ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

วศ พศ
ผว 5

เอกสารผลงานที่เสนอให้ประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง
นักวิทยาศาสตร์ 8 ว.

โดย
นางสาวอรทัย ลีลาพจนาพร
นักวิทยาศาสตร์ 7 ว

เรื่องที่ 1
การศึกษาทดลองวิเคราะห์ปริมาณไนอะซิน ในตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลัง โดยวิธี ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี (HPLC)

กลุ่มฝึกอบรมเทคนิคทางห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ

พ.ศ. 2547

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

บทคัดย่อ

การศึกษาทดลองวิเคราะห์หาปริมาณไนอะซิน ในตัวอย่าง เครื่องดื่มบำรุงกำลัง โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) เพื่อใช้เป็นบทเรียนฝึกปฏิบัติในวิชา ปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ชั้นสูง และเป็นแนวทางพัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานต่อไป ไนอะซิน หรือวิตามิน บี3 หมายถึง กรดนิโคตินิคและนิโคตินาไมด์ ทั้ง 2 องค์ประกอบนี้มีบทบาททางชีวภาพเท่าเทียมกัน (Biological activity) ในร่างกาย กรดนิโคตินิคจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของนิโคตินาไมด์ ไนอะซินมีความสำคัญต่อร่างกายคือเป็นสารตั้งต้นของโคเอนไซม์ NAD^+ และ $NADP^+$ [5,10,12] จากการทดลองโดยการปรับเปลี่ยน อัตราส่วนของสารละลายตัวชะ (Mobile phase) พบว่า สารละลายตัวชะ ที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์หาปริมาณไนอะซิน คือ เมทานอล : บัฟเฟอร์ อัตราส่วน 30 : 70 ด้วยอัตราการไหลของสารละลายตัวชะ 0.5 มิลลิตร ต่อนาที ได้พีกไนอะซิน ที่เวลาประมาณ 8 – 9 นาที ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลัง 8 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณไนอะซินในเครื่องดื่มบำรุงกำลัง มีค่าระหว่าง 11.3 - 19.5 มิลลิกรัม ต่อ100 มิลลิลิตร และทำการวิเคราะห์ ค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 2, 4, 10 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร n=7 มีค่าระหว่าง 96.9 – 103.2 มีความเที่ยงและความแม่นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ อย่างมีนัยสำคัญ และทำการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์กับผลการวิเคราะห์โดย วิธีจุลชีววิทยา (Microbiological assay)[7] ปรากฏว่าค่าที่วิเคราะห์โดยเครื่องHPLC มีค่าต่ำกว่าค่าที่วิเคราะห์โดย วิธีทางจุลชีววิทยา จากการทดลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นบทเรียนภาคปฏิบัติ ประกอบวิชาปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ชั้นสูงได้ดี ซึ่งนักศึกษาสามารถทำการทดลองเสร็จสิ้นภายในเวลาที่กำหนดไว้ตามตารางสอนประมาณ 6 ชั่วโมง

ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		
สารบัญ		ก
สารบัญตาราง		ค
สารบัญภาพประกอบ		ง
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1 ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง	1
	1.2 วัตถุประสงค์	2
	1.3 ขอบเขตการทดลอง	2
	1.4 ข้อจำกัดของการทดลอง	2
	1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ	2
	1.6 ระยะเวลาของการศึกษาทดลอง	2
บทที่ 2	วารสารปริทัศน์	3
	2.1 ไนอะซิน	3
	2.2 เครื่องดื่มบำรุงกำลัง	4
	2.3 การวิเคราะห์ทดสอบไนอะซินในอาหารและเครื่องดื่ม	4
บทที่ 3	วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ	7
	3.1 ตัวอย่าง	7
	3.2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องแก้ว	7
	3.3 การดำเนินการทดลอง	9
	3.4 การทดลองที่ 1	10
	3.5 การทดลองที่ 2	11
	3.6 การทดลองที่ 3	12
	3.7 การทดลองที่ 4	14
	3.8 การทดลองที่ 5	14
บทที่ 4	ผลการทดลอง	15
	4.1 ผลการทดลองที่ 1	15
	4.2 ผลการทดลองที่ 2	19
	4.3 ผลการทดลองที่ 3	19

เลขหมู่ วพ พิศ
ล05
เลขทะเบียน 13921
วันที่ 25 ส.ค. 49

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

	4.4 ผลการทดลองที่ 4 และการวิเคราะห์ทางสถิติ	21
	4.5 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์	22
บทที่ 5	วิจารณ์ผล	24
	วิจารณ์ผลการทดลอง	24
บทที่ 6	สรุปและข้อเสนอแนะ	25
	6.1 สรุปผลการศึกษาทดลอง	25
	6.2 ข้อเสนอแนะ	25
	6.3 ปัญหาและอุปสรรคของการศึกษาทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง		27
กิตติกรรมประกาศ		29
ภาคผนวก		30

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	รายละเอียดตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์	7
ตารางที่ 2	ปริมาณไนอะซินในสารละลายมาตรฐาน	11
ตารางที่ 3	ปริมาณไนอะซินในสารละลายตัวอย่างเพื่อการทดสอบการคืนกลับ	13
ตารางที่ 4	ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ สารชะ - เมทานอล: บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วนต่างกัน	16
ตารางที่ 5	การแสดงค่าเวลาที่พีกปรากฏและพื้นที่พีก เมื่อฉีดสารละลาย 5ซ้ำ	18
ตารางที่ 6	ปริมาณไนอะซินในตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลัง 8 ตัวอย่าง	19
ตารางที่ 7	ปริมาณไนอะซินที่วิเคราะห์ได้เมื่อเติมสารละลายมาตรฐาน	20
ตารางที่ 8	ปริมาณไนอะซิน ในตัวอย่างหมายเลข WT.531 จำนวน 7 ซ้ำ	21
ตารางที่ 9	การเปรียบเทียบปริมาณไนอะซินที่วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC กับ วิธีทางจุลชีววิทยา	20

สารบัญภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของกรดนิโคตินิค	3
2	โครงสร้างของนิโคตินาไมด์	3
3	แผนผังแสดงองค์ประกอบหลักของระบบ HPLC	6
4	โครมาโทแกรมของสารละลาย ไนอะซินมาตรฐาน	31
5	โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่าง	32
6	กราฟมาตรฐานของไนอะซิน	33
7	แผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณไนอะซิน ที่วิเคราะห์ โดยวิธีจุลชีววิทยา กับโดยใช้ เครื่อง HPLC	33

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) เป็นหัวข้อหนึ่งของรายวิชาเคมีวิเคราะห์ชั้นสูงสำหรับชั้นปีที่ 3 ของหลักสูตร อนุปริญญา เคมีปฏิบัติ ของกรมวิทยาศาสตร์บริการ HPLC เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ชั้นสูงที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปริมาณสารปริมาณน้อยๆ (Trace)ที่อยู่ในอาหารและเครื่องดื่ม ในการจัดการเรียนการสอนเพื่อช่วยผู้เรียนให้เข้าใจในเนื้อหาดียิ่งขึ้น จึงจัดให้มีการฝึกปฏิบัติการ การทดลองที่จัดให้นักศึกษา มีระยะเวลาจำกัด ต้องเป็นไปตามตารางสอน ตัวอย่างที่ใช้ควรเป็น
ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ซึ่งหาได้ง่าย ใช้เวลาเตรียมตัวอย่างไม่นานมากนัก ให้ผลการทดลองที่ชัดเจน จึงได้ทำการศึกษาทดลองนี้เพื่อใช้เป็นบทเรียนภาคปฏิบัติสำหรับนักศึกษา

ในการจัดทำการทดลองเพื่อใช้เป็นแบบฝึกหัดการทดลองสำหรับสอนภาคปฏิบัตินี้ ได้เลือกเครื่องดื่มบำรุงกำลัง เป็นตัวอย่างสำหรับการทดลองเพราะเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มยอดนิยมชนิดหนึ่งที่มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ น้ำซึ่งมี น้ำตาล เกลือแร่ วิตามินและสารปรุงแต่งกลิ่นและสี ผสมกัน ดังนั้นในการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ย่อมง่าย ไม่ต้องใช้สารเคมีอื่นๆ ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และใช้เวลาไม่นานนักซึ่งเหมาะสม ปัจจัยที่นำมาพิจารณาเลือกผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาเป็นตัวอย่างการทดลองคือ

1. การใช้ ตัวอย่างหาง่ายและสารเคมีที่ไม่เป็นอันตราย
2. เวลาที่ใช้ในการทดลองเหมาะสมกับระยะเวลาตามตารางสอน ไม่สั้นเกินไป หรือนานเกินไป สามารถดำเนินการทดลองได้เสร็จสิ้นภายในเวลา ไม่เกิน 6 ชั่วโมง
3. มีความปลอดภัยสำหรับผู้ทำการทดลองเป็นสำคัญ ในกรณีนี้หมายถึงนักศึกษา ผู้ที่มีประสบการณ์น้อย
4. เรื่องที่นำมาศึกษาทดลองเป็นเรื่องที่ทันสมัย น่าสนใจ
5. สามารถนำมาใช้ทำการทดลองครบขั้นตอนทั้งกระบวนการ ไม่บูดเน่า ระหว่างการทดลองอาจารย์ผู้สอนควรที่จะได้ทำการศึกษาและพัฒนาหาความรู้ใหม่ๆรวมถึงการทำทดลองซ้ำหลายๆครั้งเพื่อให้แน่ใจในผลการทดลอง และศึกษาข้อดี ข้อเสียของการทดลองให้แน่ใจก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็นแบบฝึกหัด บทเรียนภาคปฏิบัติ สำหรับนักศึกษาต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การทดลอง

1.2.1.พัฒนาวิธีวิเคราะห์ หาปริมาณไนอะซิน ในตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลัง โดยใช้เครื่อง HPLC เพื่อการเรียนการสอน

1.2.2.ตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี เรื่องความแม่นและความเที่ยง โดยการวิเคราะห์หาร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) และ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD.)

1.2.3.ประเมินความเหมาะสมของวิธีโดยเปรียบเทียบผลวิเคราะห์กับวิธีทางจุลชีววิทยา (Microbiological assay)

1.3 ขอบเขตการทดลอง

ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณ ไนอะซิน ในตัวอย่าง เครื่องดื่มบำรุงกำลัง ที่จำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยเครื่อง HPLC และเปรียบเทียบผลการศึกษากับผลการวิเคราะห์โดยวิธีทางจุลชีววิทยา (Microbiological assay) ซึ่งใช้ในงานบริการจากโครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ

1.4 ข้อจำกัดของการทดลอง

1.4.1 วิตามินเป็นสารประกอบทางชีวเคมี มีความซับซ้อนกว่า สารประกอบเคมีทั่วไปซึ่งทำให้ มีหลายปัจจัย ที่ต้องพิจารณาในการเลือกสภาวะการทดลอง เช่น ชนิดของสารละลายชะ และชนิดของคอลัมน์ ที่ต้องใช้เฉพาะที่มีอยู่เดิมเท่านั้น

1.4.2 การทดลองนี้เป็นการทดลองวิเคราะห์ที่ทำในเวลาที่จำกัด ผลการวิเคราะห์ที่ได้ยังไม่ได้รับการยืนยันถูกต้องตามผลทางสถิติ เป็นการทดลองขั้นต้นสำหรับการเรียนการสอนเท่านั้น

1.5 ประโยชน์ที่จะได้รับ

1.5.1 ได้แนวทางวิธีวิเคราะห์ที่สามารถนำไปประยุกต์เป็นแบบฝึกหัด สำหรับการทดลองในภาคปฏิบัติในวิชาเคมีวิเคราะห์ชั้นสูงของนักศึกษาซึ่งมีเวลาการฝึกปฏิบัติ 3 - 6 ชั่วโมง

1.5.2 สามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปเป็นแนวทางที่จะพัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชนิดที่คล้ายคลึงกันต่อไป

1.6 ระยะเวลาการศึกษาทดลอง

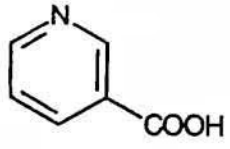
ระหว่าง เดือน ธันวาคม 2545 ถึง พฤศจิกายน 2546

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 ไนอะซิน

ไนอะซิน หรือ วิตามิน บี 3 เป็นวิตามินชนิดหนึ่งในกลุ่มวิตามินบีรวม ซึ่งเป็นวิตามินชนิดที่ละลายในน้ำได้ดี ซึ่งหมายถึงกรดนิโคตินิค ชื่อทางเคมี คือ 3 - pyridine carboxylic acid ($C_6H_5NO_2$) น้ำหนักโมเลกุล 123.11 และนิโคตินาไมด์ ชื่อทางเคมี คือ 3 - pyridine carboxamide ($C_6H_6N_2O$) น้ำหนักโมเลกุล 122.13 [10,12] ลักษณะทางกายภาพ เป็นผงสีขาว ,มีรสเปรี้ยว ละลายได้บ้างในเอทานอล แต่ไม่ละลายในอีเทอร์ ทนต่อแสง ความร้อน นอกจากนี้ยังทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและด่าง

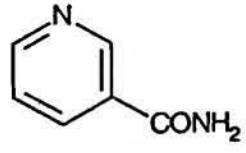
Nicotinic Acid



$C_6H_5NO_2$ 123.1

รูปที่ 1 โครงสร้างของกรดนิโคตินิค

Nicotinamide



$C_6H_6N_2O$ 122.1

รูปที่ 2 โครงสร้างของนิโคตินาไมด์

ปกติ ไนอะซินในร่างกายของเรา กรดนิโคตินิคจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ นิโคนินาไมด์ เป็นสารตั้งต้นของโคเอนไซม์ Nicotinamide adenine dinucleotide(NAD^+) และ Nicotinamide adenine dinucleotide phosohate ($NADP^+$) [5,7] ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตให้เป็นพลังงาน สังเคราะห์กรดไขมัน แต่ในทางเภสัช ถ้ากล่าวถึง ไนอะซินจะหมายถึง กรดนิโคตินิค ซึ่งมีฤทธิ์ทางยาที่ แตกต่างกับ นิโคตินาไมด์ [13,18] ไนอะซินมีบทบาทสำคัญในระบบการหายใจ ระดับเซลล์ ช่วยให้ระบบประสาททำงานเป็นปกติ บำรุงสภาพของผิวหนัง มีความจำเป็นต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของร่างกาย ถ้าร่างกายขาดไนอะซิน จะมีอาการอ่อนเพลีย ซึมเศร้า มีอาการท้องร่วง ระบบประสาทผิดปกติ ความจำเลอะเลือน มีอาการชาตามปลายมือปลายเท้า และจะทำให้เกิดโรค เพลลากรา(Pellagra) [10,11,12,19] อาการที่พบ คือ ระยะเริ่มแรกจะพบว่าปลายลิ้นแดงและเจ็บแสบ ซึ่งอาจมีแผลในปากร่วมด้วย ต่อมาพบว่าผิวหนังบริเวณที่ถูกแดดจะมีสีดำ

เหมือนถูกไฟไหม้และลอก[10,11,12,13,17,19]อาหารที่มีไนอะซินมากได้แก่ตับ หัวใจ ไต เนื้อสัตว์ และถั่วเปลือกแข็ง [11, 13,17]

2.2.เครื่องดื่มบำรุงกำลัง

เครื่องดื่มชนิดหนึ่ง ลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลือง บรรจุขวดสีชา ปิดฝาเกลียว จัดเป็นเครื่องดื่มยอดนิยม ที่มีบทบาทมากในกลุ่มบุคคลผู้บริโภค ผู้มีอาชีพที่ต้องใช้แรงงาน พนักงานขับรถ ผู้ที่ทำงานผลัดกลางคืน ยามรักษาการณ์ บุคคลเหล่านี้มักต้องการสิ่งกระตุ้นให้ร่างกายรู้สึกสดชื่น ทำให้ไม่รู้สึกง่วงหรือเหนื่อย โดยจะระบุรายละเอียดบนฉลากที่ข้างขวดบรรจุว่าประกอบด้วย น้ำตาล ซูโครส คาเฟอีน เกลือแร่และมีวิตามินต่างๆ เป็นส่วนประกอบอยู่จำนวนหนึ่ง จุดนี้เองที่ผู้ผลิตใช้เป็นประเด็นสำคัญในการโฆษณาสรรพคุณว่า เป็นเครื่องดื่มบำรุงกำลัง ซึ่งผู้บริโภคมักเรียกเครื่องดื่มชนิดนี้ว่า "เครื่องดื่มชูกำลัง ,ยาชูกำลัง"

การที่เครื่องดื่มบำรุงกำลังเหล่านี้ เป็นเครื่องดื่มซึ่งนำเอาส่วนประกอบต่างๆ มาละลายน้ำแล้วเติม รสหวาน มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวอย่างทดลองในห้องปฏิบัติการของนักศึกษา ทั้งนี้เพราะในกระบวนการเตรียมตัวไม่ยุ่งยากซับซ้อน และใช้เวลาไม่นานเกินไป

2.3 การวิเคราะห์ทดสอบไนอะซินในอาหารและเครื่องดื่ม

งานด้านวิเคราะห์ทดสอบวิตามินมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว ไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะวิธีทางจุลชีววิทยาและวิธีทางเคมีดังเช่นเคยในอดีต มีการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์หลายแนวทาง หลายวิธี นำไปสู่การใช้ เครื่องมือวิเคราะห์พิเศษ เช่น เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิดโครมาโทกราฟี แก๊สโครมาโทกราฟี และแมส สเปกโตรมิเตอร์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ความแม่นยำในการวิเคราะห์และรวดเร็วยิ่งขึ้น ทำให้เกิดการหลากหลาย ในวิธีวิเคราะห์ ซึ่งยังคงไม่มีคำตอบชี้เฉพาะลงไปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ใดเป็นวิธีที่ดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องจาก ในแต่ละวิธีที่พัฒนามานั้นทำการทดลองภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน Eitenmiller และ คณะ[9]ได้รวบรวมและทำข้อสรุปวิธีวิเคราะห์ไว้ดังนี้

2.3.1 วิธีมาตรฐาน AOAC วิธีที่ 961.14[14] เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนอะซินในยา อาหารและอาหารสัตว์ โดยการวัดสี (Colorimetric method) ตามปฏิกิริยา König (The König reaction) โดยให้ไนอะซินทำปฏิกิรินยากับไซยาโนโบรไมด์ ในสภาวะที่กำหนด วัดสีที่เกิดขึ้นที่ช่วงคลื่น 470 นาโนเมตร

2.3.2วิธีมาตรฐาน AOAC วิธีที่ 975.41 และ 981.16 [14]เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนอะซินในตัวอย่าง กำหนดให้ใช้เครื่องวิเคราะห์ อัตโนมัติ (The technicon auto analyzer II system) โดยให้ไนอะซินทำปฏิกิริยากับไซยาโนโบรไมด์ ในสภาวะที่กำหนด เช่นกัน

2.3.3. วิธีมาตรฐาน AOAC วิธีที่ 968.32[14] เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนอะซินนาไมด์ในตัวยา ของวิตามินรวม โดยการวัดสี (Colorimetric method) ตามปฏิกิริยา König (The König reaction) โดยให้ไนอะซินนาไมด์ ทำปฏิกิรินยากับไซยาโนโบรไมด์ ในสภาวะที่กำหนด วัดสีที่เกิดขึ้นที่ช่วงคลื่น 550 นาโนเมตร

2.3.4. วิธีมาตรฐาน AOAC วิธีที่ 944.13[14] เป็นวิธีการวิเคราะห์ โดยวิธีทางจุลชีววิทยา (Microbiological assay) ที่แนะนำให้ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนอะซิน ในตัวอย่างที่เป็นอาหารทุกชนิด จุลินทรีย์ที่ใช้คือ Lactobacillus plantarum, ATCC 8014

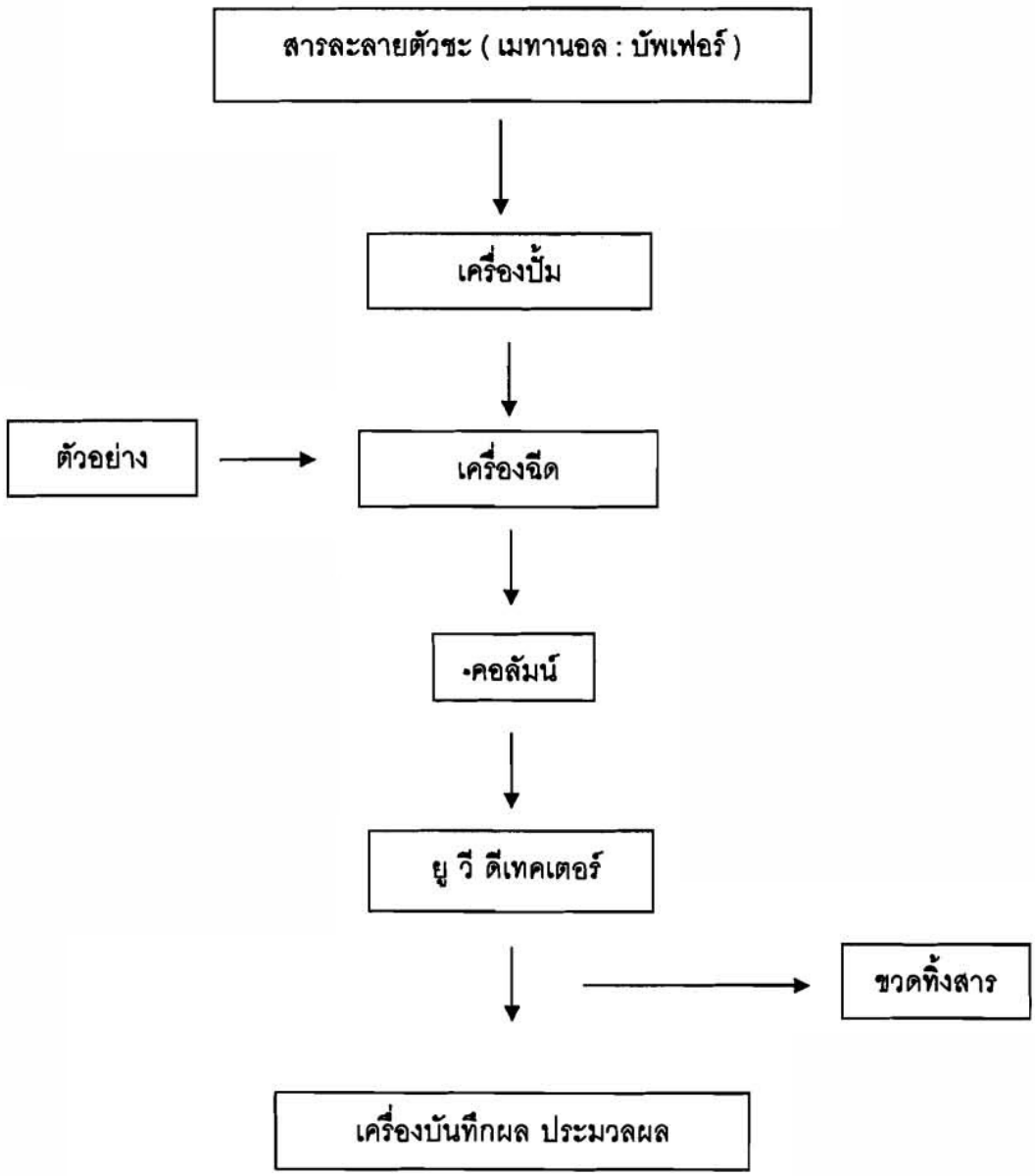
2.3.5. วิธีทางจุลชีววิทยา[7,14] เป็นวิธีที่ใช้ในงานประจำ ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบทั่วไปรวมทั้งห้องปฏิบัติการของโครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพกรมวิทยาศาสตร์บริการ โดยการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ตอบสนองต่อวิตามินที่ตรวจวิเคราะห์ หลักการของวิธีการวิเคราะห์โดยจุลินทรีย์ อาศัยการควบคุมปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ คือ สารอาหาร สภาวะความเป็นกรด – ด่าง อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสม ถ้าในตัวอย่างมีวิตามินที่จะตรวจวิเคราะห์ จุลินทรีย์ก็จะเจริญเติบโตได้ดี สามารถวัดผลการเจริญเติบโตนี้โดยการวัดปริมาณกรดที่เกิดขึ้น การตรวจวิเคราะห์วิธีทางจุลชีววิทยานี้จะต้องใช้เวลาในการดำเนินการ นานอย่างน้อย 5 วัน นับตั้งแต่เวลาที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง การเตรียมเชื้อ การบ่มเชื้อ และการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ การใช้วิธีวิเคราะห์ที่ใช้เวลานานเกินไป ย่อมเป็นข้อเสียเปรียบ ในกรณีงานเร่งด่วน ทำให้ไม่สามารถให้บริการได้ในระยะเวลาจำกัด ซึ่งเป็นเหตุจูงใจที่จะทำการศึกษาทดลองหาวิธีวิเคราะห์ที่ได้ผลรวดเร็วกว่า ซึ่งได้แก่การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้ เครื่อง HPLC

2.3.6. การวิเคราะห์โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิดโครมาโทกราฟี เป็นวิธีการแยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยหลักการดูดซับกลับไปกลับมาของสารระหว่าง เฟส 2 เฟส กล่าวคือทำให้สารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านไประหว่าง Stationary phase ที่เป็นของแข็งหรือของเหลวที่เคลือบอยู่บนของแข็งซึ่งบรรจุในคอลัมน์และ Mobile phase ซึ่งเป็นของเหลว โดยมีความดันจากปั๊มช่วย โดยทฤษฎีสารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ในคอลัมน์แตกต่างกัน (Differential migration) ทำให้สารแต่ละชนิดนั้นออกจากคอลัมน์ในเวลาต่างกัน เมื่อสารแต่ละชนิดออกจากคอลัมน์ แล้วจะผ่านเข้าเครื่องวัดโดยตรง (Detector) ในที่นี้คือ UV detector ผลที่ออกจากเครื่องมือคือ โครมาโทแกรม ของสารละลาย (Chromatogram) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณขององค์ประกอบที่ผ่านออกมาในรูปของพื้นที่พีกกับเวลาที่พีกปรากฏ (Retention time)ที่องค์ประกอบนั้น เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์

จากการศึกษาเอกสาร[7,9,16]พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้เครื่อง HPLC ศึกษาหาปริมาณวิตามินโดยใช้คุณสมบัติการละลายของวิตามิน คุณสมบัติการดูดซับไอออน สูตรโครงสร้างของ

วิตามิน โดยมีปัจจัยหลักที่ต้องนำมาพิจารณาคือ การเลือกคอลัมน์ สารละลายตัวชะ ที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถตรวจสารได้ในเวลาที่เหมาะสม ได้ผลการวิเคราะห์ และสามารถนำไปใช้เป็นแบบฝึกหัดทดลองในชั้นเรียนได้

แผนผังแสดง องค์ประกอบหลักของระบบ ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี



รูปที่ 3 แผนผังแสดงองค์ประกอบหลักของระบบ ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

3.1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาทดลองเป็นตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลัง ที่จำหน่ายตามท้องตลาดในกรุงเทพฯ จำนวน 8 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างละ 2 ขวด ลักษณะตัวอย่าง เป็นของเหลวใส สีเหลือง มีรสหวาน กลิ่นหอม บรรจุขวดแก้วสีชา ปิดสนิท ปิดฉลาก มีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลังที่ใช้วิเคราะห์

ตัวอย่างที่	หมายเลขปฏิบัติการ	ยี่ห้อ	ขนาดบรรจุ มิลลิลิตร	ผู้ผลิต
1	WL.775	M -150	150	บริษัท โอสถสภา จำกัด กรุงเทพฯ
2	WL.776	กระทิงแดง-แอล	150	บริษัท ที.ซี.ฟาร์มาซูติคอลอุตสาหกรรม จำกัด ปราจีนบุรี
3	WL.777	คาราบาวแดง	150	บริษัท คาราบาว ตะวันแดง จำกัด สมุทรปราการ
4	WT.531	. 357 แม็กนั่มพลัส	150	บริษัทโอสถสภา จำกัด กรุงเทพฯ
5	WT.532	ฉลามขาว	150	บริษัทโอสถสภา จำกัด กรุงเทพฯ
6	WT.533	แรงเยอร์	150	บริษัท แชมป์ไทยเครื่องดื่ม จำกัด นครปฐม
7	WT.534	ลูกทุ่ง	150	บริษัท ที.ซี.ฟาร์มาซูติคอลอุตสาหกรรม จำกัด กรุงเทพฯ
8	WT.535	ลิโพ วิตัน ดี	100	บริษัท โอสถสภา จำกัด กรุงเทพฯ

3.2 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.2.1 วัสดุ อุปกรณ์

1) เครื่อง High performance liquid chromatograph (HPLC) ยี่ห้อ Spectra system รุ่น PC 1000 บริษัท Thermo Separation Products ประเทศ สหรัฐอเมริกา

2) คอลัมน์ : Phenomenex Spherosorb C 8 ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน (μm)

ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร ค่าความดัน ขณะใช้งานไม่ควรเกิน3,500 psi. [16]

3) เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม

4) เครื่องกำจัดแก๊ส ด้วยคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic bath)

5) ชุดกรองสารละลาย ตัวชะ สำหรับกรอง สารละลาย ตัวชะ

6) ขวดบรรจุตัวอย่าง ขนาดเล็ก ขนาด 4 มิลลิลิตร (vials)

7) แผ่นกรอง อนุภาคขนาดเล็ก (membrane) ชนิด ไนล่อน 66 ขนาด 0.45 ไมครอน

8) ไมโครซีริงค์ ขนาด 100 ไมโครลิตร

9) เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ขวดปริมาตร Class A ขนาด 10 25 50 และ 100 มิลลิลิตร

ปิเปต วัดปริมาตร Class A ขนาด 1 2 3 4 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.2.2 สารเคมี

1) กรดนิโคตินิคมาตรฐาน ความบริสุทธิ์ 100.2 % (Purity by acidometry : 100.2 %) CAS.No. 59-67-6 RTECS QT 0525000 ผู้ผลิต : บริษัท แคลไบโอเคม จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

2) กรดฟอสฟอริค ความบริสุทธิ์ 88 - 93 % ความถ่วงจำเพาะ 1.75 ผู้ผลิต : BDH Ltd. ประเทศอังกฤษ

3) โซเดียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ($NaH_2PO_4 . H_2O$) ความบริสุทธิ์ 99 % CAS. No. 10049-21-5 ผู้ผลิต : Carlo Elba Reagent. ประเทศอิตาลี

4) เมทานอล ระดับโครมาโทกราฟฟิก (Chromatographic grade) ผู้ผลิต : Fisher Chemicals International Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

5) เอทานอล ชั้นคุณภาพ Laboratory grade

3.2.3 สารละลาย

1) สารละลายกรดนิโคตินิคมาตรฐานเข้มข้น (Stock standard solution) ระดับความเข้มข้น ไนอะซิน 100 ไมโครกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร

ชั่งกรดนิโคตินิคมาตรฐาน 0.0100กรัม ละลายด้วย 25 % เอทานอล จนละลายหมด ถ่ายใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2) สารละลายกรดนิโคตินิคมาตรฐาน (Intermediate standard solution)

ระดับความเข้มข้นไนอะซิน 10 ไมโครกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น ตาม 3.2.3 ข้อ 1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน เก็บใส่ในขวดตัวอย่างขนาดเล็ก

3) สารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) 3.5

สารละลาย โซเดียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ($NaH_2PO_4 . H_2O$) 2.76 กรัม ด้วย น้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) เป็น 3.5 ด้วย กรดฟอสฟอริค ถ่ายสารละลายลงขวดปริมาตร ขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองผ่านแผ่นเมมเบรน ไนล่อน 66 ขนาด 0.45 ไมครอน

4) เมทานอล (Chromatographic grade) กรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรน ไนล่อน 66 ขนาด 0.45 ไมครอน

3.2.4 การเตรียมตัวอย่าง เครื่องดื่มบำรุงกำลัง

1) ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร

2) กรองผ่านแผ่นกรอง อนุภาคขนาดเล็ก (membrane) ชนิด ไนล่อน 66 ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บในขวดเก็บตัวอย่าง ขนาด 4 มิลลิลิตร

3.3 การดำเนินการทดลอง

เริ่มต้น จากการศึกษาเอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งข้อมูลต่างๆ คุณสมบัติของ ไนอะซิน คุณสมบัติของ คอลัมน์ Phenomenex [16] และ สภาวะต่างๆที่เกี่ยวข้องในระบบการทดลอง พบว่ามีแนวทางที่จะเป็นไปได้ ที่จะทำการทดลองวิเคราะห์วิตามินชนิดที่ละลายในน้ำ เช่น ไนอะซิน โดยดำเนินการทดลองวิเคราะห์ปริมาณไนอะซินในตัวอย่างเครื่องดื่มดังนี้

3.3.1 การทดลองที่ 1 ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบที่เกี่ยวกับเครื่อง HPLC เช่นพื้นที่ของพีก อัตราส่วนของสารตัวชะ อัตราเร็วของสารตัวชะ (Flow rate) เวลาที่ให้พีก (Retention time, t_r) นำข้อมูลต่างๆมาพิจารณาจำแนกความเป็นไปได้ที่จะนำสภาวะนั้นๆมาใช้ โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะทำการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณไนอะซินในตัวอย่าง เครื่องดื่มบำรุงกำลัง โดยทำการทดลอง นำข้อมูลต่างๆมาเพื่อพิจารณาจำแนกความเป็นไปได้ที่จะนำสภาวะนั้นๆมาใช้

3.3.2 การทดลองที่ 2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน เพื่อการทดลองวิเคราะห์เชิงปริมาณ หาปริมาณไนอะซินในตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลัง 8 ตัวอย่าง

3.3.3 การทดลองที่ 3 การทดสอบยืนยันวิธีวิเคราะห์ โดยการทำการทดลองหาค่า ร้อยละของการคืนกลับ

3.3.4 การทดลองที่ 4 การคำนวณหาค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD.) และค่าส่วนเบี่ยงเบน-มาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เพื่อประเมินผลการทดลองโดยวิธีทางสถิติ

3.3.5 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณไนอะซินโดยเครื่อง HPLC กับวิธีทาง-จุลชีววิทยา (Microbiological assay)

3.4 การทดลองที่ 1 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ สำหรับการวิเคราะห์ โดยการปรับอัตราส่วน ใช้สารชะ ซึ่งประกอบด้วย เมทานอล และสารละลายบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วนต่างๆกัน และอัตราการไหลของสารชะ ที่ต่างกัน

3.4.1 การเตรียมสารละลาย

1) สารละลายกรดนิโคตินิคมาตรฐาน (Intermediate standard solution) ความเข้มข้นไนอะซิน 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน ตาม 3.2.3 ข้อ 1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร

2) สารละลายกรดนิโคตินิคมาตรฐาน (Working standard solution) ความเข้มข้นไนอะซิน 2 และ 4 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น ตาม ข้อ 3.4.1. 1) ปริมาตร 2 และ 4 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน เก็บใส่ในขวดตัวอย่างขนาดเล็ก

3) สารละลาย ตัวอย่าง ซึ่งเติม สารมาตรฐาน

ปิเปต ตัวอย่างเครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร จากข้อ 3.4.1 ข้อ 2) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน

3.4.2 สภาวะของระบบ (Chromatographic condition) ของการทดลอง คือ

สารละลายชะ : เมทานอล : บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 20 : 80 , 30 : 70, 40 : 60 และ 50 : 50

อัตราการไหล : 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร ต่อนาที

ปริมาตรที่ฉีด : 20 ไมโครลิตร (µl)

3.4.3 วิธีทดลอง

1) ฉีดสารละลายไนอะซินมาตรฐาน ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เข้าระบบบันทึกโครมาโทแกรม

2) ฉีดสารละลายตัวอย่าง บันทึกโครมาโทแกรม

3) ฉีดสารละลาย ตัวอย่าง ซึ่งเติม สารมาตรฐาน

4) เพื่อพิจารณา ลักษณะการแยกของพีก เวลาที่พีกปรากฏ (t_r) พื้นที่พีก(Area) และความดันของคอลัมน์ ที่ปรากฏในโครมาโทแกรม

5) การทดลอง ศึกษาเชิงคุณภาพ เพื่อยืนยันสภาวะของระบบ (System suitability)โดยพิจารณาข้อมูลสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ1) - 3) โดย

6) ฉีดสารละลายมาตรฐาน ไนอะซิน 2 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เข้าสู่ระบบ ซ้ำ 5 ครั้ง บันทึกโครมาโทแกรม

7) คำนวณ ค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของเวลาที่พีกปรากฏ และ พื้นที่ของพีก ของการฉีดสารละลายมาตรฐาน ซ้ำ 5 ครั้ง

3.5 การทดลองที่ 2 เตรียมกราฟมาตรฐาน ไนอะซิน(Calibration curve) และวิเคราะห์เชิงปริมาณ ไนอะซินในตัวอย่าง เครื่องดื่ม 8 ตัวอย่าง

3.5.1 การเตรียมสารละลายกรดนิโคตินิคมาตรฐาน (Working standard solution) ความเข้มข้น 0, 2 , 4 ,6 , 8 และ 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน ตามข้อ 3.4.1. 1) ปริมาตร 0, 2 , 4 ,6 , 8 และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 6ขวด เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน เก็บใส่ในขวดตัวอย่างขนาดเล็ก

ตารางที่ 2 ปริมาณไนอะซิน ในสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่าง	สารละลายมาตรฐาน มิลลิลิตร	ปริมาณไนอะซิน ไมโครกรัม / มิลลิลิตร
1	0	0
2	2	2
3	4	4
4	6	6
5	8	8
6	10	10

3.5.2 สภาวะของระบบ (Chromatographic condition) ที่การทดลองนี้คือ

สารละลายชะ : เมทานอล : บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 30 : 70

อัตราการไหล : 0.5 มิลลิลิตร ต่อนาที

ปริมาตรที่ฉีด : 20 ไมโครลิตร (µl)

3.5.3 วิธีการทดลอง

1) ฉีดสารละลายมาตรฐาน แต่ละความเข้มข้น คือ 0, 2 4 6 8 และ 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เข้าสู่ระบบ

2) บันทึกโครมาโทแกรม เพื่อพิจารณา พื้นที่พีก ที่ปรากฏในโครมาโทแกรม

3) สร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ของสารละลายไนอะซินมาตรฐาน ระหว่าง พื้นที่พีก เป็นแนวตั้ง กับความเข้มข้น เป็นแนวนอน

4) วิเคราะห์ปริมาณไนอะซิน ในตัวอย่าง เครื่องดื่มบำรุงกำลัง 8 ตัวอย่าง โดยฉีดสาร ละลาย ตัวอย่าง เข้าระบบ บันทึกโครมาโทแกรม เปรียบเทียบพื้นที่พีกของสารละลายตัวอย่าง กับ พื้นที่พีกของสารละลายมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณ ไนอะซิน จาก กราฟมาตรฐาน โดยวิธี external standard

5) การคำนวณหาปริมาณไนอะซินในตัวอย่าง ดังนี้

ตัวอย่าง เครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น ทำเป็นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ฉีดเข้าระบบ ได้โครมาโทแกรมแสดงพื้นที่พีก ขององค์ประกอบ และปริมาณไนอะซิน ในสารละลาย เมื่อเทียบกับ กราฟมาตรฐาน

ปริมาณไนอะซินในตัวอย่าง = Conc. X 25 x100 /1000 มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร

= Conc. X 2.5 มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร

Conc. = ค่าปริมาณไนอะซิน หน่วย ส่วนในล้านส่วน ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐาน

3.6 การทดลองที่ 3 การทดลองเพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีวิคราะห์ โดยการทดลองหา ค่าร้อยละของการคืนกลับ โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 2 , 4 และ 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างเครื่องดื่ม หมายเลข WT.531 ทำการทดลอง 7 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น ซึ่งเป็นการทดสอบความแม่น และความเที่ยงของการ วิเคราะห์ดังนี้

3.6.1 วิเคราะห์ปริมาณไนอะซิน ในตัวอย่างหมายเลข WT.531 คำนวณหาปริมาณ ไนอะซิน จาก กราฟมาตรฐาน โดยวิธี external standard เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ที่ 4 ระดับความเข้มข้น ทำการวิเคราะห์ 7 ซ้ำ ดังนี้

1) เตรียมสารละลายชุดที่ 1 ปิเปตตัวอย่างเครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร ทั้งหมด 7 ขวด กรองผ่านแผ่นเมมเบรน

2) ชุดที่ 2 เติมสารละลายมาตรฐาน 2 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร โดย ปิเปต ตัวอย่างเครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด เติมสารละลาย ไนอะซิน 50 ไมโครกรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นเมมเบรนทำ 7 ซ้ำ

3) ชุดที่ 3 เติมสารละลายมาตรฐาน 4 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร โดย ปิเปต ตัวอย่างเครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด เติมสารละลายไนอะซิน 100 ไมโครกรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร ทั้ง 7 ขวด คิดเป็นปริมาณไนอะซิน ที่เติมในสารละลายตัวอย่าง เท่ากับ 4 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นเมมเบรน

4) ชุดที่ 4 เติมสารละลายมาตรฐาน 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ปิเปต ตัวอย่างเครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตรชุดที่ 4จำนวน 7 ขวด เติมสารละลายไนอะซิน 250 ไมโครกรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร ทั้ง 7 ขวด คิดเป็นปริมาณไนอะซิน ที่เติมในสารละลายตัวอย่าง เท่ากับ 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นเมมเบรน

5) ฉีดสารละลายแต่ละชุด เข้าระบบ บันทึกโครมาโทแกรมคำนวณหาปริมาณ ไนอะซิน จาก กราฟมาตรฐาน โดยวิธี external standard

ตารางที่ 3 ปริมาณไนอะซินที่เติมในสารละลายตัวอย่าง เพื่อทดสอบการคืนกลับ

ตัวอย่างชุดที่	ปริมาณไนอะซินที่เติม (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)
1	0
2	2
3	4
4	10

6) การคำนวณ

ค่า ร้อยละของการคืนกลับ ในสารละลายตัวอย่าง = $[(C_{SR} - C_S) / C_R] \times 100$

C_{SR} คือ ปริมาณไนอะซินในตัวอย่างที่เติม ไนอะซินมาตรฐาน

C_S คือ ปริมาณไนอะซินในตัวอย่าง

C_R คือ ปริมาณไนอะซินมาตรฐาน ที่เติมในตัวอย่าง ในที่นี้ เท่ากับ 2, 4 และ 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

3.7 **การทดลองที่** 4 คำนวณค่ามางสถิติ หาค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD.) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) จากผลทดลองที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณไนอะซิน ของตัวอย่างหมายเลข WT.531 จำนวน 7 ซ้ำ เพื่อทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ เป็นการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อประเมินผลการทดลองที่3 โดยใช้ Horwitz equation[1,7,8,15]

3.8 **การทดลองที่** 5 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีทางจุลชีววิทยา

โดยส่งตัวอย่าง ทั้ง 8 ตัวอย่างนี้ ให้โครงการชีวภาพ วิเคราะห์ปริมาณไนอะซิน และนำผลการวิเคราะห์ มาเปรียบเทียบกัน โดยการใช้ Paired t – test ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1. ผลการทดลองที่ 1 จากทดลองฉีดสารละลายไนอะซินมาตรฐาน เข้าระบบโดยปรับอัตรส่วนของสารละลายชะ และอัตราการไหล พบว่า มีความเป็นไปได้ที่ จะนำการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณ ไนอะซิน โดยเครื่องHPLC โดยมีสภาวะของระบบที่เลือกเป็น ดังนี้

คอลัมน์ : Phenomenex Spherosorb C 8

สารละลายชะ : เมทานอล : บัพเฟอร์ ในอัตราส่วน 30 : 70

ดีเทคเตอร์ : U V detector ที่ความยาวคลื่น(λ) 254 นาโนเมตร

อัตราการไหล : 0.5 มิลลิลิตร / นาที

ปริมาตรสารที่ฉีด : 20 µl

เวลาที่พีกปรากฏ (retention time , t_r)พีกของไนอะซิน จะออกมา ประมาณ 9 นาที

จากการฉีดสารมาตรฐาน 2 ppm. ซ้ำ 5 ครั้ง ได้ข้อมูลดังนี้

ค่าเฉลี่ยของเวลาที่พีกปรากฏ คือ 9.0 นาที

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของเวลาที่พีกปรากฏ คือ 0.055

ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของเวลาที่พีกปรากฏ คือ 0.61

ค่าเฉลี่ยของพื้นที่พีก คือ 119936

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของพื้นที่พีก คือ 424.59

ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของพื้นที่พีก คือ 0.35

จากการพิจารณาค่าส่วนเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ ของค่าเวลาที่พีกปรากฏและพื้นที่ของพีก จะเห็นว่า น้อยกว่า 2 นั่นคือ สภาวะของการทดลองนี้ มีความเหมาะสมกับการวิเคราะห์ ไนอะซิน อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ตามมาตรฐานของ USP [1,2,18]

ตารางที่ 4 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการใช้ตัวชะ เมทานอล :บัฟเฟอร์ ในอัตราส่วนต่างกัน

รายการ	อัตราส่วน เมทานอล : บัฟเฟอร์	อัตราการไหล มล. / นาที	ผลการทดลอง
ไนอะซิน (Std.) 4 ppm.	50 : 50	1.0	ปรากฏ พีกไนอะซิน ที่เวลา 3.018 นาที ความดันคอลัมน์สูง เกินกว่า 4,300 psi ซึ่งสูงเกินกว่าค่าที่แนะนำไว้[16] เครื่องหยุดทำงาน ชั่วคราว จึงใช้การไม่ได้
ไนอะซิน 4 ppm.	40 : 60	1.0	ปรากฏ พีกไนอะซิน ที่เวลา 3.188 นาที ความดันคอลัมน์สูง เกินกว่า 3,730 psi ซึ่งสูงเกินกว่าค่าที่แนะนำไว้[16] จึงใช้การไม่ได้
ไนอะซิน 4 ppm.	30 : 70	1.0	ปรากฏ พีกไนอะซิน ที่เวลา 3.462 นาที ความดันคอลัมน์สูง เกินกว่า 3,500 psi ซึ่งสูงเกินกว่าค่าที่แนะนำไว้[16] ใช้การไม่ได้
ไนอะซิน 4 ppm.	30 : 70	0.5	ปรากฏ พีกไนอะซิน ที่เวลา 8.53 นาที ความดันคอลัมน์ต่ำกว่า 2,000 psi ความดันอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด เวลาที่พีกปรากฏพอเหมาะ ไม่เร็วหรือช้าเกินไป ผลเป็นที่พอใจ
ไนอะซิน 4 ppm.	20 : 70	1.0	ปรากฏ พีกไนอะซิน ที่เวลา 2.633 และ 2.901 นาที การแยกไม่ชัดเจน ความดันคอลัมน์ต่ำกว่า 3,450 psi ผลยังไม่เป็นที่น่าพอใจ

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รายการ	อัตราส่วน เมทานอล : บัฟเฟอร์	อัตราการไหล มล. / นาที	ผลการทดลอง
ไนอะซิน (Std.) 4 ppm. + S	30 : 70	1.0	ปรากฏ พีกไนอะซิน ที่เวลา 3.53 นาที ความดันคอลัมน์สูง เกินกว่า 3,550 psi ซึ่งสูงเกินกว่าค่าที่แนะนำไว้[16] การแยกของพีกไม่ชัดเจน ใช้การไม่ได้
ไนอะซิน (Std.) 4 ppm. + S	30 : 70	0.5	ปรากฏ พีกไนอะซิน ที่เวลา 8.534 นาที ความดันคอลัมน์ต่ำกว่า 2,000 psi การแยกของพีกชัดเจน เป็นที่พอใจ
ตัวอย่าง (S)	50 : 50	1.0	ปรากฏ พีกไนอะซิน ที่เวลา 3.022 นาที ความดันคอลัมน์สูง เกินกว่า 4,250 psi ซึ่งสูงเกินกว่าค่าที่แนะนำไว้[17] เครื่องหยุดทำงาน ชั่วคราว ใช้การไม่ได้
ตัวอย่าง (S)	30 : 70	0.5	ปรากฏ พีกไนอะซิน ที่เวลา 8.53 นาที ความดันคอลัมน์ต่ำกว่า 2,000 psi การแยกของพีกชัดเจน เป็นที่พอใจ

หมายเหตุ :

1) ค่าความดันของคอลัมน์ ปรากฏ เป็นตัวเลข อ่านได้จากหน้าปัทม์ ของเครื่อง HPLC ขณะที่เครื่องทำงาน

2) จากเอกสารกำกับ คู่มือการใช้คอลัมน์ กำหนดค่าความดันของคอลัมน์ขณะใช้งาน ไม่ควรเกิน 3,500. psi [16]

ตารางที่ 5 การแสดงค่า เวลาที่พีกไนอะซินปรากฏ และพื้นที่ของพีกเมื่อฉีดไนอะซิน 2 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ซ้ำ 5 ครั้ง

ครั้งที่	เวลา (นาที)	พื้นที่ของพีก
1	9.08	119828
2	8.94	120203
3	8.97	119256
4	8.99	120338
5	9.02	120055
ค่าเฉลี่ย	9.00	119936
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.055	424.59
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	0.61	0.35

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของเวลาที่พีกปรากฏ น้อยกว่า 1

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของพื้นที่พีก น้อยกว่า 2.0

แสดงว่า ระบบของการทดลองนี้เป็นที่ยอมรับได้ (System suitability)[1,2,8]

4.2 **ผลการทดลองที่** 2 จากการทดลองเตรียมกราฟมาตรฐาน ของไนอะซิน ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 – 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ได้ค่า Correlation 0.999 แสดงว่าระหว่าง ค่าความเข้มข้นไนอะซิน และค่าพื้นที่ของพีกมีความสัมพันธ์กัน และ ผลการวิเคราะห์ ปริมาณไนอะซินในตัวอย่าง เครื่องดื่มบำรุงกำลัง 8 ตัวอย่าง มีค่าระหว่าง 11.3 – 19.5 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ปริมาณค่าเฉลี่ยเป็น 14.6 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร หรือ 20.6 มิลลิกรัม ต่อ ขวด

ตารางที่ 6 ปริมาณไนอะซินในตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลัง 8 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	หมายเลขปฏิบัติการ	ปริมาณ ไนอะซิน	
		มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร	มิลลิกรัม ต่อ ขวด
1	WL.775	14.6	21.9
2	WL.776	15.2	22.8
3	WL.777	15.2	22.8
4	WT.531	11.3	17.0
5	WT.532	13.4	20.1
6	WT.533	12.7	19.1
7	WT.534	14.6	21.9
8	WT.535	19.5	19.5

หมายเหตุ ตัวอย่างที่ 1 – 7 ขนาดบรรจุ 150 มิลลิลิตร

ตัวอย่างที่ 8 ขนาดบรรจุ 100 มิลลิลิตร

4.3 **ผลการทดลองที่** 3 การทดลองหาค่าการคืนกลับ จากการทดลองการเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่างเครื่องดื่ม หมายเลข WT.531 จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 2 , 4 และ 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ทำการทดลอง 7 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น

คำนวณหาค่าร้อยละของการคืนกลับ มีค่าระหว่าง 96.9 – 103.2 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้[1,8,15]

(% Recovery = 96.9 - 103.2 , N = 7)

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณไนอะซินที่วิเคราะห์ได้ (ไมโครกรัม /มิลลิลิตร) ในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งเติมสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับ ความเข้มข้น คือ 2,4,10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร. จำนวน 7 ซ้ำ (N = 7)

หน่วย : ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

ปริมาณไนอะซินที่เติม	0 ppm.	2 ppm.	4 ppm.	10 ppm.
ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ครั้งที่ 1	4.445	6.627	8.520	12.924
ครั้งที่ 2	4.543	7.206	8.456	14.244
ครั้งที่ 3	4.637	6.539	8.451	12.585
ครั้งที่ 4	4.624	6.588	8.202	14.913
ครั้งที่ 5	4.461	6.531	8.437	14.744
ครั้งที่ 6	4.424	6.182	8.301	14.321
ครั้งที่ 7	4.55	6.458	8.449	16.694
ค่าเฉลี่ย	4.526	6.590	8.404	14.346
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0856	0.3084	0.111	1.362
ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)	1.8	4.679	1.321	9.494
ร้อยละของการคืนกลับ		103.2	96.9	98.2

คำนวณค่า ร้อยละของการคืนกลับ ในสารละลายตัวอย่าง = $[(C_{SR} - C_S) / C_R] \times 100$

C_{SR} คือ ปริมาณไนอะซินที่วิเคราะห์ได้ ใน ตัวอย่างที่เติมไนอะซินมาตรฐาน

C_S คือ ปริมาณไนอะซินในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน = 4.526

C_R คือ ปริมาณไนอะซินมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

ในที่นี้ เท่ากับ 2 4 และ 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

ร้อยละของการคืนกลับ$_2$ = (6.59 – 4.526) / 2.00 x 100 = 103.2 %

ร้อยละของการคืนกลับ$_4$ = (8.404 – 4.526) / 4.00 x 100 = 96.9 %

ร้อยละของการคืนกลับ$_{10}$ = (14.346 – 4.526) / 10.00 x 100 = 98.2 %

สรุปได้ว่าการทดลองนี้มีความแม่น (Accuracy) ซึ่งครอบคลุมค่าความเข้มข้น 2 - 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้[1,2,6]

4.4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อประเมินผลการทดลอง

4.4.1 จากการฉีดสารไนอะซินมาตรฐาน 2 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร จำนวน 5 ซ้ำ คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ของพื้นที่พีกและเวลาที่พีกปรากฏ ได้น้อยกว่า 2.0 ดังแสดงในตารางที่ 3 แสดงว่าระบบของการทดลองนี้เป็นที่ยอมรับได้ (System suitability)[1,2,19]

4.4.2 การทดลองหาค่าการคืนกลับ คำนวณหาค่าร้อยละของการคืนกลับ มีค่าระหว่าง 96.9 – 103.2 (% Recovery = 96.9 - 103.2 , N = 7) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5 แสดงว่า การทดลองนี้มีความแม่น ครอบคลุมความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 – 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

4.4.3 จากผลการวิเคราะห์ปริมาณไนอะซิน ในตัวอย่างหมายเลข WT.531 ซึ่งทำการวิเคราะห์จำนวน 7 ซ้ำ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน นำข้อมูลมาประเมินผลทางสถิติเพื่อยืนยันความเที่ยง(Precision) ของการทดลอง โดยใช้ Horwitz equation คำนวณค่า เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการทดลอง (% RSD_s) น้อยกว่า ค่าจากการคำนวณจากสูตร (%RSD_r)[1,2,8,15]

ตารางที่ 8 ปริมาณไนอะซินในตัวอย่างหมายเลข WT.531 จำนวน 7 ซ้ำ (n = 7)

หน่วย : ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	ครั้งที่ 7
ไนอะซิน (µg / ml)	4.445	4.543	4.637	4.624	4.461	4.424	4.550
ค่าเฉลี่ย				4.526			
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน				0.086			
ค่า เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSDs)				1.889			

ประเมินผลการวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติ เพื่อยืนยันความเที่ยงของการทดลอง

จาก Horwitz equation[1,2,9,16] กำหนดค่า % RSD_r $= 2\,C^{-0.1505}$

C = concentration ratio (4.53 ppm.) $= 4.53 \times 10^{-6}$

% RSDr จากการคำนวณ $= 2 \times (4.53 \times 10^{-6})^{(-0.1505)} = 8.15$

ค่า เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการทดลอง = % RSDs

$= (Sd./X) * 100$

% RSDs $= (0.086 / 4.526) \times 100 = 1.889$

% RSDs < %RSDr $\longrightarrow$ 1.889 < 8.15

จากการประเมินผลการทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติ แสดงว่า การทดลองนี้มีความเที่ยง (Precision) เป็นที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ ที่ประเมินโดยใช้ Horwitz equation

4.5 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โดย เครื่อง HPLC กับ ผลการวิเคราะห์ โดยวิธีทางจุลินทรีย์ จากการส่งตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลัง ชุดเดียวกัน ให้โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ พบว่า ปริมาณไนอะซินที่วิเคราะห์ โดยเครื่อง HPLC มีค่าต่ำกว่า ผลการวิเคราะห์ โดยวิธี ทางจุลินทรีย์

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณไนอะซินที่วิเคราะห์โดยวิธีจุลชีววิทยา กับ เครื่อง HPLC

หมายเลข ปฏิบัติการ	ปริมาณ ไนอะซิน (ไมโครกรัม / 100 มิลลิลิตร)		
	โดยวิธีจุลชีววิทยา*	โดยเครื่องHPLC	ผลต่าง (d)
WL.775	20	14.6	5.4
WL.776	18	15.2	2.8
WL.777	19.8	15.2	4.6
WT.531	13.4	11.3	2.1
WT.532	13.9	13.4	0.5
WT.533	13.4	12.7	0.7
WT.534	16.0	14.6	1.4
WT.535	21.0	19.5	1.5
ค่าเฉลี่ย	16.9	14.6	2.375
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลต่าง			1.79

ที่มา : โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ประเมินผลการวิเคราะห์โดยการใช้ Paired t – test กำหนดให้

H_0 : ค่าเฉลี่ย ของปริมาณที่วิเคราะห์โดย HPLC และค่าเฉลี่ย ของปริมาณที่วิเคราะห์โดย วิธีทางจุลชีววิทยาไม่แตกต่างกัน

H_1: ค่าเฉลี่ย ของปริมาณที่วิเคราะห์จากทั้ง 2 วิธีแตกต่างกัน

จากสูตร $t = \frac{\bar{d} * \sqrt{n}}{Sd}$ = t exp. = 2.375 X 0.7285 / 1.79 = 3.76

t crit จากตาราง ที่ ความเชื่อมั่น 95 % = 2.14 (ค่า degree of freedom = 14)

ค่า t จากการทดลอง (t exp.) มากกว่า ค่า t crit ที่เปิดจากตาราง ปฏิเสธ H_0

แสดงว่า ปริมาณที่วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC ไม่เท่ากับ ปริมาณที่วิเคราะห์โดยวิธีจุลชีววิทยา มีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

บทที่ 5
วิจารณ์ผล

วิจารณผลการทดลอง

5.1 การศึกษาทดลองนี้ ได้บรรลุวัตถุประสงค์ คือได้การทดลองที่สามารถนำไปใช้เป็น บทเรียนแบบฝึกหัดทดลองเรื่องการวิเคราะห์วิตามินชนิดที่ละลายน้ำ ด้วยเครื่อง HPLC

5.2 ถ้านำการวิเคราะห์ปริมาณไนอะซิน ในตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลังเป็นบทเรียนแบบฝึกหัดทดลอง คาดว่านักศึกษาสามารถทำการทดลองได้สำเร็จ ตามเวลาปฏิบัติงาน ถ้านักศึกษาได้เตรียมจัดทำแผนผังเวลาซึ่งจะเป็นข้อดีอย่างยิ่ง ตั้งแต่เริ่ม เตรียมตัวอย่าง เตรียมเครื่องมือ จนครบกระบวนการทดลอง ซึ่งคาดว่านักศึกษาจะใช้เวลา ในการทำการทดลอง ไม่ถึง 6 ชั่วโมง ดังนี้

5.2.1 เตรียมสารละลายชะ และกรองสารละลาย ใช้เวลา 10 นาที

5.2.2 เปิดเครื่อง HPLC และเตรียมเครื่อง ให้อยู่ในสภาวะนิ่งในสภาพ พร้อมใช้งาน ประมาณ 30 - 45 นาที

5.2.3 ในระหว่างที่รอให้เครื่องพร้อมใช้งาน ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่าง

5.2.4 ทดสอบสภาวะเครื่องโดยการฉีด สารละลายมาตรฐาน 20 – 30 นาที

5.2.5 จากการทดลองพบว่า พีกไนอะซิน จะปรากฏ ที่เวลา 8- 9 นาที ดังนั้น ถ้านักศึกษาเตรียมการพร้อม สามารถจะฉีด สารละลายเข้าสู่ระบบได้ 5 เข็มในเวลา 1 ชั่วโมง

5.2.6 เตรียมกราฟมาตรฐาน ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ในเวลา 60 นาที

5.3 วิตามินเป็นสารประกอบทางชีวเคมีจะมีความซับซ้อนกว่าสารประกอบเคมีทั่วไป จึงไม่อาจสรุปได้ว่า วิธีวิเคราะห์วิธีใดเหมาะสมที่สุด การเลือกวิธีวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการได้แก่ลักษณะตัวอย่าง ปริมาณวิตามินในตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง เป็นต้น

บทที่ 6
สรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการศึกษาทดลอง

6.1.1 การศึกษาทดลองวิเคราะห์ปริมาณไนอะซิน โดยใช้เครื่อง HPLC จากการวิเคราะห์ ทดลองได้โครมาโทแกรม ที่แยกจากกันชัดเจน ได้พีกไนอะซิน ที่เวลาประมาณ 8 – 9 นาที การศึกษาทดลองนี้ได้ศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีวิเคราะห์ ทดลอง พบว่า สารละลายตัวชะ ที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์หาปริมาณไนอะซิน คือ เมทานอล : บัฟเฟอร์ ใน อัตราส่วน 30 : 70 ด้วยอัตราการไหลของสารละลายตัวชะ 0.5 มิลลิตร ต่อนาที และ ทำการวิเคราะห์ซ้ำเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีวิเคราะห์ การยืนยันวิธีวิเคราะห์ โดยการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของวิธี วิเคราะห์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ค่าเฉลี่ยของปริมาณที่วิเคราะห์ในตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลัง คือ 16.9 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร หรือ 20.6 มิลลิกรัม ต่อขวด

6.1.2. การศึกษาทดลองนี้ ได้บรรลุวัตถุประสงค์ คือได้แนวทางที่จะนำไปสู่บทเรียนแบบฝึกหัดทดลองเรื่องการวิเคราะห์วิตามินชนิดที่ละลายน้ำ ด้วยเครื่อง HPLC ในหัวเรื่องการวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนอะซิน ในผลิตภัณฑ์ เครื่องดื่มบำรุงกำลัง

6.1.3 ได้ทำการทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์โดยการทำการทดลองและประเมินผลโดยวิธีทางสถิติแล้ว ได้ค่าร้อยละของการคืนกลับ 96.9 – 103.2 แสดงว่า การทดลองมีความแม่นเป็นที่ยอมรับได้ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการทดลอง (% RSDs)น้อยกว่าค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการคำนวณ (% RSDr) ตาม Horwitz equation แสดงว่า การทดลองนี้มีความเที่ยงเป็นที่ยอมรับได้

6.1.4 การเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นตัวอย่างเป็นข้อดีตรงตามวัตถุประสงค์ในเบื้องต้น คือ เป็นตัวอย่างที่หาง่ายเป็นที่รู้จัก การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน ไม่เป็นอันตราย

6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ทดลองนี้ ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีใดๆในการเตรียมตัวอย่าง และในการทดลอง สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ องค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็นน้ำกลั่น สารละลายชะ ที่ใช้ คือ เมทานอล และบัฟเฟอร์ ในอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตร ต่อ นาที หรือ 30 มิลลิลิตร ต่อชั่วโมง เมื่อนำมาคำนวณปริมาณสารเคมีที่ใช้ ตลอดเวลาการทดลอง 1 วัน เราใช้เมทานอล ไม่เกิน 100 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นการใช้สารเคมีในการทดลองที่ไม่สิ้นเปลืองมากนัก

6.2.2 การทดลองนี้ที่ยังไม่สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานแทนวิธีทางจุลชีววิทยาได้ จำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม แต่อาจจะนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ในงานเร่งด่วนได้

ในลักษณะเป็น Screening test method ทั้งนี้เพราะได้ทำการทดสอบยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ แล้ว

6.2.3 จำนวนตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์จำนวนเพียง 8 ตัวอย่าง จัดว่ายังน้อยเกินไป ควรจะได้ทำการทดลองวิเคราะห์ตัวอย่างเพิ่มเติมจำนวนมากกว่านี้ ในกรณีที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติม เครื่องดื่มบรรจุขวดเป็นตัวอย่างที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการศึกษาทดลองเพิ่มเติมทั้งนี้เพราะเป็นผลิตภัณฑ์ที่หาง่าย มีจำหน่ายหลากหลายยี่ห้อ

6.2.4 ได้แนวทางวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนอะซินโดยใช้เครื่องHPLC ซึ่งประหยัดเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ สามารถทราบผลการวิเคราะห์ทันที และสามารถนำไปพัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินอื่นๆ ได้ต่อไป เพื่อใช้แทนวิธีวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ เมื่อเครื่องอยู่ในสภาวะนิ่ง พร้อมใช้งาน วิธีนี้จะช่วยประหยัดเวลา ในการวิเคราะห์ ลดระยะเวลาในการดำเนินการไม่ต่ำกว่า 80% หรือ ลดลงอย่างน้อย 4 วัน เพราะไม่ต้องเสียเวลาในการกระบวนการ เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ รอเวลาในการให้จุลินทรีย์เจริญเติบโต ในกระบวนการของ ทางจุลชีววิทยา ทั้งนี้จักต้องทำการทดลองยืนยันความถูกต้องตามหลักวิธีอีกระยะหนึ่ง

6.2.5. การศึกษาทดลองนี้ใช้วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆที่มีอยู่เดิม ไม่ได้จัดหามาใหม่ เป็นการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า

6.3 ปัญหาและอุปสรรคของการศึกษาทดลอง

6.3.1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทดลอง มีลักษณะเป็นน้ำ เป็นของเหลว ส่วนประกอบหลักของตัวอย่าง เป็นน้ำตาล ปริมาณสารอาหารต่างๆ ในตัวอย่างจะมีอายุการเก็บ อาจเกิดการบูดเน่าเสียและหมดอายุได้ เมื่อเปิดขวดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ต้องทำการวิเคราะห์โดยเร็ว ซึ่งบางครั้งได้เตรียมงานไว้แล้ว แต่ไม่อาจทำการวิเคราะห์ได้

การแก้ไข

1. วางแผนการดำเนินการ เตรียมงานให้พร้อมก่อนการเปิดตัวอย่างวิเคราะห์
2. ปิดขวดตัวอย่างให้แน่นสนิททุกครั้ง และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในตู้เย็น

6.3.2. เครื่องหยุดขณะทำงาน สาเหตุเพราะ ความดันของคอลัมน์สูงเกินกว่าที่คอลัมน์จะรับได้

การแก้ไข

1. ลดอัตราการไหลของสารละลาย ชะ จาก 1 มิลลิลิตร / นาที เหลือ 0.5 มิลลิลิตร / นาที

6.3.3. การแยกของพีกไม่ชัดเจน สาเหตุเพราะใช้สารชะไม่เหมาะสม

การแก้ไข

1. ปรับอัตราส่วนของสารชะ ทำการทดลองใหม่

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิทยาศาสตร์บริการ, กองการศึกษาเคมีปฏิบัติ . **เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตร สถิติสำหรับงานวิเคราะห์ทดสอบและวิจัย**. 2545, มกราคม, 7-18 . กรุงเทพมหานคร : กรมฯ, 2545.
2. กรมวิทยาศาสตร์บริการ, สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ . **เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตร การใช้ HPLC ในงานวิเคราะห์ทดสอบ**. 2546. เมษายน, 22 - 25 . กรุงเทพมหานคร : กรมฯ, 2546.
3. **เครื่องดื่มบำรุงกำลัง**. 2546. [ออนไลน์.] เข้าถึงได้จาก: http://www.user.school.net.th/~hasannap / lipovitan.html . 23/1/2546
4. **เครื่องดื่มผสมคาเฟอีน**. 2546. [ออนไลน์.] เข้าถึงได้จาก: http://www.bangkokhealth.com/sitesearch_detail.asp ?number = 9268. 23/1/2546
5. มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ. **ชีวเคมี** กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.2542. 131,351.
6. สมทรง เลขะกุล. บรรณาธิการ. **ชีวเคมีของวิตามิน**. กรุงเทพฯ : ศุภวณิชการพิมพ์, 2543. 164 – 173.
7. The Association of Vitamin Chemists . **Methods of vitamin assay.** 4 th. ed. New York: Wiley, 1985. p. 1 - 14, 78 - 84, 385 - 397
8. Crosby, Neil T.,et al. **Quality in the anlylitical chemistry laboratory.** New York.: Wiley, 1995. p. 91 – 99.
9. Eitenmiller, R. R., and Landen, W.O,Jr., **Vitamin analysis for the health and food sciences.** Boca Raton : CRC Press. 1999. p. 339 -367.
10. Kutsky, Roman J. **Handbook of vitamin, minerals and hormones.** 2nd New York : Van Nostrand Reinhold Company , 1981. p. 278 – 285.
11. Machlin, Lawrence J.,ed. **Handbook of vitamins.** 2nd. ed., New York : Marcel Dekker,Inc . 1991. p. 311 – 336.
12. Niacin (Nicotinic Acid). Available : http : // www. gettingwell. com/ drug_info / nmdrugprofiles/ nutsupdrugs/ nia_0184. 20 Aug.2004

13. **Nicotinic Acid.** Available : http : // www. purchon. com/ biology/ nicotinic. htm. 19 Feb.2003

14. **Official methods of analysis of AOAC international.** 17 th ed. Edited by William, Horwitz., Gaithersburg, Md : AOAC international, 2000. p.11-16.

15. ———— 17 th ed. Edited by William, Horwitz. Appendix E. Maryland: AOAC international, 2002. p.1 – 6.

16. Phenomenex. **Phenomenex for separation sciences.** 01/ 02 . U.S.A.[n.d.]

17. **Roche vitamins : niacin in human nutrition.** 2002. Available : http : // www. roche – vitamins.com. 22 Nov. 2002.

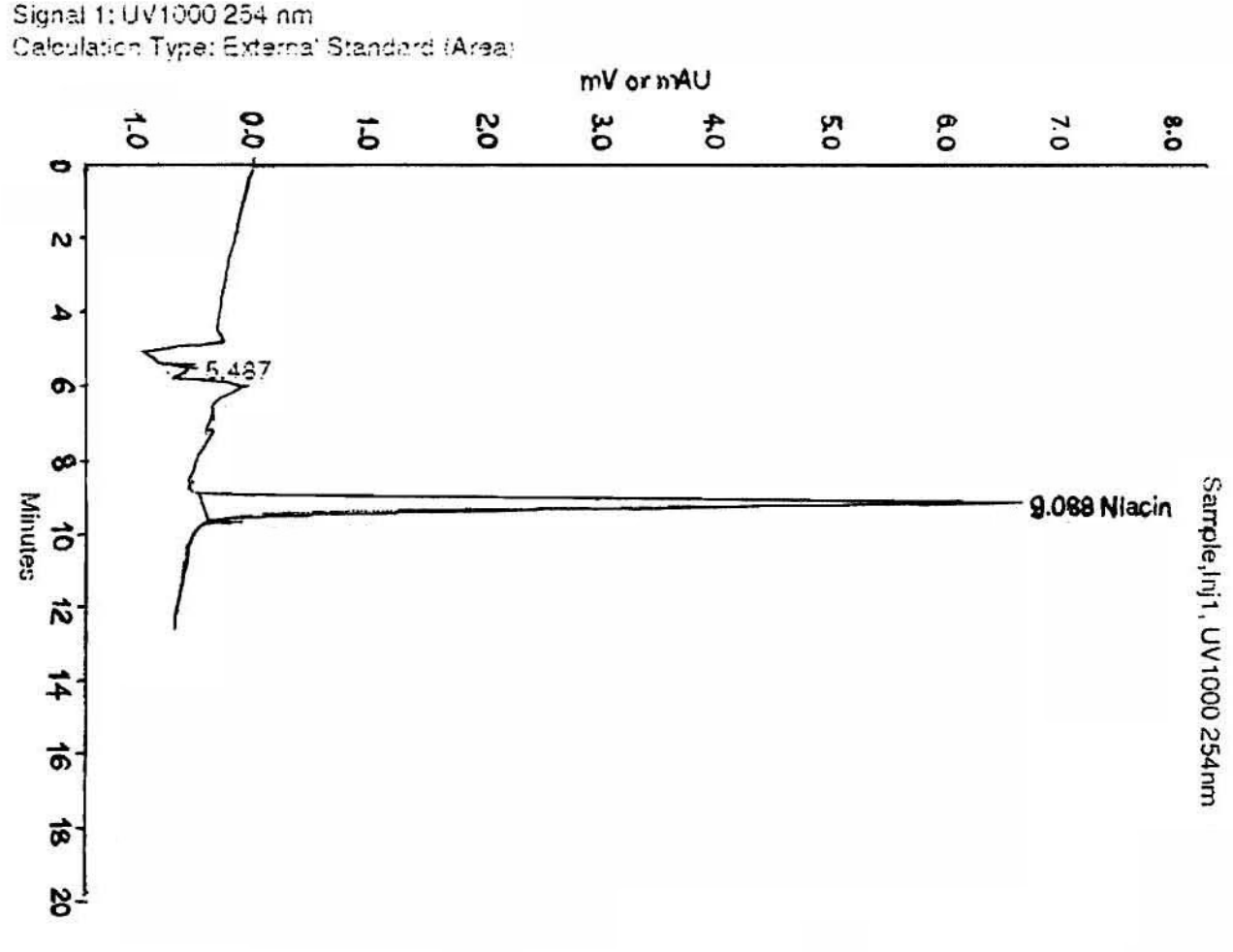
18. The United states pharmacopeial convention, Inc. **The United States Pharmacopeia.** 24 th ed. MA. : Rand Mc Nally, 2000. 1176 – 1178, 1920-1925.

19. **Vitamin B3 – Niacin.** Available : http : // www. anyvitamins . com/ vitamin_b3. 19 Feb.2003.

กิตติกรรมประกาศ

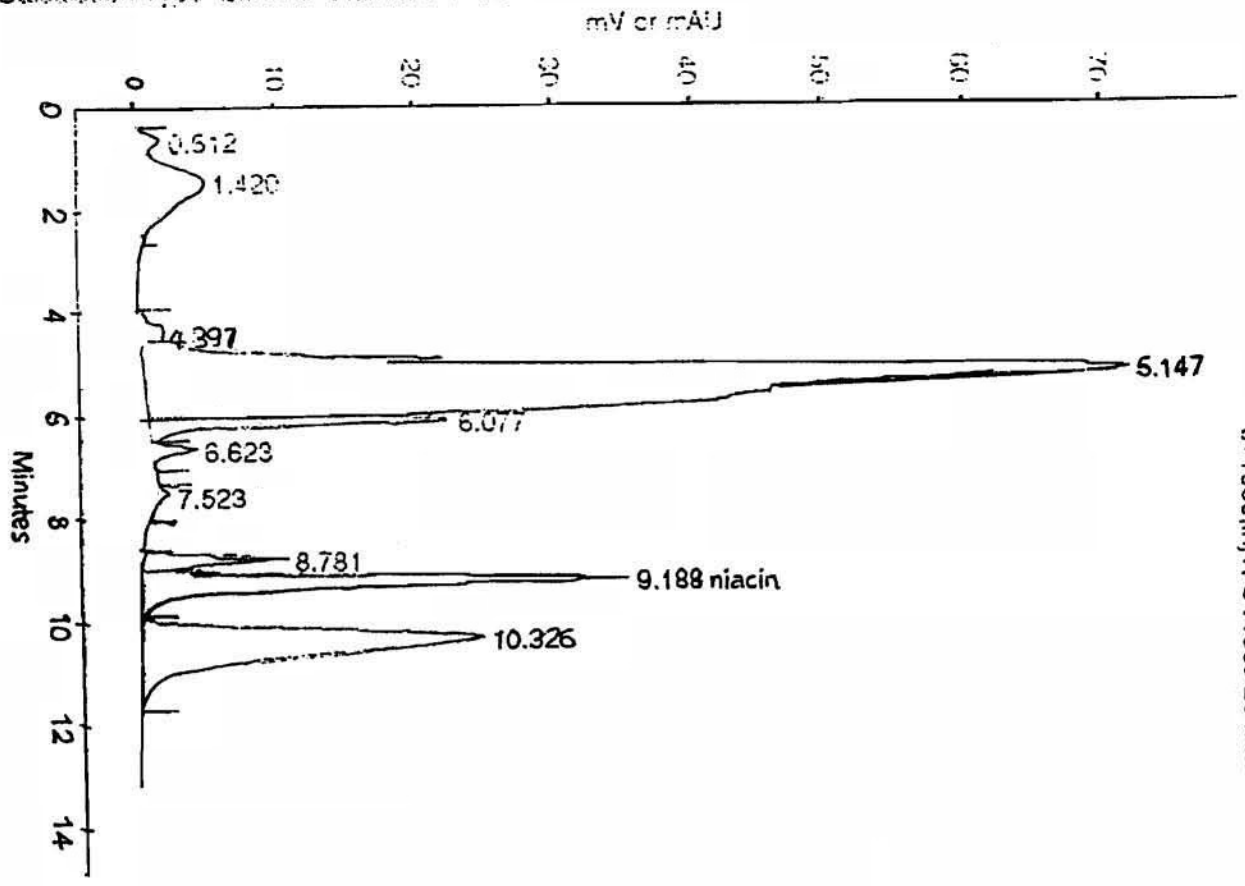
ผลงานนี้ได้รับความเอื้อเฟื้อและความร่วมมือเป็นอย่างดียิ่งจาก บุคลากรในสำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ ขอขอบพระคุณ ผู้อำนวยการสำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ ผู้อำนวยการโครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ นว. 8 ว.สุนทรี เปรื่องการ และหัวหน้ากลุ่มงานวิชาการ 2 ที่ได้ให้การสนับสนุนในการศึกษาทดลอง และขอขอบคุณบุคลากรในโครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

ภาคผนวก



Component	RT(min)	Area	Height	Conc	Peak Type
Unident0001	5.487	2978	284	0.0	Resolved
Niacin	**9.088**	**117050**	**7112**	**2.0093**	Resolved
Totals		120028	7396	**2.0093**	

รูปที่ 4 โครมาโทแกรมของสารละลายไนอะซินมาตรฐาน แสดงเวลาที่พีกปรากฏ และพื้นที่พีก



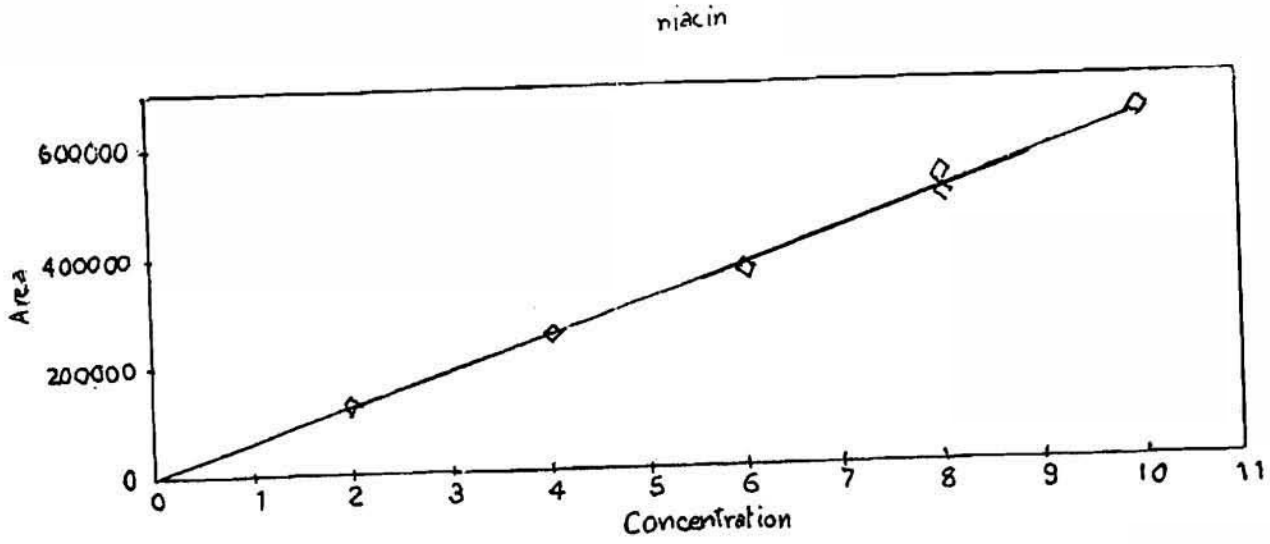
Component	RT(min)	Area	Height	Conc	Peak Type
Unident0001	0.612	30857	1791	0.0	Fused
Unident0002	1.420	240237	4649	0.0	Fused
Unident0003	4.397	29334	1575	0.0	Fused
Unident0004	5.147	3120154	71548	0.0	Fused

Mode: Acquired Data Reported On: 08-24-102

Original Results: C:\TSP\SYSTEM1 Data\r25A.RES

Unident0005	6.077	217043	21773	0.0	Fused
Unident0006	6.623	32048	3119	0.0	Fused
Unident0007	7.523	19241	1062	0.0	Resolved
Unident0008	8.781	118190	10242	0.0	Fused
niacin	**9.188**	521535	34964	**8.4373**	Fused
Unident0010	10.326	824932	24590	0.0	Resolved
Totals		5151571	175933	8.4373	

รูปที่ 5 โครมาโทแกรมสารละลาย ตัวอย่างเครื่องดื่มบำรุงกำลัง แสดงปริมาณ ไนอะซิน เทียบกับ กราฟมาตรฐาน

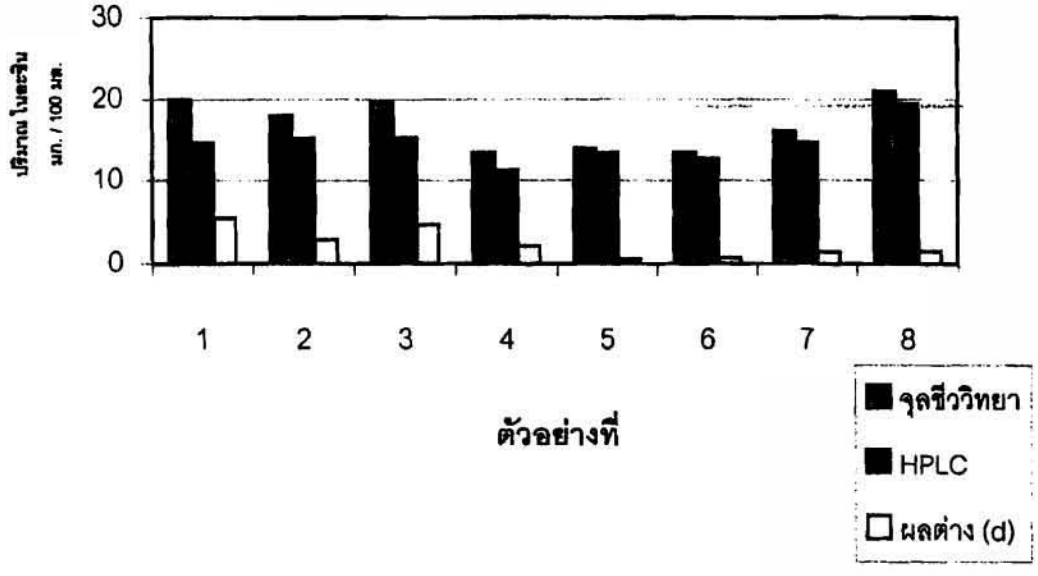


AREA = B * CONC
B = 6.2371e+004 RELIABILITY = 95.247% CORR COEFF = 0.9996

Component	RT(min)	Linear Coeff	Const Coeff	%Rel	Corr
niacin	9.029	6.23715e+004	0.00000e+000	95.247	0.9996

รูปที่ 6 กราฟมาตรฐาน ของไนอะซิน แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณความเข้มข้น (แกนX) กับ ค่าพื้นที่พีก (แกนY) ค่า Corr = 0.999 แสดงว่า ตัวแปรทั้งสองค่ามีความสัมพันธ์กัน

แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบปริมาณไนอะซิน ที่วิเคราะห์ โดย วิธีทางจุลชีววิทยา กับ เครื่องHPLC



รูปที่ 7 แผนภูมิเปรียบเทียบ ปริมาณไนอะซิน ที่วิเคราะห์ โดยวิธีทางจุลชีววิทยา กับ เครื่อง HPLC