การพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเคในตัวอย่างนม โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL PROCEDURES FOR THE ANALYSIS OF VITAMIN K IN MILK BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

อมรรัตน์ พิกุลทอง

AMORNRAT PIGOOLTHONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาการศึกษาวิทยาศาสตร์ (เคมี)
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2547

ISBN 974-9708-32-6

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเคในตัวอย่างนม โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL PROCEDURES FOR THE ANALYSIS OF VITAMIN K IN MILK BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

อมรรัตน์ พิกุลทอง
AMORNRAT PIGOOLTHONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาการศึกษาวิทยาศาสตร์ (เคมี)
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2547

ISBN 974-9708-32-6

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 51521
วัน,เดือน,ปี 2 2 ก.ค. 2547

.b.....
.i.....

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL PROCEDURES FOR THE ANALYSIS OF VITAMIN K IN MILK BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

AMORNRAT PIGOOLTHONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN SCIENCE EDUCATION (CHEMISTRY)

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2004
ISBN 974-9708-32-6

COPYRIGHT 2004
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเคในตัวอย่างนมโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL PROCEDURES FOR THE ANALYSIS OF VITAMIN K IN MILK BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ชื่อนักศึกษา นางสาวอมรรัตน์ พิกุลทอง

รหัสประจำตัว 42064222

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา การศึกษาวิทยาศาสตร์

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร.เผชิญชัย ไชยสิทธิ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุวรรณ	ไชยสิทธิ์	
ผศ.ดร.เผชิญชัย	ไชยสิทธิ์	
รศ.ดร.รวีวรรณ	ชินะตระกูล	
ดร.ปิ่นมณี	ขวัญเมือง	
ผศ.ดร.วิไลพร	วรจิตตานนท์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 2 เมษายน 2547 เวลา 10.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้องสมาคมศิษย์เก่าบัณฑิตศึกษา คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ดร.จารุวัตร จริญญุบ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 28 **เดือน** เมษายน **พ.ศ.** 2547

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเค ในตัวอย่างนม โดยเทคนิค HPLC
นักศึกษา	อมรรัตน์ พิกุลทอง
รหัสประจำตัว	42064222
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.เผชิญชัย ไชยสิทธิ์

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์วิตามินเคในตัวอย่างนมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผง โดยใช้แอลกอฮอล์บริสุทธิ์และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 ทำปฏิกิริยาสพอนิฟิเคชัน ใช้เฮกเซนสกัดวิตามินเคออกมา แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์แบบ reversed phase วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 5–40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในตัวอย่างนมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผงเท่ากับ 0, 0-0.74 และ 0–5.41 ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0, 0–10.66 และ 0–50.25 % ตามลำดับ ค่าการกลับคืนร้อยละ 76.42, 73.26 และ 56.78–70.06 ตามลำดับ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (3 SD) เท่ากับ 3.76 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม และขีดจำกัดในการวิเคราะห์ปริมาณ (10 SD) เท่ากับ 5.72 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานพบว่าผลการทดลองระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาปริมาณวิตามินเคทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกัน

Thesis Title	Development of Analytical Procedures for the Analysis of Vitamin K in Milk by High Performance Liquid Chromatography
Student	Miss. Amornrat Pigoolthong
Student ID	42064222
Degree	Master of Science
Programme	Science Education
Year	2004
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Suwan Chaiyasith
Thesis Co-Advisor	Asst. Prof. Dr. Pachernchai Chaiyasith

ABSTRACT

The purposes of this study were to study the development of analytical procedures for the analysis of vitamin K in milk by High Performance Liquid Chromatography. In this method, the sample is saponified with alcoholic alkaline solution. Vitamin K is extracted with *n*-hexane and determined by reversed phase-HPLC with UV-VIS detector, at 272 nm. The relationship between the concentration of vitamin K and peak height is linear in the range of 5-40 µg /ml with the regression coefficient 0.9997. The standard deviations of condensed milk, drinking yogurt and milk powder are 0, 0-0.74 and 0–5.41 respectively. The relative standard deviation or coefficient of variation are 0, 0–10.66 and 0–50.25 %. The recovery of condensed milk, drinking yogurt and milk powder are 76.42, 73.26 and 56.78–70.06 % respectively. The limit of detection is 3.76 µg / 100 g and the limit of quantitation is 5.72 µg / 100 g. The comparison of the result which analyzed by development of analytical procedure method and the AOAC method showed good agreement.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุวรรณ ไชยสิทธิ์ และผศ.ดร. เผชิญชัย ไชยสิทธิ์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์และกรุณาให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และช่วยตรวจสอบแก้ไข ตลอดจนปรับปรุงข้อบกพร่องต่างๆ จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. รวีรวรณ ชินะตระกูล ผศ.ดร. วิไลพร วรจิตตานนท์ และ ดร. ปิ่นมณี ขวัญเมือง คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่อง เพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนข้อคิดต่างๆ อันก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้าและเป็นแนวทางในการจัดทำวิทยานิพนธ์จนประสบความสำเร็จ

ขอขอบพระคุณ คุณสุรพล วัฒนวงศ์ อดีตผู้อำนวยการศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา คุณวันทนา สะสมทรัพย์ รักษาการผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์และดร.จิตรา ชัยวิมล รักษาการหัวหน้าห้องปฏิบัติการชีวเคมีและจุลชีววิทยา ที่ให้โอกาสและสนับสนุน ให้ใช้เวลาทำงานบางส่วนให้ความอนุเคราะห์ใช้สถานที่และเครื่องมือที่ใช้สำหรับการศึกษาวิจัยจนสำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ซึ่งเป็นที่รักและเคารพอย่างยิ่ง คุณสุวัฒน์ชัย ทองน้อย ที่คอยดูแลสุขภาพ รวมทั้งพี่ น้องและเพื่อนทุกคนที่ได้ให้กำลังใจและช่วยเหลือมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ทุกๆท่านที่ปรารถนาดี ที่ผู้วิจัยไม่ได้กล่าวไว้ในที่นี้ ที่ให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ด้วยดีตลอดมา

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยกำลังใจ และความช่วยเหลือ จากทุกๆท่านทั้งที่ได้กล่าวและไม่ได้กล่าวไว้ในที่นี้ คุณค่าและประโยชน์ที่เป็นผลจากวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ครู - อาจารย์และทุกๆท่านด้วยความเต็มใจและเคารพ

อมรรัตน์ พิกุลทอง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญภาพ.....IX

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....4

1.3 สมมุติฐานงานวิจัย.....4

1.4 กรอบแนวคิดที่ใช้การวิจัย.....4

1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....4

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้นของการวิจัย.....5

1.7 นิยามศัพท์.....6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....8

2.1 วิตามิน.....8

2.2 เทคนิค HPLC.....10

2.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี.....19

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....26

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....27

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง.....27

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....27

3.3 การดำเนินการทดลอง.....28

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....34

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และอภิปรายผล.....36

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....46

5.1 สรุปผลการวิจัย.....46

5.2 ข้อเสนอแนะ.....47

บรรณานุกรม.....48

ภาคผนวก.....50

ภาคผนวก ก. แสดงผลการทดลอง.....51

ภาคผนวก ข. แสดงวิธีการคำนวณ.....148

ประวัติผู้เขียน.....152

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 แสดงปริมาณสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปี ขึ้นไป.....1

1.2 แสดงกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....5

2.1 แสดงเกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของค่าการกลับคืน.....24

2.2 แสดงเกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของค่าการทำซ้ำ.....25

4.1 แสดงผลการทดลองในตัวอย่างนมข้น.....38

4.2 แสดงการทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมข้น.....39

4.3 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตัวอย่างนมข้น.....39

4.4 แสดงผลการทดลองในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที.....40

4.5 แสดงการทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที.....41

4.6 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที.....42

4.7 แสดงผลการทดลองในตัวอย่างนมผง.....42

4.8 แสดงการทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมผง.....44

4.9 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตัวอย่างนมผง.....45

ก.1 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 1.....52

ก.2 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 2.....54

ก.3 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 3.....56

ก.4 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 4.....58

ก.5 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 5.....60

ก.6 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมข้น.....62

ก.7 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 1.....64

ก.8 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 2.....66

ก.9 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 3.....68

ก.10 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 4.....70

ก.11 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 5.....72

ก.12 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมข้น.....74

ก.13 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 1.....76

ก.14 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 2.....78

ก.15 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 3.....80

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ก.16 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 4.....82

ก.17 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 5.....84

ก.18 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที.....86

ก.19 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 1.....88

ก.20 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 2.....90

ก.21 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 3.....92

ก.22 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 4.....94

ก.23 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 5.....96

ก.24 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที....98

ก.25 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 1.....100

ก.26 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 2.....102

ก.27 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 3.....104

ก.28 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 4.....106

ก.29 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 5.....108

ก.30 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 6.....110

ก.31 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 7.....112

ก.32 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 8.....114

ก.33 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 9.....116

ก.34 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 10.....118

ก.35 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมผงที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....119

ก.36 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมผงที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....121

ก.37 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมผงที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....122

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ก.38 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 1.....124

ก.39 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 2.....126

ก.40 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 3.....128

ก.41 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 4.....130

ก.42 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 5.....132

ก.43 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 6.....134

ก.44 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 7.....136

ก.45 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 8.....138

ก.46 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 9.....140

ก.47 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่10.....142

ก.48 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมผง ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....144

ก.49 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมผง ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....145

ก.50 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมผง ที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....146

ก.51 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....147

ก.52 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....147

สารบัญรูป

รูปที่.....หน้า

2.1 แสดงโครงสร้างวิตามินเค 1.....9

4.1 แสดงการหา System Linearity ของวิธีมาตรฐาน.....36

4.2 แสดงการหา System Linearity ของวิธีมาตรฐานโดยปรับปรุงค่า r^2.....37

4.3 แสดงการหา System Linearity ของวิธีที่พัฒนาขึ้นมา.....37

ก.1 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....51

ก.2 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 1.....51

ก.3 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....53

ก.4 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 2.....53

ก.5 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....55

ก.6 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 3.....55

ก.7 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....57

ก.8 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 4.....57

ก.9 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....59

ก.10 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 5.....59

ก.11 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....61

ก.12 แสดงโครมาโทแกรมการหาประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมข้น.....61

ก.13 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....63

ก.14 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 1.....63

ก.15 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....65

ก.16 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 2.....65

ก.17 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....67

ก.18 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 3.....67

ก.19 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....69

ก.20 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 4.....69

ก.21 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....71

ก.22 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 5.....71

ก.23 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....73

ก.24 แสดงโครมาโทแกรมการหาประสิทธิภาพของวิธีพัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมข้น.....73

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่.....หน้า

ก.25 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....75

ก.26 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 1.....75

ก.27 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....77

ก.28 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 2.....77

ก.29 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....79

ก.30 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 3.....79

ก.31 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....81

ก.32 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 4.....81

ก.33 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....83

ก.34 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 5.....83

ก.35 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....85

ก.36 แสดงโครมาโทแกรมการหาประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที.85

ก.37 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....87

ก.38 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 1.....87

ก.39 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....89

ก.40 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 2.....89

ก.41 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....91

ก.42 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 3.....91

ก.43 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....93

ก.44 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 4.....93

ก.45 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....95

ก.46 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 5.....95

ก.47 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....97

ก.48 แสดงโครมาโทแกรมการหาประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที97

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่.....หน้า

ก.49 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....99

ก.50 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 1.....99

ก.51 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....101

ก.52 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 2.....101

ก.53 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....103

ก.54 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 3.....103

ก.55 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....105

ก.56 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 4.....105

ก.57 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....107

ก.58 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 5.....107

ก.59 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....109

ก.60 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 6.....109

ก.61 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....111

ก.62 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 7.....111

ก.63 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....113

ก.64 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 8.....113

ก.65 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....115

ก.66 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 9.....115

ก.67 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....117

ก.68 แสดงโครมาโทแกรมวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 10.....117

ก.69 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค.....120

ก.70 แสดงโครมาโทแกรมการหาประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมผง.....120

ก.71 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....123

ก.72 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 1.....123

ก.73 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....125

ก.74 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 2.....125

ก.75 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....127

ก.76 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 3.....127

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่.....หน้า
ก.77 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....129
ก.78 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 4.....129
ก.79 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....131
ก.80 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 5.....131
ก.81 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....133
ก.82 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 6.....133
ก.83 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....135
ก.84 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 7.....135
ก.85 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....137
ก.86 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 8.....137
ก.87 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....139
ก.88 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 9.....139
ก.89 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....141
ก.90 แสดงโครมาโทแกรมวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 10.....141
ก.91 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามิน.....143
ก.92 แสดงโครมาโทแกรมการประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมผง.....143

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันประเทศไทยมีการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น ทำให้เกิดการแข่งขันในเชิงธุรกิจตามไปด้วย ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จึงได้มีการเติมสารอาหารต่างๆ ลงไปในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นเพื่อให้เกิดความยุติธรรมทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 182 (พ.ศ. 2541) เรื่องฉลากโภชนาการ โดยมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 8 ธันวาคม 2541 สารอาหารซึ่งบังคับให้ต้องแสดงทั้งสิ้นมี 15 รายการ ได้แก่ พลังงานทั้งหมด พลังงานจากไขมัน ไขมันทั้งหมด ไขมันอิ่มตัว โคเลสเตอรอล โปรตีน คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ใยอาหาร น้ำตาล โซเดียม แคลเซียม เหล็ก วิตามินเอ วิตามินบี 1 และ วิตามินบี 2 (กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2545 : 1)

สารอาหารที่แนะนำให้บริโภคประจำวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการแสดงคุณค่าทางโภชนาการบนฉลากของอาหาร หรือที่เรียกว่า "ฉลากโภชนาการ" โดยเลือกค่าสูงสุดจากค่าที่แนะนำสำหรับคนอายุ 20-29 ปี ทั้งหญิงและชาย โดยกำหนดให้ค่าความต้องการพลังงานวันละ 2,000 กิโลแคลอรี เป็นระดับที่คนไทยส่วนใหญ่ที่มีสภาวะทางสุขภาพปกติต้องการเป็นฐานหรือเป็นตัวเลขกลางในการคำนวณ เพื่อวัตถุประสงค์ในการแสดงฉลากโภชนาการเท่านั้น

ตารางที่ 1.1 แสดงปริมาณสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคสำหรับคนไทยตั้งแต่อายุ 6 ปีขึ้นไป

ลำดับที่	สารอาหาร	ปริมาณที่แนะนำต่อวัน	หน่วย
1	ไขมันทั้งหมด	65	กรัม
2	ไขมันอิ่มตัว	20	กรัม
3	โคเลสเตอรอล	300	มิลลิกรัม
4	โปรตีน	50	กรัม
5	คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	300	กรัม
6	ใยอาหาร	25	กรัม
7	วิตามินเอ	800	ไมโครกรัม
8	วิตามินบี 1	1.5	มิลลิกรัม
9	วิตามินบี 2	1.7	มิลลิกรัม

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

ลำดับที่	สารอาหาร	ปริมาณที่แนะนำต่อวัน	หน่วย
10	ไนอะซิน	20	มิลลิกรัม
11	วิตามินบี 6	2	มิลลิกรัม
12	โฟลิค แอซิด	200	ไมโครกรัม
13	ไบโอติน	150	ไมโครกรัม
14	แพนโทธินิค แอซิด	6	มิลลิกรัม
15	วิตามินบี 12	2	ไมโครกรัม
16	วิตามินซี	60	มิลลิกรัม
17	วิตามินดี	5	ไมโครกรัม
18	วิตามินอี	10	มิลลิกรัม
19	วิตามินเค	80	ไมโครกรัม
20	แคลเซียม	800	มิลลิกรัม
21	ฟอสฟอรัส	800	มิลลิกรัม
22	เหล็ก	15	มิลลิกรัม
23	ไอโอดีน	150	ไมโครกรัม
24	แมกนีเซียม	350	มิลลิกรัม
25	สังกะสี	15	มิลลิกรัม
26	ทองแดง	2	มิลลิกรัม
27	โปตัสเซียม	3,500	มิลลิกรัม
28	โซเดียม	2,400	มิลลิกรัม
29	แมงกานีส	3.5	มิลลิกรัม
30	ซีลีเนียม	70	ไมโครกรัม
31	ฟลูออไรด์	2	มิลลิกรัม
32	โมลิบดินัม	160	ไมโครกรัม
33	โครเมียม	130	ไมโครกรัม
34	คลอไรด์	3,400	มิลลิกรัม

(กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2545 : 4)

จากรายงานสรุปผลของโครงการพัฒนาห้องปฏิบัติการ ซึ่งจัดโดยสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าผลการวิเคราะห์จากแต่ละห้องปฏิบัติการ ในบางรายการไม่สอดคล้องกัน ดังนั้นทางสถาบันวิจัยโภชนาการจึงจัดให้มีการประชุมร่วมระหว่างห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่เข้าร่วมโครงการ เพื่อทบทวนวิธีทดสอบที่ใช้ รวมทั้งการพิจารณาถึงปัญหา แนวทางแก้ไขและควบคุม (สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2542 : 23) ดังนั้นการวิเคราะห์สารอาหารที่เชื่อถือได้ ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว เพื่อจัดทำข้อมูลฉลากโภชนาการ จึงเป็นปัจจัยที่จำเป็นอย่างยิ่งที่จะส่งเสริมให้มีการแสดงฉลากโภชนาการ เนื่องจากผู้วิจัยเป็นบุคคลหนึ่งซึ่งรับผิดชอบการวิเคราะห์สารอาหารเพื่อแสดงบนฉลากโภชนาการ เห็นสมควรปรับปรุงพัฒนาวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลากหลาย ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารทุกชนิดจำเป็นต้องวิเคราะห์สารอาหารที่จะต้องแสดงบนฉลากโภชนาการ ตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนด และเนื่องจากการวิเคราะห์วิตามินเคเป็นรายการหนึ่งที่พบว่าผลการวิเคราะห์จากแต่ละห้องปฏิบัติการไม่สอดคล้องกัน ผู้วิจัยจึงได้ปรับปรุงพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นมา

ปัจจุบันการวิเคราะห์วิตามินเค เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้เวลานาน มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง และใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย ซึ่งใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นย่อยตัวอย่างและใช้สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและไอโซออกเทนอัตราส่วน 2 : 1 สกัดวิตามินเค แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ วิตามินเค โดยใช้แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 50 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ทำปฏิกิริยาสพอนิฟิเคชัน ใช้เฮกเซนสกัดวิตามินเค แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคHPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคHPLC เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย และสามารถแยกสารเกือบทุกชนิด เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ ได้รวดเร็ว แม่นยำ มีประสิทธิภาพสูง และสามารถวิเคราะห์ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเค ในตัวอย่างนมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผงโดยเทคนิคHPLC

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างนมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผงระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นมาโดยเทคนิคHPLCกับวิธีมาตรฐาน

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเคตามวิธีมาตรฐาน กับการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเคตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมาโดยเทคนิค HPLC มีปริมาณวิตามินเคไม่แตกต่างกัน

1.4 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย

วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน นำมาทำปฏิกิริยาสพอนิฟิเคชัน และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Ball 1988 : 141)

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 ศึกษาความเข้มข้นในระดับต่ำสุดของเทคนิค HPLC ที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเคได้

1.5.2 ศึกษาหาความถูกต้องของเทคนิค HPLC โดยรายงานในรูปของร้อยละการได้กลับคืน

1.5.3 ศึกษาหาความแม่นยำของเทคนิค HPLC โดยรายงานในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

1.5.4 ประชากรในการวิจัย ได้แก่ นมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชที และนมผง

1.5.5 กลุ่มตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างนมจากห้างสรรพสินค้า เขตบางเขนโดยใช้การสุ่มแบบกลุ่ม นมข้น 5 ตัวอย่าง นมพร้อมดื่มยูเอชที 5 ตัวอย่างและนมผง 10 ตัวอย่าง ที่ผลิตและบรรจุในประเทศไทย ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2544 ถึงเดือนตุลาคม 2546

1.5.6 ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรต้น : การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเคโดยเทคนิค HPLC

ตัวแปรตาม : ปริมาณวิตามินเค

1.5.7 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์วิตามินเค โดยอาศัยข้อมูลทางสถิติ

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

1.6.1 สถานที่ ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ห้องปฏิบัติการชีวเคมีและจุลชีววิทยา ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1.6.2 ระยะเวลาในการทดลอง

ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2544 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2547

1.6.3 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย คือนมที่ผลิตและบรรจุในประเทศไทยระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2544 ถึงเดือนตุลาคม 2546 สุ่มจากห้างสรรพสินค้าเขตบางเขนจำนวน 20 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 3 ชนิดดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 1.2 แสดงกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ชนิดตัวอย่าง	เครื่องหมายการค้า
นมข้น	1.นมข้นคืนรูปหวานไขมันเนย 9% ตราหมี 2.นมข้นแปลงไขมันหวาน สูตรน้ำมันปาล์ม ตราเบิดวิงซ์ 3.นมข้นแปลงไขมันหวาน สูตรน้ำมันปาล์มผสมมันเนย ตราเรือใบ 4.นมข้นแปลงไขมันหวาน สูตรน้ำมันปาล์มผสมมันเนย ตรามะลิ 5.นมข้นคืนรูปหวานไขมันเนย 9% ตราออร์คิด
นมพร้อมดื่มยูเอชที	1.นมคืนรูปปรุงแต่งพร้อมดื่มยูเอชที รสหวาน ตราอะแล็คต้า-เอ็นเอฟ 2.น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที ไวตามิ้ลค์ 3.นมเปรี้ยวพร้อมดื่มยูเอชที รสส้ม ตราดัชมิลล์ 4.นมปรุงแต่งพร้อมดื่มยูเอชที รสช็อคโกแลตมอลต์ ตราอะแล็คต้า-เอ็นเอฟ 5.นมเปรี้ยวพร้อมดื่มยูเอชที รสส้ม ตราไอวี่

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

ชนิดตัวอย่าง	เครื่องหมายการค้า
นมผง	1.ผลิตภัณฑ์นมชนิดละลายทันทีสูตรผสมน้ำมันสกัดจากผลิตภัณฑ์ทางทะเล สำหรับเด็กอายุ 1-3 ปี และทุกคนในครอบครัวชนิดจืด ตราเอนฟาโกร ดีเอช-1 2.นมผงปรุงแต่งกลิ่นวานิลลาสูตรผสมน้ำมันสกัดจากผลิตภัณฑ์ทางทะเล สำหรับเด็กอายุ 1-3 ปี และทุกคนในครอบครัว ตราเอนฟาโกร ดีเอช-1 3.ผลิตภัณฑ์นมชนิดผงละลายทันทีชนิดจืด ตราเอนฟาโกรดีเอช-1 4.นมผงปรุงแต่งกลิ่นวานิลลาสูตรผสมใยอาหาร5%เหมาะสำหรับเด็กอายุ 1 ปีขึ้นไป ตราอะแล็คต้า-เอ็นเอฟ 5.ผลิตภัณฑ์นมชนิดละลายทันทีชนิดจืด ตราอะแล็คต้า-เอ็นเอฟ 6.นมผงดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็กอายุตั้งแต่ 6 เดือนถึง 3 ปี ตราหมี พรีไบโอ 7.นมผงปรุงแต่งรสน้ำผึ้งสำหรับเด็กวัย 1 ปีขึ้นไปและทุกคนในครอบครัว ตราหมี พรีไบโอ1 8.นมผงธรรมดาชนิดละลายได้ทันที ตรา Po-Kids 9.นมผงดัดแปลงสำหรับทารกตั้งแต่แรกเกิดถึง 1 ปี ตราเอนฟาแล็ค 10.นมผงปรุงแต่งกลิ่นวานิลลาสูตรสำหรับเด็ก 3 ปีขึ้นไป เด็กวัยเริ่มเรียนและทุกคนในครอบครัว ตราดูเม็กซ์ 3 พลัส

1.7 นิยามศัพท์

วิตามินเค หมายถึง สารประกอบอินทรีย์จำพวกควิโนน มีชื่อเรียกว่า Phylloquinone มีสูตรโมเลกุล $C_{31}H_{46}O_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 450.7 ละลายได้ในไขมัน ในที่นี้หมายถึงวิตามินเค1

ปริมาณวิตามินเค หมายถึง ค่าที่ได้จากการวัดสัญญาณที่มีการดูดกลืนแสงโดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

ตัวอย่าง หมายถึง นมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผง ที่ผลิตและบรรจุในประเทศไทย ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2544 ถึงเดือนตุลาคม 2546

HPLC หมายถึง เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ความเข้มข้นในระดับต่ำสุด หมายถึง ความเข้มข้นของสารที่สามารถวัดได้ โดยให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของสัญญาณรบกวน

ความถูกต้องของเทคนิค หมายถึง ความใกล้เคียงกันของค่าที่วัดได้กับค่ามาตรฐาน หรือค่าจริง ของสารที่ต้องการวัด โดยเทคนิค HPLC

ความแม่นยำของเทคนิค หมายถึง ค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของกลุ่มค่าที่ทดสอบซ้ำหลายครั้งโดยเทคนิค HPLC

Sample blank หรือ Matrix blank หมายถึง blank ที่เตรียมตามขั้นตอนการทดสอบทั้งหมดโดยมี Matrix ของตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวัดหรือมีสารที่ต้องการวัดในระดับที่ต่ำกว่า LOD เพื่อตรวจสอบผลการรบกวนโดยสารอื่นที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง

Fortified blank หมายถึง Reagent blank หรือ Method blank ที่เติมสารที่ต้องการวัดที่ทราบค่าลงไป Fortified blank จะใช้ประเมินกระบวนการของวิธีทดสอบ เพื่อตรวจสอบค่าการกลับคืน

Fortified matrix หมายถึง การเติมสารที่ต้องการวัดที่ทราบค่าลงในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ เพื่อเป็นการเพิ่มสัญญาณตอบสนอง ของสารที่ต้องการวัด หรือเพื่อศึกษาค่าการกลับคืนของวิธีทดสอบ

Reference material หมายถึง วัสดุหรือสารที่มีสมบัติอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างจัดทำมาอย่างดีเพียงพอสำหรับใช้สอบเทียบอุปกรณ์สำเร็จ ใช้ในการประเมินวิธีวัดหรือใช้ในการกำหนดค่าของวัสดุต่างๆ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วิตามิน

2.2 เทคนิค HPLC

2.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วิตามิน

2.1.1 ประวัติความเป็นมา

วิตามินเป็นสารที่ทำหน้าที่ควบคุมการเผาผลาญและทำให้การใช้ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในร่างกายเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ มนุษย์และสัตว์ที่ได้รับอาหารจำพวกโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมันและน้ำ ครบถ้วน แต่ขาดวิตามินก็จะทำให้ร่างกายเกิดโรคได้ คำว่าวิตามิน (Vitamin) เดิมนั้นมีชื่อว่า Vitamine เพราะวิตามินชนิดแรกที่พบเป็นสารประกอบจำพวกเอมีนดังนั้น คำว่า ไวตอล+เอมีน จึงเป็นชื่อของ Vitamine แต่ต่อมาพบว่าสารที่เป็นวิตามินไม่ได้เป็นเอมีนเสมอไป คำว่า Vitamine จึงกลายเป็น Vitamin โดยตัด e ออกไป

วิตามินเค ได้ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1935 โดย ดร.แดม และต่อมา อาล์มควิสต์และสตอคสตัด ก็ค้นพบวิตามินนี้เช่นกัน (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. 2536 : 47)

2.1.2 คุณสมบัติของวิตามินเค

วิตามิน แบ่งออกเป็น 2 พวก

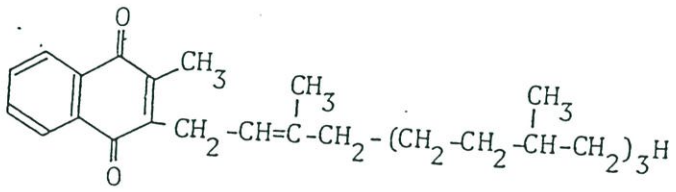
1. พวกที่ละลายในน้ำ ได้แก่ วิตามินบี วิตามินซี
2. พวกที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามินเอ ดี อี และ เค

วิตามินเค เป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกควีโนน มีหลายชนิด พบในธรรมชาติ มีอยู่ 2 ชนิด คือ วิตามินเค1 พบในอาหารประเภทผัก ผลไม้และเนื้อสัตว์ ส่วนวิตามินเค2 ร่างกายสร้างขึ้นจากแบคทีเรียในลำไส้ นอกจากนี้ ยังมีวิตามินเค3 ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ขึ้นทางเคมี มีฤทธิ์ทางชีวเคมีเป็น 2 เท่าของวิตามินเค1 และ 3 เท่าของวิตามินเค2 ตามลำดับ วิตามินเค3เป็นผงไม่ละลายน้ำ ส่วนวิตามินเค 1 เป็นน้ำมันสีเหลือง ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในแอลกอฮอล์และอีเธอร์ วิตามินเค ทนความร้อนได้ดี แต่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยกรด ด่าง แสงสว่างและถูกออกซิไดซ์ (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. 2536 : 49)

2.1.3 แหล่งที่พบ

วิตามินชนิดนี้ พบในอาหารประเภทดอกกะหล่ำ ถั่วเหลือง ผักโขม ผลไม้ ข้าว คะน้า ตำลึงกะหล่ำปลี หญ้าแอลฟาฟา บร็อคโคลี ผักกาดเขียว แครอท นอกจากนี้ยังพบในอาหารที่มาจากสัตว์ได้แก่ ตับ ไข่แดง เนยแข็งและโยเกิร์ต เป็นต้น (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. 2536 : 47)

2.1.4 โครงสร้าง วิตามินเค1



รูปที่ 2.1 วิตามินเค 1 (Phylloquinone, $C_{31}H_{46}O_2$) น้ำหนักโมเลกุล 450.7
(สรรเสริญ ทรัพย์โตษก. 2531 : 370)

2.1.5 ประโยชน์และหน้าที่

วิตามินเคมีความสำคัญสำหรับการดำรงชีวิตและการรักษาสุขภาพ ช่วยในการสร้างสารจำเป็นบางชนิดในตับ ซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้เลือดแข็งตัวเมื่อมีบาดแผล ถ้าร่างกายได้รับไม่เพียงพอจะทำให้เลือดไหลไม่หยุดเมื่อมีบาดแผล เลือดแข็งตัวช้า หน้าที่ในการสร้างโปรทอมบินของตับผิดปกติ เลือดกำเดาไหล เลือดออกตามเหงือก ลำไส้และระบบปัสสาวะ ในกรณีที่ขาดรุนแรงอาจมีการตกเลือดในสมอง การขาดวิตามินเคส่วนใหญ่เกิดเนื่องจากความผิดปกติของการดูดซึมสารอาหารในระบบลำไส้ นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะบางชนิดมีผลทำลายเชื้อจุลินทรย์ที่สร้างวิตามินเค หรืออาจเกิดได้ในกรณีที่เกิดจากการผิดปกติในตับและร่างกายท้องเสียอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันพบว่าวิตามินเคมีคุณสมบัติสำคัญต่อกระดูก จึงได้นำมาใช้กับการรักษาโรคกระดูก (สรรเสริญ ทรัพย์โตษก. 2531 : 370)

2.1.6 ความต้องการของร่างกาย

ขนาดของความต้องการจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับความสามารถในการสังเคราะห์ภายในลำไส้ของแต่ละคน เนื่องจากแบคทีเรียที่อยู่บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลายสามารถสังเคราะห์วิตามินเคได้เอง ในการดูดซึมต้องอาศัยส่วนประกอบจากน้ำดี และน้ำย่อยจากตับอ่อน เช่นเดียวกับการดูดไขมัน แต่เนื่องจากการดูดซึมไขมันส่วนใหญ่เกิดขึ้นในบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น ทำให้วิตามินเคที่สังเคราะห์ได้เองนี้ถูกนำไปใช้ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น (สรรเสริญ ทรัพย์โตษก. 2531 : 370)

ทารกที่คลอดใหม่ๆ ซึ่งได้รับวิตามินเคผ่านรกเข้าไปทั้งยังกินอาหารได้ไม่มากนัก แบคทีเรียในลำไส้ยังไม่พร้อมที่จะสังเคราะห์วิตามินเค ในระยะ 2-3 วันแรก ทำให้เด็กมีอาการตกเลือดตามผิวหนัง ดังนั้นถ้าเป็นเด็กแรกเกิดแนะนำให้กินขนาด 2.0 มิลลิกรัม หรือฉีดเข้ากล้าม 1.0 มิลลิกรัม ภายใน 6 เดือน หลังคลอด นอกจากนั้นแล้วควรให้ 10-15 ไมโครกรัมต่อวัน จนอายุ 1 ขวบ สำหรับผู้ใหญ่ควรได้รับ 60-80 ไมโครกรัมต่อวัน

2.2 เทคนิค HPLC

2.2.1 นิยามและความหมาย

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่างไประหว่างสองเฟส คือเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวกับอีกเฟสหนึ่ง ซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุงที่บรรจุในคอลัมน์หรือเคลือบแผ่นกระจกหรือเคลือบบนแผ่นกระดาษ เฟสอยู่กับที่ทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกัน ขึ้นกับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่ทำหน้าที่ในการชะล้างหรือพาสารเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ ขณะที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่

2.2.2 หลักการของ HPLC

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็น Column Liquid Chromatography แบบใหม่ ซึ่งได้มีการพัฒนามาตั้งแต่ ปีค.ศ.1969 โดยพัฒนาเกี่ยวกับคอลัมน์คือลดขนาดอนุภาคของวัสดุบรรจุลงเหลือประมาณ 3-10 μm ดังนั้นการที่จะให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ได้ต้องอาศัยเครื่องปั๊มที่มีแรงดันสูงช่วยในการแยกส่วนประกอบต่างๆ ออกจากของผสมโดยใช้เฟสเคลื่อนที่พาของผสมให้เคลื่อนที่ไปบนเฟสนิ่ง การแยกของผสมอาศัยการดูดซับหรือการกระจายตัวของแต่ละองค์ประกอบในเฟสนิ่งที่แตกต่างกัน เฟสนิ่งอาจเลือกใช้ได้ทั้งของเหลวและของแข็ง โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว การแยกของผสมด้วยเทคนิคนี้กระทำได้รวดเร็วเนื่องจากใช้ปั๊มสำหรับปั๊มเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสนิ่งที่มีอนุภาคขนาดเล็กได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการแยกสูง

2.2.3 ชนิดของเทคนิค HPLC

HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารประเภทต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง ดังนั้นการที่จะพัฒนาวิธีหรือทำการแยกให้ได้ผล สิ่งสำคัญคือการเลือกชนิดของการแยก (Modes of Separation) หรือชนิดของวัสดุบรรจุให้ถูกต้องเหมาะสมกับสารตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดตามกลไกของการแยก โดยอาศัยอันตรกิริยา (Interaction) ระหว่างสารกับเฟสอยู่กับที่เป็นหลัก คือ

1. Adsorption Chromatography หรือ Liquid Solid Chromatography (LSC)
2. Partition Chromatography (Bonded phase)
3. Ion Exchange Chromatography
4. Size Exclusion Chromatography

2.2.3.1 Adsorption Chromatography **หรือ** Liquid Solid Chromatography (LSC) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารที่มีสภาพขั้วต่างๆกัน (polarity) คือสารที่มีสภาพขั้วต่ำจนถึงปานกลาง หรือที่มีตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันต่างกัน โดยเฉพาะพวก isomer สารที่เป็นกลาง (neutral compound) หรือที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (non polar organic solvents) ไม่เหมาะสำหรับการแยกสารพวก homologous series เช่น มี aliphatic substitution ต่างกัน

เฟสอยู่กับที่ วัสดุบรรจุที่ใช้ใน HPLC ชนิดนี้ คือ silica ที่มีขนาดของอนุภาคอยู่ระหว่าง 3-10 um

เฟสเคลื่อนที่ การเลือกตัวทำละลายเพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะต้องมีความบริสุทธิ์สูง ที่นิยมใช้ได้แก่ Hexane, Isooctane, Butylchloride, Chloroform, Methylene Chloride, Tetrahydrofuran, Acetonitrile, Isopropanol, n-Propanol, Methanol และน้ำ

กลไกการแยกของ adsorption chromatography เกิดจากการดูดซับหรืออันตรกิริยาของหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลของสารกับ polar hydroxyl group หรือ Silanol Group (Si-OH) บนพื้นผิวของ Silica อันตรกิริยาอาจเป็นแบบ H-bonding, Dipole, Dipole Induced-Dipole เนื่องจากพื้นผิว Silica มีสภาพขั้วมาก เพราะฉะนั้นความแรงของการดูดซับ จึงขึ้นกับความแตกต่างของสภาพขั้วและตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของสารแต่ละชนิด (Polarity and Position) สารที่มีสภาพขั้วมากจะถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่บนเฟสอยู่กับที่นาน คือถูก Elute ออกมาช้ากว่าสารที่มีสภาพขั้วต่ำ ทำให้มีการแยกเกิดขึ้น

การ Elute สารออกจากคอลัมน์โดยวิธี Adsorption Chromatography ขึ้นกับ Polarity ของสาร คือสารใดที่มี Polarity น้อยจะถูก Elute ออกมาก่อนสารที่มี Polarity มาก ดังนั้นสามารถที่จะคาดคะเน Retention Time ของสารได้จากลำดับความแรงของ Polarity ของหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของสารได้ ลำดับความแรงของ Polarity ของหมู่ฟังก์ชันเรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้

Organic Acids (RCOOH) > Amines ≈ Alcohols > Aldehyde ≈ Ketones > Esters > Ethers > Halogenated Compounds > Unsaturated Hydrocarbons > Saturated Hydrocarbons > Perfluorocarbons

2.2.3.2 Partition Chromotography นิยมใช้กันมากมี 2 แบบ คือ Liquid Liquid Chromatography และแบบ Bonded Phase Chromatography ซึ่งทั้ง 2 แบบนี้แตกต่างกันที่

วิธีการที่เฟสอยู่กับที่จับอยู่บนอนุภาคของวัสดุช่วยพยุง คือแบบ Liquid Liquid Chromatography เฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวเคลือบติดบนอนุภาคโดยการเกาะติดทางกายภาพ ส่วนแบบ Bonded Phase Chromatography เฟสอยู่กับที่เกิดพันธะเคมีกับอนุภาค

bonded phase chromatography แบ่งตามสภาพขั้วของเฟสอยู่กับที่ได้ 2 แบบคือ

1. Normal Phase (Polar Bonded Phase) เฟสอยู่กับที่มีหมู่ฟังก์ชันที่มีสภาพขั้วมากกว่าเฟสเคลื่อนที่

เฟสเคลื่อนที่ เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Hexane, Chloroform, Methylene Chloride, Diethyl ether

กลไกการแยก เหมือนกับการแยกแบบ LSC

2. Reversed Phase (Nonpolar Bonded Phase) เฟสอยู่กับที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ไม่มีขั้ว ซึ่งมีสภาพขั้วน้อยกว่าเฟสเคลื่อนที่

เฟสเคลื่อนที่ เป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่นน้ำ Buffer, Methanol, Acetonitrile, Tetrahydrofuran และส่วนผสมของน้ำหรือ Buffer กับตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้

กลไกการแยก ขึ้นกับความแตกต่างของ Hydrophobicity หรือความไม่มีขั้วของสาร

2.2.3.3 Ion Exchange Chromatography (IEC) เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของความแรงของประจุ (Charge) ของสารตัวอย่างที่จะจับกับ Ionic Group ที่อยู่บนพื้นผิวของเฟสอยู่กับที่ซึ่งมีประจุต่างกับสารตัวอย่าง สารใดจับได้ดีหรือแรงกว่าจะถูก Elute ออกมาทีหลัง วิธีนี้นิยมใช้แยกสารอิออนนิก (Ionic Compounds) หรือสารที่สามารถแตกตัวเป็นอิออนได้ (Ionizable Compounds) ได้แก่ สารจำพวกกรด เบส Nucleotides รวมทั้ง Inorganic Ions, Amino Acids และ Biological Compounds

เฟสอยู่กับที่ เป็น Resin ที่ประกอบด้วย Synthetic Cross-Linked Polymer หรือ Silica ที่มี Ionic Group ต่ออยู่ด้วยพันธะทางเคมี ข้อดีของอนุภาคที่ใช้ Silica เป็นพื้น (Silica Based) คือทนต่อความดันและไม่พองตัวหรือหดตัวเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH,หรือ Ionic Strength ของเฟสเคลื่อนที่ และสามารถใช้กับเฟสเคลื่อนที่ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic Solvent) หรือส่วนผสมของน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์

เฟสเคลื่อนที่ ปกติจะใช้สารละลาย Buffer มี Counter Ion ที่มีประจุตรงข้ามกับ Ionic Chargeของอนุภาค แต่ประจุเหมือนกับ อิออนของสารตัวอย่าง

กลไกการแยก เกิดจากการแข่งขันกันระหว่างอิออนของสารตัวอย่างกับ Counter Ion ที่จะเข้าจับกับ Ionic Group ของอนุภาค คือ Counter Ion ในเฟสเคลื่อนที่เข้าจับกับ Ionic Group บนอนุภาคเกิด Ion-Pair เมื่อผ่านสารละลายตัวอย่างไปบน Ion-Exchang Column ถ้าอิออนของ

สารตัวอย่างในสารละลายมีประจุที่แรงกว่า Counter Ion ก็จะเข้าไปแทนที่ Counter Ion โดยจับกับ Ionic Group ของอนุภาค เกิด Ion-Pair แทน การแยกเกิดจากความแตกต่างของความแรงของประจุของสารตัวอย่างแต่ละชนิดที่จะเข้าจับกับ Ionic Group บนอนุภาค ถ้ามีประจุแรงก็จะจับกับ Ionic Group ของอนุภาคได้ดีถูก Elute ออกมาช้ากว่าสารที่มีประจุอ่อนกว่า

2.2.3.4 Size Exclusion Chromatography (SEC) เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของสาร วัสดุบรรจุในคอลัมน์เป็น Silica (≈ 10 um) หรืออนุภาคของพวก Polymer ที่มีรูพรุนขนาดสม่ำเสมอเชื่อมต่อกันเป็นร่างแห ซึ่งรูพรุนนี้เป็นที่สำหรับโมเลกุลของสารและเฟสเคลื่อนที่แพร่กระจายเข้าไป การแยกขึ้นกับการแพร่กระจายเข้าและออกจากรูพรุนของโมเลกุลของสาร Retention Time หรือการหน่วงเหนี่ยวของสารในคอลัมน์ ขึ้นกับขนาดโมเลกุลของสาร สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะเข้าไปในรูพรุนได้ทั้งหมด โมเลกุลขนาดกลางจะผ่านเข้าไปได้ในบางรูพรุน ส่วนโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนได้ ดังนั้นโมเลกุลขนาดใหญ่จึงถูก Elute ออกมาก่อน Elution Volume จะมีค่าเท่ากับ Dead Volume,Vo ของการแยกวิธีอื่น ตามด้วยโมเลกุลขนาดกลางและขนาดเล็กตามลำดับการแยกโดยวิธี SEC นี้ แตกต่างจากวิธีโครมาโทกราฟีชนิดอื่นๆ คือไม่เกิดอันตรกิริยาทางเคมีหรือทางกายภาพระหว่างสารตัวอย่างกับเฟสอยู่กับที่ หรือกับเฟสเคลื่อนที่

Size Exclusion Chromatography แบ่งออกได้ดังนี้

1. Gel Filtration Chromatography (GFC) เฟสอยู่กับที่เป็นพวก hydrophillic และเฟสเคลื่อนที่เป็นพวกน้ำ ใช้แยกสารพวกโปรตีนออกจาก Amino Acid และพวก peptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ
2. Gel Permeation Chromatography (GPC) เฟสอยู่กับที่เป็นพวก hydrophobic และเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของสารจำพวก Polymer ขนาดใหญ่ และพวก Natural Products

เฟสเคลื่อนที่ใน SEC ทำหน้าที่พาสารตัวอย่างเคลื่อนผ่านคอลัมน์เท่านั้น โดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างหรือเฟสอยู่กับที่ และโดยทั่วไปสารตัวอย่างควรละลายได้สมบูรณ์ในเฟสเคลื่อนที่ถ้าสารตัวอย่างละลายได้เป็นบางส่วนในเฟสเคลื่อนที่อาจจะเกิดกลไกการแยกอย่างอื่นร่วมด้วย เช่นAdsorption หรือ Partition ทำให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารที่หาได้ผิดพลาด ดังนั้นการเลือกเฟสเคลื่อนที่จะต้องคำนึงถึงสิ่งต่างๆ เหล่านี้คือ

1. ต้องเป็นตัวละลายที่ดีของสารตัวอย่าง
2. มีความหนืดต่ำ (Low Viscosity)
3. ไม่ทำลายเฟสอยู่กับที่

2.2.4 **เครื่องตรวจวัด**

คุณสมบัติที่ต้องการสำหรับเครื่องตรวจวัดของ HPLC มีดังนี้

1. มีความไวเพียงพอ

2. สัญญาณตอบรับมี Reproducibility ที่ดีและไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และอุณหภูมิ

3. เชื่อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน

4. ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับควรเป็นเส้นตรงในช่วงกว้าง

5. ไม่ทำลายสารตัวอย่าง

6. Detector Cell ควรมี Internal Volume (Dead Volume) น้อยๆเพื่อลดปัญหา Band Broadening

เครื่องตรวจวัดสำหรับ HPLC แบ่งออกเป็น 2 ประเภท

1. Bulk Property Detectors (Universal Detectors) เครื่องตรวจวัดนี้ วัดคุณสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่ เมื่อมีกับไม่มีสารตัวอย่างละลายอยู่เปรียบเทียบกัน เครื่องตรวจวัดประเภทนี้ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ Refractive Index Detectors, Conductivity Detectors เครื่องตรวจวัดนี้ใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิดแต่มี Sensitivity และ Selectivity ต่ำกว่า Solute Property Detectors

2. Solute Property Detectors (Selective Detectors) เครื่องตรวจวัดนี้วัดคุณสมบัติทางกายภาพของแต่ละส่วนประกอบ ของสารตัวอย่างที่แยกออกมา เครื่องตรวจวัดนี้มีsensitivity ดีกว่า Bulk Property Detectors ถึง 1000 เท่าหรือมากกว่า สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างปริมาณ 2-3 ng หรือน้อยกว่าได้ ใช้กับ Gradient Elution ได้จึงรับความนิยมมาก เครื่องตรวจวัดประเภทนี้ได้แก่ Ultraviolet-Visible Absorbance Detectors, Fluorescence Detectors, Electrochemical Detectors

เครื่องตรวจวัดสำหรับ HPLC

1. Ultraviolet-Visible Absorbance Detectors

เป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้กันมากใน HPLC หลักการทำงานอาศัยการดูดกลืนของสารตัวอย่าง เครื่องตรวจวัดชนิดนี้มีข้อดี คือไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ เครื่องตรวจวัดชนิดนี้ แบ่งเป็นชนิดย่อย ๆ ได้ดังนี้

1. Fixed-Wavelength Detectors เป็นเครื่องตรวจวัดที่วัดการดูดกลืนแสงได้ในบางช่วงคลื่น

2. Variable-Wavelength Detectors เป็นเครื่องตรวจวัดที่สามารถเลือกวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการในช่วง Ultraviolet และ Visible

3. Diode Array Detectors

2 Fluorescence Detectors

เครื่องตรวจวัดนี้มีความจำเพาะ (Selectivity) ดีกว่า UV-Vis Absorbance Detectors และ Refractive Index Detectors และมี Limit of Detection คือสามารถตรวจวัดสารได้ในปริมาณน้อย ๆ

3. Refractive Index Detectors (IR Detectors)

เป็นเครื่องตรวจวัดแบบ Universal โดยวัดค่าดรรชนีหักเห (Refractive Index) ของสารละลายของส่วนประกอบต่าง ๆ ในเฟสเคลื่อนที่ เปรียบเทียบกับค่าดรรชนีหักเหของเฟสเคลื่อนที่อย่างเดียว ดังนั้นเครื่องตรวจวัดนี้จึงใช้วัดปริมาณสารใดก็ได้ที่มีค่าดรรชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่

4. Electrochemical Detectors

เป็นเครื่องตรวจวัดที่ใช้กับสาร ที่สามารถทำปฏิกิริยา Electrochemical Reactions เช่น Oxidation, Reduction เครื่องตรวจวัดนี้จะวัดการสูญเสียหรือได้รับอิเล็กตรอนของสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ เมื่อผ่านระหว่างอิเล็กโทรด ที่ค่าความต่างศักย์ที่กำหนดให้

5. Conductivity Detectors

เครื่องตรวจวัดนี้วัดความสามารถของเฟสเคลื่อนที่ในการนำกระแสไฟฟ้าเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าปริมาณกระแสไฟฟ้านี้ขึ้นกับปริมาณของไอออนหรือสารประกอบไอออนิค ในเฟสเคลื่อนที่

2.2.5 การเลือกใช้และการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางHPLC

การแยกจะประสบความสำเร็จในการใช้ HPLC เพื่อแก้ปัญหาเกี่ยวกับการแยกส่วนประกอบต่างๆ ออกจากของผสมนั้นจำเป็นต้องพิจารณาเลือกสภาวะการทำงานที่ถูกต้อง ได้แก่ ชนิดของวัสดุบรรจุในคอลัมน์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความยาวของคอลัมน์ เฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ อุณหภูมิ ขนาดของสารตัวอย่างที่ทำการแยก ปัญหาเกี่ยวกับการเลือกใช้และการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ที่ประสบกันอยู่บ่อยๆสำหรับผู้แรกเริ่มทำงานด้านวิเคราะห์ด้วย HPLC คือการเลือกเทคนิคการแยกเพื่อให้ได้ผลการแยกที่ดีที่สุดและเสร็จสิ้นในเวลาอันสั้น อย่างไรก็ตามมีขั้นตอนทั่วๆไป ที่ใช้ในการเลือกวิธีที่เหมาะสมโดยจะต้องตัดสินใจเกี่ยวกับสิ่งต่างๆเหล่านี้

1. การเลือกเทคนิคการแยก
2. การเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม
3. การเลือกเฟสเคลื่อนที่
4. การเลือกเครื่องตรวจวัด
5. การตรวจสอบระบบที่ใช้วิเคราะห์

การเลือกเทคนิคการแยก

การเลือกเทคนิคการแยกและชนิดของคอลัมน์ที่ถูกต้องและเหมาะสม เป็นขั้นตอนที่สำคัญของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ โดยต้องพิจารณาจากคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารตัวอย่าง คือขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง การละลายของสารตัวอย่าง สภาพขั้วและสมบัติการเป็นไอออนิคของสารตัวอย่าง ขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง

จะต้องพิจารณาว่าสารตัวอย่างมีขนาดเล็กหรือขนาดใหญ่ ในกรณีไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของสารมีวิธีการทดสอบที่ง่ายและรวดเร็วโดยใช้ SEC ที่มีขนาดรูพรุนต่างๆกัน ผลของการแยกโดย SEC นี้ บอกให้ทราบว่าตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์นั้นมีองค์ประกอบของสารที่มีขนาดโมเลกุลเป็นอย่างไรบ้าง ถ้าขนาดโมเลกุลต่างกันมากเกิน 10% สามารถใช้วิธี SEC ทำการวิเคราะห์ได้โดยตรง แต่ถ้ามีองค์ประกอบของสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันเพียงเล็กน้อย จะต้องพิจารณาเลือกวิธีการแยกทางโครมาโทกราฟีวิธีอื่น

การละลายของสารตัวอย่าง สภาพขั้วและสมบัติการเป็นไอออนิค พิจารณาว่าสารตัวอย่างละลายในสารละลายที่เป็นน้ำหรือละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ถ้าไม่ทราบการละลายของสารตัวอย่างทำการทดสอบโดยละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น น้ำ เมทานอล เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เป็นต้น ผลจากการละลายของสารตัวอย่างในตัวทำละลายชนิดต่างๆ สามารถนำมาคาดคะเนโครงสร้างทางเคมีของส่วนประกอบของสารตัวอย่างได้ แนวทางการเลือกเทคนิคการแยก โดยพิจารณาจากคุณสมบัติของสารดังนี้

สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า2000 และละลายในน้ำ ถ้าสารตัวอย่างมีองค์ประกอบที่มีขนาดโมเลกุลต่างกันมากเลือก SEC โดยใช้อนุภาคของวัสดุบรรจุที่มีรูพรุนขนาดเล็ก แต่ถ้าสารมีโมเลกุลขนาดใกล้เคียงกัน พิจารณาต่อไปว่าสารตัวอย่างอยู่ในรูปของมีประจุหรือไม่มีประจุ

ถ้าสารทุกตัวอยู่ในรูปที่ Nonionic เลือกการแยกด้วย Bonded Phase Chromatography (BPC) คือเลือกคอลัมน์ Reversed Phase (RP) เป็นลำดับแรก แต่ถ้ามีสารที่มีสภาพขั้วมากรวมอยู่ด้วย สารนั้นจะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนทำให้การแยกไม่ดี ดังนั้นจึงเลือกคอลัมน์ชนิด Normal Bonded Phase โดยใช้ส่วนผสมของน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่เข้ากับน้ำได้เป็นเฟสเคลื่อนที่ สำหรับสารตัวอย่างที่เป็นพวกมีประจุ ทำการแยกได้หลายวิธี เช่นถ้าสารเป็นพวกกรดอ่อนหรือเบสอ่อนวิธีที่ง่ายที่สุดคือ Ion Suppression โดยการปรับ pH ของเฟสเคลื่อนที่และใช้คอลัมน์ RP ถ้าสารตัวอย่างเป็นพวกเบสแก่และกรดแก่ ทำการแยกด้วยวิธี Ion - Pair Chromatography หรือ Ion - Exchange Chromatography

สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า2000 และละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ถ้าไม่ทราบขนาดโมเลกุลใช้วิธี SEC คือเลือก GPC และตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเฟสเคลื่อนที่

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 2000และละลายในน้ำ

สารพวกนี้มีวิธีการแยกที่แตกต่างกันขึ้นกับคุณสมบัติของสารตัวอย่าง ถ้าเป็นไอออนิค สามารถใช้ Ion-Exchange หรืออาจใช้ Ion-Suppression ด้วยคอลัมน์ Reversed-Phase แต่ที่นิยมใช้ส่วนมากเป็นวิธี SEC แบบ GFC

สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 2000และละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

ใช้ SEC แบบ GPC

จากข้อมูลเป็นเพียงแนวทางหนึ่งที่อาจใช้ในการตัดสินใจ เลือกเทคนิคการแยกและชนิดของคอลัมน์ซึ่งโดยทั่วไปการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC สามารถเลือกใช้คอลัมน์ได้หลายชนิด ซึ่งการเลือกยังขึ้นกับความสะดวกของการทดลอง นอกจากนี้ยังขึ้นกับประสบการณ์และความชำนาญของผู้วิเคราะห์

การเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อให้มีการแยกที่ดีที่สุดนั้นจะต้องคำนึงถึงจุดประสงค์ 3 ประการคือ การแยก ความเร็วของการวิเคราะห์และความจุของสารตัวอย่างบนคอลัมน์ การวิเคราะห์ด้วย HPLC สิ่งที่ต้องการก็คือการแยกที่ดีและใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย ส่วนความจุของสารตัวอย่างจะเป็นจุดประสงค์สำหรับงานด้าน preparative LC การแยกขึ้นกับพารามิเตอร์ 3 ชนิด คือประสิทธิภาพหรือจำนวนเพลทของคอลัมน์ (N) ค่า Selectivity ของพีกทั้งสองที่อยู่ใกล้กันและค่า Retention หรือ Capacity Factor ของพีกของสารดังนั้นการเลือกคอลัมน์จะต้องพิจารณาถึงปัจจัยทางกายภาพของคอลัมน์ซึ่งได้แก่ ขนาดอนุภาคของคอลัมน์ อายุการใช้งานและความเร็วของการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางเคมีได้แก่ คุณสมบัติทางเคมีของ Bonded-Phase ลักษณะแหล่งที่มาและพื้นผิวของ Silica ซึ่งมีผลต่อการแยกดังนั้นคอลัมน์ที่เหมาะสมที่จะใช้งานจะต้องประกอบด้วยวัสดุบรรจุและภาชนะบรรจุ

การเลือกวัสดุบรรจุ

โดยทั่วไปพิจารณาถึงขนาด รูปร่างและพื้นที่ผิวของอนุภาค งานด้านวิเคราะห์นิยมใช้อนุภาคขนาดเล็กคือ 5-10 um ขนาด 5 um จะให้ค่า N มากกว่าอนุภาคขนาด 10 um ถึง 2-3 เท่าในคอลัมน์ที่มีขนาดเดียวกัน

การเลือกขนาดของคอลัมน์

ขนาดของคอลัมน์คือเส้นผ่าศูนย์กลางภายในและความยาวของคอลัมน์การเลือกคอลัมน์ยาวจะใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ทำให้สิ้นเปลืองเฟสเคลื่อนที่ คอลัมน์ที่ใช้ในงานวิเคราะห์ปริมาณมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.9-4.6 มม.และความยาว15-25 ซม. ถ้าต้องการวิเคราะห์สารปนเปื้อนต้องใช้คอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2.6 มม. เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัด เพราะสารปนเปื้อนถูกชะออกมาในเฟสเคลื่อนที่ที่มีปริมาตรน้อย

51521

การเลือกเฟสเคลื่อนที่

เมื่อเลือกเทคนิคการแยกและคอลัมน์ที่เหมาะสมได้แล้ว ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์จำเป็นต้องเลือกตัวทำละลาย เพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ เทคนิค HPLC เฟสเคลื่อนที่อาจจะเป็นตัวทำละลายตัวเดียว 2 หรือ 3 ชนิดรวมกันในการเลือกตัวทำละลายเพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่จะต้องพิจารณาถึงข้อกำหนดต่างๆของตัวทำละลายดังนี้คือ

1. จะต้องไม่ทำปฏิกิริยาหรือทำให้เฟสอยู่กับที่เปลี่ยนแปลง
2. ต้องบริสุทธิ์ไม่มีสารปนเปื้อนหรือฝุ่นผงเพราะอาจรบกวนผลการตรวจวัดด้วย UV หรือฝุ่นผงอุดตันคอลัมน์ ดังนั้นต้องกรองก่อนใช้
3. ต้องเข้ากันได้กับเครื่องตรวจวัด คือไม่รบกวนเครื่องตรวจวัด
4. ต้องเข้ากันได้กับระบบของเครื่องมือ คือไม่ทำลายหรือกัดกร่อนเครื่องมือ
5. เป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับสารตัวอย่าง คือสารตัวอย่างจะต้องละลายในตัวทำละลาย
6. สามารถนำสารตัวอย่างกลับคืนมาได้ คือเป็นตัวทำละลายที่ระเหยง่าย
7. มีความหนืดต่ำ เพราะตัวทำละลายที่มีความหนืดสูง จะทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลงและใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เนื่องจากต้องใช้อัตราความเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่ำ

การเลือกเครื่องตรวจวัด

เครื่องตรวจวัดที่นิยมมากที่สุดในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC คือ UV Spectrophotometer ซึ่งมีหลายแบบคือ Fixed Wavelength, Variable Wavelength, Programmable Wavelength และ Diode Array การเลือกเครื่องตรวจวัดต้องพิจารณาให้เหมาะสมกับสารและความไวในการตรวจ ในกรณีที่ไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้สิ่งที่ต้องพิจารณาคือความไวของเครื่องตรวจวัดและมีความเฉพาะเจาะจงได้แก่ Fluorescence Spectrophotometer หรือ Electrochemical

การตรวจสอบระบบที่ใช้วิเคราะห์

เป็นการตรวจสอบให้แน่ใจว่าระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ซึ่งการตรวจสอบนี้ เป็นการตรวจสอบเกี่ยวกับเครื่องมือ ระบบไฟฟ้า วิธีการและสภาวะของการทดลอง พารามิเตอร์ที่ใช้เพื่อทำการตรวจสอบได้แก่ Reproducibility หาได้จากค่า Relative Standard Deviation และ Separation หาได้จาก Plate Count or Column Efficiency, Tailing Factor และResolution

Relative Standard Deviation เป็นการตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องมือ ทำโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานซ้ำๆกัน

Plate Count or Column Efficiency เป็นการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Tailing Factor เป็นค่าที่วัดหรือบอกถึงความสมมาตรของพีก

Resolution เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกสองพีกที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีกทั้งสอง เพื่อให้แน่ใจว่า Internal Standard แยกออกจากสารที่ต้องการวิเคราะห์ การแยกที่สมบูรณ์มีค่าเท่ากับ 1.5 (เพ็ญพรรณ อัศวกุล และโอทอง สวัสดีมงคล, ม.ล. 2539 : 1-114)

2.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี

การตรวจสอบความใช้ได้ คือการยืนยันโดยการตรวจสอบและจัดหาหลักฐานที่เป็นรูปธรรม เพื่อแสดงว่าข้อกำหนดพิเศษโดยเฉพาะต่างๆ สำหรับการใช้ตามที่ตั้งใจไว้โดยเฉพาะสามารถบรรลุผลได้เป็นที่พอใจ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีจะต้องครอบคลุมความต้องการประยุกต์ใช้ มีบันทึกวิธีดำเนินการและผลที่ได้ มีข้อสรุปบ่งชี้ว่าวิธีนั้นเหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งาน

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีต้องทำเมื่อใช้วิธีที่ไม่เป็นมาตรฐาน วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาหรือออกแบบขึ้นเอง วิธีมาตรฐานที่ใช้นอกขอบข่าย การขยายและดัดแปลงวิธีมาตรฐาน

ในกรณีมีการขยายและดัดแปลงวิธีมาตรฐานที่ต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ ดังนี้

- Matrix ต่างจากที่กำหนด
- การดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานเช่น เวลาอบ เวลากลั่น เวลา Incubate เปลี่ยนอุณหภูมิ สารเคมี น้ำยา (Reagent) อาหารเลี้ยงเชื้อ ข้ามขั้นตอนเพื่อให้เร็วขึ้น เป็นต้น

Key Performance Parameters

1. Selectivity Vs Specificity
2. Working and Linear Ranges
3. Sensitivity
4. Level of Detection
5. Accuracy (trueness, recovery)
6. Precision (repeatability, reproducibility)
7. Ruggedness or Robustness

1. Selectivity Vs Specificity

ความสามารถในการทดสอบสารที่ต้องการในตัวอย่างที่มีสารอื่นเจือปนโดยยังคงความถูกต้องและความจำเพาะเจาะจง

วิธีการตรวจสอบ

1. ทำการตรวจวัดสารที่ต้องการ ในตัวอย่างที่มีสิ่งรบกวน (อาจมีโดยธรรมชาติหรือการเติมลงในตัวอย่าง)
2. กรณีที่ไม่แน่ใจว่ามีสิ่งรบกวนหรือไม่ ให้ทำการตรวจวัดสารที่ต้องการในตัวอย่างและ Reference Meterial โดยเปรียบเทียบกับวิธีหรือเทคนิคอื่น

2. Working and Linear Ranges

หมายถึง ช่วงการใช้งานที่ครอบคลุมระดับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบโดยสามารถแสดงระดับความแม่นยำ (Precision) ความถูกต้อง (Accuracy) และความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ตามที่กำหนดในวิธีทดสอบ

ความสัมพันธ์เชิงเส้นหมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ค่าผลทดสอบซึ่งเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่าง ภายในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด แบ่งออกเป็น System Linearity และ Method Linearity

System Linearity ทดสอบโดยใช้สารมาตรฐาน โดยจะแสดงถึงความสามารถของระบบที่ให้ผลทดสอบเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

การหาค่า System Linearity

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น (ในช่วง 50-200 % ของความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่าง)
2. ทำการวัดสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นๆ ละ 5 ซ้ำ
3. หาค่าเฉลี่ยของค่าที่อ่านได้แต่ละระดับความเข้มข้น
4. พลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่าที่อ่านได้ (แกน Y)

จากกราฟที่พลอตระหว่างความเข้มข้นและค่าที่อ่านได้ นำมาคำนวณ Regression Line โดยใช้ Method of Least Squares ทั้งนี้ Slope ของ Regression Line ,Regression Coefficient (r^2) และ Y-Intercept สามารถนำมาเป็นเกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง ซึ่งผลของ Linearity ที่ดีจะได้กราฟเส้นตรง โดยมี Slope = 1, Regression Coefficient (r^2) = 1 (โดยทั่วไปยอมรับที่ 0.999 ถึง 0.995) และ Y-Intercept = 0

Method Linearity ทดสอบโดยใช้สารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานโดยจะแสดงถึงความสามารถของวิธีทดสอบ ที่ให้ผลทดสอบเป็นสัดส่วน กับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง (ภายในช่วงที่กำหนด)

การหาค่า Method Linearity

1. เตรียมตัวอย่างจริงที่เติมสารละลายมาตรฐานอย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้น (ในช่วง 50-150 % ของความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่าง)
2. ทำการวัดที่ระดับความเข้มข้นๆ ละ 5 ซ้ำ
3. หาค่าเฉลี่ยของค่าที่อ่านได้แต่ละระดับความเข้มข้น
4. พลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่าที่อ่านได้ (แกน Y)
5. คำนวณหาค่า Regression Coefficient (r^2) โดยทั่วไปยอมรับที่ $r^2 \geq 0.99$

3. Sensitivity

หมายถึง อัตราส่วนการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น

4. Level of Detection

4.1 Instrument Detection (IDL) หมายถึง ความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 5 เท่าของ S/N ของเครื่องมือ หรือที่มีค่าเป็น 1.645 เท่าของ SD ของ Blank

4.2 Limit of Detection (LOD) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่างที่สามารถตรวจพบ โดยไม่จำเป็นต้องหาปริมาณได้ หรือเป็นความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 2 เท่า ของ SD ของ Blank เหนือค่าเฉลี่ยของสัญญาณของ Blank

4.3 Method Detection Limit (MDL) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่างที่สามารถตรวจพบได้ โดยไม่ใช่ปริมาณที่วัดได้ เป็นความเข้มข้นของสารที่ผ่านกระบวนการของวิธีทดสอบ หรือเป็นความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3.14 เท่า ของ SD ของ Blank เหนือค่าเฉลี่ยของสัญญาณของ Blank

4.4 Limit of Quantitation (LOQ) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้ โดยมีความแม่นยำและความถูกต้องที่ยอมรับได้หรือเป็นความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 10 เท่า ของ SD ของ Blank เหนือค่าเฉลี่ยของสัญญาณของ Blank

Requirements

IDL is used as a guide for MDL, LOQ

Relationship IDL : LOD : MDL : LOQ

1 : 2 : 4 : 10

วิธีการหาค่า MDL และ LOQ

วิธีที่ 1 1. ทำการทดสอบ (Sample Blanks, Fortified Sample Blanks) ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยอมรับได้ 10 ซ้ำ

2. คำนวณหาค่าเฉลี่ยของ Blank และ SD

3. กำหนดค่า MDL เท่ากับค่าเฉลี่ยของ Blank + 3.14 SD

4. กำหนดค่า LOQ เท่ากับค่าเฉลี่ยของ Blank + 10 SD

วิธีที่ 2 1. ทำการทดสอบ Sample Blanks ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ต่ำ กลาง สูง)

2. ทำการวัดความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

3. คำนวณหาค่าเฉลี่ย และ SD

4. พลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่า SD (แกน Y)

5. ลากเส้นกราฟตัดที่แกน Y ได้ค่า SD_0

6. กำหนดค่า MDL เท่ากับ 3.14 SD_0

7. กำหนดค่า LOQ เท่ากับ 10 SD_0

(หมายเหตุ : SD_0 = ค่า SD ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0)

วิธีการหาค่า LOQ วิธีที่ 3

การประเมินด้วยการมองเห็นได้ อาจจะใช้สำหรับการทดสอบที่ไม่ได้ใช้เครื่องมือ (หรืออาจใช้กับวิธีที่ใช้เครื่องมือด้วย) ทำการทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้น โดยกำหนดระดับความเข้มข้นต่ำสุด (คือ LOQ) ที่สามารถทำการทดสอบได้ด้วยความถูกต้องและความแม่นยำที่ยอมรับได้ (อาจใช้วิธีการลดระดับความเข้มข้นของตัวอย่างลงมาเรื่อยๆ จนถึงจุดที่ทดสอบด้วยการมองเห็นได้ ถ้าทำไม่ได้ให้เพิ่มระดับความเข้มข้นไปถึงจุดความเข้มข้นสุดท้ายที่มองเห็นได้ แล้วทำการทดสอบหาค่าความถูกต้องและความแม่นยำ ที่ระดับความเข้มข้นนี้ ที่ยอมรับได้ ซึ่งเป็นความเข้มข้นระดับ LOQ)

วิธีการหาค่า LOD

1. ทำการทดสอบ Sample Blanks ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

2. คำนวณหาค่า % Positive หรือ Negative Results

3. กำหนดค่า LOD โดยตรวจสอบจากความเข้มข้นต่ำสุด ที่ให้ผลการวัดที่สามารถยอมรับได้

5. Accuracy (trueness, recovery)

หมายถึง ความใกล้เคียงของค่าที่วัดได้กับค่ามาตรฐานหรือค่าจริงของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่างภายใต้วิธีการทดสอบเดียวกัน โดยทั่วไปจะแสดงในเทอมของการเบี่ยงเบน

การแสดงค่า Accuracy

1. การหาค่า Relative Accuracy

$$\text{Relative Accuracy (RA)} = \frac{\text{ค่าที่วิเคราะห์ได้ x 100}}{\text{ค่าจริง}}$$

(เกณฑ์การยอมรับของ RA อยู่ในช่วง 90-110 %)

2. การอ้างอิงค่า Certified Value

(เกณฑ์การยอมรับ = Certified Value ± Uncertainty)

วิธีการหาค่าความถูกต้อง

1. ทดสอบวัสดุอ้างอิงที่รู้ค่า
2. เปรียบเทียบผลของวิธีทดสอบกับวิธีอื่นๆที่กำหนดความถูกต้องไว้
3. การทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่รู้ค่าสารที่ต้องการวัดในปริมาณที่รู้ค่าแน่นอนลงในตัวอย่างแล้วหาค่าการกลับคืน

ค่าการกลับคืน หมายถึง การทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่ต้องการวัดในปริมาณที่ทราบค่าที่แน่นอน แล้วทดสอบหาปริมาณที่แท้จริงของสารโดยคำนวณเป็นร้อยละการกลับคืนทั้งนี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบที่ใช้ต่อการสกัดและตรวจวัดสารที่ต้องการวัดที่มีในตัวอย่าง

วิธีการหาค่าการกลับคืน

1. เติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 3 ระดับ (ต่ำ กลาง และ สูง หรือช่วง 50–150 %)
2. ทำการทดสอบ Matrix blank ที่แต่ละระดับความเข้มข้น (6 ซ้ำ)
3. คำนวณค่าการกลับคืน

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3}$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง

C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

ตารางที่ 2.1 เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของค่าการกลับคืน

ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่าง	**ค่าการกลับคืน,ร้อยละ**
100 %	98-102
10 %	98-102
1 %	97-103
0.1 %	95-105
100 ppm	90-107
10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

6. Precision (repeatability, reproducibility)

หมายถึง ค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทำการทดสอบซ้ำหลายครั้ง โดยทั่วไปจะแสดงด้วยค่า % Relative Standard Deviation (RSD) หรือ Coefficient of variation (CV)

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

ลักษณะความแม่นยำ จำแนกได้เป็น

1. Repeatability (Within-run precision)
2. Reproducibility (Between-run precision)

1. Repeatability เป็นความแม่นยำที่สัมพันธ์กับการทดสอบตัวอย่างซ้ำภายใต้สภาวะคงที่ ได้แก่ การใช้เครื่องมือ ผู้วิเคราะห์และห้องปฏิบัติการเดียวกัน ภายในช่วงระยะเวลาสั้นๆ

2. Reproducibility เป็นความแม่นยำที่สัมพันธ์กับการทดสอบตัวอย่างซ้ำภายใต้สภาวะทวนซ้ำ ได้แก่ การใช้วิธีทดสอบเดียวกัน แต่ใช้เครื่องมือ ผู้วิเคราะห์และห้องปฏิบัติการต่างกัน ในช่วงระยะเวลาที่ห่างกัน

การหาค่า Repeatability (Replicability)

1. ทำการทดสอบ Standard, Reference material หรือ Fortified sample blank ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง Working Range
2. ทดสอบซ้ำในช่วงระยะเวลาสั้นๆ
3. คำนวณค่า Repeatability ที่แต่ละความเข้มข้น โดยรายงายเป็นค่า SD หรือ %RSD

การหาค่า Reproducibility

1. ทำการทดสอบ Standard, Reference material หรือ Fortified sample blank ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง Working Range
2. ทดสอบซ้ำโดยขยายเวลามากขึ้น เมื่อเปลี่ยนเจ้าหน้าที่ทดสอบ เครื่องมือ
3. คำนวณค่า Repeatability ที่แต่ละความเข้มข้น โดยรายงายเป็นค่า SD หรือ %RSD

ตารางที่ 2.2 เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ Precision

ความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบในตัวอย่าง	RSD,%
100 %	1.3
10 %	2.8
1 %	2.7
0.1 %	3.7
100 ppm	5.3
10 ppm	7.3
1 ppm	11
100 ppb	15
10 ppb	21
1 ppb	30

7. Ruggedness or Robustness

หมายถึง การเปลี่ยนแปลงของผลการทดสอบที่ได้จากการทดสอบตัวอย่างเดียวกันภายใต้ตัวแปรของสภาวะการทำงานปกติ ได้แก่ เครื่องมือที่มีคุณลักษณะต่างกัน ผู้ทดสอบที่มีประสบการณ์ต่างกัน สารเคมีและสารมาตรฐานต่างกัน สภาวะแวดล้อมของการทดสอบต่างกัน ค่า Ruggedness or Robustness ที่ดีจะต้องมีค่าต่ำๆ

(กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทโนโลยี. 2544 : 1-37)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hwang (1985 : 684 – 688) ตรวจวัดวิตามินเค1 ในรูปทรานส์และซีสในอาหารสำหรับทารก โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลว โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นและเมทานอลย่อยตัวอย่าง จากนั้นใช้สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและไอโซออกเทนอัตราส่วน 2 : 1 สกัดตัวอย่าง สำหรับวิตามินเค1 ในรูปทรานส์ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ $\leq$ 3.3 การได้กลับคืนร้อยละ 98 $\pm$ 4 ส่วนวิตามินเค1 ในรูปซีส ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ $\leq$ 12 การได้กลับคืนร้อยละ 95 $\pm$ 9 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ 0.3 นาโนกรัม

Indyk et. al. (1995 : 719 – 723) ตรวจวัดวิตามินเค1 ในอาหารสำหรับทารกและนมโดยใช้เอนไซม์ในการย่อยตัวอย่างและสกัดด้วยเฮกเซน การได้กลับคืนร้อยละ 97.4 $\pm$ 2.5 ช่วงที่สัญญาณตอบสนองต่อความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 0.05-4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถตรวจวัดได้ 0.5 ไมโครกรัมต่อ100 กรัมนมผง

Bueno (1995 : 6 – 8) ศึกษาการวิเคราะห์วิตามินเค1 ในรูปทรานส์ ในตัวอย่างนมผงโดยใช้สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและสารละลายไอโซโพรพานอล (เข้มข้นร้อยละ 0.02 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในไอโซออกเทน) เท่ากับ 15 ต่อ 85 สกัดตัวอย่าง โดยใช้เครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ชนิด Normal Phase

Ware et. al. (2000 : 719 – 723) ตรวจวัดวิตามินเค1 ในอาหารทางการแพทย์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสและแอลฟาอะไมเลสย่อยตัวอย่าง แล้วสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมไบร์คาบอเนต เข้มข้นร้อยละ 1 ในตัวทำละลายไอโซโพรพานอล อัตราส่วน 1:1 ด้วยเทคนิค Solid Phase Extraction แล้วนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC และใช้เครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบฟลูออเรสเซนซ์ ช่วงที่สัญญาณตอบสนองต่อความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 0.1-1.0 นาโนกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 การได้กลับคืนเฉลี่ยร้อยละ 101.6 $\pm$ 2.85 ความแปรปรวนร้อยละ 9.26

Wollard et. al. (2002 : 682 – 691) ตรวจวัดวิตามินเค1 ในอาหารโดยใช้เอนไซม์ไลเปสย่อยตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด Reversed – Phase และใช้เครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบฟลูออเรสเซนซ์

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเค และเปรียบเทียบปริมาณวิตามินเค ในตัวอย่างนมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผง เพื่อจัดทำข้อมูลโภชนาการที่ถูกต้อง สามารถเชื่อถือได้ สะดวก รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย และมีประสิทธิภาพสูง เป็นวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างได้หลากหลาย ผู้วิจัยดำเนินการวิจัยดังนี้

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาวิจัยได้แก่ นมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผง

3.1.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย สุ่มจากห้างสรรพสินค้า เขตบางเขน โดยใช้วิธีการสุ่มแบบเป็นกลุ่ม ได้แก่กลุ่มนมข้น 7 ตัวอย่าง สุ่มมา 5 ตัวอย่าง กลุ่มนมพร้อมดื่มยูเอชที 30 ตัวอย่าง สุ่มมา 5 ตัวอย่างและกลุ่มนมผง 25 ตัวอย่าง สุ่มมา 10 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่ผลิตและบรรจุในประเทศไทย ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2544 ถึงเดือนตุลาคม 2546

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ของบริษัท Shimadzu รุ่น LC 8 A

3.2.2 Ultrasonic bath ของบริษัท Crest รุ่น 575 D

3.2.3 Rotary Vacuum Evaporator ของบริษัท Tokyo Rikakikai รุ่น EYELA 1350/1500

3.2.4 Water bath ของบริษัท Tokyo Rikakikai รุ่น EYELA SB-35

3.2.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Shimadsu รุ่น LIBROR EB-3200

3.2.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Shimadsu รุ่น LIBROR AEL-3200

3.2.7 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง ของบริษัท KUBOTA รุ่น 5700

3.3 การดำเนินการทดลอง

3.3.1 วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมาและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี

3.3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1). กรวยกรอง

2). กรวยแยก ขนาด 500 มิลลิลิตร

3). ขวดก้นแบน ขนาด 250 มิลลิลิตร

4). ขวดก้นแบน ขนาด 500 มิลลิลิตร

5). ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

6). ขวดวัดปริมาตรสีชา ขนาด 25 50 และ 100 มิลลิลิตร

7). ปิเปต ขนาด 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ 0.5 มิลลิลิตร

8). โซเดียมซัลเฟต ที่ปราศจากน้ำ, Merck

9). โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์, pellets, BDH

10). เฮกเซน A.R. Grade, Lab Scan

11). สารมาตรฐานวิตามินเค V 3501, Sigma

12). ไฮโดรควิโนน BDH

13). แอลกอฮอล์ บริสุทธิ์, BDH

14). อะซีโทนไนไตรล์ A.R. Grade, Merck

15). เมทานอล A.R. Grade, Merck

16). เมทานอล HPLC Grade, Merck

17). ปิโตเลียมอีเทอร์จุดเดือด 40 – 60 ^{o}C , Merck

3.3.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและการหาค่า System Linearity

1). ชั่งสารมาตรฐานวิตามินเค 10 มิลลิกรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ขวดวัดปริมาตรสีชาขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนถึงขีดบอกปริมาตร

2). ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินเค ในข้อ1). มา 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรสีชาขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จนถึงขีดบอกปริมาตร (เตรียมสารละลายมาตรฐานอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น (ในช่วง 50-200 % ของความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่าง)

3). ทำการวัดสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นๆ ละ 6 ซ้ำ

4). หาค่าเฉลี่ยของค่าที่อ่านได้แต่ละระดับความเข้มข้น

5). พลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่าที่อ่านได้ (แกน Y)

จากกราฟที่พลอตระหว่างความเข้มข้นและค่าที่อ่านได้ นำมาคำนวณ Regression Line โดยใช้ Method of Least Squares ทั้งนี้ Slope ของ Regression Line ,Regression Coefficient (r^2) และ Y-Intercept สามารถนำมาเป็นเกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง ซึ่งผลของ Linearity ที่ดีจะได้กราฟเส้นตรง โดยมี Slope = 1, Regression Coefficient (r^2) = 1 (โดยทั่วไปยอมรับที่ 0.999 ถึง 0.995) และ Y-Intercept = 0

3.3.1.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์และการหาค่าการทำซ้ำ

1). นำตัวอย่างนมแต่ละชนิดผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

2). ชั่งตัวอย่าง (ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ในขวดก้นแบน ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยชั่งตัวอย่างนมแต่ละชนิดดังนี้ ตัวอย่างนมข้น 20 กรัม ตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที 100 กรัมและตัวอย่างนมผง 20 กรัม

3). เติมไฮโดรควิโนนประมาณ 0.5 กรัม สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 (น้ำหนักโดยปริมาตร) 100 มิลลิลิตรและเอทานอล 100 มิลลิลิตร

4). นำไปวางบนแผ่นทำความร้อนที่มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยมีระบบรีฟลักซ์และคนตลอดเวลาด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างคอนเดนเซอร์ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 30 มิลลิลิตร

5). ทิ้งสารละลายให้เย็นประมาณ 40 องศาเซลเซียส

6). เทสารละลายใส่ในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร ล้างขวดก้นแบนด้วยน้ำกลั่น 2–3 ครั้งๆละ 20 - 30 มิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายไว้ในกรวยแยกใบเดียวกัน

7). สกัดสารละลายด้วย เฮกเซน 2 ครั้งๆละ 100 มิลลิลิตร

8). สารละลายที่สกัดได้นำรวมกันไว้ในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร

9). ล้างสารละลายเฮกเซน ด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 100 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดด่าง (ทดสอบด้วยฟีนอฟทาลีน ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักโดยปริมาตร))

10). กรองสารละลายผ่านสำลีซึ่งมีโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำบรรจุอยู่ ใส่ขวดรูปชมพู่ เพื่อกำจัดน้ำ

11). ระเหยสารละลายเฮกเซนให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary Vacuum Evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

12). เติมปิโตเลียมอีเทอร์ประมาณ 1–2 มิลลิลิตร เพื่อถ่ายจากขวดก้นแบนใส่หลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นระเหยปิโตเลียมอีเทอร์ โดยเป่าด้วยไนโตรเจน ทำซ้ำ 3 - 5 ครั้ง

จนสารละลายแห้ง จากนั้นละลายกากที่ได้ด้วยเมทานอล 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดสัญญาณแบบอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

สภาวะเครื่อง

เฟสเคลื่อนที่ : เมทานอล

อัตราการไหล : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องวัดสัญญาณ : อัตราไวโอเลตและวิสิเบิล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

คอลัมน์ : ชนิด reverse phase ความยาวขนาด 250 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 5 ไมครอน

13). คำนวณหาปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)

ใช้สูตร $$K = \frac{C_{std.} \times V_{total} \times Height_{samp.} \times 100}{Height_{std} \times Weight_{samp.}} \quad ...(3.1)$$

เมื่อ $C_{std.}$ = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

$V_{total.}$ = ปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ละลาย (มิลลิลิตร)

$Height_{std.}$ = ความสูงของพีกสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

$Height_{samp}$ = ความสูงของพีกตัวอย่าง

$Weight_{samp.}$ = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

14). คำนวณค่า Repeatability โดยทั่วไปจะแสดงด้วยค่า % Relative Standard Deviation (RSD) หรือ Coefficient of variation (CV)

$$\%RSD = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100 \quad ...(3.2)$$

เมื่อ RSD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ย

3.3.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี/การหาค่าการกลับคืน

1). เตรียมตัวอย่างโดยเติมสารละลายมาตรฐานอย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้น (ในช่วง 50-150 % ของความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่าง)

2). วิเคราะห์ตามขั้นตอนข้างต้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

3). หาค่าเฉลี่ยของค่าที่อ่านได้แต่ละระดับความเข้มข้น (โดยรายงานในรูปร้อยละการกลับคืน)

4). พลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่าที่อ่านได้ (แกน Y)

5). คำนวณหาค่า Regression Coefficient (r^2)

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3} \qquad ...(3.3)$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง

C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

3.3.1.5 วิธีการหาค่า MDL และ LOQ

1). ทำการทดสอบ Sample Blanks ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับ 3 ความเข้มข้น

2). เตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนข้างต้นความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

3). คำนวณหาค่าเฉลี่ย และ SD

4). พลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และค่า SD (แกน Y)

5). ลากเส้นกราฟตัดที่แกน Y ได้ค่า SD_0

6). กำหนดค่า MDL เท่ากับ 3.14 SD_0

7). กำหนดค่า LOQ เท่ากับ 10 SD_0

3.3.2 วิธีการวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน

3.3.2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1). ขวดวัดปริมาตรสีชา ขนาด 25 50 100 มิลลิลิตร

2). ปิเปต ขนาด 1 2 3 4 5 มิลลิลิตร

3). ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร

4). ขวดก้นแบน ขนาด 250 มิลลิลิตร

5). ขวดก้นแบน ขนาด 500 มิลลิลิตร

6). กรวยแยก ขนาด 500 มิลลิลิตร

7). กรวยกรอง

8). สารมาตรฐานวิตามินเค V 3501, Sigma

9). เมทานอล A.R.Grade, Merck

10). แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 28 – 30 %, J.T.Baker

11). ไดคลอโรมีเทน ACS – ISO,Merck

12). ไอโซออกเทน HPLC Grade, Merck A.R. Grade,Merck

13). ไอโซโพรพานอล ACS for Analysis,Carlo Erba

14). อะซีโทน ACS – ISO,Carlo Erba

3.3.2.2 การเตรียมสารมาตรฐาน

1). ชั่งสารมาตรฐานวิตามินเค ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 0.02 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยไอโซออกเทน เขย่าให้สารละลายผสมกัน ปิเปตสารละลาย 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยไอโซออกเทน เขย่าให้สารละลายผสมกัน

2). ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินเค ในข้อ1). มา 4 และ 7 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยไอโซออกเทน เขย่าให้สารละลายผสมกัน จะได้ความเข้มข้น 400 และ 700 ไมโครกรัม / ลิตร ตามลำดับ

3.3.2.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างและการทดสอบความแม่นยำ

1). ชั่งตัวอย่างใส่กรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร

2). เติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 28 – 30 %, 4.0 มิลลิลิตร เขย่า 60 วินาที

3). เติมเมทานอล 60 มิลลิลิตร เขย่า 30 วินาที

4). เติมไดคลอโรมีเทน 100 และ ไอโซออกเทน 50 มิลลิลิตร เขย่า

5). ทิ้งให้แยกชั้น แล้วไขส่วนล่างลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

6). ทำซ้ำ ข้อ 4 – 5 อีก 2 ครั้ง

7). เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ใบเดิม

8). นำสารละลายไประเหยให้แห้งโดยใช้ Rotary Vacuum Evaporator ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

9). เติมไอโซโพรพานอล ร้อยละ 0.01 (ปริมาตร / ปริมาตร) ในไอโซออกเทน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นแบน

10). จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ในข้อ 9. ไปกำจัดสารรบกวนโดยใช้คอลัมน์แก้ว ความยาวขนาด 30 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุด้วยซิลิกา 5 กรัมและโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ 2 กรัม

11). เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในขวดก้นแบนขนาด 250 มิลลิลิตร

12). นำสารละลายไประเหยให้แห้งโดยใช้ Rotary Vacuum Evaporator ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

13). เติมอะซีโทน 2 – 3 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นแบน เพื่อละลายกากที่ได้แล้วปิเปตสารละลายใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเป่าด้วยไนโตรเจน

14). ทำซ้ำข้อ 13). 4 – 5 ครั้งจนสารละลายแห้ง

15). ละลายกากที่ได้ด้วยไอโซออกเทนปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปตกตะกอนโดยใช้เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

สภาวะของเครื่อง

เฟสเคลื่อนที่ : สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและไอโซโพรพานอล (เข้มข้นร้อยละ 0.02 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และไอโซออกเทน) เท่ากับ 30 : 70

อัตราการไหล : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องวัดสัญญาณ : อัตราไวโอเลตและวิสิเบิล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

16.). คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หรือค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

3.3.2.4 การสร้างกราฟมาตรฐาน

1). นำสารละลายมาตรฐานวิตามินเคที่เตรียมไว้ (ในข้อ 3.3.2.2) ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะเครื่องที่กล่าวข้างต้น ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ

2). สร้างกราฟมาตรฐานโดยพลอตระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกับความสูงของพีก

3.3.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี

ทดสอบจากตัวอย่าง 3 กลุ่ม โดยเติมสารละลายมาตรฐานวิตามินเคที่ทราบความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น เตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ตามขั้นตอนที่กล่าวข้างต้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ รายงานค่าในรูปร้อยละการกลับคืน

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. คำนวณหาปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างนมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผง โดยรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

2. เปรียบเทียบปริมาณวิตามินเค ที่วิเคราะห์ได้โดยแต่ละวิธีด้วยวิธีทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน

3.4.1 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1). ค่าเฉลี่ย (Jeffery, Bassett, Mendham and Denney. 1989 : 135)

$$\text{ใช้สูตร } \bar{X} = \frac{\sum_{i}^{n} X}{n} \qquad \ldots(3.4)$$

เมื่อ $\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ย

$\sum_{i}^{n} X$ = ผลรวมของค่าแต่ละค่าในชุดข้อมูล

n = จำนวนข้อมูลของกลุ่มตัวอย่าง

2). ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Jeffery, Bassett, Mendham and Denney. 1989 : 135)

$$\text{ใช้สูตร } SD = \sqrt{\frac{\sum\left(X_i - \bar{X}\right)^2}{\left(n-1\right)}} \qquad \ldots(3.5)$$

เมื่อ SD = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่าง

X_i = ค่าแต่ละค่าในชุดข้อมูล

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง

n = จำนวนข้อมูลของกลุ่มตัวอย่าง

3). การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Miller and Miller. 1993 : 61)

$$\text{ใช้สูตร} \quad F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \qquad \ldots(3.6)$$

โดยที่ $S_1^2 > S_2^2$

เมื่อ F = อัตราส่วนความแปรปรวน

S_1^2 = ความแปรปรวนของข้อมูลชุดที่ 1

S_2^2 = ความแปรปรวนของข้อมูลชุดที่ 2

4). การทดสอบสมมติฐาน (Jeffery, Bassett, Mendham and Denney. 1989 : 141)

$$\text{ใช้สูตร} \quad t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S_P\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \qquad \ldots(3.7)$$

เมื่อ $S_P = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$

$\bar{X}_1$ และ $\bar{X}_2$ = ค่าเฉลี่ยของตัวอย่างชุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

S_1 และ S_2 = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างชุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

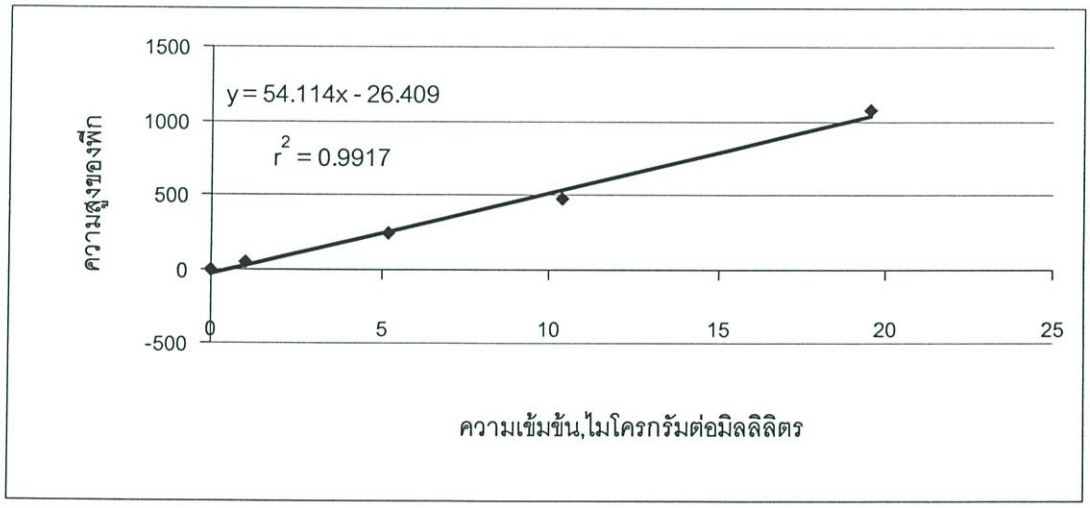
n_1 และ n_2 = จำนวนข้อมูลชุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างนม จำแนกตามกลุ่มตัวอย่างได้แก่ นมข้น 5 ตัวอย่าง นมพร้อมดื่มยูเอชที 5 ตัวอย่างและนมผง 10 ตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 4.1-4.9 และรูปที่ 4.1-4.3

4.1 การหา System Linearity ของวิธีมาตรฐาน

ทดสอบโดยใช้สารละลายมาตรฐานวิตามินเคที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 (ตารางที่ ก.51)

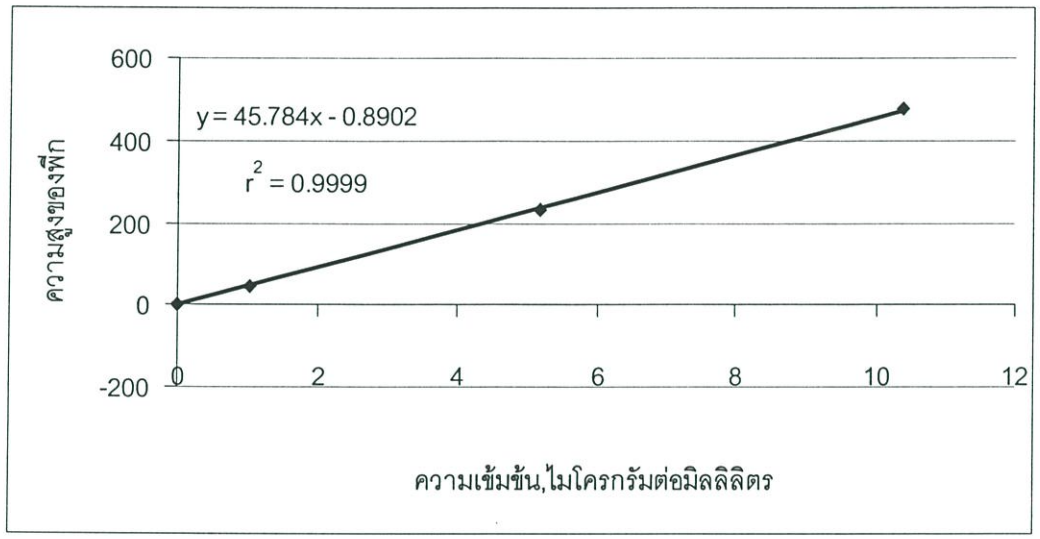


รูปที่ 4.1 แสดงการหา System Linearity ของวิธีมาตรฐาน

จากรูปที่ 4.1 การทดสอบ System Linearity ของวิธีมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเคเท่ากับ 1.04, 5.18, 10.37 และ 19.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.52, 0.41, 0.98 และ 7.17 ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.11, 0.18, 0.21 และ 0.67 ตามลำดับ

จากผลการทดสอบ โดยจะแสดงถึงความสามารถของระบบที่ให้ผลการทดลองเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0–19.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์เท่ากับ 0.9917 และพบว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค เป็นเส้นตรง

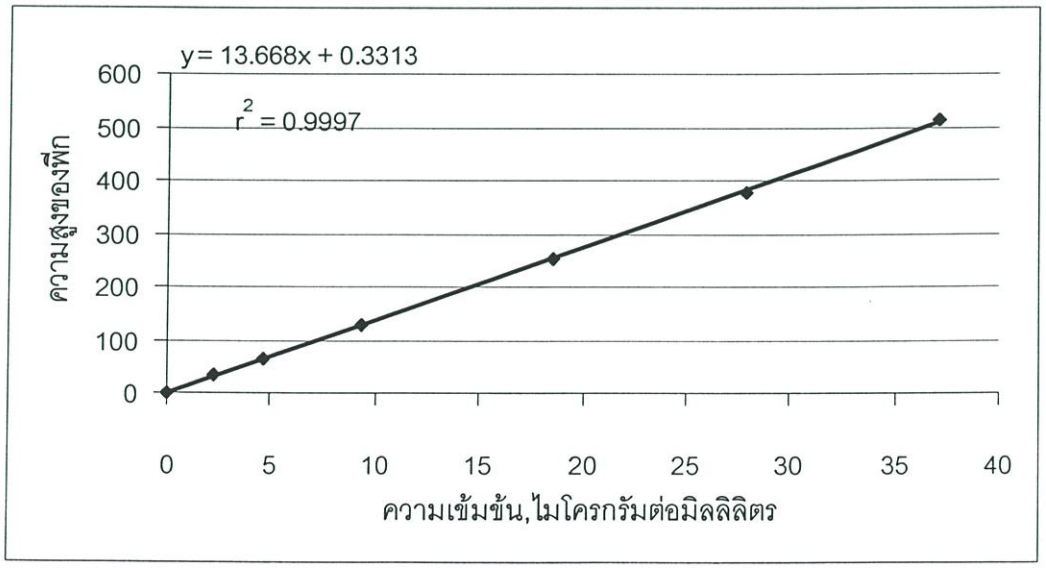
ในช่วงความเข้มข้น 0–10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 ซึ่งโดยทั่วไปยอมรับค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ ≥ 0.9995 (ดังแสดงในรูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 แสดงการหา System Linearity ของวิธีมาตรฐาน

4.2 การหา System Linearity ของวิธีที่พัฒนาขึ้นมา

ทดสอบโดยใช้สารละลายมาตรฐานวิตามินเคที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ตารางที่ ก.52)



รูปที่ 4.3- แสดงการหา System Linearity ของวิธีที่พัฒนาขึ้นมา

จากรูปที่ 4.3 การทดสอบ System Linearity ของวิธีที่พัฒนาขึ้นมา ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเคเท่ากับ 2.32, 4.65, 9.30, 18.59, 27.89 และ 37.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.15, 0.82, 1.60, 1.60, 1.94 และ 3.35 ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 3.48, 1.24, 1.25, 0.64, 0.51 และ 0.65 ตามลำดับ

จากผลการทดสอบ โดยจะแสดงถึงความสามารถของระบบที่ให้ผลการทดลองเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0–40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997 ซึ่งโดยทั่วไปยอมรับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ≥ 0.9995 เมื่อเปรียบเทียบ System Linearity ของวิธีมาตรฐานกับวิธีที่พัฒนาขึ้นมา พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมา มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค เป็นเส้นตรงในช่วงกว้างกว่าวิธีมาตรฐาน ทั้งนี้ขึ้นกับสารที่ถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่บนเฟสอยู่กับที่นาน

4.3 แสดงผลการทดลองในตัวอย่างนมข้น

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทำซ้ำในตัวอย่างนมข้น

ตัวอย่าง	วิธีมาตรฐาน			วิธีที่พัฒนาขึ้นมา		
	$\bar{X}$ (µg/ 100 g)	SD	%RSD	$\bar{X}$ (µg/ 100 g)	SD	%RSD
1	-	0	0	-	0	0
2	-	0	0	-	0	0
3	-	0	0	-	0	0
4	-	0	0	-	0	0
5	-	0	0	-	0	0

- ตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเค

จากตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างนมข้น จำนวน 5 ตัวอย่าง จะเห็นว่าตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเค ทั้งวิธีมาตรฐานและวิธีที่พัฒนาขึ้นมา

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างนมข้น ตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเคทั้ง 2 วิธี เนื่องจากโดยลักษณะทั่วไปของตัวอย่างไม่มีปริมาณวิตามินเค แต่ที่ผู้วิจัยนำตัวอย่าง นมข้นมาทำการวิเคราะห์ เพื่อที่จะศึกษาลักษณะของตัวอย่าง (Matrix sample)

ตารางที่ 4.2 แสดงการทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมข้น ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอย่าง	ค่าที่ได้จากการคำนวณ	ค่าที่ได้จากการเปิดตาราง t	t-test
1	0	2.262	√
2	0	2.262	√
3	0	2.262	√
4	0	2.262	√
5	0	2.262	√

√ ยอมรับ

จากตารางที่ 4.2 การทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมข้น ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า t ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 0 และ ค่า t ที่เปิดจากตารางมีค่าเท่ากับ 2.262

จากผลการทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมข้น ค่า t ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่าค่า t จากตาราง ดังนั้นจึงยอมรับสมมติฐาน แสดงว่าการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเค ตามวิธีมาตรฐานกับการเตรียมตัวอย่างที่ได้พัฒนาขึ้นมา มีปริมาณวิตามินเคไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.3 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตัวอย่างนมข้น ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอย่าง	ค่าที่ได้จากการคำนวณ	ค่าที่ได้จากการเปิดตาราง F	F-test
1	0	4.026	√
2	0	4.026	√
3	0	4.026	√
4	0	4.026	√
5	0	4.026	√

√ ยอมรับ

จากตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในตัวอย่างนมข้น ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า F ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 0 และค่า F ที่เปิดจากตารางมีค่าเท่ากับ 4.026

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตัวอย่างนมข้น ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า F ที่คำนวณได้น้อยกว่าค่า F จากตาราง จึงยอมรับผลการทดลอง แสดงว่าการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเคตามวิธีมาตรฐานกับการเตรียมตัวอย่างที่ได้พัฒนาขึ้นมา มีความแปรปรวนของปริมาณวิตามินเคไม่แตกต่างกัน

4.4 แสดงผลการทดลองในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทำซ้ำในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที

ตัวอย่าง	วิธีมาตรฐาน			วิธีที่พัฒนาขึ้นมา		
	$\bar{X}$ (µg/ 100 g)	SD	%RSD	$\bar{X}$ (µg/ 100 g)	SD	%RSD
1	4.57	0.75	16.41	6.81	0.65	9.54
2	2.92	0.28	9.59	3.74	0.28	7.49
3	-	0	0	-	0	0
4	6.63	0.43	6.49	6.94	0.74	10.66
5	-	0	0	-	0	0

- ตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเค

จากตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยวิธีมาตรฐาน พบว่าปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างที่ 1, 2 และ 4 มีค่าเท่ากับ 4.57, 2.92 และ 6.63 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.75, 0.28 และ 0.43 ตามลำดับ และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 16.41, 9.59 และ 6.49 ตามลำดับ โดยที่ตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างที่ 3 และ 5 สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเค โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นมา ตรวจพบปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างที่ 1, 2 และ 4 มีค่าเท่ากับ 6.81, 3.74 และ 6.94 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.65, 0.28 และ 0.74 ตามลำดับ และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 9.54, 7.49 และ 10.66 ตามลำดับ และตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างที่ 3 และ 5

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเค โดยวิธีมาตรฐานพบว่าปริมาณวิตามินเคที่ตรวจพบได้ในช่วง 0-6.63 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในช่วง 0.28–0.75 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในช่วง 6.49-16.41 สำหรับวิธีที่พัฒนาขึ้นมาพบว่าปริมาณวิตามินเคที่ตรวจพบได้ในช่วง 0-6.94 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในช่วง 0.28–0.74 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ช่วง 7.49-10.66 ซึ่งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ยอมรับได้ ≥ 2 ($n>6$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเที่ยงของวิธีทดสอบ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความใกล้เคียงกันของกลุ่มค่าที่ทดสอบหลาย ๆ ครั้งสูง และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ยอมรับได้ ≤ 20 (ปริมาณวิตามินเคที่ตรวจพบในตัวอย่างระดับไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)

ตารางที่ 4.5 แสดงการทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอย่าง	ค่าที่ได้จากการคำนวณ	ค่าที่ได้จากการเปิดตาราง t	t-test
1	6.788	2.306	×
2	6.245	2.306	×
3	0	2.262	√
4	1.146	2.262	√
5	0	2.262	√

√ ยอมรับ

× ปฏิเสธ

จากตารางที่ 4.5 การทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่า ค่า t ที่คำนวณได้ในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เท่ากับ 6.788, 6.245, 0, 1.146 และ 0 ตามลำดับ สำหรับค่าที่เปิดจากตารางมีค่าเท่ากับ 2.306, 2.306, 2.262, 2.262 และ 2.262 ตามลำดับ

จากผลการทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที ค่า t ที่คำนวณได้ในตัวอย่างที่ 1 และ 2 มีค่ามากกว่าค่า t จากตาราง จึงปฏิเสธสมมติฐาน สำหรับค่า t ในตัวอย่างที่ 3, 4 และ 5 น้อยกว่าค่า t จากตาราง จึงยอมรับสมมติฐาน แสดงว่าการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเคตามวิธีมาตรฐานกับการเตรียมตัวอย่างที่ได้พัฒนาขึ้นมามีปริมาณวิตามินเคไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.6 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอย่าง	ค่าที่ได้จากการคำนวณ	ค่าที่ได้จากการเปิดตาราง F	F-test
1	1.332	4.433	√
2	1.000	4.433	√
3	0	4.026	√
4	2.962	4.026	√
5	0	4.026	√

√ ยอมรับ

จากตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า F ที่คำนวณได้ในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เท่ากับ 1.332, 1.000, 0, 2.962 และ 0 ตามลำดับ สำหรับค่าที่เปิดจากตารางมีค่าเท่ากับ 4.433, 4.433, 4.026, 4.026 และ 4.026 ตามลำดับ

จากผลการทดลอง ค่า F ที่คำนวณได้ในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 น้อยกว่าค่า F จากตาราง จึงยอมรับผลการทดลอง แสดงว่าการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเคตามวิธีมาตรฐานกับการเตรียมตัวอย่างที่ได้พัฒนาขึ้นมา มีความแปรปรวนของปริมาณวิตามินเคไม่แตกต่างกัน

4.5 แสดงผลการทดลองในตัวอย่างนมผง

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทำซ้ำในตัวอย่างนมผง

ตัวอย่าง	วิธีมาตรฐาน			วิธีที่พัฒนาขึ้นมา		
	$\bar{X}$ (µg/ 100 g)	SD	%RSD	$\bar{X}$ (µg/ 100 g)	SD	%RSD
1	-	0	0	3.33	1.01	30.33
2	24.73	6.29	25.43	10.01	5.03	50.25
3	33.76	5.20	15.40	16.51	1.24	7.51
4	110.86	11.27	10.17	24.36	4.08	16.75

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

ตัวอย่าง	วิธีมาตรฐาน			วิธีที่พัฒนาขึ้นมา		
	$\bar{X}$ (µg/ 100 g)	SD	%RSD	$\bar{X}$ (µg/ 100 g)	SD	%RSD
5	56.24	4.78	8.50	52.19	1.26	2.41
6	41.21	11.99	29.09	14.31	1.21	8.46
7	19.42	2.53	13.03	38.00	5.41	14.24
8	-	0	0	-	0	0
9	102.28	12.29	12.02	55.13	0.78	1.41
10	29.0	7.10	24.48	37.70	3.78	10.03

- ตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเค

จากตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างนมผง จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยวิธีมาตรฐาน พบว่าในตัวอย่างที่ 1 และ 8 ตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเค ส่วนในตัวอย่างที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 และ 10 ตรวจพบปริมาณวิตามินเค มีค่าเท่ากับ 24.73, 33.76, 110.86, 56.24, 41.21, 19.42, 102.28 และ 29.00 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 6.29, 5.20, 11.27, 4.78, 11.99, 2.53, 12.29 และ 7.10 ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 25.43, 15.40, 10.17, 8.50, 29.09, 13.09,12.02 และ 24.48 ตามลำดับ สำหรับวิธีที่พัฒนาขึ้นมา ตรวจพบปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 และ 10 มีค่าเท่ากับ 3.33, 10.01, 16.51, 24.36, 52.19, 14.31, 38.00, 55.13 และ 37.70 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.01, 5.03, 1.24, 4.08, 1.26, 1.21, 5.41, 0.78 และ 3.78 ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 30.33, 50.25, 7.51 , 16.75, 2.41, 8.46 ,14.24, 1.41 และ 10.03 ตามลำดับ และตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างที่ 8

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเค ในตัวอย่างนมผง จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยวิธีมาตรฐานพบปริมาณวิตามินเคในช่วง 19.42-110.86 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในช่วง 2.53-12.29 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในช่วง 8-29.09 โดยพบว่านมผงตัวอย่างที่ 7 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำสุด (2.53) และนมผงตัวอย่างที่ 9 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงสุด (12.29) ส่วนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์พบว่านมผงตัวอย่างที่ 5 มีค่าต่ำสุด

(8.50) และนมผงตัวอย่างที่ 6 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สูงสุด (29.09) สำหรับวิธีที่พัฒนาขึ้นมาพบปริมาณวิตามินเคในช่วง 3.33-55.13 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในช่วง 0.78-5.41 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในช่วง 1.41–50.25 โดยพบว่านมผงตัวอย่างที่ 9 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำสุด (0.78) และนมผงตัวอย่างที่ 7 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงสุด (5.41) ส่วนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์พบว่านมผงตัวอย่างที่ 9 มีค่าต่ำสุด (1.41) และนมผงตัวอย่างที่ 2 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สูงสุด (50.25) ซึ่งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ยอมรับได้ ≥ 2 ($n>6$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเที่ยงของวิธีทดสอบซึ่งเป็นค่าที่แสดงความใกล้เคียงกันของกลุ่มค่าที่ทดสอบหลายๆ ครั้งสูง และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ยอมรับได้ ≤ 20 (ปริมาณวิตามินเคที่ตรวจพบระดับไมโครกรัมต่อ 100 กรัม) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง

ตารางที่ 4.8 แสดงการทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมผง ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอย่าง	ค่าที่ได้จากการคำนวณ	ค่าที่ได้จากการเปิดตาราง t	t-test
1	0	2.571	√
2	21.69	2.571	×
3	27.88	2.776	×
4	106.32	2.776	×
5	23.62	2.306	×
6	40.31	2.306	×
7	14.15	2.365	×
8	0	2.262	√
9	90.45	2.447	×
10	3.43	2.262	×

√ ยอมรับ

× ปฏิเสธ

จากตารางที่ 4.8 การทดสอบสมมติฐานในตัวอย่างนมผง ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า t ที่คำนวณได้ในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 เท่ากับ 0, 21.69, 27.88, 106.32, 23.62, 40.31, 14.15, 0, 90.45 และ 3.43 และ ค่า t ที่เปิดจากตารางเท่ากับ 2.571, 2.571, 2.776, 2.776, 2.306, 2.306, 2.365, 2.262, 2.447 และ 2.262 ตามลำดับ

จากผลการทดลองค่า t ที่คำนวณในตัวอย่างที่ 2-10 ยกเว้นตัวอย่างที่ 8 มีค่า t มากกว่าค่า t จากตาราง จึงปฏิเสธสมมติฐาน แสดงว่าการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเค ตามวิธีมาตรฐานกับการเตรียมตัวอย่างที่ได้พัฒนาขึ้นมามีปริมาณวิตามินเคแตกต่างกัน สำหรับค่า t ที่คำนวณได้ในตัวอย่างที่ 1. และ 8 น้อยกว่าค่า t จากตาราง แต่จะไม่นำมาพิจารณาเนื่องจากตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเค

ตารางที่ 4.9 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตัวอย่างนมผง ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอย่าง	ค่าที่ได้จากการคำนวณ	ค่าที่ได้จากการเปิดตาราง F	F-test
1	0	7.146	√
2	1.564	7.146	√
3	17.558	9.605	×
4	7.628	9.605	√
5	14.371	4.433	×
6	98.466	4.433	×
7	4.573	4.995	√
8	0	4.026	√
9	247.607	5.820	×
10	3.528	4.026	√

√ ยอมรับ

× ปฏิเสธ

จากตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในตัวอย่างนมผง ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า F ที่คำนวณได้ในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 เท่ากับ 0, 1.564, 17.558, 7.628, 14.371, 98.466, 4.573, 0, 247.607 และ 3.528 และค่า F ที่เปิดจากตารางเท่ากับ 7.146, 7.146, 9.605, 9.605, 4.433, 4.433, 4.995, 4.026, 5.820 และ 4.026

จากผลการทดลองค่า F ที่คำนวณได้ในตัวอย่างที่ 1, 2, 4, 7, 8 และ 10 น้อยกว่าค่า F จากตาราง จึงยอมรับผลการทดลอง แสดงว่าการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเค ตามวิธีมาตรฐานกับการเตรียมตัวอย่างที่ได้พัฒนาขึ้นมา มีความแปรปรวนของปริมาณวิตามินเคไม่แตกต่างกัน ส่วนค่า F ที่คำนวณได้ในตัวอย่างที่ 3, 5, 6 และ 9 มากกว่าค่า F จากตาราง จึงปฏิเสธผลการทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องจากความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง ทำให้ค่าความแปรปรวนสูง

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินเค โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน มีจุดประสงค์เพื่อประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลากหลาย มีความถูกต้อง แม่นยำสูง โดยใช้ตัวอย่างนมที่วางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้าในเขตบางเขน ได้แก่นมข้น 5 ตัวอย่าง นมพร้อมดื่มยูเอชที 5 ตัวอย่างและนมผง 10 ตัวอย่าง ซึ่งผลิตและบรรจุในประเทศไทย ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2544 ถึงเดือนตุลาคม 2546 โดยการเตรียมตัวอย่างวิธีที่พัฒนาขึ้นมา สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเคเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 5–40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในตัวอย่างนมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผงเท่ากับ 0, 0.28 - 0.85 และ 0.78 – 5.03 ตามลำดับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0, 7.49 – 12.28 และ 0 – 50.25 ตามลำดับ ค่าการกลับคืนร้อยละ 76.42, 73.26 และ 56.82 –70.06 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (3 SD) เท่ากับ 3.76 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม และ ขีดจำกัดในการวิเคราะห์ปริมาณ (10 SD) เท่ากับ 5.72 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ส่วนตัวอย่างนมผงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (3 SD) เท่ากับ 3.33 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม และขีดจำกัดในการวิเคราะห์ปริมาณ (10 SD) เท่ากับ 15 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม

สำหรับวิธีมาตรฐาน ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 5–10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในตัวอย่างนมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผงเท่ากับ 0, 0.28 - 0.75 และ 0 – 12.29 ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0, 0 – 16.41 และ 0 – 29.09 ตามลำดับ การกลับคืนร้อยละ 38.15, 86.86 และ 36.37 – 48.40 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง วิธีมาตรฐานกับวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาพบว่าปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างนมข้น นมพร้อมดื่มยูเอชทีและนมผงทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกัน

จากสรุปผลการทดลองจะพบว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างที่พัฒนาขึ้นมา เป็นวิธีที่สามารถใช้แทนวิธีมาตรฐานได้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที ซึ่งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย มีประสิทธิภาพสูง และสามารถหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีซึ่งเป็นอันตรายได้ สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเคในตัวอย่างนมผงจะพบว่าทั้ง 2 วิธีมีปริมาณ

วิตามินเคที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากตัวอย่างไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสังเกตเห็นได้จากค่าการทำซ้ำ

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

การวิจัยในครั้งนี้มีข้อจำกัดเรื่องระยะเวลา ซึ่งการศึกษาการพัฒนาการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์วิตามินเคในตัวอย่างนมโดยเทคนิค HPLC เป็นวิธีที่สามารถใช้แทนวิธีมาตรฐานได้ ซึ่งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย มีประสิทธิภาพสูง และสามารถหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีซึ่งเป็นอันตรายได้

ข้อเสนอแนะในการวิจัยต่อไป

ศึกษาปริมาณไขมันในตัวอย่างนมและความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง เนื่องจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ มีไขมันเหลือจากการสกัดตัวอย่าง และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สูง

บรรณานุกรม

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2544. **"การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี."** กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. เอกสารประกอบการประชุม.

กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2544. **"โครงการพัฒนาห้องปฏิบัติการเพื่อสนับสนุนอุตสาหกรรมอาหารส่งออก."** กรุงเทพฯ : กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. เอกสารประกอบการประชุม.

.....2545. **"อาหารที่แสดงฉลากโภชนาการ."** กรุงเทพฯ : กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. เอกสารประกอบการประชุม.

เพ็ญพรรณ อัศวกุล และโอทอง สวัสดีมงคล, ม.ล., บรรณาธิการ. 2539. **Liquid Chromatography ในงานวิเคราะห์.** กรุงเทพฯ : ประชาชนจำกัด.,หน้า 1-114.

มหาวิทยาลัยมหิดล. 2542. "Development of Reference Materials and their Used for External Analytical Quality Control Programme." หน้า 1-6. ใน **การประชุมโครงการพัฒนาคุณภาพการวิเคราะห์สารอาหาร.** กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยภชนาการ.

รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. 2536. **เคมีอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.,หน้า 47-53.

ลัดดาวัลย์ การะโชติ. 2533. "วิตามิน." **วิทยาศาสตร์.** 34(5) : 412-418.

สรรเสริญ ทรัพย์โตษก. 2531. **โภชนาการเชิงชีวเคมี.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.,หน้า 367-370.

อารมย์ ปริญญากุล และนคร พูลสนอง. 2522. "วิตามินชนิดที่ใช้ดื่มและวิตามินในยาสำเร็จรูปโดยทั่วไป." **อุตสาหกรรมอาหาร.** 18(2) : 1-14.

Bueno, M.P., editor. 1995. "*trans* – Vitamin K_1 (Phylloquinone) in Ready–To–Feed Milk–Based Infant Formula Liquid Chromatographic Method." **Assocication of Official Analytical Chemists.** 6-8

Horwitz, W., editor. 2000. **Assocication of Official Analytical Chemists.**2. 17th ed. The United States of America : AOAC INTERNATIONAL., pp 32-34.

Ball, G.F.M. 1988. **Fat-Soluble Vitamin Assays In Food Analysis.** (A Comprehensive Review). New York : Elsevier Applied Science., pp 50-56.

Hwang, S.M. 1985. "Liquid Chromatographic Determination of Vitamin K_1 *Trans*-and *Cis*-Isomers in Infant Formula." **J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM.** 68(4) : 684-688.

Indyk, H.E., Littlejohn, V.C., Lawrence, R.J. and Woollard, D.C. 1995. "Liquid Chromatographic Determination of Vitamin K_1 in Infant Formulas and Milk." **Journal of AOAC International.** 78(3) : 719-723.

Jeffery, G.H., Bassett, J., Mendham, J. and Denney, R.C. 1989. **Textbook of Quantitative Chemical Analysis.** 5th ed. English : English Language Book Society.,pp 135-141.

Jeon, J.I. and Ikins, G. W.,editor. 1995. **Analyzing Food for Nutrition Labeling and Hazardous Contaminants.** New York : Marcel Dekker.,pp 263-266

De Leenheer, A.P., Lambert, W.E. and Nelis, H.J., editor. 1992. **Modern Chromatographic Analysis of Vitamins.** 2nd ed. New York : Marcel Dekker.,pp 197-229.

Miller, J.C. and Miller, J.N. 1993. **Statisitcs for Analytical Chemistry.** 3rd ed. England : Simon & Schuster International Group.,p 55.

Ware, G.M., Chase, G.W., Eitenmiler, R.R. and Long, A.R. 2000. "Determination of Vitamin K_1 in Medical Foods by Liquid Chromatography with Postcolumn Reduction and Fluorometric Detection." **Journal of AOAC International.** 83(4) : 957-962.

Wollard, D.C., Indyk, H.E., Fong, B.Y. and Cook, K.K. 2002. "Determination of Vitamin K_1 Isomers in Foods by Liquid Chromatography with C_{30} Bonded – Phase Column." **Journal of AOAC International.** 85(3) : 682-691.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แสดงผลการทดลอง

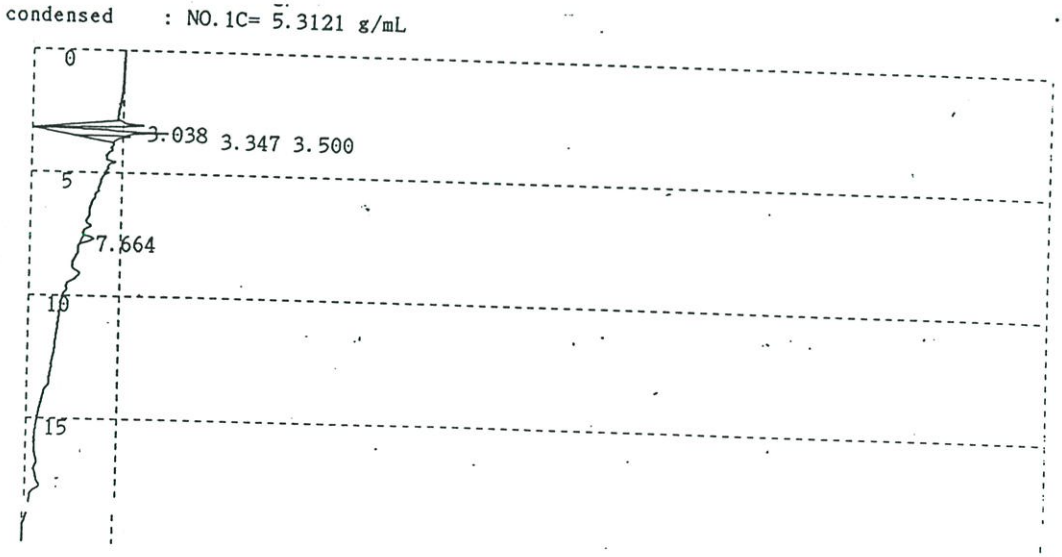
Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 4.880 ug/mL

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	5.671	113	18			7.0993	
	3	6.093	1477	207			92.9007	
		TOTAL	1590	225			100	

รูปที่ ก.1 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

condensed : NO.1C= 5.3121 g/mL

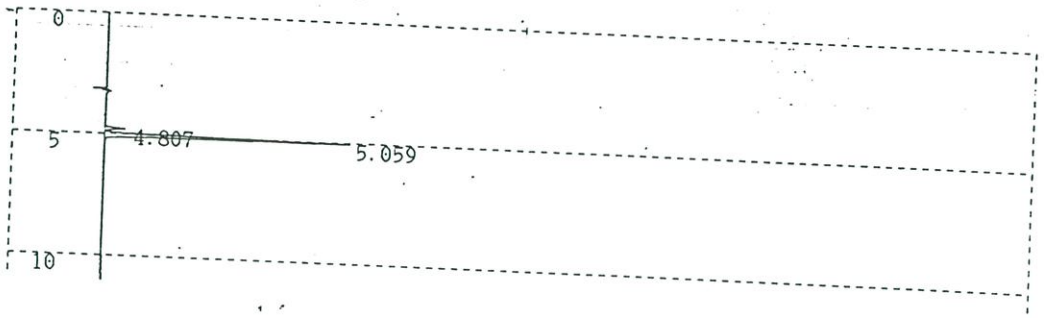


รูปที่ ก.2 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 1

ตารางที่ ก.1 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 1

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ100 กรัม)
1	5.0790	-	-	-
2	5.7151	-	-	-
3	5.3121	-	-	-
4	5.2319	-	-	-
5	5.3658	-	-	-
6	5.7723	-	-	-
7	5.1301	-	-	-
8	5.0430	-	-	-
9	5.2495	-	-	-
10	5.1509	-	-	-
$\bar{X}$				-
SD				0
%RSD				0

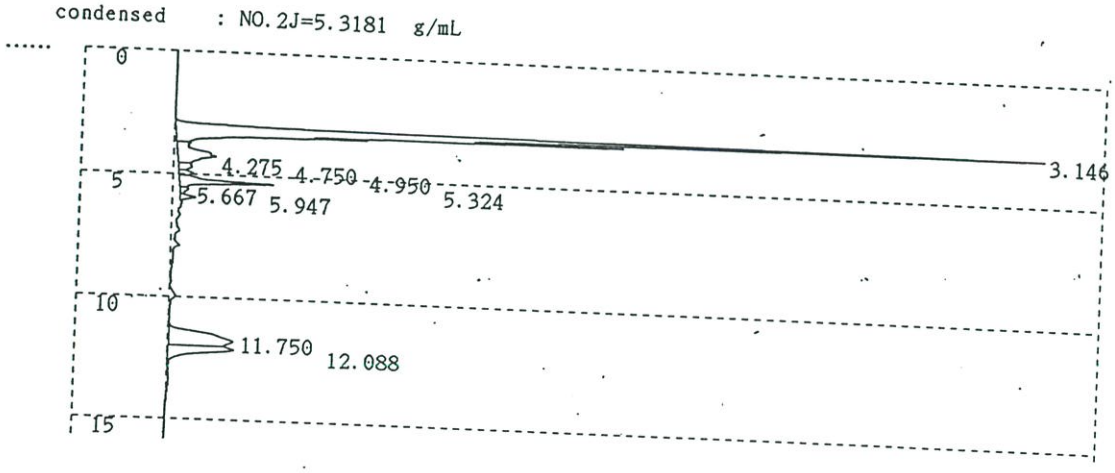
Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 4.880 ug/mL
condensed : NO.2F= g/mL



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	4.807	117	22			7.3099	
	4	5.059	1479	264	V		92.6901	
		TOTAL	1595	286			100	

รูปที่ ก.3 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

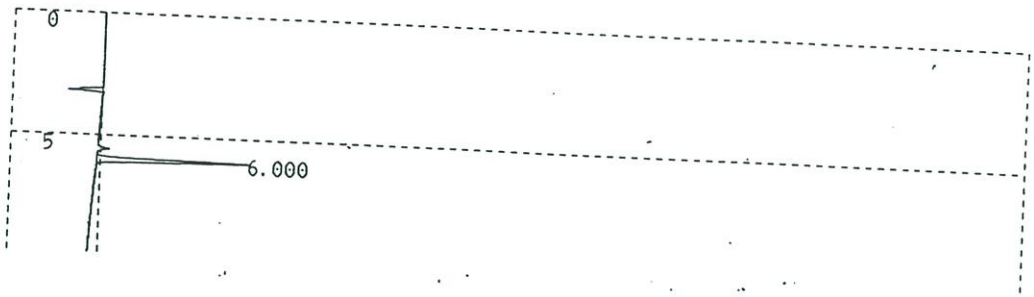


รูปที่ ก.4 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 2

ตารางที่ ก.2 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 2

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ100 กรัม)
1	5.4120	-	-	-
2	5.3390	-	-	-
3	5.1026	-	-	-
4	5.0704	-	-	-
5	5.4801	-	-	-
6	5.3043	-	-	-
7	5.3310	-	-	-
8	5.4605	-	-	-
9	5.0833	-	-	-
10	5.3181	-	-	-
$\bar{X}$				-
SD				0
%RSD				0

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 3.904 ug/mL
condensed : NO.3 g/mL

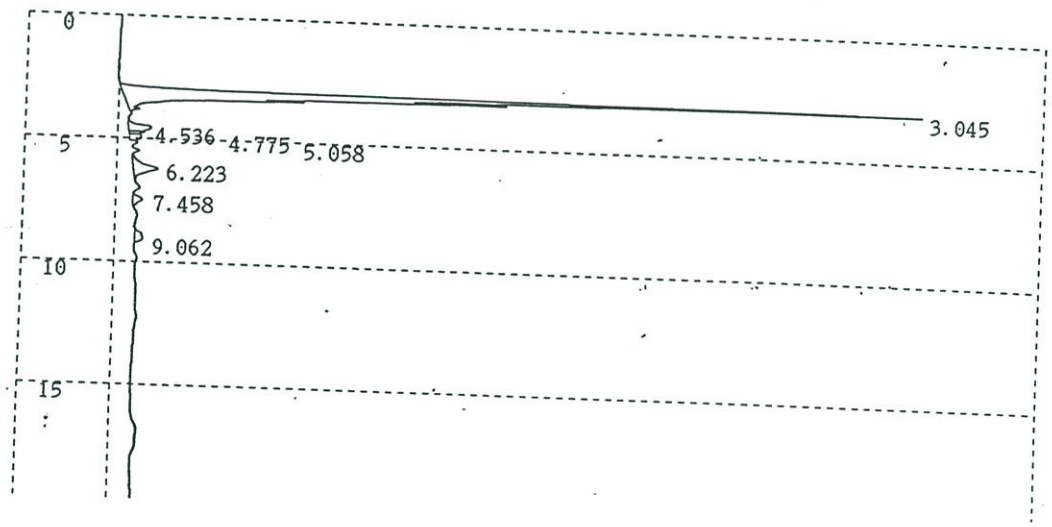


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	6	1277	165			100	
		TOTAL	1277	165			100	

รูปที่ ก.5 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

condensed : NO.3J=5.0412 g/mL

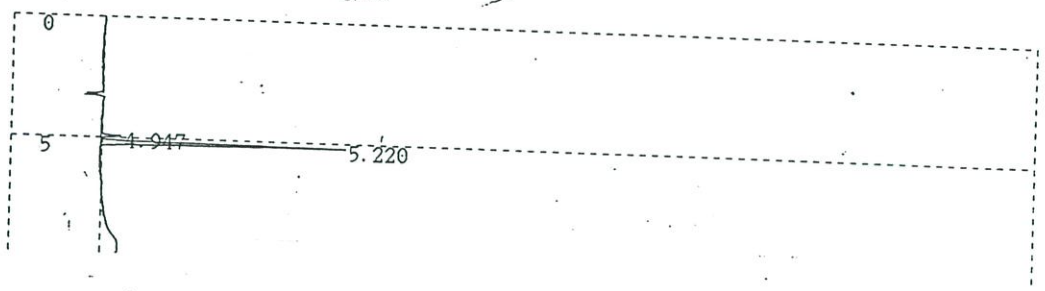


รูปที่ ก.6 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 3

ตารางที่ ก.3 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 3

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ100 กรัม)
1	5.6353	-	-	-
2	5.7693	-	-	-
3	5.2709	-	-	-
4	5.1742	-	-	-
5	5.1770	-	-	-
6	5.8028	-	-	-
7	5.7813	-	-	-
8	5.0466	-	-	-
9	5.0453	-	-	-
10	5.0412	-	-	-
$\overline{X}$				-
SD				0
%RSD				0

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 4.880 ug/mL
condensed : NO.4 = g/mL

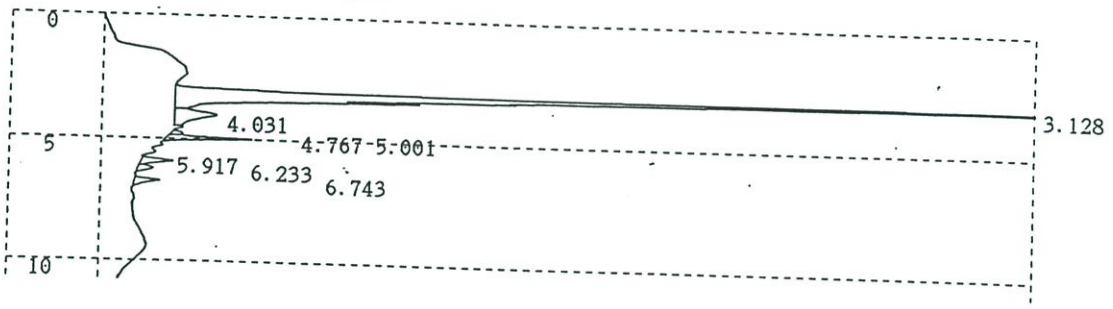


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	4.947	119	22			7.289	
	3	5.22	1509	262	V		92.7109	
		TOTAL	1627	284			100	

รูปที่ ก.7 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

condensed : NO.4J=5.0586 g/mL

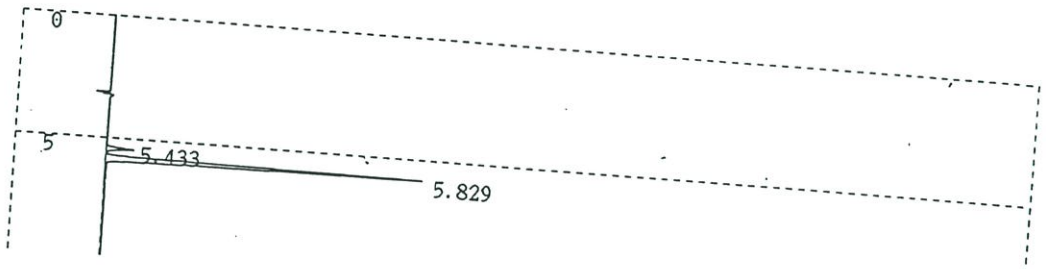


รูปที่ ก.8 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 4

ตารางที่ ก.4 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 4

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ100 กรัม)
1	5.6147	-	-	-
2	5.8387	-	-	-
3	5.2302	-	-	-
4	5.1202	-	-	-
5	5.3131	-	-	-
6	5.1863	-	-	-
7	5.5240	-	-	-
8	5.5613	-	-	-
9	5.1168	-	-	-
10	5.0586	-	-	-
$\overline{X}$				-
SD				0
%RSD				0

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 7.808 ug/mL

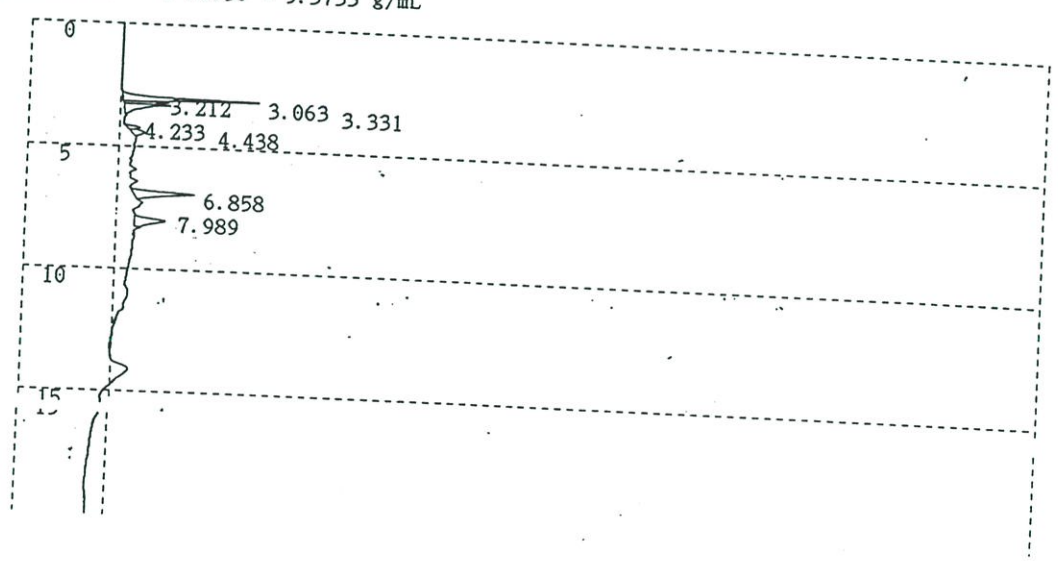


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	5.433	182	29			7.2666	
	3	5.829	2318	341			92.7334	
		TOTAL	2499	370			100	

รูปที่ ก.9 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

Condensed : NO.5J = 5.3733 g/mL

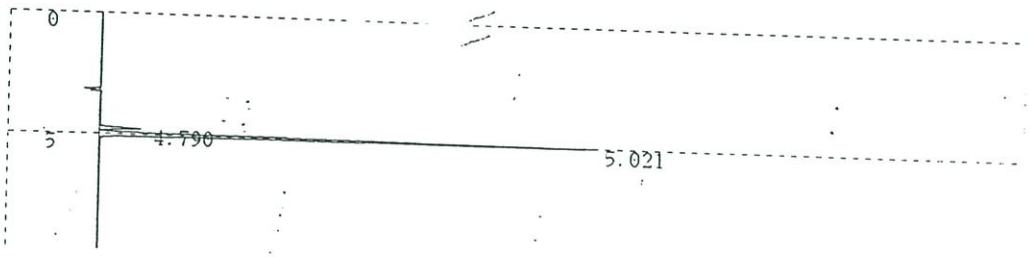


รูปที่ ก.10 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 5

ตารางที่ ก.5 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมข้นตัวอย่างที่ 5

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ100 กรัม)
1	5.5478	-	-	-
2	5.3497	-	-	-
3	5.3387	-	-	-
4	5.8921	-	-	-
5	5.9018	-	-	-
6	5.5628	-	-	-
7	5.8021	-	-	-
8	5.0993	-	-	-
9	5.8399	-	-	-
10	5.3733	-	-	-
$\overline{X}$				-
SD				0
%RSD				0

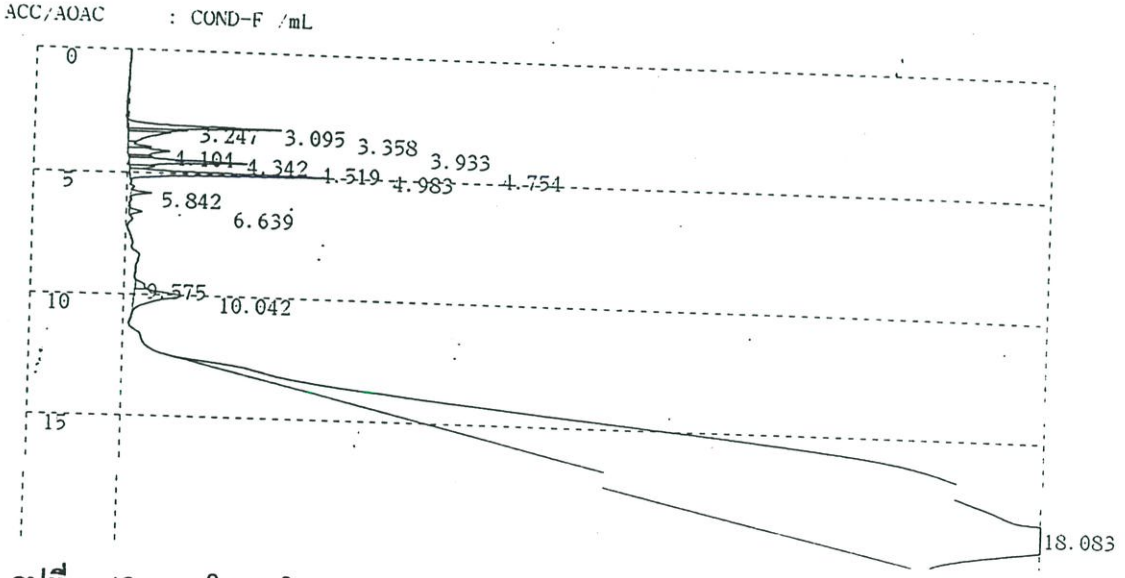
Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 9.76 ug/mL
ACC/AOAC : COND- /mL



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	4.79	239	45			7.3243	
	3	5.021	3018	540	V		92.6757	
		TOTAL	3256	586			100	

รูปที่ ก.11 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

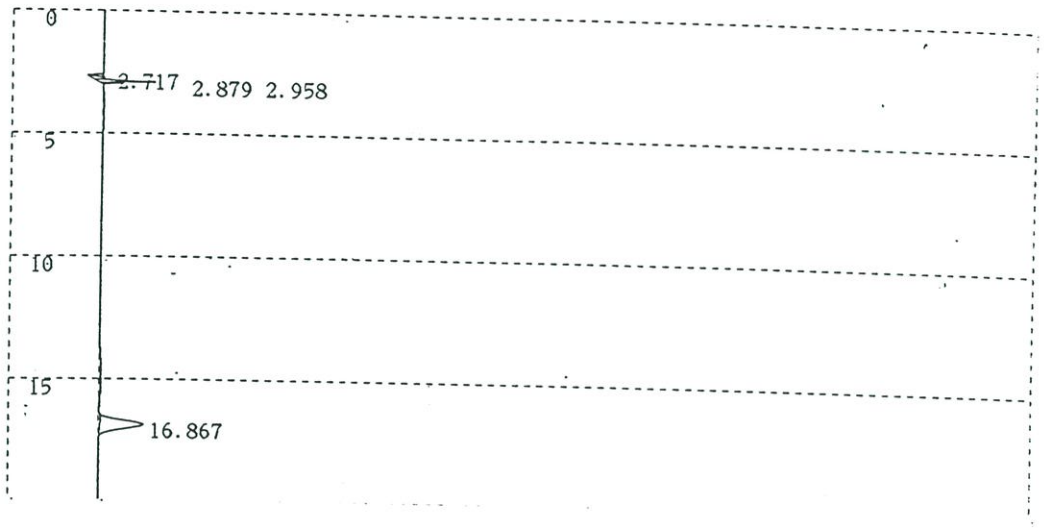


รูปที่ ก.12 แสดงโครมาโทแกรมผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมข้น

ตารางที่ ก.6 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมข้น

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	การได้กลับคืน (ร้อยละ)
1	5.3321	4.970	215	39.81
2	5.3327	4.989	215	39.81
3	5.7359	4.977	221	40.93
4	5.7856	4.983	215	39.81
5	5.1618	4.984	226	41.85
6	7.4733	4.967	185	34.26
7	6.7653	4.975	192	35.56
8	6.6087	4.972	179	33.15
$\overline{X}$				38.15
SD				3.31
%RSD				8.68

Column : spherisorb ODS2 250x4.6mm.,5um
mobile phase: 100%.methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm X 0.16AUFS
standard : 3.7184ug/mL
condensed milk: NO.1 g/mL

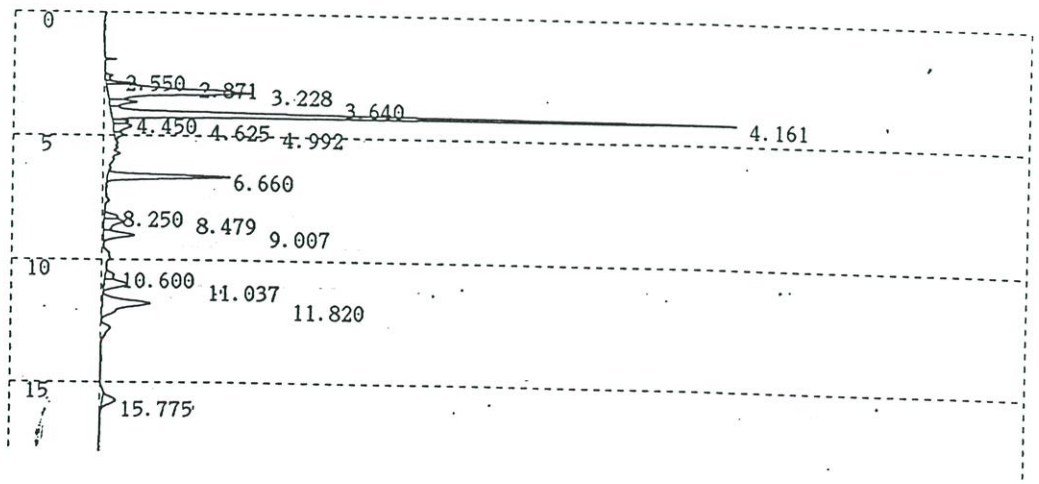


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.717	101	16			6.7701	
	2	2.879	235	63	V		15.7078	
	3	2.958	57	24	V		3.8266	
	4	16.867	1102	46			73.6955	
		TOTAL	1495	147			100	

รูปที่ ก.13 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

condensed milk: NO.1J-35.63 g/mL

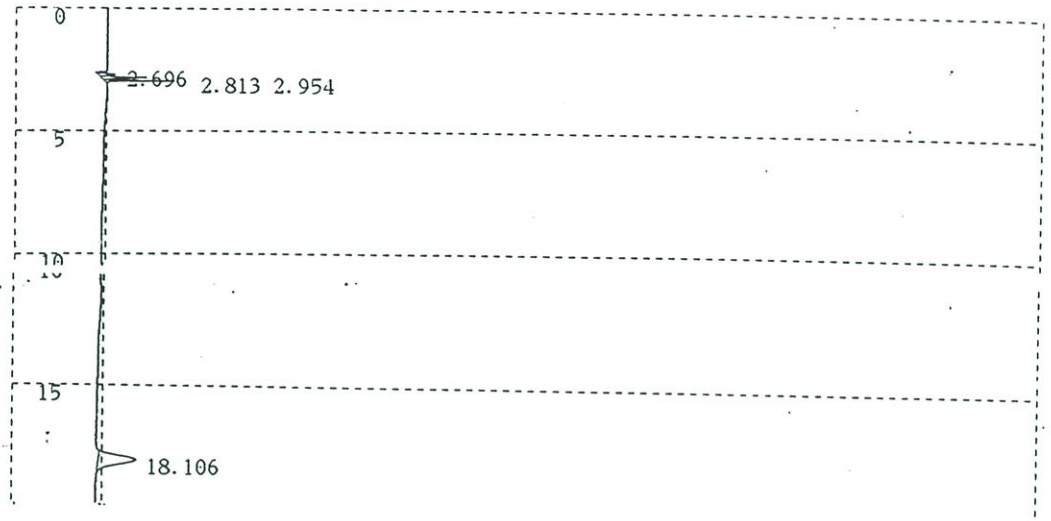


รูปที่ ก.14 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 1

ตารางที่ ก.7 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 1

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ100 กรัม)
1	0.58	23.20	-	-	-
2	0.52	31.81	-	-	-
3	0.46	37.45	-	-	-
4	0.47	22.15	-	-	-
5	0.53	23.28	-	-	-
6	0.47	34.18	-	-	-
7	0.56	26.14	-	-	-
8	0.41	38.81	-	-	-
9	0.56	21.70	-	-	-
10	0.54	35.63	-	-	-
$\bar{X}$					-
SD					0
%RSD					0

Column : spherisorb ODS2 250x4.6mm.,5um
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm X 0.16AUFS
standard : 3.7184ug/mL
condensed milk:NO.2 g/mL

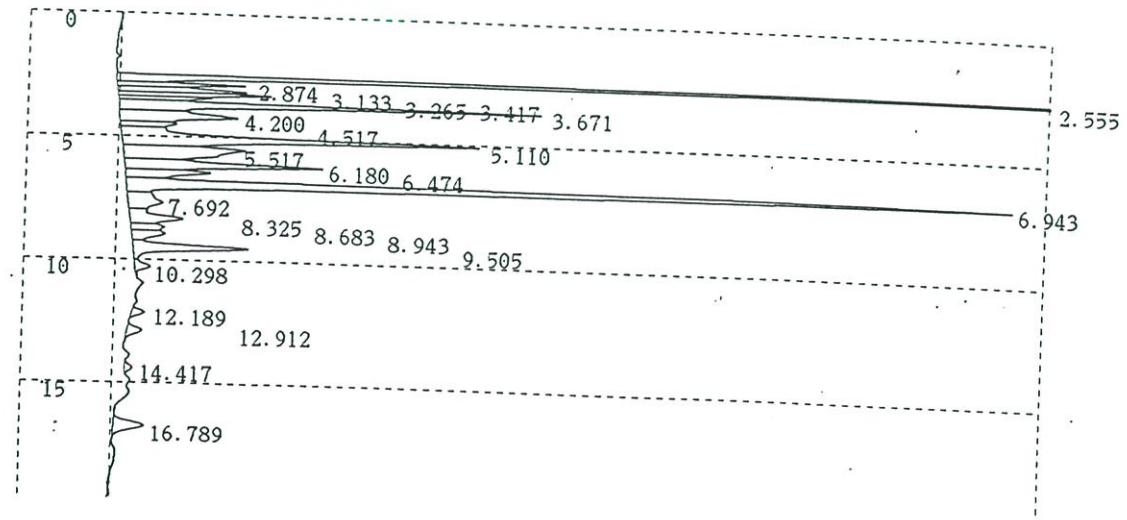


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.696	96	20			6.4009	
	2	2.813	191	49	V		12.7284	
	3	2.954	188	75	V		12.5217	
	4	18.106	1025	41			68.3491	
		TOTAL	1500	185			100	

รูปที่ ก.15 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

condensed milk:NO.2J-20.25 g/mL



รูปที่ ก.16 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 2

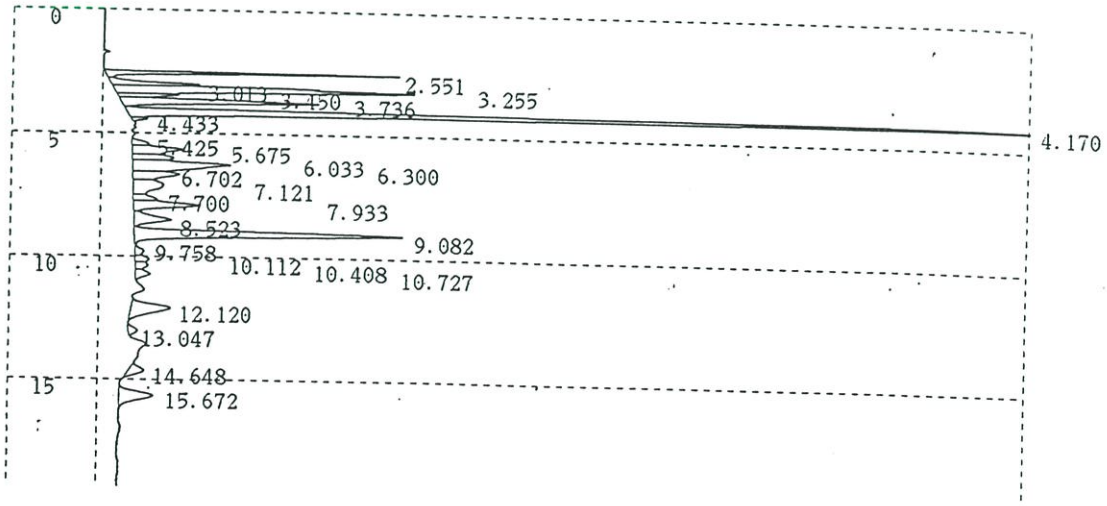
Column : spherisorb ODS2 250x4.6mm.,5um
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm X 0.16AUFS
standard : 3.7184ug/mL

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.694	63	16			4.2415	
	2	2.811	127	39	V		8.5641	
	3	2.868	106	40	V		7.1255	
	4	2.925	115	46	V		7.7401	
	5	16.754	1071	46			72.3288	
		TOTAL	1481	186			100	

รูปที่ ก.17 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

condensed milk: NO.3A-21.50 g/mL

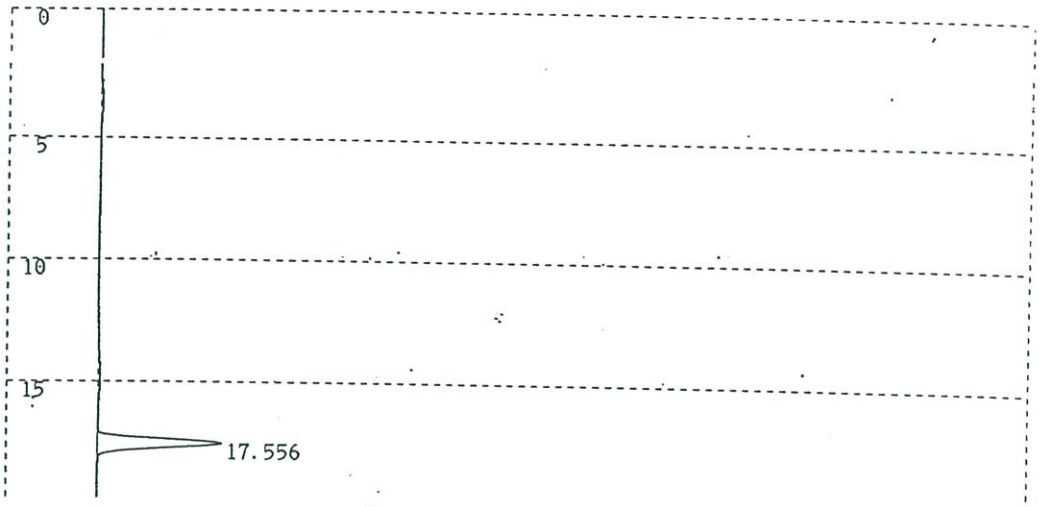


รูปที่ ก.18 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 3

ตารางที่ ก.9 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 3

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ100 กรัม)
1	0.0.48	21.50	-	-	-
2	0.50	34.44	-	-	-
3	0.50	30.33	-	-	-
4	0.49	21.43	-	-	-
5	0.49	23.81	-	-	-
6	0.45	29.38	-	-	-
7	0.55	22.29	-	-	-
8	0.50	21.92	-	-	-
9	0.53	23.31	-	-	-
10	0.48	30.70	-	-	-
$\bar{X}$					-
SD					0
%RSD					0

Column : spherisorb ODS2 250x4.6mm.,5um
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm X 0.16AUFS
standard : 9.296 ug/mL
condensed milk:NO.4

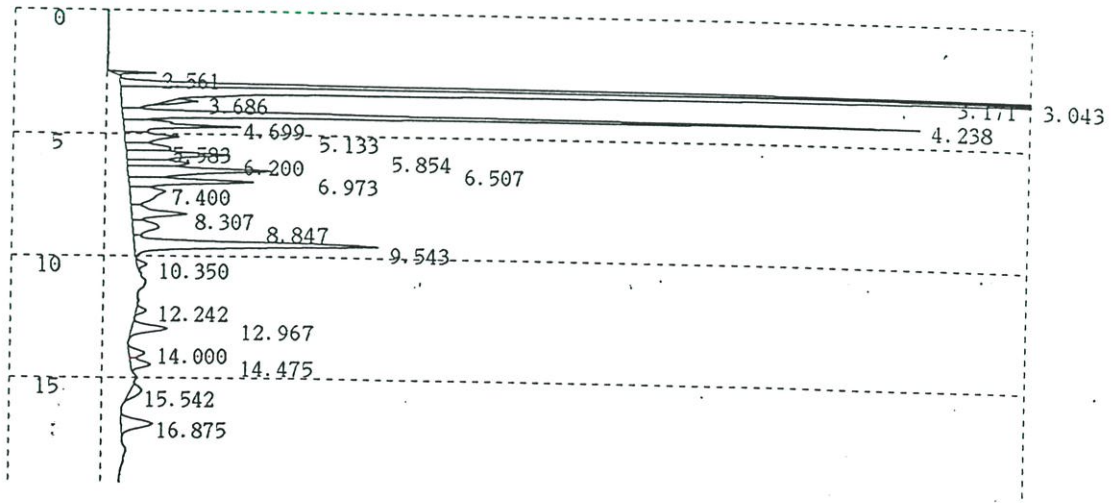


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	17.556	3342	136			100	
		TOTAL	3342	136			100	

รูปที่ ก.19 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

condensed milk:NO.4A-24.05 g/mL

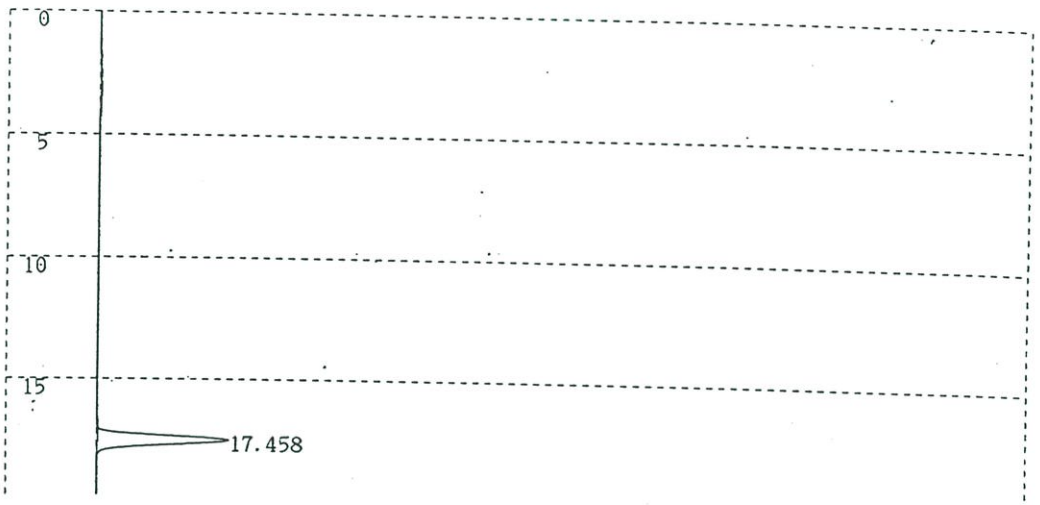


รูปที่ ก.20 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 4

ตารางที่ ก.10 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 4

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ100 กรัม)
1	0.50	24.05	-	-	-
2	0.50	27.19	-	-	-
3	0.50	22.88	-	-	-
4	0.44	24.03	-	-	-
5	0.57	20.57	-	-	-
6	0.56	30.68	-	-	-
7	0.47	24.64	-	-	-
8	0.48	25.50	-	-	-
9	0.55	20.43	-	-	-
10	0.49	25.60	-	-	-
$\overline{X}$					-
SD					0
%RSD					0

Column : spherisorb ODS2 250x4.6mm.,5um
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm X 0.16AUFS
standard : 9.296 ug/mL

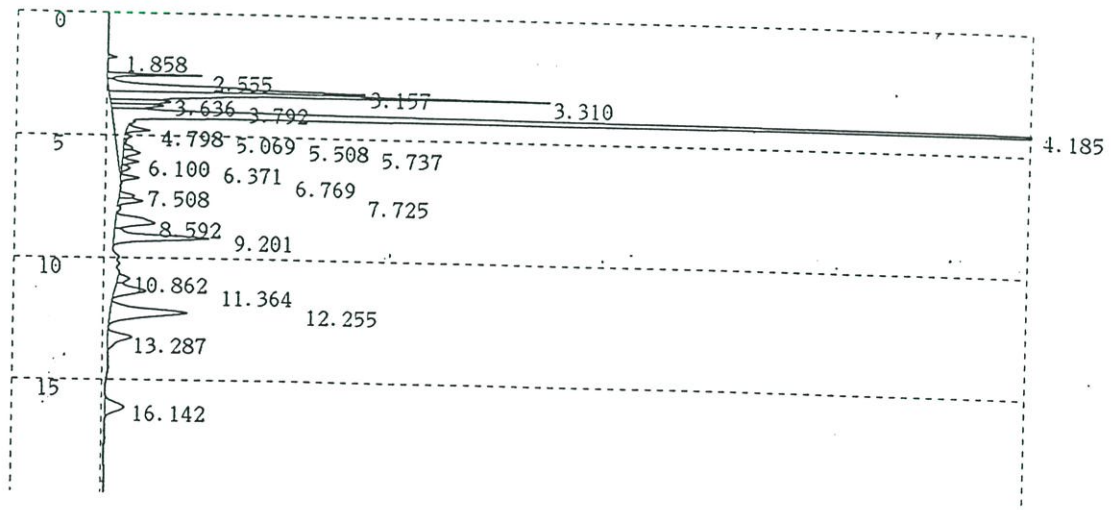


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	17.458	3397	139			100	
		TOTAL	3397	139			100	

รูปที่ ก.21 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

condensed milk:NO.5A-19.99 g/mL

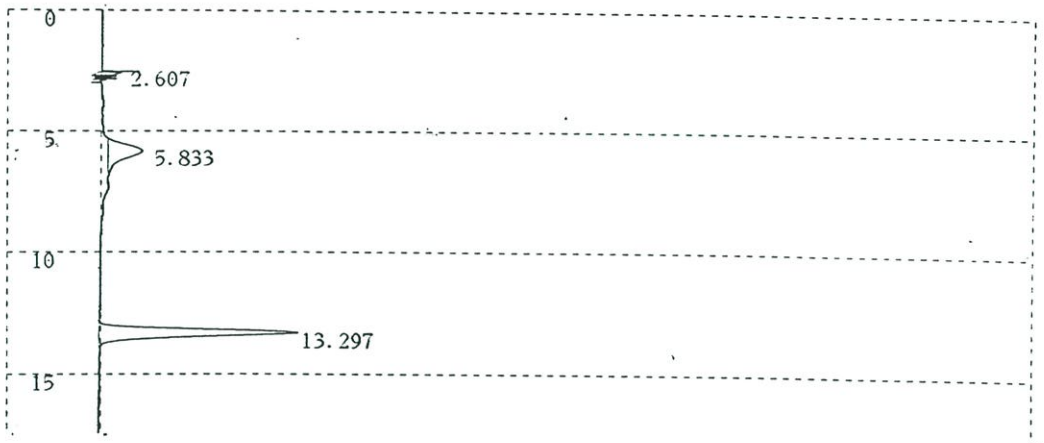


รูปที่ ก.22 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมข้นตัวอย่างที่ 5

ตารางที่ ก.11 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมข้นตัวอย่างที่ 5

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ100 กรัม)
1	0.50	19.99	-	-	-
2	0.57	21.28	-	-	-
3	0.53	23.29	-	-	-
4	0.50	22.15	-	-	-
5	0.46	24.56	-	-	-
6	0.53	21.32	-	-	-
7	0.61	21.04	-	-	-
8	0.43	22.23	-	-	-
9	0.47	26.26	-	-	-
10	0.51	21.93	-	-	-
$\bar{X}$					-
SD					0
%RSD					0

COLUMN : PHenomenex .5u,250X4.6mm
DETECTER : UV 272nm
FLOWRATE : 1.0mL/min.
MOBILE PHASE : 100%Methanol
CONDENSED :
standard : 13.944 ug/mL

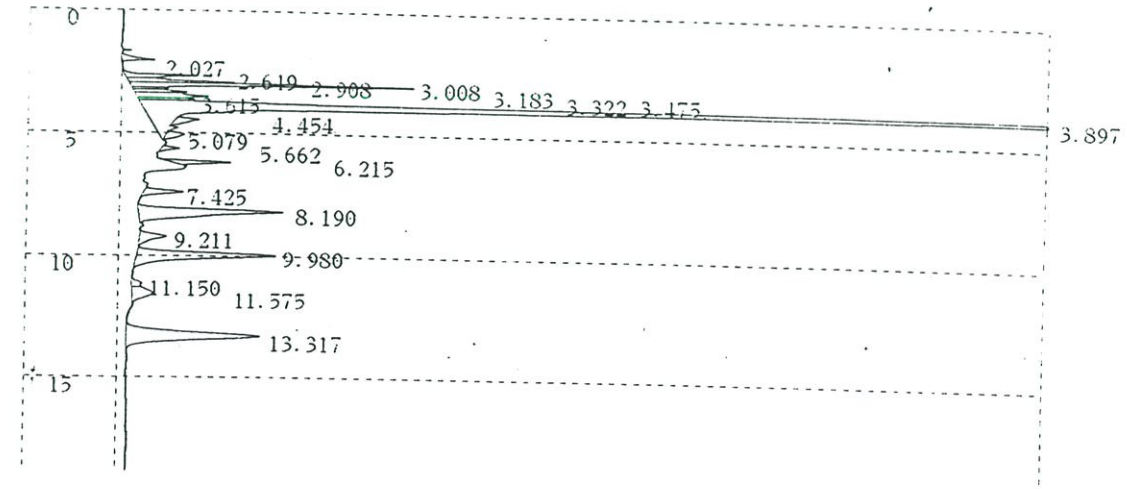


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	2.607	184	26	V		3.0982	
	6	5.833	1336	36			22.5322	
	7	13.297	4410	215			74.3696	
		TOTAL	5929	277			100	

รูปที่ ก.23 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

Condensed : ACC-A

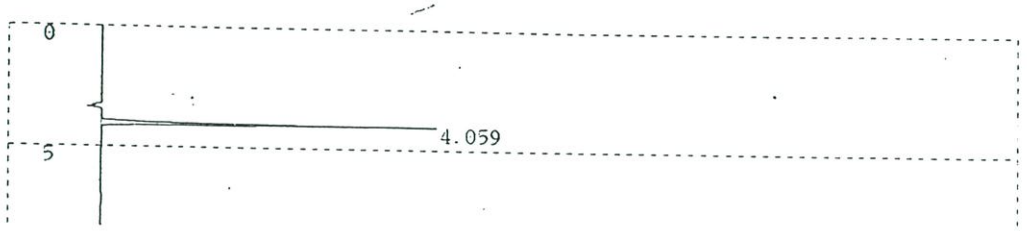


รูปที่ ก.24 แสดงโครมาโทแกรมผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมข้น

ตารางที่ ก.12 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมข้น

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	การได้กลับคืน (ร้อยละ)
1	0.52	19.90	13.317	145	68.72
2	0.48	24.03	13.348	166	78.67
3	0.46	21.04	13.383	154	72.99
4	0.46	25.39	13.424	163	77.25
5	0.56	20.58	13.375	172	81.52
6	0.51	20.60	13.381	165	78.20
7	0.48	20.94	13.383	161	76.30
8	0.51	25.98	13.390	164	77.73
$\overline{X}$					76.42
SD					3.92
%RSD					5.13

Column :Silica 5u. 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 5.184 ug/mL

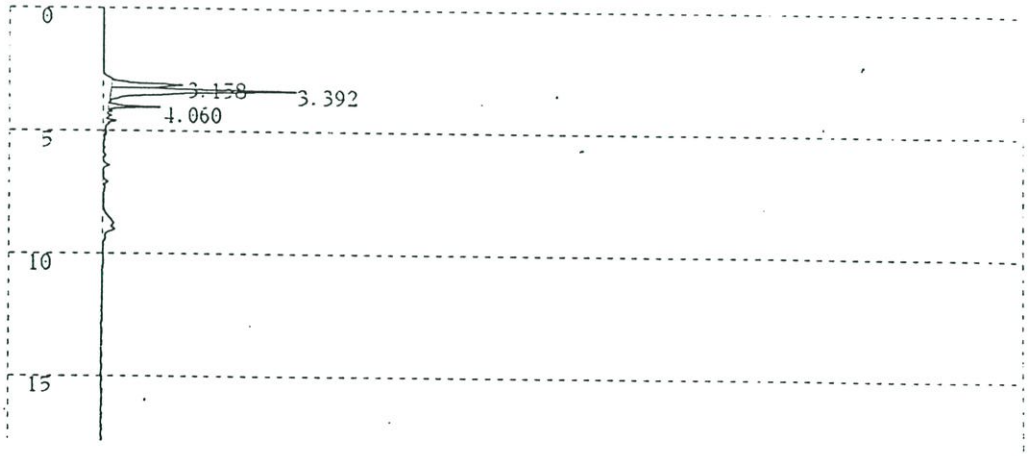


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.059	1798	370			100	
		TOTAL	1798	370			100	

รูปที่ ก.25 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

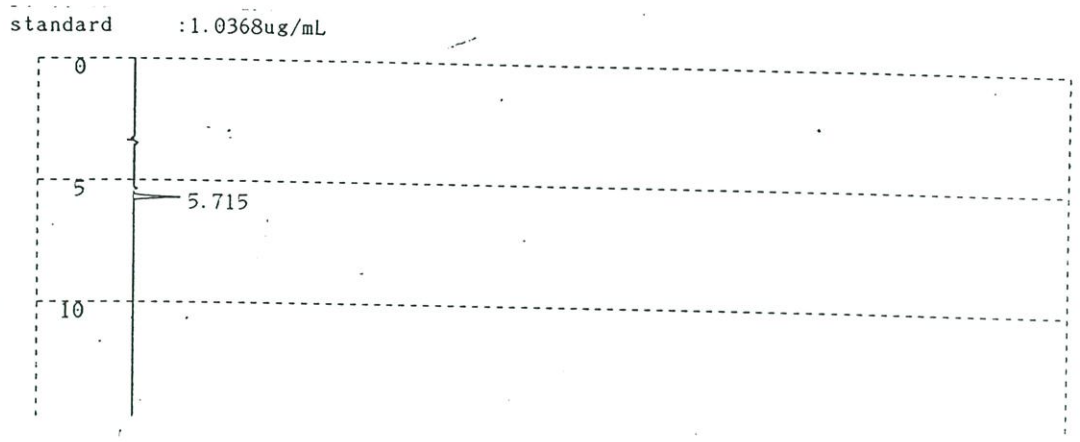
sample 1B : 20.03 g/mL



รูปที่ ก.26 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 1

ตารางที่ ก.13 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 1

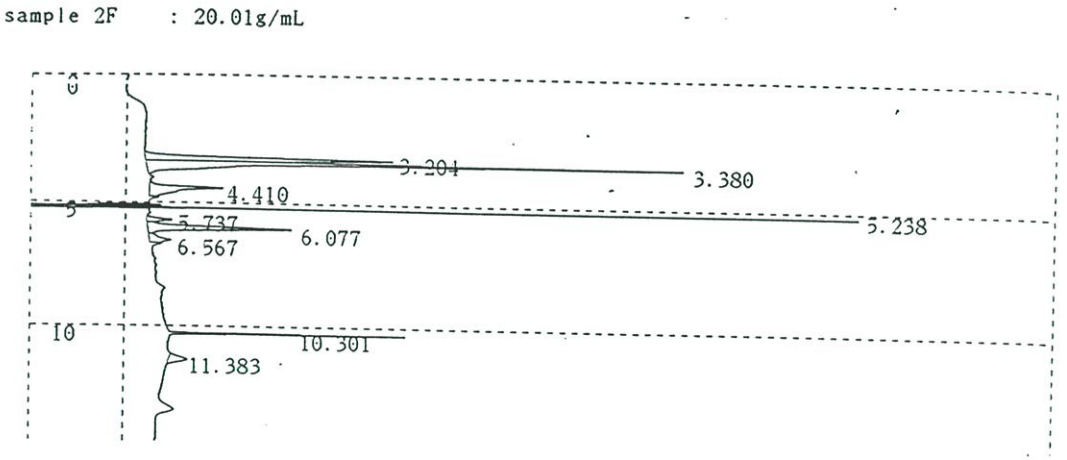
การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	20.03	4.045	70	4.90
2	20.03	4.060	55	3.85
3	20.02	5.003	77	5.39
4	20.03	4.958	77	5.39
5	20.09	5.000	68	4.74
6	20.15	5.066	52	3.62
7	20.01	4.992	71	4.97
8	20.05	5.674	49	3.42
9	20.05	5.002	70	4.89
$\bar{X}$				4.57
SD				0.75
%RSD				16.41



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	5.715	328	50			100	
		TOTAL	328	50			100	

รูปที่ ก.27 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

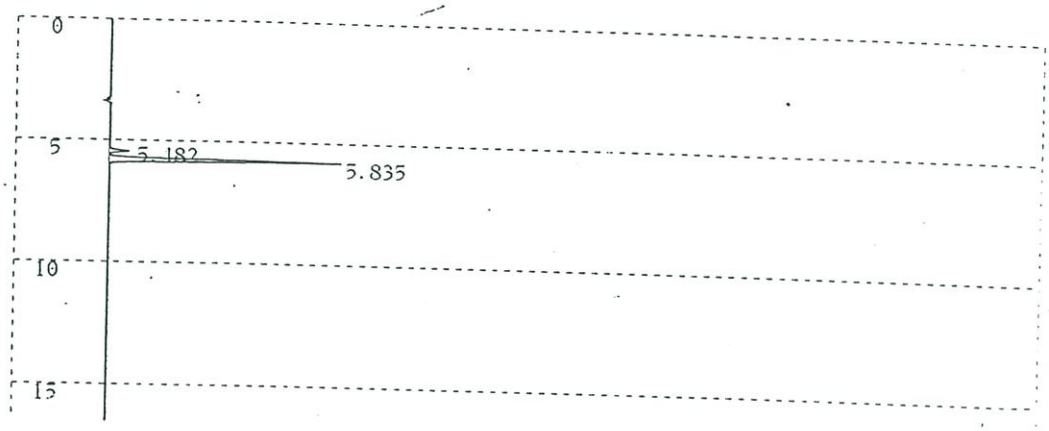


รูปที่ ก.28 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 2

ตารางที่ ก.14 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 2

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	20.02	5.650	28	3.09
2	19.99	5.650	27	2.98
3	20.01	5.644	32	3.53
4	20.06	5.575	24	2.64
5	20.01	5.753	26	2.87
6	20.00	5.805	24	2.65
7	20.00	5.827	26	2.87
8	20.08	5.614	27	2.97
9	20.03	5.696	24	2.64
$\bar{X}$				2.92
SD				0.28
%RSD				9.59

Column :Silica 5u. 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 5.184 ug/mL
Samp. : g/mL

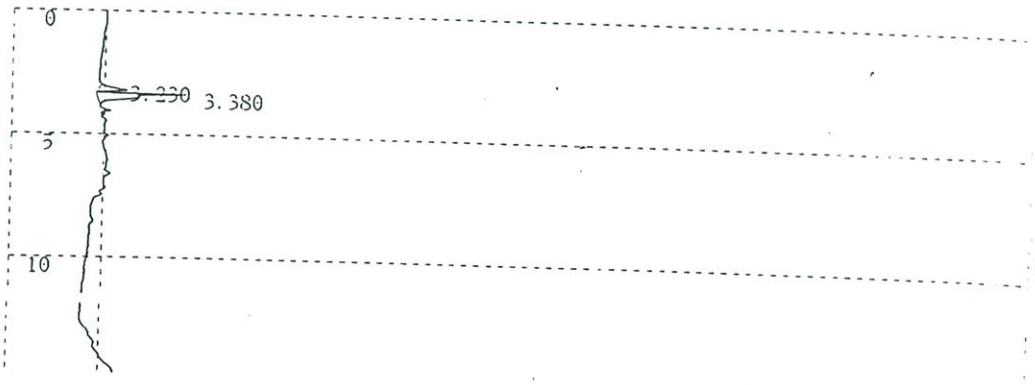


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	5.482	123	21			6.7747	
	3	5.835	1691	250			93.2253	
		TOTAL	1814	270			100	

รูปที่ ก.29 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

Samp.3F : 20.28 g/mL

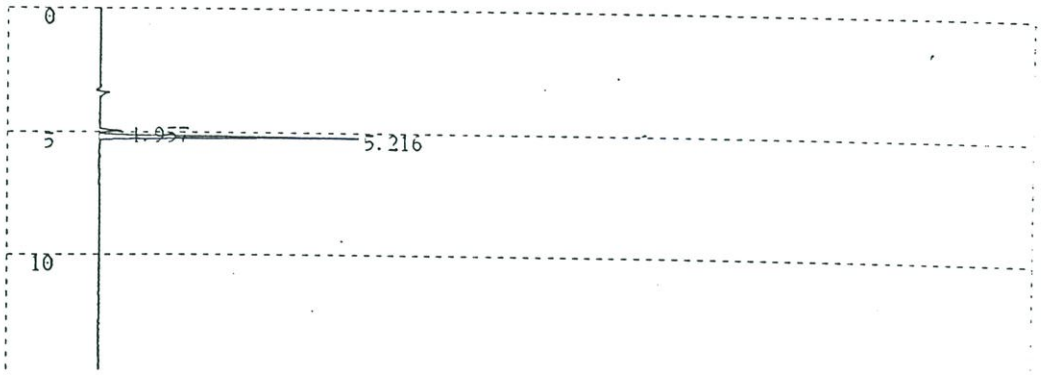


รูปที่ ก.30 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 3

ตารางที่ ก.15 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 3

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	25.63	-	-	-
2	22.79	-	-	-
3	20.03	-	-	-
4	20.13	-	-	-
5	20.08	-	-	-
6	20.28	-	-	-
7	20.17	-	-	-
8	20.59	-	-	-
9	20.16	-	-	-
10	20.61	-	-	-
$\overline{X}$				-
SD				0
%RSD				0

Column :Silica 5u. 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 5.184ug/mL

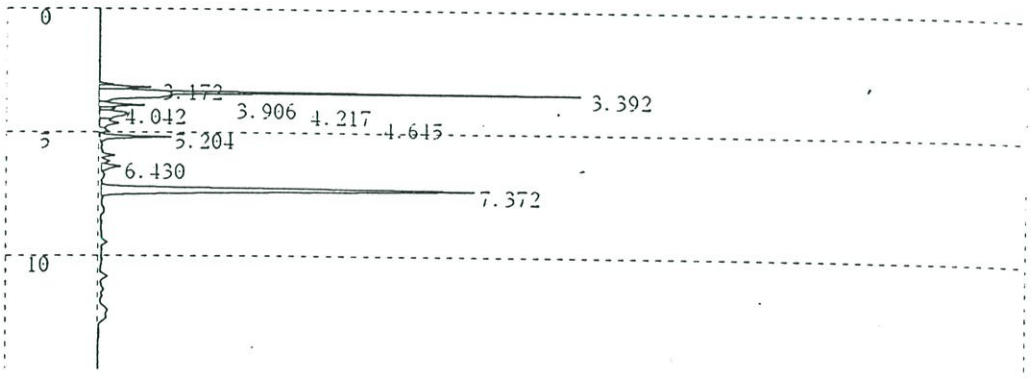


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	4.957	136	25			7.5464	
	4	5.216	1663	279	V		92.4536	
		TOTAL	1798	304			100	

รูปที่ ก.31 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

sample 4C : 20.04 g/mL

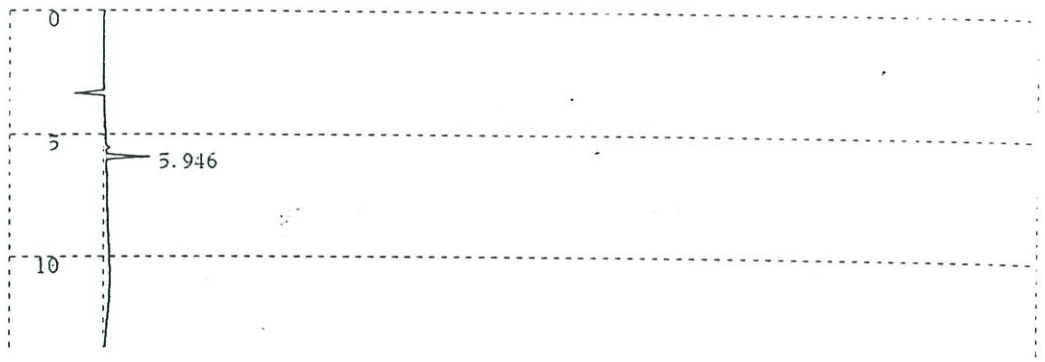


รูปที่ ก.32 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 4

ตารางที่ ก.16 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 4

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม)
1	20.00	5.170	75	6.92
2	20.00	5.157	67	6.18
3	20.04	5.204	76	7.00
4	20.06	5.181	76	6.99
5	20.13	5.161	73	6.69
6	20.10	5.154	71	6.52
7	20.14	5.142	67	6.14
8	20.10	5.155	64	5.87
9	20.09	5.149	76	6.98
10	20.15	5.188	77	7.05
$\overline{X}$				6.63
SD				0.43
%RSD				0.49

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 1.0368ug/mL

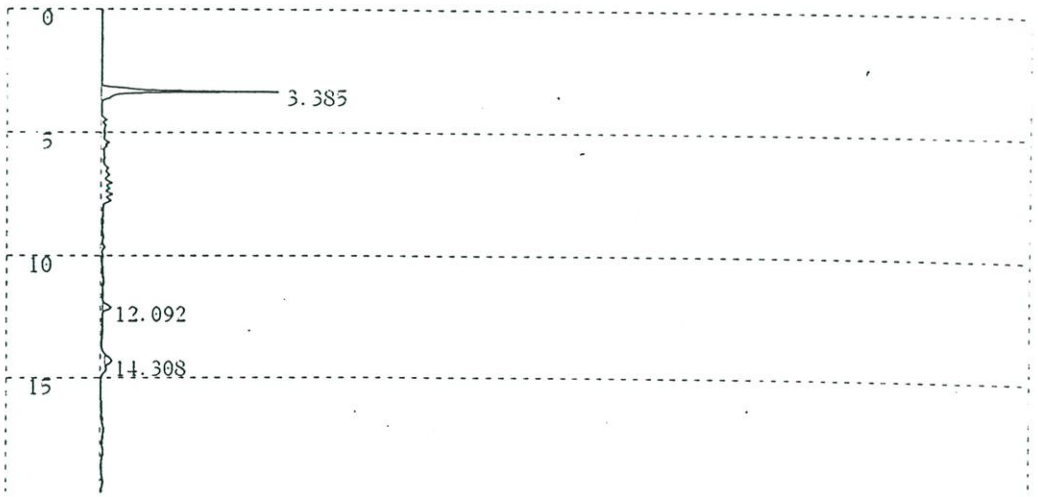


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	5.946	329	47			100	
		TOTAL	329	47			100	

รูปที่ ก.33 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

sample 5A : 20.00 g/mL

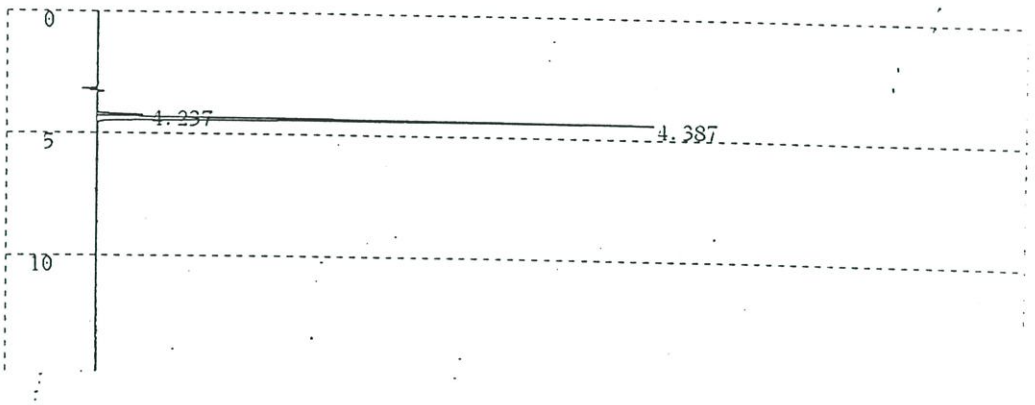


รูปที่ ก.34 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 5

ตารางที่ ก.17 ตารางแสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 5

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	20.00	-	-	-
2	20.07	-	-	-
3	20.07	-	-	-
4	20.04	-	-	-
5	20.13	-	-	-
6	20.04	-	-	-
7	20.02	-	-	-
8	20.27	-	-	-
9	20.26	-	-	-
10	20.21	-	-	-
$\bar{X}$				-
SD				0
%RSD				0

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 9.76 ug/mL

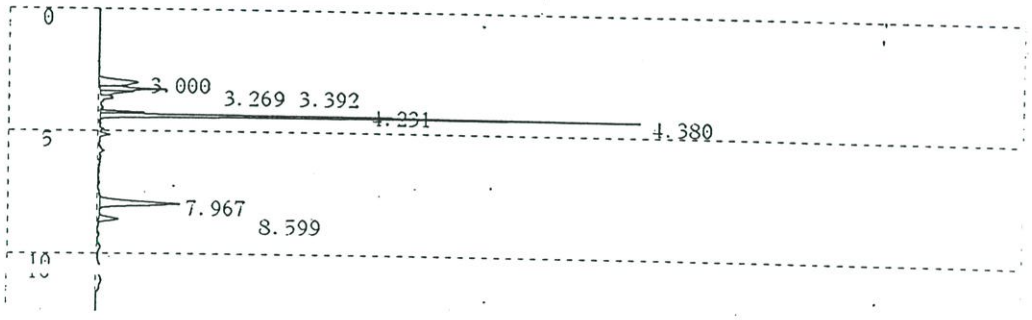


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	4.237	234	50			7.2791	
	4	4.387	2979	599	V		92.7209	
		TOTAL	3213	649			100	

รูปที่ ก.35 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

ACC/AOAC : UHT-A /mL

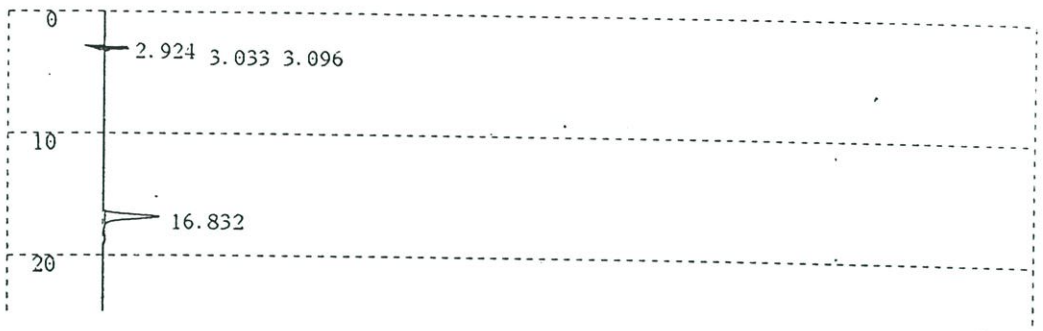


รูปที่ ก.36 แสดงโครมาโทแกรมผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในนมพร้อมดื่มยูเอชที

ตารางที่ ก.18 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	การได้กลับคืน (ร้อยละ)
1	19.2860	4.380	585	97.83
2	18.1550	4.370	438	73.24
3	18.6264	4.370	505	84.45
4	19.3888	4.366	452	75.59
5	21.0148	4.366	571	95.48
6	24.3786	4.371	583	97.49
7	20.3685	4.352	507	84.78
8	22.7828	4.356	550	91.97
9	20.4399	4.360	484	80.94
$\overline{X}$				86.86
SD				9.30
%RSD				10.71

Column : Pinnacle Amine ODS 250X4.6mm , 5um
MP : 100 %MeOH
Det. : UV 272 X 0.16 AUFS
standard : 5.74 ug/mL

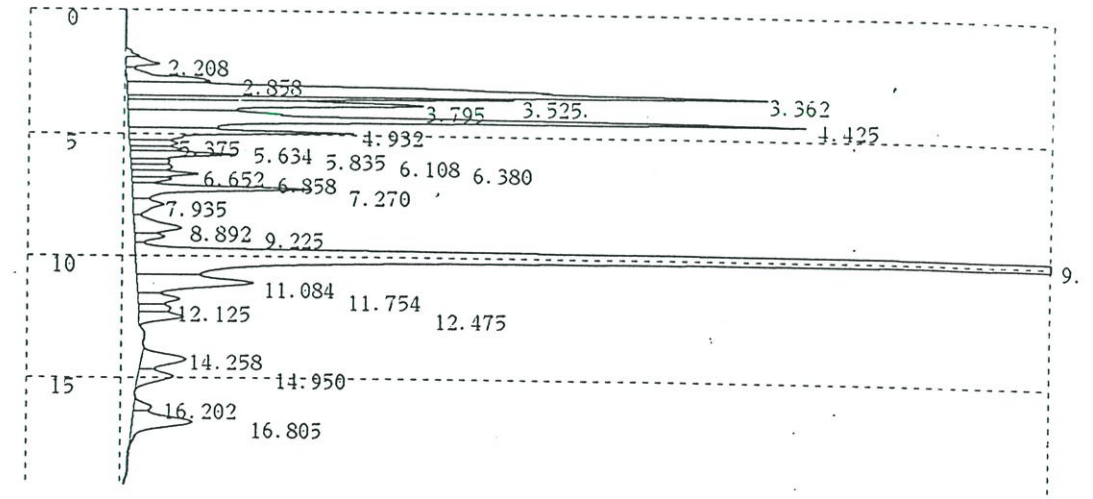


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.924	205	43			10.1776	
	2	3.033	106	24	V		5.2475	
	3	3.096	189	38	V		9.379	
	5	16.832	1516	57			75.1959	
		TOTAL	2016	162			100	

รูปที่ ก.37 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

samp. 1/4 : 100.47g/mL

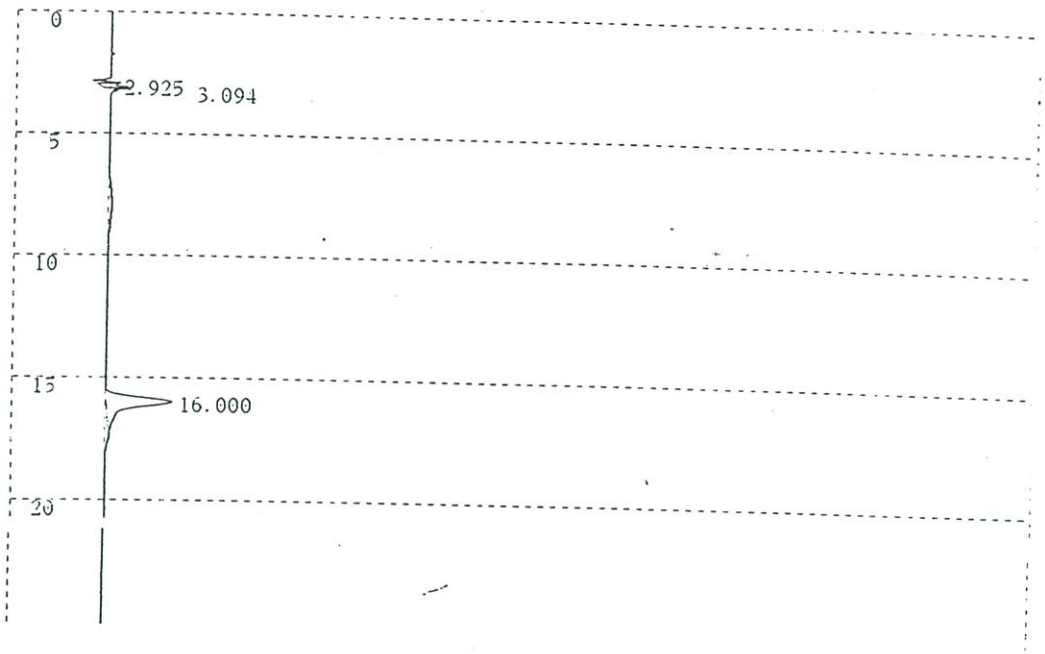


รูปที่ ก.38 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 1

ตารางที่ ก.19 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 1

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ100 กรัม)
1	0.55	101.44	16.700	68	6.75
2	0.50	101.51	15.958	73	7.24
3	0.50	100.47	16.805	64	6.41
4	0.52	100.89	16.714	62	6.19
5	0.50	100.99	16.164	64	6.38
6	0.51	113.85	16.148	73	6.46
7	0.52	100.13	16.174	74	7.44
8	0.50	100.34	16.187	81	8.13
9	0.50	100.49	16.227	63	6.31
$\overline{X}$					6.81
SD					0.65
%RSD					9.54

Column : Pinnacle Amine ODS 250X4.6mm , 5um
MP : 100 %MeOH
Det. : UV 272 X 0.16 AUFS
Std. : 5.74 ug/mL

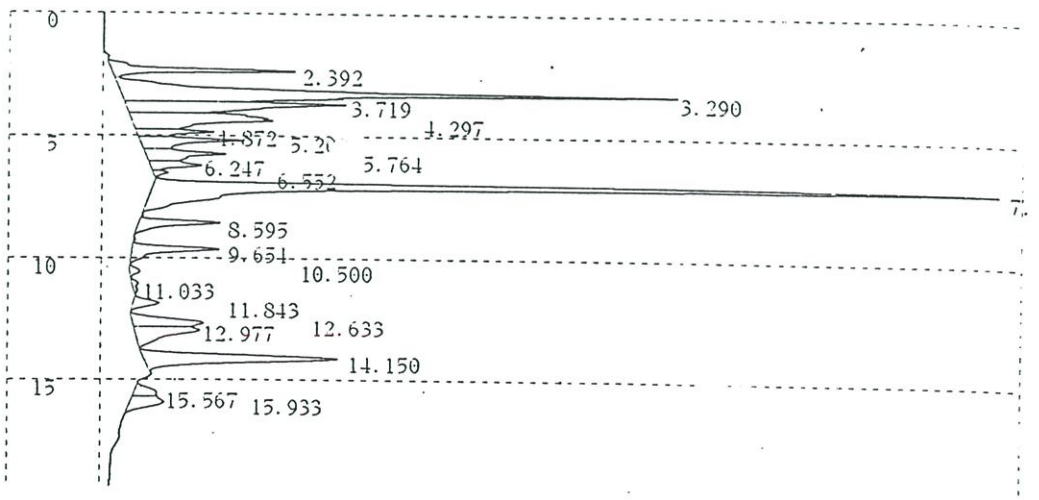


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	2.925	131	27			5.4551	
	3	3.094	214	28	V		8.9098	
	6	16	2055	70			85.6351	
		TOTAL	2400	125			100	

รูปที่ ก.39 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

samp. 2/8 : 99.52 g/mL

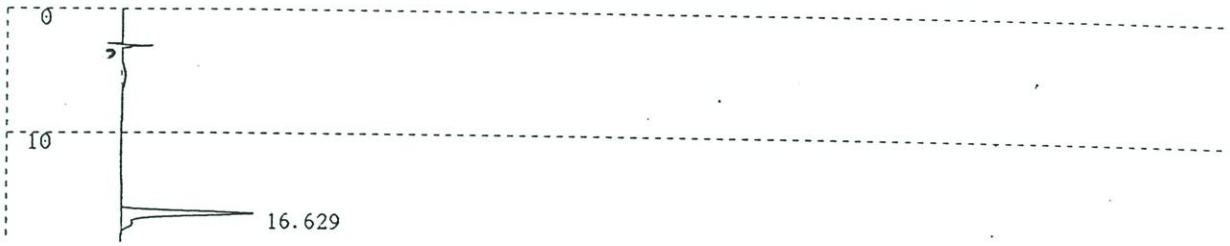


รูปที่ ก.40 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 2

ตารางที่ ก.20 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 2

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.50	101.14	15.897	34	3.51
2	0.54	100.18	16.517	36	3.75
3	0.52	104.45	17.477	33	3.29
5	0.52	104.05	17.358	35	3.51
6	0.53	101.92	17.367	38	3.89
7	0.53	101.53	15.898	38	3.91
8	0.52	99.52	15.933	37	3.88
9	0.48	103.00	15.850	41	4.15
$\bar{X}$					3.74
SD					0.28
%RSD					7.49

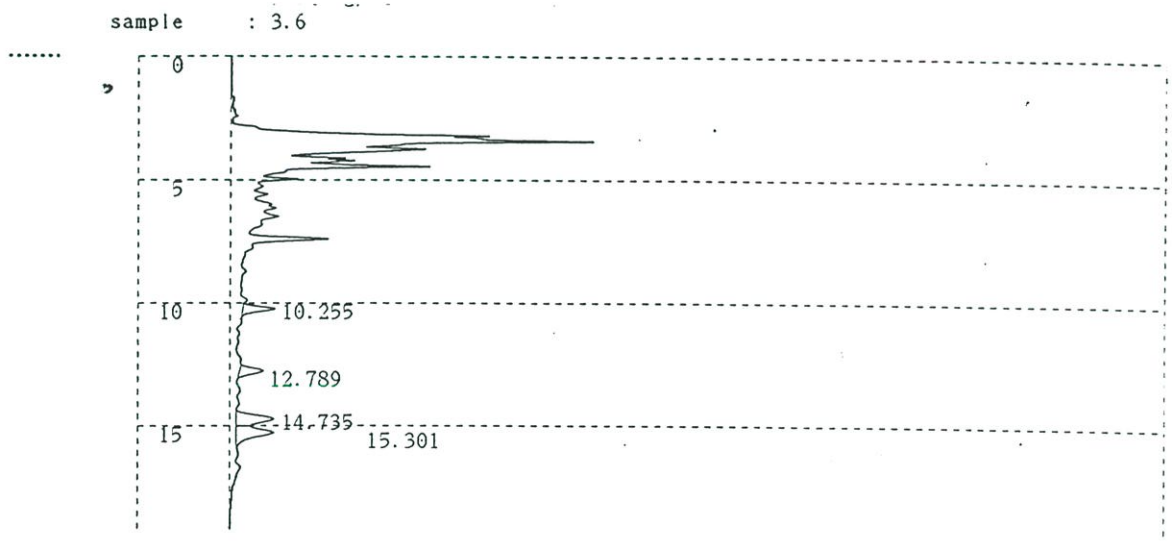
column : pinnacle amine ODS 250x4.6 mm, 5 um
mobile phase : 100 % methanol
flow rate : 1.0 mL/ min.,
detection : UV -272 nm
sensitivity : 0.16 AUFS
standard K :11.48 ug/mL



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	16.629	3589	116			100	
		TOTAL	3589	116			100	

รูปที่ ก.41 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค



รูปที่ ก.42 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 3

ตารางที่ ก.21 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 3

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.55	102.57	-	-	-
2	0.50	100.98	-	-	-
3	0.50	100.58	-	-	-
4	0.54	104.32	-	-	-
5	0.54	100.38	-	-	-
6	0.54	102.26	-	-	-
7	0.50	101.92	-	-	-
8	0.49	102.80	-	-	-
9	0.51	100.99	-	-	-
10	0.53	105.85	-	-	-
$\overline{X}$					-
SD					0
%RSD					0

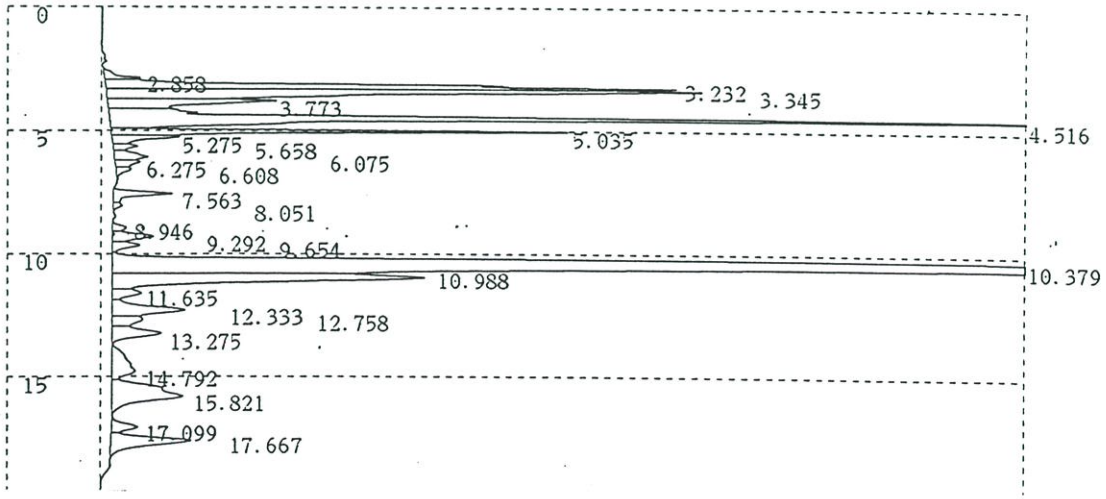
Column : Pinnacle amine ODS
mobile phase : MeOH
Flow rate : 1.0 mL/ min.
Detector : 272 nm
Sensitivity : 0.16 AUFS
standard K1 : 5.74 ug/mL

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4	3.168	171	35	V		10.8905	
	5	17.59	1400	55			89.1095	
		TOTAL	1571	90			100	

รูปที่ ก.43 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

The 4/4 : 101.24 g/mL

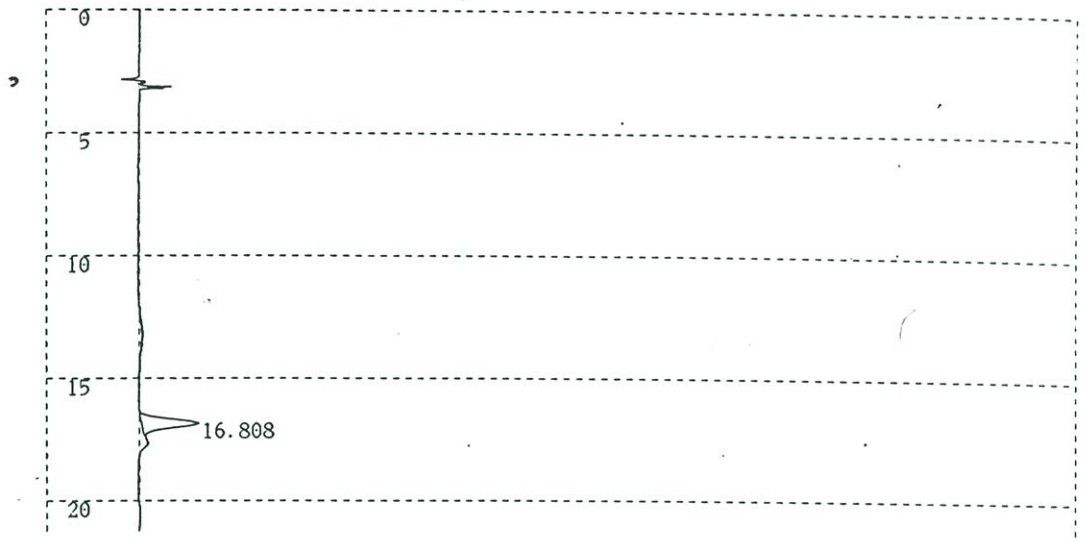


รูปที่ ก.44 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 4

ตารางที่ ก.22 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 4

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.52	101.85	15.946	75	7.42
2	0.55	101.25	17.686	83	8.26
3	0.53	101.88	17.472	77	7.61
4	0.52	101.43	16.768	65	6.45
5	0.52	100.22	16.725	62	6.23
6	0.53	100.04	16.708	62	6.24
7	0.48	107.03	15.975	70	6.59
8	0.51	99.79	16.000	76	7.67
9	0.54	109.54	15.963	73	6.71
10	0.48	100.75	15.958	62	6.20
$\bar{X}$					6.94
SD					0.74
%RSD					10.66

column : pinnacle Amine ODS 250x4.6mm,5um
mobile phase: 100% Methanol
detector : UV 272 x 0.16AUFS
standard : 5.74 ug/mL

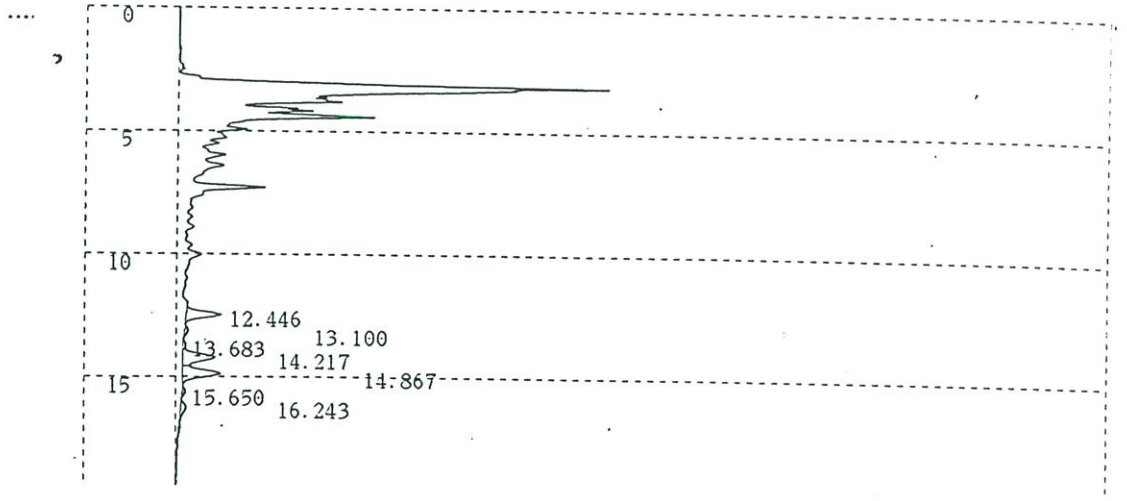


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	16.808	1460	60			100	
		TOTAL	1460	60			100	

รูปที่ ก.45 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

sample 5.9 : 101.76 g/mL

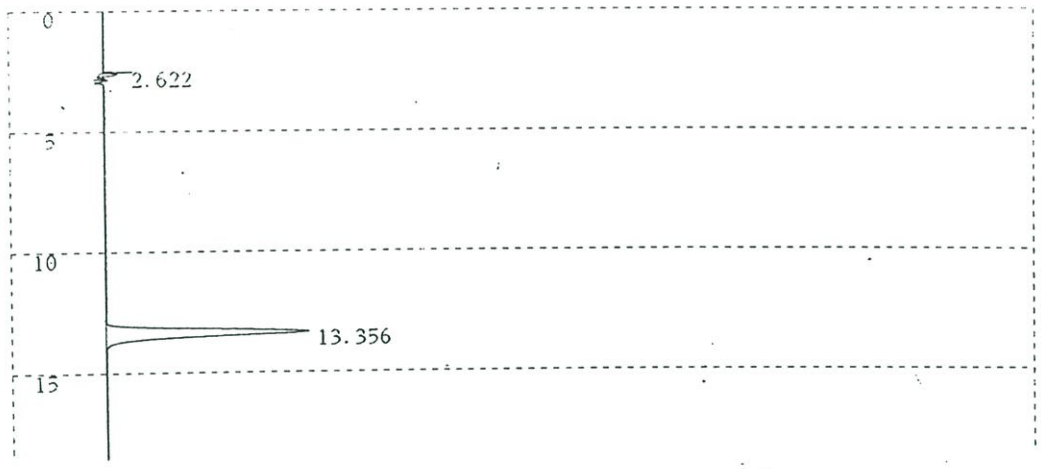


รูปที่ ก.46 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 5

ตารางที่ ก.23 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชทีตัวอย่างที่ 5

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม)
1	0.51	101.78	-	-	-
2	0.51	106.77	-	-	-
3	0.49	116.00	-	-	-
4	0.56	101.72	-	-	-
5	0.49	100.18	-	-	-
6	0.49	100.52	-	-	-
7	0.52	100.61	-	-	-
8	0.52	101.36	-	-	-
9	0.50	101.76	-	-	-
10	0.55	111.18	-	-	-
$\overline{X}$					-
SD					0
%RSD					0

COLUMN : Phenomenex ,5u,250X4.6mm
DETECTER : UV 272nm
FLOWRATE : 1.0mL min.
MOBILE PHASE : 100%Methanol
standard : 14.8736ug.mL
UHT : ACC-

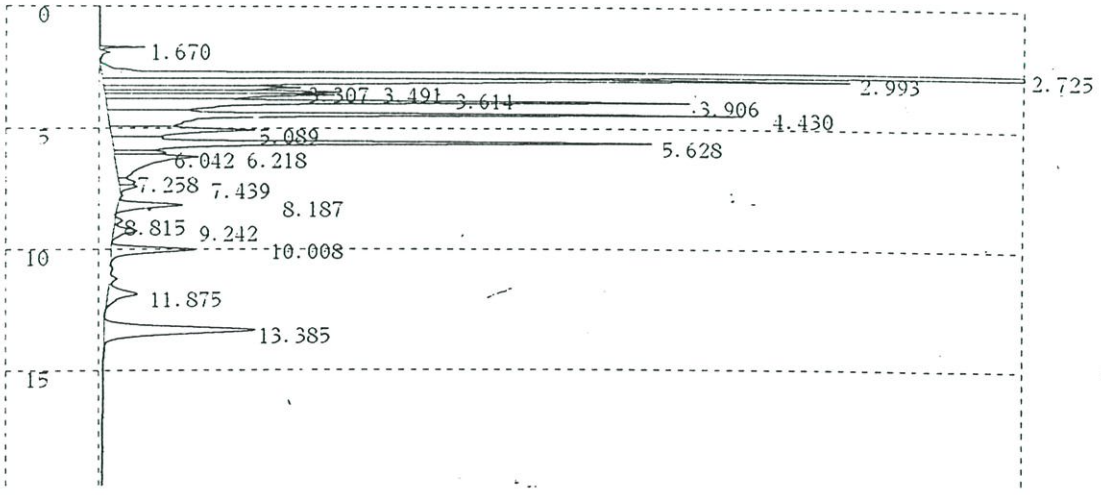


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	2.622	121	19	V		2.5757	
	4	13.356	4573	218			97.4243	
		TOTAL	4694	237			100	

รูปที่ ก.47 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

UHT : ACC-A



รูปที่ ก.48 แสดงโครมาโทแกรมผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมพร้อมดื่มยูเอชที

ตารางที่ ก.24 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	การได้กลับคืน (ร้อยละ)
1	0.56	100.26	13.385	163	74.43
2	0.61	100.75	13.333	162	73.97
3	0.49	108.85	13.273	151	68.95
4	0.62	104.64	13.310	146	66.67
5	0.53	99.53	13.332	166	75.80
6	0.47	102.08	13.329	173	79.00
7	0.62	103.38	13.290	162	73.97
$\bar{X}$					73.26
SD					4.16
%RSD					5.68

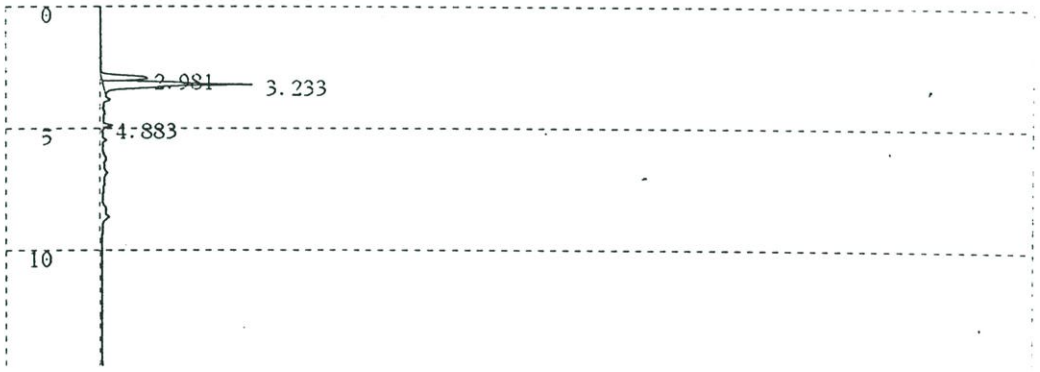
Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 2.592 ug/mL

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	3.133	302	67			25.8078	
	2	4.091	868	161			74.1922	
		TOTAL	1170	229			100	

รูปที่ ก.49 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

AOAC : milk powder1-D 4.8087g, mL



** CALCULATION REPORT **

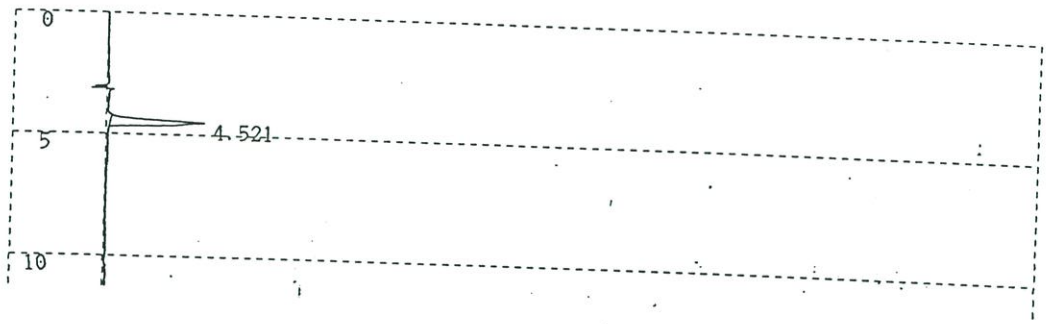
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.981	585	48			26.0945	
	2	3.233	1607	158	V		71.6963	
	3	4.883	50	8			2.2091	
		TOTAL	2241	214			100	

รูปที่ ก.50 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 1

ตารางที่ ก.25 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 1

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	5.6926	-	-	-
2	5.8417	-	-	-
3	5.7892	-	-	-
4	4.8087	-	-	-
5	5.2769	-	-	-
6	5.0362	-	-	-
7	5.1172	-	-	-
8	5.2186	-	-	-
9	5.1951	-	-	-
10	5.5077	-	-	-
$\overline{X}$				-
SD				0
%RSD				0

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 3.904 ug/mL

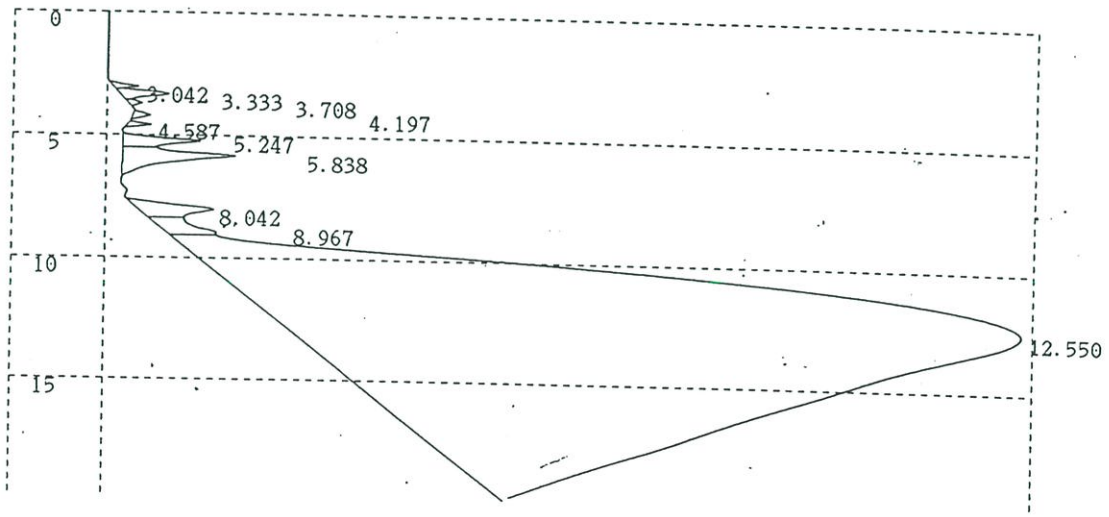


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	4.521	1358	100			100	
		TOTAL	1358	100			100	

รูปที่ ก.51 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : NO.2A=5.2283 g/mL

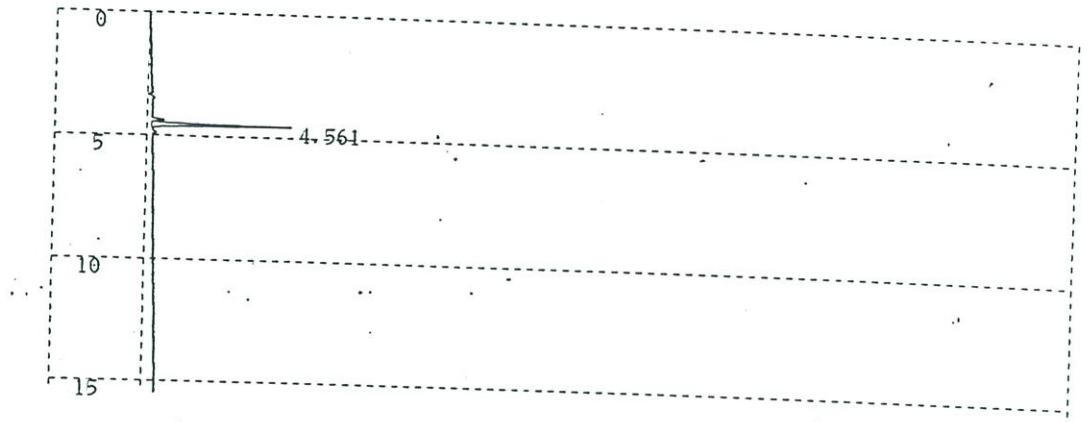


รูปที่ ก.52 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 2

ตารางที่ ก.26 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 2

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	5.2283	4.587	25	18.67
2	5.2109	4.625	23	17.23
3	5.1596	3.975	29	21.94
4	5.1952	4.075	38	28.56
5	5.1459	4.083	39	29.59
6	5.3008	4.104	44	32.41
$\overline{X}$				24.73
SD				6.29
%RSD				25.43

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 0.01% isopropanol -15%dichloromethane in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
milk Powder : AOAC-NO.3 g/mL
standard : 2.592 ug/mL

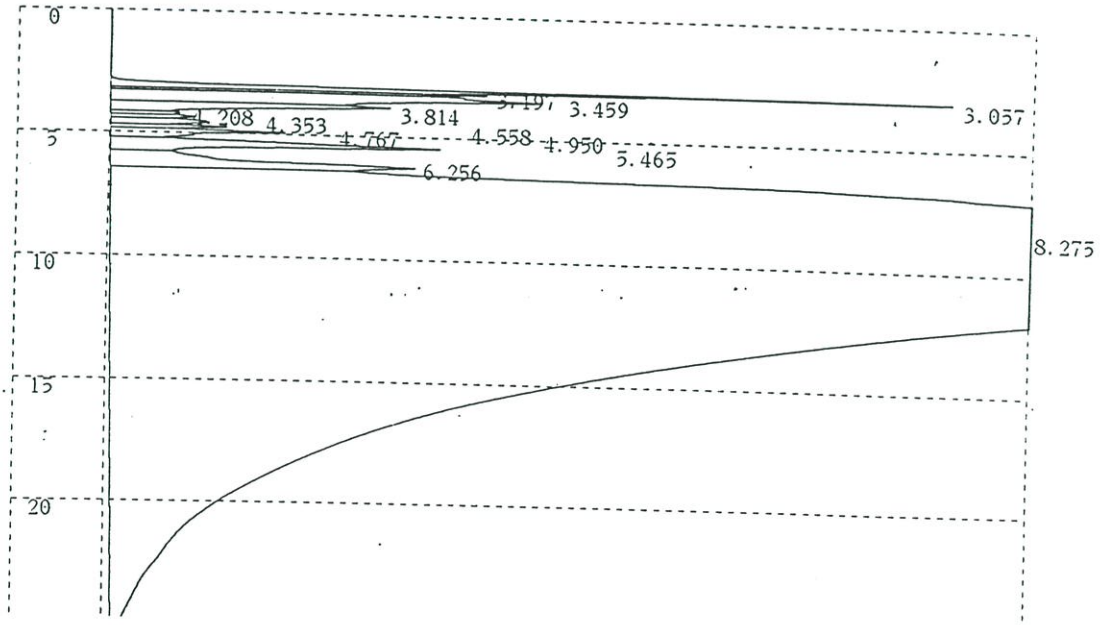


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	4.561	803	150	V		100	
		TOTAL	803	150			100	

รูปที่ ก.53 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk Powder : AOAC-NO.3A, 5.4960g/mL

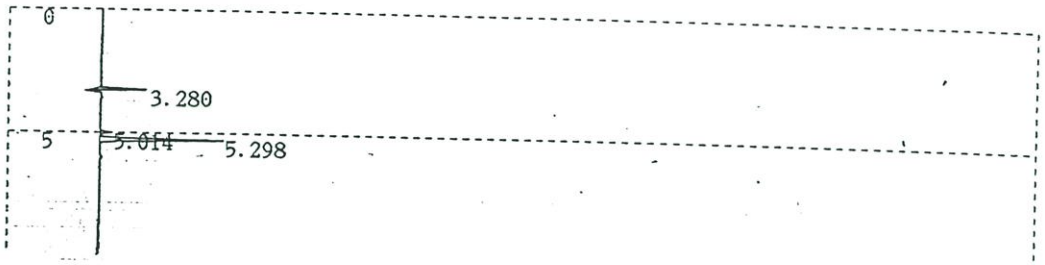


รูปที่ ก.54 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 3

ตารางที่ ก.27 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 3

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	5.4960	4.558	104	32.48
2	5.0787	4.483	104	35.21
3	5.1083	4.436	119	39.99
4	5.1235	4.558	77	25.80
5	5.1066	4.592	105	35.30
$\overline{X}$				33.76
SD				5.20
%RSD				15.40

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
AOAC : milk powder No.4- g/mL
: standard 2.592 ug/mL in C8H18

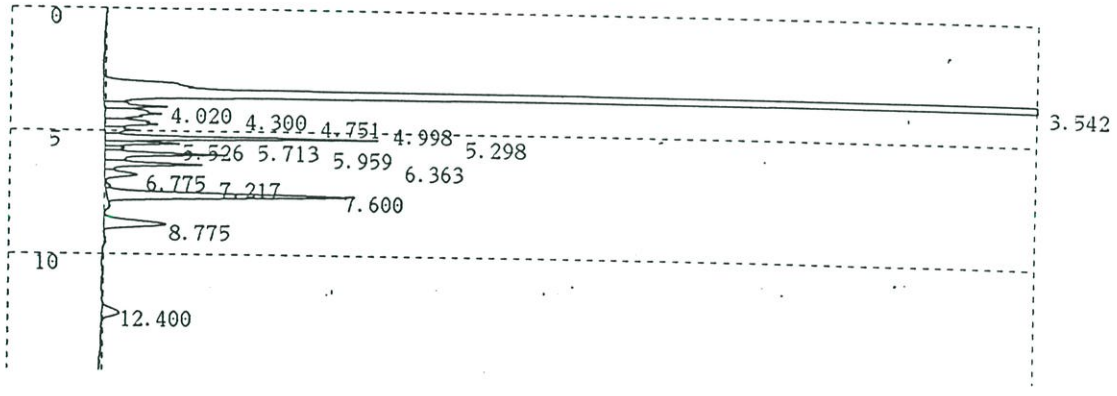


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	3.28	293	60			25.4011	
	2	5.014	59	11			5.0906	
	3	5.298	802	133			69.5083	
		TOTAL	1153	204			100	

รูปที่ ก.55 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

AOAC : milk powder No.4-D 5.4641g/mL

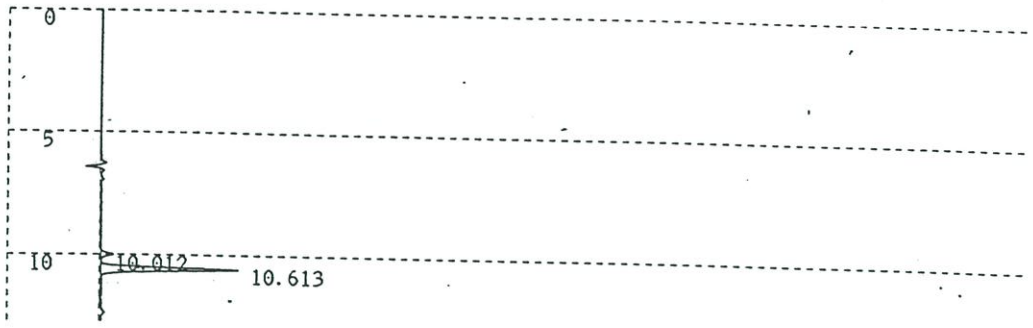


รูปที่ ก.56 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 4

ตารางที่ ก.28 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 4

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	5.4641	5.298	290	104.61
2	5.2439	5.296	283	106.38
3	5.0996	5.302	289	111.70
4	5.0408	5.320	260	101.67
5	5.0974	5.311	336	129.93
$\overline{X}$				110.86
SD				11.27
%RSD				10.17

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
milk powder : NO.5-
standard : 2.592ug/mL

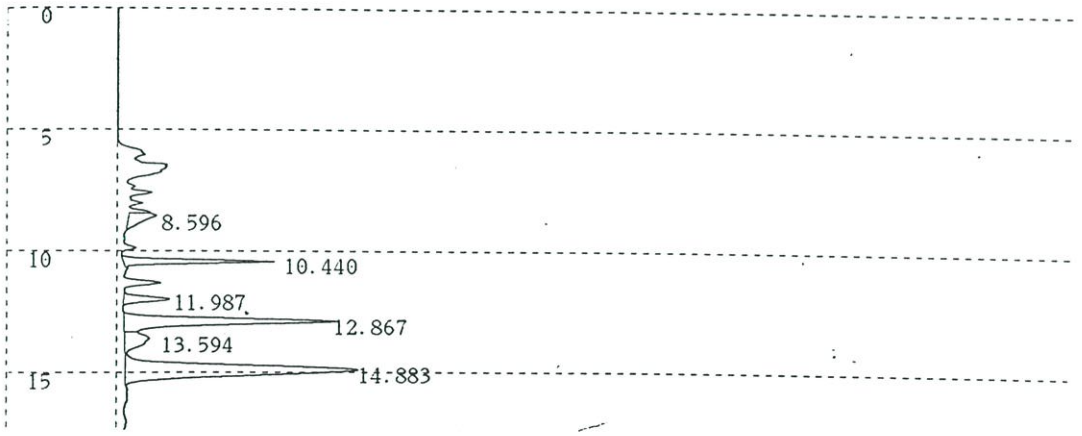


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	10.012	111	12			6.6319	
	2	10.613	1559	146			93.3681	
		TOTAL	1669	158			100	

รูปที่ ก.57 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

Milk powder : NO.5D=4.9512 g/ml

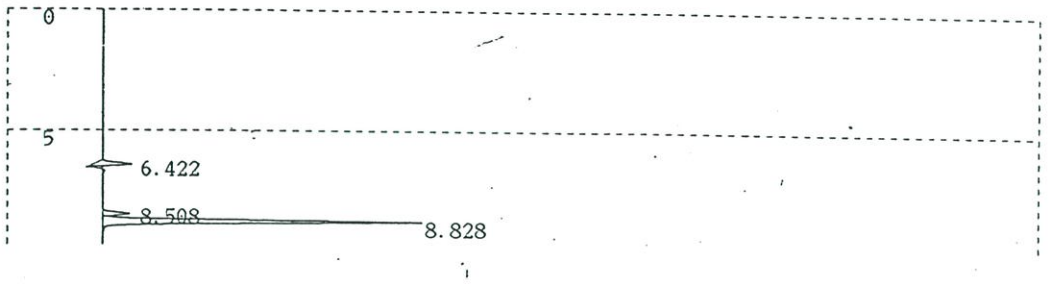


รูปที่ ก.58 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 5

ตารางที่ ก.29 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 5

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	5.6587	5.557	130	50.61
2	5.3992	5.489	124	50.59
3	5.6542	5.582	131	51.04
4	4.9512	10.440	136	60.51
5	5.1021	5.689	139	60.01
6	5.0191	10.377	137	60.13
7	5.0769	10.725	122	52.93
8	5.0407	10.423	135	59.00
9	5.3510	5.613	149	61.34
$\overline{X}$				56.24
SD				4.78
%RSD				8.50

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 5.184ug/mL

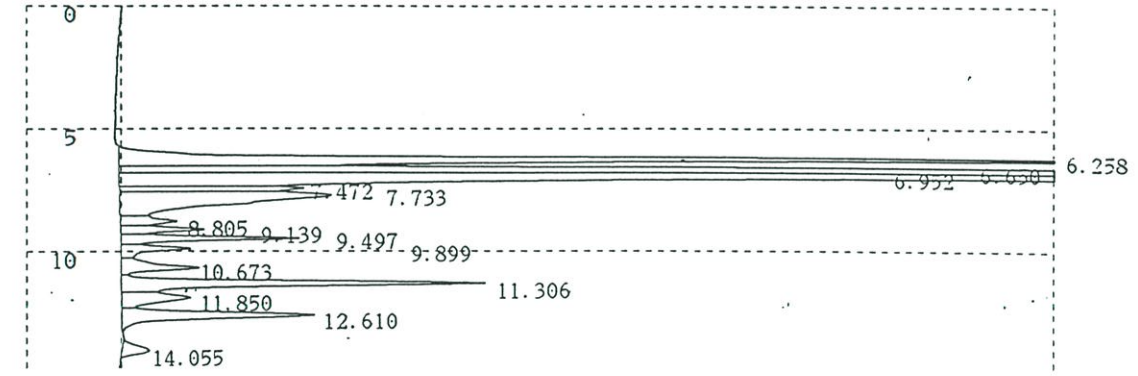


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	6.422	369	39			9.925	
	2	8.508	235	28			6.3247	
	3	8.828	3117	342	V		83.7502	
		TOTAL	3722	409			100	

รูปที่ ก.59 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : 6J



รูปที่ ก.60 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 6

ตารางที่ ก.30 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 6

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	5.0495	8.811	168	46.61
2	5.0066	8.883	105	29.38
3	5.0906	8.948	75	20.64
4	5.0441	9.286	152	42.22
5	5.0776	9.285	182	50.22
6	5.0587	9.316	153	42.38
7	5.0713	9.467	110	30.39
8	5.0918	9.472	202	55.58
9	5.0819	9.497	194	53.49
$\bar{X}$				41.21
SD				11.99
%RSD				29.09

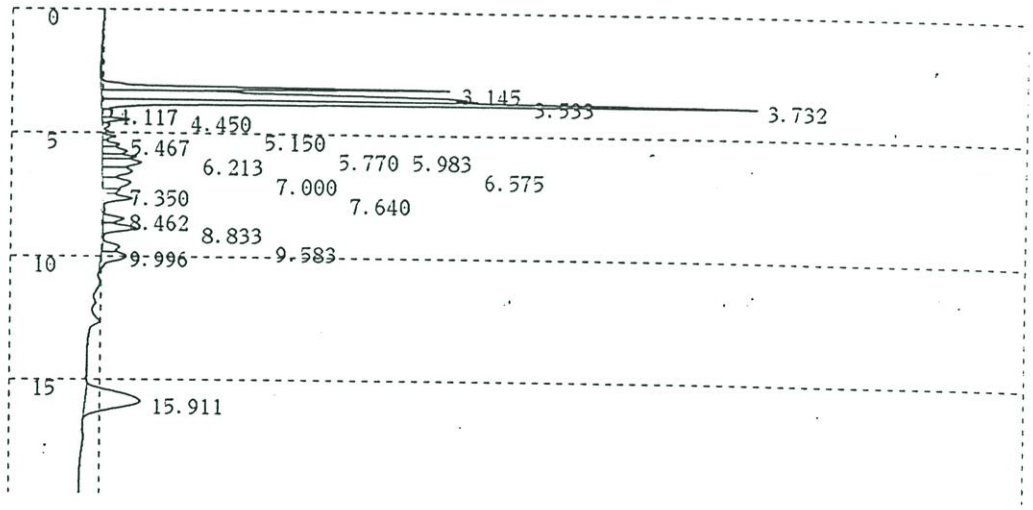
Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 15% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 5.1840 ug/mL

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.583	106	11			6.4898	
	2	8.458	1526	130			93.5102	
		TOTAL	1632	141			100	

รูปที่ ก.61 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

Milk powder : AOAC-NO.7B= 6.4364g/mL



รูปที่ ก.62 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 7

ตารางที่ ก.31 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 7

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	5.3514	8.400	24	16.37
2	5.3784	8.508	34	23.08
3	5.0013	8.944	28	20.44
4	5.3061	8.479	26	17.89
5	5.3095	8.368	23	15.81
6	5.2969	8.549	30	20.68
7	5.3849	8.477	29	19.66
8	5.4492	8.619	32	21.44
$\overline{X}$				19.42
SD				2.53
%RSD				13.09

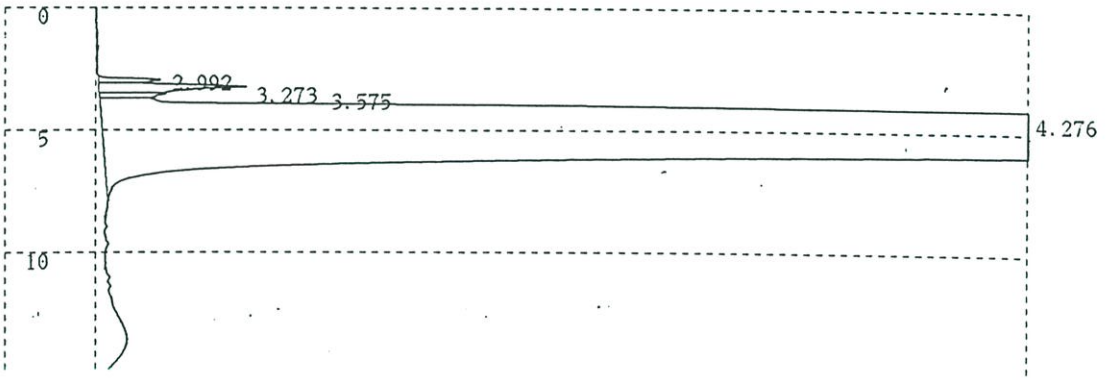
Column : Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 3.904 ug/mL

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	3.687	1416	327			100	
		TOTAL	1416	327			100	

รูปที่ ก.63 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : NO.8G=5.1450 g/mL



** CALCULATION REPORT **

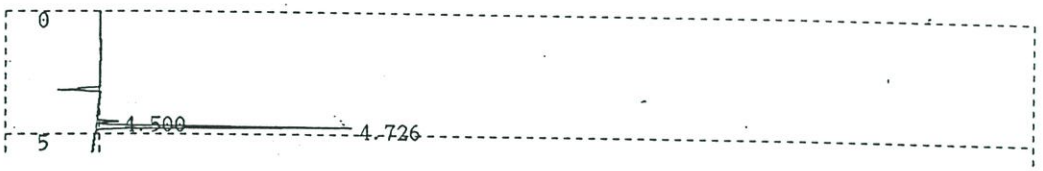
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.992	672	65			0.1019	
	2	3.273	2436	158	V		0.3695	
	3	3.575	780	70	V		0.1182	
	4	4.276	655412	12014	V		99.4103	
		TOTAL	659300	12307			100	

รูปที่ ก.64 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 8

ตารางที่ ก.32 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 8

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	5.5101	-	-	-
2	5.4888	-	-	-
3	5.4723	-	-	-
4	5.3614	-	-	-
5	5.1243	-	-	-
6	5.5248	-	-	-
7	5.1450	-	-	-
8	5.3068	-	-	-
9	5.0817	-	-	-
10	5.1826	-	-	-
$\overline{X}$				-
SD				0
%RSD				0

Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 4.880 ug/mL
milk powder : NO.9

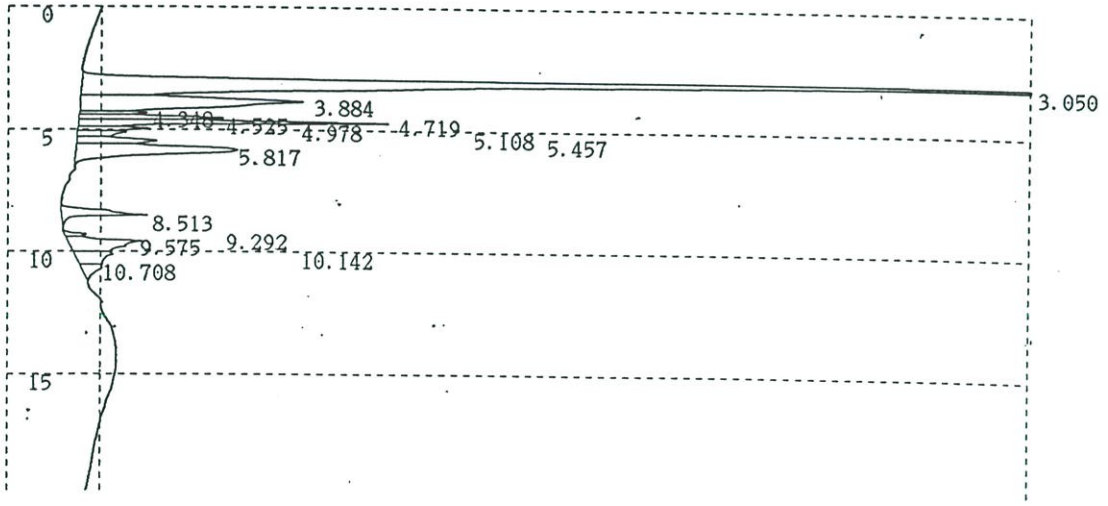


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.5	120	23			7.5913	
	2	4.726	1464	273	V		92.4086	
		TOTAL	1585	296			100	

รูปที่ ก.65 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : NO.9J = 4.9775 g/mL

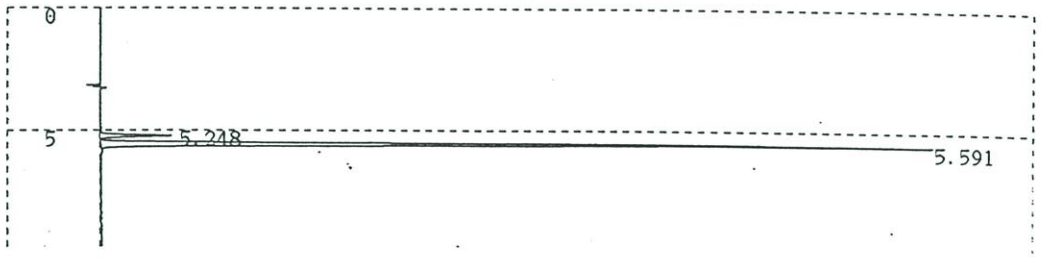


รูปที่ ก.66 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 9

ตารางที่ ก.33 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 9

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	4.2447	4.421	268	106.98
2	4.9933	4.730	307	109.50
3	5.1667	4.706	299	103.07
4	5.1888	4.717	280	96.11
5	4.9400	4.694	283	102.03
6	4.9987.	4.703	223	79.45
7	4.9775	4.719	332	118.79
$\bar{X}$				102.28
SD				12.29
%RSD				12.02

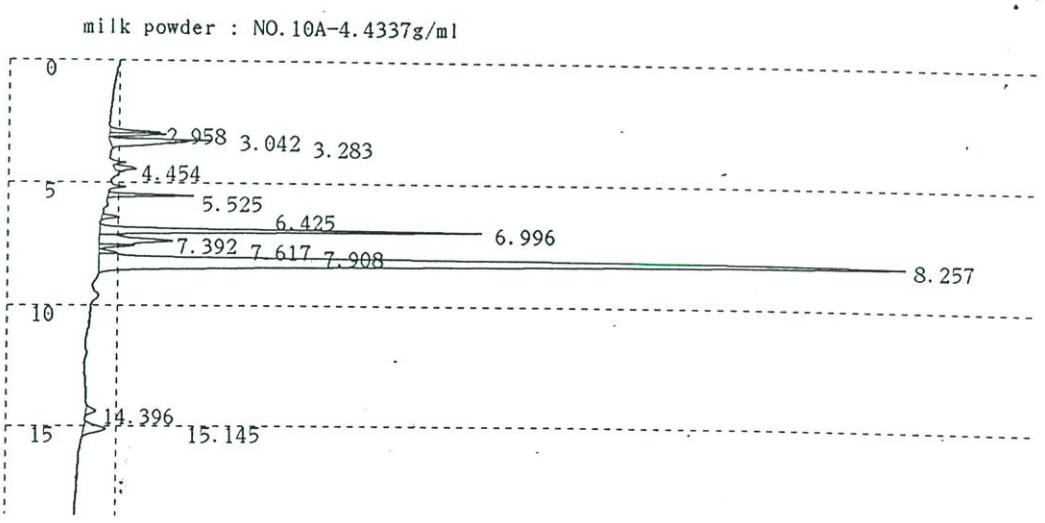
Column :Silica 5u, 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 19.52 ug/mL
milk powder : NO.10



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	5.248	458	76			7.2961	
	4	5.591	5814	891	V		92.7038	
		TOTAL	6272	967			100	

รูปที่ ก.67 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค



รูปที่ ก.68 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 10

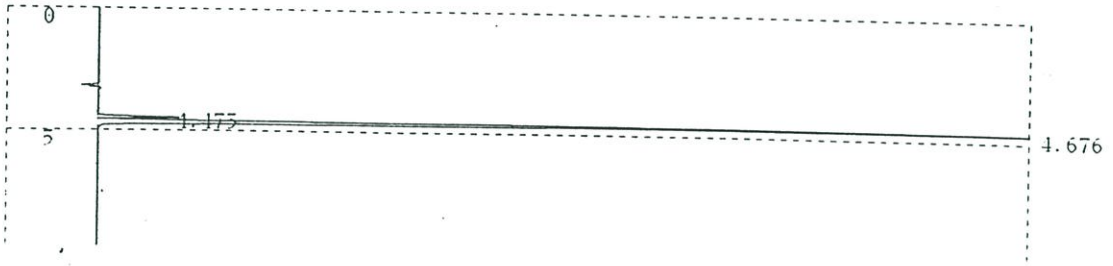
ตารางที่ ก.34 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานในนมผงตัวอย่างที่ 10

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	4.4337	5.525	80	39.80
2	4.4623	5.404	51	25.21
3	5.2945	5.423	53	22.08
4	5.2831	5.380	56	23.38
5	4.9981	5.475	91	40.16
6	4.9417	5.400	53	23.66
7	5.0068	5.423	71	31.28
8	5.2398	5.403	53	22.31
9	5.0987	5.410	81	35.04
10	5.3694	5.315	66	27.11
$\overline{X}$				29.00
SD				7.10
%RSD				24.48

ตารางที่ ก.35 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมผงที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	การได้กลับคืน (ร้อยละ)
1	5.03	5.158	225	42.37
2	5.14	5.100	185	34.84
3	5.02	5.090	181	34.09
4	5.19	5.090	186	35.03
5	5.22	5.072	179	33.71
6	5.68	5.086	191	35.97
7	5.41	5.085	187	35.22
8	5.78	5.083	211	39.74
$\overline{X}$				36.37
SD				3.05
%RSD				8.39

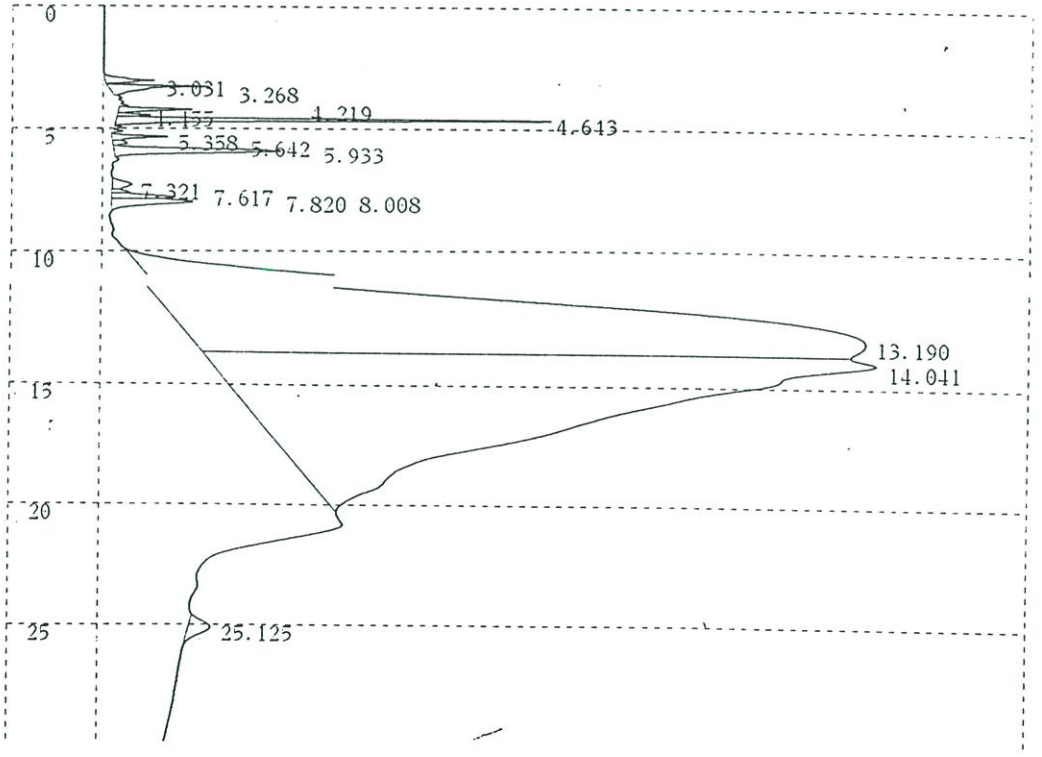
Column : Silica 5u. 250 X 4.6mm
Mobile phase : 30% dichloromethane-0.02% isopropanol in isooctane
Flow rate : 1.0mL/min.
Detector : UV 254 X 0.16 AUFS
standard : 19.52ug/mL
ACC/AOAC : MP(2)



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	4.475	460	88			7.3287	
	3	4.676	5815	1056	V		92.6713	
		TOTAL	6275	1144			100	

รูปที่ ก.69 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค



รูปที่ ก.70 แสดงโครมาโทแกรมผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมผง

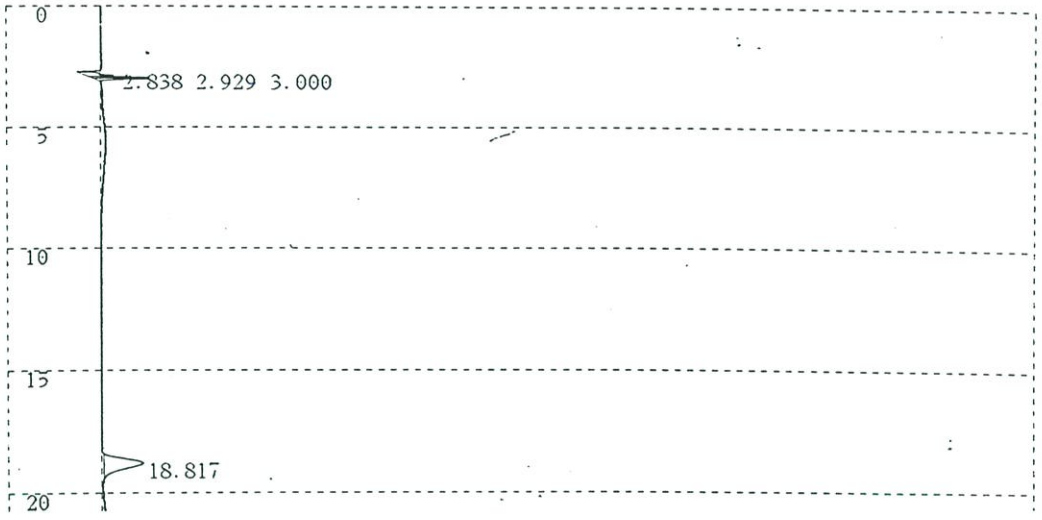
ตารางที่ ก.36 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมผงที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	การได้กลับคืน (ร้อยละ)
1	5.20	4.643	472	44.28
2	5.42	4.640	486	45.59
3	5.49	4.619	353	33.11
4	5.16	4.616	398	37.34
5	5.42	4.619	369	34.62
6	5.05	4.622	395	37.05
7	5.66	4.617	397	37.24
8	5.48	4.613	375	35.18
9	5.70	4.616	390	36.59
10	5.25	4.593	367	34.43
$\bar{X}$				37.54
SD				4.15
%RSD				11.05

ตารางที่ ก.37 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมผงที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	การได้กลับคืน (ร้อยละ)
1	5.15	4.806	1070	51.87
2	5.03	4.786	1116	54.10
3	5.01	4.763	990	47.99
4	5.22	4.751	987	47.84
5	5.01	4.736	1017	49.30
6	5.01	4.732	1010	48.96
7	5.28	4.724	906	43.92
8	5.09	4.723	985	47.75
9	5.35	4.721	1055	51.14
10	5.61	4.716	849	41.15
$\bar{X}$				48.40
SD				3.75
%RSD				7.75

Column : spherisorb ODS2 250x4.6mm.,5um
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm X 0.16AUFS
standard : 3.968ug/mL

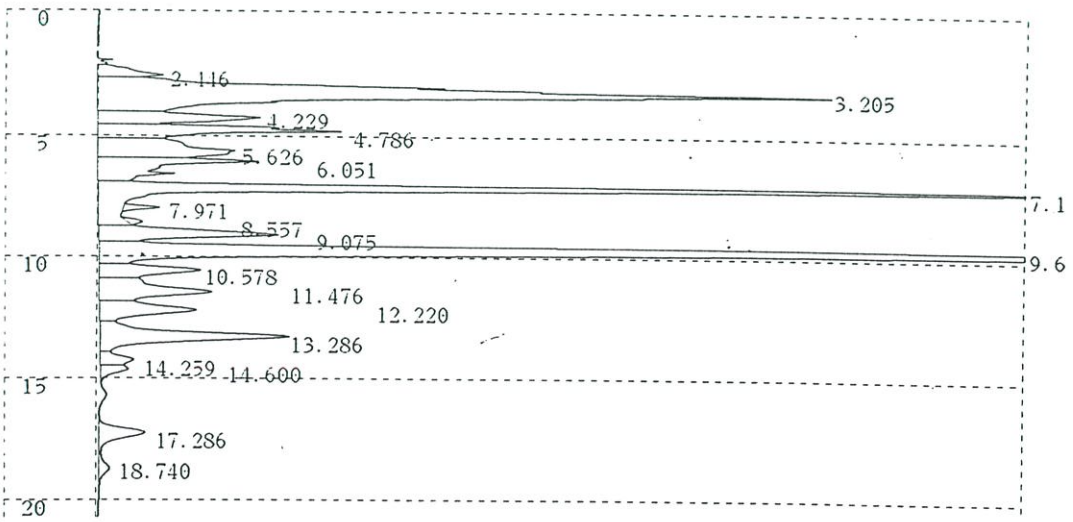


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.838	209	31			11.9193	
	2	2.929	196	61	V		11.1668	
	3	3	191	57	V		10.8989	
	4	18.817	1158	42			66.0149	
		TOTAL	1754	192			100	

รูปที่ ก.71 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : DEV.No.1C-26.65g/mL

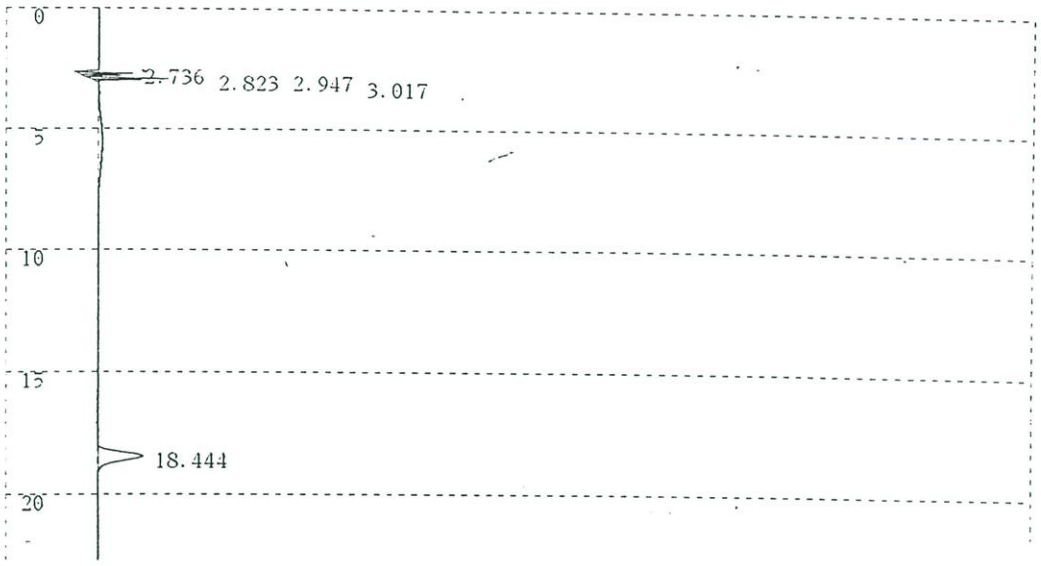


รูปที่ ก.72 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 1

ตารางที่ 4.38 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 1

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.49	20.17	18.470	8	3.66
2	0.57	20.08	18.600	6	2.76
3	0.60	26.65	18.740	11	3.81
4	0.50	20.68	18.433	5	2.23
5	0.56	20.51	18.464	11	4.95
6	0.50	21.42	18.542	6	2.58
$\overline{X}$					3.33
SD					1.01
%RSD					30.33

Column : spherisorb ODS2 250x4.6mm.,5um
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm X 0.16AUFS
standard : 3.968 ug/mL

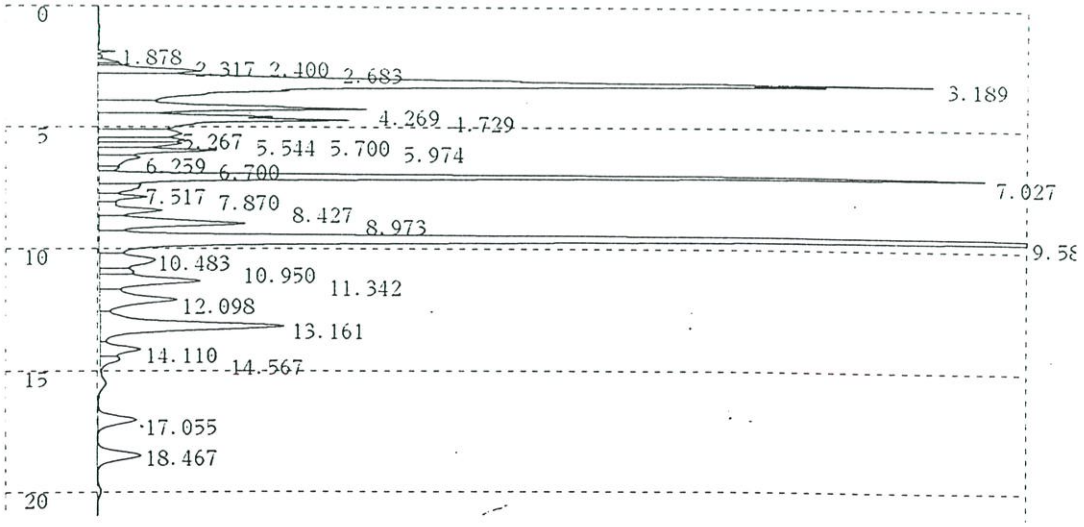


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.736	169	59			8.7707	
	2	2.823	132	42	V		6.8487	
	3	2.947	289	86	V		14.9925	
	4	3.017	131	53	V		6.8021	
	5	18.444	1208	49			62.5861	
		TOTAL	1930	289			100	

รูปที่ ก.73 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : DEV. No.2G-20.14 g/mL

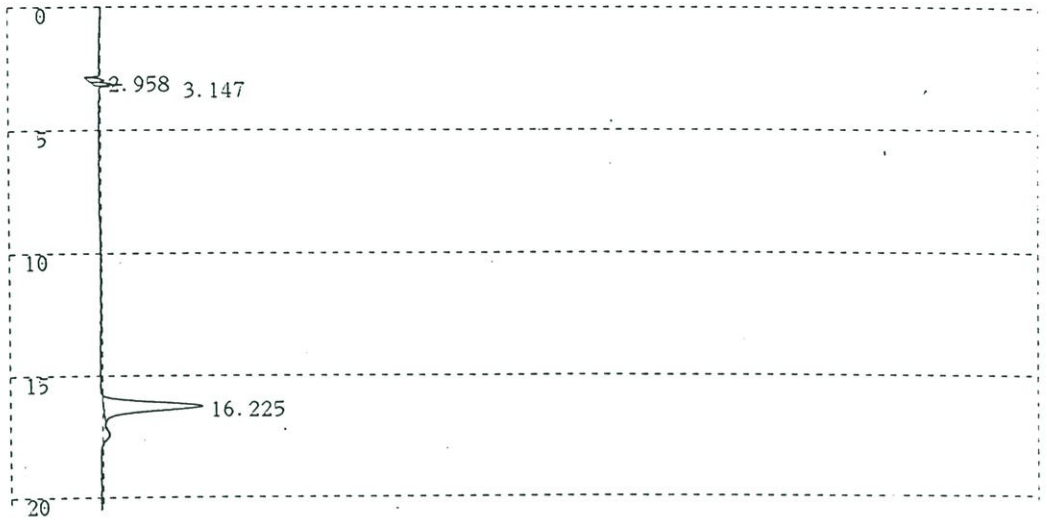


รูปที่ ก.74 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 2

ตารางที่ ก.39 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 2

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.51	20.04	18.200	19	7.68
2	0.51	20.06	18.362	39	15.74
3	0.52	20.02	18.171	13	5.26
4	0.51	20.12	18.479	42	16.90
5	0.50	20.18	18.492	15	6.02
6	0.52	20.07	18.342	21	8.47
$\overline{X}$					10.01
SD					5.03
%RSD					50.25

column : Pinnncle amine ODS,5um 250x4.6mm.
mobile phase:100% methanol
detector : UV 272 nmx0.16 AUFS
standard : 9.92 ug/mL

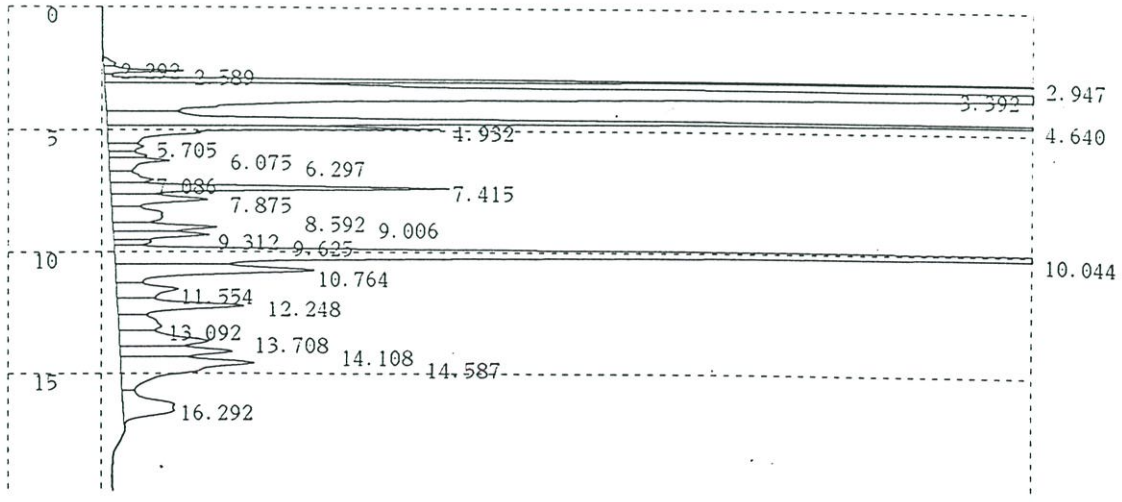


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.958	160	19			5.5759	
	2	3.147	160	31	V		5.5794	
	4	16.225	2546	105			88.8447	
		TOTAL	2866	155			100	

รูปที่ ก.75 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

samp.3E : 34.47 g/mL

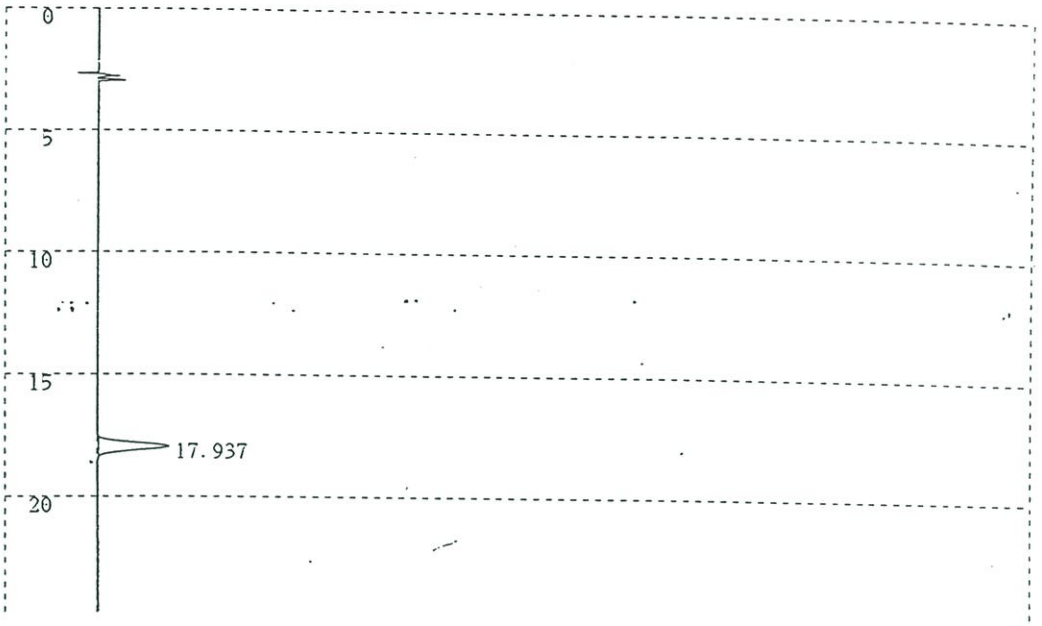


รูปที่ ก.76 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 3

ตารางที่ ก.40 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 3

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.52	20.08	15.911	61	15.91
2	0.50	20.18	16.292	55	14.93
3	0.51	20.20	15.911	75	18.31
4	0.52	20.03	16.104	64	16.79
5	0.51	20.18	16.075	64	16.60
6	0.50	20.07	16.044	51	13.18
$\overline{X}$					16.51
SD					1.24
%RSD					7.51

Col. : spherisorb ODS2 250x4.6mm..5um
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm
sensitivity : 0.16 AUFS
standard : 4.96 ug/mL

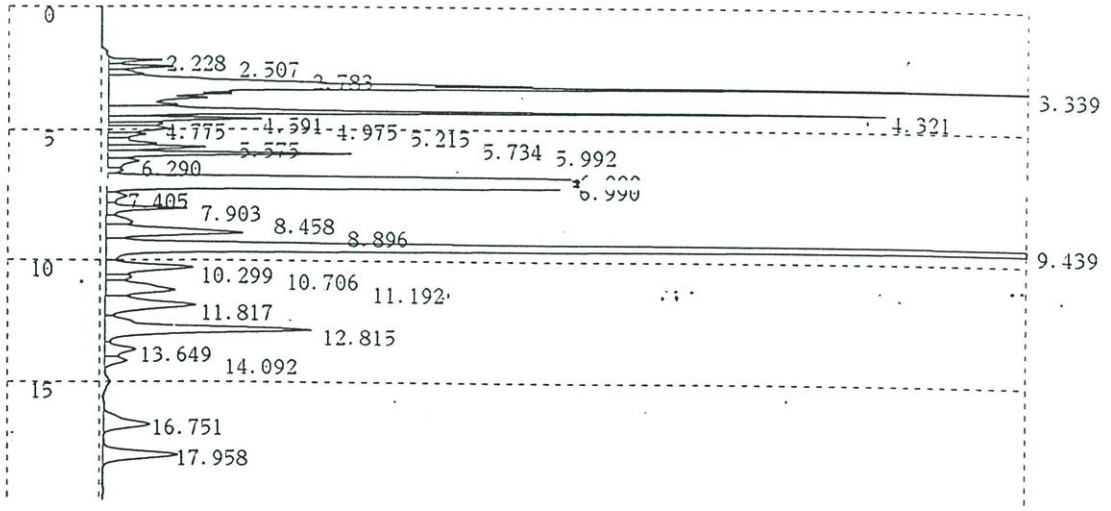


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4	17.937	1610	76			100	
		TOTAL	1610	76			100	

รูปที่ ก.77 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : DEV.4H 20.37g/mL

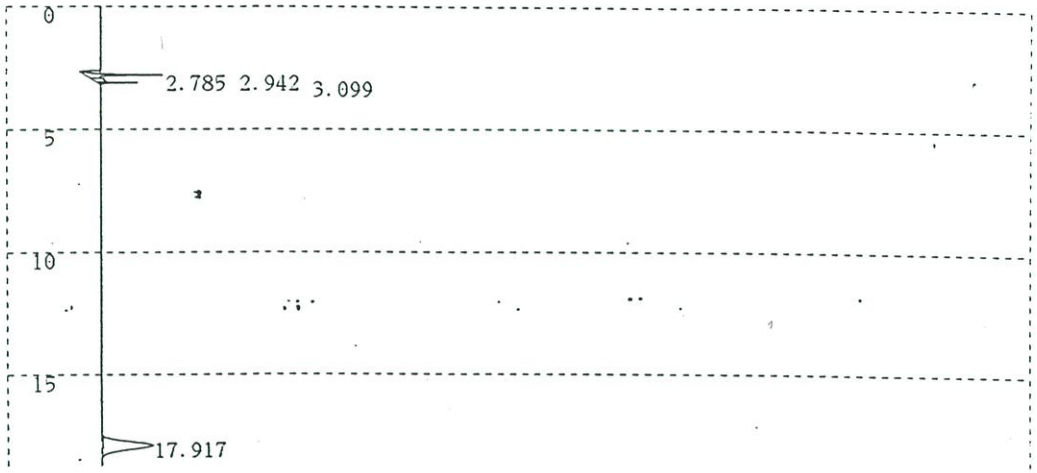


รูปที่ ก.78 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 4

ตารางที่ ก.41 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 4

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.51	20.33	17.742	72	23.11
2	0.50	21.19	18.041	63	19.40
3	0.53	20.37	17.958	80	25.63
4	0.50	20.13	17.791	94	30.48
5	0.54	20.58	18.016	73	23.15
$\overline{X}$					24.36
SD					4.08
%RSD					16.75

Column : spherisorb ODS2 250x4.6mm.,5um
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm X 0.16AUFS
standard : 3.968 ug/mL

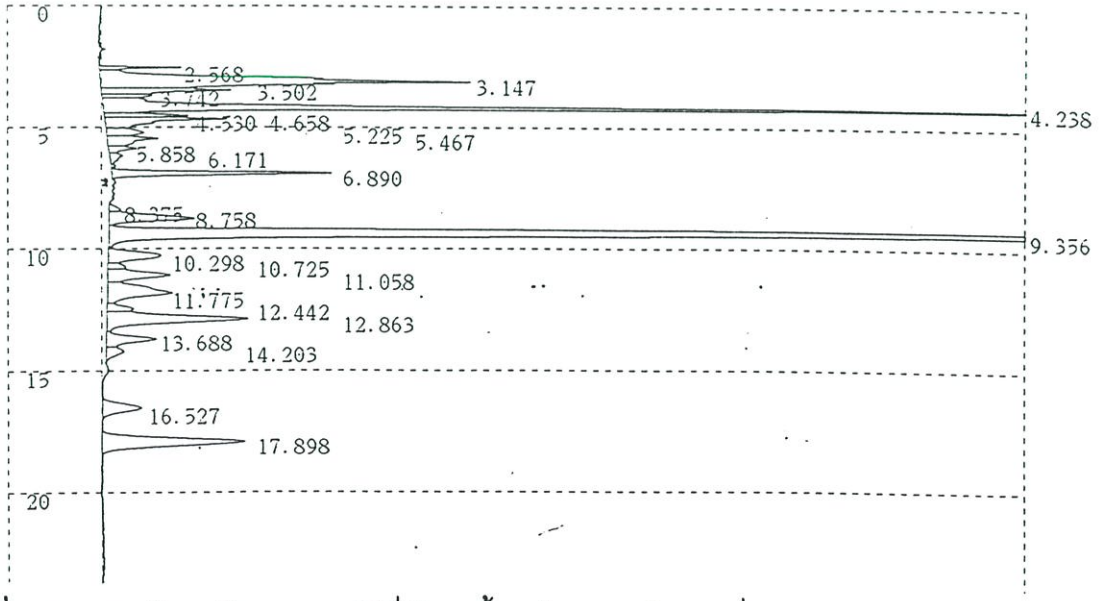


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.785	397	86			21.2502	
	2	2.942	126	15	V		6.743	
	3	3.099	103	45	V		5.481	
	4	17.917	1244	55			66.5258	
		TOTAL	1870	200			100	

รูปที่ ก.79 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : DEV.NO.5D-22.00 g/mL

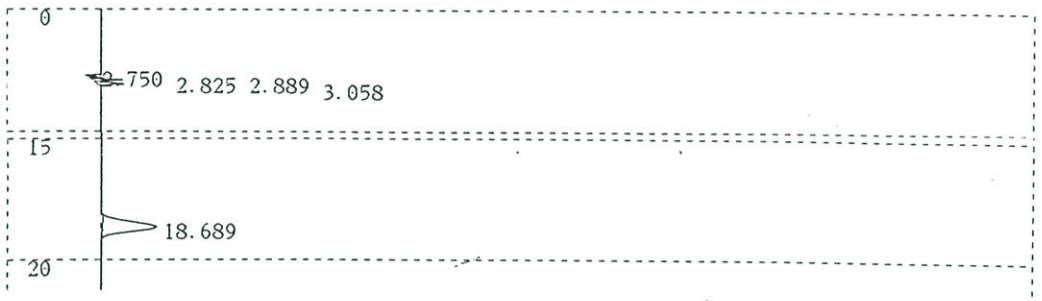


รูปที่ ก.80 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 5

ตารางที่ ก.42 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 5

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.53	20.23	17.975	143	51.00
2	0.56	26.50	17.892	200	54.50
3	0.49	22.00	17.898	157	51.49
4	0.54	20.58	17.899	154	53.99
5	0.52	20.68	17.820	148	51.63
6	0.62	20.38	17.962	147	52.04
7	0.51	21.08	17.876	149	50.99
8	0.57	20.07	17.913	146	52.48
9	0.49	20.42	17.873	146	51.58
$\overline{X}$					52.19
SD					1.26
%RSD					2.41

Col. : spherisorb ODS2 250x4.6mm.,5um
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm
sensitivity : 0.16 AUFS
standard : 4.96 ug/mL
milk powder : g / mL

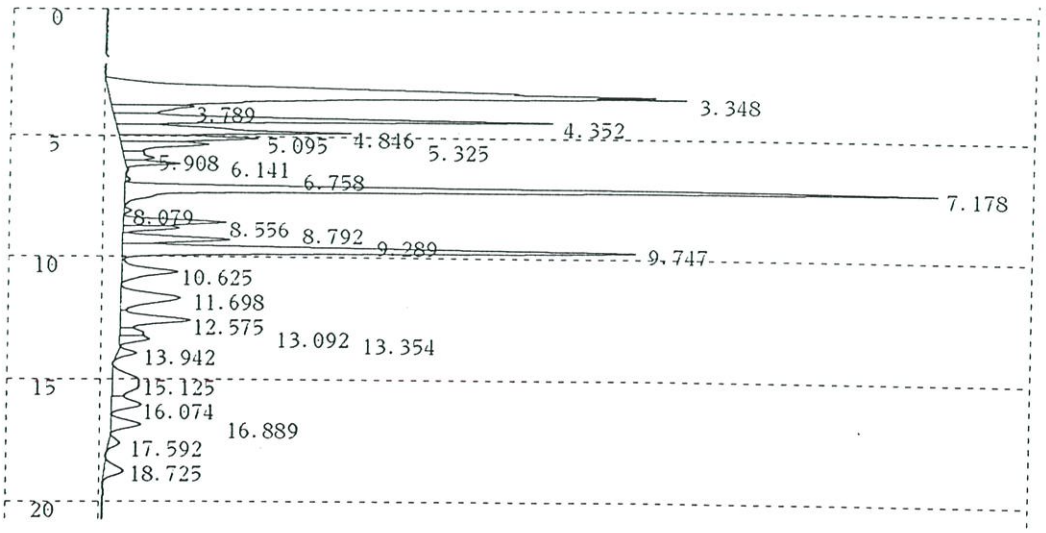


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.75	36	9			1.8916	
	2	2.825	51	16	V		2.6872	
	3	2.889	100	33	V		5.2532	
	4	3.058	155	26	V		8.1827	
	5	18.689	1556	58			81.9853	
		TOTAL	1898	143			100	

รูปที่ ก.81 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : DEV6-B,11.68g / mL

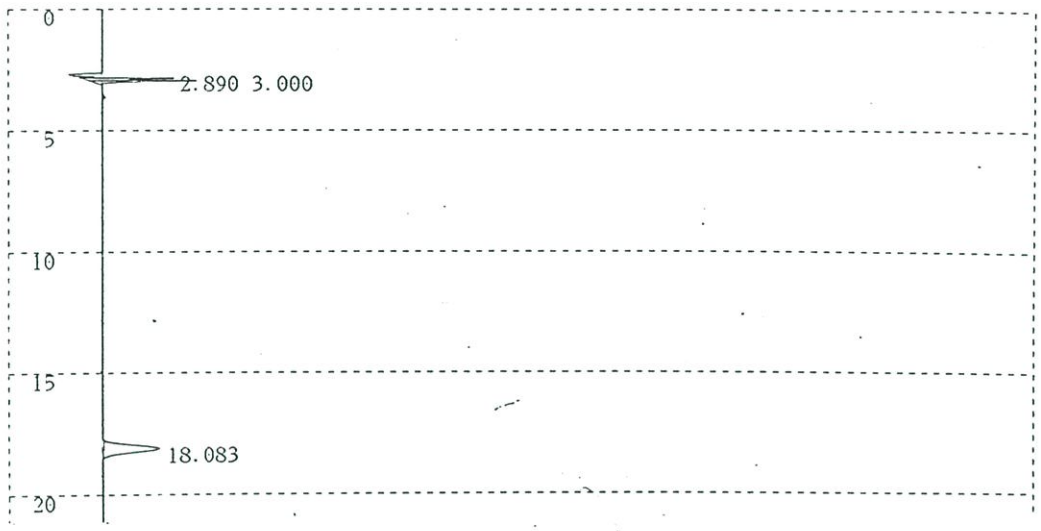


รูปที่ ก.82 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 6

ตารางที่ ก.43 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 6

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.57	11.68	18.725	21	15.38
2	0.52	10.05	18.725	17	14.47
3	0.51	11.09	18.737	18	13.88
4	0.53	10.16	18.721	19	15.99
5	0.60	11.83	18.786	17	12.29
6	0.63	11.18	18.750	18	13.77
7	0.51	13.08	18.898	24	15.69
8	0.52	11.64	18.747	18	13.22
9	0.47	11.51	18.704	19	14.12
$\overline{X}$					14.31
SD					1.21
%RSD					8.46

Col. : spherisorb ODS2 250x4.6mm.,5um
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm
sensitivity : 0.16 AUFS
standard : ug/mL
milk powderR: 7-

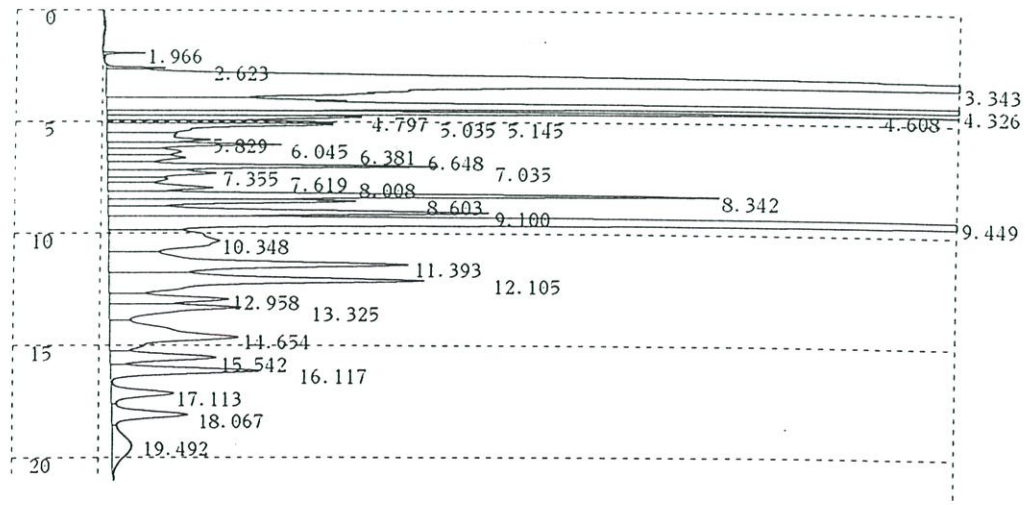


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	2.89	382	100	V		18.7623	
	3	3	395	115	V		19.4003	
	4	18.083	1260	61			61.8375	
		TOTAL	2038	276			100	

รูปที่ ก.83 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : R7-3 = 10.63g /0.5mL

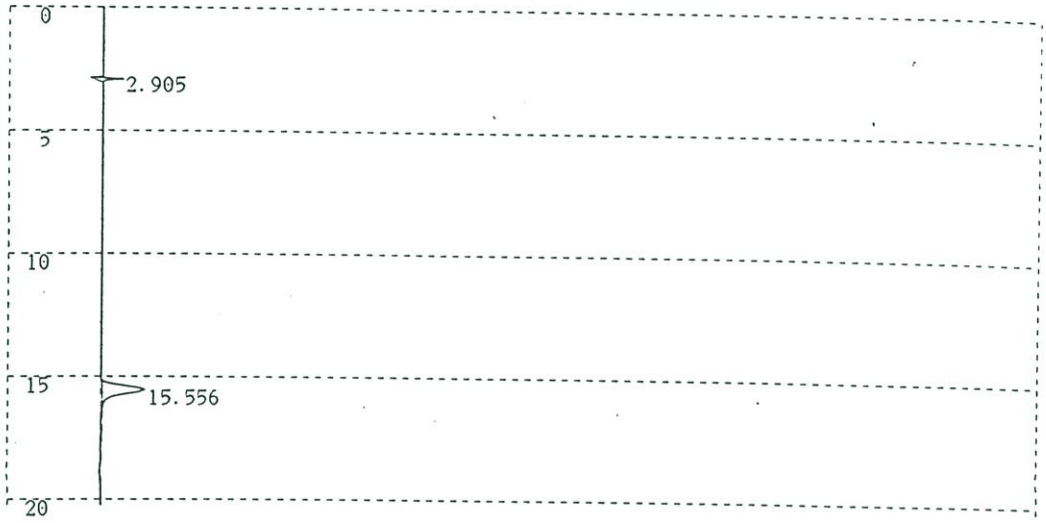


รูปที่ ก.84 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 7

ตารางที่ ก.44 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 7

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.54	10.54	18.122	87	33.02
2	0.55	15.30	18.243	147	38.43
3	0.56	10.63	18.067	89	33.49
4	0.58	11.45	18.211	125	43.67
5	0.55	10.98	18.124	93	33.88
6	0.56	10.33	18.242	115	44.53
7	0.58	12.37	18.190	137	44.30
8	0.50	10.16	18.205	83	32.68
$\overline{X}$					38.00
SD					5.41
%RSD					14.24

Col. :pinnacle amine ODS 250X4.6mm
mobile phase: 100% methanol
flow rate : 1.0mL/min.
detector : UV 272 nm
sensitivity : 0.16 AUFS
standard : 3.968 ug/mL

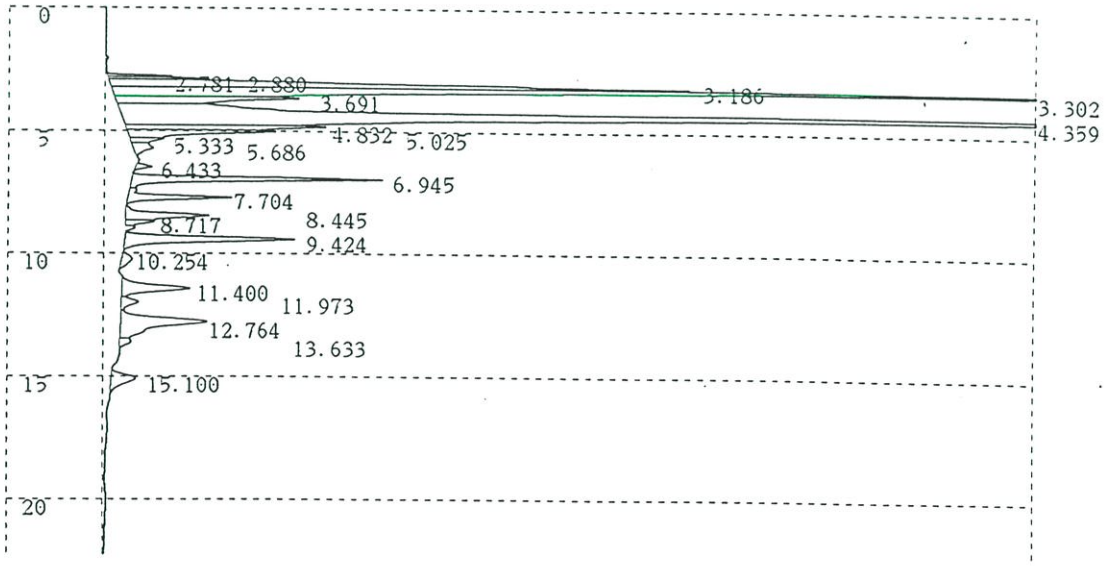


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.905	153	32			12.9925	
	2	15.556	1025	44			87.0075	
		TOTAL	1178	76			100	

รูปที่ ก.85 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : NO.8-7= 8.07g/0.5mL

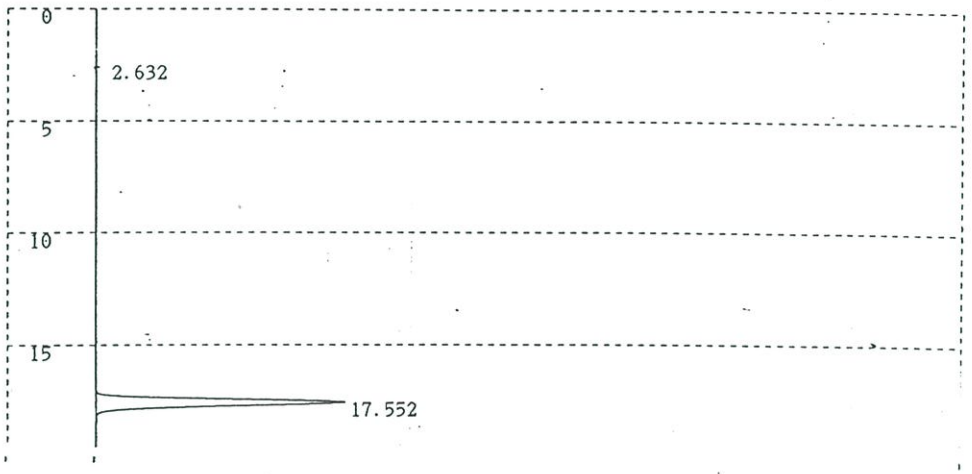


รูปที่ ก.86 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 8

ตารางที่ ก.45 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 8

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.50	11.92	-	-	-
2	0.54	21.91	-	-	-
3	0.60	22.51	-	-	-
4	0.66	25.02	-	-	-
5	0.52	9.23	-	-	-
6	0.52	13.29	-	-	-
7	0.50	8.07	-	-	-
8	0.51	8.90	-	-	-
9	0.53	8.31	-	-	-
10	0.50	12.65	-	-	-
$\bar{X}$					-
SD					0
%RSD					0

COLUMN : Spherisorb ODS2,5u,250X4.6mm
DETECTER : UV 272nm
FLOWRATE : 1.0mL/min.
MOBILE PHASE : 100%Methanol
Standard : 18.952 ug/mL

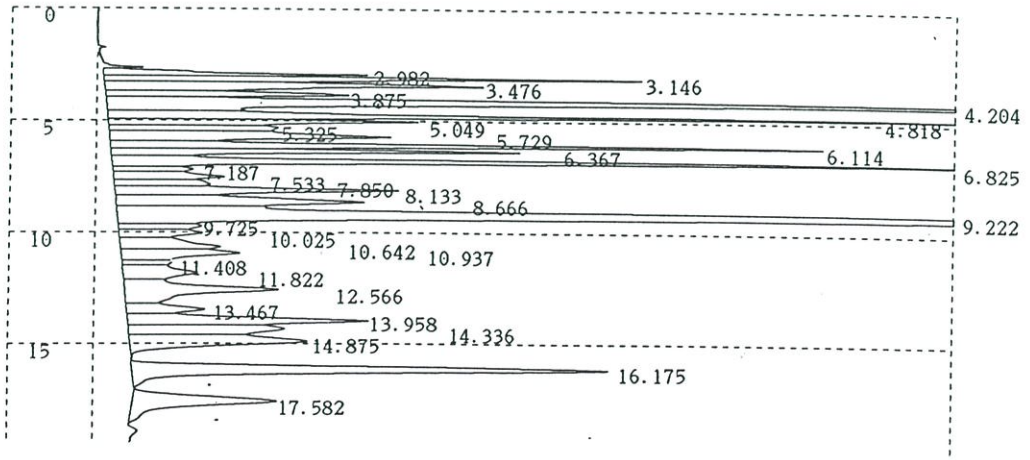


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.632	14	5			0.2261	
	2	17.552	6045	288			99.7739	
		TOTAL	6058	294			100	

รูปที่ ก.87 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : MP-RNO.9H= 20.58 g/mL

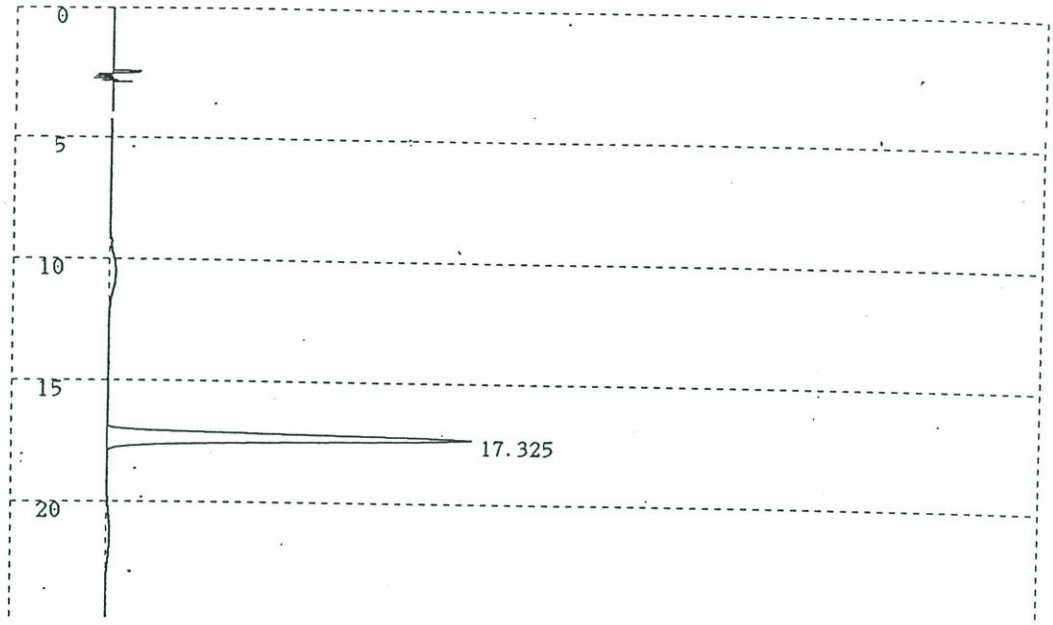


รูปที่ ก.88 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 9

ตารางที่ ก.46 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 9

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.55	20.53	17.500	174	56.16
2	0.52	21.54	17.735	174	55.07
3	0.49	19.91	17.500	165	54.92
4	0.48	20.42	17.493	167	54.19
5	0.58	20.58	17.582	169	54.42
6	0.53	20.87	17.668	172	56.18
7	0.56	21.09	17.735	170	54.95
$\overline{X}$					55.13
SD					0.78
%RSD					1.41

COLUMN : Spherisorb ODS2,5u,250X4.6mm
DETECTER : UV 272nm
FLOWRATE : 1.0mL/min.
MOBILE PHASE : 100%Methanol
Standard : 27.888 ug/mL
milk powder : MPRNO.10 g/mL

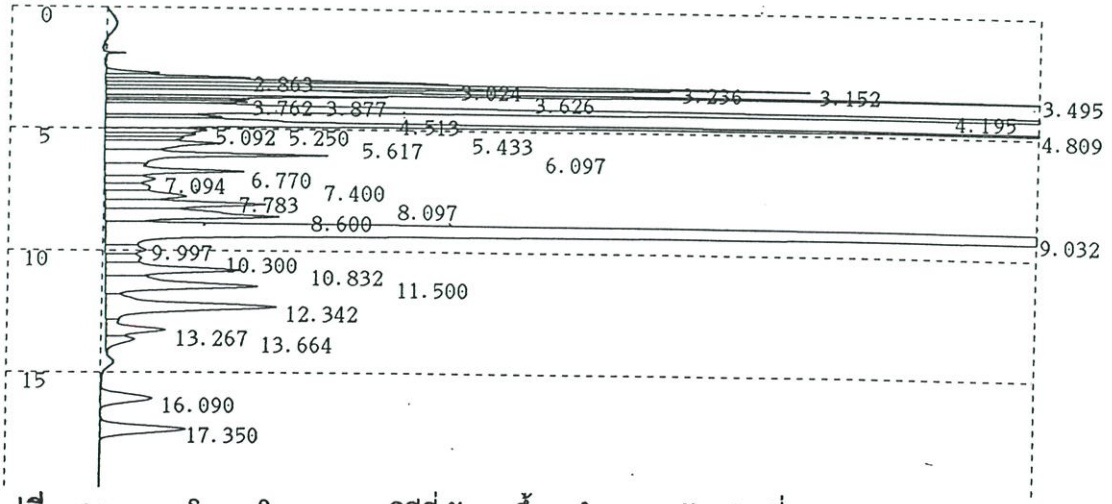


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	7	17.325	8548	393			100	
		TOTAL	8548	393			100	

รูปที่ ก.89 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : MPRNO.10A= 21.26 g/mL

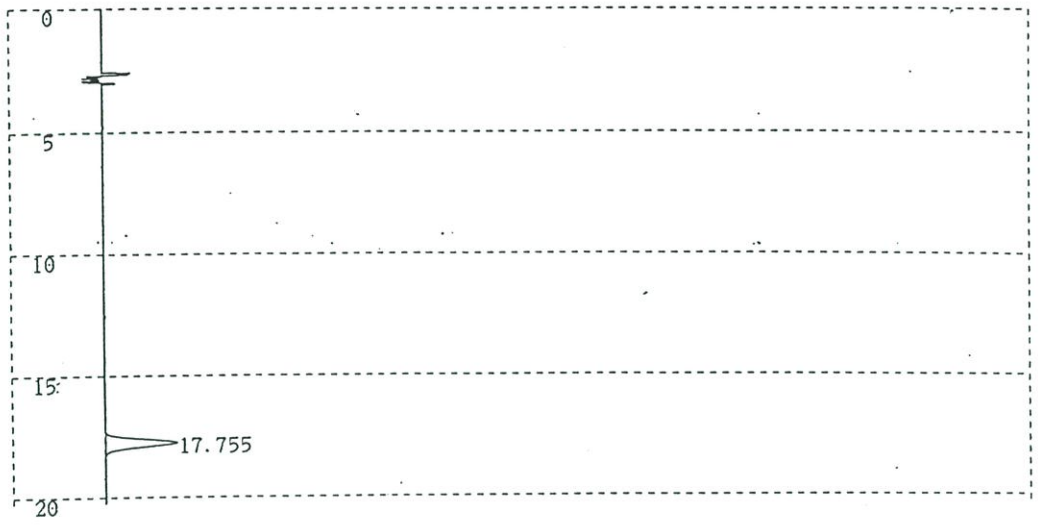


รูปที่ ก.90 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 10

ตารางที่ ก.47 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในนมผงตัวอย่างที่ 10

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	ปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)
1	0.54	21.26	17.350	88	29.30
2	0.56	21.97	17.292	107	34.47
3	0.50	19.80	17.416	116	41.47
4	0.53	21.62	17.312	124	40.60
5	0.64	21.43	17.326	116	38.31
6	0.48	19.17	17.614	96	35.45
7	0.58	19.63	17.517	112	40.39
8	0.50	20.43	17.410	117	40.54
9	0.52	20.36	17.437	106	36.85
10	0.58	20.75	17.412	116	39.57
$\overline{X}$					37.70
SD					3.78
%RSD					10.03

COLUMN : Spherisorb ODS2,5u,250X4.6mm
DETECTER : UV 272nm
FLOWRATE : 1.0mL/min.
MOBILE PHASE : 100%Methanol
Standard : 5.7760 ug/mL
milk powder : ACC-1-MP = g/mL

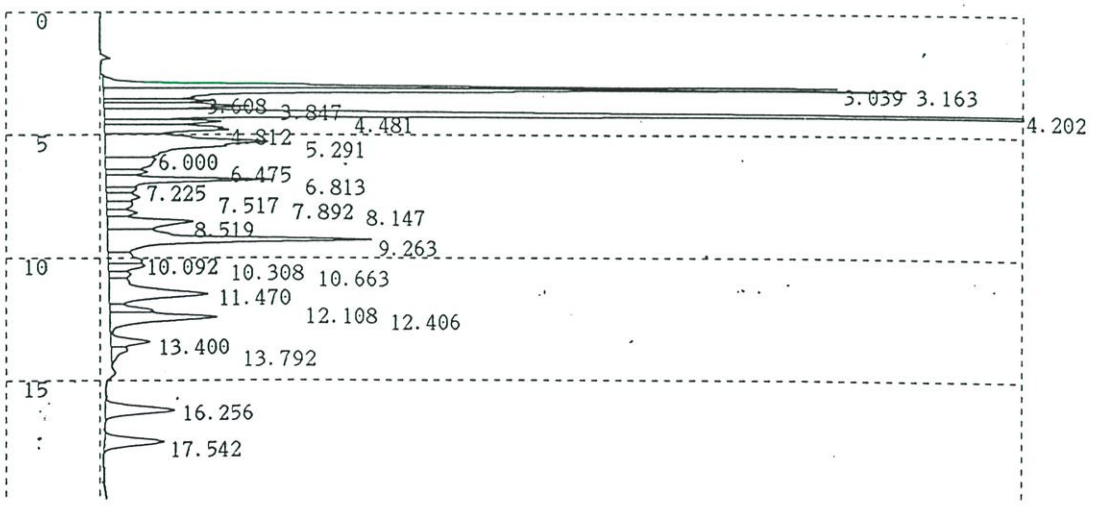


** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5	17.755	1713	78			100	
		TOTAL	1713	78			100	

รูปที่ ก.91 แสดงโครมาโทแกรมของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

milk powder : ACC-1-MPB= 19.77 g/mL



รูปที่ ก.92 แสดงโครมาโทแกรมผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมผง

ตารางที่ ก.48 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมผงที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	การได้กลับคืน (ร้อยละ)
1	0.47	22.19	17.375	53	68.83
2	0.49	21.20	17.386	46	59.74
3	0.56	20.12	17.484	45	58.44
4	0.49	19.53	17.611	41	53.25
5	0.53	20.11	17.489	40	51.95
6	0.48	19.56	17.598	36	46.75
7	0.62	21.56	17.375	49	63.64
8	0.50	20.37	17.433	35	45.45
9	0.56	19.77	17.542	65	84.42
$\overline{X}$					59.16
SD					12.15
%RSD					20.54

ตารางที่ ก.49 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมผงที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	การได้กลับคืน (ร้อยละ)
1	0.46	20.03	18.305	178	47.85
2	0.49	19.96	18.308	222	59.68
3	0.64	20.11	18.233	221	59.41
4	0.53	20.08	18.169	228	61.29
5	0.60	20.01	18.207	218	58.60
6	0.57	20.08	18.232	249	66.94
7	0.63	20.07	18.249	212	56.99
8	0.51	20.02	18.264	194	52.15
9	0.61	20.06	18.302	172	46.24
10	0.51	20.72	18.315	218	58.60
$\bar{X}$					56.78
SD					6.31
%RSD					11.11

ตารางที่ ก.50 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมผงที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดลอง	ไฮโดรควิโนน (กรัม)	น้ำหนัก (กรัม)	เวลา (นาที)	ความสูงของพีก	การได้กลับคืน (ร้อยละ)
1	0.52	20.32	18.475	407	73.07
2	0.54	20.44	18.522	387	69.48
3	0.55	20.02	18.425	341	61.22
4	0.62	19.68	18.614	405	72.71
5	0.48	20.45	18.644	394	70.74
6	0.44	20.84	18.481	395	70.92
7	0.57	20.59	18.532	389	69.84
8	0.55	20.28	18.516	412	73.97
9	0.50	20.26	18.523	404	72.53
10	0.52	20.21	18.544	295	52.96
$\overline{X}$					68.74
SD					6.60
%RSD					9.60

ตารางที่ ก.51 แสดงผลการทดลองวิธีมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค โดยการฉีดซ้ำ 6 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความสูงของพีก	S	%RSD
0	0	0	0
1.04	47	0.52	1.11
5.18	234	0.41	0.18
10.37	475	0.98	0.21

ตารางที่ ก.52 แสดงผลการทดลองวิธีที่พัฒนาขึ้นมาของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค โดยการฉีดซ้ำ 6 ครั้ง

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความสูงของพีก	S	%RSD
0	0	0	0
2.32	33	1.15	3.48
4.65	66	0.82	1.24
9.30	128	1.60	1.25
18.59	251	1.60	0.64
27.89	377	1.94	0.51
37.17	513	3.35	0.65

ภาคผนวก ข
แสดงวิธีการคำนวณ

ข.1 วิธีการคำนวณหาปริมาณวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)

ใช้สูตร $$K = \frac{C_{std.} \times V_{total} \times Height_{samp.} \times 100}{Height_{std} \times Weight_{samp.}}$$

เมื่อ $C_{std.}$ = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินเค (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

$V_{total.}$ = ปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ละลาย (มิลลิลิตร)

$Height_{std.}$ = ความสูงของพีกสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

$Height_{samp.}$ = ความสูงของพีกตัวอย่าง

$Weight_{samp.}$ = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

แทนค่า

$$K = \frac{5.74\ (\mu g/ml) \times 1.0\ ml \times 68 \times 100}{101.44(g) \times 57}$$

$$= 6.75\ \mu g./100\ g.$$

ข.2 การคำนวณประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

ใช้สูตรการได้กลับคืนร้อยละ $= \frac{(A-B)}{C} \times 100$

เมื่อ A = ความสูงของพีกตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

B = ความสูงของพีกตัวอย่าง

C = ความสูงของพีกสารละลายมาตรฐานวิตามินเค

แทนค่า

$$= \frac{(585-0)}{598} \times 100$$

$$= 97.83$$

ข.3 วิธีการหาค่า MDL และ LOQ

กำหนดค่า MDL เท่ากับ $\bar{X}+3$ SD และ LOQ เท่ากับ $\bar{X}+10$ SD

ข.3.1 วิธีมาตรฐานในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที (ข้อมูลจากตารางที่ ก.16)

$\bar{X}$ = 2.92 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม

SD = 0.28

ดังนั้นค่า MDL ในนมพร้อมดื่มยูเอชที = 2.92+0.84

และค่า LOQ ในนมพร้อมดื่มยูเอชที = 2.92+2.80

ข.3.2 วิธีที่พัฒนาขึ้นมาในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที (ข้อมูลจากตารางที่ ก.22)

$\bar{X}$ = 3.74 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม

SD = 0.28

ดังนั้นค่า MDL ในนมพร้อมดื่มยูเอชที = 3.74+0.84

และค่า LOQ ในนมพร้อมดื่มยูเอชที = 3.74+2.80

ข.4 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวน

$$\text{ใช้สูตร} \quad F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

โดยที่ $S_1^2 > S_2^2$

เมื่อ F = อัตราส่วนความแปรปรวน

S_1^2 = ความแปรปรวนของข้อมูลชุดที่ 1

S_2^2 = ความแปรปรวนของข้อมูลชุดที่ 2

จากตารางที่ 4.4 แสดงผลการทำซ้ำในตัวอย่างนมพร้อมดื่มยูเอชที

ตัวอย่าง	วิธีมาตรฐาน			วิธีที่พัฒนาขึ้นมา		
	$\bar{X}$ (µg/ 100 g)	SD	%RSD	$\bar{X}$ (µg/ 100 g)	SD	%RSD
1	4.57	0.75	16.41	6.81	0.65	9.54
2	2.92	0.28	9.59	3.74	0.28	7.49
3	-	0	0	-	0	0
4	6.63	0.43	6.49	6.94	0.74	10.66
5	-	0	0	-	0	0

- ตรวจไม่พบปริมาณวิตามินเค

ค่า SD ของวิธีมาตรฐาน = 0.75, S^2 = 0.563

ค่า SD ของวิธีที่พัฒนาขึ้นมา = 0.65 , S^2 = 0.423

ดังนั้นค่า F = 1.33

ข.5 แสดงการทดสอบสมมติฐาน

ใช้สูตร $$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S_P\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

เมื่อ $$S_P = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$\bar{X}_1$ และ $\bar{X}_2$ = ค่าเฉลี่ยของตัวอย่างชุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

S_1 และ S_2 = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างชุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

n_1 และ n_2 = จำนวนข้อมูลชุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

$n_1 = 9$, $n_2 = 9$

$S_1^2 = 0.563$, $S_2^2 = 0.423$

$\bar{X}_1 = 4.57$, $\bar{X}_2 = 6.81$

ดังนั้น $t = 8.325$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวอมรรัตน์ พิกุลทอง
วัน เดือน ปีเกิด	17 กันยายน 2512
สถานที่เกิด	เลขที่ 25 หมู่ 5 ต.บางงอน อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	หมู่บ้านบุรีรมย์ เลขที่ 44 / 34 หมู่ 7 แขวงสามวาตะวันตก เขตคลองสามวา กรุงเทพฯ 10510
สถานที่ทำงาน	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เลขที่ 196 ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ
ตำแหน่ง	นักวิชาการ 6
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2535 สำเร็จการศึกษา การศึกษาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ – เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน ปีการศึกษา 2546 สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการศึกษาวิทยาศาสตร์ (เคมี) จากสถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง