การหาปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ในตัวอย่างเครื่องดื่มและหญ้าหวาน โดยใช้ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

Determination of Rebaudioside A and Stevioside in Beverage and Stevia Samples by High-Performance Liquid Chromatography

ขจัดภัย ทิพยผ่อง, กิตติญา ดีเลิศ และ สมศักดิ์ ศิริไชย*

Khajadpai Thipyapong , Kittiya Deelert and Somsak Sirichai*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Chemistry Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 3 June 2018

Accepted : 1 July 2018

Published online : 5 July 2018

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับหาปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ในตัวอย่างเครื่องดื่มและหญ้าหวาน โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับตัวตรวจวัดไดโอดอาเรย์ คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Luna C_{18} ความยาวคอลัมน์ 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตรและขนาดอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ 5 ไมโครเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัดคือ 210 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ อะซิโตไนไตรล์และน้ำ (พีเอช 3.5) ที่อัตราส่วน 35:65 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 0.60 มิลลิลิตรต่อนาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 8 นาที ขีดจำกัดการตรวจวัดของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์คือ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตรและขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์คือ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของกราฟมาตรฐาน (0.01 ถึง 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร) ของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์คือ 0.9990 และ 0.9998 ตามลำดับ ความเที่ยงจากการวิเคราะห์ภายในวันในเทอมของรีเทนชันไทม์และพื้นที่พีกของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์มีร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.17-2.36 และ 0.10-2.04 ตามลำดับ และความเที่ยงระหว่างวันในเทอมของรีเทนชันไทม์ และพื้นที่พีกของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์มีร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.07-3.99 และ 0.11-6.94 ตามลำดับ ความแม่นในเทอมของร้อยละการกลับคืนของสารที่สนใจทั้งสองอยู่ในช่วง 92.0-101.3 วิธีที่นำเสนอนี้สามารถประยุกต์ใช้กับการหาปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ในตัวอย่างเครื่องดื่มและหญ้าหวานได้

คำสำคัญ : รีบาวดิโอไซด์ เอ, สตีวิโอไซด์, สตีเวีย, ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

*Corresponding author. E-mail : sirichai@buu.ac.th

Abstract

The optimized conditions for the determination of two steviol glycosides, namely rebaudioside A and stevioside in beverage and stevia samples by using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector was studied. Analytical column was Luna C_{18} (4.6 mm x 250 mm, 5 micrometer). Both analytes were detected at 210 nm. It was found that the optimized mobile phase comprised acetonitrile and water (pH 3.5) in ratio of 35:65 (%v/v). The flow rate of mobile phase was 0.60 mL/min. Under these optimized conditions, analysis time was about 8 min. The limits of detection were 0.03 mg/L for rebaudioside A and stevioside, and the limits of quantitation were 0.10 mg/L for rebaudioside A and stevioside. Correlation coefficients of calibration curves from 0.01 to 5.00 mg/L were 0.9990 for rebaudioside A, and 0.9998 for stevioside. Intra-day precisions in terms of percent relative standard deviation of retention times and peak areas were 0.17-2.36 for rebaudioside A, and 00.10-2.04 for stevioside. Inter-day precisions in terms of percent relative standard deviation of retention times and peak areas were 0.07-3.99 for rebaudioside A, and 0.11-6.94 for stevioside. Accuracy of the purposed methods for rebaudioside A and stevioside in terms of percent recovery was in the range 92.0-101.3. The proposed method could be applied to determine rebaudioside A and stevioside in beverage and stevia samples.

Keywords : rebaudioside A, stevioside, stevia, high-performance liquid chromatography

บทนำ

รีบาวดิโอไซด์ เอ (Rebaudioside A) และสตีวิโอไซด์ (Stevioside) เป็นสารสำคัญซึ่งสามารถสกัดได้จากหญ้าหวาน (*Stevia Rebaudiana Bertoni*, Stevia) ทั้งรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์เป็นสารประกอบกลุ่มไกลโคไซด์ที่เรียกว่า สตีวิออลไกลโคไซด์ (Steviol glycosides) ซึ่งได้รับการอนุมัติโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐฯ ว่าปลอดภัยและนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อใช้เป็นสารให้ความหวานตามธรรมชาติหรืออาหารเสริมในอาหารและเครื่องดื่มต่าง ๆ เนื่องจากมีรสชาติหวานกว่าน้ำตาลซูโครส 250-300 เท่า (Gasmalla *et al*., 2015) หญ้าหวานเป็นพืชสมุนไพรที่มนุษย์รู้จักมาเป็นเวลานาน ใช้เป็นสารทดแทนความหวานแคลอรี่ต่ำ นอกจากนี้สารสกัดจากหญ้าหวานยังมีข้อดีอีกหลายประการ เช่น ทนต่อกรดและความร้อน ไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ เมื่อนำมาเป็นส่วนผสมในอาหารจึงไม่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และไม่ถูกดูดซึมในระบบย่อยอาหาร จึงเหมาะอย่างยิ่งกับผู้ที่เป็นโรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิต และโรคหัวใจ จึงทำให้เป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจต่อผู้ที่เป็นโรคอ้วนและโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นทั่วโลก ในปัจจุบันสารทดแทนความหวาน เช่น ซูโครสและแอสปาแตม แม้จะให้ความหวานสูงและใช้ในเชิงพาณิชย์มาก แต่สารทดแทนความหวานเหล่านี้เป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์เป็นส่วนใหญ่ (Kim & Kinghorn, 2002) แอสปาแตมเป็นสารทดแทนความหวานที่ไม่ให้พลังงาน แต่มีข้อเสียคือโครงสร้างสารจะเปลี่ยนไปเมื่อถูกความร้อนสูงและเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน จึงไม่ควรใช้แอสปาแตมในการปรุงอาหารและไม่ควรเก็บไว้นานๆ อีกทั้งการบริโภคแอสปาแตมทำให้มีความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งปอดและมะเร็งตับได้ แต่ในส่วนของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ซึ่งเป็นสารประกอบที่ได้มาจากแหล่งธรรมชาติ สามารถใช้ปรุงอาหารที่ความร้อนสูงได้และยังได้ผ่านการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา นอกจากนี้ยังไม่พบรายงานเรื่องอันตรายจากการใช้ อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารของประเทศไทยมีการใช้วัตถุเจือปนอาหาร

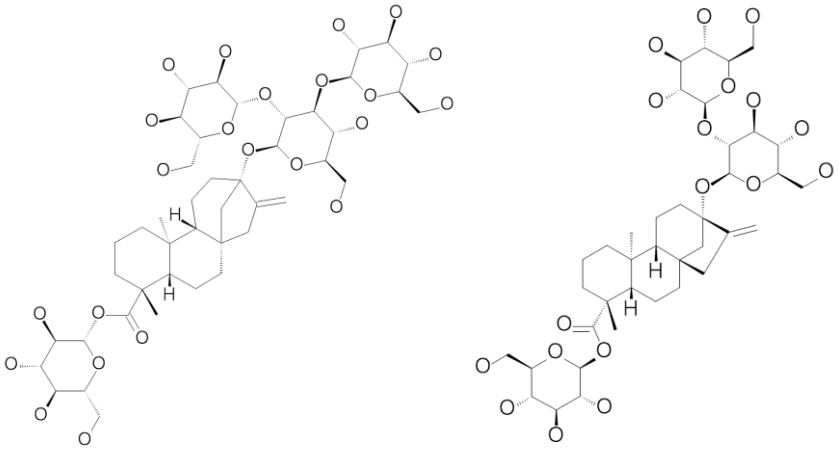
ในกระบวนการผลิตและกระบวนการเตรียมอาหารในธุรกิจเพิ่มมากขึ้น เพื่อทำให้อาหารมีคุณลักษณะที่ต้องการหรือยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์อาหาร อาจทำให้มีความเสี่ยงต่อการได้รับสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคเพิ่มขึ้น หากมีการใช้ที่ไม่ถูกต้อง ปริมาณสตีวิออลไกลโคไซด์สูงสุดที่กระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 381) พ.ศ. 2559 อนุญาตให้ใช้ในหมวดเครื่องดื่ม (Notification of the Ministry of Public Health, 2016) แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสตีวิออลไกลโคไซด์สูงสุดที่กระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 381) พ.ศ. 2559 อนุญาตให้ใช้ในหมวดเครื่องดื่ม

หมวดเครื่องดื่ม	ปริมาณสูงสุดที่อนุญาต (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
เครื่องดื่มที่มีนมเป็นส่วนประกอบหลัก	70
น้ำผลไม้และน้ำผัก	200
เครื่องดื่มแต่งกลิ่นรส	115
กาแฟ เครื่องดื่มแทนกาแฟ ชา เครื่องดื่มสมุนไพร และเครื่องดื่มจากธัญพืชชนิดต่าง ๆ ไม่รวมโกโก้	200
เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่แต่งกลิ่นรส	200

การวิเคราะห์ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์มีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพที่ 1 จึงมีความสำคัญและจำเป็นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และควบคุมปริมาณการใช้ให้เป็นไปตามกฎหมายกำหนด ปัจจุบันมีรายงานการวิเคราะห์รีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์หลายเทคนิค ได้แก่ เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High-performance liquid chromatography, HPLC) ร่วมกับตัวตรวจวัดยูวี (Aranda-Gonzalez *et al*., 2015; Bovanova *et al*., 1995) ลิควิดโครมาโทกราฟีและใช้แมสสเปกโทรมิเตอร์เป็นตัวตรวจวัด (Molina-Calle *et al*., 2016; Riecktal., 2010) เทคนิคอุลตร้าไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC) และใช้แมสสเปกโทรมิเตอร์เป็นตัวตรวจวัด (Gardana *et al*., 2010) และเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซีส (Capillary electrophoresis, CE) (Pavlíček & Tuma, 2017; Liu & Li, 1995)

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์รีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ในตัวอย่างเครื่องดื่มและหญ้าหวาน โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ชนิดรีเวิร์สเฟสและใช้ตัวตรวจวัดเป็นไดโอดอาเรย์ เนื่องจากมีต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ แต่มีความแม่นและความเที่ยงสูง



(1) (2)

ภาพที่ 1 โครงสร้างเคมีของรีบาวดิโอไซด์ เอ (1) และสตีวิโอไซด์ (2)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีและอุปกรณ์

สารรีบาวดิโอไซด์ เอ ($C_{44}H_{70}O_{23}$) ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98.0 และสตีวิโอไซด์ ($C_{38}H_{60}O_{18}$) ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 80.0 เป็นเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Tokyo Chemical Industry (TCI) ประเทศญี่ปุ่น อะซิโตไนไตรล์และเมทานอลเกรด HPLC ของบริษัท Honeywell ประเทศสหรัฐอเมริกา กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นร้อยละ 85 ของบริษัท QRëc ประเทศนิวซีแลนด์ น้ำที่ใช้ในการทดลองคือน้ำปราศจากไอออน (18.3 MΩ) จากเครื่องผลิตน้ำ Water Purification System รุ่น EASYpure LF ของบริษัท Barnsted ประเทศเยอรมัน ไมโครไซริงค์ (micro syringe) ขนาด 100 ไมโครลิตรของบริษัท Agilent ประเทศสหรัฐอเมริกา ไซริงจ์ฟิลเตอร์ชนิดพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์ (syringe filter PVDF) ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Chrom Tech ประเทศสหรัฐอเมริกา แผ่นเมมเบรนสำหรับใช้กรองเฟสเคลื่อนที่ชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร บริษัท Whatman ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. เครื่องมือ

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่ใช้เป็นของบริษัท Agilent รุ่น 1260 Infinity II ประเทศสหรัฐอเมริกา และตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาเรย์ คอลัมน์วิเคราะห์คือ Luna C_{18} ความยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร และมีขนาดอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ 5 ไมโครเมตร ของบริษัท Phenomenex ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนฉีดสาร (injector) เป็นชนิด Rheodyne ปริมาตรฉีดคือ 20 ไมโครลิตร ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัดคือ 210 นาโนเมตร ชุดกรองเฟสเคลื่อนที่ ขนาด 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gelman Sciences ประเทศสหรัฐอเมริกา การวิเคราะห์ใช้การชะแบบไอโซเครติก (isocratic elution) ที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ ความเข้มข้น 500.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิดอย่างละ 0.0050 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร สารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ เตรียมโดยการเจือจางสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นและเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน

4. การเตรียมตัวอย่าง

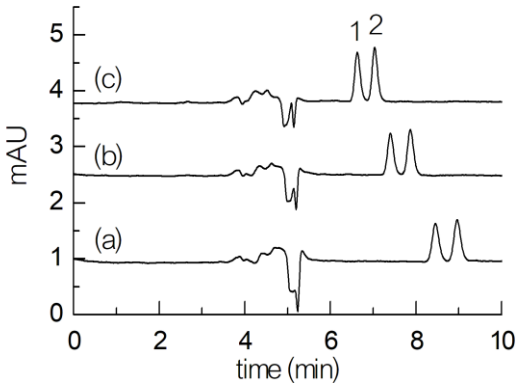
เตรียมตัวอย่างเครื่องดื่มโดยวิธีการเจือจาง โดยการปิเปตตัวอย่างเครื่องดื่มในปริมาตรที่เหมาะสม ลงในขวดปริมาตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน กรองสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้โดยใช้ไซริงซ์ฟิลเตอร์ และนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC *สำหรับตัวอย่างผงสารสกัดหญ้าหวาน* เตรียมโดยการชั่งผงสารสกัดหญ้าหวาน 0.1500 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร จากนั้นเจือจางสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ กรองด้วยไซริงซ์ฟิลเตอร์ และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC *สำหรับตัวอย่างใบหญ้าหวานอบแห้ง* วิธีการเตรียมดัดแปลงจากวิธีของ Vaněk และคณะ (Vaněk *et al*., 2001) เตรียมโดยการชั่งตัวอย่างใบหญ้าหวานอบแห้ง 1.0000 กรัม ลงในบีกเกอร์ เทน้ำเดือดปริมาตร 40 มิลลิลิตร และต้มต่อเป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรองลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเจือจางสารละลายที่เตรียมได้ กรองด้วยไซริงซ์ฟิลเตอร์ และนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ตอนที่ 1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

1.1 ผลของร้อยละอะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่

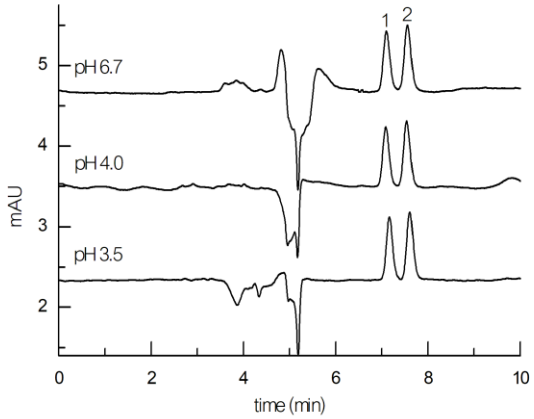
ในการศึกษาผลของร้อยละอะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ของอะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำที่อัตราส่วน 34:66 35:65 และ 36:64 โดยปริมาตร ผลของร้อยละอะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมแสดงดังภาพที่ 2 จากภาพเห็นได้ว่าเมื่อร้อยละของอะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่ารีเทนชันไทม์และค่าการแยกของสารลดลง การที่ค่ารีเทนชันไทม์ของสารลดลงเมื่อเพิ่มร้อยละของอะซิโตไนไตรล์ เนื่องจากในระบบรีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟี สารสามารถถูกชะออกมาเร็วขึ้นโดยการลดความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่ หรือกล่าวอีกอย่างหนึ่ง โดยการเพิ่มร้อยละของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วน้อยกว่าน้ำ ในการศึกษานี้ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่คืออะซิโตไนไตรล์และน้ำ โดยอะซิโตไนไตรล์มีความมีขั้วน้อยกว่าน้ำ ดังนั้นเมื่อเพิ่มร้อยละของอะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่ ความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่ลดลง (ความแรงการชะเพิ่มขึ้น) ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น และจากโครมาโทแกรมเห็นได้ว่า รีบาวดิโอไซด์ เอ ถูกชะออกมาก่อนสตีวิโอไซด์ เนื่องจากเมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารทั้งสอง รีบาวดิโอไซด์ เอ มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่าสตีวิโอไซด์ นั่นคือรีบาวดิโอไซด์ เอ มีขั้วมากกว่าสตีวิโอไซด์ ด้วยเหตุนี้ เมื่อเพิ่มร้อยละของอะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่ (ลดความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่) รีบาวดิโอไซด์ เอ จึงถูกชะออกมาก่อนสตีวิโอไซด์ อย่างไรก็ตาม เมื่ออะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 35 พีกของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์แยกไม่สมบูรณ์ ดังนั้น อัตราส่วนของอะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำในเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ 35:65 โดยปริมาตร



ภาพที่ 2 ผลของร้อยละอะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของรีบาวดิโอไซด์ เอ (พีก 1) และสตีวิโอไซด์ (พีก 2) องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ของอะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำที่อัตราส่วน (a) 34:66 (b) 35:65 และ (c) 36:64 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 0.60 มิลลิลิตรต่อนาที

1.2 ผลการศึกษาพีเอชของน้ำในเฟสเคลื่อนที่

ในการศึกษาผลของพีเอชของน้ำในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ โดยศึกษาพีเอชของน้ำ 3.5, 4.0 และ 6.7 (ไม่ปรับพีเอช) ในการศึกษานี้ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำที่อัตราส่วน 35:65 โดยปริมาตร ผลการศึกษาแสดงในโครมาโทแกรมดังภาพที่ 3 จากภาพเห็นได้ว่า ในช่วงพีเอชที่ศึกษามีผลต่อค่ารีเทนชันไทม์ ค่าการแยก และความสูงพีกของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ไม่มากหรือแทบไม่มีผล เนื่องจากค่าพีเอชที่ศึกษามีค่าน้อยกว่าค่า p*K*a ของสารที่สนใจทั้งสองมาก (p*K*a 11.75 สำหรับรีบาวดิโอไซด์ เอ และ p*K*a 11.84 สำหรับสตีวิโอไซด์) ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของสารไม่ต่างกันมาก โดยสารที่ต้องการวิเคราะห์ทั้งสองอยู่ในรูปโปรโตเนต (protonated form) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่า ที่พีเอช 3.5 สารที่สนใจแยกกันอย่างสมบูรณ์ ด้วยค่าแฟคเตอร์การแยก (separation factor) 1.10 และค่าการแยก 1.51 ดังนั้น จึงเลือกพีเอชของน้ำ 3.5 เป็นค่าที่เหมาะสมในการวิเคราะห์รีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์

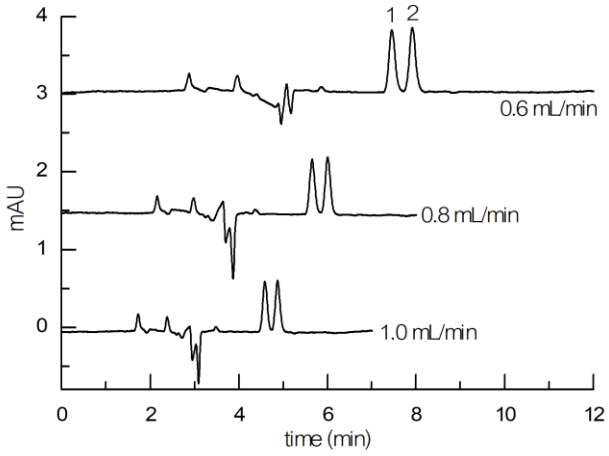


ภาพที่ 3 ผลของพีเอชของน้ำในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของรีบาวดิโอไซด์ เอ (พีก 1) และสตีวิโอไซด์ (พีก 2) องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ของอะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำที่อัตราส่วน 35:65 โดยปริมาตร (a) พีเอช 3.5 (b) พีเอช 4.0 และ (c) พีเอช 6.7 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 0.60 มิลลิลิตรต่อนาที

1.3 ผลอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

การศึกษาผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากการศึกษาแสดงผลในโครมาโทแกรมดังภาพที่ 4 จากผลการศึกษาเห็นได้ว่า อัตราการไหลมีผลต่อค่ารีเทนชันไทม์และการแยกของสารรีบาวดิโอไซด์และสตีวิโอไซด์ เมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ลดลง และการแยกของสารที่ต้องการวิเคราะห์ทั้งสองลดลง ดังนั้น เมื่อพิจารณาในเทอมของเวลาในการวิเคราะห์และการแยก จึงเลือกอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นอัตราการไหลที่เหมาะสม ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ ค่าการแยกของสารมีค่า 1.51 และแฟคเตอร์การแยกมีค่า 1.10

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ การวิเคราะห์สารรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ สามารถวิเคราะห์ได้ภายใต้เวลา 8 นาที ซึ่งน้อยกว่างานวิจัยของ Martono และคณะ (Martono *et al*., 2016) ที่ใช้เวลาวิเคราะห์ประมาณ 10 นาที นอกจากนี้ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารทั้งสองนี้มีเพียงอะซิโตไนไตรล์และน้ำเท่านั้น ไม่มีองค์ประกอบของกรดไตรฟลูออโรอะซิติกซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในงานของ Martono



ภาพที่ 4 ผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของรีบาวดิโอไซด์ เอ (พีก 1) และสตีวิโอไซด์ (พีก 2) องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ของอะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำ (พีเอช 3.5) ที่อัตราส่วน 35:65 โดยปริมาตร

ตอนที่ 2 การศึกษาความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

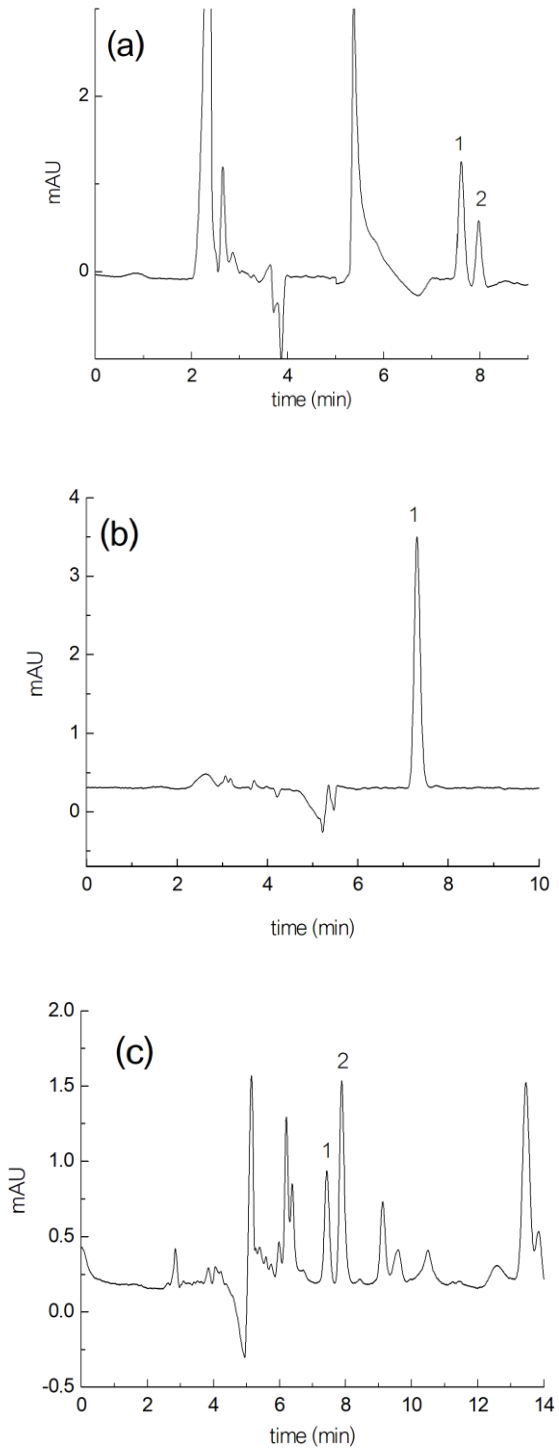
ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ ศึกษาในเทอมของขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ซึ่งค่า LOD และ LOQ คำนวณจากการหาอัตราส่วนของสัญญาณ (signal) ต่อสัญญาณรบกวน (noise) ที่ 3:1 และ 10:1 ตามลำดับ ความเป็นเส้นตรง (linearity) ทำโดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์แต่ละชนิด ๆ ละ 6 ความเข้มข้น โดยแต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ 3 ครั้ง (n = 3) ความเที่ยงภายในวัน (intra-day precision) ของวิธีวิเคราะห์ ทำโดยวิเคราะห์สารแต่ละชนิดที่ 3 ระดับความเข้มข้น แต่ละระดับความเข้มข้นวิเคราะห์ 7 ครั้ง ความเที่ยงระหว่างวัน (inter-day precision) ของวิธีวิเคราะห์ทำโดยวิเคราะห์สารแต่ละชนิดที่ 3 ระดับความเข้มข้น แต่ละระดับความเข้มข้นวิเคราะห์ 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน สำหรับความแม่นของวิธีวิเคราะห์ ศึกษาในเทอมของร้อยการได้กลับคืน โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้นลงในตัวอย่าง แต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ 3 ครั้ง ผลการศึกษาความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าที่ได้จากการศึกษาความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

ตัวแปร	รีบาวดิโอไซด์ เอ	สตีวิโอไซด์
ขีดจำกัดการตรวจวัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.03	0.03
ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.10	0.10
สมการกราฟมาตรฐาน (0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร)	y = 8.8922x + 0.0515	y = 8.2353x + 0.1323
สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)	0.9990	0.9998
ความเที่ยงภายในวัน		
รีเทนชันไทม์ (%RSD)		
ความเข้มข้น 0.30 มิลลิกรัมต่อลิตร	1.59	0.18
ความเข้มข้น 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.24	0.10
ความเข้มข้น 4.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.17	0.24
พื้นที่พีก (%RSD)		
ความเข้มข้น 0.30 มิลลิกรัมต่อลิตร	2.36	2.04
ความเข้มข้น 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร	1.90	1.06
ความเข้มข้น 4.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.89	0.46
ความเที่ยงระหว่างวัน		
รีเทนชันไทม์ (%RSD)		
ความเข้มข้น 0.30 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.07	0.11
ความเข้มข้น 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.10	0.16
ความเข้มข้น 4.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.13	0.18
พื้นที่พีก (%RSD)		
ความเข้มข้น 0.30 มิลลิกรัมต่อลิตร	3.99	6.94
ความเข้มข้น 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร	2.66	2.37
ความเข้มข้น 4.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	0.93	2.04
ความแม่นในเทอมของร้อยละการได้กลับคืน		
ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร	92.0 $\pm$ 0.0	98.7 $\pm$ 2.3
ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	97.3 $\pm$ 0.6	98.3 $\pm$ 0.6
ความเข้มข้น 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	97.6 $\pm$ 0.8	101.3 $\pm$ 0.2

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมของ HPLC วิเคราะห์รีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ในตัวอย่างเครื่องดื่ม ตัวอย่างผงหญ้าหวานสกัด และตัวอย่างใบหญ้าหวานอบแห้ง โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างแสดงดังภาพที่ 5 และผลการหาปริมาณของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ในตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 3 เห็นได้ว่าปริมาณของสตีวิออลไกลโคไซด์ที่พบในตัวอย่างเครื่องดื่มทั้งสามชนิด ไม่เกินปริมาณสูงสุดที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนด



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์รีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ในตัวอย่าง (a) ตัวอย่างเครื่องดื่ม (b) ตัวอย่างผงหญ้าหวานสกัด และ (c) ตัวอย่างใบหญ้าหวานอบแห้ง

ตารางที่ 3 ปริมาณรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ที่พบในตัวอย่าง

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณที่พบ	
	รีบาวดิโอไซด์ เอ	**สตีวิโอไซด์**
น้ำผลไม้	134.94 ± 1.90 มิลลิกรัมต่อลิตร	16.83 ± 2.31 มิลลิกรัมต่อลิตร
น้ำอัดลม	77.00 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร	29.00 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร
น้ำสมุนไพร	118.17 ± 0.80 มิลลิกรัมต่อลิตร	12.83 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อลิตร
ผงหญ้าหวานสกัด	1213.60 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัม	ตรวจไม่พบ
ใบหญ้าหวานอบแห้ง	43.17 ± 0.76 มิลลิกรัมต่อกรัม	78.83 ± 0.58 มิลลิกรัมต่อกรัม

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีรีเวิร์สเฟสไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี และใช้การชะแบบไอโซเครติกสำหรับวิเคราะห์รีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์พร้อมกันในตัวอย่างเครื่องดื่มและหญ้าหวาน วิธีที่นำเสนอนี้เป็นวิธีที่ง่าย วิเคราะห์ได้เร็ว มีความเฉพาะเจาะจง มีความแม่นและความเที่ยง นอกจากนี้องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ใช้ในระบบไม่ซับซ้อน วิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ปริมาณของรีบาวดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ได้ การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ใช้เพียงการกรองและการเจือจางเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

Aranda-Gonzàlez, I., Moguel-Ordoñez, Y., and Betancur-Ancona, D. (2015). Validation of HPLC-UV method for determination of minor glycosides contained in Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *Biomedical Chromatography*, *29,* 733–738.

Bovanová, L., Brandšteterová, E., and Baxa, S. (1998). HPLC determination of stevioside in plant material and food samples. *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*, *207*, 352–355.

Gardana, C., Scaglianti, M., and Simonetti, P. (2010). Evaluation of steviol and its glycosides in stevia rebaudiana leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1217*, 1463–1470.

Gasmalla, M. A. A., Yang, R. and Hua, X. (2014). Stevia rebaudiana Bertoni: An alternative sugar replacer and its application in food Industry. *Food Engineering Reviews*, *6*, 150–162.

Kim, N.-C. and Kinghorn, A. D. (2002). Highly sweet compounds of plant origin. *Archives of Pharmacal Research*, *25*, 725–746.

Liu, J., and Li, S.F.Y. (1995). Separation and determination of stevia sweeteners by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Journal of liquid chromatography*, *18*(9), 1703-1719.

Martono, Y., Riyanto, S., Rohman, A., and Martono, S. (2016). Improvement method of fast and isocratic RP-HPLC analysis of major diterpene glycoside from Stevia rebaudiana leaves. In *AIP Conference Proceedings*. (pp. 1-8). American Institute of Physics: AIP Publishing.

Molina-Calle, M., Sánchez De Medina, V., Delgado De La Torre, M.P., Priego-Capote, F., and Luque De Castro, M.D. (2016). Development and application of a quantitative method based on LC-QqQ MS/MS for determination of steviol glycosides in Stevia leaves. *Talanta*, *154*, 263–269.

Notification of the Ministry of Public Health (No. 381) (2016) *Food additives.* Retrieved June 30, 2018, from http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_ moph/P381.pdf (in Thai)

Pavlíček, V., and Tůma, P. (2017). The use of capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for sensitive determination of stevioside and rebaudioside A in foods and beverages. *Food Chemistry*, *219*, 193–198.

Rieck, U.W, Lankes, C., Wawrzun, A., and Wüst, M. (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of Stevia rebuadiana. *European food Research and Technology*, *231*, 581-588.

Vaněk, T., Nepovím, A., and Valíček, P. (2001). Determination of stevioside in plant material and fruit teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, *14*, 383–388.