เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับการวิเคราะห์ไทเอมีนและไรโบฟลาวินแบบรวดเร็วในผลิตภัณฑ์นม

High Performance Liquid Chromatographic Method for Rapid Determination of Thiamine and Riboflavin in Dairy Products

กมลรัตน์ เลียบศิริ และ ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ*

Kamonrat Liabsiri and Piyada Jittangprasert*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

Received : 31 October 2015

Accepted : 7 December 2015

Published online : 2 February 2016

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่สะดวก รวดเร็ว และน่าเชื่อถือสำหรับการวิเคราะห์ไทเอมีนและไรโบฟลาวินแบบพร้อมกัน โดยใช้สภาวะการแยกด้วยคอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 x 3.0 mm, length x I.D.) วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 232 และ 266 นาโนเมตรสำหรับไทเอมีนและไรโบฟลาวิน ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าสามารถแยกวิตามินทั้งสองชนิดได้พร้อมกันภายในระยะเวลาไม่เกิน 8.0 นาที ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.10 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับไทเอมีน และในช่วงความเข้มข้น 0.25 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับไรโบฟลาวิน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดี ($r^2 > 0.999$) ค่าความเที่ยงของวิธีแสดงในรูปของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) มีค่าอยู่ในช่วง 0. 34-1.90 % และมีค่าร้อยละการคืนกลับของวิตามินทั้งสองชนิดอยู่ในช่วง 81.83 – 102.70 วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ไทเอมีนและไรโบฟลาวินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มได้เป็นผลสำเร็จ จะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว ราคาถูก และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบทั่วไป

คำสำคัญ : ไทเอมีน ไรโบฟลาวิน ผลิตภัณฑ์นม คอลัมน์ขนาดเล็ก โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

*Corresponding author. E-mail : piyadaj@g.swu.ac.th

Abstract

A fast, simple and reliable high-performance liquid chromatographic method has been developed for the simultaneous analysis of thiamine and riboflavin. The chromatographic separation was performed on a mini C18 column (8.0 x 3.0 mm, length x I.D.) with isocratic elution using acetronitrile and 0.05 M acetate buffer (pH 7.0). Direct UV absorptions at wavelength of 232 and 266 nm were used for detection of thiamine and riboflavin, respectively. Both vitamins were separated in less than 8.0 min at flow rate of 0.10 ml/min. The linear calibration curves were obtained over the concentration range of 0.10 - 100 mg/L for thiamine and 0.25 - 100 mg/L for riboflavin with good correlation coefficients ($r^2 > 0.999$). The precisions were measured in term of relative standard deviation (RSD) value. The RSDs of the method were in the range 0.34 – 1.90%. The percentage recoveries of both vitamins were obtained in the range of 81.83 - 102.70. The contents of both vitamins in milk samples were successfully determined by using the developed method. Compared with the conventional HPLC method, the proposed method has the advantage of being rapid, low cost and environmentally friendly.

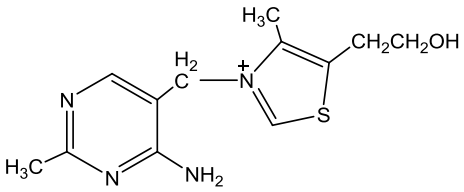
Keywords : Thiamine, Riboflavin, Dairy Products, short column, High Performance Liquid Chromatography

บทนำ

วิตามินเป็นหนึ่งในสารอาหารหลักที่มีความจำเป็นต่อมนุษย์ซึ่งร่างกายไม่สามารถขาดได้ เนื่องจากวิตามินเป็นสารประกอบที่ทำหน้าที่ร่วมกับสารอาหารอื่นๆ เพื่อควบคุมกระบวนการทางเคมีต่างๆภายในร่างกายให้เป็นไปตามปกติ วิตามินสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มวิตามินที่ละลายในไขมัน และกลุ่มวิตามินที่ละลายในน้ำ โดยกลุ่มวิตามินที่ละลายในน้ำได้แก่ วิตามินซี และกลุ่มวิตามินบีรวม (Yin *et al*., 2008) ซึ่งวิตามินกลุ่มนี้แม้ว่าจะบริโภคเกินความต้องการในแต่ละวันก็จะไม่มีอันตราย เนื่องจากวิตามินกลุ่มนี้มีคุณสมบัติละลายในน้ำ ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณมากเกินไปก็จะถูกขับออกมาได้เอง จึงไม่มีการสะสมภายในร่างกาย ถึงแม้ว่าวิตามินเหล่านี้จะสามารถพบในอาหารประเภทต่างๆอยู่แล้ว แต่ด้วยพฤติกรรมของผู้บริโภคในสภาวะเร่งรีบในปัจจุบัน ทำให้อุตสาหกรรมด้านอาหารและเครื่องดื่มมีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมวิตามินเหล่านี้เสริมลงไปเพื่อให้สอดคล้องกับพฤติกรรมของผู้บริโภค โดยผลิตภัณฑ์หนึ่งที่ภาคอุตสาหกรรมให้ความสนใจเป็นอย่างมากคือ ผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีคุณค่าทางสารอาหารครบถ้วนตามความต้องการของผู้บริโภคทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ โดยในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มส่วนใหญ่สามารถพบได้ทั้งวิตามินเอ ไทเอมีน (วิตามินบี 1) และไรโบฟลาวิน (วิตามินบี 2) (Márquez-Sillero *et al*., 2013) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการวิเคราะห์ปริมาณของวิตามินที่เติมลงไปในผลิตภัณฑ์นมต่างๆ เพื่อเป็นการรับรองคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้เป็นที่ยอมรับและน่าเชื่อถือจากผู้บริโภค และเป็นการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด โดยวิธีวิเคราะห์ที่เลือกใช้ต้องมีประสิทธิภาพ ความถูกต้องและความแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในระดับปริมาณน้อยๆ (ระดับไมโครกรัม)ได้ โดยเฉพาะการเลือกวิธีสำหรับการวิเคราะห์วิตามินในกลุ่มที่ละลายในน้ำ ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่ไม่ค่อยเสถียร มีความไวต่อแสงและเกิดการสลายตัวได้ง่าย (Rodriguez *et al*., 2012)

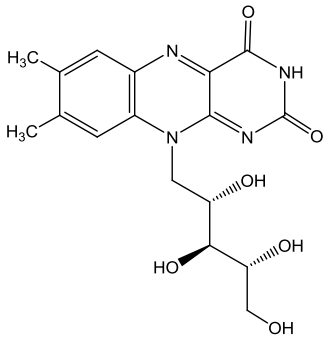
สำหรับเทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจวัดวิตามินมีหลากหลายเทคนิค เช่น เทคนิคยูวีวิซิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี (Liu *et al*., 2002) เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรโฟโตเมตรี (Wu *et al.,* 2003) และเทคนิคทางจุลชีววิทยา (Tanner & Barnett, 1986) เป็นต้น ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ไม่สามารถวิเคราะห์วิตามินแบบพร้อมกันหลายๆชนิดได้ จึงมีการนำเทคนิคการแยกสารมาพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์วิตามินได้พร้อมกันหลายชนิด โดยหนึ่งในเทคนิคการแยกที่มีความเหมาะสมและเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากลสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินกลุ่มที่ละลายในน้ำในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มประเภทต่างๆ คือ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ซึ่งจากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่างานวิจัยโดยส่วนใหญ่ยังนิยมใช้คอลัมน์ในการแยกที่มีความยาวในช่วง 15-25 เซนติเมตร (Hurtado *et al*., 1997; Kall, 2003; Engel *et al*., 2010; Rodriguez *et al*., 2012) จึงทำให้ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่และตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งคอลัมน์ยังมีราคาสูงอีกด้วย ต่อมาจึงเริ่มมีงานวิจัยที่นำคอลัมน์ขนาดเล็ก (ความยาวไม่เกิน 1.5 เซนติเมตร) มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญกลุ่มต่างๆ เช่น การวิเคราะห์ปริมาณอาซินิกในรูปฟอร์มต่างๆ (Le & Ma, 1998) การวิเคราะห์สารโทลเพอริโซนและลิโดเคอีนในตัวอย่างยา (Youngvises *et al*., 2003) และการวิเคราะห์วัตถุกันเสียกลุ่มพาราเบนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Youngvises *et al*., 2013) เป็นต้น ซึ่งผลการวิจัยพบว่าการนำคอลัมน์ขนาดเล็กมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนี้สามารถช่วยลดระยะเวลาของการวิเคราะห์ทำให้มีความรวดเร็วมากยิ่งขึ้น โดยยังคงประสิทธิภาพการแยกที่ดีไม่แตกต่างจากการใช้คอลัมน์ขนาดยาว อีกทั้งคอลัมน์ขนาดเล็กยังมีราคาถูกกว่า และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วยเนื่องจากการใช้ปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ลดลง อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานวิจัยที่นำคอลัมน์ขนาดเล็กนี้มาประยุกต์ใช้ในการแยกวิตามินกลุ่มที่ละลายในน้ำในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นม โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก (ความยาวไม่เกิน 1.0 เซนติเมตร) สำหรับประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ไทเอมีนและไรโบฟลาวิน (โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 1) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมประเภทต่างๆที่มีจำหน่ายและได้รับความนิยมในประเทศไทย ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่โดยทั่วไปสามารถตรวจพบไทเอมีนและไรโบฟลาวินในระดับปริมาณต่ำ คือ 0.5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ เพื่อให้ได้วิธีการวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย



ไทเอมีน

(Thiamine; Vitamin B_1)



ไรโบฟลาวิน

(Riboflavin; Vitamin B_2)

ภาพที่ 1 โครงสร้างของไทเอมีนและไรโบฟลาวิน

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

สารละลายมาตรฐานไทเอมีนและสารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวินเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมได้จากการชั่งน้ำหนักที่ทราบค่าละเอียดของสารมาตรฐาน 10 มิลลิกรัม นำมาละลายพร้อมปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนในขวดปรับปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานนี้ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆต่อไปโดยใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) โดยสารละลายมาตรฐานที่เตรียมต้องเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง และสารละลายมาตรฐานทุกความเข้มข้นถูกกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทั้งหมดเป็นประเภทสำหรับงานวิเคราะห์ทางเคมี (AR grade) จากบริษัท Sigma-Aldrich ยกเว้นตัวทำละลายแอซีโตไนไตรท์และเมทานอลเป็นประเภทสำหรับงานโครมาโทกราฟี (HPLC grade) จากบริษัท Merck และใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนสำหรับการเตรียมสารละลายทุกครั้ง

การเตรียมตัวอย่าง

ในการวิเคราะห์ใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มประเภทต่างๆ ได้แก่ นมสดยู เอช ที นมสดพาสเจอไรซ์ และนมปรุงแต่งกลิ่นรส ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไปจำนวน 5 ตัวอย่าง มาผ่านกระบวนการสกัดที่ดัดแปลงมาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Gatti & Gioia, 2005; Gratacós-Cubarśi *et al*., 2011) ดังนี้ ขั้นแรกนำตัวอย่างปริมาตร 5.00 มิลลิลิตรมาผสมกับกรดไตรฟลูออโรอะซิติกเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสมาปรับ pH ให้เป็นกลางโดยใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอนเนตเข้มข้นร้อยละ 5 แล้วนำไปสกัดอีกครั้งด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase

Extraction) โดยใช้ตัวดูดซับชนิด Oasis WCX cartridge (6 cc, 150 mg sorbent) ก่อนทำการสกัดให้ทำการเตรียมตัวดูดซับด้วยสารละลายเมทานอลและน้ำกลั่นปราศจากไอออนอย่างละ 5 มิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นใส่สารละลายตัวอย่างปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร แล้วทำการชะไทเอมีนและไรโบฟลาวินออกจากตัวดูดซับด้วยสารละลายกรดฟอร์มิกในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ชะได้มาระเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน แล้วทำการฉีดตัวอย่างเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

สภาวะของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

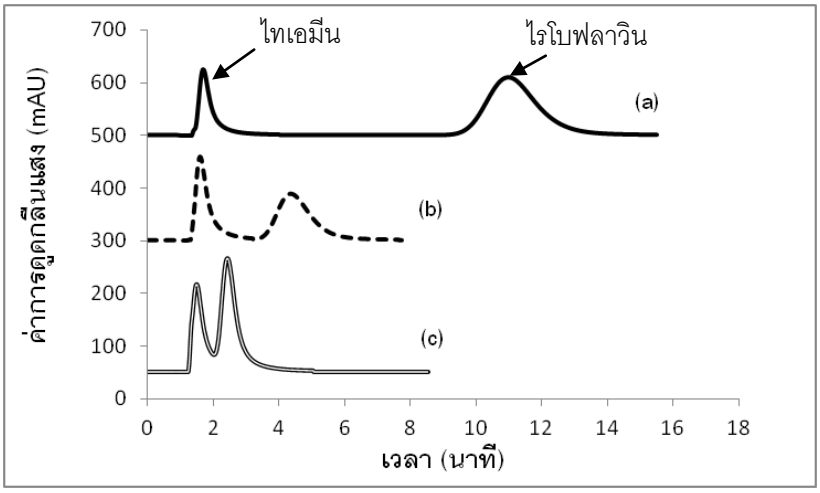
ในการวิเคราะห์ใช้เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟีของบริษัท Shimadzu รุ่น LC-20A สภาวะการแยกใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (Security Guard Cartridge, 8.0 x 3.0 mm, length x I.D.) ของบริษัท Phenomenex วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 7: 93 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรของสารที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร และตรวจวัดสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงด้วยตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 232 และ 266 นาโนเมตร สำหรับไทเอมีนและไรโบฟลาวิน ตามลำดับ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การศึกษาสภาวะการแยกที่เหมาะสม

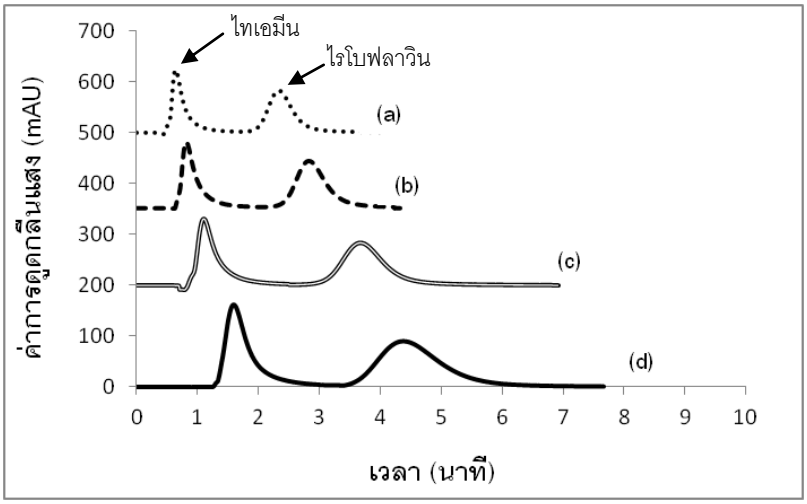
ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์ และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ส่งผลต่อสภาวะการแยกของสารละลายมาตรฐานผสมของไทเอมีนและไรโบฟลาวินที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 x 3.0 mm, length x I.D.) และใช้สารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นสภาวะที่ไทเอมีนจะอยู่ในรูปของไอออนประจุ +1 และไรโบฟลาวินจะอยู่ในรูปที่ไม่มีประจุ จึงสามารถแยกพร้อมกันได้โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (Dwivedi *et al*., 1973; Maslowska *et al.,* 1984) และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของไทเอมีนและไรโบฟลาวินที่ความยาวคลื่น 232 และ 266 นาโนเมตร ตามลำดับ

ผลการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่เมื่อใช้สารละลายผสมระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ 5:95, 7:93 และ10:90 โดยปริมาตร แสดงดังภาพที่ 2 ผลการทดลองพบว่าที่อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ร้อยละ 5:95 และร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร (ภาพที่ 2a-b) การแยกระหว่างไทเอมีนและไรโบฟลาวินเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์และลักษณะของพีคมีความสมมาตรกัน โดยเวลาการคงอยู่ (R_t) ของสารทั้งสองชนิดมีค่าลดลงตามความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่การใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราส่วนร้อยละ 10:90 โดยปริมาตร ไม่สามารถแยกพีคของไทเอมีนและไรโบฟลาวินออกจากกันได้ (ภาพที่ 2c) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราส่วนระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่ร้อยละ 7:93 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ไทเอมีนและไรโบฟลาวินแบบพร้อมกันทั้งในด้านความสมมาตรของพีคและเวลาที่ใช้ในการแยก



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของไทเอมีนและไรโบฟลาวิน เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วนร้อยละ (a) 5:95 โดยปริมาตร (b) 7:93 โดยปริมาตร และ (c) 10:90 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที

ภาพที่ 3 แสดงผลของการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วง 0.10 - 0.20 มิลลิลิตรต่อนาทีสำหรับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมของไทเอมีนและไรโบฟลาวิน โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซิเตตที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) อัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร จะเห็นได้ว่าเมื่อลดอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ทำให้สารทั้งสองชนิดอยู่ภายในคอลัมน์ได้ระยะเวลานานขึ้น ส่งผลให้ค่าเวลาการคงอยู่ของสารทั้งสองชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากเป็นสภาวะที่สามารถแยกไทเอมีนและไรโบฟลาวินออกจากสารรบกวนต่างๆที่อยู่ในผลิตภัณฑ์นมได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของไทเอมีนและไรโบฟลาวิน เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหล (a) 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที (b) 0.18 มิลลิลิตรต่อนาที (c) 0.15 มิลลิลิตรต่อนาที และ (d) 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ไทเอมีนและไรโบฟลาวินแบบพร้อมกันโดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็กชนิด C18 (8.0 x 3.0 mm, length x I.D.) ในระบบไอโซเครติกที่พัฒนาขึ้น พบว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือสารละลายผสมระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) ในอัตราส่วนร้อยละ 7:93 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งได้ลักษณะโครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานผสมของวิตามินบีทั้ง 2 ชนิด ดังภาพประกอบ 3d จะเห็นได้ว่าภายใต้สภาวะการแยกดังกล่าวสามารถแยกไทเอมีน (R_t = 1.71 นาที) และไรโบฟลาวิน (R_t = 4.36 นาที) ออกจากกันได้เป็นอย่างดี (ค่า R_s = 2. 1) โดยใช้เวลาในการแยกไม่เกิน 8.00 นาที อีกทั้งยังคงมีประสิทธิภาพการแยกที่ดีไม่แตกต่างจากคอลัมน์ขนาดยาวและเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานขององค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, 1994) โดยมีค่า capacity factor ของไทเอมีนและไรโบฟลาวินเท่ากับ 0.8 และ 3.3 ตามลำดับ และค่า tailing factor เท่ากับ 1.75 และ 1.25 สำหรับพีคของไทเอมีนและไรโบฟลาวินตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้คอลัมน์ขนาดมาตรฐาน (ความยาว 15-25 เซนติเมตร) (Hurtado *et al*., 1997; Engel *et al*., 2010; Rodriguez *et al*., 2012) สำหรับการวิเคราะห์วิตามินทั้งสองชนิดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่าใช้เวลาในการแยกนานกว่า 15 นาที จึงเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ทำได้สะดวกและรวดเร็วมากขึ้นเนื่องจากช่วยลดระยะเวลาการวิเคราะห์ให้น้อยลง (ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 15 นาที/ตัวอย่าง) อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่และตัวทำละลายอินทรีย์ จึงเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้นอีกด้วย

การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น

ช่วงความเป็นเส้นตรง

จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของไทเอมีนที่ช่วงความเข้มข้น 0.10 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และไรโบฟลาวินที่ช่วงความเข้มข้น 0.25 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วฉีดเข้าระบบการวิเคราะห์ เมื่อนำสัญญาณพื้นที่ใต้พีคกับค่าความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่ากราฟมาตรฐานของสารทั้งสองชนิดมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.999 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (r^2 มากกว่า 0.995)

ความไวของวิธีวิเคราะห์

ค่าความไวในการวิเคราะห์ศึกษาในเทอมของค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) โดยนำสารละลายมาตรฐานผสมของไทเอมีนและไรโบฟลาวินมาทำการศึกษาด้วยวิธีเดียวกับการวิเคราะห์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม แล้วเลือกความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่มีสัดส่วนสัญญาณของไทเอมีนและไรโบฟลาวินต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีค่า LOD ของไทเอมีนและไรโบฟลาวิน เท่ากับ 50.0 และ 0.10 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับค่า LOQ ของไทเอมีนและไรโบฟลาวินมีค่าเท่ากับ 0.10 และ 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาทั้งในเทอมของความเที่ยงภายในวันเดียวกันซึ่งทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 5 ครั้ง และความเที่ยงระหว่างวันซึ่งทำการวิเคราะห์ซ้ำเป็นระยะเวลา 5 วันต่อเนื่องกัน โดยใช้สารละลายมาตรฐานผสมของไทเอมีนและไรโบฟลาวินที่ความเข้มข้น 3 ระดับ (ระดับต่ำ กลาง และสูง) ผลการศึกษารายงานโดยใช้ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ หรือ %RSD แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าค่า %RSD ของสัญญาณพื้นที่ใต้พีคสำหรับการวิเคราะห์ภายใน

วันเดียวกันอยู่ในช่วง 0.43-1.82 และสำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.34-1.90 จะเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ความเที่ยงของการวิเคราะห์เป็นที่น่าพอใจ โดยมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารทั้งสองชนิดน้อยกว่า 2.00

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ไทเอมีนและไรโบฟลาวิน

สารละลายมาตรฐาน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)	
		ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน*	ความเที่ยงระหว่างวัน*
ไทเอมีน	0.10	1.72	1.79
	10.00	1.03	1.01
	100.0	0.43	0.34
ไรโบฟลาวิน	0. 25	1.82	1.90
	25.00	0.97	1.01
	100.0	0.56	0.68

* n = 5

<u>การวิเคราะห์ปริมาณไทเอมีนและไรโบฟลาวินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม</u>

ผลการทดลองในตารางที่ 2 แสดงปริมาณไทเอมีนและไรโบฟลาวินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มประเภทต่างๆ ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไป จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มที่นำมาวิเคราะห์มีปริมาณไทเอมีนและไรโบฟลาวินอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.49 – 1.29 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.67 – 1.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับสำหรับการศึกษาค่าร้อยละของการคืนกลับทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของไทเอมีนและไรโบฟลาวินลงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 88.06 - 102.70 สำหรับการวิเคราะห์ไทเอมีน และ 81.83 – 99.39 สำหรับการวิเคราะห์ไรโบฟลาวิน โดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างทุกชนิดมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เป็นที่น่าพอใจ (มีค่าน้อยกว่า 2.50) แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้วิเคราะห์ไทเอมีนและไรโบฟลาวินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นม ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีสิ่งเจือปนมากได้เป็นอย่างดี

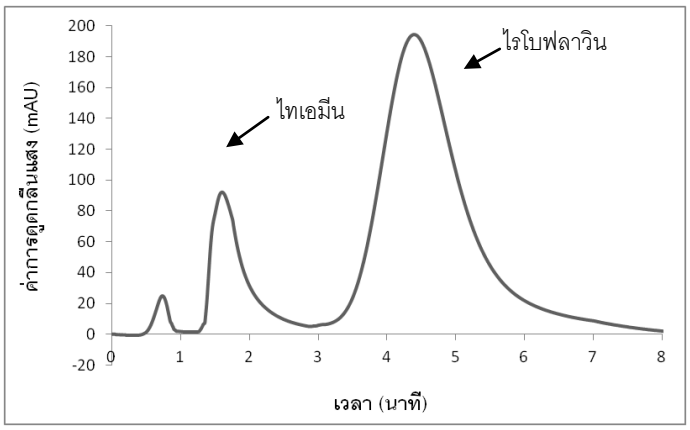
ตารางที่ *2* ปริมาณไทเอมีนและไรโบฟลาวินที่วิเคราะห์ได้และค่าร้อยละการคืนกลับในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม

ตัวอย่างนมพร้อมดื่ม	ปริมาณไทเอมีน ± SD[a] (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณไรโบฟลาวิน ± SD[a] (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของการคืนกลับ (%RSD[b])	
			ไทเอมีน	ไรโบฟลาวิน
ตัวอย่างที่ 1	0.51 ± 0.07	0.85 ± 0.01	98.84 (2. 04)	99.39 (1. 18)
ตัวอย่างที่ 2	0.49 ± 0.03	0.67 ± 0.02	97.41 (1.30)	86.87 (2.21)
ตัวอย่างที่ 3	1.29 ± 0.08	1.03 ± 0.10	102.70(2.48)	90.68 (0.65)
ตัวอย่างที่ 4	0.97 ± 0.07	0.87 ± 0.01	88.06 (1.23)	81.83 (1.19)
ตัวอย่างที่ 5	0.85 ± 0.06	0.91 ± 0.06	91.87 (1.75)	97.26 (1.60)

[a]ปริมาณ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[b]ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณไทเอมีนและไรโบฟลาวินในตัวอย่างจริงได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถแยกสัญญาณของสารทั้งสองชนิดออกจากสารรบกวนที่อยู่ในตัวอย่างได้ดี ให้ผลการแยกเป็นที่น่าพอใจ และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ดังแสดงให้เห็นในตัวอย่างโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ไทเอมีนและไรโบฟลาวินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มตัวอย่างที่ 3

สรุปผลการวิจัย

ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ไทอามีนและไรโบฟลาวินในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก (ความยาว < 1.00 เซนติเมตร) และมีวัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างแอซิโตไนไตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมแอซีเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) อัตราส่วนร้อยละ 7 : 93 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.10 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณไทเอมีนและไรโบฟลาวินที่มีประสิทธิภาพดี

รวดเร็ว ราคาถูก อีกทั้งยังได้วิธีวิเคราะห์ทางเลือกใหม่ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์น้อยมากเมื่อเทียบกับเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบทั่วไป นอกจากนี้วิธีที่พัฒนาขึ้นยังให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ สามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มซึ่งเป็นตัวอย่างประเภทหนึ่งที่มีสิ่งเจือปนสูงได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2558

เอกสารอ้างอิง

Dwivedi, B.K., Arnold, R.G. (1973). Chemistry of Thiamine Degradation on Food Products and Model Systems. Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *21*, 54-60.

Engel, R., Stefanovit-Bányai, E., & Abrankó, L. (2010). LC Simultaneous Determination of the Free Forms of B Group Vitamins and Vitamin C in Various Fortified Food Products. *Chomatographia, 71*, 1069–1074.

Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. (1994). *Validation of Chromatographic Methods*. Retrieved December 3, 2015, from http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf

Gatti, R., Gioia, M.G. (2005). Liquid Chromatography Determination with Fluorescence Detection of B_6 Vitamers and Riboflavin in Milk and Pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta, 538*, 135-141.

Gratacós-CubarŚi, M., Sárraga, C., Clariana, M., Garćia Regueiro, J.A., Castellari, M. (2011). Analysis of Vitamin B1 in Dry-Cured Sausages by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Array Detection. *Meat Science, 87*, 234-238.

Hurtado, S.A., Nogués, M.T.V., Pulido, M.I., & Font, A.M. (1997). Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, *778*, 247-253.

Kall, M.A. (2003). Determination of total vitamin B6 in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. *Food Chemistry*, *82*, 315-327.

Le, X.C., Ma, M. (1998). Short-Column Liquid Chromatography with Hydride Generation Atomic Fluorescence Detection for the Speciation of Arsenic. *Analytical Chemistry*, *70*, 1926-1933.

Liu, S., Zhang, Z., Liu, Q., Luo, H., & Zheng, W. (2002). Spectrophotometric determination of vitamin B1 in a pharmaceutical formulation using triphenylmethane acid dyes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *30*, 685-694.

Márquez-Sillero, I., Cárdenas, S., & Valcárcel, M. (2013). Determination of Water-Soluble Vitamins in Infant Milk and Dietary Supplement Using a Liquid Chromatography on-line Coupled to a Corona-charged Aerosol Detector. *Journal of Chromatography A*, *1313*, 253– 258.

Maslowska, J., Malicka, M. (1984). Potentiometric and Spectrophotometric Studies on Acidic-Basic Properties of Riboflavin. *Polish Journal of Chemistry*. *58*, 503-510.

Rodriguez, R.S.J, Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Sánchez-Mata, M.C. (2012). Simultanous Determination of Vitamin B1 and B2 in Complex Cereal Foods, by Reverse phase Isocratic HPLC-UV. *Journal of Cereal Science, 55*, 293-299.

Tanner J.T., Barnett S.A. (1986). Methods of Analysis for Infant Formula: Food and Drug Administration and Infant Formula Council Collaborative Study, Phase III. *Journal-Association of Official Analytical Chemists, 69,* 777-785.

Wu, X., Diao, Y., Sun, C., Yang, J., Wang, Y., & Sun, S. (2003). Fluorimetric determination of ascorbic acid with *o*-phenylenediamine. *Talanta, 59*, 95-99.

Yin,C., Cao,Y., Ding,S., Wang,Y. (2008). Rapid Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins with Microemulsion Electrokinetic Chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1193*, 172-177.

Youngvises, N., Chaida, T., Khonyoung, S., Kuppithayanant, N., Tiyapongpattana, W., Itharat, A., Jakmunee, J. (2013). Greener Liquid Chromatography Using a Guard Column with Micellar Mobile Phase for Separation of Some Pharmaceuticals and Determination of Parabens. *Talnata*, *106*, 350-359.

Youngvises, N., Liawruangrath, B., Liawruangrath, S. (2003). Simultaneous Micellar LC Determination of Lidocaine and Tolperisone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *31*, 629-638.