

โครงการวิจัย

เรื่อง

พฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนภายใต้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด สำหรับการชะแบบไอโซครติกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบผันกลับ

Retention behaviour of β -carotene under binary mobile phase for isocratic elution by reversed-phase high performance liquid chromatography

ศูนย์วิจัยการวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

นางสาวจิราภรณ์ หนูยิ้มชัย

นางสาวนิธวีดี จุลนิต

นางสาวมณฑกานต์ จันทรัมย์

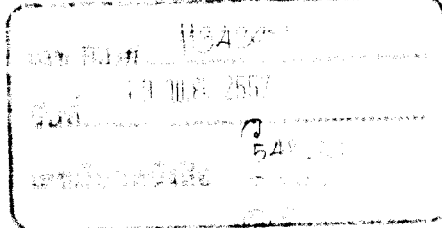
โครงการวิจัยทางเคมีนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาตรี

โปรแกรมวิชาเคมีและเคมีประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ปีการศึกษา 2556



ชื่อโครงการวิจัย พฏิกิริยาการถูกชะของเบต้าแคโรทีนภายใต้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด สำหรับการชะแบบไอโซครีติกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบผันกลับ

ผู้ทำวิจัย 1. นางสาวจิราภรณ์ หนูยิ้มชัย รหัสนักศึกษา 534275004
2. นางสาวนิธิตี จุลนิล รหัสนักศึกษา 534275012
3. นางสาวมณฑกานต์ จันทร์รังษี รหัสนักศึกษา 534275023

โปรแกรมวิชา เคมีและเคมีประยุกต์


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรรุวรรณ สุจริต)
กรรมการที่ปรึกษา


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรรุวรรณ สุจริต)
ประธานกรรมการสอบ



.....
(อาจารย์รวิรัตน์ ทองศรีนุ่น)
กรรมการสอบ


.....
(อาจารย์นันทิยา เป้าทอง)
กรรมการสอบ


.....
(อาจารย์จिरภา คงเขียว)
ประธานโปรแกรม


.....
(อาจารย์จिरภา คงเขียว)
อาจารย์ประจำวิชา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีได้รับรองโครงการวิจัย (โครงการงาน) นี้เป็นส่วนของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาเคมี


.....
(ดร.พิพัฒน์ ลิ้มปะนพิทยาธร)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ชื่อโครงการวิจัย	พฤติกรรมกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนภายใต้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด สำหรับการชะแบบไอโซคราติกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบผันกลับ		
ผู้ทำโครงการวิจัย	นางสาวจิราภรณ์ หนูยิ้มชัย	รหัสนักศึกษา	534275004
	นางสาวนิรวิดี จุลนิล	รหัสนักศึกษา	534275012
	นางสาวมณฑกานต์ จันทรงษ์	รหัสนักศึกษา	534275023
โปรแกรมวิชา	เคมีและเคมีประยุกต์		
ปีการศึกษา	2557		

บทคัดย่อ

ในการศึกษาพฤติกรรมกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน ภายใต้ระบบ isocratic โดยเทคนิค RP-HPLC ด้วยคอลัมน์ C-18 ได้ใช้สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ดังนี้ ความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลเท่ากับ 445 นาโนเมตร (nm) และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร/นาที (mL/min) โดยชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายผสม 2 ชนิด จำนวน 2 แบบ ได้แก่ iso-propanol-Methanol (MeOH) และ iso-propanol-Acetonitrile (ACN) ที่มีสัดส่วนโดยปริมาตร (volume fractions; ψ) ของ iso-propanol ใน MeOH หรือ ACN เท่ากับร้อยละ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 เมื่อชะที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส (°C) ในการศึกษาได้อธิบายอันตรกิริยาของเบต้าแคโรทีนในระหว่างการถูกชะ โดยการเขียนกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่สารถูกหน่วงอยู่กับเฟสคงที่เทียบกับเวลาที่สารถูกชะออกมากับเฟสเคลื่อนที่ (retention factor; k) กับค่า ψ พบว่าได้กราฟแบบเอกซ์โพเนนเชียล ที่อธิบายด้วยสมการ $k = ae^{-b\psi}$ นอกจากนี้ได้เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และ $\log k$ กับ ψ พบว่าได้กราฟเส้นตรงที่สามารถอธิบายด้วยสมการที่แตกต่างกัน ได้แก่ $1/k = S\psi + 1/k_0$ และ $\log k = -S\psi + \log k_0$ ตามลำดับ จากกราฟเส้นตรงทั้ง 2 แบบ ได้ใช้พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีต่าง ๆ ได้แก่ S, $1/k_0$ และ $\log k_0$ มาอธิบายการถูกชะของเบต้าแคโรทีน เมื่อใช้ MeOH หรือ ACN เป็นเฟสเคลื่อนที่เพียงอย่างเดียวจากการศึกษาพบว่า ตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN ที่ ψ เท่ากับร้อยละ 0.25 เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการชะเบต้าแคโรทีนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 13.97 นาที โดยวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 5 ถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) ที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9998 ค่าร้อยละของการได้กลับคืนมาเท่ากับ 99.26 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) เท่ากับ 0.81% ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณต่ำสุดที่ตรวจหาปริมาณ (LOQ) ได้มีค่าเท่ากับ 0.64

มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีการที่ได้พัฒนาได้นำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผักที่แตกต่างกัน 7 ชนิด พบว่ามีปริมาณเบต้าแคโรทีนในแครอท เท่ากับ 1130.81 ผักโขม เท่ากับ 451.90 ฟักทอง เท่ากับ 361.48 คะน้า เท่ากับ 252.94 มะเขือเทศ เท่ากับ 211.27 และบรอกโคลี เท่ากับ 193.65 กรัมต่อกิโลกรัม (g/kg) ส่วนสาหร่ายผมนางไม่สามารถตรวจวัดเบต้าแคโรทีนได้



Project	Retention behaviour of β -carotene under binary mobile phase for isocratic elution by reversed-phase high performance liquid chromatography		
Author	Miss.Jiraporn Nooyimsai	No. 534275004	
	Miss.Nithiwadee Jullanin	No. 534275012	
	Miss.Monthakan Jantharangsri	No. 534275023	
Major Program	Chemistry and Applied Chemistry		
Academic Year	2013		

Abstract

The retention behaviour of β -carotene under isocratic elution by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with C-18 column has been studied using the optimal conditions of HPLC instrument, i.e. maximum wave length of UV-visible at 445 nm, and flow rate of mobile phase at 1.5 mL/min. In the elution study, two binary mobile phases, i.e. 2-propanol-methanol (MeOH) and 2-propanol-acetonitrile (ACN) at different volume fractions (ψ); 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 and 0.25% under defined temperatures, i.e. 25 and 35°C were studied. In this study, the interactions of β -carotene during elution have been described by the plot of dependency of retention factor (k) on ψ and the exponential dependency was obtained with its describing by equation; $k = ae^{-b\psi}$. In addition, other dependencies, i.e. $1/k$ on ψ , and $\log k$ on ψ were also plotted and the linear dependencies were obtained with their describing by different equations; $1/k = S\psi + 1/k_0$ and $\log k = -S\psi + \log k_0$, respectively. Various chromatographic parameters, i.e. S , $1/k_0$ and $\log k_0$ derived from those linear plots have been also used to describe the elution of β -carotene when pure MeOH or ACN using for mobile phase was carried out. From this finding, the mixed solvents comprising iso-propanol in ACN at $\psi = 0.25\%$ were shown as the optimal binary mobile phase to elute β -carotene at 35°C for 13.97 min. The validations of this method with the linearity in the range of 5 to 80 mg/L, the correlation coefficient (r^2) of 0.9998, the percent recovery of 99.26%, the relative standard deviation (RSD) of 0.81%, the lower of detection (LOD) of 0.06 mg/L and the lower of quantification (LOQ) of 0.64 mg/L were obtained. The developed method has been applied to quantify β -carotene in different

seven samples of vegetable. From the determination, it was found that the amounts of β -carotene in carrot of 1130.81, spinach of 451.90, pumpkin of 361.48, kales of 252.94, tomato of 211.27 and broccoli of 193.65 g/kg were obtained, whereas the amount of β -carotene in *Gracilaria fisheri* was non-detectable.



กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จากรวรรณ สุจริต ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำการดำเนินการวิจัย ทุกขั้นตอน และให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ ทั้งในด้านของการดำเนินการทดลอง และในส่วนของ การเขียนรูปเล่ม ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ อย่างดียิ่ง อีกทั้งทำให้ ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ในการทำงานวิจัย ได้รู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัยอีกด้วย ขอขอบพระคุณอาจารย์นรรัตน์ ทองศรีนุ่น และอาจารย์นันทิยา เป้าทอง กรรมการสอบ โครงการวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาทุกท่านที่ได้ให้ความรู้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือและสารเคมีในการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ พ่อแม่ พี่น้อง และเพื่อน ๆ ที่ให้กำลังใจ ชี้นำแนวทางปฏิบัติที่ดี และสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

จิราภรณ์ หนูยิ้มชัย	รหัสนักศึกษา 534275004
นิธิวดี จุลนิล	รหัสนักศึกษา 534275012
มณฑกานต์ จันทรงษ์	รหัสนักศึกษา 534275023

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญรูปภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตของงานวิจัย	3
สถานที่ทำการวิจัย	3
วิธีการดำเนินงานวิจัย	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
ลักษณะทั่วไปของเบต้าแคโรทีน	4
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	7
1. คอลัมน์	8
1.1 บอนด์เฟสชนิดเฟสธรรมดา	8
1.2 บอนด์เฟสชนิดเฟสผันกลับ	8
2. เครื่องตรวจวัด	9
2.1 Bulk property	9
2.2 Solute property	9
2.2.1 เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์	9
2.2.2 เครื่องตรวจวัดชนิดโรแฟรกโทมิเตอร์	10
2.2.3 เครื่องตรวจวัดชนิดอิเล็กโทรเคมีคัล	10
2.2.4 เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี-วิชิเบิล	10
(1) fixed-wavelength detectors	10
(2) variable-wavelength detector	10
(3) diode array detector	10

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3. เครื่องสูบ	11
4. ระบบควบคุมและประมวลผล งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11 12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินวิจัย	
1. เครื่องมือและอุปกรณ์สารเคมี	17
1.1 เครื่องมือ	17
1.2 อุปกรณ์	17
2. สารเคมีการเตรียมสารละลาย และการกรองและการไล่แก๊สในเฟสเคลื่อนที่	18
2.1 สารเคมี	18
2.2 การเตรียมสารละลาย	19
(1) สารละลายสต็อกเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 400 mg/L	19
(2) สารละลายมาตรฐานสำหรับการใช้งานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L	19
(3) สารละลายอะซิโตน 90% โดยปริมาตร (v/v)	19
2.3 การกรองและการไล่แก๊สในเฟสเคลื่อนที่เพื่อเตรียมการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง HPLC ในระบบ Isocratic	19
3. วิธีการทดลอง	20
3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC	20
3.1.1 การศึกษาความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล ของเบต้าแคโรทีน	20
3.1.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการชะเบต้าแคโรทีน	20
3.1.3 การศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม	20
3.2 การศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ที่มีผลต่อการชะเบต้าแคโรทีน	21
3.2.1 การศึกษาผลของเฟสเคลื่อนที่ของตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH	21
3.2.2 การศึกษาผลของเคลื่อนที่ของตัวทำละลายผสมระหว่าง n-propanol:MeOH	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.3 การศึกษาเฟสผลของเคลื่อนที่ของตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN	22
3.2.4 การศึกษาผลของเฟสเคลื่อนที่ของตัวทำละลายผสมระหว่าง n-propanol:ACN	22
3.3 การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน	22
3.3.1 การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้ เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH	22
3.3.2 การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้ เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN	23
3.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์	23
3.4.1 การทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง	23
3.4.2 การทดสอบความแม่นยำ	24
3.4.3 การทดสอบความเที่ยง	25
3.4.4 การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและปริมาณต่ำสุด ที่ตรวจหาปริมาณได้	26
3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนจากตัวอย่างผัก	27
3.5.1 การเตรียมตัวอย่างผัก	27
3.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนโดยเทคนิค HPLC	27
3.6 การคำนวณ	28
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผล	
1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC	29
1.1 การศึกษาความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล	29
1.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการชะเบต้าแคโรทีน	30
1.3 การศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม	31
2. การศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ที่มีผลต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3. การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน	34
3.1 การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้ เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH	34
3.2 การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้ เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:CAN	41
3.3 การพิจารณาผลของพารามิเตอร์ที่ได้จากการเขียนกราฟ ต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน	46
3.3.1 ผลของความชันของกราฟเส้นตรง	46
3.3.2 ผลของจุดตัดแกน y ของกราฟเส้นตรง	47
3.4 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้ เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดที่ $\psi = 0.25\%$	49
4. การทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์	51
4.1 การทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง	51
4.2 การทดสอบความแม่นยำ	52
4.3 การทดสอบความเที่ยง	53
4.4 การหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและปริมาณต่ำสุด ที่ตรวจหาปริมาณได้	54
5. การวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนจากตัวอย่างผัก	55
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	
สรุปผลการทดลอง	56
ข้อเสนอแนะ	56
แนวทางการพัฒนา	57
บรรณานุกรม	58
ภาคผนวก	63
ก. ผลของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC	64
ข. ผลของการศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ที่มีผลต่อการชะเบต้าแคโรทีน	65

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ค. ผลของการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน	67
ง. วิธีคำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีน	72
จ. Abstract ที่ได้ไปนำเสนอใน The 39 th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 39)	73
ช. Abstract และ Highlight ที่ส่งไปนำเสนอใน Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2015) (in process)	74
ประวัติผู้ทำโครงการวิจัย	



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	18
ตารางที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับค่ารีชันโทม์เฉลี่ย	30
ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กับค่ารีชันโทม์เฉลี่ยและความดันของเครื่อง HPLC	31
ตารางที่ 4.3 สภาพที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC	32
ตารางที่ 4.4 แสดงค่า $t_{r,av}$ และ $t_{0,av}$ ของเบต้าแคโรทีน เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	33
ตารางที่ 4.5 พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการศึกษาพฤติกรรม การถูกชะ ของเบต้าแคโรทีน โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH	39
ตารางที่ 4.6 พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการศึกษาพฤติกรรม การถูกชะ ของเบต้าแคโรทีน โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN	44
ตารางที่ 4.7 แสดงค่าพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการศึกษาพฤติกรรม การถูกชะของเบต้าแคโรทีน โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสม 2 ชนิด ที่มีสภาพขั้วต่างกันด้วยเทคนิค RP-HPLC	48
ตารางที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน เบต้าแคโรทีนกับค่าพื้นที่ใต้พีค	51
ตารางที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน เบต้าแคโรทีนกับค่าพื้นที่ใต้พีค	53
ตารางที่ 4.10 ผลการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L	54
ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก	55
ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลของเบต้าแคโรทีน	64
ตารางที่ ก.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับค่า t_r เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v) และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	65
ตารางที่ ก.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กับค่า t_r และ ความดันของเครื่อง HPLC เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v) ที่อุณหภูมิ 35 °C	65

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ ข.1 แสดงค่า t_r , t_0 และค่า k ของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 35 °C	66
ตารางที่ ค.1 แสดงค่า t_r , t_0 และค่า k ของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0:100 (v/v), 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 25 °C	67
ตารางที่ ค.2 แสดงค่า t_r , t_0 และค่า k ของเบต้าแคโรทีน เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0:100 (v/v), 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 35 °C	68
ตารางที่ ค.3 แสดงค่า t_r , t_0 และค่า k ของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 0:100 (v/v), 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 25 °C	69
ตารางที่ ค.4 แสดงค่า t_r , t_0 และค่า k ของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0:100 (v/v), 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 35 °C	70
ตารางที่ ค.5 แสดงค่า $1/k$ และ $\log k$ ของเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN เมื่อค่า ψ เท่ากับ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (%) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C	71
ตารางที่ ง.1 แสดงปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก	72

สารบัญรูปภาพ

	หน้า	
รูปที่ 1.1	แสดงโครงสร้าง β -carotene	1
รูปที่ 2.1	แผนภาพแสดงส่วนประกอบของเครื่อง HPLC	8
รูปที่ 4.1	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่น	29
รูปที่ 4.2	แสดงการเปรียบเทียบค่า k โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ เมื่อใช้สภาวะของเครื่อง HPLC ดังนี้ อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 5:95 (v/v), อุณหภูมิของคอลัมน์ 35 °C และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min	34
รูปที่ 4.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า k กับ ψ ของ iso-propanol ใน MeOH(%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบด้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	35
รูปที่ 4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ ของ iso-propanol ใน MeOH (%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบด้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	36
รูปที่ 4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ ของ iso-propanol ใน MeOH (%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบด้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	38
รูปที่ 4.6	แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเบด้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L ที่อุณหภูมิ 25 °C และที่ 35 °C ด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH (25:75v/v) ที่ $\psi = 0.25\%$ เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	40
รูปที่ 4.7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า k กับ ψ ของ iso-propanol ใน ACN (%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบด้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	41

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.8	42
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ ของ iso-propanol ใน ACN (%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	
รูปที่ 4.9	43
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ ของ iso-propanol ใน ACN (%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	
รูปที่ 4.10	45
โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L ที่อุณหภูมิ 25 °C และที่ 35 °C ด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN (25:75v/v) ที่ $\psi = 0.25\%$ เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	
รูปที่ 4.11	46
แสดงการเปรียบเทียบค่าความชันของกราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k$ กับ ψ เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C	
รูปที่ 4.12	47
แสดงการเปรียบเทียบค่า $1/k_0$ ที่ได้จากกราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k_0$ ที่ได้จากกราฟที่เขียนระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN	
รูปที่ 4.13	49
โครมาโทแกรมของสารละลายเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า $\psi = 0.25\%$ ของ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN(b) ที่อุณหภูมิ 25 °C และที่ 35 °C โดยเทคนิค RP-HPLC เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	
รูปที่ 4.14	50
โครมาโทแกรมของสารละลายเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า $\psi = 0.25\%$ ของ iso-propanol:MeOH(2) และ iso-propanol:ACN(1) ที่อุณหภูมิ 35 °C โดยเทคนิค RP-HPLC เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min	

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 4.15 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย
มาตรฐานเบต้าแคโรทีน (mg/L) และพื้นที่ใต้พีค $\times 10^5$ (mAU)
เมื่อสภาวะของเครื่อง HPLC ดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN
อัตราส่วน 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min
ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 445 nm ที่อุณหภูมิ 35 °C

หน้า

52

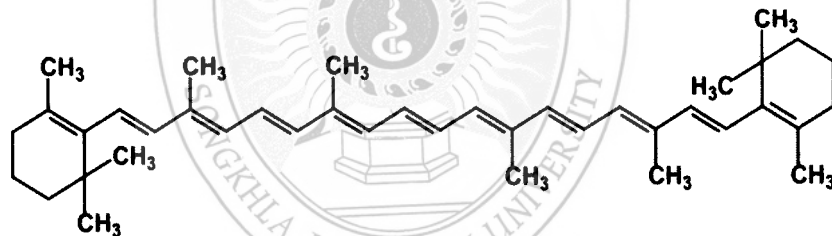


บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เบต้าแคโรทีน (β -carotene) คือสารตั้งต้นของวิตามินเอที่เรียกว่า โปรวิตามินเอ พบในผักและผลไม้ที่มีสีส้ม เหลือง เขียว หรือแดง เบต้าแคโรทีนเป็นสารประกอบที่มีความสำคัญต่อสุขภาพ โดยสามารถเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้แข็งแรง เบต้าแคโรทีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง อย่างไรก็ตามหากได้รับเบต้าแคโรทีนในปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งอาจเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งได้ (Rao and Honglei, 2002) เบต้าแคโรทีนมีโครงสร้าง ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้าง β -carotene

ที่มา: (<https://www.google.co.th/search?q=โครงสร้างเบต้าแคโรทีน> 14/04/2014)

จากรูปที่ 1.1 จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของเบต้าแคโรทีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่มีสภาพขั้ว (non-polar organic compound) ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมในการนำมาศึกษาพฤติกรรม การถูกชะด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบผั้กลับ (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography; RP-HPLC) เนื่องจากทำการศึกษาโดยใช้คอลัมน์ C-18 ซึ่งหมู่ฟังก์ชันที่ผิวซิลิกาภายในคอลัมน์มีสภาพขั้วที่ต่ำทำให้สามารถเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ตามสภาพขั้วต่าง ๆ ได้ โดยการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของสารอินทรีย์ที่เติมลงไป (organic modifier) ในตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่เพื่อปรับเปลี่ยนสภาพขั้วและสามารถชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ได้

จากรายงานการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน โดยเทคนิค HPLC ที่ผ่านมา เช่น Rajendran *et al.* (2005) ได้ใช้เฟสคงที่ (stationary phase) เป็นคอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นไอโซโพรพานอลซึ่งมีดัชนีสภาพขั้ว (polarity index ; P_1) เท่ากับ 3.9 ผสมกับเมทานอลซึ่งมีดัชนีสภาพขั้ว เท่ากับ 5.1 ในอัตราส่วน 1:99 v/v และใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate) เท่ากับ 1.5 mL/min พบว่าเบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ที่เวลา 29.05 นาที (min) ในขณะที่ Xu *et al.* (2006) ได้เปลี่ยนชนิดของเฟสเคลื่อนที่เป็นไดคลอโรมีเทน ($P_1 = 3.1$) และอะซิโตไนไตรล์ ($P_1 = 5.8$) ผสมในอัตราส่วน 25:75 (v/v) เพื่อศึกษาการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสคงที่เป็นคอลัมน์ C-18 และใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เท่ากัน พบว่าเบต้าแคโรทีนถูกชะที่เวลา 10.1 นาที แสดงว่าเมื่อปรับสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ให้ต่ำลงโดยการเติมสารอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วที่ต่ำกว่าจะทำให้เบต้าแคโรทีนเกิดอันตรกิริยากับเฟสเคลื่อนที่ได้ดีขึ้นทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ C-18 ได้เร็วขึ้น จากรายงานการศึกษาดังกล่าวแสดงว่าการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของสารอินทรีย์ที่เติมลงไปในตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่เพื่อปรับสภาพขั้วจะมีผลต่อพฤติกรรมการถูกชะและเวลาในการถูกชะของเบต้าแคโรทีน

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน โดยใช้ระบบเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ที่มีสภาพขั้วที่แตกต่างกันโดยมีสัดส่วนของตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดคงที่ตลอดการชะ (isocratic binary mobile phases) ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก 7 ชนิด ได้แก่ แครอท ฟักทอง มะเขือเทศ บรอกโคลี กระเทียม ผักโขม และสาหร่ายผมนาง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน โดยใช้เทคนิค RP-HPLC ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ที่มีสภาพขั้วที่แตกต่างกัน
2. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก 7 ชนิด ได้แก่ แครอท ฟักทอง มะเขือเทศ บรอกโคลี กระเทียม ผักโขม และสาหร่ายผมนาง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก 7 ชนิด
2. ทราบถึงชนิดของเฟสเคลื่อนที่และอัตราส่วนของตัวทำละลาย 2 ชนิดที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก 7 ชนิด
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปได้

ขอบเขตของการศึกษา

1. ศึกษาความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสเบิลของเบต้าแคโรทีน
2. ศึกษาอุณหภูมิของคอลัมน์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการชะเบต้าแคโรทีน
3. ศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม
4. ศึกษาพฤติกรรมของการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ ในระบบ isocratic binary mobile phases
5. ศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมเมื่อใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก 7 ชนิด
6. ทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์
7. วิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก 7 ชนิด

สถานที่ทำการวิจัย ทดลอง หรือเก็บข้อมูล

การวิจัยได้ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเคมี ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. รวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้อง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีน
3. ศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่และอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการศึกษาพฤติกรรมของการถูกชะของเบต้าแคโรทีน
4. ศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมเมื่อใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก 7 ชนิด
5. ทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์
6. วิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก 7 ชนิด
7. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย
8. จัดทำรายงาน

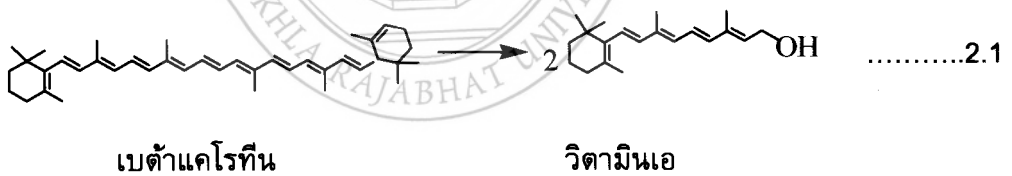
บทที่ 2

ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปของเบต้าแคโรทีน

เบต้าแคโรทีนเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งที่พบในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) มีสูตรทางเคมี คือ $C_{40}H_{56}$ มีมวลโมเลกุล 536.87 กรัมต่อโมล (g/mol) ความหนาแน่นเท่ากับ 0.941 ± 0.06 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (g/cm^3) มีจุดหลอมเหลว 180-182 °C เบต้าแคโรทีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่มีสภาพขั้ว มีลักษณะเป็นผลึกสีเข้ม ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซิโตน เบนซิน คลอโรฟอร์ม คาร์บอนไดซัลไฟด์และเมทานอล เป็นต้น (เบต้าแคโรทีน, 2556) เบต้าแคโรทีนจะสลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงหรือเมื่อถูกออกซิไดซ์ และจะสามารถพบเบต้าแคโรทีนได้ในผักหรือผลไม้ที่มีสีเขียวยและเหลือง เช่น ฟักทอง แครอท ผักโขม บรอกโคลี คื่นห่าน มะเขือเทศ มะละกอสุก และมะม่วง เป็นต้น (HealthToday, 2547)

เบต้าแคโรทีนเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของวิตามินเอ ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของเบต้าแคโรทีนจะให้วิตามินเอ 2 โมเลกุล ดังแสดงในสมการ



โดยที่เบต้าแคโรทีน 6 มิลลิกรัม (mg) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นวิตามินเอ 1 RE (retinol equivalent) (กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2546) หากมีปริมาณเบต้าแคโรทีนในร่างกายสูงจะส่งผลให้มีปริมาณวิตามินเอสูงด้วย นอกจากนี้เบต้าแคโรทีนยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีประโยชน์ต่อร่างกายหลายด้าน ได้แก่ ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยบำรุงผิวพรรณไม่ให้เหี่ยวเฉา และช่วยบำรุงดวงตา เป็นต้น (ข้อมูลโภชนาการ, 2549)

จากผลการศึกษาและวิจัยจำนวนมากพบว่าการรับประทานเบต้าแคโรทีนอย่างสม่ำเสมอ จะช่วยให้จำนวนอนุมูลอิสระลดลง เนื่องจากเบต้าแคโรทีนจะไปทำหน้าที่กระตุ้นให้ที-เฮลเปอร์ (T-helper) ซึ่งเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกัน ให้ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระหรือด้านสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีแหล่งที่มาจากทั้งภายนอกและภายในร่างกาย ตัวอย่างของแหล่งที่มา

จากภายนอกร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ คาร์บอนหรือ แสงแดด รังสีแกมมา คลื่นความร้อน และอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือธาตุเหล็กในปริมาณสูง ส่วนแหล่งที่มาจากภายในร่างกาย ได้แก่ การเผาผลาญของเซลล์โดยใช้ออกซิเจน ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด (วารสารโภชนาการ ฉบับที่ 2, 2553) อีกทั้งยังเป็นปัจจัยที่ทำให้โรคมีพัฒนาการอย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงยิ่งขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมและความบกพร่องของเซลล์ประสาท เช่น โรคต้อกระจกในผู้สูงอายุ โรคเนื้อเยื่ออักเสบ เป็นต้น (โอภา วัชรคุปต์, 2549)

ในทางการแพทย์มีข้อมูลการศึกษาของเบต้าแคโรทีนที่ชี้ให้เห็นถึงผลของเบต้าแคโรทีนที่ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและลดจำนวนอนุมูลอิสระที่จะก่อให้เกิดโรคได้ ตัวอย่างเช่น Watson (1991) แห่งมหาวิทยาลัยแอริโซนา ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ทำการศึกษาดังกล่าวของเบต้าแคโรทีนที่ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย โดยให้ชายและหญิง จำนวน 60 คน รับประทานผักและผลไม้เพื่อให้ได้ปริมาณเบต้าแคโรทีน 30-60 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่า ชายและหญิงวัย 60 ปี มีภูมิคุ้มกันร่างกายเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งภูมิคุ้มกันนั้นวัดได้จากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะถูกกระตุ้นหรือเกิดการแบ่งเซลล์ ทำให้พร้อมที่จะทำงาน และเมื่อหยุดรับประทานผักผลไม้พบว่าภูมิคุ้มกันค่อย ๆ ลดลง จนกระทั่งมีระดับกลับสู่ค่าเดิมก่อนที่จะมีการรับประทานผักและผลไม้ และเมื่อตรวจวัดปริมาณเบต้าแคโรทีนในร่างกายพบว่าเบต้าแคโรทีน ขนาด 30-60 มิลลิกรัม นั้นได้มาจากการรับประทานแครอทประมาณ 5-10 หัว และจากการรับประทานมันฝรั่งบด 2-4 ชีดต่อวัน (200-400 กรัม (g)) รวมถึงยังมีการศึกษาผลของเบต้าแคโรทีนที่มีต่อการลดจำนวนอนุมูลอิสระที่จะก่อให้เกิดโรคโดยเฉพาะโรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญอันดับที่ 2 หรือ 3 และคาดการณ์ว่าในอีก 10 ปี ข้างหน้าจะมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งประมาณ 11 ล้านคน ทั่วโลก สำหรับสถานการณ์โรคมะเร็งในประเทศไทย พบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับที่ 1 ติดต่อกันมากกว่า 6 ปี และนับวันยิ่งเพิ่มจำนวนมากขึ้น (อัญชุลี อุทา, 2554) การลดโอกาสในการเกิดโรคมะเร็งของผู้ที่เคยสูบบุหรี่นั้นเกิดจากการให้ผู้ที่เคยสูบบุหรี่รับประทานผักและผลไม้ที่มีเบต้าแคโรทีนเป็นระยะเวลา 9 ปี เพื่อให้เบต้าแคโรทีนมีปริมาณมากพอที่จะสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค จากนั้นจึงตรวจวัดปริมาณเบต้าแคโรทีนในร่างกาย พบว่าผู้ที่มีปริมาณเบต้าแคโรทีนในปริมาณที่ต่ำมีโอกาสเกิดโรคมะเร็งกล่องเสียงเป็น 5 เท่า ของผู้ที่รับประทานผักและผลไม้อย่างสม่ำเสมอ (วารสารโภชนาการ ฉบับที่ 2, 2553) ทั้งนี้นอกจากเบต้าแคโรทีนจะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีแล้ว เมื่อร่างกายได้รับเบต้าแคโรทีน ดับจะทำหน้าที่ย่อยสลายจนได้เป็นวิตามินเอ ร่างกายจึงนำไปใช้ในการสร้างสารโรดอปซิน (rhodopsin) และเรตินา (retina) ในตา ทำให้ตามีความสามารถในการมองเห็นในเวลากลางคืน และช่วยลดความเสี่ยงของเซลล์ลูกตา ลดความเสี่ยงในการเป็นต้อกระจก เป็นต้น (HealthToday, 2547) ดังนั้น การรับประทานผักและผลไม้ที่มีเบต้าแคโรทีนอย่างสม่ำเสมอจะช่วยให้อนุมูลอิสระที่มีในร่างกายลดลง และลดความเสี่ยงในการเกิดโรคได้

แต่อย่างไรก็ตามหากได้รับประทานเบต้าแคโรทีนในปริมาณที่มากอาจจะก่อให้เกิดโทษได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น หญิงวัย 20 ปีที่รับประทานผักทองเป็นประจำหลังอาหารนาน 2 ปี พบว่า มีความผิดปกติเกิดขึ้น คือ มีไข้ ขาบวม ผิวแห้ง น้ำหนักตัวลด และปวดศีรษะ จากการวินิจฉัยของแพทย์พบว่า มีปริมาณวิตามินเอในร่างกายมากเกินไปเกินความต้องการ เนื่องจากร่างกายสามารถเปลี่ยนเบต้าแคโรทีนไปเป็นวิตามินเอได้ การรับประทานเบต้าแคโรทีนในปริมาณมากจะทำให้ได้รับวิตามินเอเพิ่มมากด้วย (ศศิธร ศิริวรราชัย, 2546) ดังนั้น จึงควรรับประทานเบต้าแคโรทีนในปริมาณที่พอเหมาะเพื่อให้ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ในแต่ละวัน นอกจากนี้ยังสามารถพบเบต้าแคโรทีนได้ในเซลล์แมมเบอร์น ซึ่งทำหน้าที่ในการป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์จากสารว่องไวปฏิกิริยาที่จะทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติจนอาจทำให้เกิดโรคมะเร็งบางชนิดได้ เช่น มะเร็งช่องปาก กล้องเสียง ตับ หรือกระเพาะอาหาร หรืออาจเป็นโรคเส้นเลือดหัวใจอุดตันและโรคต่อกระจก เป็นต้น (Giovannucci, 1999)

ในปัจจุบันกลุ่มผู้บริโภคได้เห็นถึงความสำคัญของเบต้าแคโรทีนที่มีผลต่อร่างกาย จึงหันมาบริโภคเบต้าแคโรทีนที่มีในผักและผลไม้กันมากขึ้น ทำให้นักวิจัยหลายท่านสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับเบต้าแคโรทีน โดยเฉพาะในทางเคมีวิเคราะห์ที่มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคอย่างต่อเนื่อง โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ Biophotonic Scanner (BS), Liquid chromatography (LC), Supercritical fluid chromatography (SFC), Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) และ HPLC เป็นต้น

HPLC เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมมาก เนื่องจากสามารถเป็นเครื่องมือที่มีความไวในการวิเคราะห์สูงที่สามารถวิเคราะห์สารประกอบที่ไม่มีสภาพขั้ว เช่น เบต้าแคโรทีนได้ จากการรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีผู้วิจัยหลายท่านเลือกใช้เทคนิค HPLC ในการศึกษาเบต้าแคโรทีน ตัวอย่างเช่น

ปิยศิริ สุนทรนนท์ (2551) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเบต้าแคโรทีนในพืชหลายชนิด ได้แก่ หว่า ดอกดาหลา เปลือกมะเอ็ก ผลมะเอ็ก และดอกเข็ม ด้วยเทคนิค HPLC โดยนำพืชเหล่านี้มาทำแห้งด้วยวิธี Lyophilization แล้วนำตัวอย่างที่หนัก 300-500 mg (น้ำหนักแห้ง) มาเติมเอทานอลที่ผสม butylated hydroxytoluene (BHT) เข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ปริมาตร 10 mL เก็บที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 15 นาที แล้วเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 40% (w/v) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Saponification ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 30 นาที แล้วนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL จากนั้นเติมสารละลายผสม hexane : toluene ในอัตราส่วน 10:8 (v/v) นำส่วนใสมาระเหยจนแห้ง แล้วนำไปละลายด้วยเตตระไฮโดรฟูเรน (tetrahydrofuran; THF) หลังจากนั้นนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ที่ใช้คอลัมน์ C-18 ที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ของสารละลายผสมระหว่างอะซิโตน ไตรโซล และเตตระไฮโดรฟูเรน ในอัตราส่วน 52:40:8 (v/v) และใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.1 mL/min พบว่าใช้เวลาในการชะเบต้าแคโรทีน ในช่วง 13.00 ถึง 15.00 นาที และพบว่า

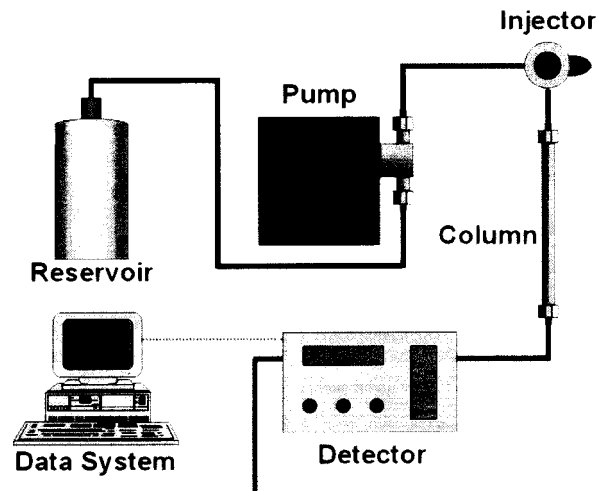
เปลือกมะอึกมีเบต้าแคโรทีนมากที่สุดคือ 732.43 ไมโครกรัม (μg) ส่วนเนื้อมะอึกมีเบต้าแคโรทีน 185.57 ไมโครกรัม และดอกเข็ม 167.38 ไมโครกรัม ส่วนในหว่า และดอกดาหลามีปริมาณเบต้าแคโรทีนอยู่น้อยมาก

Ahamad *et al.* (2007) สนใจศึกษาเบต้าแคโรทีนในผักใบเขียวด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล:ไดคลอโรมีเทน:อะซิโตรไนไตรล์ ในอัตราส่วน 10:20:70 (v/v) ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2 mL/min และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 452 nm ทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ในเวลา 4.7 นาที เมื่อคำนวณปริมาณเบต้าแคโรทีนในผักที่ศึกษาพบว่า มันฝรั่งมีเบต้าแคโรทีนน้อยกว่า 80 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ส่วนในผักกาด ผักโขม และแครอท มีปริมาณเบต้าแคโรทีนมากกว่า 80 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ในขณะที่ Robinson *et al.* (1986) ได้รายงานปริมาณเบต้าแคโรทีนในผักทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ มันฝรั่ง ผักกาด ผักโขม และแครอท มีปริมาณเบต้าแคโรทีนอยู่ในช่วง 80-920 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง)

จากการรายงานดังกล่าวเทคนิค HPLC เป็นเทคนิคที่สนใจสำหรับนำมาใช้ในการศึกษาเบต้าแคโรทีน ในหัวข้อต่อไปจะกล่าวถึงรายละเอียดของเทคนิค HPLC

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหรือ HPLC เป็นเครื่องมือที่พัฒนามาจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยพัฒนาให้คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-5 มิลลิเมตร (mm) ใช้สารที่บรรจุในคอลัมน์ (packing material) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-10 ไมโครเมตร (μm) และใช้เครื่องสูบเป็นตัวขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ (แมน อมรสิทธิ์ และคณะ, 2553a) HPLC เป็นเครื่องมือที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์และแยกสารเกือบทุกชนิด เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่มีความไวสูง (high sensitivity) และสามารถประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำและมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะสารที่ไม่ระเหยและไม่คงตัวต่อความร้อน ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่อง HPLC แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

ที่มา: (<http://www.lcresources.com/resources/getstart/1c01.htm>, 1/7/2014)

1. คอลัมน์ (Column)

คอลัมน์เป็นอุปกรณ์ในเครื่อง HPLC ที่สำคัญ ทำหน้าที่แยกสาร คอลัมน์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการแยกสารชนิดต่าง ๆ ออกจากกันได้ แต่ไม่มีคอลัมน์ใดคอลัมน์หนึ่งที่สามารถแยกสารทุกชนิดได้ในเวลาเดียวกัน ดังนั้นการแยกสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ดีนั้นขึ้นอยู่กับสารที่ใส่บรรจุในคอลัมน์หรือที่เรียกว่าเฟสคงที่

ปัจจุบันเฟสคงที่แบบเกิดพันธะ (bonded-phase) เป็นเทคนิคที่นำเอาซิลิกาที่มีรูพรุนขนาดเล็กมาดัดแปลง โดยการทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ที่ต้องการใช้เป็นเฟสคงที่เพื่อให้เกิดพันธะกับหมู่ซิลานอล มี 3 วิธี คือ วิธีเกิดผ่านปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) วิธีคลอรีเนชัน (chlorination) และ วิธีซิลิลเลชัน (silylation) (จารุวรรณ สุจริต, 2552a) เทคนิคนี้นิยมนำมาใช้ในงาน HPLC สามารถแบ่งชนิดของพันธะที่เกิดขึ้นได้ 2 ชนิด

1.1 บอนด์เฟสชนิดเฟสธรรมดา (normal phase; NP) เป็นเทคนิคการแยกสารโดยเฟสคงที่เป็นสารที่มีสภาพขั้ว เช่น ซิลิกา และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารที่ไม่มีสภาพขั้ว เช่น เฮกเซนผสมกับเมทิลลีนคลอไรด์ วิธีนี้จะควบคุมยากเนื่องจากปริมาณน้ำมีผลต่อการวิเคราะห์ อีกทั้งยังเกิดความยุ่งยากในการวิเคราะห์สารที่ละลายได้ดีในน้ำ ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับใช้แยกสารที่มีสภาพขั้วสูง

1.2 บอนด์เฟสชนิดเฟสผักลับ (reversed phase; RP) เป็นเทคนิคการแยกสารที่ใช้เฟสคงที่เป็นหมู่ฟังก์ชันที่ไม่มีสภาพขั้ว โดยนำซิลิกามาสร้างพันธะกับหมู่ Octadecyl (ODS; $-C_{18}H_{37}$), Octyl ($-C_8H_{17}$) หรือ Hexyl ($-C_6H_{13}$) ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้จะมีสภาพขั้วต่ำหรือไม่มีขั้ว ส่วนเฟสเคลื่อนที่จะเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้ว เช่น น้ำ หรือสารละลายผสมระหว่างน้ำกับ

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เมทานอล และอะซิโตนไนไตรล์ เป็นต้น วิธีนี้จะเหมาะสำหรับใช้แยกสารที่มีสภาพขั้วต่ำ ดังนั้นในงานวิจัยต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาหรือแยกสารที่ไม่มีสภาพขั้วหรือสารที่มีสภาพขั้วต่ำมักนิยมเลือกใช้เทคนิค RP-HPLC (จารุวรรณ สุจริต, 2552b) เนื่องจาก

1. สามารถใช้แยกได้ทั้งสารประกอบที่ไม่มีขั้ว สารประกอบที่มีขั้ว และสารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้ บางครั้งสามารถแยกสารประกอบประเภทนี้พร้อม ๆ กันด้วยเฟสเคลื่อนที่ชนิดเดียวกัน

2. คอลัมน์บอนด์เฟสค่อนข้างเสถียร โดยบอนด์เฟสแบบเฟสผันกลับจะสามารถใช้แยกสารที่มีสภาพขั้วและไม่มีสภาพขั้วได้ นอกจากนี้ยังมีความไวสูงทำให้ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือ

3. ตัวทำละลายที่ใช้หาง่าย ราคาถูก และมีความบริสุทธิ์สูง

4. สามารถทำนายลำดับการชะของสารที่ออกจากคอลัมน์ได้ เพราะเวลาในการถูกหน่วงของสารจะเพิ่มขึ้นตามสมบัติของสารประกอบที่ไม่มีขั้ว

5. สมดุลที่เกิดขึ้นในคอลัมน์จะเกิดเร็ว

ด้วยเหตุนี้ RP-HPLC จึงเป็นเทคนิคที่นิยมใช้สำหรับแยกสารประกอบที่ไม่มีสภาพขั้ว และสารที่ไม่คงตัวต่อความร้อน ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้สำหรับศึกษาเบต้าแคโรทีน

2. เครื่องตรวจจับ (Detector)

เครื่องตรวจจับมีหน้าที่ตรวจวัดสัญญาณของตัวอย่างเปรียบเทียบกับสัญญาณของเฟสเคลื่อนที่ เครื่องตรวจจับที่ใช้ในเทคนิค HPLC แบ่งออกเป็น 2 ประเภทได้แก่

2.1 Bulk property หรือ general detector เป็นเครื่องตรวจจับประเภทที่วัดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพของทั้งเฟสเคลื่อนที่และสารตัวอย่างที่ทำกรวิเคราะห์ เช่น การวัดค่าดัชนีหักเหของสารละลาย (refractive index) และคอนดักติวิตี (conductivity)

2.2 Solute property หรือ selective detector เป็นเครื่องตรวจจับประเภทที่วัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากสมบัติของสารที่วิเคราะห์เพียงอย่างเดียว เช่น เครื่องตรวจจับชนิดอัลตราไวโอเล็ต-วิชิเบิล ฟลูออเรสเซนซ์ และ อิเล็กโทรเคมีคัล (แมน อมรสิทธิ์และคณะ, 2553b)

เครื่องตรวจจับที่ใช้ในเทคนิค HPLC มีหลายชนิด แต่ละชนิดมีหลักการวัดที่แตกต่างกันจึงสามารถวิเคราะห์สารที่คุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างกัน เครื่องตรวจจับที่นำมาใช้กับเครื่อง HPLC ได้แก่

2.2.1 เครื่องตรวจจับชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent detector) เป็นเครื่องที่วัดการวาวแสงของสารเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี มีความไวในการตรวจวัดสูงกว่าเครื่องตรวจจับ

ยูวี-วิชิเบิลประมาณ 1,000 เท่า เครื่องตรวจวัดชนิดนี้ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงจึงใช้กับสารบางชนิดเท่านั้น เช่น กลุ่มยา (pharmaceuticals) สารประกอบที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต (clinically) และสารทางธรรมชาติ วิตามิน สารชีวเคมี (biochemical species) เป็นต้น

2.2.2 เครื่องตรวจวัดชนิดรีแฟกโทมิเตอร์ (refractometer detector) เป็นเครื่องที่วัดค่าดัชนีหักเหของสารละลายทั้งหมดที่เข้าสู่เครื่องตรวจวัด จึงไม่มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการวัด การหาปริมาณจึงเป็นการวัดเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าดัชนีหักเหระหว่างเฟสคงที่กับเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารอื่นปน มักนำมาใช้กับการวิเคราะห์สารประกอบที่ไม่ตอบสนองกับเครื่องตรวจวัดยูวี-วิชิเบิล เช่น น้ำตาล เป็นต้น

2.2.3 เครื่องตรวจวัดชนิดอิเล็กโทรเคมีคัล (electrochemical detector) เป็นเครื่องตรวจวัดที่อาศัยการวัดค่าทางเคมีไฟฟ้าของสารที่ถูกแยกออกจากคอลัมน์ ได้แก่ โวลแทมเมตรี แอมเพโรเมตรี และคูลอมมิตรี ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ปริมาณน้อยในน้ำ ปัจจุบันนิยมใช้เครื่องตรวจวัดคูลอมมิตรี ซึ่งจะตรวจวัดปริมาณไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในระบบ โดยการวัดกระแสความต่างศักย์ (current-voltage) ที่เกิดขึ้นในระบบโดยใช้อิเล็กโทรดเหมาะสำหรับใช้วัดสารตัวอย่างที่เป็นตัวออกซิไดซ์ และตัวรีดิวซ์ในช่วงของศักย์ไฟฟ้าที่กำหนด ตัวอย่าง ได้แก่ สารชีวเคมี เช่น ฮอร์โมน เป็นต้น

2.2.4 เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี-วิชิเบิล (UV-VIS spectrophotometer) เป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมมากที่สุดเทคนิค HPLC เครื่องตรวจวัดชนิดนี้สามารถใช้กับสารละลายตัวอย่างที่มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิชิเบิล (ช่วงความยาวคลื่น 190-600 nm) เครื่องตรวจวัดชนิดนี้สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงดังกล่าวได้ เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ต้องไม่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่วิเคราะห์ (พัฒนาเหล่าไฟบูลย์, 2554a) เครื่องตรวจวัดชนิดนี้นำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในเทคนิค HPLC ที่นิยมนำยูวี-วิชิเบิลมาเป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณในการศึกษาเกี่ยวกับเบต้าแคโรทีน ซึ่งหลักการทำงานใช้กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต นอกจากนี้เครื่องตรวจวัดยูวี-วิชิเบิลยังสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

(1) fixed-wavelength detectors เป็นเครื่องตรวจวัดที่สามารถวัดการดูดกลืนคลื่นแสงได้ในบางช่วง

(2) variable-wavelength detector เป็นเครื่องตรวจวัดที่สามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการ

(3) diode array detector เป็นเครื่องตรวจวัดที่สามารถสแกนยูวีและแสดงสเปกตรัมเป็นภาพสามมิติซึ่งแสดงค่าการดูดกลืน ความยาวคลื่น และเวลาที่วิเคราะห์จากสเปกตรัมที่ได้ทำให้สามารถเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับวิเคราะห์สารแต่ละชนิด สำหรับตัวทำละลายที่ใช้เตรียมเป็นเฟสเคลื่อนที่ต้องมีคุณสมบัติไม่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่าง (แมน อมรสิทธิ์และคณะ, 2553b)

3. เครื่องสูบ (Pump)

เครื่องสูบเป็นส่วนหนึ่งของเครื่อง HPLC ที่ทำหน้าที่ดูดเฟสเคลื่อนที่จากภาชนะบรรจุเข้าสู่ระบบ เครื่องสูบที่ใช้ทำจากวัสดุที่ทนต่อสารเคมีและการกัดกร่อน เช่น ไททาเนียม (titanium) แซฟไฟร์ (sapphire) เป็นต้น (พัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2554b) ปัจจุบันนิยมใช้เครื่องสูบแบบควบคุมอัตราการไหลให้คงที่ (constant flow) ได้แก่ เครื่องสูบชนิด reciprocating ส่วนประกอบมีลูกสูบ 2 ตัว (dual piston) ทำงานสลับกัน ทำให้สัญญาณที่เกิดจากจังหวะการทำงาน (pulse) ของลูกสูบแต่ละตัวหักล้างกันพอดี สัญญาณที่ออกมาจึงเรียบ

การแยกสารในเทคนิค HPLC ให้มีประสิทธิภาพนั้นมียปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้อง คือ การเลือกระบบของตัวทำละลายและการเลือกตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่มีความจำเพาะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยก แต่ควรมีคุณสมบัติพื้นฐานที่เหมือนกันคือ มีความบริสุทธิ์สูง ปราศจากสิ่งเจือปน และไม่ทำปฏิกิริยากับเฟสคงที่ คอลัมน์ ตัวฉีต เครื่องตรวจวัด และสารที่ต้องการแยกจนทำให้เสื่อมสภาพไป นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงความหนืดและความปลอดภัยของสารละลายด้วย ซึ่งตัวทำละลายที่นิยมใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ อะซิโตน ไตรคลอโรเอทิลีน เมทานอล ไดคลอโรมีเทน น้ำ เป็นต้น การใช้เฟสเคลื่อนที่ที่สะอาดอย่างออกจากคอลัมน์พบได้ 2 ลักษณะคือ

1. Isocratic elution เป็นระบบการชะโดยใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพช่วงที่ตลอดการแยกสาร ทำให้ตัวทำละลายที่ใช้มีสัดส่วนคงที่ตลอดการใช้งาน (จารุวรรณ สุจริต, 2553c)

2. Gradient elution เป็นระบบการชะโดยใช้ตัวทำละลายที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพช่วงตลอดกระบวนการแยกสาร การทำงานในระบบ gradient elution ต้องใช้เครื่องสูบที่ออกแบบสำหรับการทำ gradient elution โดยเฉพาะ เช่น ใช้เครื่องสูบหลายเครื่อง หรือเครื่องสูบที่มีportional valve เป็นต้น (แมน อมรสิทธิ์และคณะ, 2553c)

4. ระบบควบคุมและประมวลผล (Microprocessor)

ระบบควบคุมและประเมินผลมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเครื่องมือส่วนอื่น ๆ รวมทั้งประมวลผลการวิเคราะห์ โดยรายงานผลเป็นโครมาโทแกรมพร้อมทั้งข้อมูลอื่น ๆ ที่สนใจขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้ใช้ เช่น ข้อมูลการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ เป็นต้น ในโครมาโทแกรมหนึ่งจะประกอบด้วยสัญญาณที่ได้จากการวัดเฟสเคลื่อนที่ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นตรงสม่ำเสมอเรียกว่าเส้นฐาน (base line) กับสัญญาณที่ได้จากการวัดสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างซึ่งมีลักษณะเป็นยอดแหลมเรียกว่า พีก (peak) ลักษณะของพีกอาจจะสูงหรือต่ำกว่าเส้นฐานขึ้นอยู่กับผลต่างของสัญญาณจากการวัดเฟสเคลื่อนที่และสารที่วิเคราะห์ สารแต่ละชนิดที่สามารถแยกได้จะให้พีกที่เวลาต่างกัน เวลาจากจุดเริ่มฉีดสารถึงยอดพีกเรียกว่า รีเทนชันไทม์

(retention time; t_r) ค่า t_r ใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ส่วนความสูงของพีคสัมพันธ์กับปริมาณของสารจึงใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (แมน อมรสิทธิ์และคณะ, 2553d)

ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC ที่ได้กล่าวมาเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของสารประกอบต่าง ๆ และเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ โดยการแยกทางโครมาโทกราฟีที่มีประสิทธิภาพนั้น หลักสำคัญคือ จะต้องสามารถแยกสารที่ผสมกันให้ออกจากกันได้ในระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งการแยกสารจะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพมากน้อยแค่ไหนจะต้องขึ้นอยู่กับผู้วิจัยที่ควรเลือกปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมอย่างไร

เบต้าแคโรทีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่มีสภาพขั้ว เมื่อต้องการทำการศึกษามักนำ RP-HPLC มาเป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาด้วยเหตุผลหลายประการที่ทำให้เทคนิค RP-HPLC นี้มีความเหมาะสมในการนำมาศึกษาเบต้าแคโรทีน โดยจะนำเสนอผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของผู้วิจัยหลายท่านที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเบต้าแคโรทีน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การแยกเบต้าแคโรทีนให้ได้ประสิทธิภาพโดยสนใจพฤติกรรมการถูกชะของสาร ขึ้นอยู่กับ การเลือกใช้ประเภทคอลัมน์ ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตัวตรวจวัด อุณหภูมิของคอลัมน์ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้จะมีผลต่อการชะและเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของสารออกจากคอลัมน์ ดังนั้นนักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาดังตัวอย่างเช่น การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนที่ใช้ทั้งระบบการชะแบบ isocratic elution และระบบการชะแบบ gradient elution โดยมีผู้ทำการศึกษาต่อไปนี้

Nyambaka และ Ryley (1996) ได้แยกแอลฟาและเบต้าแคโรทีนในผักใบเขียว ด้วยเทคนิค RP-HPLC ในการศึกษาเลือกใช้ระบบการชะสารแบบ isocratic โดยมีสารละลายผสมของน้ำ ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ในอัตราส่วน 6:15:79 (v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่และใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8 mL/min ใช้ RP-column C-18 ในการแยก จากนั้นตรวจวัดด้วยยูวี-วิชิเบิลที่ความยาวคลื่น 450 nm พบว่าแอลฟาและเบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ที่เวลา 29.08 และ 31.00 นาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเวลาที่ใช้ในการชะแอลฟาและเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ค่อนข้างนาน เนื่องจากแอลฟาและเบต้าแคโรทีนเป็นสารประกอบที่ไม่มีสภาพขั้วเมื่อเข้าสู่คอลัมน์ที่เป็นบอนด์เฟสชนิดเฟสแบบผันกลับที่มีสภาพความเป็นขั้วต่ำกว่าเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย น้ำ ($P_1 = 9$) ไดคลอโรมีเทน ($P_1 = 3.1$) และเมทานอล ($P_1 = 5.1$) ทำให้เฟสเคลื่อนที่มีสภาพขั้วไม่สูงมาก และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8 mL/min อาจไม่เพียงพอที่จะสามารถชะสารให้ออกจากคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้แอลฟาและเบต้าแคโรทีนถูกหน่วงกับคอลัมน์เป็นเวลานาน Nyambaka และ Ryley จึงได้

ปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ให้มีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นจากเดิมโดยใช้ น้ำ : ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ผสมกันในอัตราส่วน 4.8:15.2:80 (v/v) พร้อมทั้งปรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้เพิ่มขึ้นเป็น 1.0 mL/min พบว่าใช้เวลาในการชะแอลฟาแคโรทีนออกจากคอลัมน์ 17.00 นาที และเบต้าแคโรทีน 19.05 นาที จากการศึกษาของ Nyambaka และ Ryley แสดงให้เห็นว่าเมื่อปรับสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อเวลาในการชะสารคือ ทำให้สารเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น

Thibeault *et al.* (2009) ได้ใช้ระบบการชะแบบ isocratic ในการศึกษาแคโรทีนอยด์ เรตินอล และโทโคฟีรอล ในเซรัมของมนุษย์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี โดยทำการศึกษาด้วยเครื่อง HPLC ที่ใช้ ODS2 column C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน: อะซิโตรไนไตรล์ ในอัตราส่วน 10:20:70 (v/v) ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 mL/min ศึกษาที่อุณหภูมิ 25 °C และตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 455 nm สภาวะนี้ใช้สำหรับศึกษาแคโรทีนอยด์ที่เป็นแอลฟาและเบต้าแคโรทีนเท่านั้น โดยได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการชะของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ที่เดิมและไม่เติมแอมโมเนียมอะซิเตท พบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เติมแอมโมเนียมอะซิเตทจะมีความไวในการวิเคราะห์สูงและแสดงโครมาโทแกรมที่คมชัดกว่า (sharp) โดยสามารถชะแอลฟาและเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ได้ในเวลาประมาณ 9.58 และ 10.98 นาที ตามลำดับ ในที่นี้การเติมแอมโมเนียมอะซิเตทในเฟสเคลื่อนที่เพื่อต้องการปรับสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ให้ต่ำลงเพื่อให้แอลฟาและเบต้าแคโรทีนสามารถเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้นและทำให้แอลฟาและเบต้าแคโรทีนมีความเสถียรในการวิเคราะห์

Lyan *et al.* (2001) ใช้เทคนิค RP-HPLC ในการศึกษาแคโรทีนอยด์ 13 ชนิดในพลาสมาของมนุษย์ ที่เลือกใช้ระบบการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ isocratic โดยมีน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 5 mL ไดคลอโรมีเทนปริมาตร 10 mL เมทานอลที่ผสมกับแอมโมเนียมอะซิเตทที่มีความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 15 mL และอะซิโตรไนไตรล์ปริมาตร 70 mL ผสมกันเพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ และกำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2 mL/min ใช้คอลัมน์ RP C-18 ในการแยกตรวจวัดด้วยเครื่องโฟโตไดโอดอาร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 450 nm พบว่าแคโรทีนอยด์ทั้ง 13 ชนิดประกอบไปด้วย แอสตา-แซนทีน ใช้เวลาในการชะออกจากคอลัมน์ 5.6 นาที ลูทีน 8.3 นาที ซีแซนทีน 9.2 นาที แคนตาแซนทีน 10.2 นาที เบต้าคริปโทแซนทีน 18.7 นาที แอคทินโนน 19.8 นาที ทรานส์-ไลโคปีน 25.7 นาที ซิส-ไลโคปีน 30.9 นาที แอลฟาแคโรทีน 37.4 นาที ทรานส์-เบต้าแคโรทีน 40.7 นาที 9-ซิส-เบต้าแคโรทีน 43 นาที และ 13-ซิส-เบต้าแคโรทีน 45.5 นาที จากการศึกษาโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ทั้ง 13 ชนิด พบว่า โครงสร้างของเบต้าแคโรทีนเป็นสารประกอบที่ไม่มีสภาพขั้วทำให้ถูกตรึงกับคอลัมน์เป็นเวลานาน จึงถูกชะออกมาจากคอลัมน์เป็นลำดับสุดท้ายซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Karppi *et al.* (2008) ที่ใช้ระบบการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ isocratic ในการศึกษา เบต้าแคโรทีนในพลาสมาของมนุษย์ โดยใช้สารละลาย

ผสมของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 15:25:60 (v/v) พร้อมทั้งเติม BHT ที่มีความเข้มข้น 0.01% (w/v) ลงในเฟสเคลื่อนที่ โดยกำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 mL/min ตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดอาร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 454 nm พบว่าเบต้าแคโรทีน ถูกชะออกจากคอลัมน์ใช้เวลา 30 นาที

Murkovic *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาเบต้าแคโรทีนในผักทองด้วยเทคนิค RP-HPLC ที่เลือกกระบบการชะสารแบบ isocratic คอลัมน์ที่ใช้สำหรับแยกเป็น RP-column C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทน เมทานอล และอะซิโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 4:20:76 (v/v) พร้อมทั้งเติม 0.1% ของ BHT และใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 mL/min จากนั้นตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดยูวี-วิซิเบิลที่ความยาวคลื่น 450 nm พบว่า เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ใช้เวลา 30 นาที Englberger *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาเบต้าแคโรทีนในกล้วย Micronesia และเผือกด้วยเทคนิค RP-HPLC ที่เลือกกระบบการชะสารแบบ isocratic โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น อะซิโตไนไตรล์และเมทานอล ในอัตราส่วน 19:81 (v/v) ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 mL/min ตรวจวัดด้วยยูวี-วิซิเบิลที่ความยาวคลื่น 475 nm พบว่า ใช้เวลาในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ 25.01 นาที ในการศึกษาเบต้าแคโรทีนของผู้วิจัยทั้ง 2 ท่าน ที่ใช้สารละลายผสมของ เมทานอลและอะซิโตไนไตรล์เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยทราบว่าเมทานอล และอะซิโตไนไตรล์เป็นสารละลายที่มีสภาพขั้วสูงเมื่อผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันส่งผลให้ความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น การใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพความเป็นขั้วที่สูงจะไม่สามารถชะสารที่มีสภาพขั้วต่ำออกจากคอลัมน์ได้ เนื่องจากในเทคนิค RP-HPLC ลำดับการถูกชะจะเกิดขึ้นตามลำดับสภาพขั้วของสารที่วิเคราะห์ ดังนั้นเฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วที่สูงมาก จะไม่สามารถชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากเบต้าแคโรทีนถูกหน่วงอยู่กับเฟสคงที่ ทำให้ใช้เวลานานในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์

Lin และ Chen (2003) ทำการศึกษารูปประกอบของแคโรทีนอยด์ในน้ำมันมะเขือเทศด้วยเทคนิค RP-HPLC ที่เลือกกระบบการชะสารแบบ gradient คอลัมน์ที่ใช้สำหรับแยกสารเป็น C-30 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซิโตไนไตรล์และบิวทานอลในอัตราส่วน 70:30 (v/v) บรรจุอยู่ในปั๊ม A และใช้เมทิลลีนคลอไรด์บรรจุในปั๊ม B เริ่มแรกใช้เฟสเคลื่อนที่ในปั๊ม A 99% และปั๊ม B 1% แล้วค่อย ๆ เพิ่มเฟสเคลื่อนที่ในปั๊ม B เป็น 4% เมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที เพิ่มเฟสเคลื่อนที่ในปั๊ม B เป็น 10% จนครบเวลา 50 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนกลับมาเป็น 1% ของเฟสเคลื่อนที่ในปั๊ม B เมื่อถึงเวลาที่ 55 นาที โดยกำหนดให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2 mL/min ทำการตรวจวัดด้วยยูวี-วิซิเบิลที่ความยาวคลื่น 476 nm พบว่า เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ใช้เวลาในการถูกชะ ดังนี้ ได-ซิส-เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ใช้เวลา 6.84 นาที 15-ซิส-เบต้าแคโรทีน ชะที่เวลา 7.45 นาที 9-ซิส-เบต้าแคโรทีน ถูกชะที่เวลา 8.21 นาที ทรานส์-เบต้าแคโรทีนถูกชะที่เวลา 10.39 นาที ซิส-เบต้าแคโรทีนถูกชะที่เวลา 11.30 นาที และ 13-ซิส-เบต้าแคโรทีน ถูกชะที่เวลา 12.31 นาที ในการทดลองนี้ใช้ระบบ

การชะสารแบบ gradient ในการแยกองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ที่ประกอบไปด้วยสารหลายชนิด ซึ่งมีสภาพขั้วใกล้เคียงกัน ดังนั้นการใช้ระบบการชะแบบ gradient จะทำให้เฟสเคลื่อนที่มีอัตราส่วนของความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงส่งผลให้มีค่าสภาพขั้วที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย จึงทำให้สามารถแยกสารเหล่านี้ออกจากคอลัมน์ได้ ในการทดลองนี้จึงสามารถการแยกเบต้าแคโรทีนด้วยเทคนิค HPLC ที่เลือกใช้ระบบการชะสารแบบ gradient ได้ประสบความสำเร็จ

Gimeno *et al.* (2000) ได้ศึกษาเบต้าแคโรทีนในน้ำมันมะกอกโดยใช้เทคนิค RP-HPLC ใช้คอลัมน์ ODS-2 ควบคุมอุณหภูมิ 45 °C สำหรับการแยก ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลซึ่งบรรจุในปั๊ม A น้ำบริสุทธิ์บรรจุในปั๊ม B และบิวทานอลบรรจุอยู่ในปั๊ม C ใน 3 นาทีแรก กำหนดให้เฟสเคลื่อนที่ในปั๊ม A:B:C เคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ในอัตราส่วน 92:3:5 (v/v) ต่อมาอีก 1 นาที เปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ปั๊ม A:C ให้เคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ในอัตราส่วน 92:8 (v/v) นาน 5 นาที จากนั้นจึงเปลี่ยนกลับมาใช้เฟสเคลื่อนที่ปั๊ม A:B:C ในอัตราส่วน 92:3:5 (v/v) จนตลอดการแยกสาร โดยกำหนดให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2 mL/min ทำการตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดอาร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 450 nm พบว่าสามารถชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ใช้เวลา 8.02 นาที ต่อมา Gimeno *et al.* (2001) ได้ศึกษาเบต้าแคโรทีนโดยศึกษาในตัวอย่างของพลาสมามนุษย์ได้ทำการศึกษาดังกล่าว พบว่าใช้เวลาในการชะเบต้าแคโรทีนประมาณ 8 นาทีเช่นกัน จากการศึกษาในครั้งนี้ Gimeno ให้เหตุผลว่าการเลือกใช้เมทานอล และอะซิโตนไตรรล์เป็นเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากได้รับคำแนะนำจากงานวิจัยอื่น ๆ หลายฉบับ และจากการศึกษาสภาพขั้วของเมทานอลและอะซิโตนไตรรล์ทราบว่าสารทั้ง 2 ชนิดเป็นสารที่มีสภาพขั้วสูงทำให้มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค RP-HPLC

Barba *et al.* (2006) ใช้เทคนิค RP-HPLC โดยมีการประยุกต์ใช้ตัวตรวจวัดชนิดยูวี-วิชิเบิลในการศึกษาไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในผัก ใช้ RP-column C-18 ในการแยก ใช้อะซิโตนไตรรล์และเมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วน 10:90 (v/v) พร้อมทั้งเติม triethylamine (TEA) 9 ไมโครโมลาร์ (μM) ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.9 mL/min และตรวจวัดสารที่ความยาวคลื่น 475 nm พบว่าไลโคปีนถูกชะออกจากคอลัมน์ใช้เวลา 5.18 นาที และเบต้าแคโรทีน 6.03 นาที นั้นแสดงว่าไลโคปีนมีสภาพความเป็นขั้วมากกว่าเบต้าแคโรทีน ทำให้เมื่อทำการแยกโดยใช้คอลัมน์ที่เป็นบอนด์เฟสชนิดเฟสแบบผันกลับ ซึ่งภายในคอลัมน์จะมีเฟสคงที่หรือหมู่ R เป็นสารประกอบที่มีสภาพขั้วต่ำ เบต้าแคโรทีนจึงถูกตรึงไว้กับเฟสคงที่นานกว่า ในขณะที่เดียวกัน ไลโคปีนก็ถูกชะออกมากับเฟสเคลื่อนที่ ทำให้สารสองตัวนี้แยกออกจากกันอย่างชัดเจน

Andrés *et al.* (2014) ศึกษาเบต้าแคโรทีนที่มีในนมถั่วเหลืองด้วยเทคนิค HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์เป็นส่วนสำคัญในการศึกษา ใช้คอลัมน์ RP C-18 ในการแยก ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่าง น้ำ THF และเมทานอล ในอัตราส่วน 6:27:67 (v/v) ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8 mL/min และตรวจวัดสารที่ความยาวคลื่น 470 nm

พบว่าใช้เวลาสำหรับเซเบต้าแคโรทีน ออกจากคอลัมน์นานกว่า 40 นาที ในการทดลองนี้ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8 mL/min ซึ่งมีความแรงในการชะสารต่ำทำให้สารใช้เวลาในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์

Pupin *et al.* (1999) ศึกษาองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ในน้ำส้มด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยนำตัวอย่างของน้ำส้มปริมาตร 5 mL ไปทำการสกัดด้วย เอทิลอะซิเตทที่เติม BHT 0.004% ครั้งละ 50 mL ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดสารสกัดของน้ำส้มเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 100 μ Lทำการแยกด้วยคอลัมน์ C-18 Vydac 201TP54 โดยมีสารละลายผสมของ 1,2 ไดคลอโรอีเทน เมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ ผสมกันในอัตราส่วน 5:35:60 (v/v) ซึ่งในเมทานอลได้เติม 0.1% BHT 0.1% TEA และ 0.05 โมลาร์ (M) ของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตท ใช้สารละลายผสมนี้เป็นเฟสเคลื่อนที่และกำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 mL/min จากนั้นทำการวัดสารที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่องตรวจวัดยูวี-วิสิเบิล พบว่าในน้ำส้มมีแคโรทีนอยด์ 5 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ ลูทีน ซีแซนทีน เบต้าครีฟโทแซนทีน แอลฟาแคโรทีน และเบต้าแคโรทีน ซึ่งแคโรทีนอยด์ทั้ง 5 ชนิดนี้ถูกชะออกจากคอลัมน์ใช้เวลาต่างกัน โดยแอลฟาและเบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์เป็นลำดับสุดท้ายใช้เวลา 15.00 และ 16.98 นาที ตามลำดับ

จากข้อมูลทั้งหมดที่มีการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาเบต้าแคโรทีนที่ใช้เทคนิค RP-HPLC โดยมีปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิที่ศึกษา สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ระบบการชะสารตัวอย่าง และ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เข้ามาเกี่ยวข้อง ทั้งนี้การแยกจะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพก็ต้องเลือกปัจจัยเหล่านี้ให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จากข้อมูลการศึกษานี้จึงนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน โดยใช้ระบบเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดที่มีสภาพขั้วที่แตกต่างกัน และมีสัดส่วนของตัวทำละลาย 2 ชนิด คงที่ตลอดการชะในการวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่าง ผัก 7 ชนิด ได้แก่ แครอท ฟักทอง มะเขือเทศ บรอกโคลี กระเทียม ผักโขม และสาหร่ายผสมนาง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 เครื่องมือ

(1) เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-10Avp และควบคุมการทำงานด้วยซอฟต์แวร์ CLASS-VP เวอร์ชัน 5.5 มีส่วนประกอบสำคัญได้แก่ ปัมป์ LC-10AD vp Liquid Chromatography, เครื่องตรวจวัด SPD-M10A vp Diode Array และตู้เก็บคอลัมน์ CTO-10A vp

(2) เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV 1601

(3) ชุดเครื่องกรองสุญญากาศ (filtered vacuum)

(4) เครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic)

(5) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

(6) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

(7) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง

1.2 อุปกรณ์

(1) คอลัมน์สำหรับการแยก Phenomenex C18 (2) (5 μm Luna, 100A) ขนาด 250 \times 4.6 mm การ์ดคอลัมน์ (C18) ขนาด 4 \times 3.0 mm

(2) เข็มฉีดยา (syring) ขนาด 50 ไมโครลิตร (μL)

(3) ชุดกรองตัวอย่าง ประกอบด้วย เข็มฉีดยา และเยื่อกรองชนิด Nylon ขนาด 0.45 μm

(4) ขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่ ขนาด 1 ลิตร (L)

(5) เยื่อกรองชนิด Sartolon Polyamid ขนาด 0.45 μm

(6) กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

(7) ไมโครปิเปต ขนาด 200 และ 1000 μL

- (8) บีเปต ขนาด 1, 5, 10 และ 20 mL
- (9) กรวยแยก ขนาด 250 mL
- (10) บีกเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 250 mL
- (11) ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10, 25, 50 และ 100 mL
- (12) กระบอกตวง ขนาด 5, 10, 100 และ 1000 mL
- (13) หลอดทดลอง
- (14) กรวยกรอง
- (15) แท่งแก้วคนสาร
- (16) กระจกฟอยด์
- (17) พาราฟิล์ม

2. สารเคมี การเตรียมสารละลาย และการกรองและการไล่แก๊สในเฟสเคลื่อนที่

2.1 สารเคมี

ในการศึกษาได้ใช้สารเคมีที่แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	ชื่อสารเคมี	สูตรโมเลกุล	ยี่ห้อ	เกรด	ความบริสุทธิ์
1	β -carotene	$C_{40}H_{56}$	Sigma-Aldrich	R&D	$\geq 97.0\%$
2	Methanol	CH_3OH	Lab – Scan	HPLC	99.9%
3	n-propanol	$CH_3 CH_2 CH_2OH$	Lab – Scan	HPLC	99.9%
4	iso-propanol	$(CH_3)_2CHOH$	Lab – Scan	HPLC	99.9%
5	Acetone	CH_3COCH_3	Lab – Scan	A.R.	99.5%
6	Acetonitrile	CH_3CN	Lab – Scan	HPLC	99.9%
7	Hexane	$CH_3(CH_2)_4CH_3$	Lab – Scan	HPLC	99.5%

หมายเหตุ R&D (Research & Development) = เกรดงานวิจัยและพัฒนา

A.R. (Analytical reagent grade) = เกรดงานวิเคราะห์

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) = เกรด HPLC

2.2 การเตรียมสารละลาย

(1) สารละลายสต็อกเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 400 mg/L

โดยชั่งเบต้าแคโรทีน 10 mg ใส่ลงในบีกเกอร์ ละลายด้วยเฮกเซน ใส่ขวดวัดปริมาตร แล้วปรับปริมาตร 25 mL ผสมให้เข้ากัน บรรจุลงในขวดสีชา และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C สารละลายสต็อกเบต้าแคโรทีนสามารถเก็บได้นาน 1 เดือน

(2) สารละลายมาตรฐานสำหรับการใช้งานเบต้าแคโรทีน (working standard solution) เข้มข้น 10 mg/L

โดยเปิดสารละลายสต็อกเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 400 mg/L ปริมาตร 250 μ L ใส่ขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วยเฮกเซน ผสมให้เข้ากัน

(3) สารละลายอะซิโตน 90% (v/v)

โดยตวงสารละลายอะซิโตน ปริมาตร 90 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน (De-ionized water; DI) ผสมให้เข้ากัน

2.3 การกรองและการไล่แก๊สในเฟสเคลื่อนที่เพื่อเตรียมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในระบบ Isocratic

(1) กรองตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ผ่านเยื่อกรองชนิด Sartolon Polyamid ขนาด 0.45 μ m ลงในขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่ขนาด 1 ลิตร เพื่อกำจัด ผง ผุ่น หรืออนุภาคแขวนลอย ออกให้หมด

(2) ไล่แก๊สออกซิเจน ไนโตรเจน หรือคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อาจละลายอยู่ในตัวทำละลาย ออกด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาที

(3) นำสารละลายของเฟสเคลื่อนที่บรรจุลงในขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่แล้วต่อเข้าเครื่อง HPLC ทำการไล่ฟองอากาศ (purge) ในระบบ

(4) เปิดโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ (run method)

(5) อุณหภูมิเครื่อง 20-30 นาที หรือจนกว่าเสถียรเรียบร้อย

(6) ฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูป (ปริมาตร 20 μ L)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC

ศึกษาสภาวะต่างๆ ได้แก่ ความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลของเบต้าแคโรทีน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการชะเบต้าแคโรทีน และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม รายละเอียดมีดังนี้

3.1.1 การศึกษาความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลของเบต้าแคโรทีน

(1) วัดค่าการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีน เข้มข้น 10 mg/L ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ความยาวคลื่น 375 ถึง 500 nm โดยใช้เฮกเซนเป็นแบลนค์ (blank)

(2) บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของเบต้าแคโรทีนทุกค่าความยาวคลื่นที่ศึกษา

(3) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และความยาวคลื่น (wave length)

3.1.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการชะเบต้าแคโรทีน

โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 2 ค่า ได้แก่ 25 และ 35 °C ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v) มีขั้นตอนดังนี้

(1) ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 25 °C

(2) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min

(3) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC

ให้เต็มลูฟ

(4) บันทึกค่า t_r

(5) เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 35 °C แล้วทำตามขั้นตอนที่ 3.1.2(2)-3.1.2(4)

3.1.3 การศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

โดยศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 3 ค่า ได้แก่ 1.0, 1.5 และ 2.0 mL/min ที่อุณหภูมิ 35 °C และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v) มีขั้นตอนดังนี้

(1) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 mL/min

(2) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC

ให้เต็มลูฟ

(3) บันทึกค่า t_r และค่าความดันของเครื่อง HPLC

(4) เปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.5 และ 2.0 mL/min ตามลำดับ แล้วทำตามขั้นตอนที่ 3.1.3(2)-3.1.3(3)

3.2 การศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดที่มีผลต่อการชะเบต้าแคโรทีน

โดยทำการศึกษานิดของเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายผสม 2 ชนิด (binary mobile phase) จำนวน 4 คู่ ได้แก่ iso-propanol:MeOH, n-propanol:MeOH, iso-propanol:ACN และ n-propanol:ACN รายละเอียดมีดังนี้

3.2.1 การศึกษาผลของเฟสเคลื่อนที่ของตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol: MeOH ต่อการชะเบต้าแคโรทีน

- (1) ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 35 °C
- (2) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH อัตราส่วน 5:95 (v/v)
- (3) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ
- (4) บันทึกค่า t_r และ t_0 แล้วคำนวณค่า k โดยใช้สมการที่ 3.1 (วัชชัย ศรีวิบูลย์, 2551)

$$k = (t_r - t_0) / t_0 \quad \dots\dots\dots 3.1$$

เมื่อ k = เวลาที่สารถูกหน่วงอยู่กับเฟสคงที่เทียบกับเวลาที่สารถูกชะออกมากับเฟสเคลื่อนที่ (retention factor)

t_r = เวลาที่ใช้ในการทำให้ตัวถูกละลายเคลื่อนที่ได้เท่ากับ 1 คอลัมน์ (retention time)

t_0 = เวลาที่โมเลกุลของตัวพาเดินทางได้ 1 คอลัมน์ (dead time or hold-up time)

3.2.2 การศึกษาผลของเฟสเคลื่อนที่ของตัวทำละลายผสมระหว่าง n-propanol: MeOH ต่อการชะเบต้าแคโรทีน

- (1) ปรับอุณหภูมิของเครื่องตรวจจับที่ 35 °C
- (2) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง n-propanol:MeOH อัตราส่วน 5:95 (v/v)
- (3) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ
- (4) บันทึกค่า t_r และ t_0 แล้วคำนวณค่า k จากสมการที่ 3.1

3.2.3 การศึกษาผลของเฟสเคลื่อนที่ของตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol: ACN ต่อการชะเบต้าแคโรทีน

- (1) ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 35 °C
- (2) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN อัตราส่วน 5:95 (v/v)
- (3) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ
- (4) บันทึกค่า t_r และ t_0 แล้วคำนวณค่า k จากสมการที่ 3.1

3.2.4 การศึกษาผลของเฟสเคลื่อนที่ของตัวทำละลายผสมระหว่าง n-propanol: ACN ต่อการชะเบต้าแคโรทีน

- (1) ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 35 °C
- (2) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง n-propanol:ACN อัตราส่วน 5:95 (v/v)
- (3) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ
- (4) บันทึกค่า t_r และ t_0 แล้วคำนวณค่า k จากสมการที่ 3.1

3.3 การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน

โดยทำการศึกษาเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายผสม 2 ชนิด จำนวน 2 คู่ ได้แก่ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C รายละเอียดมีดังนี้

3.3.1 การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH

- (1) ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 25 °C
- (2) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสัดส่วนของ iso-propanol:MeOH ต่อไปนี้ 0:100 (v/v), 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25:75 (v/v) ซึ่งทำให้มีค่า ψ ของ iso-propanol ใน MeOH หรือ ACN เท่ากับ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25% ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า ψ ได้จากสมการที่ 3.2 (Barba *et al.*, 2006)

$$\psi = \text{ความเข้มข้นของ iso-propanol ในตัวทำละลาย MeOH หรือ ACN (v/v)} \times 10^{-2} \quad \dots 3.2$$

(3) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ

(4) บันทึกค่า t_r และ t_0 แล้วคำนวณค่า k จากสมการที่ 3.1

(5) เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 35 °C แล้วทำตามขั้นตอนที่ 3.3.1(2)- 3.3.1(4)

(6) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า k กับ ψ , $1/k$ กับ ψ และ $\log k$

กับ ψ

3.3.2 การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN

(1) ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 25 °C

(2) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสัดส่วนของ iso-propanol:ACN ต่อไปนี้ 0:100 (v/v), 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v), 25:75 (v/v) ซึ่งทำให้มีค่า ψ เท่ากับ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25% ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า ψ ได้จากสมการที่ 3.2

(3) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ

(4) บันทึกค่า t_r และ t_0 แล้วคำนวณค่า k จากสมการที่ 3.1

(5) เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 35 °C แล้วทำตามขั้นตอนที่ 3.3.2(2)- 3.3.2(4)

(6) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า k กับ ψ , $1/k$ กับ ψ และ $\log k$

กับ ψ

3.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์

การทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษา ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection; LOD) และปริมาณต่ำสุดที่ตรวจหาปริมาณได้ (limit of quantification; LOQ) รายละเอียดมีดังนี้

3.4.1 การทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง

การทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง ทำได้โดยศึกษาจากการใช้สารละลายมาตรฐานของเบต้าแคโรทีนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) รายละเอียดมีดังนี้

(1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนที่มีความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 80 mg/L โดยปิเปตสารละลายสต็อกเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 400 mg/L ปริมาตร 125, 250, 500 และ

2000 μL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนพอดีขีด เขย่าขวดให้เข้ากัน

- (2) ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ $35\text{ }^{\circ}\text{C}$
- (3) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v)
- (4) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 5 mg/L แล้ว $10, 20$ และ 80 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ ทำซ้ำ 3 ครั้ง
- (5) บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีค (peak-areas) ของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนทุกค่าความเข้มข้นที่ศึกษา
- (6) เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีน (concentration; mg/L) และพื้นที่ใต้พีค (peak-area; mAU)
- (7) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2) และเขียนสมการเส้นตรง

3.4.2 การทดสอบความแม่นยำ

การทดสอบความแม่นยำ ทำได้โดยศึกษาจากการหาค่าร้อยละของการได้กลับคืนมารายละเอียดมีดังนี้

- (1) ปิเปตสารละลายสต็อกเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 400 mg/L ปริมาตร $950\text{ }\mu\text{L}$ ใส่ขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วยเฮกเซน ผสมให้เข้ากัน ทำให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 38 mg/L แล้วปิเปตสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีน ปริมาตร $20\text{ }\mu\text{L}$ ใส่ลงในบีกเกอร์
- (2) เติมสารละลาย 90% (v/v) อะซิโตน ปริมาณ 30 mL ลงไปในบีกเกอร์
- (3) เก็บสารละลายจากข้อ 3.4.2(2) ในบีกเกอร์ที่ปิดด้วยด้วยพาราฟิล์มและห่อให้มิดชิดด้วยกระดาษฟอยด์ แล้วนำไปเก็บให้พ้นแสง เป็นเวลา 1 คืน
- (4) นำสารละลายจากข้อ 3.4.2(3) ใส่ในหลอด centrifuge เพื่อปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงในอัตราความเร็วรอบ 1500 rpm นาน 10 นาที
- (5) นำส่วนของสารละลายที่ใส (อยู่ชั้นบน) มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- (6) นำสารละลายส่วนที่กรองได้จากข้อ 3.4.2(5) ปริมาตร 10 mL ใส่ลงในกรวยแยก แล้วสกัดด้วยเฮกเซนปริมาณ 3 mL เป็นเวลา 15 นาที ไชชั้นเฮกเซนลงในหลอดทดลอง
- (7) นำสารละลายจากข้อ 3.4.2(6) ไประเหยให้แห้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิแล้วเติมเฮกเซนลงไป 1 mL
- (8) ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ ทำ 3 ซ้ำ



(9) บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีคแล้วคำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

(10) คำนวณร้อยละของการได้กลับคืนมา (recovery; %) ดังสมการที่ 3.3 (ธวัชชัย ศรีวิบูลย์, 2551)

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{C_m}{C_i} \times 100 \quad \dots\dots\dots 3.3$$

เมื่อ C_m = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนที่วัดได้เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (mg/L)

C_i = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนที่ทราบค่า (เท่ากับ 38 mg/L)

3.4.3 การทดสอบความเที่ยง

การทดสอบความเที่ยงทำได้โดยศึกษาจากการทำ Intramediate precision รายละเอียดมีดังนี้

- (1) ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 35 °C
- (2) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v)
- (3) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ ทำ 10 ซ้ำ
- (4) บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีค แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation; %RSD) ดังสมการที่ 3.4 (แมน อมรสิทธิ์และคณะ, 2553e)

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{SD} \times 100}{\bar{X}} \quad \dots\dots\dots 3.4$$

เมื่อ \bar{X} = ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (arithmematic mean) คำนวณได้จากสมการที่ 3.5

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) คำนวณได้จากสมการที่ 3.6

543.84
9.3176
2.1

สูตรหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \dots\dots\dots 3.5$$

เมื่อ x_i = ข้อมูลตัวที่ i ; $i = 1, 2, \dots, n$
 n = ขนาดตัวอย่าง

สูตรหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \dots\dots\dots 3.6$$

เมื่อ \bar{X} = ค่าเฉลี่ยเลขคณิต
 x_i = ข้อมูลตัวที่ i ; $i = 1, 2, \dots, n$
 n = ขนาดตัวอย่าง

3.4.4 การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและปริมาณต่ำสุดที่ตรวจหาปริมาณได้

รายละเอียดมีดังนี้

- (1) ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 35 °C
- (2) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v)
- (3) ฉีดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ ทำ 10 ซ้ำ
- (4) บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีค
- (5) คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ดังสมการที่ 3.7 และ 3.8 ตามลำดับ (แม้นอมรสิทธิ์ และคณะ, 2553f)

$$LOD = 3SD \quad \dots\dots\dots 3.7$$

$$LOQ = 10SD \quad \dots\dots\dots 3.8$$

3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนจากตัวอย่างผัก

ทำการเตรียมตัวอย่างผักโดยการสกัดด้วยวิธีของ Foss *et al.* (1984) และวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนโดยเทคนิค HPLC รายละเอียดมีดังนี้

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างผัก

งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก 7 ชนิด ได้แก่ แครอท ฟักทอง มะเขือเทศ บรอกโคลี คะน้า ผักโขม และสาหร่ายผมนาง ตามลำดับ โดยสกัดจากตัวอย่างที่ละลายโดยใช้วิธีการสกัดแบบแบทช์ (batch extraction) รายละเอียดมีดังนี้

(1) ชั่งตัวอย่างผักแต่ละชนิดอย่างละ 5 กรัม แล้วนำมาบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่งบดสาร ใส่ลงในบีกเกอร์

(2) เติมน้ำละลาย 90% (v/v) อะซิโตน ปริมาณ 30 mL ลงไปในบีกเกอร์

(3) เก็บสารละลายจากข้อ 3.5.1(2) ในบีกเกอร์ที่ปิดด้วยด้วยพาราฟิล์มและห่อให้มิดชิดด้วยกระดาษฟอยด์ แล้วนำไปเก็บให้พ้นแสง เป็นเวลา 1 คืน

(4) นำสารละลายจากข้อ 3.5.1(3) ใส่ในหลอด centrifuge เพื่อปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงในอัตราความเร็วรอบ 1500 rpm นาน 10 นาที

(5) นำส่วนของสารละลายที่ใส (อยู่ชั้นบน) มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

(6) นำสารละลายส่วนที่กรองได้จากข้อ 3.5.1(5) ปริมาตร 10 mL ใส่ลงในกรวยแยกแล้วสกัดด้วยเฮกเซน ปริมาณ 3 mL เป็นเวลา 15 นาที ใช้ชั้นเฮกเซนลงในหลอดทดลอง

(7) นำสารละลายจากข้อ 3.5.1(6) ไประเหยให้แห้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิแล้วเติมเฮกเซนลงไป 1 mL และกรองสารละลายตัวอย่างผ่านชุดกรองตัวอย่าง

(8) นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC

3.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนโดยเทคนิค HPLC

รายละเอียดมีดังนี้

(1) ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 35 °C

(2) ตั้งอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min ที่เป็นตัวอย่างผสมระหว่าง iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v)

(3) ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง HPLC ให้เต็มลูฟ

(4) บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีคแล้วคำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

(5) รายงานผลเป็น g/kg

3.6 การคำนวณ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel เวอร์ชัน 2010 ในการสร้างกราฟมาตรฐานกราฟระหว่างค่า k กับ ψ , $1/k$ กับ ψ และ $\log k$ กับ ψ รวมทั้งคำนวณค่าทางสถิติที่ใช้วิเคราะห์ผล ได้แก่ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ สมการเส้นตรง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ค่าเฉลี่ยเลขคณิต และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตามลำดับ



บทที่ 4

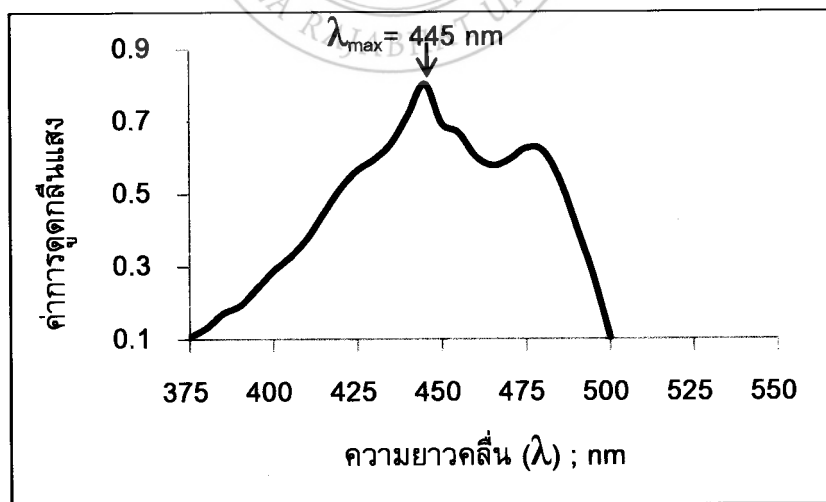
ผลและการอภิปรายผล

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC เพื่อให้เครื่องมือมีประสิทธิภาพสูงสุดในการวิเคราะห์เบต้าแคโรทีน โดยได้ศึกษาสภาวะดังต่อไปนี้ ศึกษาความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลของเบต้าแคโรทีน ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการชะเบต้าแคโรทีน และศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1.1 การศึกษาความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล

การศึกษาความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลของเบต้าแคโรทีนด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 375 ถึง 500 nm ผลการศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากรูป พบว่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลของเบต้าแคโรทีน เท่ากับ 445 nm ซึ่งเบต้าแคโรทีนดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.803 ดังนั้น จึงเลือกความยาวคลื่นที่ 445 nm เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัดเบต้าแคโรทีน



รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่น

1.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการชะเบต้าแคโรทีน

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 2 ค่า ได้แก่ 25 และ 35 °C เมื่อใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN ในอัตราส่วน 25:75 (v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่และใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.5 mL/min ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับค่ารีเทนไทม์เฉลี่ย ($t_{r,av}$) (N=2)

อุณหภูมิ (°C)	$t_{r,av} \pm SD$ (min)
25	14.46 \pm 0.31
35	13.94 \pm 0.05

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์จาก 25 เป็น 35 °C พบว่าที่อุณหภูมิ 35 °C เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ C-18 ได้เร็วกว่าอุณหภูมิ 25 °C เนื่องจาก เบต้าแคโรทีนเกิดอันตรกิริยากับ *n*-alkyl ที่เคลือบอยู่ที่ผิวของซิลิกาในคอลัมน์ C-18 (Suitcharit *et al.*, 2013) ทำให้เบต้าแคโรทีนกับ *n*-alkyl มีแรงกระทำระหว่างโมเลกุลต่อกันโดยที่โมเลกุลทั้งสองเป็นโมเลกุลที่ไม่มีสภาพขั้ว จึงเกิดอันตรกิริยากันได้ตามหลักการ like dissolves like นั่นคือ สารที่มีขั้วละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วและสารที่ไม่มีขั้วละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระภายในระหว่างเบต้าแคโรทีนกับ *n*-alkyl ในระหว่างการชะของเบต้าแคโรทีน (migration process) ออกจากคอลัมน์ ทั้งกลไกการถูกชะของเบต้าแคโรทีนและการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเบต้าแคโรทีนกับ *n*-alkyl ทำให้พลังงานอิสระภายในเปลี่ยนแปลงมีความสัมพันธ์กันและสามารถอธิบายได้ดังสมการที่ 4.1 (Purcell *et al.*, 1999)

$$\text{Log } k = - \Delta G_{\text{assoc}}^{\circ} / RT + \text{log } \Phi \quad \dots\dots\dots 4.1$$

- เมื่อ $\Delta G_{\text{assoc}}^{\circ}$ = พลังงานอิสระของกิบส์ (Gibbs free energy) ของเบต้าแคโรทีนกับ *n*-alkyl
 R = ค่าคงที่ของแก๊สสากล เท่ากับ $8.21 \times 10^{-2} \text{ L}\cdot\text{atm}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$; atm = 101,325 Pa
 T = อุณหภูมิสมบูรณ์ (K)
 Φ = อัตราส่วนเฟส

จากสมการที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิมีผลต่อเวลาในการชะเบต้าแคโรทีน นั่นคือที่อุณหภูมิสูงจะใช้เวลาในการชะเบต้าแคโรทีนน้อย ดังนั้น จึงใช้อุณหภูมิ 35 °C สำหรับการชะเบต้าแคโรทีน เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนโดยใช้เวลาน้อยที่สุด

1.3 การศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

การศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 3 ค่า ได้แก่ 1.0, 1.5 และ 2.0 mL/min ที่อุณหภูมิ 35 °C และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v) ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กับค่ารีชันโทม์เฉลี่ยและความดันเฉลี่ยของเครื่อง HPLC (N=2)

อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ (mL/min)	$t_{r,av} \pm SD$ (min)	ความดันเฉลี่ย (psi)
1.0	22.93 \pm 0.03	995
1.5	13.94 \pm 0.05	1210
2.0	8.55 \pm 0.04	2750

จากตารางที่ 4.2 เห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบต้าแคโรทีนมีผลทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ C-18 ได้เร็วขึ้น (ราชชัย ศรีวิบูลย์, 2551) ตามความสัมพันธ์ที่แสดงด้วยสมการที่ 4.2

$$V_R = t_r F \quad \dots\dots\dots 4.2$$

เมื่อ V_R = Retention volume หรือ ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการทำให้สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์

F = Flow rate หรือ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

จากสมการที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าค่า t_r แปรผกผันกับค่า F นั่นคือ ค่า t_r และ V_R ลดลงเมื่ออัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เบต้าแคโรทีนจึงถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่สูงจะทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็ว ส่งผลให้ความดันของปั๊มสูงตาม ทำให้เกิดการอุดตันภายในคอลัมน์ ส่งผลให้คอลัมน์เสื่อมสภาพได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min เป็นอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่สุดในการชะเบต้าแคโรทีน

จากการศึกษา สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยสภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้นำไปใช้ในการศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการชะเบต้าแคโรทีน และพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนในลำดับต่อไป

ตารางที่ 4.3 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC

สภาวะที่ศึกษา	สภาวะในการศึกษา	สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์
ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	375 – 500	445
อุณหภูมิ (°C)	25 และ 35	35
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่(mL/min)	1.0 - 2.0	1.5

2. การศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดที่มีผลต่อการชะเบต้าแคโรทีน

โดยศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายผสม 2 ชนิด จำนวน 4 คู่ ได้แก่ iso-propanol:MeOH, n-propanol:MeOH, iso-propanol:ACN และ n-propanol:ACN เมื่อใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 5:95 (v/v) และใช้สภาวะของเครื่อง HPLC (ตารางที่ 4.3) ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 4.4

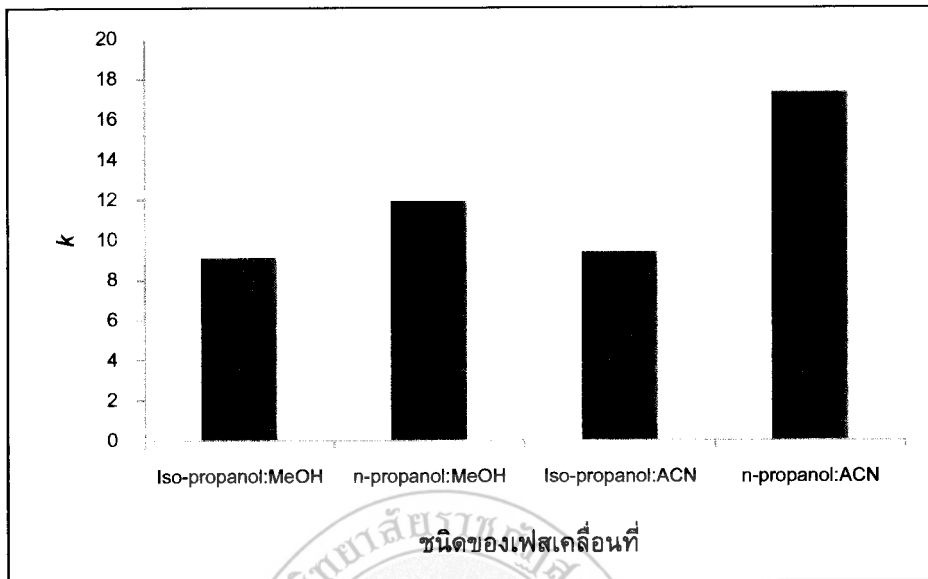
จากตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า เฟสเคลื่อนที่ที่เติม iso-propanol ลงไป สามารถชะเบต้าแคโรทีนออกมาได้เร็วขึ้น นั่นคือ ค่า t_r ของเบต้าแคโรทีนที่ต่ำกว่าเมื่อชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่เติม n-propanol ทั้งนี้เนื่องจาก iso-propanol ซึ่งมีสภาพขั้ว ($P_1 = 3.9$) ที่ต่ำกว่า n-propanol ($P_1 = 4.0$) (Phenomenex, 2013) ดังนั้นจึงทำให้เบต้าแคโรทีนซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่มีสภาพขั้วสามารถเกิดอันตรกิริยากับ iso-propanol ได้ดีกว่า n-propanol ส่งผลให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เติม n-propanol จะเห็นได้ว่าการเติมสารอินทรีย์ลงไป ในเฟสเคลื่อนที่ที่สามารถปรับสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ให้ต่ำลง ส่งผลให้สารที่สนใจที่มีสภาพขั้วต่ำหรือไม่มีสภาพขั้วถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น และเมื่อพิจารณาลักษณะโครงสร้างของ

n-propanol ที่เป็นโซ่ตรงกับ iso-propanol ที่เป็นโซ่กิ่ง (แม้ว่าสารทั้ง 2 ชนิดมีโมเลกุลเหมือนกัน คือ C_3H_7OH) พบว่า n-propanol สามารถละลายน้ำได้ดีกว่า iso-propanol (แอลกอฮอล์, 2557) ดังนั้น เมื่อเบต้าแคโรทีนถูกชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่เติม iso-propanol ทำให้เบต้าแคโรทีนสามารถเกิดอันตรกิริยากับ iso-propanol ได้ดีกว่า n-propanol ส่งผลให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เติม n-propanol

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า $t_{r,av}$ และ $t_{0,av}$ ของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ (N=2)

เฟสเคลื่อนที่	$t_{r,av} \pm SD$ (min)	$t_{0,av} \pm SD$ (min)
iso-propanol:MeOH	24.85 \pm 0.06	2.46 \pm 0.02
n-propanol:MeOH	25.82 \pm 0.06	2.00 \pm 0.01
iso-propanol:ACN	36.00 \pm 1.33	3.46 \pm 0.06
n-propanol:ACN	40.97 \pm 1.10	2.23 \pm 0.04

อย่างไรก็ตามในการรายงานผลพฤติกรรมของการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเพื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของสารในการถูกชะออกจากคอลัมน์เมื่อเปลี่ยนสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ จะไม่สามารถแสดงโดยใช้ค่า t_r ได้ เนื่องจาก การใช้ค่า t_r จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ ได้แก่ สภาวะของเครื่อง HPLC (เช่น อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ อุณหภูมิของคอลัมน์) สภาวะของเฟสคงที่ (เช่น *n*-alkyl ที่เคลือบอยู่ที่ผิวของซิลิกาในคอลัมน์ C-18) และ สภาวะของเฟสเคลื่อนที่ (เช่น ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่) เป็นต้น ดังนั้นในการรายงานจึงต้องใช้ค่า k' อธิบายพฤติกรรมของการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเมื่อปรับเปลี่ยนสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจาก ค่า k' เป็นค่าที่แสดงตำแหน่งของสารที่ไม่คำนึงถึงสภาวะของเครื่อง HPLC (Nikitas and Pappa-Louisi, 2009) Barba *et al.* (2006) ได้ศึกษาไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในผัก โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น ACN:MeOH ในอัตราส่วน 10:90 (v/v) พบว่า ค่า k' ของเบต้าแคโรทีนมีค่าสูง แต่เมื่อเติม TEA 9 μM ลงในเฟสเคลื่อนที่ดังกล่าว พบว่าค่า k' ของเบต้าแคโรทีนลดลง แสดงว่าการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่มีผลทำให้ค่า k' เปลี่ยนซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ ด้วยเหตุนี้ในการรายงานผลพฤติกรรมของการถูกชะของเบต้าแคโรทีนจึงเลือกค่า k' ในการรายงาน



รูปที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบค่า k โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดต่างๆ เมื่อใช้สภาวะของเครื่อง HPLC ดังนี้ อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 5:95 (v/v), อุณหภูมิของคอลัมน์ 35 °C และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min

จากรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เติม iso-propanol มีผลทำให้ค่า k ของเบต้าแคโรทีนต่ำกว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เติม n-propanol แสดงว่าเบต้าแคโรทีนเกิดอันตรกิริยากับ iso-propanol ได้ดีกว่า จึงทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงเลือกเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN เพื่อศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนต่อไป

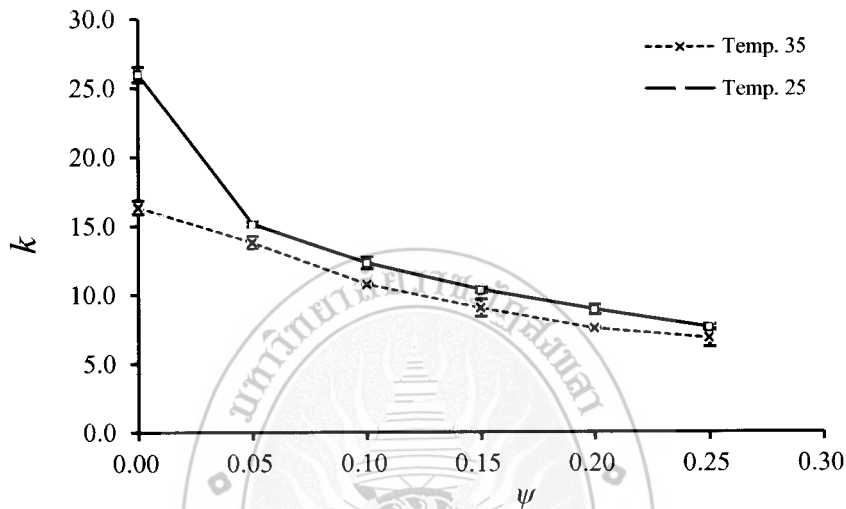
3. การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน

การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายผสม 2 ชนิด จำนวน 2 คู่ ได้แก่ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C รายละเอียดมีดังนี้

3.1 การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH

จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH มีสัดส่วนของ iso-propanol:MeOH ดังนี้ 0:100 (v/v), 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25:75 (v/v) ซึ่งทำให้มีค่า ψ

เท่ากับ 0 , 0.05 ,0.10 ,0.15 ,0.20 และ 0.25% ตามลำดับ เมื่อเขียนความสัมพันธ์ระหว่างค่า k (แกน y) และค่า ψ (แกน x) จะแสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า k กับ ψ ของ iso-propanol ใน MeOH (%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.5 mL/min

จากรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าค่า k ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อค่า ψ เพิ่มขึ้น (สัดส่วนของ iso-propanol ใน MeOH เพิ่มขึ้น) ทำให้สภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ลดลงเบต้าแคโรทีนจึงเกิดอันตรกิริยาได้ดีกับ iso-propanol ที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เติมลงในเฟสเคลื่อนที่ (Lesellier *et al.*, 2003) ทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อเพิ่มปริมาตรของ iso-propanol ใน MeOH ให้มีค่า $\psi = 0.25\%$ สามารถชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์โดยใช้เวลาน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่อื่นๆ ที่ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นส่งผลให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็ว นั่นคือที่อุณหภูมิ 35 °C เบต้าแคโรทีนจะถูกชะออกมาได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25 °C แสดงว่าอุณหภูมามีผลต่อเวลาในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ดังที่เคยอธิบายมาก่อนนี้ จะเห็นได้ว่าค่า k แปรผกผันกับค่า ψ โดยแสดงความสัมพันธ์แบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponential) ที่สามารถอธิบายได้ตามสมการที่ 4.3

$$k = ae^{-b\psi}$$

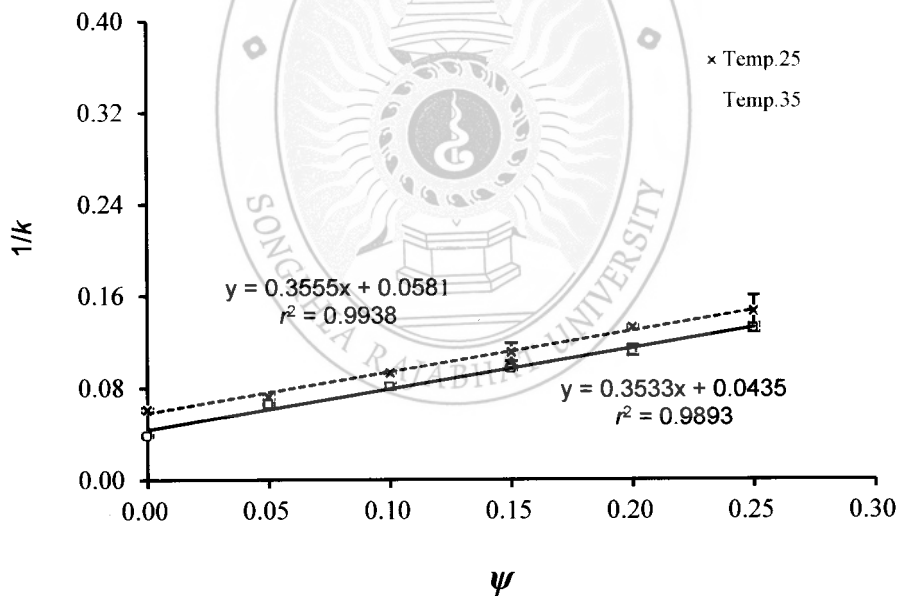
เมื่อ a และ b = ค่าคงที่ที่ขึ้นอยู่กับการค่า ψ ที่อุณหภูมิใด ๆ

จากผลที่ได้จะสามารถเขียนสมการแบบเอกซ์โพเนนเชียล ที่สอดคล้องกับสมการที่ 4.3 ได้ดังนี้

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 25^{\circ}\text{C} \quad k = 21.57e^{-4.52\psi} \quad \dots\dots\dots 4.4$$

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 35^{\circ}\text{C} \quad k = 16.08e^{-3.62\psi} \quad \dots\dots\dots 4.5$$

อย่างไรก็ตามการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์แบบเอกซ์โพเนนเชียล ไม่สามารถแสดงค่าของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทางโครมาโทกราฟีที่สนใจศึกษาได้ (เช่น S , $1/k_0$, $\log k_0$ และ r^2) ซึ่งพารามิเตอร์เหล่านี้เป็นค่าที่หาได้จากสมการเส้นตรง ดังนั้นในการศึกษาจึงจำเป็นต้องเขียนกราฟเส้นตรง โดยสามารถเขียนได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k$ กับ ψ รูปที่ 4.4 แสดงกราฟเส้นตรงที่เขียนระหว่าง $1/k$ กับ ψ



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ ของ iso-propanol ใน MeOH (%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 $^{\circ}\text{C}$ เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min

จากรูปที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าเมื่อค่า ψ เพิ่มขึ้น นั่นคือสัดส่วนของ iso-propanol ใน MeOH เพิ่มขึ้น ทำให้สภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ลดลง เบต้าแคโรทีนจึงเกิดอันตรกิริยาได้ดีกับ เฟสเคลื่อนที่ จึงทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น (ค่า $1/k$ เพิ่มขึ้น) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า ψ กับค่า $1/k$ สามารถอธิบายได้โดยใช้สมการที่ 4.6 (Purcell et al., 1999)

$$1/k = S\psi + 1/k_0 \quad \dots\dots\dots 4.6$$

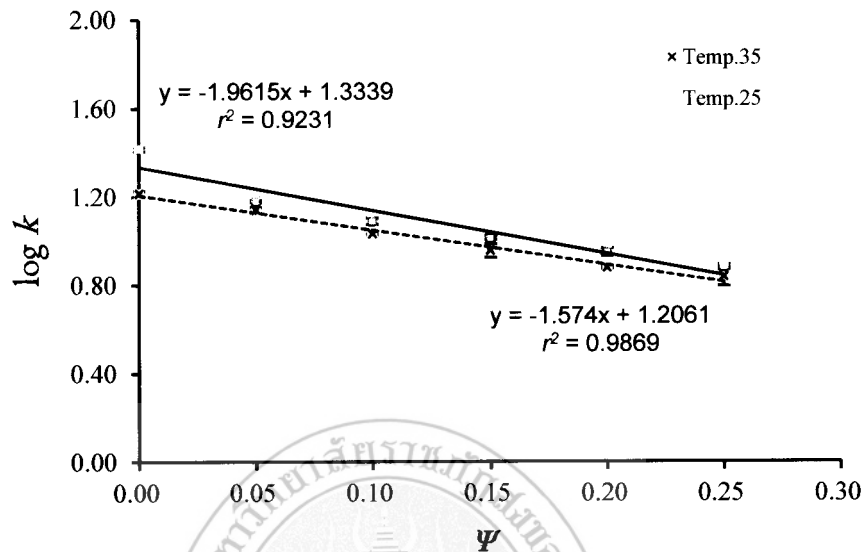
เมื่อ S = Slope หรือ ความชัน
 $1/k_0$ = จุดตัดแกน y เมื่อค่า $\psi = 0\%$

จากสมการที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าค่า $1/k$ แปรผันตรงกับค่า ψ และความชันของกราฟ มีค่ามากกว่าศูนย์ จากรูปที่ 4.4 สามารถเขียนสมการเชิงเส้นตรงที่สอดคล้องกับสมการที่ 4.6 ได้ดังนี้

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 25^{\circ}\text{C} \quad 1/k = 0.3555(\pm 2.23 \times 10^{-10}) \psi + 0.0581(\pm 1.16 \times 10^{-6}) \quad \dots\dots\dots 4.7$$

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 35^{\circ}\text{C} \quad 1/k = 0.3533(\pm 6.36 \times 10^{-10}) \psi + 0.0435(\pm 1.95 \times 10^{-6}) \quad \dots\dots\dots 4.8$$

จากสมการเส้นตรงที่เขียนได้ (สมการที่ 4.7 และ 4.8) พบว่าค่าความชันที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C มีค่าเท่ากับ 0.3555 และ 0.3533 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเฟสเคลื่อนที่ที่มี MeOH เพียงอย่างเดียว ($\psi = 0\%$) เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์โดยใช้เวลานานที่สุด (ค่า $1/k$ ต่ำที่สุด) เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่มีสภาพขั้วสูงสุด นั่นคือ เมื่อค่า $\psi = 0\%$ ทำให้ได้จุดตัดที่แกน y คือค่า $1/k_0$ จากรูปที่ 4.4 พบว่า $1/k_0$ ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C มีค่าเท่ากับ 0.0581 และ 0.3533 ตามลำดับ นอกจากนี้สามารถเขียนกราฟเส้นตรงได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ ได้ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ ของ iso-propanol ใน MeOH (%vol $\times 10^2$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min

จากรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มค่า ψ มีผลให้ค่า $\log k$ ลดลง นั่นคือ เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถอธิบายได้ด้วยสมการที่ 4.9 (Purcell *et al.*, 1999)

$$\log k = -S\psi + \log k_0 \quad \dots\dots\dots 4.9$$

จากสมการที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าค่า $\log k$ แปรผกผันกับค่า ψ และความชันของกราฟมีค่าน้อยกว่าศูนย์ จากรูปที่ 4.5 สามารถเขียนสมการเชิงเส้นตรงที่สอดคล้องกับสมการที่ 4.9 ได้ดังนี้

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 25^\circ\text{C } \log k = -1.9615(\pm 3.52 \times 10^{-5}) \psi + 1.3339(\pm 4.60 \times 10^{-4}) \quad \dots\dots 4.10$$

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 35^\circ\text{C } \log k = -1.5740(\pm 3.71 \times 10^{-7}) \psi + 1.2061(\pm 4.72 \times 10^{-5}) \quad \dots\dots 4.11$$

จากสมการเส้นตรงที่เขียนได้ (สมการที่ 4.10 และ 4.11) พบว่าค่าความชันที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C มีค่าเท่ากับ -1.9615 และ -1.5740 ตามลำดับ และสามารถหาค่า $\log k_0$ ได้เช่นเดียวกับการหาค่า $1/k_0$ เมื่อ $\psi = 0\%$ จากรูปที่ 4.5 พบว่า $\log k_0$ ที่อุณหภูมิ 25 และ

35 °C มีค่าเท่ากับ 1.3339 และ 1.2061 ตามลำดับ จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k$ กับ ψ สามารถสรุปค่าพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีดังแสดงในตารางที่ 4.5

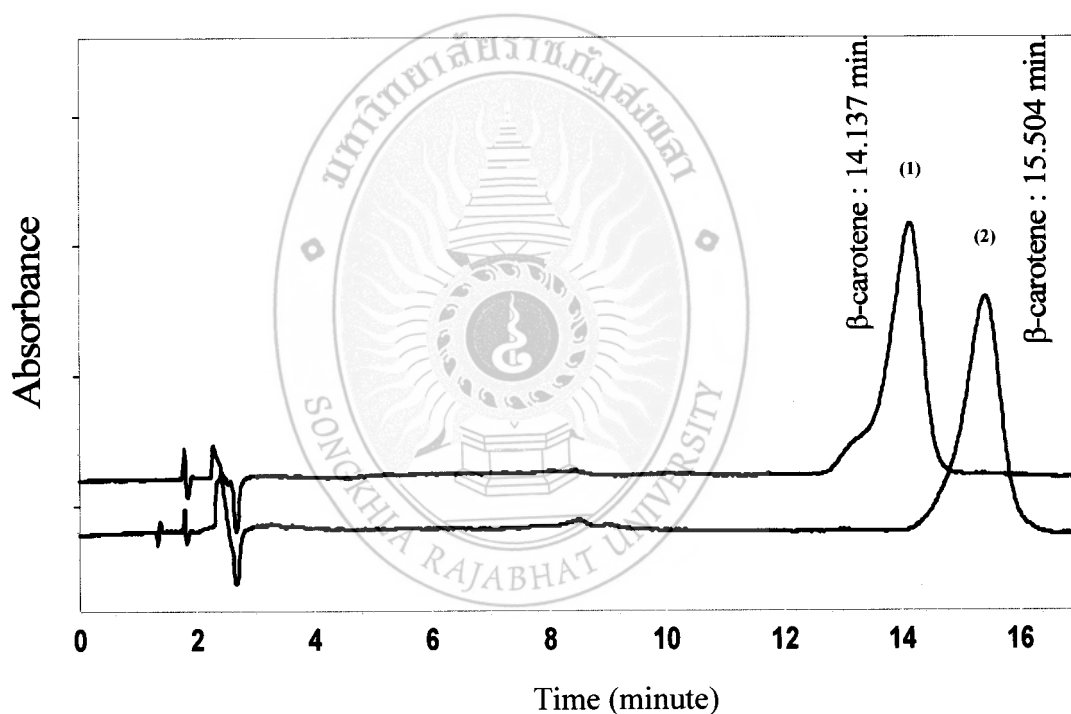
ตารางที่ 4.5 พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH

อุณหภูมิ (°C)	พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH ($\psi = 0.25\%$)					
	1/k กับ ψ			log k กับ ψ		
	S	$1/k_0$	r^2	S	$\log k_0$	r^2
25	0.353	0.041	0.9893	-1.962	1.334	0.9231
35	0.356	0.058	0.9938	-1.574	1.206	0.9869

จากตารางที่ 4.5 จะเห็นได้ว่ากราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ มีค่าความชันและ $1/k_0$ เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ส่วนกราฟที่เขียนระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ แสดงแนวโน้มในทิศทางตรงข้าม นั่นคือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่าความชันและ $\log k_0$ จะมีค่าลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์หรือค่า r^2 จากกราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ มีค่าที่ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 °C ($r^2 = 0.9938$) เมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 25 °C จากข้อมูลของพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีในตารางที่ 4.5 สามารถอธิบายเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C โดยพิจารณาจากค่าความชันและค่า $1/k_0$ เมื่อเฟสเคลื่อนที่มีค่า $\psi = 0.25\%$ จะเห็นได้ว่าความชันของกราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ มีค่าต่างกันเล็กน้อย แสดงว่าอุณหภูมิมิมีผลต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเพียงเล็กน้อย และเมื่อเฟสเคลื่อนที่มีค่า $\psi = 0\%$ (มี MeOH 100%) จะเห็นได้ว่าค่า $1/k_0$ ที่อุณหภูมิ 35 °C มีค่าน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 25 °C อย่างเห็นได้ชัด แสดงว่าเบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เช่นเดียวกันกับการพิจารณากราฟที่เขียนระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิต่ำและสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลของการเปลี่ยนแปลงสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยดูจากค่าความชันจะพบว่าค่าความชันเพิ่มขึ้นแสดงว่าเมื่อปรับเปลี่ยนสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ให้ลดลงโดยการเพิ่มสัดส่วนของ iso-propanol

ลงในเฟสเคลื่อนที่ ทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกมาเร็วที่อุณหภูมิสูงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเพียงเล็กน้อย แต่การเติม iso-propanol ลงในเฟสเคลื่อนที่ที่มีผลอย่างมากต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน นั่นคือ เมื่อทำให้สภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ลดลงเบต้าแคโรทีนจึงถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น

จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH (25:75 v/v) ที่ $\psi = 0.25\%$ ด้วยระบบ isocratic โดยเทคนิค RP-HPLC พบว่าเบต้าแคโรทีนถูกชะที่อุณหภูมิ 35 °C ได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25 °C ดังแสดงในรูปที่ 4.6

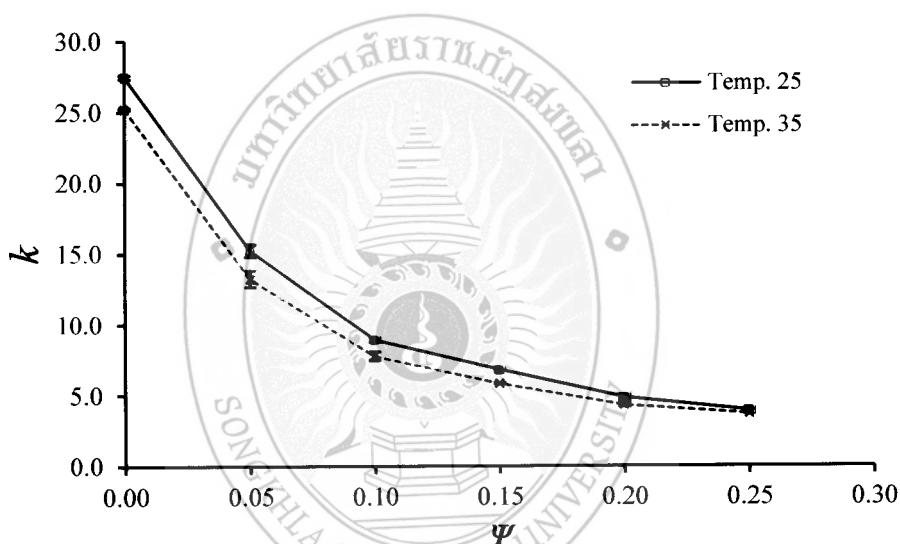


รูปที่ 4.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L ที่อุณหภูมิ 25 °C (2) และที่ 35 °C (1) ด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH (25:75 v/v) ที่ $\psi = 0.25\%$ เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min

ผลจากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:MeOH จะนำไปเปรียบเทียบกับผลของการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol: ACN ต่อไป

3.2 การศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN

จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN มีสัดส่วนของ iso-propanol:ACN ดังนี้ 0:100 (v/v) , 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25.75 (v/v) ซึ่งทำให้มีค่า ψ เท่ากับ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25% ตามลำดับ เมื่อเขียนความสัมพันธ์ระหว่างค่า k (แกน y) และ ค่า ψ (แกน x) แสดงดังรูปที่ 4.7



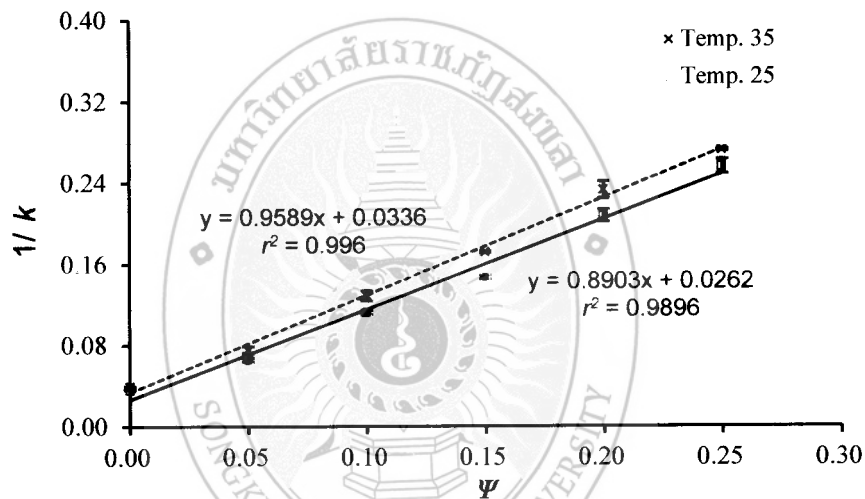
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า k กับ ψ ของ iso-propanol ใน ACN (%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.5 mL/min

จากรูปที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าค่า k ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อค่า ψ เพิ่มขึ้น นั่นคือ สัดส่วนของ iso-propanol ใน ACN เพิ่มขึ้น ทำให้สภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ลดลง (Lesellier *et al.*, 2003) เบต้าแคโรทีนจึงเกิดอันตรกิริยาได้ดีกับ iso-propanol ทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อเพิ่มค่า ψ เป็น 0.25% จะทำให้สามารถชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ได้เร็วที่สุด เมื่อเทียบกับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่อื่นๆ ที่ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ส่งผลให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็ว แสดงว่าอุณหภูมิมีผลการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ดังที่เคยอธิบายมาก่อนนี้ จะเห็นได้ว่าค่า k แปรผกผันกับค่า ψ โดยแสดงความสัมพันธ์แบบเอกซ์โพเนนเชียลที่สามารถอธิบายได้ตามสมการที่ 4.3 จากการทดลองสามารถเขียนสมการแบบเอกซ์โพเนนเชียล ได้ดังนี้

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 25^{\circ}\text{C} \quad k = 23.14e^{-7.70\psi} \quad \dots\dots\dots 4.12$$

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 35^{\circ}\text{C} \quad k = 20.36e^{-7.60\psi} \quad \dots\dots\dots 4.13$$

เพื่อให้ได้พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟี เช่น S , $1/k_0$, $\log k_0$ และ r^2 ดังนั้นจึงได้เขียนกราฟเส้นตรง ที่เขียนความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k$ กับ ψ ดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ



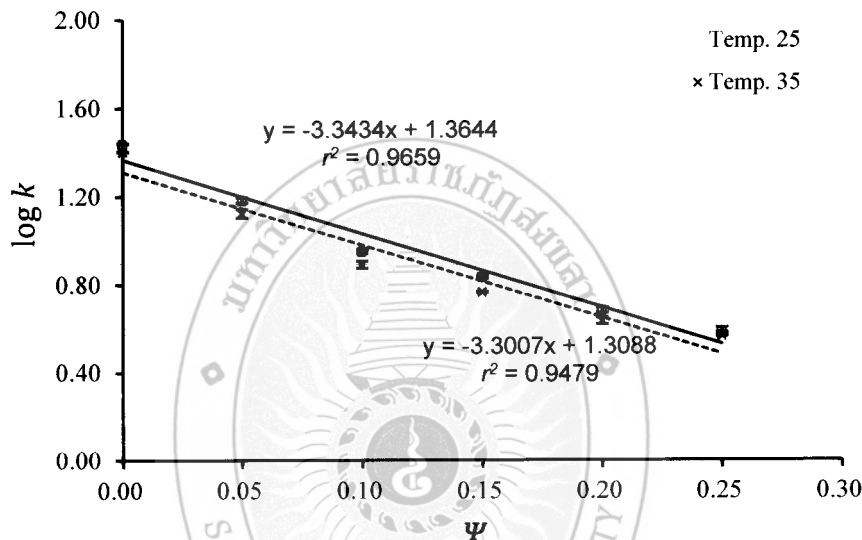
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ ของ iso-propanol ใน ACN (%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35°C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.5 mL/min

จากรูปที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าเมื่อค่า ψ เพิ่มขึ้น นั่นคือสัดส่วนของ iso-propanol ใน ACN เพิ่มขึ้น ทำให้สภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ลดลง เบต้าแคโรทีนจึงถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น (ค่า $1/k$ เพิ่มขึ้น) สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่า ψ กับค่า $1/k$ ได้โดยใช้สมการที่ 4.6 และสามารถเขียนสมการเชิงเส้นตรง ได้ดังนี้

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 25^{\circ}\text{C} \quad 1/k = 0.9589 (\pm 2.39 \times 10^{-8}) \psi + 0.0336 (\pm 1.20 \times 10^{-5}) \quad \dots\dots\dots 4.14$$

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 35^{\circ}\text{C} \quad 1/k = 0.8903 (\pm 4.68 \times 10^{-9}) \psi + 0.0262 (\pm 5.30 \times 10^{-6}) \quad \dots\dots\dots 4.15$$

จากสมการเส้นตรงที่เขียนได้ (สมการที่ 4.14 และ 4.15) พบว่าค่าความชันที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C มีค่าเท่ากับ 0.9589 และ 0.8903 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเฟสเคลื่อนที่ที่มี ACN เพียงอย่างเดียว ($\psi = 0\%$) เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์โดยใช้เวลานานที่สุด (ค่า $1/k$ ต่ำที่สุด) เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่มีสภาพขั้วสูงสุด จากรูปที่ 4.8 พบว่า $1/k_0$ ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C มีค่าเท่ากับ 0.0336 และ 0.0262 ตามลำดับ รูปที่ 4.9 แสดงกราฟเส้นตรงที่เขียนจากความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ ดังนี้



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ ของ iso-propanol ใน ACN (%vol $\times 10^{-2}$) ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ C-18 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.5 mL/min

จากรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มสัดส่วนของ iso-propanol ใน ACN (ทำให้ ψ เพิ่ม) มีผลให้ค่า $\log k$ ลดลง นั่นคือ เบต้าแคโรทีนเกิดอันตรกิริยาได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่ซึ่งทำให้ถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็ว สามารถอธิบายความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ด้วยสมการที่ 4.9 และสามารถเขียนสมการเชิงเส้นตรงที่ ได้ดังนี้

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 25^{\circ}\text{C} \quad \log k = -3.3434(\pm 5.33 \times 10^{-5}) \psi + 1.3644(\pm 5.66 \times 10^{-4}) \quad \dots\dots 4.16$$

$$\text{ที่อุณหภูมิ } 35^{\circ}\text{C} \quad \log k = -3.3007(\pm 1.22 \times 10^{-4}) \psi + 1.3088(\pm 8.57 \times 10^{-4}) \quad \dots\dots 4.17$$

จากสมการเส้นตรงที่เขียนได้ (สมการที่ 4.16 และ 4.17) จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C ความชันมีค่าน้อยกว่าศูนย์ ($S = -3.3434$ และ $S = -3.3007$ ตามลำดับ) และ

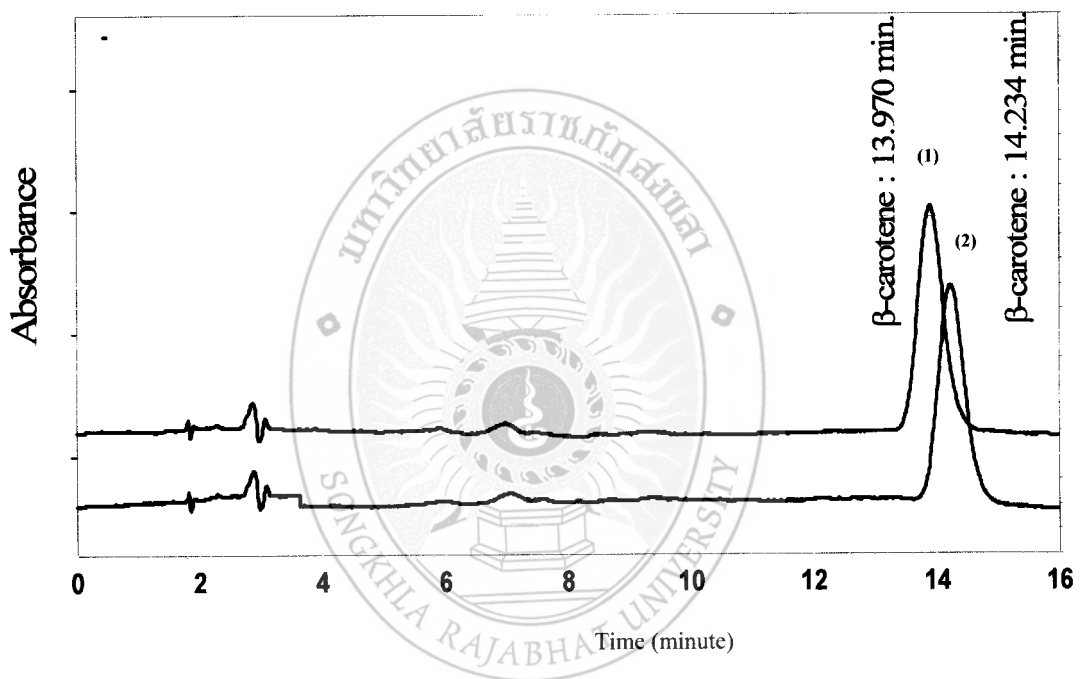
สามารถหาค่า $\log k_0$ ได้เช่นเดียวกับการหาค่า $1/k_0$ เมื่อ $\psi = 0\%$ จากรูปที่ 4.8 พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C ทำให้ $\log k_0$ มีค่าเท่ากับ 1.3644 และ 1.3088 ตามลำดับ จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k$ กับ ψ สามารถสรุปค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของ เบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN

อุณหภูมิ (°C)	พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของ เบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN ($\psi = 0.25\%$)					
	1/k กับ ψ			log k กับ ψ		
	S	$1/k_0$	r^2	S	$\log k_0$	r^2
25	0.890	0.026	0.9896	-3.343	1.364	0.9659
35	0.959	0.034	0.9960	-3.301	1.390	0.9479

จากตารางที่ 4.6 จะเห็นได้ว่ากราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ มีค่าความชันและ $1/k_0$ เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ส่วนกราฟที่เขียนระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ แสดงแนวโน้มในทิศทางตรงข้าม นั่นคือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่าความชันและ $\log k_0$ จะมีค่าลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์หรือค่า r^2 จากกราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ มีค่าที่ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 °C ($r^2 = 0.9960$) เมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 25 °C จากข้อมูลของพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีในตารางที่ 4.6 สามารถอธิบายเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C โดยพิจารณาจากค่าความชันและค่า $1/k_0$ เมื่อเฟสเคลื่อนที่มีค่า $\psi = 0.25\%$ จะเห็นได้ว่าความชันของกราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ มีค่าต่างกันเล็กน้อย แสดงว่าอุณหภูมิมิมีผลต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเพียงเล็กน้อย และเมื่อเฟสเคลื่อนที่มีค่า $\psi = 0\%$ (มี ACN 100%) จะเห็นได้ว่าค่า $1/k_0$ ที่อุณหภูมิ 35 °C มีค่าน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 25 °C อย่างเห็นได้ชัด แสดงว่าเบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เช่นเดียวกันกับการพิจารณากราฟที่เขียนระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิต่ำและสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลของการเปลี่ยนแปลงสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยดูจากค่าความชันจะพบว่าค่าความชันเพิ่มขึ้น

แสดงว่าเมื่อปรับเปลี่ยนสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ให้ลดลงโดยการเพิ่มสัดส่วนของ iso-propanol ลงในเฟสเคลื่อนที่ ทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกมาเร็วที่อุณหภูมิสูงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อพฤติกรรมของการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเพียงเล็กน้อย แต่การเติม iso-propanol ลงในเฟสเคลื่อนที่มีผลอย่างมากต่อพฤติกรรมของการถูกชะของเบต้าแคโรทีน นั่นคือ เมื่อทำให้สภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ลดลง เบต้าแคโรทีนจึงถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น



รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L ที่อุณหภูมิ 25 °C (2) และที่ 35 °C (1) ด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN (25:75 v/v) ที่ $\psi = 0.25\%$ เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min

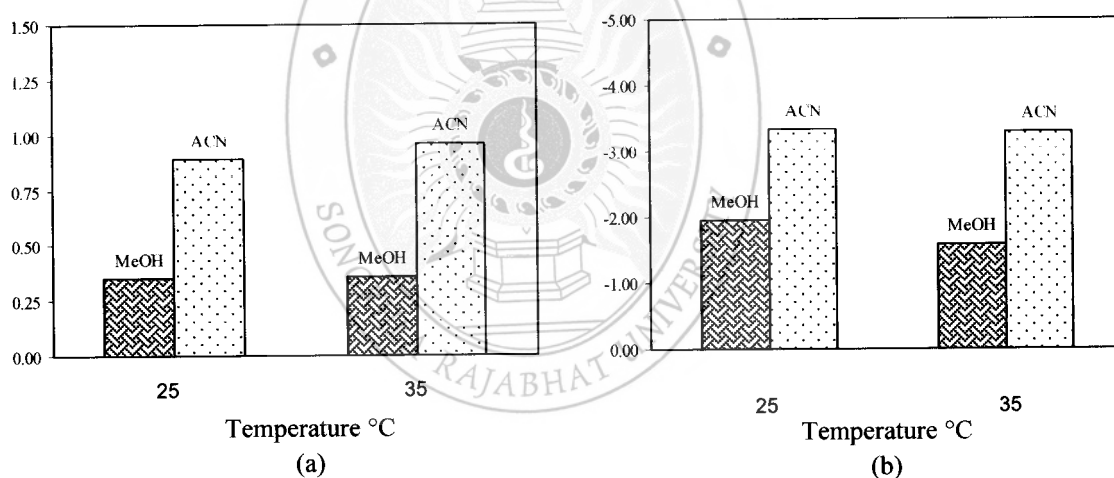
จากการศึกษาพฤติกรรมของการถูกชะของเบต้าแคโรทีนที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN (25:75 v/v) ที่ $\psi = 0.25\%$ ด้วยระบบ isocratic โดยเทคนิค RP-HPLC พบว่าเบต้าแคโรทีนถูกชะที่อุณหภูมิ 35 °C ได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25 °C และนอกจากนี้พบว่าลักษณะพีคของเบต้าแคโรทีนมีความคล้ายคลึงกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.10

3.3 การพิจารณาผลของพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการเขียนกราฟต่อพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน

จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน เมื่อเขียนกราฟเอกซ์โพเนนเชียลสามารถอธิบายได้เฉพาะแนวโน้มของการถูกชะของเบต้าแคโรทีนเท่านั้น แต่ไม่สามารถใช้พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากกราฟแบบเอกซ์โพเนนเชียล เพื่ออธิบายพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนได้ ในขณะที่กราฟเส้นตรงที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k$ กับ ψ สามารถใช้พารามิเตอร์ที่ได้จากกราฟ มาอธิบายพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนได้ พารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ ความชันและจุดตัดแกน y รายละเอียดมีดังนี้

3.3.1 ผลของความชันของกราฟเส้นตรง

เมื่อนำค่าความชันของกราฟเส้นตรงที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k$ กับ ψ เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN มาเขียนกราฟเทียบกับอุณหภูมิ สามารถแสดงดังรูปที่ 4.11



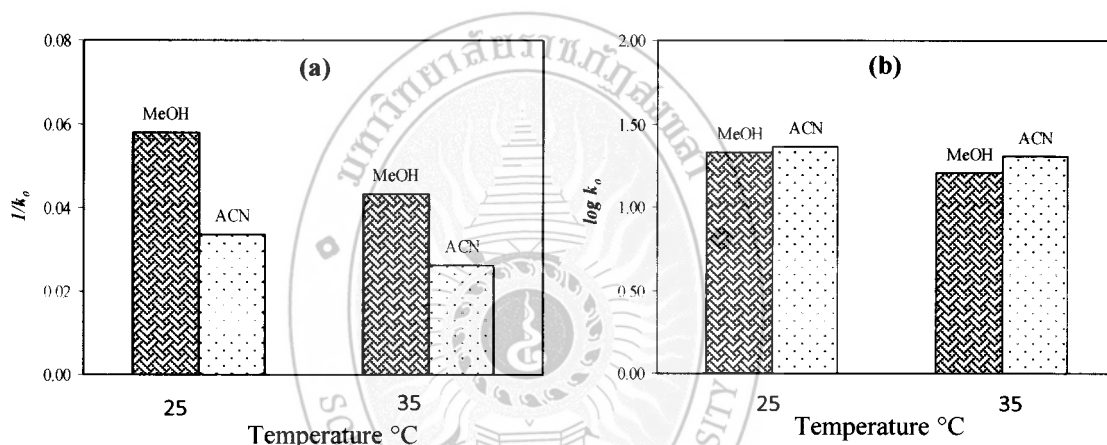
รูปที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบค่าความชันของกราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ (a) และค่า $\log k$ กับ ψ (b) เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าความชันของกราฟเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN มีค่าสูงกว่าความชันของกราฟเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH อย่างเห็นได้ชัดที่อุณหภูมิที่ศึกษา แสดงว่าเบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วเมื่อใช้ iso-propanol:ACN เป็นเฟสเคลื่อนที่ และจะถูกชะได้เร็วขึ้นที่อุณหภูมิ 35 °C ทั้งนี้เนื่องจากเบต้าแคโรทีนสามารถเกิดอันตรกิริยากับ iso-propanol ที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เติมลงไปในเฟสเคลื่อนที่ ACN เนื่องจากผลของ hydrophobic interactions ดังนั้นเฟสเคลื่อนที่

iso-propanol:ACN สามารถชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ได้ดีกว่าเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH อย่างไรก็ตาม ค่าความชันที่ได้จากการเขียนกราฟระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k$ กับ ψ สามารถอธิบายพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนได้ไม่แตกต่างกัน

3.3.2 ผลของจุดตัดแกน y ของกราฟเส้นตรง

เมื่อนำค่าจุดตัดแกน y ที่ได้จากกราฟเส้นตรงที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k$ กับ ψ เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ปราศจากการเติม iso-propanol ($\psi = 0\%$) มาเขียนกราฟเทียบกับอุณหภูมิ สามารถแสดงดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 แสดงการเปรียบเทียบค่า $1/k_0$ ที่ได้จากกราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ (a) และค่า $\log k_0$ ที่ได้จากกราฟที่เขียนระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ (b) เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN

จากรูปที่ 4.12 จะเห็นได้ว่าจุดตัดแกน y ($1/k_0$) ที่ได้จากกราฟเส้นตรงที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ ACN มีค่าน้อยกว่า MeOH (ค่า $1/k_0$ น้อยแสดงว่าค่า t_r น้อย) ในขณะที่จุดตัดแกน y ($\log k_0$) ที่ได้จากกราฟเส้นตรงที่เขียนระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ ACN มีค่า $\log k_0$ มากกว่า MeOH (ค่า $\log k_0$ มากแสดงว่าค่า t_r น้อย) ที่อุณหภูมิที่ศึกษา แสดงว่าเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ ACN เท่ากับ 100% เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ MeOH เท่ากับ 100% และเบต้าแคโรทีนจะถูกชะได้เร็วขึ้นที่อุณหภูมิ 35 °C ทั้งนี้เนื่องจาก ACN มีค่าดัชนีสภาพขั้วต่ำกว่า MeOH จึงทำให้เบต้าแคโรทีนสามารถเกิด hydrophobic interactions กับ ACN ได้ดีกว่า MeOH จึงทำให้เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าจุดตัดแกน y จากการเขียนกราฟทั้งสอง ($1/k_0$ และ $\log k_0$) จะเห็นได้ว่าค่า $1/k_0$ ที่ได้จากกราฟเส้นตรงที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ มีความแตกต่างระหว่าง

เฟสเคลื่อนที่ทั้งสองชนิดได้ดีกว่าค่า $\log k_0$ ที่ได้จากกราฟเส้นตรงที่เขียนระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ ดังนั้น การเขียนกราฟเส้นตรงระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ สามารถนำพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากกราฟมาใช้อธิบายพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนได้ดีกว่าการเขียนกราฟเส้นตรงระหว่างค่า $\log k$ กับ ψ

จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนระหว่างเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN สามารถสรุปพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสม 2 ชนิดที่มีสภาพขั้วต่างกันด้วยเทคนิค RP-HPLC

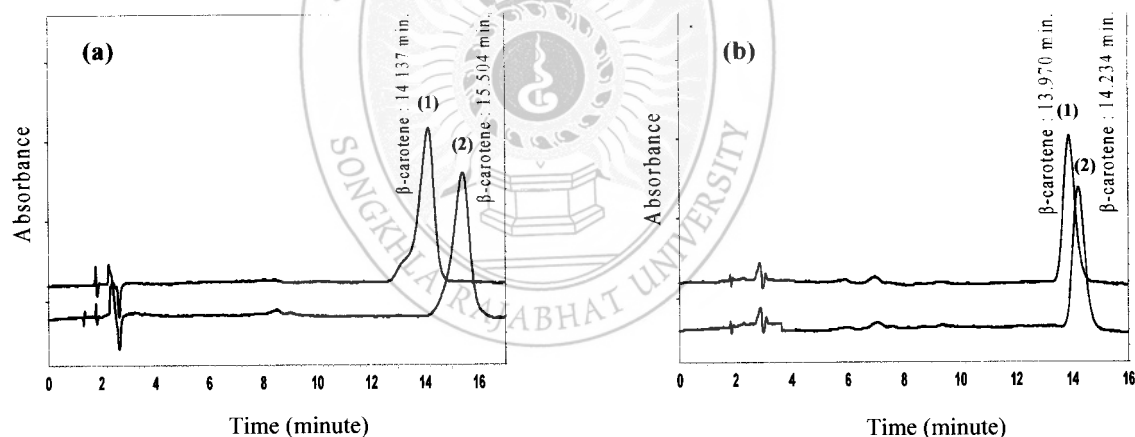
อุณหภูมิ (°C)	Iso-propanol:MeOH ($\psi=0.25\%$)						Iso-propanol:ACN ($\psi=0.25\%$)					
	1/k กับ ψ			log k กับ ψ			1/k กับ ψ			log k กับ ψ		
	S	$1/k_0$	r^2	S	$\log k_0$	r^2	S	$1/k_0$	r^2	S	$\log k_0$	r^2
25	0.353	0.044	0.9893	-1.962	1.334	0.9231	0.890	0.026	0.9896	-3.343	1.364	0.9659
35	0.356	0.058	0.9938	-1.574	1.206	0.9869	0.959	0.034	0.9960	-3.301	1.309	0.9479

เมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการเขียนกราฟเส้นตรงที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และ $\log k$ กับ ψ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟี เช่น S, $1/k_0$ และ $\log k_0$ ที่ได้จากเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN มีค่าที่ดีกว่าเมื่อเทียบเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH นอกจากนี้ยังพบอีกว่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (r^2) ที่ได้จากกราฟที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN ที่อุณหภูมิ 35 °C มีค่าที่ดีที่สุด ($r^2 = 0.9960$) เมื่อเปรียบเทียบกับเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH ($r^2 = 0.9938$)

3.4 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดที่ $\psi = 0.25\%$

จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนภายใต้เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ด้วยระบบ isocratic โดยเทคนิค RP-HPLC จะเห็นได้ว่าการที่เบต้าแคโรทีนจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ในเวลาที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ อุณหภูมิของคอลัมน์ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ และอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ เป็นต้น

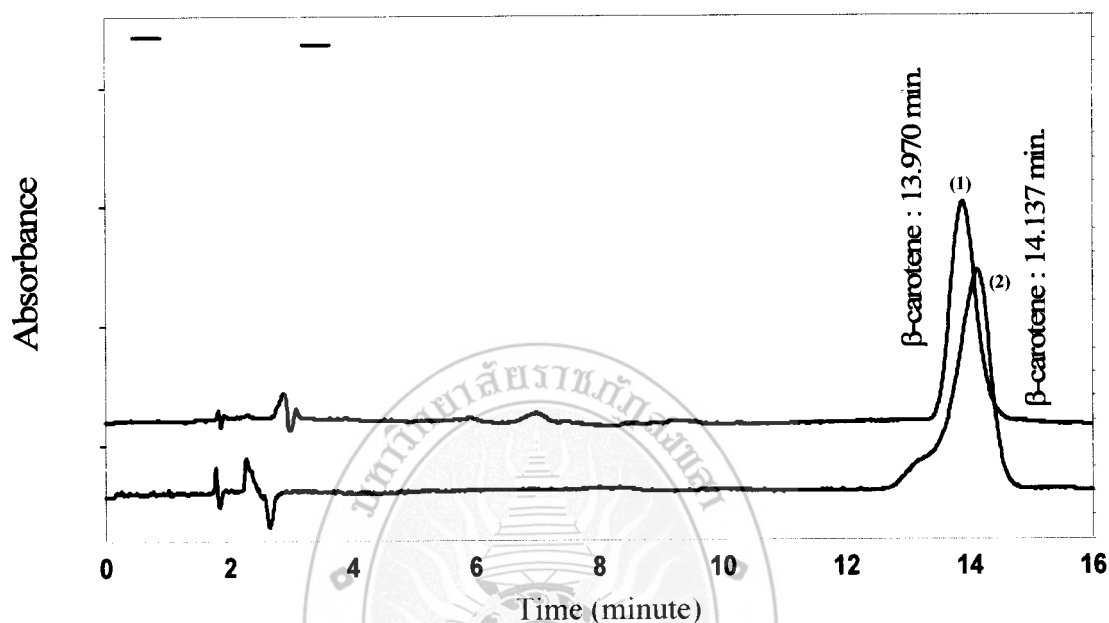
รูปที่ 4.13 แสดงโครมาโทแกรมของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ของ iso-propanol:ACN และ iso-propanol:MeOH ($\psi = 0.25\%$) ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C จากรูปจะเห็นได้ว่าเบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN (รูปที่ 4.13 (b)) ได้เร็วกว่าการใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH (รูปที่ 4.13 (a)) และถูกชะออกที่อุณหภูมิ 35 °C (1) ได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25 °C (2)



รูปที่ 4.13 โครมาโทแกรมของสารละลายเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า $\psi = 0.25\%$ ของ iso-propanol:MeOH (a) และ iso-propanol:ACN (b) ที่ อุณหภูมิ 25 °C (2) และที่ 35 °C (1) โดยเทคนิค RP-HPLC เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min

เมื่อเปรียบเทียบการถูกชะของเบต้าแคโรทีน ที่อุณหภูมิ 35 °C ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH กับ iso-propanol:ACN ที่ $\psi = 0.25\%$ พบว่าเบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วที่สุดที่เวลา 13.970 นาที เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN ในขณะที่เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH จะชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ที่เวลา 14.137 นาที ดังรูปที่ 4.14 ดังนั้น ตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN ที่ $\psi = 0.25\%$ จึงเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ในการชะเบต้าแคโรทีนที่อุณหภูมิ 35 °C ออกจากคอลัมน์ C-18 โดยเทคนิค RP-HPLC เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min



รูปที่ 4.14 โครมาโทแกรมของสารละลายเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า $\psi = 0.25\%$ ของ iso-propanol:MeOH (2) และ iso-propanol:ACN (1) ที่อุณหภูมิ 35 °C โดยเทคนิค RP-HPLC เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min

จากการศึกษาสภาวะต่าง ๆ เพื่อชะเบต้าแคโรทีนโดยเทคนิค RP-HPLC พบว่าสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลของเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 445 nm อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 35 °C อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min และตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN ที่ $\psi = 0.25\%$ ดังนั้นจึงสามารถนำสภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้ไปใช้ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ และวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนจากตัวอย่างผักต่อไป

4. การทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์

การใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้องและความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษา เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการที่ทำให้ทราบถึงข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้น ๆ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ โดยศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ทดสอบความแม่นยำ ทดสอบความเที่ยง ตรวจสอบขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด และตรวจหาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจหาปริมาณได้ รายละเอียดมีดังนี้

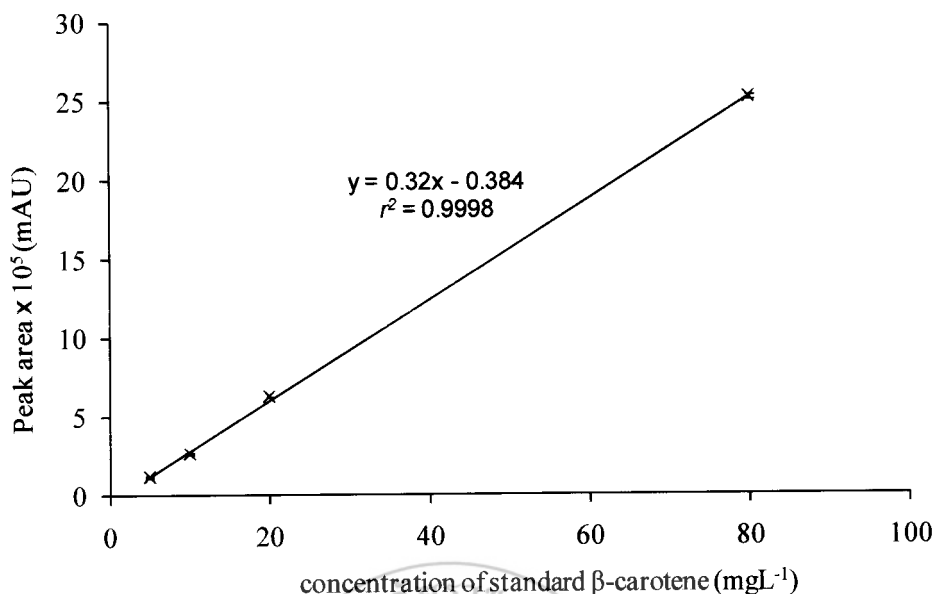
4.1 การทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง

ในการวิเคราะห์เบต้าแคโรทีนด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้สารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีน ที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20 และ 80 mg/L เมื่อใช้สภาวะของเครื่อง HPLC ดังนี้ อุณหภูมิของคอลัมน์ 35 °C เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN ในอัตราส่วน 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 445 nm แล้วบันทึกค่าพื้นที่ใต้พีค ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนกับค่าพื้นที่ใต้พีค (N=3)

ความเข้มข้น (mg/L)	พื้นที่ใต้พีค $\times 10^5$ (mAU)				\pm SD (mAU)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
5	1.15	1.18	1.20	1.18	0.02
10	2.63	2.66	2.70	2.67	0.03
20	6.22	6.25	6.25	6.24	0.02
80	25.06	25.13	25.35	25.18	0.15

จากตารางที่ 4.8 สามารถนำข้อมูลที่ได้นำมาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนและพื้นที่ใต้พีค พบว่าได้กราฟเส้นตรงที่มีสมการ $y = 0.32x - 0.384$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9998 และพบว่าสามารถตรวจวัดได้ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ถึง 80 mg/L ดังแสดงในรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีน (mg/L) และพื้นที่ใต้พีค $\times 10^5$ (mAU) เมื่อสภาวะของเครื่อง HPLC ดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 mL/min ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 445 nm ที่อุณหภูมิ 35 °C

4.2 การทดสอบความแม่นยำ

ในการทดสอบความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์จะรายงานเป็นร้อยละการได้กลับคืนมา โดยนำสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนที่ความเข้มข้น 38 mg/L (กำหนดให้เท่ากับ C_0) มาทำการสกัดด้วยอะซิโตน 90% จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ไปตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ที่มีสภาวะของเครื่อง ดังนี้ อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 35 °C อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN เท่ากับ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 445 nm แล้วบันทึกค่าพื้นที่ใต้พีค และหาปริมาณเบต้าแคโรทีนที่ตรวจวัดได้ (กำหนดให้เท่ากับ C_m) โดยเทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 4.9

จากตารางที่ 4.9 จากผลการศึกษาได้ความเข้มข้นเท่ากับ 37.72 ± 2.47 mg/L แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของการได้กลับคืนมาโดยใช้สมการที่ 3.3 พบว่าค่าร้อยละของการได้กลับคืนมาเท่ากับ 99.26

ตารางที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนกับค่าพื้นที่ใต้พีค (N=3)

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีน (C_i ; mg/L)	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนที่ทราบค่า (C_m ; mg/L)				±SD (mg/L)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
38	35.01	37.72	38.29	37.72	2.47

4.3 การทดสอบความเที่ยง

ในการทดสอบความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์จะรายงานเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยทำการทดลองซ้ำในวันเดียวกัน (Intramediate precision) ในการทดสอบได้นำสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนความเข้มข้น 10 mg/L ไปตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ที่มีสภาวะของเครื่องดังนี้ อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 35 °C อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN เท่ากับ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น เท่ากับ 445 nm แล้วบันทึกค่าพื้นที่ใต้พีค ดังแสดงในตารางที่ 4.10

จากตารางที่ 4.10 สามารถคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากผลการตรวจวัดได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.65 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.02 ตามลำดับ นำผลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยใช้สมการที่ 3.4 พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.81%

ตารางที่ 4.10 ผลการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L (N=10)

สารละลายมาตรฐาน เบต้าแคโรทีนเข้มข้น 10 mg/L	
ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีค $\times 10^5$ (mAU)
1	2.63
2	2.66
3	2.60
4	2.64
5	2.65
6	2.66
7	2.68
8	2.65
9	2.65
10	2.66
ค่าเฉลี่ย	2.65
SD	± 0.02
%RSD	0.81

4.4 การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและค่าต่ำสุดที่ตรวจหาปริมาณได้

ในการหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและค่าต่ำสุดที่ตรวจหาปริมาณได้ทำได้โดยนำสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนความเข้มข้น 10 mg/L ไปตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ที่มีสภาวะของเครื่อง ดังนี้ อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 35 °C อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN เท่ากับ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 445 nm แล้วบันทึกค่าพื้นที่ใต้พีค ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากผลการตรวจวัดได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.02 นำผลที่ได้มาคำนวณหาขีดจำกัดต่ำสุดและปริมาณต่ำสุดที่ตรวจหาปริมาณได้จากสมการที่ 3.7 และ 3.8 พบว่าค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.06 mg/L และค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจหาปริมาณได้เท่ากับ 0.64 mg/L

5. การวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนจากตัวอย่างผัก

จากการศึกษาสมภาวะต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC และการทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ จะเห็นได้ว่าเทคนิค RP-HPLC มีความจำเพาะเจาะจง ความแม่นยำ และมีความเที่ยงสูง ดังนั้นจึงนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผักจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ แครอท ฟักทอง มะเขือเทศ บรอกโคลี กระนำ ผักโขม และสาหร่ายผมนาง โดยทำการสกัดเบต้าแคโรทีนจากตัวอย่างผักด้วยตัวทำละลายอะซิโตน 90% (ใช้วิธีการสกัดแบบแบทช) และนำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ไปตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ที่มีสภาวะของเครื่อง ดังนี้ อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 35 °C อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN เท่ากับ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 445 nm แล้วบันทึกค่าพื้นที่ใต้พีค คำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผักโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ผลการศึกษา ดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก (N=3)

ตัวอย่างผัก	ปริมาณของเบต้าแคโรทีน (g/kg) ±SD
แครอท	1130.81 ± 0.44
ผักโขม	451.90 ± 0.21
ฟักทอง	361.48 ± 0.53
กระนำ	252.94 ± 0.12
มะเขือเทศ	211.27 ± 0.14
บรอกโคลี	193.65 ± 0.03
สาหร่ายผมนาง	ND

หมายเหตุ ND = ไม่สามารถตรวจวัดได้ (Non-Detectable)

จากตารางที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าแครอทมีปริมาณเบต้าแคโรทีนมากที่สุด รองลงมาคือ ผักโขม ฟักทอง กระนำ มะเขือเทศ และบรอกโคลี ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายผมนางไม่สามารถตรวจวัดเบต้าแคโรทีนได้

บทที่ 5

สรุป

เบต้าแคโรทีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่มีสภาพขั้ว จึงเหมาะสำหรับนำมาศึกษาพฤติกรรมถูกกักด้วยเทคนิค RP-HPLC ที่ใช้ระบบการชะแบบ isocratic จากการศึกษาพบว่าเบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็ว เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v) ที่ $\psi = 0.25\%$ แสดงว่าสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อพฤติกรรมถูกกักของเบต้าแคโรทีน นั่นคือ เมื่อเติม iso-propanol ลงในเฟสเคลื่อนที่เพื่อปรับสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ให้ต่ำลง ทำให้เบต้าแคโรทีนเกิดอันตรกิริยากับ iso-propanol ในเฟสเคลื่อนที่ได้ดี เบต้าแคโรทีนจึงถูกชะออกจากคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 25 เป็น 35 °C เบต้าแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น เนื่องจาก อุณหภูมิที่สูงจะทำให้พลังงานอิสระของการจับตัวระหว่างเบต้าแคโรทีนกับ immobilized *n*-alkyl ภายในคอลัมน์ C-18 ลดลงในระหว่างการถูกชะออกจากคอลัมน์ ในการศึกษาสามารถใช้ค่า k และค่า ψ มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์แบบต่าง ๆ เพื่อใช้อธิบายพฤติกรรมถูกกักของเบต้าแคโรทีนได้ 2 แบบ ได้แก่ กราฟเอกซ์โพเนนเชียลที่เขียนระหว่างค่า k กับ ψ และกราฟเส้นตรงที่เขียนระหว่างค่า $1/k$ กับ ψ และค่า $\log k$ กับ ψ ที่มีค่าความชันมากกว่าศูนย์และน้อยกว่าศูนย์ ตามลำดับ จากกราฟเส้นตรงที่ได้ทำให้สามารถนำค่าพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ $1/k_0$ และ $\log k_0$ มาอธิบายพฤติกรรมถูกกักของเบต้าแคโรทีน เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่ไม่เติม iso-propanol ลงไป ($\psi = 0\%$) พบว่าเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ ACN เพียงอย่างเดียว สามารถชะเบต้าแคโรทีนออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ MeOH ที่ไม่เติม iso-propanol จากการศึกษาทำให้สามารถนำตัวทำละลายผสมระหว่าง iso-propanol:ACN ที่ $\psi = 0.25\%$ เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการนำไปหาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก 7 ชนิดที่อุณหภูมิ 35 °C ได้ ผลการตรวจวัดพบว่าแครอทมีปริมาณเบต้าแคโรทีนมากที่สุดเท่ากับ 1130.81 g/kg ส่วนผักโขม ฟักทอง กระเทียม และมะเขือเทศ มีปริมาณลดลง ตามลำดับ บรอกโคลีมีปริมาณเบต้าแคโรทีนน้อยสุดเท่ากับ 193.65 g/kg ในขณะที่สาหร่ายผมนางไม่สามารถตรวจวัดปริมาณเบต้าแคโรทีนได้

ข้อเสนอแนะ

HPLC เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูง อุปกรณ์ต่าง ๆ ของ HPLC ส่วนใหญ่มีราคาแพง ดังนั้นผู้ใช้งานจึงจำเป็นต้องเรียนรู้เรื่องการดูแลรักษาตัวเครื่อง รวมทั้งคอลัมน์สำหรับการแยก และการรีดคอลัมน์ เป็นต้น ในการดูแลรักษาคอลัมน์ ควรล้างคอลัมน์สำหรับการแยก

ด้วย MeOH 100%, iso-propanol:MeOH อัตราส่วน 25:75 (v/v), iso-propanol 100%, methylene chloride 100% ตามลำดับ อย่างละ 1 ชั่วโมง และควรถอดการ์ดคอลัมน์มาจัดสารปนเปื้อนด้วย hexane และ MeOH โดยใช้เครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง อย่างละครึ่งชั่วโมง อาทิตย์ละ 1 ครั้ง เพื่อไม่ให้คอลัมน์เกิดการอุดตัน ดังนั้นควรดูแลรักษาเครื่องมืออย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องและมีอายุการใช้งานยาวนานขึ้น

แนวทางการพัฒนา

จากการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีนด้วยเทคนิค RP-HPLC สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก ผลไม้ และอาหารเสริมชนิดต่าง ๆ อีกทั้งสามารถใช้ประโยชน์อ้างอิงสำหรับการใช้พัฒนาเทคนิควิธีในการวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ได้



บรรณานุกรม

- กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2546) ปริมาณสารอาหารอ้างอิงที่ควรได้รับประจำวันสำหรับคนไทย [Online]. Available: <http://www.nutrition.anamai.moph.go.th/temp/files/antioxidan.pdf>. สืบค้นเมื่อ 14 เมษายน 2557.
- ข้อมูลโภชนาการ (2549) [Online]. Available: <http://www.healthrethai.com> สืบค้นเมื่อ 26 กรกฎาคม 2557.
- โครงสร้างของเบต้าแคโรทีน (2557) [Online]. Available: <http://www.google.co.th/search?q=โครงสร้าง+เบต้าแคโรทีน> สืบค้นเมื่อ 14 เมษายน 2557.
- จรรูวรรณ สุจริต (2552a). เอกสารประกอบการสอนรายวิชาการวิเคราะห์โดยเครื่องมือ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา, หน้า 69-70.
- จรรูวรรณ สุจริต (2552b). เอกสารประกอบการสอนรายวิชาการวิเคราะห์โดยเครื่องมือ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา, หน้า 73.
- จรรูวรรณ สุจริต (2552c). เอกสารประกอบการสอนรายวิชาการวิเคราะห์โดยเครื่องมือ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา, หน้า 29.
- ธวัชชัย ศรีวิบูล (2551) เทคนิคการแยก, ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, พิมพ์ที่สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง ครั้งที่ 1, 356 หน้า.
- เบต้าแคโรทีน (2556) [Online]. Available: <http://www.th.wikipedia.org/wiki/เบต้าแคโรทีน> สืบค้นเมื่อ 25 กรกฎาคม 2557
- ปิยศิริ สุนทรนนท์ (2551) สารต้านอนุมูลอิสระในดอกดาหลา. วิทยานิพนธ์, วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 142 หน้า.
- แผนภาพแสดงส่วนประกอบของเครื่อง HPLC (2556) [Online]. Available: <http://www.lcresources.com/resources/getstart/1c01.htm> สืบค้นเมื่อ 1 กรกฎาคม 2557
- พัฒนา เหล่าไพบูลย์ (2554a) HPLC โคโรมาโทกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูงหลักการและการประยุกต์ใช้, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น, พิมพ์ครั้งที่ 3, พิมพ์ที่ หจก.ขอนแก่นการพิมพ์, หน้า 84-93.
- พัฒนา เหล่าไพบูลย์ (2554b) HPLC โคโรมาโทกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูงหลักการและการประยุกต์ใช้, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น, พิมพ์ครั้งที่ 3, พิมพ์ที่ หจก.ขอนแก่นการพิมพ์, หน้า 45.
- มัน อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวนิช (2553a) หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. บริษัทชวนพิมพ์ 50 จำกัด กรุงเทพมหานคร, หน้า 397.

- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวนิช (2553b) *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. บริษัทชวนพิมพ์ 50 จำกัด กรุงเทพมหานคร, หน้า 427.
- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวนิช (2553c) *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. บริษัทชวนพิมพ์ 50 จำกัด กรุงเทพมหานคร, หน้า 409.
- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวนิช (2553d) *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. บริษัทชวนพิมพ์ 50 จำกัด กรุงเทพมหานคร, หน้า 428-429.
- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวนิช (2553e) *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. บริษัทชวนพิมพ์ 50 จำกัด กรุงเทพมหานคร, หน้า 8.
- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวนิช (2553f) *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. บริษัทชวนพิมพ์ 50 จำกัด กรุงเทพมหานคร, หน้า 9.
- วารสารโภชนาการ ฉบับที่ 2 ปีที่ 45 เดือนกรกฎาคม-ธันวาคม 2553 : พิมพ์ที่โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย [Online] Available: www.nutritionthailand.or.th. สืบค้นเมื่อ 25 กรกฎาคม 2557.
- ศศิธร ศิริวรราชัย (2546) วิตามินเอกับเบต้าแคโรทีน [Online] Available: [http:// www.uniserv.buu.ac.th/forum2/post.asp?](http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/post.asp?) สืบค้นเมื่อ 20 กรกฎาคม 2557.
- อัญชลี อุทา (2554) กินต้านมะเร็งเต้านม [Online] Available: <http://www.bloggang.com/mainblog> สืบค้นเมื่อ 3 สิงหาคม 2557.
- แอลกอฮอลล์, [Online]. Available:<http://www.th.wikipedia.org/wiki/แอลกอฮอลล์> สืบค้นเมื่อ 19 กรกฎาคม 2557.
- โสภา วัชรคุปต์ (2549) *สารต้านอนุมูลอิสระ*. พิมพ์ครั้งที่ 1 ,พิมพ์ที่ พี.เอส.พรีนซ์ นนทบุรี 200 หน้า
- Ahamad MN., Saleemullah M., Shas U.H., Khalil A.I and Saljoqi A.U.R.(2007) Determination of bata carotene content in fresh vegetables using high-performance liquid chromatography. *Sarhad J. Argic*,**23**: pp 767-770.
- Andrés, V., Villanueva M.J. and Tenorio M.D.(2014) Simultaneous determination of tocopherols, retinol, ester derivatives and β -carotene in milk-and soy-juice based beverages by HPLC with diode-array detection. *J.LWT-Food Science and Technology*,**58**: pp 557-562.
- Barba O.,Hurtado C.,Mata S., Ruiz F. and Teja L. (2006) Application of a UV-Vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *J.Food Chemistry* ,**95**: pp 328-336.

- Englberge L., Schierle J., Marks G.C. and Fitzgerald M.H. (2003) Micronesian banana, taro, and other foods: newly recognized sources of provitamin A and other carotenoids. *J.Food Composition and Analysis*, **16**: pp 3-19.
- Foss, P.T. Storebakken, K. Schiedt, S. Liaaen-Jensen, E Austreng and K. Streiff. (1984) Carotenoid in diets for salmois I: Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *J. Aquaculture*, **41**: pp 213-226.
- Gimeno E., Calero E., Castellote A.I., Lamuela-Raventos R.M. and De la Torre M.C. (2000) Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatography A*, **881**: pp 255-259.
- Gimeno E., Calero E., Castellote A.I., Lamuela-Raventos R.M. and De la Torre M.C. (2001) Rapid high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in human plasma and low-density lipoproteins. *J.Chromatography B*, **758**: pp 315–322.
- Giovannucci E. (1999) Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: a review of the epidemiologic literature. *J.Natl. Cancer Inst*, **91**: pp 317-331.
- Health Today (2547) Available: <http://www.organithailand.com/webborad-php>. สืบค้นเมื่อ 26 กรกฎาคม 2557.
- Karppi J., Nurmi T., Olmedilla-Alonso B., Granado-Lorencio F. and Nyysönen K. (2008) Simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol and six carotenoids in human plasma by using an isocratic reversed-phase HPLC method. *J.Chromatography B*, **867**: pp 226–232.
- Lesellier, E., West, C. and Tchaplal, A. (2003) Advantages of the use of monolith stationary phases for modelling the retention in sub/supercritical chromatography Application to *cis/trans*- β -carotene separation. *J.Chromatography A*, **1018**: pp 225-232
- Lin C.H. and Chen B.H. (2003) Determination of carotenoids in tomato juice by liquid Chromatography. *J.Chromatography A*, **1012** : pp 103-109.
- Lyan B., Azais-Braesco v., Cardinault N., Tyssandier V., Borel P., Alexandre-Gouabau M. and Grolier P. (2001) Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. *J.Chromatography B*, **751** : pp 297–303.

- Murkovic M., Mulleder U. and Neunteufl H. (2002) Carotenoid Content in Different Varieties of Pumpkins. *J.Food composition and analysis*, **15**: pp 633–638.
- Nikitas, P., and Pappa-Louisi, A. (2009) Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatography A*, **1216**: pp 1737-1755.
- Nyambaka H. and Reley J. (1996) An isocratic reversed-phase HPLC separation of the stereoisomers of the provitamin A carotenoids (α - and β -carotene) in dark green vegetables. *J.Food Chemistry*, **55**: pp 63-72.
- Pupin A.M., Dennis M.J. and Toledo M.C.F. (1999) HPLC analysis of carotenoids in orange juice. *J.Food Chemistry*, **64**: pp 269-275.
- Purcell, A.W., Zhao, G.L., Aguilar, M.I., and Hearn, M.T.W. (1999) Comparison between the isocratic and gradient retention behavior of polypeptides in reversed-phase liquid chromatographic environments. *J. Chromatography A*, **852**: pp 43-55.
- Rajendran, V., Pu, Y.S. and Chen, B.H. (2005) An improved HPLC method for determination of carotenoids in human serum. *J. of Chromatography B*. **824**, 99–106.
- Rao, A.V. and Honglei, S. (2002) Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *J. Nutrition Research*. **22**(10), 1125-1131.
- Robinson C.H., Marilyn R.L., Wanda L.C. and Garwick A.E. (1986) Analyzed summer vegetables for their micronutrient content. *J. Nutrition*, **45**: pp 497-502.
- Phenomenex [Online]. Available: <http://www.Phenomenex.com> สืบค้นเมื่อ 19 กรกฎาคม 2557.
- Skoog DA., West DM. and Holler F.J. (1987) *J.Fundamentals of analytical Chemistry*, America pp:56-58.
- Suitcharit, C., Jullanin, N., Jantharangsri, M., and Nooyimsai, J. (2013) Retention behavior of β -carotene under binary mobile phase for isocratic elution in reversed-phase liquid chromatography. 39th Congress on Science and Technology of Thailand.
- Thibeault D., Su H., Macnamara E. and Shipper M.H., (2009) Isocratic rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of carotenoids, retinol and tocopherols in human serum. *J.Chromatography B*, **877**: pp 1077-1083.

- Watson RR. and Moriguchi S. (1991) Beta-carotene 's effect on serum lipoproteins and immunologic indices in human. *J.Clinical Nutrition*, **54** :pp 609-610.
- Xu, F., Yuan and Q.P. (2006) Determination of lycopene and β -carotene by high-performance liquid chromatography using sudan I as internal standard. *J. of Chromatography B*, **838**:pp 44–49.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

ผลของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลของเบต้าแคโรทีน

ความยาวคลื่น (λ) (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง (abs)
375	0.107
380	0.132
385	0.172
390	0.193
395	0.240
400	0.288
405	0.326
410	0.376
415	0.447
420	0.516
425	0.565
430	0.595
435	0.639
440	0.717
445	0.803
450	0.694
455	0.669
460	0.604
465	0.578
470	0.593
475	0.625
480	0.619
485	0.541
490	0.412
495	0.274
500	0.104

ตารางที่ ก.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับค่า t_r เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v) และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min

อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	ค่า t_r (min)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย \pm SD
25	14.23	14.68	14.46 \pm 0.31
35	13.97	13.90	13.94 \pm 0.05

ตารางที่ ก.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กับค่า t_r และความดันของเครื่อง HPLC เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN อัตราส่วน 25:75 (v/v) ที่อุณหภูมิ 35 $^{\circ}\text{C}$

อัตราการไหล (mL/min)	ค่า t_r (min)			ความดัน (psi)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย \pm SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
1.0	22.95	22.91	22.93 \pm 0.03	1000	990	995
1.5	13.97	13.90	13.94 \pm 0.05	1200	1220	1210
2.0	8.52	8.57	8.55 \pm 0.04	2700	2800	2750

ภาคผนวก ข.

ผลของการศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดที่มีผลต่อการชะเบต้าแคโรทีน

ตารางที่ ข.1 แสดงค่า t_r , t_0 และค่า k ของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 35 °C

เฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 5:95 (v/v)	ค่า t_r (min)			ค่า t_0 (min)			ค่า $k \pm SD$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm SD$	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm SD$	
iso-propanol:MeOH	24.81	24.89	24.85 \pm 0.06	2.44	2.47	2.46 \pm 0.02	9.12 \pm 0.08
n-propanol:MeOH	25.86	25.78	25.82 \pm 0.06	1.99	2.00	2.00 \pm 0.01	11.94 \pm 0.05
iso-propanol:ACN	35.06	36.94	36.00 \pm 1.33	3.42	3.50	3.46 \pm 0.06	9.40 \pm 0.41
n-propanol:ACN	41.17	40.19	40.97 \pm 1.10	2.26	2.20	2.23 \pm 0.04	17.37 \pm 0.60

ภาคผนวก ค

ผลของการศึกษาพฤติกรรมการถูกชะของเบต้าแคโรทีน

ตารางที่ ค.1 แสดงค่า t_r , t_0 และค่า k ของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0:100 (v/v) , 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 25 °C

ค่า ψ	ค่า t_r (min)			ค่า t_0 (min)			ค่า $k \pm SD$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm SD$	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm SD$	
0	48.60	48.56	48.58 \pm 0.03	2.81	2.90	2.85 \pm 0.06	26.00 \pm 0.55
0.05	29.06	29.04	29.05 \pm 0.01	2.85	2.80	2.83 \pm 0.04	15.14 \pm 0.19
0.10	23.97	23.89	23.93 \pm 0.06	2.54	2.42	2.48 \pm 0.09	12.32 \pm 0.43
0.15	20.43	20.39	20.41 \pm 0.02	2.38	2.32	2.35 \pm 0.05	10.35 \pm 0.20
0.20	17.85	17.78	17.81 \pm 0.05	2.35	2.22	2.28 \pm 0.09	8.91 \pm 0.36
0.25	15.50	15.71	15.61 \pm 0.15	2.27	2.19	2.23 \pm 0.05	7.61 \pm 0.21

ตารางที่ ค.2 แสดงค่า t_r , t_0 และค่า k ของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0:100 (v/v) , 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 35 °C

ค่า ψ	ค่า t_r (min)			ค่า t_0 (min)			ค่า $k \pm SD$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm SD$	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm SD$	
0	31.26	31.20	31.23 \pm 0.05	2.73	2.62	2.68 \pm 0.08	16.37 \pm 0.49
0.05	26.68	27.25	26.97 \pm 0.40	2.55	2.46	2.51 \pm 0.06	13.82 \pm 0.42
0.10	21.18	21.30	21.24 \pm 0.09	2.43	2.44	2.44 \pm 0.01	10.76 \pm 0.06
0.15	18.06	19.06	18.56 \pm 0.71	2.22	2.40	2.31 \pm 0.13	9.03 \pm 0.63
0.20	15.39	15.47	15.43 \pm 0.05	2.38	2.36	2.37 \pm 0.01	7.55 \pm 0.06
0.25	14.14	14.10	14.12 \pm 0.03	2.11	2.41	2.26 \pm 0.21	6.85 \pm 0.65

ตารางที่ ค.3 แสดงค่า t_r , t_0 และค่า k ของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0:100 (v/v) , 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 25 °C

ค่า ψ	ค่า t_r (min)			ค่า t_0 (min)			ค่า $k \pm SD$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm SD$	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm SD$	
0	105.95	105.56	105.75 \pm 0.28	3.72	3.70	3.71 \pm 0.02	27.47 \pm 0.14
0.05	42.34	43.20	42.77 \pm 0.61	3.46	3.58	3.52 \pm 0.08	15.23 \pm 0.43
0.10	31.97	32.69	32.33 \pm 0.51	3.53	3.51	3.52 \pm 0.02	8.91 \pm 0.16
0.15	26.48	26.87	26.67 \pm 0.28	3.44	3.44	3.44 \pm 0.00	6.81 \pm 0.08
0.20	18.71	19.36	19.04 \pm 0.46	3.22	3.22	3.22 \pm 0.00	4.82 \pm 0.14
0.25	14.23	14.68	14.46 \pm 0.31	2.90	2.91	2.91 \pm 0.01	3.91 \pm 0.11

ตารางที่ ค.4 แสดงค่า t_r , t_0 และค่า k ของเบต้าแคโรทีนเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0:100 (v/v) , 5:95 (v/v), 10:90 (v/v), 15:85 (v/v), 20:80 (v/v) และ 25:75 (v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 35 °C

ค่า ψ	ค่า t_r (min)			ค่า t_0 (min)			ค่า $k \pm SD$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm SD$	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย $\pm SD$	
0	101.08	100.80	100.94 \pm 0.20	3.81	3.80	3.81 \pm 0.01	25.23 \pm 0.08
0.05	37.33	37.75	37.54 \pm 0.30	3.62	3.41	3.51 \pm 0.15	13.24 \pm 0.59
0.10	27.57	27.94	27.76 \pm 0.26	3.55	3.37	3.46 \pm 0.13	7.76 \pm 0.30
0.15	22.68	22.55	22.62 \pm 0.09	3.31	3.30	3.30 \pm 0.00	5.83 \pm 0.03
0.20	17.56	16.85	17.20 \pm 0.50	3.18	3.18	3.18 \pm 0.00	4.30 \pm 0.15
0.25	13.97	13.90	13.94 \pm 0.05	2.89	2.88	2.89 \pm 0.01	3.67 \pm 0.02

ตารางที่ ค.5 แสดงค่า $1/k$ และ $\log k$ ของเฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH และ iso-propanol:ACN เมื่อค่า ψ เท่ากับ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25% อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.5 mL/min ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C (N=2)

ค่า ψ	เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:MeOH				เฟสเคลื่อนที่ iso-propanol:ACN			
	$1/k \pm SD$		$\log k \pm SD$		$1/k \pm SD$		$\log k \pm SD$	
	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C
0	0.04 ± 0.001	0.06 ± 0.002	1.41 ± 0.009	1.21 ± 0.013	0.04 ± 0.002	0.04 ± 0.001	1.44 ± 0.002	1.40 ± 0.001
0.05	0.07 ± 0.001	0.07 ± 0.002	1.18 ± 0.005	1.14 ± 0.013	0.07 ± 0.019	0.08 ± 0.034	1.18 ± 0.012	1.12 ± 0.019
0.10	0.08 ± 0.003	0.09 ± 0.000	1.09 ± 0.015	1.03 ± 0.002	0.11 ± 0.021	0.13 ± 0.050	0.95 ± 0.008	0.89 ± 0.017
0.15	0.10 ± 0.002	0.11 ± 0.008	1.01 ± 0.009	0.96 ± 0.030	0.15 ± 0.018	0.17 ± 0.008	0.83 ± 0.005	0.77 ± 0.002
0.20	0.11 ± 0.005	0.12 ± 0.001	0.95 ± 0.017	0.88 ± 0.003	0.21 ± 0.061	0.23 ± 0.082	0.68 ± 0.013	0.63 ± 0.015
0.25	0.13 ± 0.004	0.15 ± 0.014	0.88 ± 0.012	0.84 ± 0.041	0.26 ± 0.070	0.27 ± 0.013	0.59 ± 0.012	0.56 ± 0.002

ภาคผนวก ง.

วิธีคำนวณหาปริมาณเบต้าแคโรทีน

โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสมการเส้นตรง $y = 0.32 X - 0.384$

เมื่อ $y =$ พื้นที่ใต้พีค

$x =$ ความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีน

ตรวจวัดความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีนในแครอทโดยเทคนิค HPLC ได้เท่ากับ 113.75 mg/L เนื่องจากในการรายงานปริมาณเบต้าแคโรทีนต้องรายงานเป็นหน่วย g/kg สามารถคำนวณได้ดังนี้

สารสกัดจากแครอทปริมาตร 20 μ L มีเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 113.75 mg

ถ้าสารสกัดจากแครอท (5 g) ปริมาตร 1000 μ L จะมีเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 5,687 mg

สารสกัดที่ได้จากแครอทสด 5 g มีเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 5,687 mg

ฉะนั้นถ้าสารสกัดที่ได้จากแครอท 1000 g จะมีเบต้าแคโรทีนเท่ากับ 1.13×10^6 mg

ดังนั้น คิดเป็น g/kg ได้เท่ากับ 1130.85 g/kg

ตารางที่ ง.1 แสดงปริมาณเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างผัก

ตัวอย่างผัก	พื้นที่ใต้พีค $\times 10^5$ (mAU)				\pm SD (mAU)	mg/L	g/kg
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย			
แครอท	35.74	36.27	35.40	35.80	0.44	113.09	1130.81
ผักขม	14.30	14.04	13.89	14.08	0.21	45.19	451.90
ฟักทอง	11.53	10.57	11.45	11.18	0.53	36.15	361.48
คะน้า	7.78	7.78	7.57	7.71	0.12	25.29	252.94
มะเขือเทศ	6.23	6.51	6.39	6.38	0.14	21.13	211.27
บรอกโคลี	5.01	5.07	5.05	5.04	0.03	16.96	193.65
สาหร่ายผมนาง	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ภาคผนวก จ.

Abstract ที่ได้ไปนำเสนอใน The 39th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 39)**RETENTION BEHAVIOUR OF β -CAROTENE AT DIFFERENT TEMPERATURES UNDER BINARY MOBILE PHASES FOR ISOCRATIC ELUTION IN REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Charuwan Suitcharit*, Nithiwadee Jullanin, Monthakan Jantharangsri, Jiraporn Nooyimsai

Program of Chemistry and Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Songkhla University, Muang District, Songkhla Province 90000, Thailand

*e-mail: csuitcharit@yahoo.com

Abstract: The retention behaviour of β -carotene under isocratic elution by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using binary mobile phases comprising 2-propanol in acetonitrile at different volume fractions (ψ); 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 and 0.25 under defined temperatures; 25 and 35°C was studied to describe the interactions of β -carotene during elution. In this study, three retention equations have been used to describe adequately the dependency of retention factors on ψ values of mobile phases as a function of temperatures. In this case, the chromatographic parameters, i.e. retention factor (k), reciprocal of retention factor ($1/k$), logarithm of retention factor ($\log k$) on retention values obtained from each elution condition were calculated to provide a three-plot retention of β -carotene. From the finding, it is shown that the dependency of k on ψ is parabolic and the dependencies of $1/k$ on ψ and $\log k$ on ψ are linear at temperature used. The linear dependency from the plot of $1/k$ vs. ψ gives a positive slope, whereas the plot of $\log k$ vs. ψ gives a negative one which it was a chromatographic parameter derived from the linear plot. The best correlation coefficient ($r^2 = 0.9960$) from $1/k$ vs. ψ plot at 35°C has been obtained with the comparison of $\log k$ vs. ψ plot at temperatures used. These findings thus have recommended that the retention behaviour of β -carotene corresponding to its peak shape at two temperatures used under mobile phase comprising 2-propanol in acetonitrile at $\psi = 0.25$ for isocratic elution by RP-HPLC was similarly. Nevertheless, the elution of β -carotene with such mobile phase composition evidently stood being faster at 35°C.

Keywords: isocratic elution, retention behaviour, binary mobile phases, β -carotene

ภาคผนวก จ.

Abstract และ Highlight ที่ส่งไปนำเสนอใน Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2015) (in process)

Linear Retention Equations for Describing the Isocratic Elution Behaviour of β -carotene in Reversed-Phase Liquid Chromatography Using Binary solvent System

Charuwan Suitcharit*, Nithiwadee Jullanin, Monthakan Jantharangsri, Jiraporn Nooyimsai

Program of Chemistry and Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Songkhla University, Muang District, Songkhla Province 90000, Thailand

**E-mail: csuitcharit@gmail.com*

The isocratic elution for β -carotene by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using binary solvents at different volume fractions of 2-propanol in acetonitrile (ψ), i.e. 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 and 0.25 under the controlled column temperatures at 25 and 35°C was studied. To describe the elution behaviour of β -carotene under such conditions by representing in various kinds of the graphs, three different retention parameters, namely, retention factor (k), reciprocal of retention factor ($1/k$), and natural logarithm of retention factor ($\ln k$) were calculated by using the corresponding chromatographic retention data. From the plots, the exponential dependency of k on ψ and two linear dependencies, i.e. $1/k$ on ψ and $\ln k$ on ψ were obtained. Under the linear dependency, two retention parameters, i.e. $1/k$ and $\ln k$ can be fitted to the following equations, i.e. $1/k = 1/k_0 + S\psi$ (Eq. (1)) and $\ln k = \ln k_0 - S\psi$ (Eq. (2)). To select a good fitting performance, the correlation coefficient (r^2) values derived from these equations were compared. From the finding, it was found that a better fitting of Eq. (1) was over Eq. (2). That is; the values of r^2 derived from Eq. (1) at 25 and 35°C were of 0.990 and 0.996, respectively, whereas the r^2 values of 0.948 and 0.966 derived from Eq. (2) were obtained at 25 and 35°C, respectively. Therefore, the Eq. (1) with a good correlation of retention data in the ψ range from 0 to 0.25 for 2-propanol in acetonitrile was suitable recommended for describing the accuracy elution behaviour of β -carotene under the isocratic conditions. However, the constants obtained from these linear equations, i.e. S , $1/k_0$, $\ln k_0$ were also considered according to the concentration of 2-propanol in acetonitrile for the retention data.

Keywords: Linear retention equation; β -carotene; Isocratic elution; 2-propanol:acetonitrile

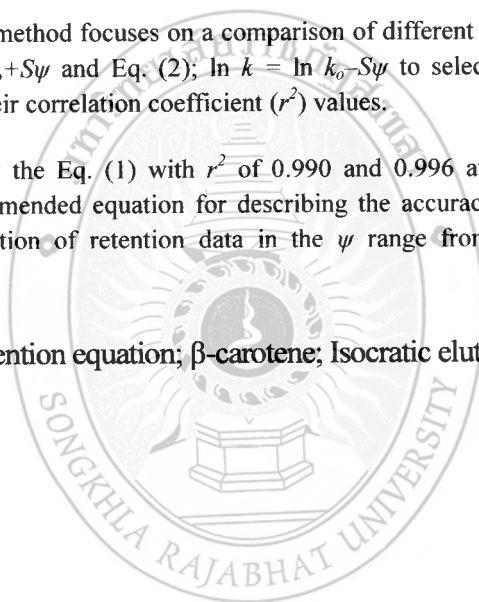
Linear Retention Equations for Describing the Isocratic Elution Behavior of β -carotene in Reversed-Phase Liquid Chromatography Using Binary solvent System

Charuwan Suitcharit*, Nithiwadee Jullanin, Monthakan Jantharangsri, Jiraporn Nooyimsai
*Program of Chemistry and Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology,
Rajabhat Songkhla University, Muang District, Songkhla Province 90000, Thailand*

**E-mail. csuitcharit@gmail.com*

- We described the elution behavior of β -carotene under the isocratic elution by RP-HPLC using binary solvents at different volume fractions, ψ of 2-propanol in acetonitrile under 25 and 35°C by using different three equations according to its dependency of retention data on ψ .
- The proposed method focuses on a comparison of different two linear equations between Eq. (1); $1/k = 1/k_o + S\psi$ and Eq. (2); $\ln k = \ln k_o - S\psi$ to select a good fitting performance by considering their correlation coefficient (r^2) values.
- We found that the Eq. (1) with r^2 of 0.990 and 0.996 at 25 and 35°C, respectively was suitable recommended equation for describing the accuracy elution behavior of β -carotene with a correlation of retention data in the ψ range from 0 to 0.25 under the isocratic conditions.

Keywords :Linear retention equation; β -carotene; Isocratic elution; 2-propanol:acetonitrile



ประวัติผู้ทำโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล

จิราภรณ์ หนูยิ้มชัย

วัน เดือน ปี

19 พฤศจิกายน 2534

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2546

สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนบ้านรัตปุ่น จังหวัด
สงขลา

พ.ศ. 2550

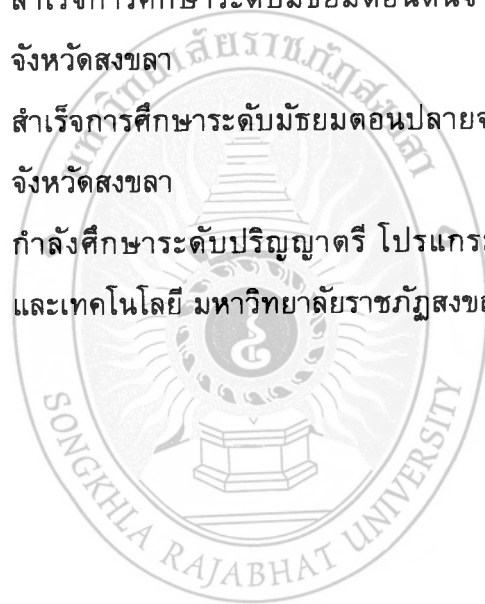
สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนต้นจากโรงเรียนกระแสนิษฐ์วิทยา
จังหวัดสงขลา

พ.ศ. 2553

สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนปลายจากโรงเรียนกระแสนิษฐ์วิทยา
จังหวัดสงขลา

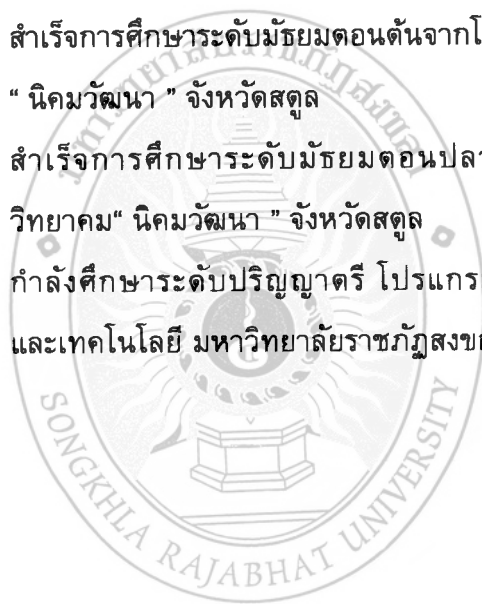
พ.ศ. 2556

กำลังศึกษาระดับปริญญาตรี โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา



ประวัติผู้ทำโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล	นิธิวดี จุลนิล
วัน เดือน ปี	12 ตุลาคม 2534
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2546	สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนนิคมซอย 10 จังหวัดสตูล
พ.ศ. 2550	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนควนกาหลงวิทยาคม “นิคมพัฒนา” จังหวัดสตูล
พ.ศ. 2553	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนควนกาหลงวิทยาคม “นิคมพัฒนา” จังหวัดสตูล
พ.ศ. 2556	กำลังศึกษาระดับปริญญาตรี โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา



ประวัติผู้ทำโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล	มณฑกานต์ จันทรังษี
วัน เดือน ปี	31 ธันวาคม 2534
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2546	สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนบ้านบาไทย จังหวัดสงขลา
พ.ศ. 2550	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนต้นจากโรงเรียนบ้านบาไทย จังหวัดสงขลา
พ.ศ. 2553	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนปลายจากโรงเรียนทุ่งสงวิทยา จังหวัดนครศรีธรรมราช
พ.ศ. 2556	กำลังศึกษาระดับปริญญาตรี โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

