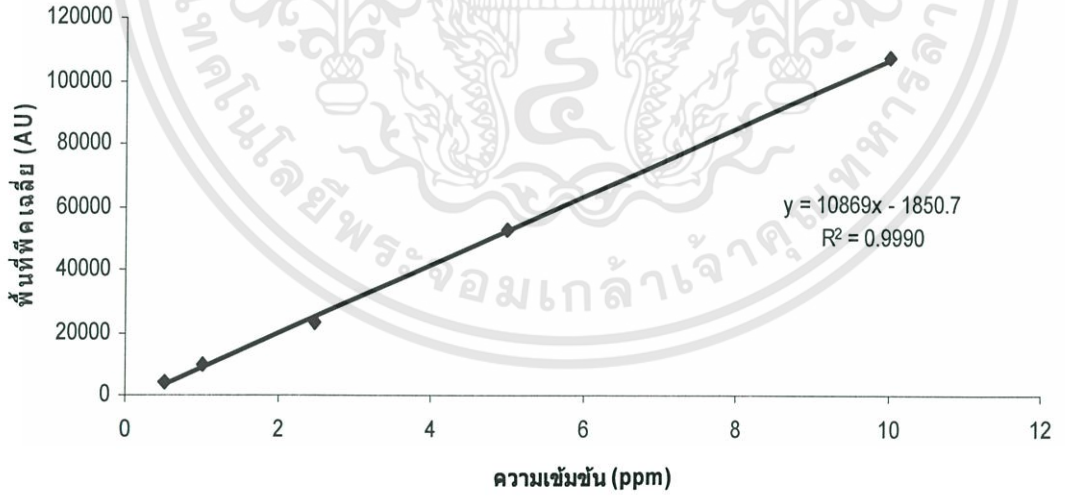
ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถวิเคราะห์ได้ $LOQ = (10 \times 900.6973) / 6628.3$

$\cong 1.359$ mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.3 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินอีของชุดการทดลองที่ 2 โดยทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.5-10 ppm ในเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่พีค (AU)			Mean	SD	RSD (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
0.5	2936	2953	2917	2935.3333	18.0093	0.61
1	5641	5711	5682	5678	35.1710	0.62
2.5	17287	17545	17369	17400.3333	131.8231	0.76
5	33862	31584	35890	33778.6667	2154.2092	6.38
10	65531	65490	66101	65707.3333	341.5411	0.52



รูปที่ ง.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินอี ชุดการทดลองที่ 2 โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.4 ผลความผิดพลาดของเครื่องมือวิเคราะห์จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินอีกับพื้นที่เฉลี่ยของชุดการทดลองที่ 2

Xi	Xi^2	Yi	Y^i	|Yi - Y^i|	$(Yi - Y^i)^2$
0.5	0.25	4264.333	3583.8	680.5333	463125.5724
1	1	10112.33	9018.3	1094.033	1196908.205
2.5	6.25	23052.33	25321.8	-2269.467	5150480.464
5	25	52640.33	52494.3	146.033	21325.63709
10	100	107195	106839.3	355.7	126522.49

$\sum Xi^2 = 132.5$ $\sum (Yi - Y^i)^2 = 6958362.369$

เมื่อ Xi คือ ความเข้มข้นที่แท้จริง

$Y^i = 10869Xi - 1850.7$

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

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

$$= \sqrt{6958362.369 / 3}$$

$$= 1522.975$$

เพราะฉะนั้น $LOD = (3 \times 1522.975) / 10869.7$

ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัดได้ $LOD \cong 0.420$ mg/L

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

ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถวิเคราะห์ได้ $LOQ = (10 \times) / 10869.7$

$\cong 1.401$ mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.

การคำนวณค่า t-test จากผลการวิเคราะห์

การเปรียบเทียบความแตกต่างของวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณระหว่างเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐานกับเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน

ตารางที่ จ.1 ปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างข้าวกล้องที่วิเคราะห์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอล : อะซีโทไนไทรล์ 50 : 50 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 20 ไมโครลิตร

พันธุ์	ปริมาณวิตามินอี (mg/100g)					
	External Standard			Standard Addition		
	Mean	SD	%RSD	Mean	SD	%RSD
ชัยนาท 1	0.4264	0.0002	0.04	0.4375	0.0090	2.05
ดอกมะลิ 105	0.2482	0.0011	0.45	0.2494	0.0125	4.99
กข 23	0.1339	0.0012	1.19	0.0773	0.0059	7.69

ตัวอย่าง เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ระหว่างเทคนิค การสร้างกราฟมาตรฐาน กับเทคนิคการเติมสารมาตรฐานของตัวอย่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1

ขั้นที่ 1 ตั้งสมมติฐาน $H_0 : \mu_{\text{External Standard}} = \mu_{\text{Standard Addition}}$ $\quad \bar{x}_1 = 0.4263 , S_1 = 0.000150$

$H_1 : \mu_{\text{External Standard}} \neq \mu_{\text{Standard Addition}}$ $\quad \bar{x}_2 = 0.43751, S_2 = 0.00899$

เมื่อ $\alpha = 0.01$

ขั้นที่ 2 ทดสอบความเท่ากันของความแปรปรวน

$$H_0 : \sigma^2_{\text{External Standard}} = \sigma^2_{\text{Standard Addition}}$$

$$H_1 : \sigma^2_{\text{External Standard}} \neq \sigma^2_{\text{Standard Addition}}$$

$$F_c = \frac{\text{larger sample variance}}{\text{smaller sample variance}} = S^2_2 / S^2_1 = 3592$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่ 3 อ่านค่า F ตารางที่ 3-1 = 2 และ 3-1 = 2 degree of freedom

$$F_{t,(2,2\ df),\ 0.05} = 19$$

$$F_t < F_c \ ;$$ ปฏิเสธ H_0

ขั้นที่ 4 คำนวณค่า t_c

แทนค่า $\bar{x}_1$, $\bar{x}_2$, S^2_1, S^2_2, n_1, n_2

$$t_c = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = -2.159$$

ขั้นที่ 5 คำนวณค่า t_t จากสูตร v df ($\alpha = 0.01$)

แทนค่า S^2_1, S^2_2, n_1, n_2

$$v = \frac{\left[\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right]^2}{\frac{\left[\frac{s^2_1}{n_1}\right]^2}{n_1 - 1} + \frac{\left[\frac{s_2^2}{n_2}\right]^2}{n_2 - 1}} = \infty$$

$$t_{t,\ v\ df,\ \alpha/2} = t_{t,\ \infty\ df,\ 0.005} = 2.576$$

ขั้นที่ 6 สรุปผล ยอมรับ H_0

ดังนั้นผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่ต่างกันที่ระดับความมั่นใจที่ 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้