



## โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

### เรื่อง

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำในน้ำผัก  
และผลไม้สำเร็จรูปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง  
(Development and validation of method for determination of water soluble vitamins in  
fruit and vegetable juice products by High Performance Liquid Chromatography)

### โดย

|                 |            |          |
|-----------------|------------|----------|
| นสภ. จิตติรัตน์ | วรศักดิ์   | 57210025 |
| นสภ. ญาณาร      | พึงสูงเนิน | 57210168 |
| นสภ. รัชกร      | โอฬารวงศ์  | 57210182 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

## เรื่อง

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำใน  
น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง  
(Development and validation of method for determination of water soluble  
vitamins in fruit and vegetable juice products by High Performance Liquid  
Chromatography

## โดย

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| นสภ. จูติรัตน์ วรรณศักดิ์ | 57210025 |
| นสภ. ญาณารร พิงสูงเนิน    | 57210168 |
| นสภ. รัชกร โอฬารวงศ์      | 57210182 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## คำนำ

เนื่องด้วยในปัจจุบันยังไม่พบวิธีการวิเคราะห์เพื่อแยกวิตามินที่ละลายน้ำในน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปโดยประกอบด้วย วิตามิน B1, B2 และ C ซึ่งวิธีการวิเคราะห์มาตรฐานของวิตามินที่ละลายในน้ำผักและผลไม้ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน มีหลายขั้นตอน ไม่เฉพาะเจาะจง และสารที่ใช้ในการวิเคราะห์บางชนิดเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อแยกวิตามิน B1, B2 และ C และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ specificity, linearity and range, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantitation, robustness, system suitability testing เพื่อยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพ สามารถนำไปประยุกต์ใช้หาปริมาณวิตามินที่อยู่ในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปว่ามีปริมาณที่ถูกต้องตรงตามที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

### โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2561

**เรื่อง** การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำในน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- |                    |            |      |          |
|--------------------|------------|------|----------|
| 1. นสภ. จิตรีรัตน์ | วรศักดิ์   | รหัส | 57210025 |
| 2. นสภ. ญาณวธร     | พึงสูงเนิน | รหัส | 57210168 |
| 3. นสภ. รัชกร      | โอฬารวงศ์  | รหัส | 57210182 |

### อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- |                     |                  |
|---------------------|------------------|
| 1. ญญ.อ.ดร. สมาวดี  | เปลี่ยนวนงษ์     |
| 2. ญญ.อ.ดร. เนตรชนก | เจียงสืบชาติวิระ |

---

### บทคัดย่อ

เนื่องด้วยปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์แยกวิตามินที่ละลายน้ำในน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป ซึ่งประกอบด้วย วิตามิน B1, B2 และ C จึงได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ด้วย reversed phase high performance liquid (RP-HPLC) ในการแยกวิตามินทั้ง 3 ชนิดออกจากกัน วิธีการที่พัฒนาขึ้นได้มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้น ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดเชิงปริมาณได้ ความคงทนของวิธีวิเคราะห์ และความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ นำมาวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในน้ำผักและผลไม้ โดยเลือกน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปที่วางขายในร้านสะดวกซื้อทั้งหมด 3 บริษัท สำหรับสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสมได้แก่ การใช้วัฏภาคคงที่ C18, ความยาวคอลัมน์ 250 mm, เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 4.6 mm, วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ 0.01% Trifluoroacetic acid (TFA) ในน้ำกลั่น และเมทานอล ในอัตราส่วน 98:2-10:90 ซึ่งผลการวิเคราะห์วิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานมีค่า  $R^2 \geq 0.995$ , LOQ ของวิตามิน B1, B2 และ C เท่ากับ 0.2863, 0.5825 และ 1.3539  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ วิธีการวิเคราะห์ที่ได้มีความสะดวกรวดเร็ว และสารเคมีที่ใช้มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยลง

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ญญ.อ.ดร. สมาวดี เปลี่ยนวนงษ์

## ABSTRACT

Senior Project Academic Year 2018

: Development and Validation of Method for Determination of Water Soluble Vitamins in Fruit and Vegetable Juice Products by High Performance Liquid Chromatography

By

- |                    |              |    |          |
|--------------------|--------------|----|----------|
| 1. Miss. Thitirat  | Worasak      | ID | 57210025 |
| 2. Mr. Yanathon    | Fungsungnern | ID | 57210168 |
| 3. Mr. Thatchakorn | Olanwong     | ID | 57210182 |

Advisor:

- |                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| 1. Dr. Samarwadee | Plianwong          |
| 2. Dr. Nadechanok | Jiangseubchatveera |

## ABSTRACT

There are no suitable methods for analyzing and separating the water soluble vitamins in fruit and vegetable juice products. The water soluble vitamins in this study are of vitamin B1, B2 and C. So, the reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is developed to separate these vitamins. The developed methods was validated for specificity, linearity and range, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantitation, robustness and also system suitability testing. The fruit and vegetable juice products were selected from 3 companies in a convenience store. The optimal condition was performed with HPLC column C18, 250x4.5 mm id, mobile phase is 0.01% Trifluoroacetic acid (TFA) in DI water (solvent A) and Methanol (solvent B) in linear gradient profile (A:B) started from 98:2-10:90. The linearity of the developed method was  $R^2 \geq 0.995$ . LOQ of vitamin B1, B2 and C were 0.2863, 0.5825, 1.3539  $\mu\text{g/mL}$  respectively. Thus, This developed method is convenient for juice product analysis. In addition, the chemicals are less toxic to the environment.

Major Advisor Dr. Samarwadee Plianwong

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความกรุณา ช่วยเหลือ เสนอข้อเสนอแนะเพื่อ  
แก้ปัญหา ปรับปรุงให้การวิจัยสมบูรณ์และถูกต้อง รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ในการใช้  
ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทำงานวิจัยครั้งนี้จาก ภาณุ.อ.ดร. สมาวดี เปลี่ยนวงษ์ อาจารย์ที่  
ปรึกษาหลัก และขอกราบขอบพระคุณ ภาณุ.อ.ดร. เนตรชนก เจียงสืบชาติวิระ ที่ให้ความกรุณาเป็น  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์  
วิตามินต่างๆได้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษา  
งานวิจัยทั้งสองท่าน

ขอกราบขอบพระคุณคุณกนกพร ก้อนทรัพย์ ผู้ช่วยนักวิจัย ที่ช่วยสอนวิธีการใช้เครื่องมือ  
ต่างๆ และเสนอข้อเสนอแนะตลอดช่วงเวลาทำการวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน ตลอดจนเป็นกำลังใจ  
ในการศึกษาให้กับผู้วิจัยเสมอมา

คณะผู้วิจัย

27 พฤศจิกายน 2561

## สารบัญ

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| บทที่ 1 .....                                                                | 1  |
| บทนำ.....                                                                    | 1  |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหา .....                                              | 1  |
| วัตถุประสงค์ .....                                                           | 4  |
| สมมติฐาน .....                                                               | 4  |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....                                              | 4  |
| กรอบแนวคิด.....                                                              | 5  |
| นิยามศัพท์.....                                                              | 5  |
| ผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป .....                                       | 5  |
| โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) ..... | 5  |
| บทที่ 2 .....                                                                | 7  |
| วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง .....                                                  | 7  |
| วิตามิน .....                                                                | 7  |
| ความหมาย.....                                                                | 7  |
| ชนิดของวิตามิน.....                                                          | 7  |
| วิตามินที่ละลายในไขมัน (Fat-soluble vitamins) .....                          | 7  |
| วิตามินที่ละลายในน้ำ (Water-soluble vitamins) .....                          | 8  |
| HPLC.....                                                                    | 11 |
| Chromatography .....                                                         | 11 |
| High performance liquid chromatography .....                                 | 11 |

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC).....                       | 13 |
| สารละลาย (mobile phase).....                                                        | 13 |
| Pump .....                                                                          | 15 |
| Injector .....                                                                      | 15 |
| Column .....                                                                        | 15 |
| Detector ที่นิยมใช้ เช่น.....                                                       | 15 |
| การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation) .....                  | 17 |
| ความหมาย .....                                                                      | 17 |
| พารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ .....                   | 17 |
| ความจำเพาะเจาะจงของวิธีการวิเคราะห์ (Specificity) .....                             | 17 |
| ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) .....                                        | 17 |
| ความเที่ยงตรงของวิธีการวิเคราะห์ (Precision) .....                                  | 18 |
| ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (Linearity and Range) .       | 18 |
| ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Limit of detection) .....                                 | 18 |
| ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ในเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation) .....                  | 19 |
| งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่สามารถละลายน้ำได้โดยใช้ |    |
| เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC).....                                     | 19 |
| บทที่ 3 .....                                                                       | 22 |
| วิธีการดำเนินการวิจัย .....                                                         | 22 |
| เครื่องมือที่ใช้ในการจัดทำโครงการงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ .....                       | 22 |
| สารเคมีที่ใช้และสารตัวอย่างในการจัดทำโครงการงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์.....             | 23 |
| วิธีดำเนินงานวิจัย.....                                                             | 24 |
| บทที่ 4 .....                                                                       | 34 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| ผลการวิจัย .....                                                           | 34 |
| ผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง $\lambda_{\max}$ ของวิตามิน.....            | 34 |
| ผลการวิเคราะห์ Retention time ของวิตามิน .....                             | 34 |
| การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) .....            | 37 |
| Isocratic elution.....                                                     | 37 |
| ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity).....                              | 37 |
| ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้น (Linearity and range) ..... | 39 |
| ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) .....                               | 41 |
| ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision) .....                               | 42 |
| ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Limit of detection) .....                        | 45 |
| ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดเชิงปริมาณได้ (Limit of quantitation) .....          | 46 |
| Gradient elution .....                                                     | 46 |
| ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์.....                                            | 46 |
| ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้น (Linearity and range) ..... | 48 |
| ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) .....                               | 50 |
| ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม.....                               | 50 |
| ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision) .....                               | 51 |
| ใช้วิธีการทดสอบซ้ำ (Repeatability) .....                                   | 51 |
| ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Limit of detection) .....                        | 54 |
| ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดเชิงปริมาณได้ (Limit of quantitation) .....          | 55 |
| ความคงทนของวิธีการทดสอบ (Robustness) .....                                 | 55 |
| ความเหมาะสมของวิธีการทดสอบ (System Suitability Testing) .....              | 59 |
| การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป.....                    | 61 |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| ตัวอย่างน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป .....                                     | 61 |
| บทที่ 5 .....                                                             | 71 |
| สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย.....                                             | 71 |
| ผลของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของแต่ละวิตามิน (Isocratic elution) ..... | 71 |
| ผลของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของแต่ละวิตามินรวม (Gradient) .....       | 73 |
| ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัย .....                                            | 79 |

## สารบัญตาราง

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| ตารางที่ 1 ความแตกต่างของ NORMAL PHASE และ REVERSE PHASE ..... | 13 |
| ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 .....            | 27 |
| ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 .....            | 28 |
| ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน C .....             | 28 |
| ตารางที่ 5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินรวมและน้ำผลไม้.....  | 29 |
| ตารางที่ 6 $\Lambda_{MAX}$ ของวิตามิน B1, B2 และ C .....       | 34 |
| ตารางที่ 7 %RECOVERY สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1.....            | 41 |
| ตารางที่ 8 %RECOVERY สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2.....            | 41 |
| ตารางที่ 9 %RECOVERY สารละลายมาตรฐานวิตามิน C.....             | 42 |
| ตารางที่ 10 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 .....       | 42 |
| ตารางที่ 11 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2.....        | 43 |
| ตารางที่ 12 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน C.....         | 43 |
| ตารางที่ 13 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 .....       | 44 |
| ตารางที่ 14 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2.....        | 44 |
| ตารางที่ 15 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน C.....         | 45 |
| ตารางที่ 16 LOD สารละลายมาตรฐานวิตามิน.....                    | 45 |
| ตารางที่ 17 LOQ สารละลายมาตรฐานวิตามิน.....                    | 46 |
| ตารางที่ 18 %RECOVERY สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 .....       | 50 |
| ตารางที่ 19 %RECOVERY สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2.....        | 50 |
| ตารางที่ 20 %RECOVERY สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C.....         | 51 |
| ตารางที่ 21 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 .....    | 51 |
| ตารางที่ 22 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2.....     | 52 |
| ตารางที่ 23 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C.....      | 52 |
| ตารางที่ 24 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 .....    | 53 |

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| ตารางที่ 25 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2.....         | 53 |
| ตารางที่ 26 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C.....          | 54 |
| ตารางที่ 27 LOD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม.....                     | 54 |
| ตารางที่ 28 LOQ สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม.....                     | 55 |
| ตารางที่ 29 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1.....         | 58 |
| ตารางที่ 30 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2.....         | 58 |
| ตารางที่ 31 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C.....          | 59 |
| ตารางที่ 32 THEORETICAL PLATE สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม .....      | 59 |
| ตารางที่ 33 THEORETICAL PLATE สารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้ ..... | 60 |
| ตารางที่ 34 ตัวอย่างน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป .....                  | 61 |
| ตารางที่ 35 ปริมาณวิตามินที่วิเคราะห์ได้ .....                     | 78 |

## สารบัญภาพ

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| รูปที่ 1 การฉีดสารเข้าไปในคอลัมน์ก่อนเปิดและปิดปั๊ม .....                                             | 11 |
| รูปที่ 2 ตัวอย่าง CHROMATOGRAM .....                                                                  | 12 |
| รูปที่ 3 ความเข้ากันของสารละลายอินทรีย์ต่างๆ ในสารละลายบัฟเฟอร์อินทรีย์ที่สามารถละลาย<br>น้ำได้ ..... | 14 |
| รูปที่ 4 เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิด DIODE ARRAY DETECTOR (DAD) .....                                    | 16 |
| รูปที่ 5 CHROMATOGRAM ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 ที่ความยาวคลื่น 245 NM .....                       | 34 |
| รูปที่ 6 CHROMATOGRAM ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 ที่ความยาวคลื่น 268 NM .....                       | 35 |
| รูปที่ 7 CHROMATOGRAM ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C ที่ความยาวคลื่น 245 NM .....                        | 35 |
| รูปที่ 8 CHROMATOGRAM ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวมที่ความยาวคลื่น 245 NM .....                        | 36 |
| รูปที่ 9 CHROMATOGRAM ของวิตามินรวมที่ความยาวคลื่น 268 NM.....                                        | 36 |
| รูปที่ 10 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 และน้ำผักและผลไม้... 37                 |    |
| รูปที่ 11 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 และน้ำผักและผลไม้... 38                 |    |
| รูปที่ 12 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C และน้ำผักและผลไม้ .... 38                |    |
| รูปที่ 13 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 .....                                   | 39 |
| รูปที่ 14 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 .....                                   | 40 |
| รูปที่ 15 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C .....                                    | 40 |
| รูปที่ 16 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 .....                                | 46 |
| รูปที่ 17 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2 .....                                | 47 |
| รูปที่ 18 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C .....                                 | 47 |
| รูปที่ 19 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 .....                                | 48 |
| รูปที่ 20 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2 .....                                | 49 |
| รูปที่ 21 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C .....                                 | 49 |
| รูปที่ 22 CHROMATOGRAM ของสารละลายมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 245 NM .....                                 | 55 |
| รูปที่ 23 CHROMATOGRAM ของสารละลายมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 268 NM .....                                 | 56 |

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| รูปที่ 24 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 .....        | 56 |
| รูปที่ 25 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2 .....        | 57 |
| รูปที่ 26 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2 .....        | 57 |
| รูปที่ 27 CHROMATOGRAM สารละลายตัวอย่างบริษัท A ที่ความยาวคลื่น 245 NM .....  | 62 |
| รูปที่ 28 CHROMATOGRAM สารละลายตัวอย่างบริษัท A ที่ความยาวคลื่น 268 NM .....  | 62 |
| รูปที่ 29 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B1 บริษัท A ..... | 63 |
| รูปที่ 30 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B2 บริษัท A ..... | 63 |
| รูปที่ 31 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน C บริษัท A .....  | 64 |
| รูปที่ 32 CHROMATOGRAM สารละลายตัวอย่างบริษัท B ที่ความยาวคลื่น 245 NM .....  | 65 |
| รูปที่ 33 CHROMATOGRAM สารละลายตัวอย่างบริษัท B ที่ความยาวคลื่น 268 NM .....  | 65 |
| รูปที่ 34 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B1 บริษัท B ..... | 66 |
| รูปที่ 35 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B2 บริษัท B ..... | 66 |
| รูปที่ 36 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน C บริษัท B .....  | 67 |
| รูปที่ 37 CHROMATOGRAM สารละลายตัวอย่างบริษัท C ที่ความยาวคลื่น 245 NM .....  | 68 |
| รูปที่ 38 CHROMATOGRAM สารละลายตัวอย่างบริษัท C ที่ความยาวคลื่น 268 NM .....  | 68 |
| รูปที่ 39 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B1 บริษัท C ..... | 69 |
| รูปที่ 40 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B2 บริษัท C ..... | 69 |
| รูปที่ 41 กราฟ CALIBRATION CURVE ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน C บริษัท C .....  | 70 |



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันประชากรได้ให้ความสำคัญกับการดูแลสุขภาพของตนเองมากยิ่งขึ้น โดยให้ความสนใจในการบริโภคผักและผลไม้ในอัตราที่สูง เนื่องจากในผักและผลไม้มีใยอาหาร แร่ธาตุ และวิตามินที่จำเป็นต่อร่างกาย นอกจากนี้ในประชาชนบางกลุ่มยังนิยมการรับประทานอาหารเสริม เพื่อเสริมสร้างให้ร่างกายแข็งแรงและมีสุขภาพโดยรวมที่ดีขึ้น จากข้อมูลของวิทยาลัยวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยโคโลราโดสเตท (Colorado State University) เมืองฟอร์ต คอลลินส์ รัฐโคโลราโด ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้กล่าวถึงประโยชน์ของวิตามินต่างๆ(1) ดังนี้ วิตามิน B1 หรือ Thiamine มีประโยชน์คือ ช่วยกระตุ้นความอยากอาหาร และบำรุงระบบประสาท วิตามิน B2 หรือ Riboflavin มีประโยชน์คือ บำรุงสายตา และทำให้ผิวพรรณสุขภาพดี ช่วยเปลี่ยน Tryptophan เป็น Niacin วิตามิน B3 หรือ Niacin มีประโยชน์คือ ช่วยกระตุ้นการทำงานของ enzyme ต่างๆ และทำให้ผิวพรรณสุขภาพดี วิตามิน B5 หรือ Pantothenic acid มีประโยชน์คือ ช่วยในการสร้างฮอร์โมนและเป็นหนึ่งในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตจากอาหาร เช่นเดียวกันกับ วิตามิน B7 หรือ Biotin ที่เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการเมแทบอลิซึมจากอาหาร วิตามิน B6 หรือ Pyridoxine มีประโยชน์ คือ ช่วยในการสร้างเม็ดเลือดแดงและมีผลในการสร้าง insulin และ hemoglobin วิตามิน B9 หรือ Folate มีประโยชน์คือ ช่วยในการสร้างเม็ดเลือดแดง ควบคุมระดับฮอร์โมน และช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคทางระบบประสาทและหลอดเลือดหัวใจ วิตามิน B12 หรือ Cobalamine มีประโยชน์คือ เป็นตัวช่วยในกระบวนการสร้างเม็ดเลือดแดง บำรุงประสาท และเป็นตัวช่วยในกระบวนการสร้างส่วนประกอบต่างๆ ของระบบพันธุกรรม และวิตามิน C หรือ Ascorbic acid มีประโยชน์คือ ช่วยในการเสริมสร้างคอลลาเจน ทั้งในกล้ามเนื้อและกระดูก ช่วยซ่อมแซมกระดูกและฟัน ช่วยทำให้หลอดเลือดแข็งแรง ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เราจึงจำเป็นต้องได้รับวิตามินอย่างเพียงพอ ไม่ว่าจะเป็นในรูปแบบผักสด ผลไม้สด แคปซูลอาหารเสริม หรือในรูปแบบของผลิตภัณฑ์น้ำผักและน้ำผลไม้สำเร็จรูป เพื่อให้เพียงพอต่อการได้รับวิตามินในแต่ละวัน อ้างอิงจากแผนงาน วิจัยนโยบายอาหารและโภชนาการ เพื่อการสร้างเสริมสุขภาพ (Food

and Nutrition Policy for Health Promotion) ได้ระบุปริมาณวิตามินแต่ละชนิดที่เราควรได้รับในแต่ละวันสำหรับคนไทย (Thai Recommended Daily Intakes : Thai RDI) (1, 2) ดังนี้ วิตามิน B1 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 1.5 มิลลิกรัม, วิตามิน B2 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 1.7 มิลลิกรัม, วิตามิน B3 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 20 มิลลิกรัม เอ็น อี<sup>1</sup>, วิตามิน B5 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 6 มิลลิกรัม, วิตามิน B6 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 2 มิลลิกรัม, วิตามิน B7 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 150 ไมโครกรัม, วิตามิน B9 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 200 ไมโครกรัม, วิตามิน B12 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 2 ไมโครกรัม และวิตามิน C ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 60 มิลลิกรัม

เนื่องด้วยการดำรงชีวิตในปัจจุบันซึ่งมีเทคโนโลยีที่กำลังพัฒนาและความเร่งรีบที่มากขึ้น ทำให้คนเรา ต้องการความสะดวกสบายในการบริโภค จึงมีหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความสนใจคือ น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปต่างๆ ที่มีการวางขายกันอย่างแพร่หลายในร้านสะดวกซื้อ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความสะดวกรวดเร็วในการรับประทาน และยังมีรสชาติที่อร่อยดื่มได้ง่าย โดยในผลิตภัณฑ์น้ำผักและน้ำผลไม้ที่วางขายนั้นมักจะมีประกอบไปด้วยวิตามินหลายชนิด ทั้งวิตามินที่ละลายน้ำ ได้แก่ วิตามิน B วิตามิน C และวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามิน A เป็นต้น โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจในการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำบางชนิดในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป

จากการศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำนั้น พบว่า มีวิธีวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินที่สามารถละลายน้ำ (water soluble vitamins) ในผลิตภัณฑ์น้ำผักและน้ำผลไม้สำเร็จรูป (3-5) เช่น titration, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ UV-VIS spectrophotometry เป็นต้น เพื่อให้วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องและแม่นยำเหมาะสมในการวิเคราะห์ จึงต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยดูจาก parameter ต่างๆ ได้แก่ specificity, linearity, range, accuracy, precision, detection limited, quantitation limited, robustness, system suitability testing (6)

สำหรับวิธีการวิเคราะห์โดยการอ้างอิงวิธีตาม AOAC official methods of analysis ได้ระบุวิธีการ ตรวจสอบหาปริมาณสารวิตามินแต่ละชนิดเอาไว้ ดังนี้

---

<sup>1</sup> เอ็น อี (NE) = Niacin Equivalent

- วิตามิน B1 ตรวจโดยใช้วิธี Chromatographic method, Fluorometric method
- วิตามิน B2 ตรวจโดยใช้วิธี Fluorometric method
- วิตามิน B3 ตรวจโดยใช้วิธี Microbiological method
- วิตามิน B6 ตรวจโดยใช้วิธี Ion-exchange chromatography
- วิตามิน B12 ตรวจโดยใช้วิธี Titrimetric method
- วิตามิน C ตรวจโดยใช้วิธี Titrimetric method

จากการค้นหาวิธีการวิเคราะห์วิตามินที่ละลายในน้ำผลไม้จาก AOAC พบว่า วิธีการมาตรฐานที่นิยมใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน มีหลายขั้นตอน ไม่เฉพาะเจาะจง และสารที่ใช้ในการวิเคราะห์บางชนิดเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เช่น ammonia, acetonitrile และจากงานวิจัยที่ศึกษาได้มีการค้นคว้าวิธีการวิเคราะห์วิตามินที่ละลายในน้ำวิธีใหม่หลายวิธี แต่ยังไม่มียวิธีการที่เหมาะสมที่สามารถแยกวิตามินที่เราสนใจได้ครบทุกตัวและใช้สารละลายที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมน้อยลง

ซึ่งหนึ่งในบทบาทของเภสัชกรที่สำคัญ คือ การคุ้มครองผู้บริโภค โดยทำหน้าที่ตรวจสอบปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพให้ตรงตามปริมาณที่ระบุไว้ในฉลากบรรจุภัณฑ์ เพื่อให้เกิดความปลอดภัยและเกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้บริโภค จึงได้สนใจในการทำวิจัยนี้ขึ้นเพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำบางชนิดในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป ให้มีความสะดวกรวดเร็วและเหมาะสม โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography : HPLC) ซึ่งจะนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาตรวจสอบปริมาณวิตามินในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปที่วางขายอยู่ในร้านสะดวกซื้อว่ามีปริมาณที่ตรงตามปริมาณที่ระบุไว้ในฉลากบรรจุภัณฑ์หรือไม่

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำบางชนิดในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป
2. เพื่อตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น
3. เพื่อหาปริมาณวิตามินที่อยู่ในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปว่ามีปริมาณที่ถูกต้องตรงตามที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์

### สมมติฐาน

1. ปริมาณวิตามินในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปที่วิเคราะห์ได้ มีปริมาณตรงตามที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์
2. วิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป มีความเหมาะสม เช่น มีวิธีการวิเคราะห์ที่สะดวกรวดเร็ว และสารที่ใช้มีพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าวิธีการวิเคราะห์ที่มีอยู่ สามารถหาปริมาณวิตามินได้ถูกต้องแม่นยำ

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. วิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป มีความเหมาะสม เช่น มีวิธีการวิเคราะห์ที่สะดวกรวดเร็ว และสารที่ใช้มีพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าวิธีการวิเคราะห์ที่มีอยู่
2. วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องและแม่นยำ
3. ทราบปริมาณวิตามินที่อยู่ในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปว่ามีปริมาณที่ถูกต้องตรงตามที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์

## กรอบแนวคิด

### ตัวแปรต้น

1. ผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปที่ขายในร้านสะดวกซื้อ
2. ชนิดและอัตราส่วนของ mobile phase
3. อัตราการไหล (Flow rate) ของ mobile phase
4. pH ของ Mobile phase
5. เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Time)

### ตัวแปรควบคุม

1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์
2. คุณหมุมในการวิเคราะห์
3. Column ที่ใช้ในการวิเคราะห์
4. คุณภาพของสารมาตรฐานและสารเคมี

### ตัวแปรตาม

1. ปริมาณวิตามินในผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป
2. Retention time
3. Analysis time
4. Peak area
5. Parameter ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ เช่น linearity and range, accuracy, precision, LOD และ LOQ

## นิยามศัพท์

### ผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป

ผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้ที่นำมาใช้ในการศึกษา เป็นน้ำผักหรือน้ำผลไม้ล้วน และน้ำผักผลไม้รวม โดยไม่จำกัดชนิดน้ำผักหรือผลไม้ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เลือกใช้เป็นแบบกล่องพร้อมดื่มและมีปริมาณสุทธิ 200 ml ที่สามารถหาได้ง่ายในร้านสะดวกซื้อ

### โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography)

เป็น chromatography ที่มีความแตกต่างจากปกติคือ วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) จะบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กมาก (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-5  $\mu\text{m}$ ) และใช้ปั๊มทำให้วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) เคลื่อนที่ และใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยมากในการฉีดลงไปในคอลัมน์เพื่อแยกสาร สารที่ถูกวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ชะลอออกไปจะถูกตรวจวัดได้หลายวิธี เช่น UV absorption, refractive index, fluorescence, molecular mass and fragmentation in a mass spectrometer หรือเครื่องมืออื่นๆ และสุดท้ายเครื่องจะวัดออกมาเป็น chromatogram ออกมาในรูปแบบของ retention time ของสารแยกออกมาได้ ณ เวลาที่แตกต่างกัน

### การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation)

เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้อง ความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษา เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติ เงื่อนไข หรือข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ

อ้างอิงจาก ICH Harmonised Tripartite Guideline ของ International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ว่าด้วยการตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์ (Validation of Analytical Procedures) (7) มีดังนี้

- ความจำเพาะเจาะจงของวิธีการวิเคราะห์ (Specificity)
- ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)
- ช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (Range)
- ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)
- ความเที่ยงตรงของวิธีการวิเคราะห์ (Precision)
- ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Detection Limit)
- ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ในเชิงปริมาณ (Quantitation Limit)
- ความคงทนของวิธีการทดสอบ (Robustness)
- ความเหมาะสมของวิธีการทดสอบ (System Suitability Testing)

## บทที่ 2

### วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### วิตามิน

##### ความหมาย

จากพจนานุกรม ฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ.2554 (8) ได้กำหนดความหมายของวิตามิน คือ กลุ่มสารอินทรีย์ซึ่งเป็นสารอาหารจำเป็นที่ร่างกายต้องการแต่เพียงจำนวนน้อย ๆ แต่ขาดไม่ได้ หากขาดจะทำให้ก่อวิญวณภายในร่างกายทำงานผิดปกติและอาจเกิดโรคได้ โดยสารกลุ่มนี้มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของร่างกาย ช่วยต้านทานโรคต่างๆ บำรุงผิวพรรณ เหงือก ฟัน และตา แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ละลายได้ในไขมัน เช่น วิตามิน A วิตามิน D เป็นต้น และชนิดที่ละลายได้ในน้ำ เช่น วิตามิน B วิตามิน C เป็นต้น

และจากวิทยาลัยวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยโคโลราโดสเตท (Colorado State University) เมืองฟอร์ตคอลลินส์ รัฐโคโลราโด ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ให้ความหมายของวิตามิน (1) คือ สารอาหารที่จำเป็นสามารถพบได้ในอาหาร ทำหน้าที่เฉพาะ มีความสำคัญต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย และมีความสำคัญในสิ่งที่จะช่วยทำให้มีสุขภาพที่ดี

##### ชนิดของวิตามิน

วิตามินมีความแตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด (9) คือ

1. วิตามินที่ละลายในไขมัน (Fat-soluble vitamins)
2. วิตามินที่ละลายในน้ำ (Water-soluble vitamins)

##### 1.วิตามินที่ละลายในไขมัน (Fat-soluble vitamins)

ได้แก่ วิตามิน A วิตามิน D วิตามิน E และวิตามิน K โดยจะละลายในไขมันก่อนที่จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดก่อนที่จะนำไปใช้ โดยวิตามินส่วนเกินจะถูกกักเก็บไว้ในตับ และไม่จำเป็นที่จะต้องได้รับในทุกวัน

## 2.วิตามินที่ละลายในน้ำ (Water-soluble vitamins)

ได้แก่ วิตามิน B และ วิตามิน C จะไม่ถูกกักเก็บไว้ในร่างกาย เนื่องจากสามารถขับออกได้ทางปัสสาวะ เราจึงจำเป็นต้องได้รับวิตามินเหล่านี้ในทุกๆวัน โดยวิตามินที่ละลายในน้ำ มีประโยชน์ต่างๆ ดังนี้

- วิตามิน B1 (Thiamine) มีประโยชน์คือ ช่วยกระตุ้นความอยากอาหาร และบำรุงระบบประสาท
- วิตามิน B2 (Riboflavin) มีประโยชน์คือ บำรุงสายตา และทำให้ผิวพรรณสุขภาพดี ช่วยเปลี่ยน Tryptophan เป็น Niacin
- วิตามิน B3 (Niacin) มีประโยชน์คือ ช่วยกระตุ้นการทำงานของ enzyme ต่างๆ และทำให้ผิวพรรณสุขภาพดี
- วิตามิน B5 (Pantothenic acid) มีประโยชน์คือ ช่วยในการสร้างฮอร์โมน และเป็นหนึ่งในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน, โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตจากอาหาร
- วิตามิน B7 (Biotin) เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการเมแทบอลิซึมจากอาหาร
- วิตามิน B6 (Pyridoxine) มีประโยชน์ คือ ช่วยในการสร้างเม็ดเลือดแดง และมีผลในการสร้าง insulin และ hemoglobin
- วิตามิน B9 (Folate) มีประโยชน์คือ ช่วยในการสร้างเม็ดเลือดแดง ควบคุมระดับฮอร์โมน และช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคทางระบบประสาท และหลอดเลือดหัวใจ
- วิตามิน B12 (Cobalamine) มีประโยชน์คือ เป็นตัวช่วยในกระบวนการสร้างเม็ดเลือดแดง บำรุงประสาท และเป็นตัวช่วยในกระบวนการสร้างส่วนประกอบต่างๆของระบบพันธุกรรม
- วิตามิน C (Ascorbic acid) มีประโยชน์คือ ช่วยในการเสริมสร้างคอลลาเจน ทั้งในกล้ามเนื้อและกระดูก ช่วยซ่อมแซมกระดูกและฟัน ช่วยทำให้หลอดเลือดแข็งแรง ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

เราจึงจำเป็นที่จะต้องได้รับวิตามินเหล่านี้ในแต่ละวัน โดยปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน จากแผนงานวิจัยนโยบายอาหารและโภชนาการ เพื่อการสร้างเสริมสุขภาพ (Food and Nutrition Policy for Health Promotion) ได้ระบุว่า ปริมาณวิตามินแต่ละชนิดที่เราควรได้รับในแต่ละวัน สำหรับคนไทย (Thai Recommended Daily Intakes : Thai RDI) (2) มีดังนี้

- วิตามิน B1 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 1.5 มิลลิกรัม
- วิตามิน B2 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 1.7 มิลลิกรัม
- วิตามิน B3 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 20 มิลลิกรัม เอ็น อี<sup>2</sup>
- วิตามิน B5 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 6 มิลลิกรัม
- วิตามิน B6 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 2 มิลลิกรัม
- วิตามิน B7 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 150 ไมโครกรัม
- วิตามิน B9 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 200 ไมโครกรัม
- วิตามิน B12 ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 2 ไมโครกรัม
- วิตามิน C ปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน คือ 60 มิลลิกรัม

ตามการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน มาตรฐานของ AOAC official method of analysis ได้มีการระบุวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินต่างๆไว้ ดังนี้

#### Vitamin B และ Vitamin B2 (10)

ใช้ fluorometric method โดยอาศัยหลักการวาวแสงของคุณสมบัติของตัวมันเอง หลักการของเครื่องคือ เมื่อสารได้รับพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่นสั้น ทำให้อิเล็กตรอนเดี่ยวมีพลังงานสูงขึ้น และกระโดดไปอยู่ในออร์บิทัล (orbital) ที่สูงขึ้นตามระดับของพลังงานที่ได้รับและเมื่อกลับสู่สถานะพื้นจะเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นเท่ากับความยาวคลื่นที่ดูดกลืนเข้าไป แต่เนื่องจากการกลับเข้าสู่สถานะพื้นของอิเล็กตรอนในอะตอม มีการสูญเสียพลังงานไปส่วนหนึ่ง เนื่องจากการชนและการสั่นของอะตอม จึงทำให้แสงที่เปล่งออกมาขณะกลับสู่สถานะพื้นมีความ

---

<sup>2</sup> เอ็น อี (NE) = Niacin Equivalent

ยาวคลื่นมากกว่าความยาวคลื่นแสงที่ได้รับไป จากนั้นเครื่องจะตรวจวัดความยาวคลื่นที่ออกมาซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะของสารแต่ละตัว (11)

#### Vitamin B3 (10)

ใช้วิธี calorimetric method โดยใช้เครื่อง Bomb calorimeter ใช้หลักการของ direct calorimetry ซึ่งเป็นการวัดปริมาณความร้อนที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อมีการเผาผลาญเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ตัวอย่างจะถูกบรรจุใน chamber และ charged ด้วยออกซิเจนภายใต้ความดันสูง (high pressure) จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าเคลื่อนที่ผ่าน fuse และทำให้เกิดการจุดระเบิด (ignites) เชื้อเพลิงคือส่วนผสมของตัวอย่างและออกซิเจน (food-oxygen mixture) โดยเครื่อง calorimeter จะถูกหุ้มด้วยฉนวนเพื่อป้องกันไม่ให้ความร้อนถ่ายเทออกไปสู่สภาวะแวดล้อม สามารถวัดโดยการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิของน้ำ ทำให้ทราบปริมาณความร้อนที่ปลดปล่อยจากสารตัวอย่างแต่ละชนิด (7)

#### Vitamin C (10)

ใช้วิธี 2,6-dichloroindophenol titrimetric method หลักการทั่วไปของการไทเทรต คือ วัดปริมาณของสารละลาย ซึ่งปริมาณของสารละลายจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณสาร โดยทำปฏิกิริยากับสารที่ทราบปริมาณหรือความเข้มข้นที่แน่นอน สารที่ไม่ทราบความเข้มข้นจะบรรจุในขวดรูปชมพู่เรียกว่าไทแทรนด์ (titrand) โดยสมมติให้สาร A ส่วนเป็นสารที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนหรือเรียกว่าสารมาตรฐาน จะถูกบรรจุในบิวเรตต์เรียกว่าไทแทรนต์ (titrant) จุดสารที่นำมาไทเทรตทำปฏิกิริยากันพอดี เรียกว่าจุดสมมูลหรือจุดสะเทิน (equivalence point) จุดที่กรดทำปฏิกิริยากันพอดีหรือสะเทินพอดีกับเบส ส่วนจุดที่อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสี เรียกว่าจุดยุติ (end point) ซึ่งเป็นจุดที่จะหยุดการไทเทรต ถ้าใช้อินดิเคเตอร์ที่เหมาะสมจะทำให้จุดยุติตรงกับจุดสมมูลหรือใกล้เคียงกับจุดสมมูล แต่ถ้าใช้อินดิเคเตอร์ไม่เหมาะสมอาจจะทำให้จุดยุติอยู่ห่างจากจุดสมมูลมาก ทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้ (12)

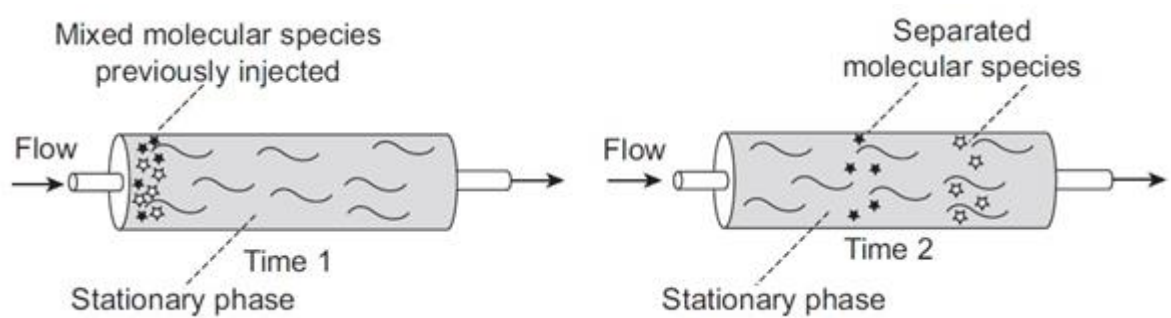
## HPLC

**Chromatography**

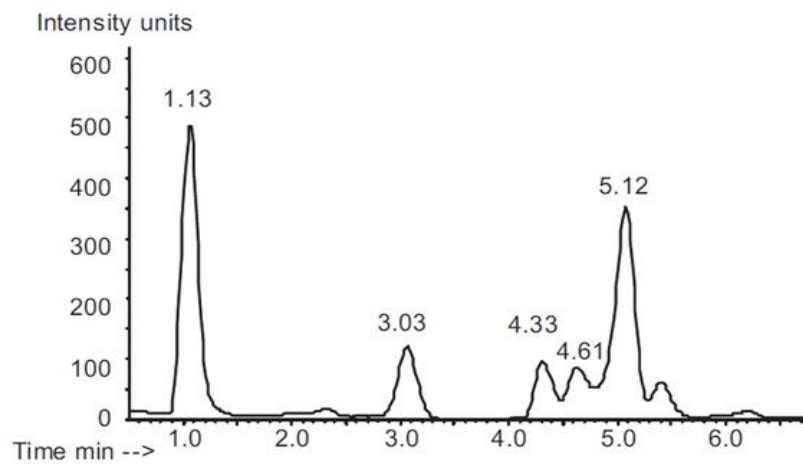
เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้ในการแยกโมเลกุลของสารที่ผสมกันอยู่ เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในห้องทดลองและโรงงานอุตสาหกรรม สำหรับการแยกสารจะใช้สารที่ต้องการแยกไหลในวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยผ่านวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ที่เหมาะสมในการแยก โดยถ้าสารตัวอย่างเป็นของเหลว วัฏภาคเคลื่อนที่จะเป็นของเหลว ถ้าสารตัวอย่างเป็นแก๊ส วัฏภาคเคลื่อนที่จะเป็นแก๊ส

**High performance liquid chromatography**

เป็นหนึ่งในการทำ chromatography แตกต่างจากปกติคือ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) จะบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กมาก (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-5  $\mu\text{m}$ ) และใช้ปั๊มในการทำให้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เคลื่อนที่ และใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยในการฉีดลงไปในคอลัมน์เพื่อแยกสาร สารที่ถูกวัฏภาคเคลื่อนที่ชะออกไปจะถูกตรวจวัดได้หลายวิธี เช่น UV absorption, refractive index, fluorescence, molecular mass and fragmentation in a mass spectrometer โดยเครื่องจะวัดออกมาเป็น chromatogram ออกมาในรูปของ retention time ของสารแยกออกมาได้ ณ เวลาที่แตกต่างกัน



รูปที่ 1 การฉีดสารเข้าไปในคอลัมน์ก่อนเปิดและปิดปั๊ม



รูปที่ 2 ตัวอย่าง chromatogram

ซึ่งแต่ละพีคก็จะเป็นสารคนละตัวกัน และความสูงที่แตกต่างกันของแต่ละพีคขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณสารที่อยู่ในตัวอย่าง ปริมาณสารที่ฉีด ความไวของเครื่องที่ใช้ในการวัด และพื้นที่ใต้กราฟของพีคขึ้นอยู่กับปริมาณสารในตัวอย่าง ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC สามารถนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพเชิงปริมาณของสารหลังการเปรียบเทียบความถูกต้อง (13)

เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC สามารถนำไปใช้ในงานวิเคราะห์ได้หลายวัตถุประสงค์ เช่น เพื่อแยกสารออกจากสารผสม หรือเพื่อตรวจสอบและวัดปริมาณสารในสารผสม โดยสามารถประยุกต์ใช้คุณสมบัติในการแยกสารจากสารผสมเพื่อใช้ในการเตรียมวัตถุดิบก่อนการผลิตในขั้นต่อไป ซึ่งรูปแบบการแยกสารในเทคนิค HPLC ที่ใช้ทั่วไปมี 2 ประเภท แบ่งตามความมีขั้วของวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่ Normal phase และ Reverse phase (14)

ตารางที่ 1 ความแตกต่างของ normal phase และ reverse phase

|                           | Normal phase                               | Reverse phase          |
|---------------------------|--------------------------------------------|------------------------|
| Compound                  | Polar substituents                         | Non-polar substituents |
| Stationary phase polarity | High (alkyl-amines , alkyl-nitriles)       | Low (alkyl-silanes)    |
| Solvent polarity          | Low to medium                              | Medium to high         |
| Solvent strength          | Non polar → polar                          | polar → Non polar      |
| Sample elution order      | Least polar first                          | Most polar first       |
| Effect of increasing      | Reduces elution time                       | Increase elution time  |
| Solvent polarity          |                                            |                        |
| Cautions :                | Ketone & aldehydes not good for alkylamine | Use between pH 2-8     |

### ส่วนประกอบของของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

#### 1. สารละลาย (mobile phase)

สารละลาย หรือ solvent เป็นตัวแปรที่มีความสำคัญในการแยกสารตัวอย่างออกเป็นองค์ประกอบย่อยต่างๆ มีความจำเพาะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยก โดยสารละลายส่วนใหญ่ที่ใช้เป็น mobile phase ใน HPLC ได้แก่ organic solvent หรือ aqueous solution ของเกลือชนิดต่างๆ ซึ่งสารละลายตัวอย่างทุกชนิดก่อนการวิเคราะห์ด้วย HPLC ควรกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  ใช้ ultrasonic bath เพื่อกำจัดแก๊สที่ละลายในสารละลายทั้งหมด คุณสมบัติพื้นฐานที่สำคัญบางประการของ mobile phase ที่ใช้ใน HPLC ได้แก่

1. ไม่ทำปฏิกิริยากับ column หรือ packing material
2. สามารถละลายสารตัวอย่างได้
3. ปราศจากตะกอนและ dissolved gas (อาจทำให้เกิดการอุดตันใน column)
4. สารละลายปราศจากสิ่งเจือปนซึ่งรวมถึงพวก preservative และ stabilizer ต่างๆ สำหรับน้ำกลั่นจะต้องปราศจากสารอินทรีย์และแบคทีเรียต่างๆ
5. เหมาะสมกับชนิดของ detector ที่ใช้



## 2. Pump

ทำหน้าที่สูบ mobile phase เพื่อส่งเข้าสู่ column ในอัตราเร็วที่กำหนด ความดันของระบบจะขึ้นอยู่กับอัตราการเคลื่อนที่ของ mobile phase นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับ viscosity ของ mobile phase, ขนาดของ packing material และความยาวของ column โดยปกติความดันที่ใช้มักไม่เกิน 4,000 psi pump สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. Isocratic pump ใช้อัตราส่วนของ mobile phase ได้คงที่ตลอดเวลา
2. Gradient Pump เป็น pump ที่สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ mobile phase ได้ตามเวลาที่กำหนด

## 3. Injector

เป็นเครื่องมือที่ฉีดสารเข้าสู่ column มี 2 ชนิด ได้แก่

1. Manual injector
2. Auto samples injector นิยมใช้

## 4. Column

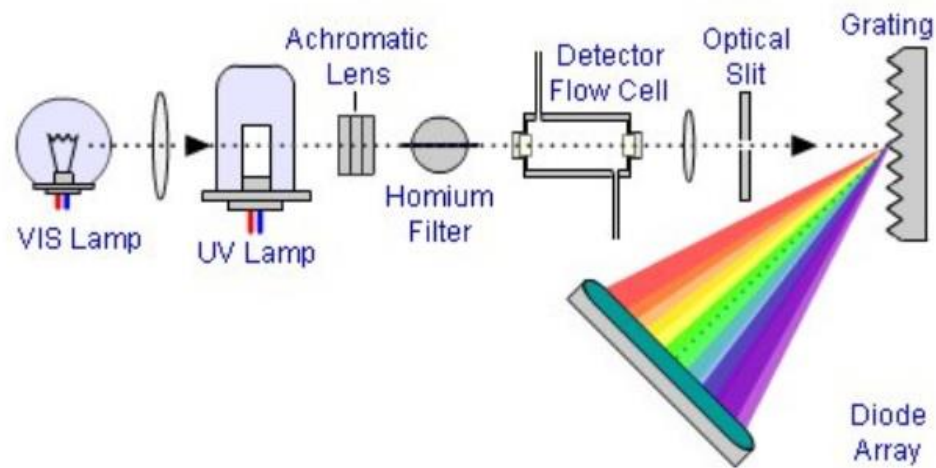
ตัว column ทำจาก Stainless Steel, แก้ว หรือ Teflon มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-25 mm ในงานวิเคราะห์ใช้ขนาด 1-5 mm โดยอาจใช้ขนาดใหญ่กว่าปกติกับการวิเคราะห์ preparative separation และ Steric Exclusion Chromatography สำหรับ analysis column เป็น column ที่นิยมใช้ในการแยกสารเพื่อการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพ นอกจากนี้ analytical column แล้ว มี column ชนิดอื่นๆ ได้แก่

Guard column จะอยู่ก่อน analytical column ภายในบรรจุ material ที่มักเป็นชนิดเดียวกับ analytical column ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายซึ่งจะเกิดแก่ column ได้แก่ particle ต่างๆ ช่วยให้ column มีอายุการใช้งานนานขึ้น

## 5. Detector ที่นิยมใช้ เช่น

1. UV detector ซึ่งสารที่ต้องการวิเคราะห์ต้องสามารถดูดกลืนแสง UV ได้ หรือเตรียมสาร derivative ของสารประกอบที่วิเคราะห์เพื่อให้ได้สารซึ่งดูดกลืนคลื่นแสง UV
2. RI detector ใช้เมื่อต้องการเปรียบเทียบความแตกต่างของ refractive index ของสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน
3. Fluorescence detector ใช้ได้กับสารที่เมื่อดูดกลืนคลื่นแสง UV จากแหล่งแสงใน detector แล้วสามารถเปล่งแสง Fluorescence ได้ (16)

4. Diode array detector ( DAD ) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร โดยสามารถวัดได้ทีละหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน วัดได้ตั้งแต่ 190-850 nm ระบบการเดินทางของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง (reverse optics) คือ แสงจากแหล่งกำเนิดแสง (light source) จะผ่านไปยัง flow cell แล้วผ่านไปยัง monochromator คือ slit และ grating เมื่อแสงตกกระทบบน grating แสงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วไปตกกระทบบนแผงของ diode array ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็น chromatogram สารตัวอย่างที่เหมาะสมกับ detector ต้องเป็นตัวอย่างที่สามารถดูดกลืนแสงได้ (17)



รูปที่ 4 เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิด Diode array detector (DAD) (18)

## การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation)

### ความหมาย

เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้อง ความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษา เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติ เจือปน หรือข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ

### พารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์

พารามิเตอร์สำคัญที่ใช้ในการศึกษา อ้างอิงจาก United State of Pharmacopoeia 2014 (19) ได้แก่

1. Specificity
2. Accuracy
3. Precision
4. Linearity and Range
5. Limit of detection
6. Limit of quantitation

#### 1. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีการวิเคราะห์ (Specificity)

เพื่อแสดงว่าวิธีวิเคราะห์นั้นสามารถตรวจสอบได้อย่างจำเพาะเจาะจงสำหรับสารที่ต้องการศึกษา โดยปราศจากสารรบกวนอื่นๆ เช่น diluent , placebo และ degradation product อื่นๆ (20)

#### 2. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ว่ามีค่าใกล้เคียงความจริงหรือไม่ โดยอาจมีการสร้างตัวอย่างเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ และควรตั้งค่าความถูกต้องในช่วงที่ระบุของวิธีการวิเคราะห์ (21)

### 3. ความเที่ยงตรงของวิธีการวิเคราะห์ (Precision)

เป็นความสามารถของวิธีการทดสอบที่ให้ผลการทดสอบหรือผลวิเคราะห์มีค่าใกล้เคียงกัน โดยทดสอบซ้ำๆ หลายครั้ง แบ่งออกเป็น

3.1 Repeatability วิธีการทดสอบคือ การทดสอบสารตัวอย่างซ้ำๆ หลายตัวอย่าง ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ

3.2 Intermediate precision วิธีการทดสอบคือ การวิเคราะห์สารตัวอย่างในห้องปฏิบัติการเดียวกัน แต่วิเคราะห์ในวันต่างกันหรือมีการเปลี่ยนผู้วิเคราะห์

3.3 Reproducibility คือ การทดสอบซ้ำโดยใช้วิธีการเดิม แต่เปลี่ยนสถานที่ที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อสังเกตว่าวิธีการเดิมสามารถให้ผลเหมือนกันในสถานที่อื่นหรือไม่

### 4. ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (Linearity and Range)

4.1 Linearity คือ ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลทดสอบเป็นสัดส่วน โดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด วิธีการทดสอบ คือ เตรียมอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ในช่วง 25-120% (20)

4.2 Range คือ ช่วงความเข้มข้นระหว่างค่าสูงและค่าต่ำของสารที่ต้องการทดสอบที่เป็นเส้นตรง และสามารถวิเคราะห์ปริมาณของสาร ในช่วงดังกล่าวได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

สำหรับเกณฑ์ที่ใช้ในการยอมรับ ประเมินได้จากค่า Correlation coefficient ของ Regression line โดยค่าที่ได้ควรมากกว่า 0.995 (20)

### 5. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Limit of detection)

คือ ปริมาณที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้และไม่ขึ้นกับปริมาณ โดยมีวิธีต่างๆ ดังนี้(21)

5.1 Visual evaluation

5.2 Signal to noise ratio

5.3 Standard deviation of the response and the slope

5.4 Standard deviation of the blank

### 5.5 Calibration curve

#### 6. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ในเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation)

คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ โดยวิธีการวิเคราะห์จะต้องเป็นการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และเที่ยงตรง โดยมีวิธีต่างๆ ดังนี้ (21)

##### 6.1 Visual evaluation

##### 6.2 Signal to noise ratio

##### 6.3 Standard deviation of the response and the slope

##### 6.4 Standard deviation of the blank

##### 6.5 Calibration curve

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่สามารถละลายน้ำได้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

อ้างอิงจากงานวิจัย Rapid determination of main constituents of packed juices by reverse phase-high performance liquid chromatography: an insight in to commercial fruit drinks(22) ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามิน C ในน้ำส้มโดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ HPLC (Phenomenex Luna C18 column, flow rate 1 mL/min, 50°C) ใน Reverse phase ที่แตกต่างกันและใช้ UV detector ความยาวคลื่น 268 nm ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้น โดยใช้ mobile phase คือ acetonitrile และ 10 mM potassium di-hydrogen ortho phosphate buffer ในอัตราส่วน 40:60 (pH=2.1) จากผลการวิเคราะห์พบว่า ได้ค่า repeatability และ reproducibility น้อยกว่า 0.05, 0.1 และมีค่า  $R^2$  0.99 สำหรับวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

อ้างอิงจากงานวิจัย Analysis of organic acids in fruit juices by hplc and uv detection (23) ทำการวิเคราะห์ปริมาณ organic acid ได้แก่ oxalic acid, tartaric acid, quinic acid, malic acid, ascorbic acid, shikimic acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid และ acetic acid ในน้ำผลไม้(น้ำองุ่น น้ำส้ม น้ำแอปเปิ้ล น้ำแครนเบอร์รี่) โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ HPLC (PerkinElmer Brownlee Validated Aqueous  $C_{18}$ , flow rate 1.5 mL/min, 30 °C) และใช้ UV detector ความยาวคลื่น 210 nm ใช้ mobile phase คือ Isocratic; 25-mM K-phosphate buffer

(monobasic potassium phosphate และ phosphoric acid) (pH 2.4) ใช้เวลาวิเคราะห์ 8 นาที และเวลาที่ใช้ในการล้าง 6 นาที พบว่ามีค่า  $R^2$  มากกว่า 0.999 และแต่ละพีคแยกกันอย่างชัดเจน

อ้างอิงจากงานวิจัย Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices (24) ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ organic acid ได้แก่ tartaric acid, malic acid, ascorbic acid และ citric acid ในผลไม้และน้ำผลไม้ (แอปเปิ้ล ส้ม เลมอน) โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ HPLC (HP 1100 series (Agilent, Germany) liquid chromatograph, RP-C18 column (3  $\mu$ m particle size, 150  $\times$  4.6 mm I.D., เก็บใน 25 °C), flow rate 0.5 mL/min) แบบ reversed phase และใช้ UV-Visible diode array detector (DAD) ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้น ความยาวคลื่น 210 nm สำหรับ tartaric acid, malic acid และ citric acids ความยาวคลื่น 250 nm สำหรับ ascorbic acid โดยมี mobile phase คือ 0.01 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer solution (pH = 2.60 ปรับด้วย o-phosphoric acid) โดยมี parameter ที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ efficiency, adequate linearity, relative standard deviation (RSD), repeatability, reproducibility, limits of detection (LD), quantification (LQ) และ recovery rates ได้ค่า linearity ที่ดี โดยดูจากค่า relative standard deviation (RSD) ของค่า repeatability เท่ากับ 0.4%-2.3% (n = 10), reproducibility เท่ากับ 1.2%-5.0% (n = 18), Limits of detection (LD) เท่ากับ 0.03-3.31  $\mu$ g/mL, Limits of quantitation (LOQ) อยู่ระหว่าง 0.10-11.03  $\mu$ g/mL, recovery rates อยู่ระหว่าง 82-110% พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นได้ค่า parameter ที่ผ่านเกณฑ์ของ Brazilian legislation มีวิธีทำที่สะดวกรวดเร็ว (ใช้เวลาในการทำประมาณ 10 นาที) ราคาไม่แพง สารเคมีที่ใช้ไม่เป็นพิษกับร่างกายและสิ่งแวดล้อม

อ้างอิงจากงานวิจัย RP – HPLC determination of water – soluble vitamins in honey (4) ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินที่ละลายในน้ำ ได้แก่ B2, B3, B9, B5 และวิตามิน C ในน้ำผึ้งจาก sardinia ประเทศอิตาลี ที่ง่ายขึ้นและเร็วขึ้น โดยใช้เทคนิค RP – HPLC (Alltima (Alltech, Sedriano, Italy) C18 column 250mm $\times$ 4.6mm, 5  $\mu$ m particle size, flow rate 1.0 mL/min) และใช้ UV-Vis variable wavelength detector ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 254 nm สำหรับวิตามิน B3 และวิตามิน C ความยาวคลื่น 210 nm สำหรับวิตามิน B2, B5 และ B9

โดยมี mobile phase คือ 0.025% v/v TFA aqueous solution และ Acetonitrile จากงานวิจัยพบว่า วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีค่า LOD อยู่ในช่วง 0.1 mg/kg – 0.58 mg/kg และ LOQ อยู่ในช่วง 0.30 mg/kg – 1.75 mg/kg มีค่า linearity ที่ดี ( $R^2=0.9929$ ) มีค่า Precision ที่ดี โดยวัดจากค่าเฉลี่ยของ Repeatability และ Reproducibility ไม่พบ Bias

อ้างอิงจากงานวิจัย A Novel HPLC method for the concurrent analysis and quantitation of seven water-soluble vitamins in biological fluids (plasma and urine): a validation study and application (25) ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำ ได้แก่ วิตามิน B1, B3, B5, B6, B9 B12 และวิตามิน C ในพลาสมาและurine โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ HPLC (MetaChem Polaris (Varian medical system Ltd, Crawley, UK) C18-A 5  $\mu$ m (250mm  $\times$  2.1mm i.d.) flow rate 0.2 mL/min, Injection volume 3  $\mu$ L, 30°C) แล้วนำไปกรองด้วย precolumn (MetaGuard column (Varian medical system Ltd, Crawley, UK) C18) แบบ reversed phase และใช้ photodiode array detector ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 270 nm โดยใช้ความยาวคลื่น 230 nm สำหรับ ascorbic acid, 270 nm สำหรับ thiamine (B1), 265 nm สำหรับ riboflavin (B2), 256 nm สำหรับ nicotinamide, 266 nm สำหรับ pantothenic acid (B5), 257 nm สำหรับ pyridoxine (B6), 280 nm สำหรับ folic acid (B9) และ 230 nm สำหรับ cyanocobalamin (B12) โดยมี mobile phase คือ 0.01% TFA aqueous (pH 2.9, solvent A) และ 100% methanol (solvent B) จากงานวิจัยพบว่า วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีวิธีทำที่สะดวกรวดเร็ว (ใช้เวลาในการทำประมาณ 35 นาที) มีค่า Precision ที่ยอมรับได้ โดยวัดจากค่าเฉลี่ยของ Repeatability และ Reproducibility ได้ค่า %RSD ทั้งหมดใกล้เคียงกัน มีค่า linearity ( $R^2$ ) มากกว่า 0.99 recovery rates อยู่ระหว่าง 93-100% และสามารถนำวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้กับการตรวจหาปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำในพลาสมาและurine ในคนที่ติดแอลกอฮอล์

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้ในการจัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์
  - 1.1. คอมพิวเตอร์
    - 1.1.1. Notebook PC Intel core i7-7500U (3.5 GHz, with 4 GB of RAM)  
Microsoft window 10 pro
    - 1.1.2. Notebook PC Intel Core i7-4710HQ (2.50 GHz, 6 MB L3 Cache,  
up to 3.50 GHz) Microsoft window 8.1 pro
    - 1.1.3. MacBook Pro Touchbar and TouchID (2.3 GHz up to 3.8 GHz  
quad-core 8th-generation Intel Core i5 processor Macintosh with  
8 GB of RAM) macOS 10.12.1
  - 1.2. โปรแกรม
    - 1.2.1. Labsolutions
    - 1.2.2. Excel for Mac version 16.12
  - 1.3. เครื่องมือและอุปกรณ์
    - 1.3.1. HPLC Shimadzu (Detector PDA SPD-M20A, Autosample SIL-20A  
HT, Liquid chromatograph LC-20AD, Column oven CTO-10AS  
VP, Degassing unit DGU-20A5R)
    - 1.3.2. UV-Visible Spectrophotometer (HITACHI U-2900)
    - 1.3.3. Ultrasonic cleaner (Sonicator WiseClean WUC-D22H)
    - 1.3.4. Stanless steel column C18 (ACE 5 C18 250 x 4.6 mm id)
    - 1.3.5. Pipette (AXYPET 2-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L)
    - 1.3.6. Syringe (NIPRO disposable syringe 3 mL, 1 mL)

- 1.3.7. Syringe filter nylon 0.22  $\mu\text{m}$  green, 0.45  $\mu\text{m}$  white (CNW technologies)
- 1.3.8. ชุดกรองแก้วสุญญากาศ (Vacuum filtering VERTICAL)
- 1.3.9. ชุดกรองพลาสติก (Reusable bottle-top filter Thermo SCIENTIFIC DS0320-5045)
- 1.3.10. Filtration membranes nylon 0.45  $\mu\text{m}$
2. สารเคมีที่ใช้และสารตัวอย่างในการจัดทำโครงการงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์
  - 2.1. L-Ascorbic acid (Vitamin C, SIGMA-ALDRICH USA)
  - 2.2. Thiamine (Vitamin B1, SIGMA-ALDRICH USA)
  - 2.3. (-)Riboflavin (Vitamin B2, SIGMA-ALDRICH USA)
  - 2.4. Folic acid (Vitamin B9, SIGMA-ALDRICH USA)
  - 2.5. Methanol (Honeywell USA)
  - 2.6. Trifluoroacetic acid (TFA, Tokyo chemical industry)
  - 2.7. Sodium carbonate ( $\text{HCO}_3$ )
  - 2.8. ตัวอย่างน้ำผลไม้
    - 2.8.1. น้ำผลไม้ผสมน้ำผักรวม บริษัท A
      - 2.8.1.1. Exp 09/07/19 17:51 C09
    - 2.8.2. น้ำผักผลไม้รวม บริษัท B
      - 2.8.2.1. Mfd 09/04/18 Exp 09/04/19 18:52 I4
      - 2.8.2.2. Mfd 17/08/18 Exp 17/08/19 16:36 H5
    - 2.8.3. น้ำส้มโชกุน บริษัท C
      - 2.8.3.1. Exp 19/12/18 19:14 B01

### 3. วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1. สารตัวอย่าง

- 3.1.1. น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปจากร้านสะดวกซื้อหรือห้างสรรพสินค้าจาก 3 บริษัท

#### 3.2. การเตรียมตัวทำละลาย และ mobile phase

- 3.2.1. 0.01% Trifluoroacetic acid (TFA)

ปิเปต TFA 100  $\mu$ L ลงใน DI water 1000 mL และนำไป Degas ในเครื่อง Sonicator 15 นาที

- 3.2.2. 1M  $\text{NaHCO}_3$

ชั่ง  $\text{NaHCO}_3$  12.6 g ใส่ปิกเกอร์ ละลายด้วย DI water 100 mL แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 150 mL ด้วย DI water ใน Cylinder

- 3.2.3. Methanol

นำ Methanol ไปกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45  $\mu$ m และนำไป Degas ในเครื่อง Sonicator 15 นาที

- 3.2.4. DI water

นำ DI water ไปกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45  $\mu$ m และนำไป Degas ในเครื่อง Sonicator 15 นาที

#### 3.3. RP-HPLC requirement

- 3.3.1. HPLC

Shimadzu (Detector PDA SPD-M20A, Autosample SIL-20A HT, Liquid chromatograph LC-20AD, Column oven CTO-10AS VP, Degassing unit DGU-20A5R)

- 3.3.2. Column

ACE5 column C18 250 mm x 4.6 mm id

### 3.3.3. Guard column

Analytical guard cartridge system (KJ0-4282, Phenomenex)

### 3.3.4. Chromatographic Conditions (25)

#### 3.3.4.1. Isocratic elution (สารมาตรฐานวิตามินแต่ละชนิด)

วิตามิน C และวิตามิน B1 ใช้ mobile phase คือ 0.01% TFA ใน DI water (pH 2.9) เป็น solvent A และ 100% methanol เป็น solvent B โดยปรับอัตราส่วน A:B เป็น 98:2 ใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งหมด 8 นาที

วิตามิน B2 ใช้ mobile phase คือ 0.01% TFA ใน DI water (pH 2.9) เป็น solvent A และ 100% methanol เป็น solvent B โดยปรับอัตราส่วน A:B เป็น 10:90 ใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งหมด 10 นาที

#### 3.3.4.2. Gradient elution (สารมาตรฐานวิตามินรวม)

ใช้ mobile phase คือ 0.01% TFA ใน DI water (pH 2.9) เป็น solvent A และ 100% methanol เป็น solvent B โดยปรับอัตราส่วน A:B ใน 5 นาทีแรกเป็น 98:2 แล้วปรับเป็น 10:90 ภายใน 10 นาทีต่อมา และคงอัตราส่วนนี้ไว้ 10 นาที จึงค่อยๆ ปรับอัตราส่วนเป็น 98:2 ภายใน 10 นาที ใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งหมด 20 นาทีและล้างคอลัมน์ 15 นาที

#### 3.3.4.3. Conditions

Detector คือ photodiode array detector ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้น อุณหภูมิการวิเคราะห์ที่ 25 °C Flow rate 1.0 mL/min ใช้ความยาวคลื่น 245 nm สำหรับวิตามิน C, B1 และ ความยาวคลื่น 268 nm สำหรับวิตามิน B2 (4)

### 3.4. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

#### 3.4.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินแต่ละชนิด

##### 3.4.1.1. วิตามิน B1

ละลายวิตามิน B1 5 mg ใน volumetric flask 10 mL DI water ที่มี 0.01% Trifluoroacetic acid (TFA) แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL เป็น B1 Stock1 จากนั้นปิเปต B1 Stock1 ปริมาตร 1 mL ใส่ volumetric flask 10 ml แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL เป็น B1 Stock2 จากนั้นปิเปต B1 Stock2 ปริมาตร 1 mL ใส่ volumetric flask 10 mL แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL เป็น B1 Stock3

##### 3.4.1.2. วิตามิน B2

ละลายวิตามิน B2 2.5 mg ใน volumetric flask 100 mL DI water ที่มี 0.01% Trifluoroacetic acid (TFA) แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 mL เป็น B2 stock1 จากนั้นปิเปต B2 Stock1 ปริมาตร 4 mL ใส่ volumetric flask 10 mL แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL เป็น B2 Stock2

##### 3.4.1.3. วิตามิน C

ละลายวิตามิน C 10 mg ใน DI water ที่มี 0.01% Trifluoroacetic acid (TFA) แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

#### 3.4.2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

##### 3.4.2.1. วิตามิน B1

เตรียมเหมือนกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1

##### 3.4.2.2. วิตามิน B2

เตรียมเหมือนกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2

## 3.4.2.3. วิตามิน C

ละลายวิตามิน C 25 mg ใน volumetric flask 25 mL ด้วย DI water ที่มี 0.01% Trifluoroacetic acid (TFA) แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25 mL เป็น C Stock1 จากนั้นปิเปต C Stock1 ปริมาตร 1 mL ใส่ volumetric flask 10mL แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL เป็น C Stock2

## 3.5. การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

## 3.5.1. สารละลายมาตรฐาน

## 3.5.1.1. วิตามิน B1

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1

| ความเข้มข้น (mg/mL) | STD stock3 ( $\mu$ L) | Mobile phase ( $\mu$ L) |
|---------------------|-----------------------|-------------------------|
| 0.0001              | 20                    | 980                     |
| 0.00025             | 50                    | 950                     |
| 0.0005              | 100                   | 900                     |
| 0.001               | 200                   | 800                     |
| 0.002               | 400                   | 600                     |

## 3.5.1.2. วิตามิน B2

ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2

| ความเข้มข้น (mg/mL) | STD stock2 (μL) | Mobile phase (μL) |
|---------------------|-----------------|-------------------|
| 0.0005              | 50              | 950               |
| 0.001               | 100             | 800               |
| 0.002               | 200             | 900               |
| 0.004               | 400             | 800               |
| 0.008               | 800             | 600               |

## 3.5.1.3. วิตามิน C

ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน C

| ความเข้มข้น (mg/mL) | STD stock (μL) | Mobile phase (μL) |
|---------------------|----------------|-------------------|
| 0.0005              | 25             | 975               |
| 0.00025             | 50             | 950               |
| 0.0005              | 100            | 900               |
| 0.001               | 200            | 800               |
| 0.002               | 400            | 600               |

3.5.1.4. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม (standard) และน้ำผลไม้  
(sample)

ตารางที่ 5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินรวมและน้ำผลไม้

| B1<br>(mg/mL) | STD B1 stock<br>( $\mu$ L) | B2<br>(mg/mL) | STD B2 stock<br>( $\mu$ L) | C<br>(mg/mL) | STD C stock<br>( $\mu$ L) | น้ำผลไม้<br>( $\mu$ L) | Mobile phase<br>( $\mu$ L) |
|---------------|----------------------------|---------------|----------------------------|--------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|
| 0.0002        | stock3 (40)                | 0.0005        | Stock2 (50)                | 0.0025       | Stock2 (25)               | 100                    | 785                        |
| 0.0005        | stock3 (100)               | 0.001         | Stock2 (100)               | 0.005        | Stock2 (50)               | 100                    | 650                        |
| 0.001         | stock3 (200)               | 0.002         | Stock2 (200)               | 0.01         | Stock2 (100)              | 100                    | 400                        |
| 0.002         | stock2 (40)                | 0.004         | Stock2 (400)               | 0.02         | Stock2 (200)              | 100                    | 260                        |
| 0.004         | stock2 (80)                | 0.008         | Stock1 (320)               | 0.04         | Stock1 (40)               | 100                    | 460                        |

3.6. วิธีการดำเนินการวิจัย

3.6.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินแต่ละชนิด

3.6.2. สแกน spectrum เพื่อหา  $\lambda_{\max}$  ของวิตามินแต่ละชนิดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-600 nm

3.6.3. พัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินแต่ละชนิดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography)

3.6.3.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินแต่ละชนิด

3.6.3.2. ตั้งค่า condition ของเครื่องตามที่กำหนด

3.6.4. พัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามิน B1 B2 และ C ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography)

3.6.4.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

- 3.6.4.2. ตั้งค่า condition ของเครื่องตามที่กำหนด
- 3.6.5. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำในน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป
  - 3.6.5.1. เลือกผลิตภัณฑ์น้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปชนิดกล่อง 200 ml  
จาก 3 บริษัท บริษัทละ 1 กล่อง ไม่จำกัดชนิดน้ำผักและผลไม้
  - 3.6.5.2. เตรียมสารละลายตัวอย่าง
  - 3.6.5.3. ตั้งค่า condition ของเครื่องตามที่กำหนด
- 3.6.6. นำ chromatogram และ peak area ที่ได้ มาวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบ  
ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ต่อไป
- 3.7. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) (20)
  - 3.7.1. ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)  
การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ทำการ spike  
สารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น (วิตามิน B1 คือ 0.0001-0.002  
mg/mL วิตามิน B2 คือ 0.0005-0.008 mg/mL วิตามิน C คือ 0.0005-  
0.002 mg/mL) ใน matrix ของน้ำผลไม้ นำไปกรองผ่าน syringe filter  
nylon 0.22  $\mu$ m ความเข้มข้นละ 1 vial วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง  
โดยความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ประเมินผลจาก Peak purity จากการ  
วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High  
performance liquid chromatography) โดยใช้ diode array detector  
(DAD) ในการวิเคราะห์
  - 3.7.2. ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ  
(Linearity and range)  
โดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างทั้งหมด 5  
ความเข้มข้น โดยที่ช่วงที่กำหนดจะครอบคลุมความเข้มข้นที่ระบุไว้บน  
ฉลาก (วิตามิน B1 คือ 0.0001-0.002 mg/mL วิตามิน B2 คือ 0.0005-  
0.008 mg/mL วิตามิน C คือ 0.0005-0.002 mg/mL) นำไปกรองผ่าน

syringe filter nylon 0.22  $\mu\text{m}$  ความเข้มข้นละ 1 vial วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไป plot กราฟ calibration curve หา  $R^2$  โดยค่า linearity ที่สามารถยอมรับได้จะต้องมีค่า  $R^2$  มากกว่าหรือเท่ากับ 0.995

### 3.7.3. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

โดยการเตรียมสารละลายทั้งหมด 3 ความเข้มข้น (วิตามิน B1 คือ 0.0001- 0.002 mg/mL วิตามิน B2 คือ 0.0005-0.008 mg/mL วิตามิน C คือ 0.0005-0.002 mg/mL) นำมากรองผ่าน syringe filter nylon 0.22  $\mu\text{m}$  ความเข้มข้นละ 3 vial วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณหาค่า % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{observed concentration}}{\text{nominal concentration}} \times 100$$

### 3.7.4. ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ใช้วิธีการทดสอบซ้ำ (Repeatability) คือ เตรียมสารละลายตัวอย่างทั้งหมด 3 ความเข้มข้น โดยครอบคลุมความเข้มข้นที่ระบุไว้บนฉลากของน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป (วิตามิน B1 คือ 0.0001-0.002 mg/mL วิตามิน B2 คือ 0.0005-0.008 mg/mL วิตามิน C คือ 0.0005-0.002 mg/mL) นำมากรองผ่าน syringe filter nylon 0.22  $\mu\text{m}$  ความเข้มข้นละ 3 vial นำมาวิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณหาค่า SD แล้วรายงานเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์หรือ %RSD

$$\% \text{RSD} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

สำหรับ Intermediate precision ทำโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างทั้งหมด 3 ความเข้มข้น (วิตามิน B1 คือ 0.0001-0.002 mg/mL วิตามิน B2 คือ 0.0005-0.008 mg/mL วิตามิน C คือ 0.0005-0.002

mg/mL) นำมากรองผ่าน syringe filter nylon 0.22  $\mu\text{m}$  ความเข้มข้นละ 3 vial นำมาวิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณหาค่า SD แล้วรายงานค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์หรือ %RSD โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 3 วัน

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

### 3.7.5. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Limit of detection)

นำค่าที่วิเคราะห์ได้จาก calibration curve มาแทนในสูตร โดยค่า Detection Limit (DL) สามารถหาได้จาก

$$DL = 3.3 \sigma / S$$

$\sigma$  = ค่า standard deviation (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

S = ค่าความชันของ calibration curve

### 3.7.6. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดเชิงปริมาณได้ (Limit of quantitation)

นำค่าที่วิเคราะห์ได้จาก calibration curve มาแทนในสูตร โดยค่า Quantitation Limit (QL) สามารถหาได้จาก

$$QL = 10 \sigma / S$$

$\sigma$  = ค่า standard deviation (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

S = ค่าความชันของ calibration curve

### 3.7.7. ความคงทนของวิธีการทดสอบ (Robustness) (26)

โดยการหาความคงทนของวิธีการทดสอบ ทำได้โดย เปลี่ยนแปลงวิธีการทดสอบให้แตกต่างจากเดิมเล็กน้อย แล้วสังเกตถึงความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ได้แก่ การเปลี่ยนแปลง pH ของ mobile phase เพิ่มขึ้น/ลดลง 0.2 โดยเตรียม mobile phase 0.01% TFA ปรับจนได้ pH 2.7 นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45  $\mu\text{m}$  และนำไป degas ในเครื่อง Sonicator 15 นาที

3.7.8. ความเหมาะสมของวิธีการทดสอบ (System Suitability Testing)

เป็นการวัดความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ ได้แก่ column efficiency (plate number), resolution, symmetry factor, repeatability

3.7.9. การหาปริมาณวิตามินในน้ำผักและผลไม้

นำน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman™ เบอร์ 1 แล้วกรองผ่าน syringe filter nylon 0.22  $\mu\text{m}$  ก่อนใส่ vial ทำการวิเคราะห์ต่อไป

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

1. ผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง  $\lambda_{\max}$  ของวิตามิน

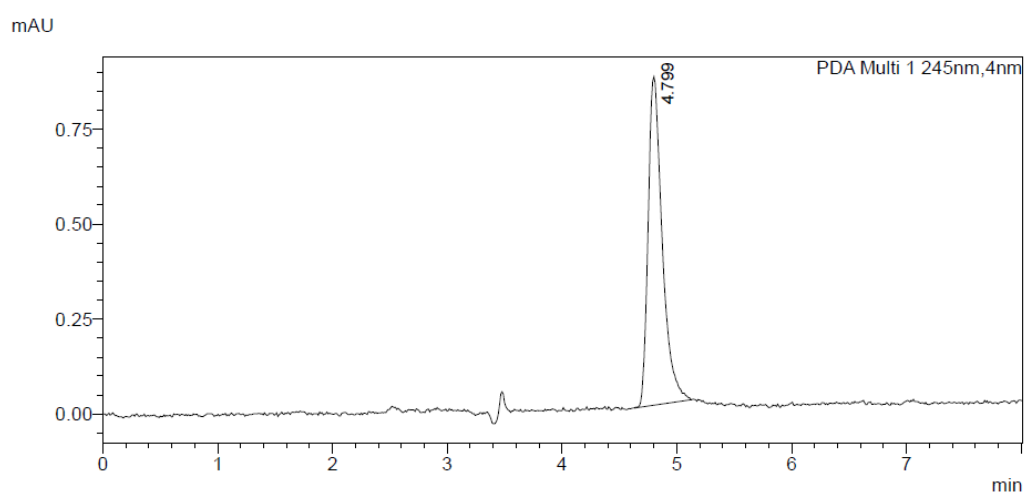
ตารางที่ 6  $\lambda_{\max}$  ของวิตามิน B1, B2 และ C

| วิตามิน | $\lambda_{\max}$ (nm) |
|---------|-----------------------|
| B1      | 245                   |
| B2      | 268                   |
| C       | 245                   |

จากการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-600 nm พบว่า  $\lambda_{\max}$  ของวิตามิน B1 245 nm, B2 268 nm, B9 284 nm, C 245 nm นำค่า  $\lambda_{\max}$  ที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2. ผลการวิเคราะห์ Retention time ของวิตามิน

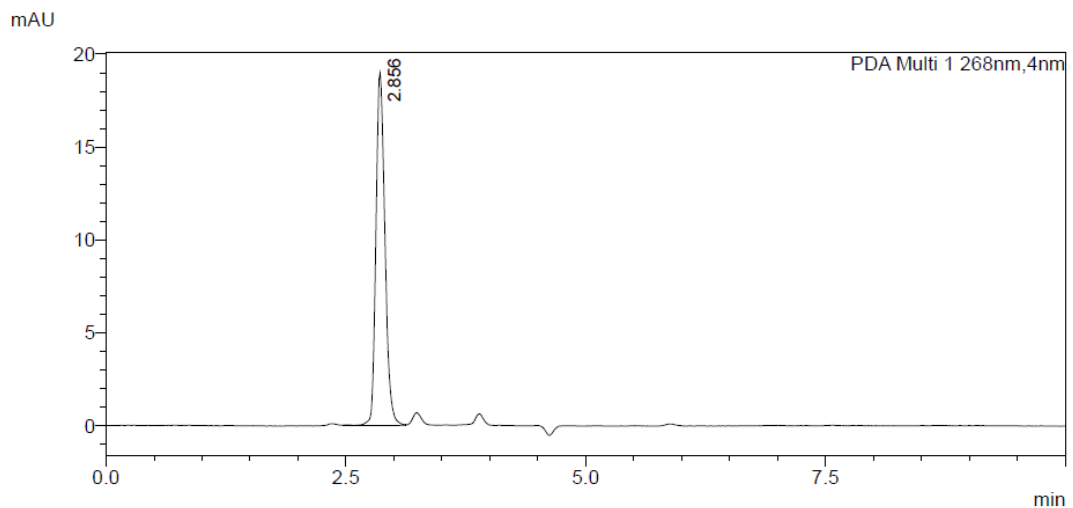
- 2.1. สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 (ความเข้มข้น 0.0005 mg/mL)



รูปที่ 5 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 ที่ความยาวคลื่น 245 nm

จากการวิเคราะห์โครมาโทแกรม เพื่อหา retention time ของวิตามิน B1 พบว่ามีค่า retention time อยู่ที่ 4.799 นาที

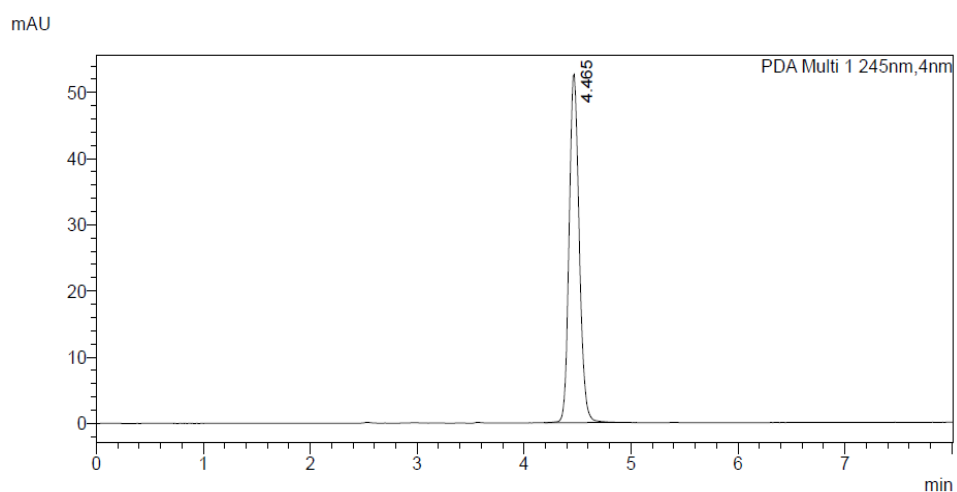
## 2.2. สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 (ความเข้มข้น 0.002 mg/mL)



รูปที่ 6 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 ที่ความยาวคลื่น 268 nm

จากการวิเคราะห์โครมาโทแกรม เพื่อหา retention time ของวิตามิน B2 พบว่ามีค่า retention time อยู่ที่ 2.856 นาที

## 2.3. สารละลายมาตรฐานวิตามิน C (ความเข้มข้น 0.01 mg/mL)



รูปที่ 7 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C ที่ความยาวคลื่น 245 nm

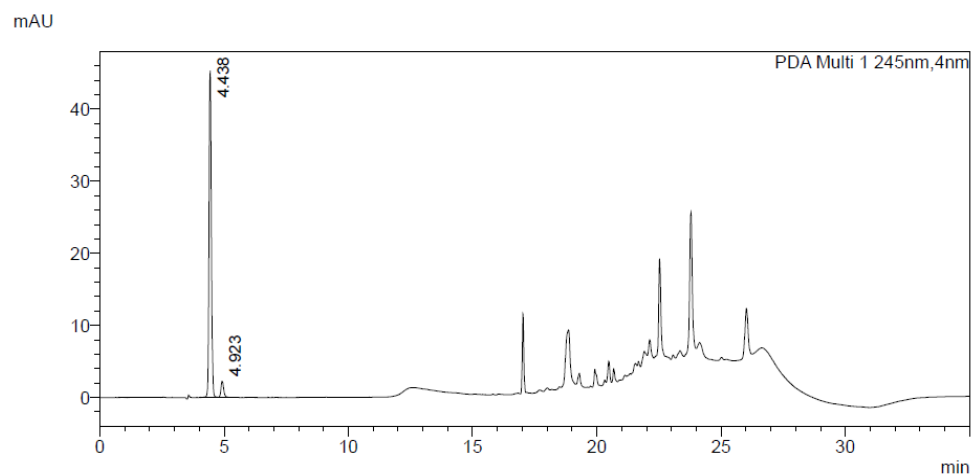
จากการวิเคราะห์โครมาโทแกรม เพื่อหา retention time ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C พบว่ามีค่า retention time อยู่ที่ 4.465 นาที

### 2.3.1. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

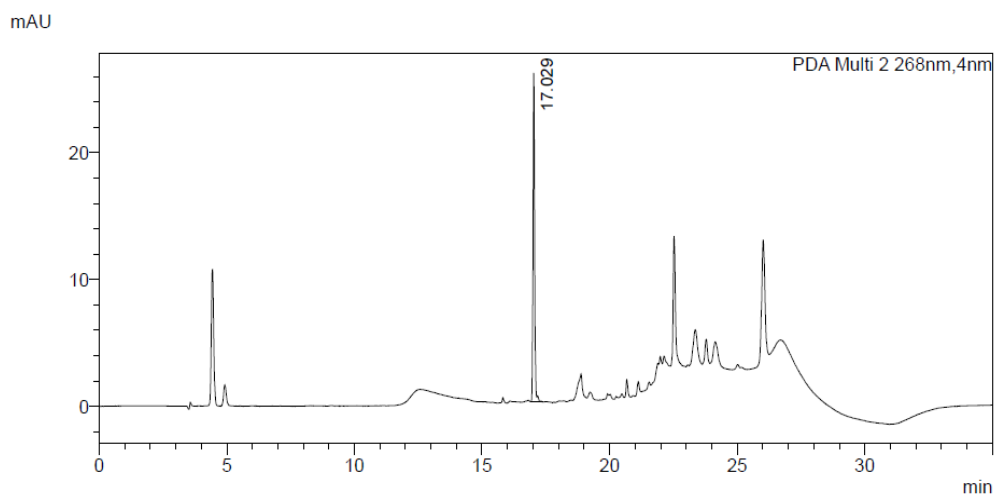
2.3.1.1. สารละลายมาตรฐานวิตามิน C (ความเข้มข้น 0.01 mg/mL)

วิตามิน B1 (ความเข้มข้น 0.0005 mg/mL) และสารละลาย

มาตรฐานวิตามิน B2 (ความเข้มข้น 0.02 mg/mL)



รูปที่ 8 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวมที่ความยาวคลื่น 245 nm



รูปที่ 9 Chromatogram ของวิตามินรวมที่ความยาวคลื่น 268 nm

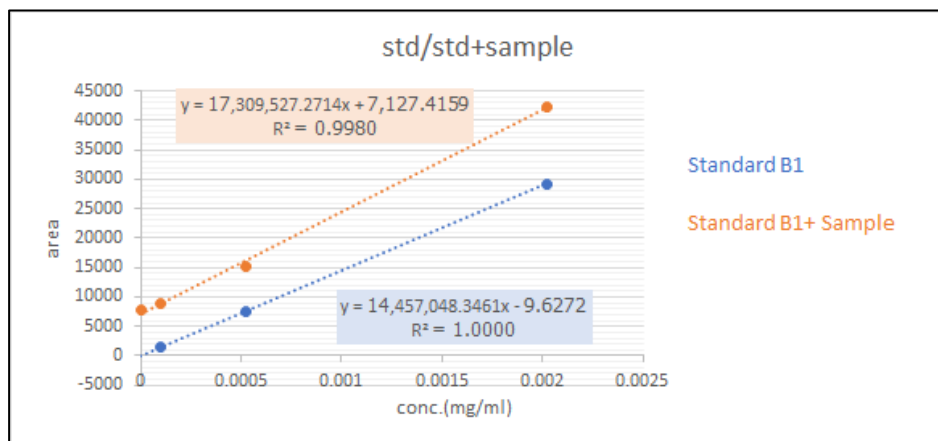
จากการวิเคราะห์โครมาโทแกรมเพื่อหา retention time ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C และ B1 ที่ความยาวคลื่น 245 nm พบว่ามีค่า retention time ที่ 4.438 และ 4.923 นาที วิตามิน B2 ที่ความยาวคลื่น 268 nm พบว่ามีค่า retention time ที่ 17.029 นาที

### 3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

#### 3.1. Isocratic elution

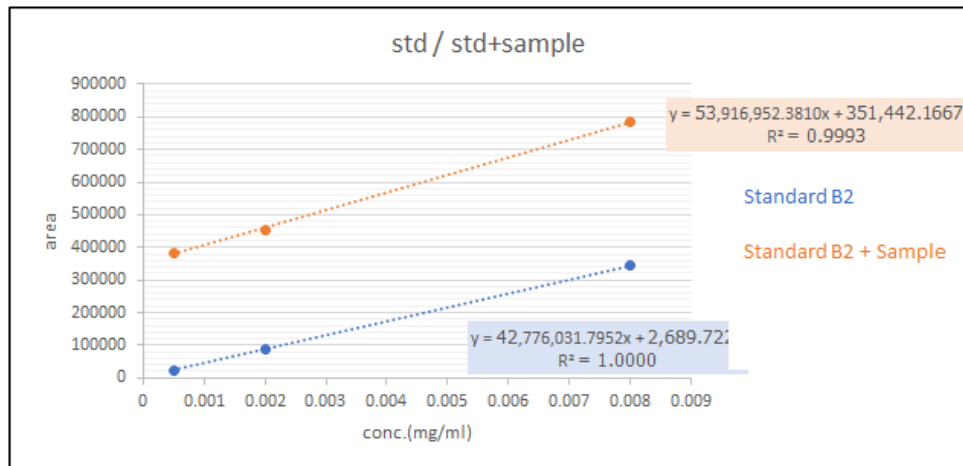
##### 3.1.1. ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

##### 3.1.1.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 เมื่อ spike Matrix น้ำผักและผลไม้



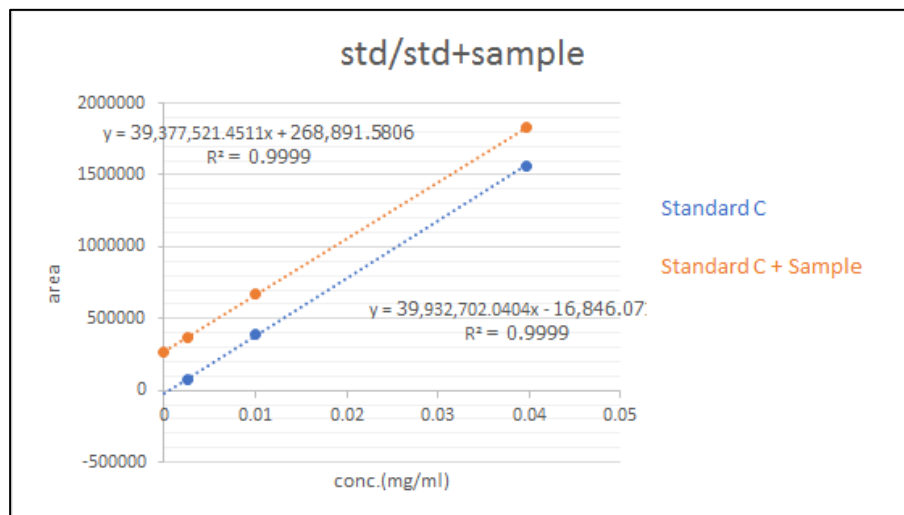
รูปที่ 10 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 และน้ำผักและผลไม้

3.1.1.2. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 เมื่อ spike  
Matrix น้ำผักและผลไม้



รูปที่ 11 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 และน้ำผักและผลไม้

3.1.1.3. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน C เมื่อ spike  
Matrix น้ำผักและผลไม้



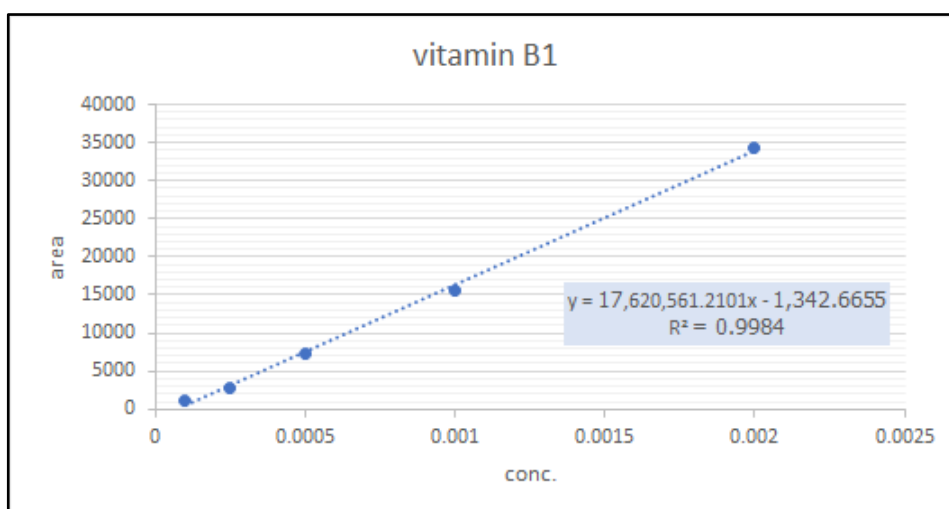
รูปที่ 12 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C และน้ำผักและผลไม้

จากผลการวิเคราะห์เมื่อ spike น้ำผักและผลไม้ปริมาณคงที่ลงในสารละลายมาตรฐานวิตามิน และนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาพลอตกราฟ calibration curve ระหว่างความเข้มข้นกับ peak area จะส่งผลให้ peak area ของสารละลายมาตรฐานเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกราฟ calibration curve สารละลายมาตรฐานวิตามิน และสารละลายมาตรฐานวิตามินที่มีการ spike น้ำผักและผลไม้ พบว่าผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสมการเส้นตรงมีค่าใกล้เคียงกัน ส่งผลให้เส้นตรงทั้งสองเส้นขนานกัน ซึ่งบ่งบอกถึงวิธีที่พัฒนาขึ้นมี specificity และ accuracy สำหรับการนำมาวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในน้ำผักและผลไม้

### 3.1.2. ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (Linearity and range)

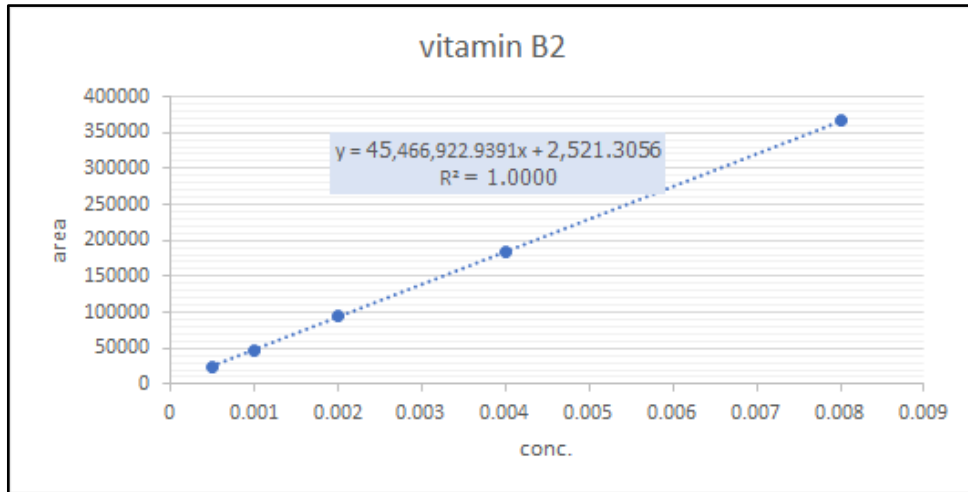
#### 3.1.2.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน

##### 3.1.2.1.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1



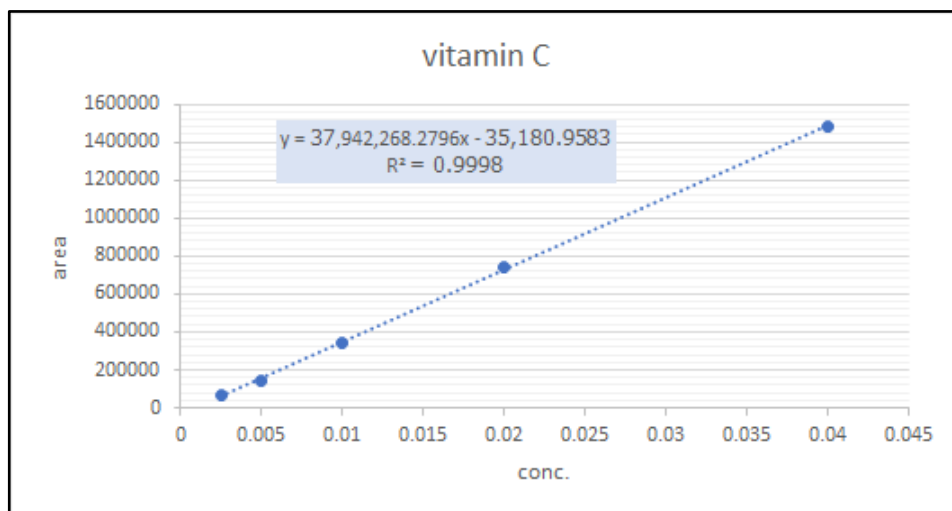
รูปที่ 13 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1

## 3.1.2.1.2. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2



รูปที่ 14 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2

## 3.1.2.1.3. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน C



รูปที่ 15 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C

จากการพลอตกราฟ calibration curve ระหว่างความเข้มข้นของวิตามินและ peak area เพื่อหาค่า  $R^2$  ของสมการเส้นตรง ซึ่งค่า  $R^2$  ที่สามารถยอมรับได้คือ  $R^2 \geq 0.995$  ซึ่งค่า  $R^2$  ที่วัดได้ของวิตามิน B1, B2 และ C เท่ากับ 0.9984, 1.0000 และ 0.9998 ตามลำดับ

### 3.1.3. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

#### 3.1.3.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0001- 0.002 mg/mL มีค่า % Recovery ดังนี้

ตารางที่ 7 %Recovery สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1

| ความเข้มข้น (mg/mL) | % Recovery |
|---------------------|------------|
| 0.0001              | 83.4195    |
| 0.0005              | 102.5106   |
| 0.002               | 119.5801   |

#### 3.1.3.2. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0005-0.008 mg/mL มีค่า % Recovery ดังนี้

ตารางที่ 8 %Recovery สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2

| ความเข้มข้น (mg/mL) | % Recovery |
|---------------------|------------|
| 0.0005              | 135.5839   |
| 0.002               | 115.5332   |
| 0.008               | 125.4075   |

### 3.1.3.3. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน C

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0005-0.002 mg/mL มีค่า % Recovery ดังนี้

ตารางที่ 9 %Recovery สารละลายมาตรฐานวิตามิน C

| ความเข้มข้น (mg/mL) | % Recovery |
|---------------------|------------|
| 0.002               | 102.5342   |
| 0.01                | 102.0919   |
| 0.04                | 98.2970    |

### 3.1.4. ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

#### 3.1.4.1. ใช้วิธีการทดสอบซ้ำ (Repeatability)

##### 3.1.4.1.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0001- 0.002 mg/mL นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ % RSD ดังนี้

ตารางที่ 10 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | % RSD  |
|---------------------|-------------|--------|
| 0.0001              | 0.000004479 | 3.0129 |
| 0.0005              | 0.000033042 | 6.8557 |
| 0.002               | 0.000037588 | 1.8497 |

## 3.1.4.1.2. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0005-0.008 mg/mL นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ % RSD ดังนี้

ตารางที่ 11 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD         | % RSD  |
|---------------------|------------|--------|
| 0.0005              | 0.00000997 | 2.0547 |
| 0.002               | 0.00002017 | 0.9956 |
| 0.008               | 0.00004412 | 0.5517 |

## 3.1.4.1.3. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน C

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0005-0.002 mg/mL นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ % RSD ดังนี้

ตารางที่ 12 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน C

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD         | % RSD  |
|---------------------|------------|--------|
| 0.002               | 0.00003240 | 2.1088 |
| 0.01                | 0.00007867 | 0.8886 |
| 0.04                | 0.00019760 | 0.5051 |

## 3.1.4.2. Intermediate precision

## 3.1.4.2.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0001-0.002 mg/mL ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ %RSD ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 13 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | %RSD   |
|---------------------|-------------|--------|
| 0.0001              | 0.000013873 | 9.1039 |
| 0.0005              | 0.000038395 | 8.0464 |
| 0.002               | 0.000045778 | 2.2572 |

## 3.1.4.2.2. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0005-0.008 mg/mL ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ %RSD ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 14 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน B2

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | %RSD   |
|---------------------|-------------|--------|
| 0.0005              | 0.000032158 | 6.1559 |
| 0.002               | 0.000033119 | 1.6564 |
| 0.008               | 0.000035384 | 0.4415 |

### 3.1.4.3. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน C

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0005-0.04 mg/mL ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ %RSD ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 15 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามิน C

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | %RSD    |
|---------------------|-------------|---------|
| 0.0025              | 0.000462178 | 21.0106 |
| 0.01                | 0.000694140 | 7.1704  |
| 0.04                | 0.000496283 | 1.2531  |

### 3.1.5. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Limit of detection)

ตารางที่ 16 LOD สารละลายมาตรฐานวิตามิน

| วิตามิน | LOD ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------|--------------------------|
| B1      | 0.094493                 |
| B2      | 0.192236                 |
| C       | 0.446808                 |

### 3.1.6. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดเชิงปริมาณได้ (Limit of quantitation)

ตารางที่ 17 LOQ สารละลายมาตรฐานวิตามิน

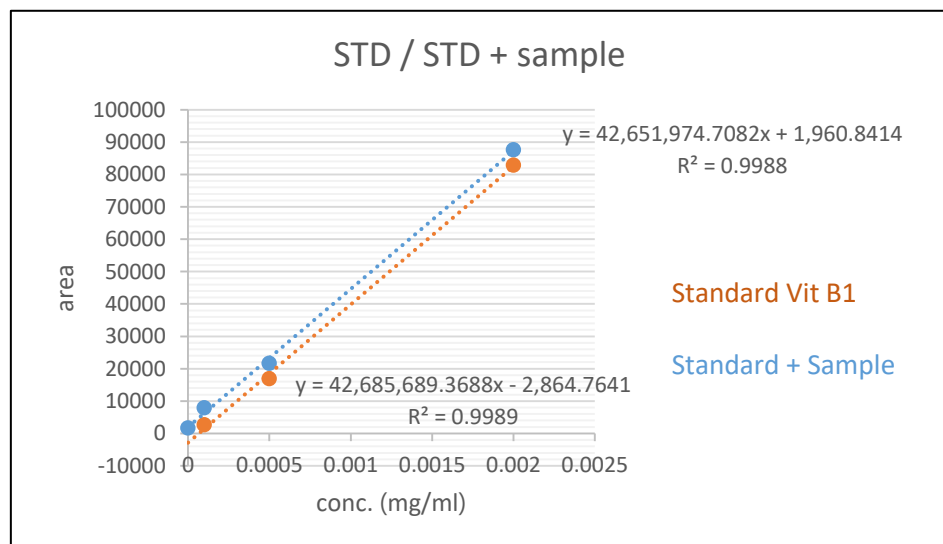
| วิตามิน | LOQ (µg/mL) |
|---------|-------------|
| B1      | 0.286342    |
| B2      | 0.582535    |
| C       | 1.353963    |

## 3.2. Gradient elution

### 3.2.1. ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์

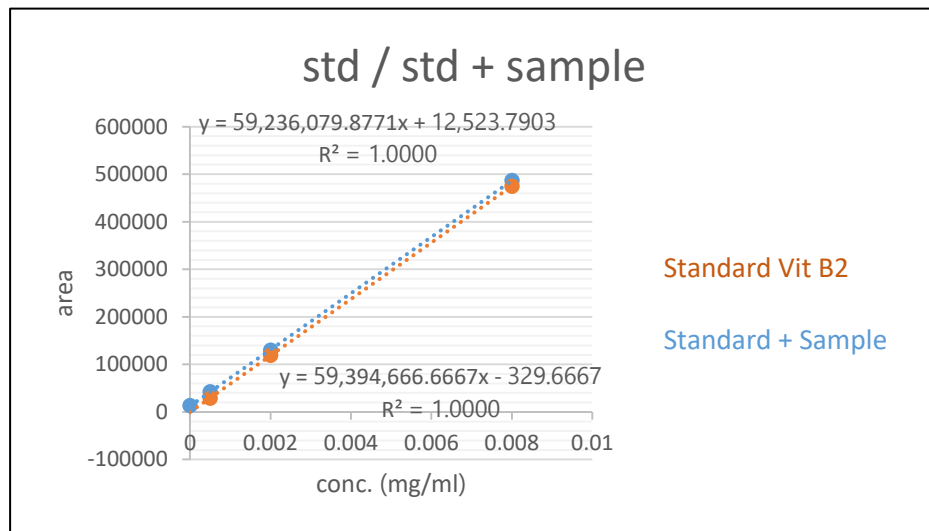
#### 3.2.1.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

##### 3.2.1.1.1. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1



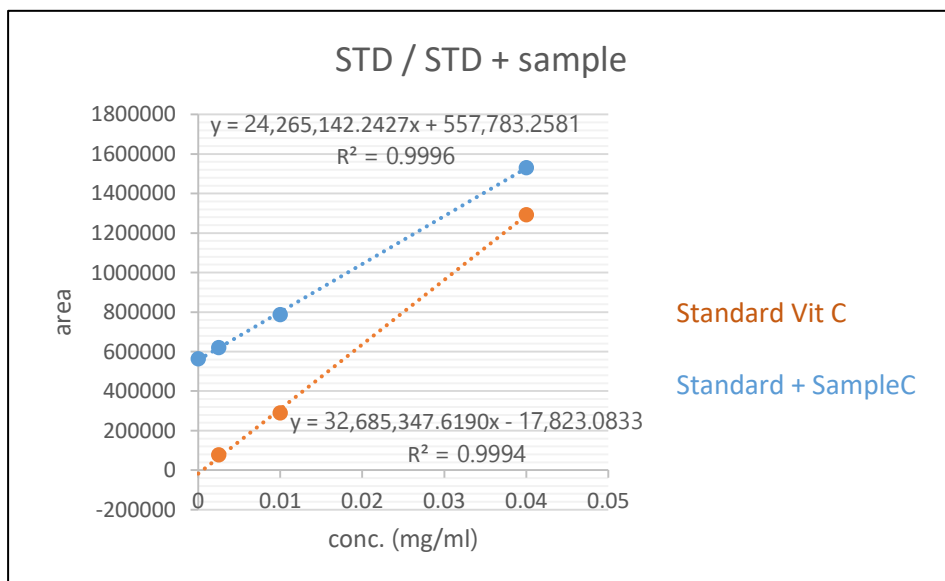
รูปที่ 16 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1

## 3.2.1.1.2. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2



รูปที่ 17 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

## 3.2.1.1.3. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C



รูปที่ 18 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C

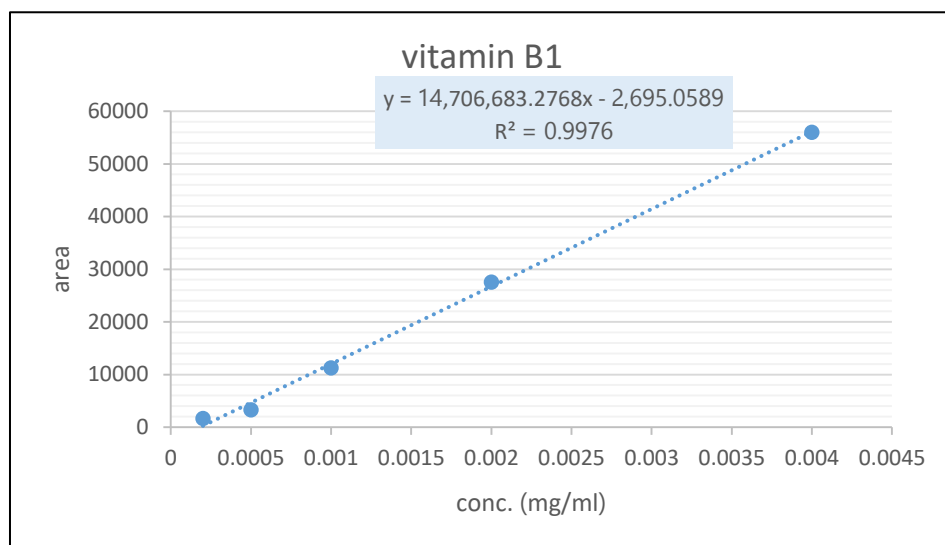
จากผลการวิเคราะห์เมื่อ spike น้ำผักและผลไม้ปริมาณคงที่ลงในสารละลายมาตรฐานวิตามิน และนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาพลอตกราฟ calibration curve ระหว่างความเข้มข้น

กับ peak area จะส่งผลให้ peak area ของสารละลายมาตรฐานเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกราฟ calibration curve สารละลายมาตรฐานวิตามิน และสารละลายมาตรฐานวิตามินที่มีการ spike น้ำผักและผลไม้ พบว่าผลการวิเคราะห์ความชันของสมการเส้นตรงมีค่าใกล้เคียงกัน ส่งผลให้เส้นตรงทั้งสองเส้นขนานกัน ซึ่งบ่งบอกถึงวิธีที่พัฒนาขึ้นมี specificity และ accuracy สำหรับการนำมาวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในน้ำผักและผลไม้

### 3.2.3. ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (Linearity and range)

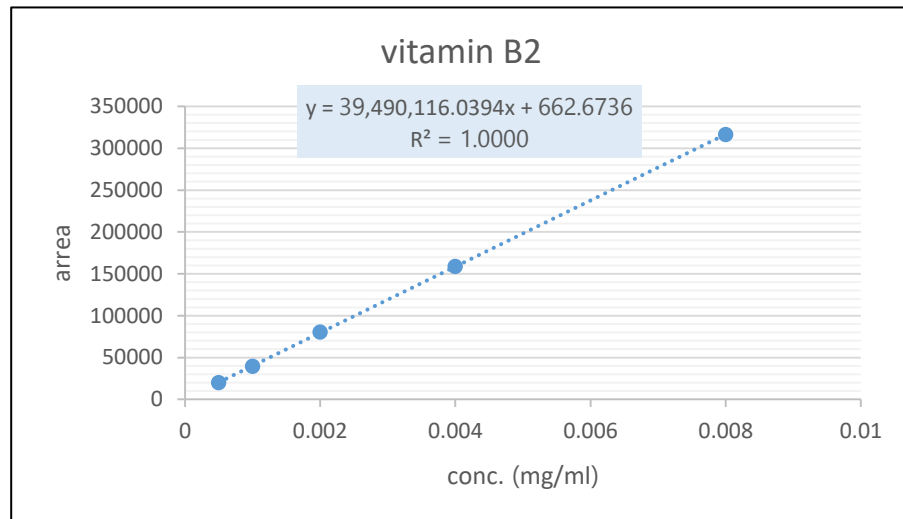
#### 3.2.3.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

##### 3.2.3.1.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1



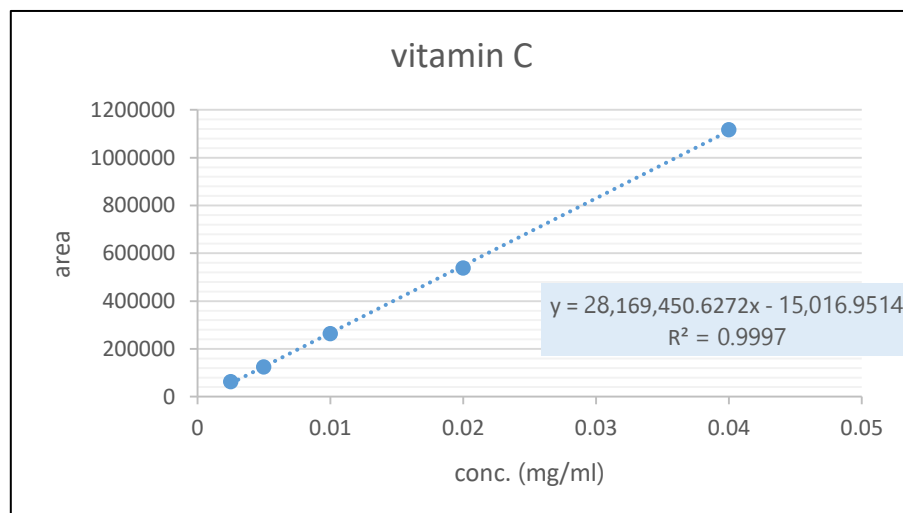
รูปที่ 19 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1

## 3.2.3.1.2. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2



รูปที่ 20 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

## 3.2.3.1.3. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C



รูปที่ 21 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C

จากการพลอตกราฟ calibration curve ระหว่างความเข้มข้นของวิตามินและ Peak area เพื่อหาค่า  $R^2$  ของสมการเส้นตรง ซึ่งค่า  $R^2$  ที่สามารถยอมรับได้คือ  $R^2 \geq 0.995$  ซึ่งค่า  $R^2$  ที่วัดได้

เมื่อรวมโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1, B2 และ C เท่ากับ 0.9976, 1.0000 และ 0.9997 ตามลำดับ

### 3.2.4. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

#### 3.2.4.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 มีค่า % Recovery ดังนี้

ตารางที่ 18 %Recovery สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1

| ความเข้มข้น (mg/mL) | % Recovery |
|---------------------|------------|
| 0.0002              | 143.3084   |
| 0.001               | 92.1185    |
| 0.004               | 99.3031    |

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2 มีค่า % Recovery ดังนี้

ตารางที่ 19 %Recovery สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

| ความเข้มข้น (mg/ml) | % Recovery |
|---------------------|------------|
| 0.0005              | 96.4973    |
| 0.002               | 97.4859    |
| 0.008               | 99.4958    |

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C มีค่า %Recovery ดังนี้

ตารางที่ 20 %Recovery สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C

| ความเข้มข้น (mg/ml) | % Recovery |
|---------------------|------------|
| 0.002               | 67.2019    |
| 0.01                | 66.7657    |
| 0.04                | 72.4501    |

### 3.2.5. ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

#### 3.2.5.1. ใช้วิธีการทดสอบซ้ำ (Repeatability)

##### 3.2.5.1.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0001- 0.002 mg/mL นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ % RSD ดังนี้

ตารางที่ 21 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | % RSD  |
|---------------------|-------------|--------|
| 0.0001              | 0.000023544 | 7.1528 |
| 0.0005              | 0.000083772 | 8.4903 |
| 0.002               | 0.000087971 | 2.1604 |

## 3.2.5.1.2. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลาย  
มาตรฐานวิตามินรวม B2 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3  
ความเข้มข้น 0.0005-0.008 mg/mL นำค่าที่ได้จาก  
กราฟมาคำนวณหาค่า SD และ % RSD ดังนี้

ตารางที่ 22 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD         | % RSD  |
|---------------------|------------|--------|
| 0.0005              | 0.00000977 | 1.9743 |
| 0.002               | 0.00003566 | 1.7613 |
| 0.008               | 0.00017499 | 2.1886 |

## 3.2.5.1.3. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C

จากการพลอตกราฟ Calibration Curve ของ  
สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C โดยใช้ช่วงความ  
เข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0005-0.002 mg/mL นำค่าที่  
ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ % RSD ดังนี้

ตารางที่ 23 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD         | % RSD  |
|---------------------|------------|--------|
| 0.002               | 0.00008550 | 3.3911 |
| 0.01                | 0.00073506 | 7.6835 |
| 0.04                | 0.00049287 | 1.2441 |

## 3.2.5.2. Intermediate precision

## 3.2.5.2.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0001-0.002 mg/mL ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ %RSD ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 24 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | %RSD    |
|---------------------|-------------|---------|
| 0.0002              | 0.000022778 | 7.0816  |
| 0.001               | 0.000140378 | 14.8508 |
| 0.004               | 0.004350086 | 11.8567 |

## 3.2.5.2.2. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0005-0.008 mg/mL ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ %RSD ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 25 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | %RSD   |
|---------------------|-------------|--------|
| 0.0005              | 0.000496661 | 4.7334 |
| 0.002               | 0.002015170 | 2.8203 |

|       |             |        |
|-------|-------------|--------|
| 0.008 | 0.008011201 | 3.3438 |
|-------|-------------|--------|

### 3.2.5.2.3. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0005-0.04 mg/mL ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ %RSD ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 26 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | %RSD   |
|---------------------|-------------|--------|
| 0.0025              | 0.000275438 | 9.7865 |
| 0.01                | 0.009876655 | 7.3913 |
| 0.04                | 0.040061194 | 8.0374 |

### 3.2.6. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Limit of detection)

ตารางที่ 27 LOD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

| วิตามิน | LOD ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------|--------------------------|
| B1      | 0.122832                 |
| B2      | 1.690308                 |
| C       | 2.795974                 |

### 3.2.7. ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดเชิงปริมาณได้ (Limit of quantitation)

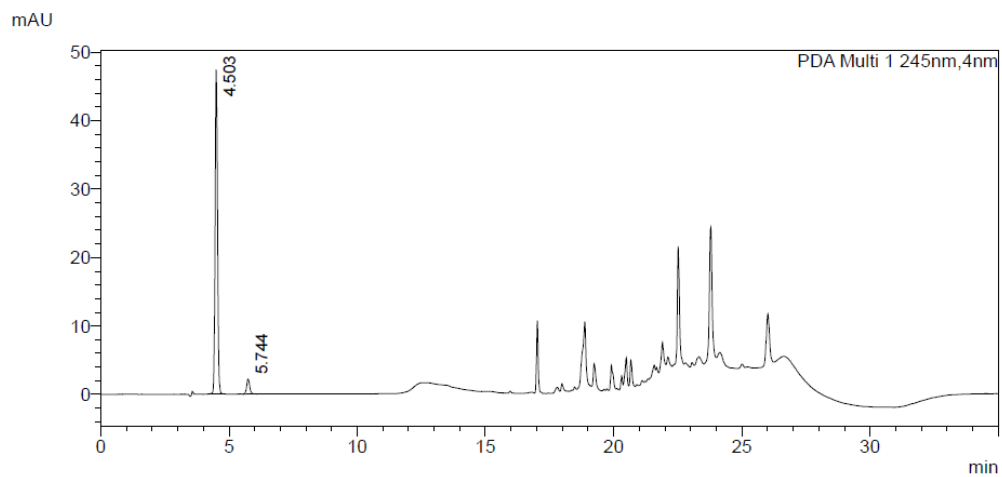
ตารางที่ 28 LOQ สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

| วิตามิน | LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------|--------------------------|
| B1      | 0.372220                 |
| B2      | 5.122146                 |
| C       | 8.472648                 |

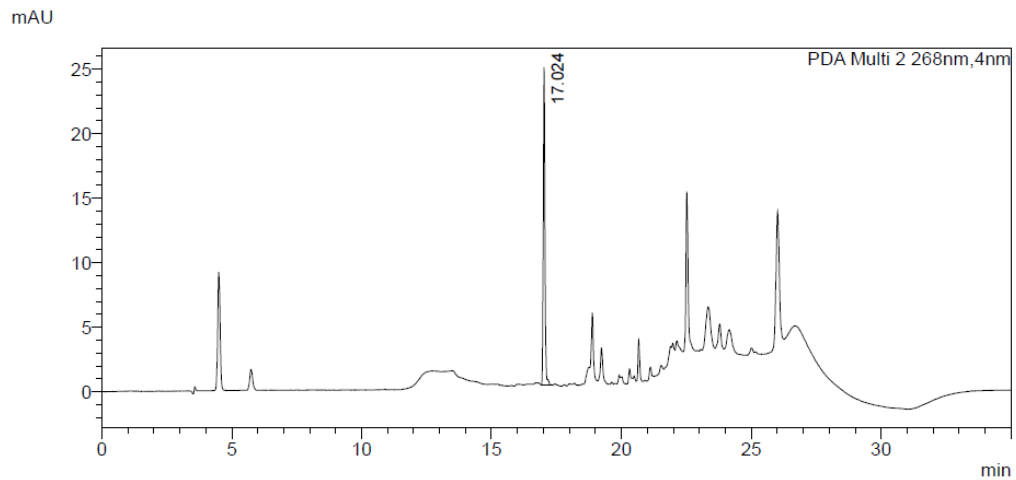
### 3.2.8. ความคงทนของวิธีการทดสอบ (Robustness)

3.2.8.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่เปลี่ยน pH ของ mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์จาก pH 2.90 เป็น 2.70

#### 3.2.8.1.1. Retention time



รูปที่ 22 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 245 nm

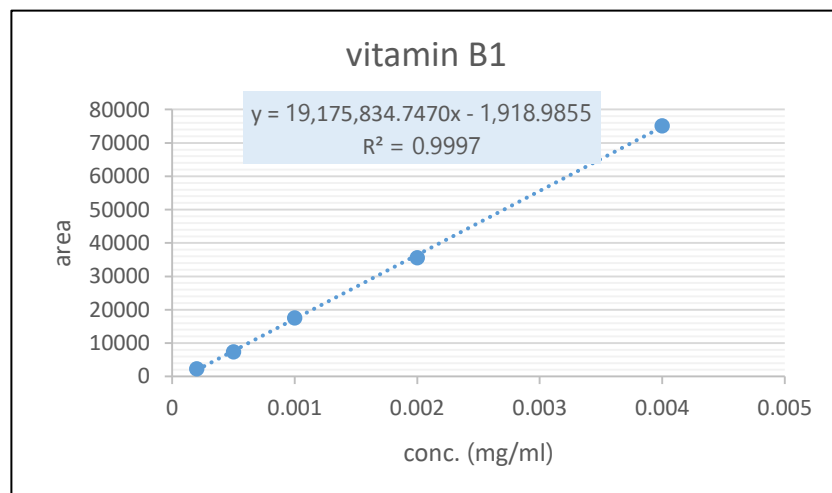


รูปที่ 23 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐานที่มีความยาวคลื่น 268 nm

ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่เปลี่ยน pH ของ mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์จาก pH 2.90 เป็น 2.70 ค่า Retention time ที่ได้ของวิตามิน B1, B2 และ C เท่ากับ 5.744, 17.024 และ 4.503 นาที ตามลำดับ

3.2.8.1.2. ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (Linearity and range)

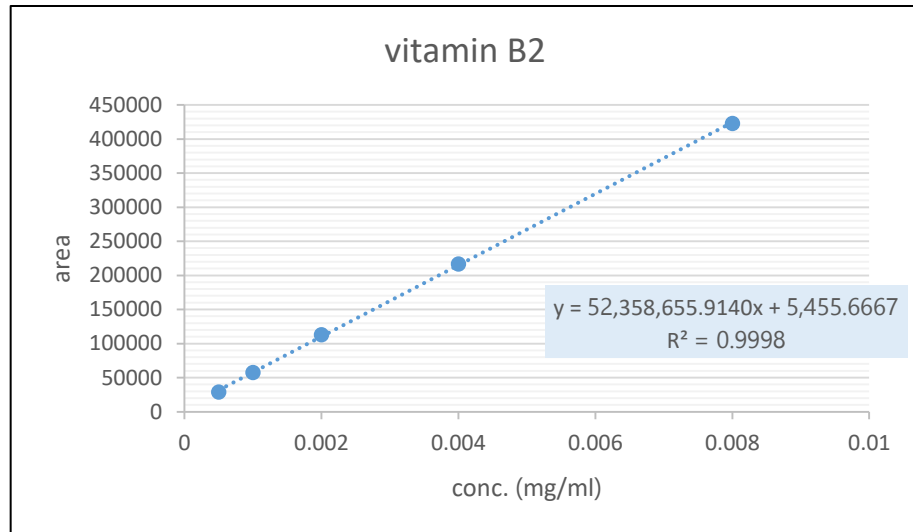
3.2.8.1.2.1. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1



รูปที่ 24 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1

## 3.2.8.1.2.2. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน

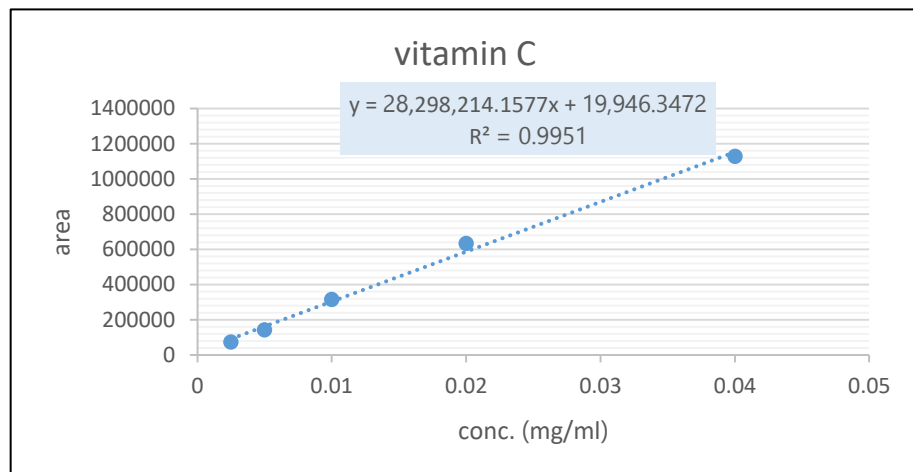
รวม B2



รูปที่ 25 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

## 3.2.8.1.2.3. ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามิน

รวม B1



รูปที่ 26 กราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

## 3.2.8.1.3. Repeatability

## 3.2.8.1.3.1. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0001- 0.002 mg/mL นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ % RSD ดังนี้

ตารางที่ 29 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | % RSD  |
|---------------------|-------------|--------|
| 0.0001              | 0.000008905 | 4.0038 |
| 0.0005              | 0.000021769 | 2.1443 |
| 0.002               | 0.000084391 | 2.1003 |

## 3.2.8.1.3.2. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2 โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.0005- 0.008 mg/mL นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ % RSD ดังนี้

ตารางที่ 30 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | % RSD  |
|---------------------|-------------|--------|
| 0.0005              | 0.000009651 | 2.1760 |
| 0.002               | 0.000013199 | 0.6437 |
| 0.008               | 0.000176962 | 2.2197 |

### 3.2.8.1.3.3. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C

จากการพลอตกราฟ calibration curve ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น 0.002- 0.04 mg/mL นำค่าที่ได้จากกราฟมาคำนวณหาค่า SD และ % RSD ดังนี้

ตารางที่ 31 SD และ % RSD สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C

| ความเข้มข้น (mg/mL) | SD          | % RSD  |
|---------------------|-------------|--------|
| 0.002               | 0.000156742 | 8.3321 |
| 0.01                | 0.000286987 | 2.7493 |
| 0.04                | 0.000913527 | 2.3321 |

### 3.2.9. ความเหมาะสมของวิธีการทดสอบ (System Suitability Testing)

#### 3.2.9.1. Column efficacy

##### 3.2.9.1.1. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

ตารางที่ 32 Theoretical plate สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

| วิตามิน | Theoretical plate (N) |
|---------|-----------------------|
| B1      | 8,652.0438            |
| B2      | 642,610.8397          |
| C       | 30,473.8472           |

## 3.2.9.1.2. สารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้

ตารางที่ 33 Theoretical plate สารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้

| วิตามิน | Theoretical plate (N) |
|---------|-----------------------|
| B1      | 40,494.6662           |
| B2      | 1,520,257.9527        |
| C       | 43,626.3233           |

## 3.2.9.2. Resolution

## 3.2.9.2.1. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

3.2.9.2.1.1. ระหว่างวิตามิน B1 และ C เท่ากับ 0.95

3.2.9.2.1.2. ระหว่างวิตามิน B2 และสารที่ใกล้ที่สุด เท่ากับ  
3.216

## 3.2.9.2.2. สารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้

3.2.9.2.2.1. ระหว่างวิตามิน B1 และ C เท่ากับ 0.903

3.2.9.2.2.2. ระหว่างวิตามิน B2 และสารที่ใกล้ที่สุด เท่ากับ  
1.77

## 3.2.9.3. Symmetry factor

## 3.2.9.3.1. สารละลายมาตรฐานวิตามินรวม

3.2.9.3.1.1. วิตามิน B1 เท่ากับ 1.73

3.2.9.3.1.2. วิตามิน B2 เท่ากับ 0.981

3.2.9.3.1.3. วิตามิน C เท่ากับ 1.137

## 3.2.9.3.2. สารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้

3.2.9.3.2.1. วิตามิน B1 เท่ากับ 2.2

3.2.9.3.2.2. วิตามิน B2 เท่ากับ 1.47

## 3.2.9.3.2.3. วิตามิน C เท่ากับ 1.25

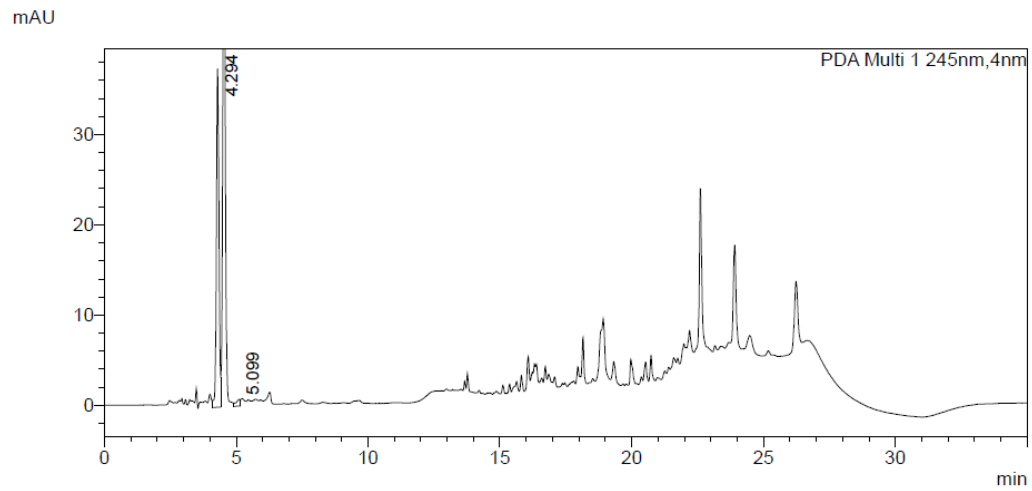
## 4. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป

## 4.1. ตัวอย่างน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป

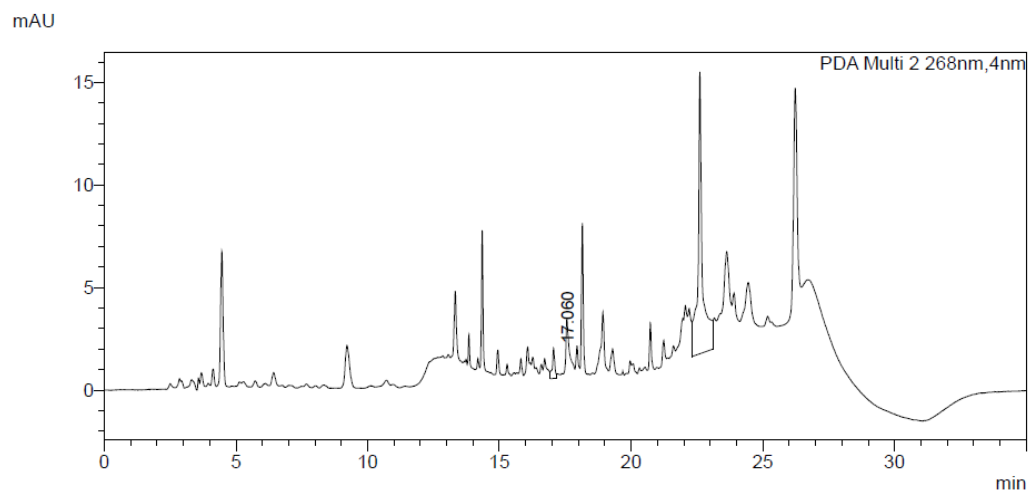
ตารางที่ 34 ตัวอย่างน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูป

| บริษัทน้ำผัก<br>และผลไม้ | %RDI<br>B1 | ความเข้มข้น<br>(mg/mL) | %RDI<br>B2 | ความเข้มข้น<br>(mg/mL) | %RDI<br>C | ความเข้มข้น<br>(mg/mL) |
|--------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|-----------|------------------------|
| A                        | 25         | 0.001875               | 25         | 0.002125               | 80        | 0.24                   |
| B                        | 30         | 0.00225                | 30         | 0.00255                | 50        | 0.15                   |
| C                        | 20         | 0.001                  | 20         | 0.001133               | 160       | 0.32                   |

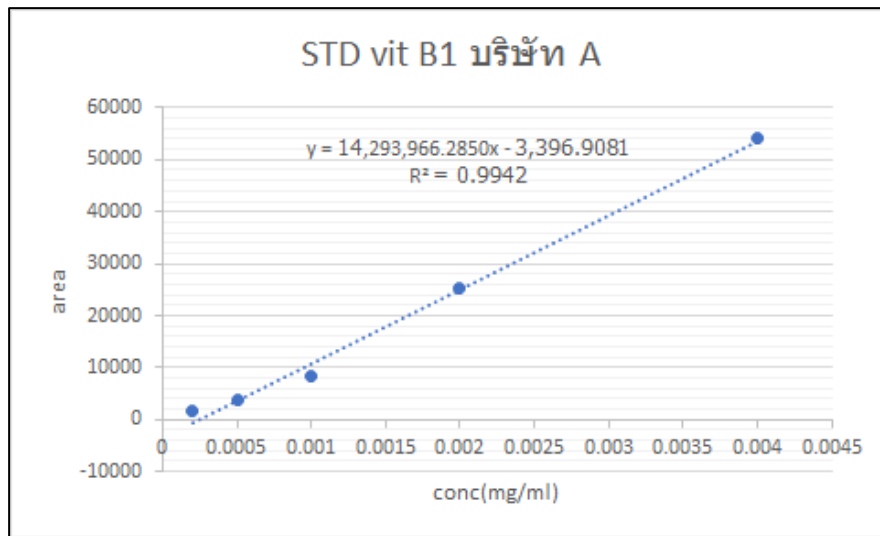
#### 4.2. ผลการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้บริษัท A



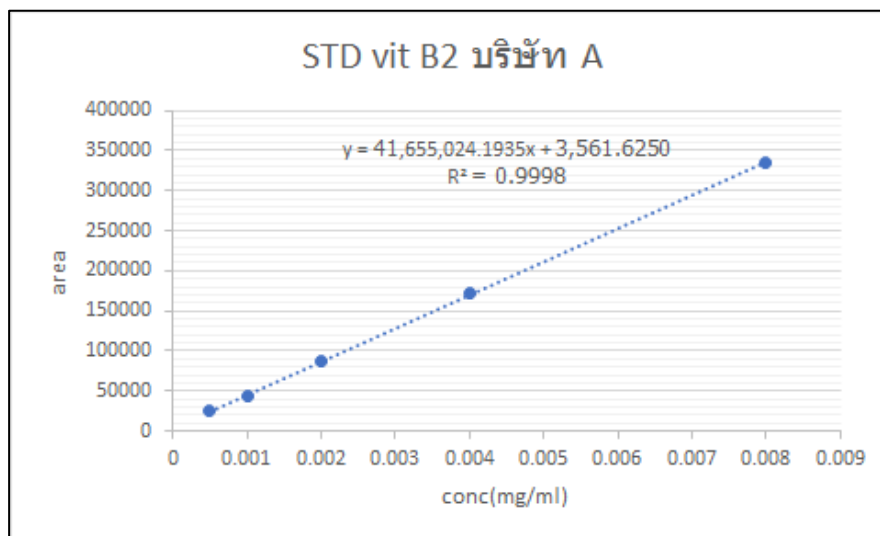
รูปที่ 27 Chromatogram สารละลายตัวอย่างบริษัท A ที่ความยาวคลื่น 245 nm



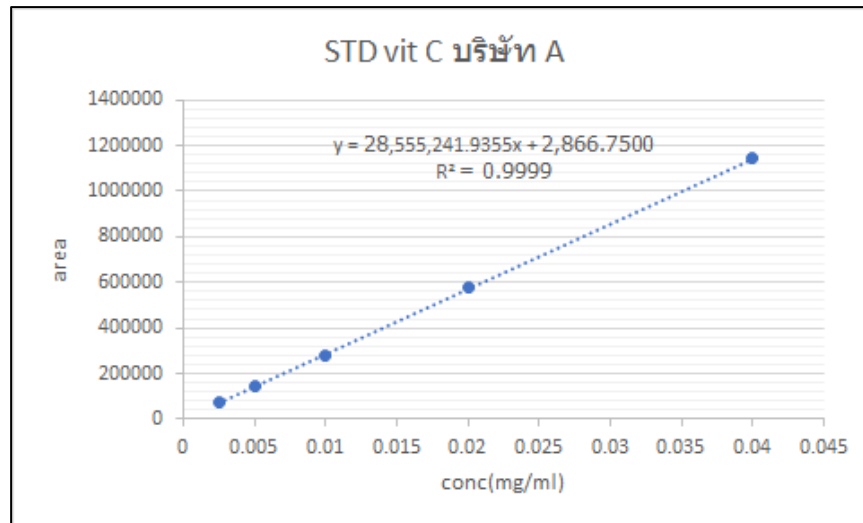
รูปที่ 28 Chromatogram สารละลายตัวอย่างบริษัท A ที่ความยาวคลื่น 268 nm



รูปที่ 29 กราฟ calibration curve ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B1 บริษัท A



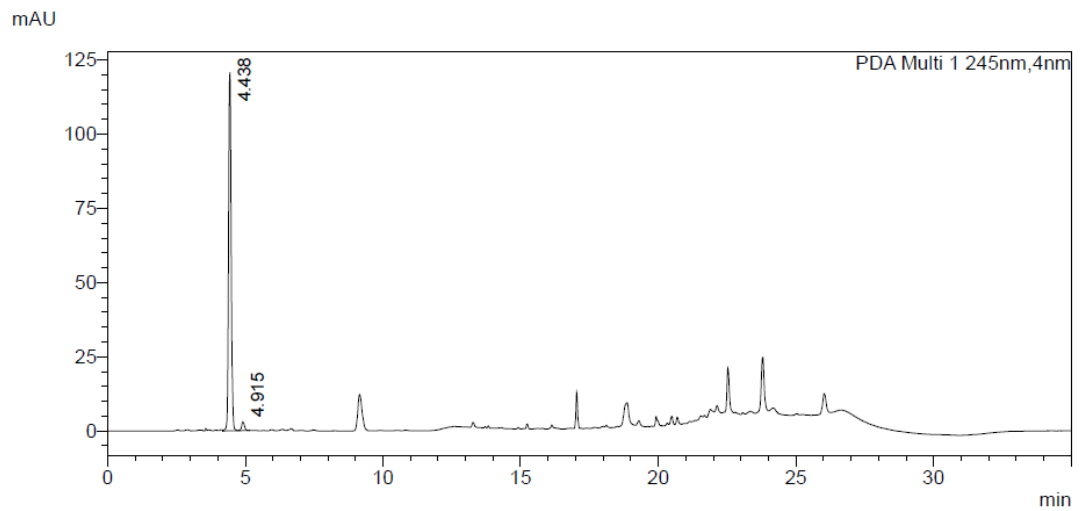
รูปที่ 30 กราฟ calibration curve ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B2 บริษัท A



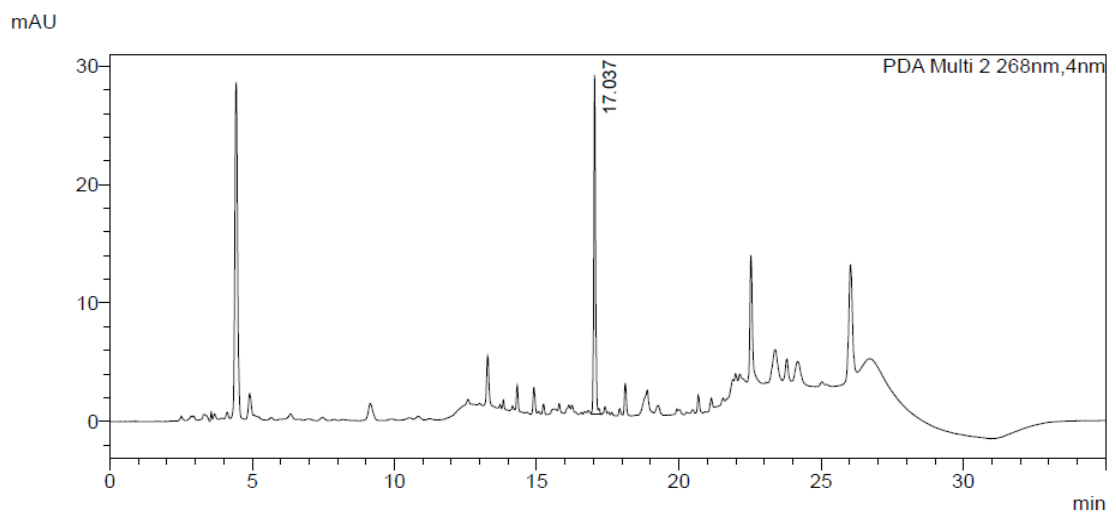
รูปที่ 31 กราฟ calibration curve ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน C บริษัท A

จากการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในสารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้ของบริษัท A พบว่าวิตามิน B1, B2 และ C มี retention time เท่ากับ 5.099, 17.060 และ 4.249 นาที และเมื่อนำค่า peak area ที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณกับสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ standard curve เพื่อหาปริมาณวิตามินที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งปริมาณวิตามิน B1 B2 และ C ที่คำนวณได้ คือ 0.00040 mg/mL (0.7960 mg), 0.00012 mg/mL (0.0244 mg) และ 0.00661 mg/mL (13.2253 mg) ตามลำดับ

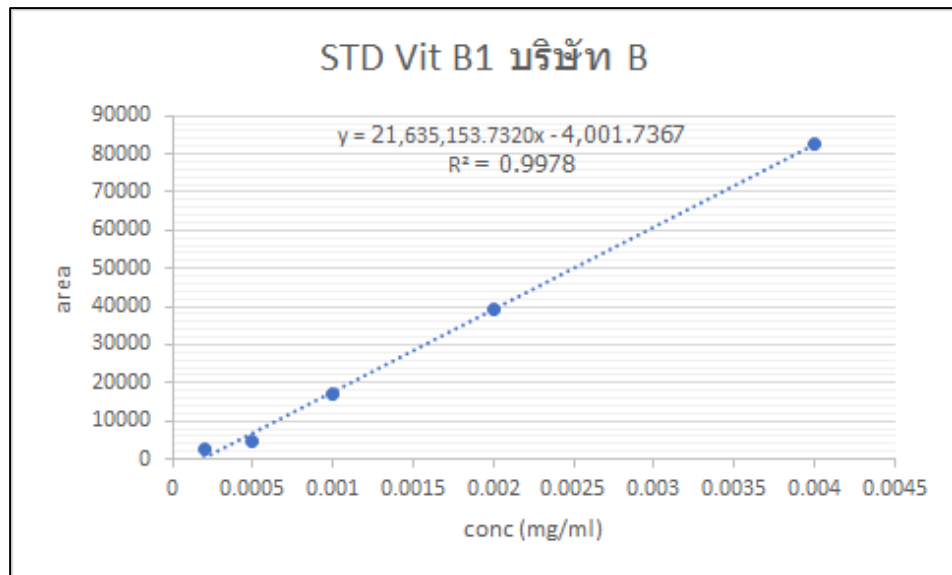
#### 4.3. ผลการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้บริษัท B



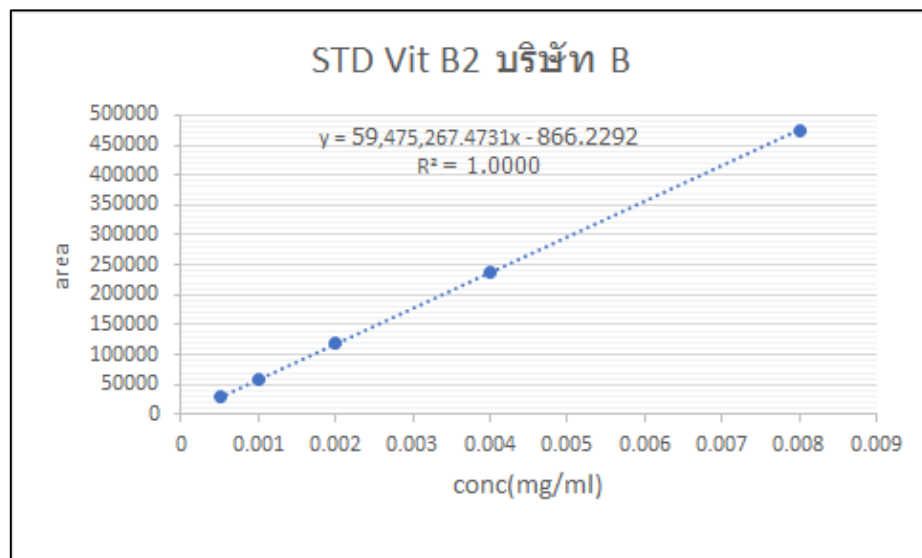
รูปที่ 32 Chromatogram สารละลายตัวอย่างบริษัท B ที่ความยาวคลื่น 245 nm



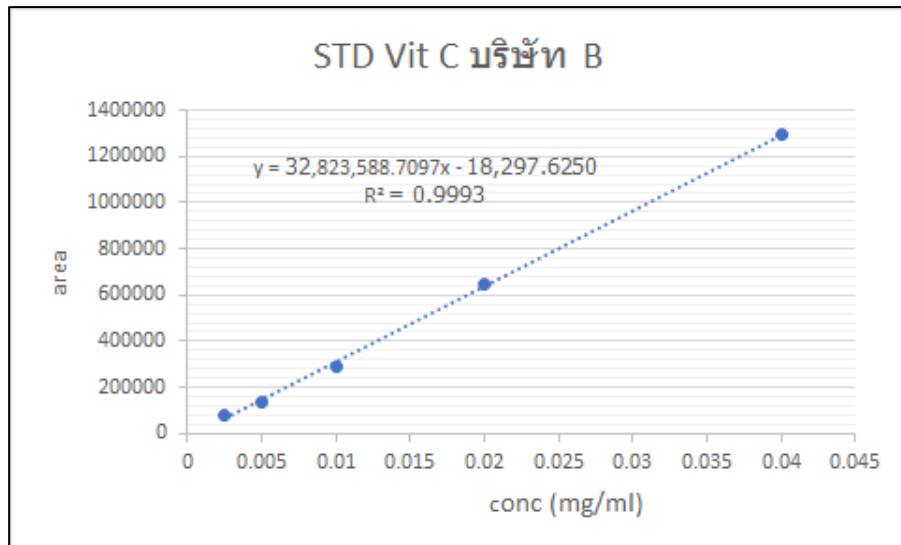
รูปที่ 33 Chromatogram สารละลายตัวอย่างบริษัท B ที่ความยาวคลื่น 268 nm



รูปที่ 34 กราฟ calibration curve ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B1 บริษัท B



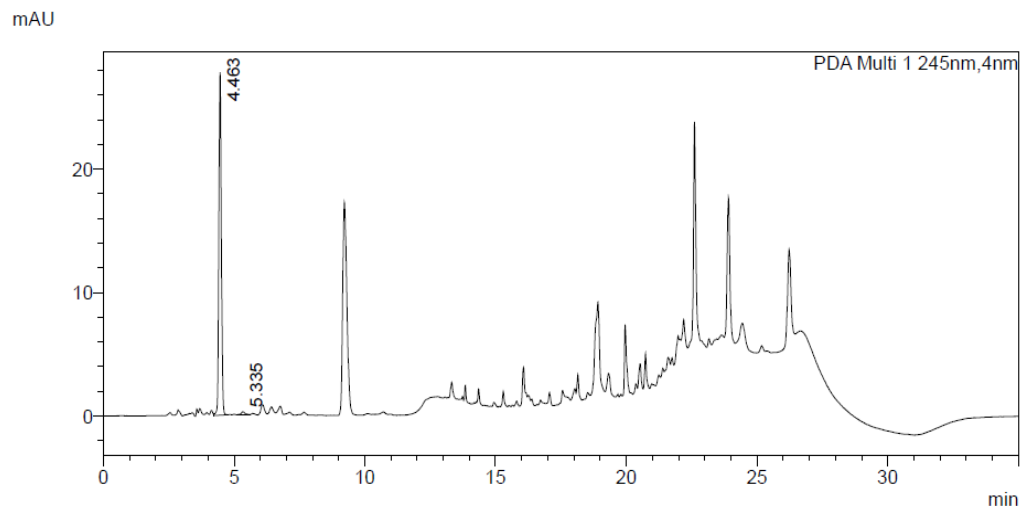
รูปที่ 35 กราฟ calibration curve ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B2 บริษัท B



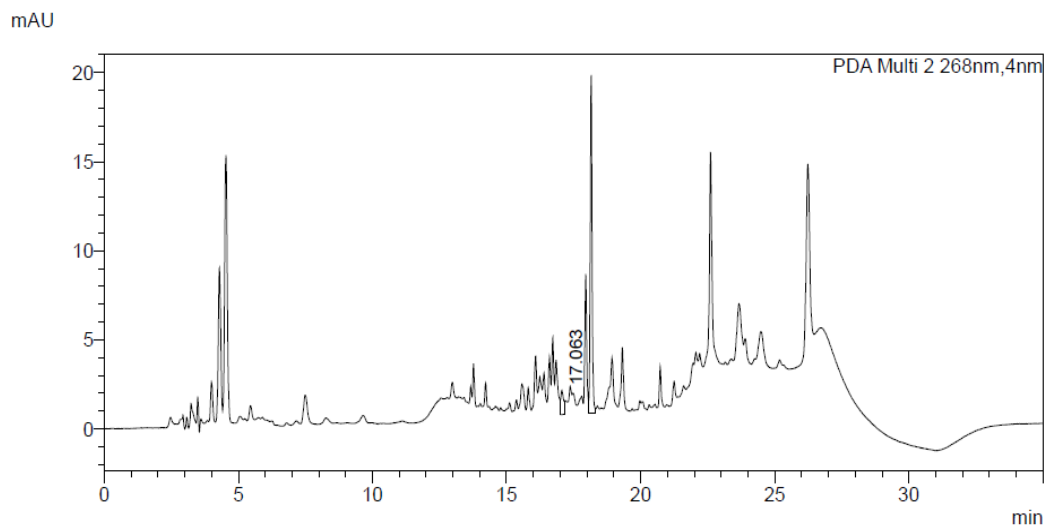
รูปที่ 36 กราฟ calibration curve ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน C บริษัท B

จากการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในสารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้ของบริษัท B พบว่าวิตามิน B1, B2 และ C มี retention time เท่ากับ 4.915, 17.037 และ 4.438 นาที และเมื่อนำค่า peak area ที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณกับสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ standard curve เพื่อหาปริมาณวิตามินที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งปริมาณวิตามิน B1 B2 และ C ที่คำนวณได้ คือ 0.00026 mg/mL (0.5241 mg), 0.00024 mg/mL (0.4847 mg) และ 0.01777 mg/mL (35.5402 mg) ตามลำดับ

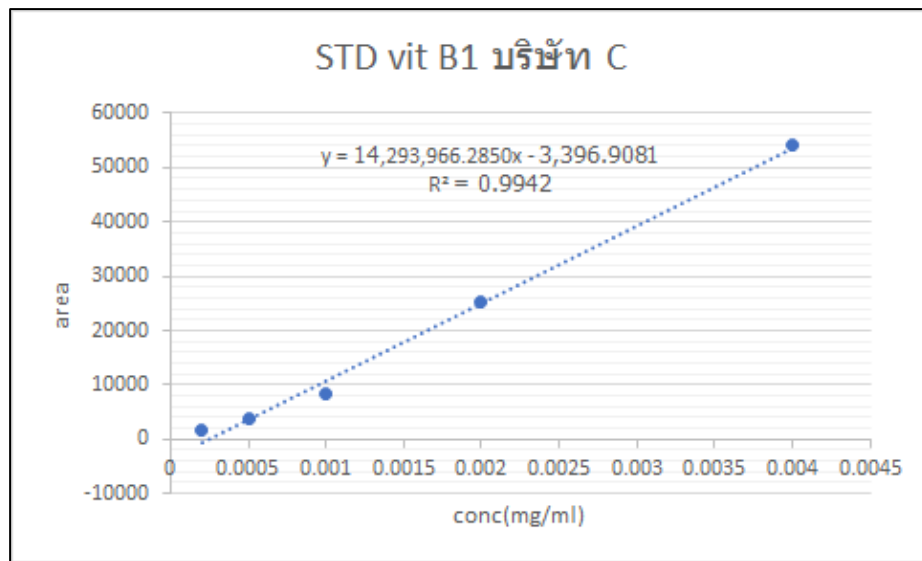
#### 4.4. ผลการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้บริษัท C



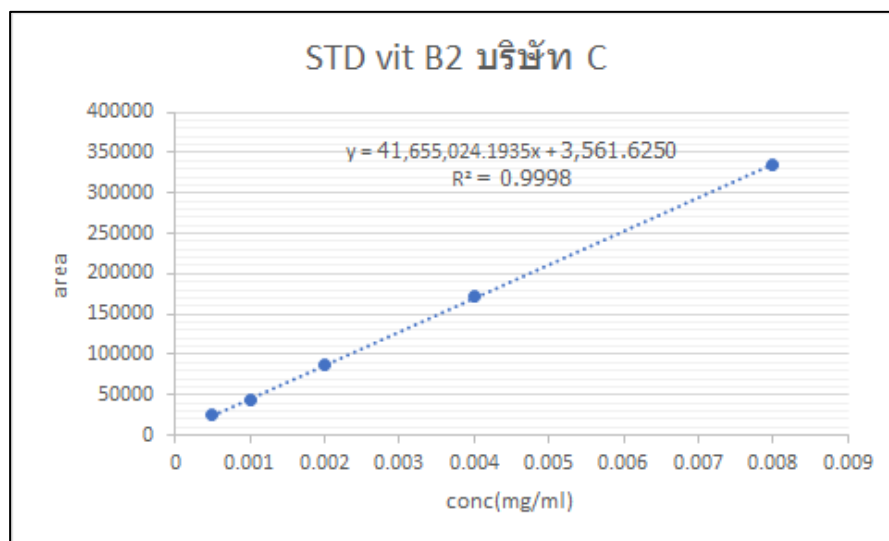
รูปที่ 37 Chromatogram สารละลายตัวอย่างบริษัท C ที่ความยาวคลื่น 245 nm



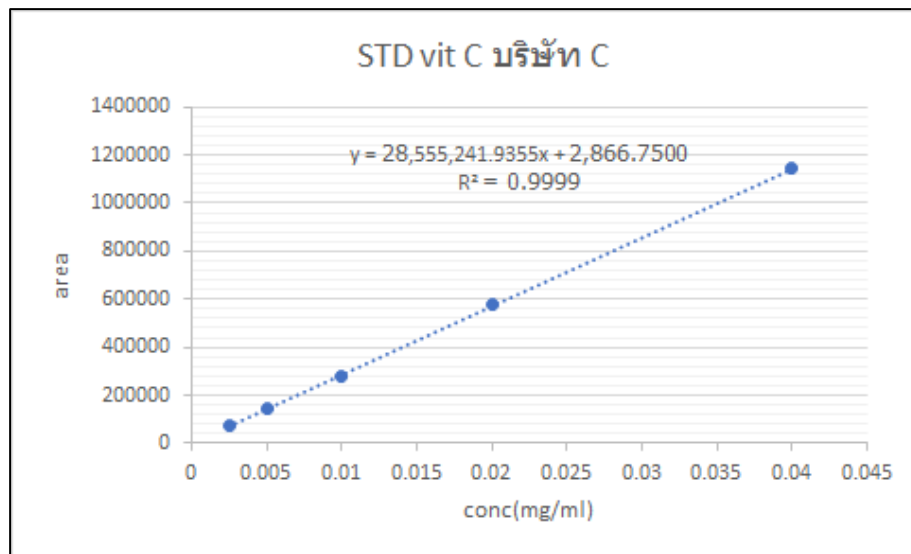
รูปที่ 38 Chromatogram สารละลายตัวอย่างบริษัท C ที่ความยาวคลื่น 268 nm



รูปที่ 39 กราฟ calibration curve ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B1 บริษัท C



รูปที่ 40 กราฟ calibration curve ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน B2 บริษัท C



รูปที่ 41 กราฟ calibration curve ของสารละลายตัวอย่างวิตามิน C บริษัท C

จากการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในสารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้ของบริษัท C พบว่าวิตามิน B1, B2 และ C มี retention time เท่ากับ 5.335, 17.063 และ 4.463 นาที และเมื่อนำค่า peak area ที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณกับสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ standard curve เพื่อหาปริมาณวิตามินที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งปริมาณวิตามิน B1 B2 และ C ที่คำนวณได้ คือ 0.00076 mg/mL (2.2676 mg), 0.00011 mg/mL (0.3342 mg) และ 0.01341 mg/mL (40.2224 mg) ตามลำดับ

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการวิจัยการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำในน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำที่ทำการพัฒนาขึ้นผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดเชิงปริมาณได้ ความคงทนของวิธีการทดสอบ และความเหมาะสมของวิธีการทดสอบ

#### ผลของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของแต่ละวิตามิน (Isocratic elution)

จากผลความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ มีเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้อยู่ที่  $R^2 \geq 0.995$  (อ้างอิง AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation chemical Method for Dietary Supplements and Botanicals (6)) ค่า  $R^2$  ของสารละลายมาตรฐาน B1, B2 และ C คือ 0.9984 , 1.0000 และ 0.9998 ซึ่งทั้งหมดผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้

จากผลความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ มีเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของการเจือจางสารละลายมาตรฐาน ซึ่งวิตามิน B1 มีการเจือจางจาก 100% เป็น 1% มีช่วง%Recovery ที่ยอมรับได้คือ 92-105% วิตามิน B2 และ C มีการเจือจางจาก 100% เป็น 10% มีช่วง%Recovery ที่ยอมรับได้คือ 95-102% (อ้างอิง AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation chemical Method for Dietary Supplements and Botanicals (6))

ผล %Recovery ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 ที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.0005 และ 0.002 mg/mL คือ 83.4195% , 102.5106% และ 119.5801% พบว่าที่ความเข้มข้น 0.0001

และ 0.002 mg/mL ไม่อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน แต่ที่ความเข้มข้น 0.0005 mg/mL อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

ผล %Recovery ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 ที่ความเข้มข้น 0.0005, 0.002 และ 0.008 mg/mL ที่ได้คือ 135.5839%, 115.5332% และ 125.4075% ซึ่งมี %Recovery มากกว่าเกณฑ์มาตรฐาน

ผล %Recovery ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C ที่ความเข้มข้น 0.002, 0.01 และ 0.04 mg/mL คือ 102.5342%, 102.0919% และ 98.2970% ซึ่งที่ความเข้มข้น 0.04 mg/mL อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน และความเข้มข้น 0.002 และ 0.01 mg/mL มี %Recovery มากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

จากผลความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้วิธีการทดสอบซ้ำและ intermediated precision มีเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของการเจือจางสารละลายมาตรฐาน ซึ่งวิตามิน B1 มีการเจือจางจาก 100% เป็น 1% มีช่วง %RSD ที่ยอมรับได้อยู่ที่ 2% วิตามิน B2 และ C มีการเจือจางจาก 100% เป็น 10% มีช่วง %RSD ที่ยอมรับได้อยู่ที่ 1.5% (อ้างอิง AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation chemical Method for Dietary Supplements and Botanicals (6))

ผล %RSD ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B1 ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.005 และ 0.002 mg/mL มี %RSD เท่ากับ 3.0129%, 6.8557% และ 1.8497% เมื่อทำ intermediated precision ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มี %RSD เท่ากับ 9.1039%, 8.0464% และ 2.2572% พบว่า %RSD ทั้งหมดมากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้นที่ความเข้มข้น 0.002 mg/mL อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

ผล %RSD ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน B2 ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.005 และ 0.002 mg/mL มี %RSD เท่ากับ 2.0547%, 0.9956% และ 0.5517% เมื่อทำ intermediated precision ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มี %RSD เท่ากับ 6.1559%, 1.6564% และ 0.4415% พบว่า %RSD ของวิธีการทดสอบซ้ำที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.002 mg/mL อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.001 mg/mL มากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน และ intermediate precision ที่ความเข้มข้น

0.002 mg/mL มี %RSD อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน และที่ความเข้มข้น 0.001 และ 0.005 mg/mL มี %RSD มากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

ผล %RSD ของสารละลายมาตรฐานวิตามิน C ที่ความเข้มข้น 0.0005, 0.002 และ 0.008 mg/ml มี %RSD เท่ากับ 2.1088%, 0.8886% และ 0.5051% เมื่อทำ intermediated precision ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มี %RSD เท่ากับ 21.0106%, 7.1704% และ 1.2531% พบว่า %RSD ของวิธีการทดสอบซ้ำที่ความเข้มข้น 0.002 และ 0.008 mg/mL อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.0005 mg/mL มากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน และเมื่อใช้วิธี intermediate precision ที่ความเข้มข้น 0.008 mg/mL มี %RSD อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน แต่ที่ความเข้มข้น 0.0005 และ 0.002 mg/mL มี %RSD มากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

ผลของปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ของวิตามิน B1, B2 และ C คือ 0.0945, 0.1922 และ 0.4468 µg/mL ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ

ผลของปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดเชิงปริมาณได้ของวิตามิน B1, B2 และ C คือ 0.2863, 0.5825 และ 1.3540 µg/mL ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบเชิงปริมาณได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ

ผลของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของแต่ละวิตามินรวม (Gradient)

จากผลความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ มีเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้อยู่ที่  $R^2 \geq 0.995$  (อ้างอิง AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation chemical Method for Dietary Supplements and Botanicals (6)) ค่า  $R^2$  ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1, B2 และ C คือ 0.9976, 1.0000 และ 0.9997 ซึ่งทั้งหมดผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้

จากผลความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ มีเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของการเจือจางสารละลายมาตรฐาน ซึ่งวิตามิน B1 มีการเจือจางจาก 100% เป็น 1% มีช่วง %Recovery ที่ยอมรับได้คือ 92-105% วิตามิน B2 และ C มีการเจือจางจาก 100% เป็น 10% มี

ช่วง %Recovery ที่ยอมรับได้คือ 95-102% (อ้างอิง AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation chemical Method for Dietary Supplements and Botanicals (6))

ผล %Recovery ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวมวิตามิน B1 ที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.0005 และ 0.002 mg/mL คือ 143.3084%, 92.1185% และ 99.3031% จะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 0.0005 และ 0.002 mg/mL อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน แต่ความเข้มข้น 0.0001 mg/mL มี %Recovery มากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

ผล %Recovery ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวมวิตามิน B2 ที่ความเข้มข้น 0.0005, 0.002 และ 0.008 mg/mL คือ 96.4973%, 97.4859% และ 99.4958% ทุกความเข้มข้นอยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

ผล %Recovery ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวมวิตามิน C ที่ความเข้มข้น 0.002, 0.01 และ 0.04 mg/mL คือ 67.2019%, 66.7657% และ 72.4501% ทุกความเข้มข้นอยู่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน

จะเห็นได้ว่า %Recovery มีทั้งต่ำกว่าและสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน อาจเกิดจากการชั่งสารเนื่องจากเครื่องชั่งที่ใช้ชั่งสารมีความไม่เที่ยงตรง ทำให้บางครั้งการชั่งน้ำหนักไม่เท่ากัน ในส่วนสารละลายมาตรฐานวิตามินรวมวิตามิน C มี %Recovery ต่ำที่สุด อาจเกิดจากการสลายตัวของวิตามินระหว่างการวิเคราะห์

จากผลความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้วิธีการทดสอบซ้ำและ intermediated precision มีเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของการเจือจางสารละลายมาตรฐาน ซึ่งวิตามิน B1 มีการเจือจางจาก 100% เป็น 1% มีช่วง %RSD ที่ยอมรับได้อยู่ที่ 2% วิตามิน B2 และ C มีการเจือจางจาก 100% เป็น 10% มีช่วง %RSD ที่ยอมรับได้อยู่ที่ 1.5% (อ้างอิง AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation chemical Method for Dietary Supplements and Botanicals (6))

ผล %RSD ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B1 ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.005 และ 0.002 mg/mL มี %RSD เท่ากับ 7.1528%, 8.4903% และ 2.1604% เมื่อทำ intermediated

precision ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มี %RSD เท่ากับ 7.0816%, 14.8508% และ 11.8567% พบว่า %RSD ทั้งหมดมากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

ผล %RSD ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม B2 ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.005 และ 0.002 mg/mL มี %RSD เท่ากับ 1.9743%, 1.7613% และ 2.1886% เมื่อทำ intermediated precision ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มี %RSD เท่ากับ 4.7334%, 2.8203% และ 3.3438% พบว่า %RSD ทั้งหมดมากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

ผล %RSD ของสารละลายมาตรฐานวิตามินรวม C ที่ความเข้มข้น 0.0005, 0.002 และ 0.008 mg/mL มี %RSD เท่ากับ 3.3911%, 7.6835% และ 1.2441% เมื่อทำ intermediated precision ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มี %RSD เท่ากับ 9.7865%, 7.3913% และ 8.0374% พบว่า %RSD ทั้งหมดมากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้นที่ความเข้มข้น 0.008 mg/ml ของวิธีทดสอบซ้ำ ที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

จาก %RSD ของสารละลายมาตรฐาน พบว่าส่วนใหญ่ค่า %RSD มากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่ง %RSD สัมพันธ์กับความเที่ยงตรงของวิธีการวิเคราะห์ ซึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดของการปิเปตสาร ทำให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไม่เท่ากัน หรือวิตามินเกิดการสลายตัวระหว่างการวิเคราะห์ ทำให้พื้นที่ใต้กราฟมีค่าลดลงจากความเป็นจริง หรือเกิดจากความคลาดเคลื่อนของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์แต่ละครั้งเนื่องจากอายุการใช้งานของ detector ที่ใกล้ครบอายุการใช้งาน จึงทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนจากค่าจริงได้ เนื่องจากพบว่าในขวดเดียวกันเมื่อทำการวิเคราะห์ซ้ำ พื้นที่ใต้กราฟที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงมากเช่นกัน

ผลของปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ของวิตามินรวม B1, B2 และ C คือ 0.1228, 1.6903 และ 2.7960  $\mu\text{g/mL}$

ผลของปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดเชิงปริมาณได้ของวิตามินรวม B1, B2 และ C คือ 0.3722, 5.1221 และ 8.4726  $\mu\text{g/mL}$

ผลของความคงทนของวิธีทดสอบ โดยการเปลี่ยน pH ของ mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์จาก pH 2.90 เป็น 2.70 ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ retention time และทดสอบซ้ำ

ค่า Retention time ที่ได้ของสารมาตรฐานวิตามินรวม B1, B2 และ C มีค่าเท่ากับ 5.744, 17.024 และ 4.503 นาที ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้เพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ pH 2.90

ผลของ Repeatability พบว่า %RSD ของสารละลายมาตรฐานของวิตามินรวม B1 ที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.0005 และ 0.002 mg/ml มี %RSD เท่ากับ 4.0038%, 2.1443% และ 2.1003% ซึ่งทุกความเข้มข้นมี %RSD มากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

ผล %RSD ของสารละลายมาตรฐานของวิตามินรวม B2 ที่ความเข้มข้น 0.0005, 0.002 และ 0.008 mg/ml มี %RSD เท่ากับ 2.1760%, 0.6437% และ 2.2197% ซึ่งที่ความเข้มข้น 0.002 mg/ml มี %RSD อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน และที่ความเข้มข้น 0.0005 และ 0.008 mg/mL มี %RSD มากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน

ผล %RSD ของสารละลายมาตรฐานของวิตามินรวม C ที่ความเข้มข้น 0.002, 0.01 และ 0.04 mg/ml มี %RSD คือ 8.3321%, 2.7493% และ 2.3321% พบว่ามี %RSD มากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งผล %RSD ส่วนใหญ่มีค่ามากกว่าช่วงเกณฑ์มาตรฐานเช่นเดียวกับก่อนปรับ pH

ผลของความเหมาะสมของวิธีการทดสอบ โดยมีหัวข้อที่ทดสอบคือ column efficacy, resolution และ symmetry factor

ผลของ column efficacy มีเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ คือ  $N \geq 2000$  (อ้างอิง CDER Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method (27)) สารละลายมาตรฐานวิตามิน B1, B2 และ C มีค่า Theoretical Plate (N) คือ 8652.0438, 42610.8397 และ 30473.8472 ตามลำดับ และค่า Theoretical Plate (N) ของสารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้ของวิตามิน B1, B2 และ C มีค่า Theoretical Plate (N) คือ 40494.6662, 1520257.9527 และ 43626.3233 ตามลำดับ

ผลของ Resolution มีเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ คือ  $R \geq 2.0$  (อ้างอิง CDER Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method (27)) สารละลายมาตรฐานระหว่างวิตามิน B1 และ C มีค่าเท่ากับ 0.95 ระหว่างวิตามิน B2 และสารที่ใกล้ที่สุด มีค่าเท่ากับ 3.216, สารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้ระหว่างวิตามิน B1 และ C มีค่าเท่ากับ 0.903 ระหว่างวิตามิน B2 และ

สารที่ใกล้ที่สุด มีค่าเท่ากับ 1.77 ซึ่ง ค่า R ที่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้นระหว่างสารละลายมาตรฐาน B2 และสารที่ใกล้ที่สุด

จากผลจะเห็นว่าวิตามิน C และ B1 ทั้งของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง น้ำผักและผลไม้มีค่า R ต่ำ เนื่องจากฐานของพีควิตามินที่แยกได้มีความกว้าง ทำให้เมื่อสิ้นสุดพีคของวิตามิน C แล้วตรวจพบฐานของพีควิตามิน B1 ทันที จึงทำให้ค่า R ต่ำ ในส่วนของสารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้ วิตามิน B2 และสารที่ใกล้ที่สุด มีค่า R ต่ำกว่าสารละลายมาตรฐาน เนื่องจากในน้ำผักและผลไม้มีสารอื่นเป็นส่วนประกอบมากกว่าสารมาตรฐาน วิธีการที่พัฒนาขึ้น จึงอาจไม่ดีพอในการแยกสาร

ผลของ symmetry factor มีเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ คือ tailing factor  $\leq 2.0$  (อ้างอิง CDER Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Method (27)) โดยค่า tailing factor ของสารละลายมาตรฐาน วิตามิน B1, B2 และ C มีค่าเท่ากับ 1.73, 0.981 และ 1.137 ตามลำดับ และสารละลายตัวอย่างน้ำผักและผลไม้ วิตามิน B1, B2 และ C มีค่าเท่ากับ 2.2, 1.47 และ 1.25 ตามลำดับ ซึ่งค่า tailing factor ของสารละลายมาตรฐานมีค่า  $\leq 2$  ยกเว้นในน้ำผักและผลไม้ของวิตามิน B1 ที่มีค่า tailing factor  $\geq 2$

การคัดเลือกน้ำผักและผลไม้สำเร็จรูปจากร้านสะดวกซื้อทั้งหมด 3 บริษัท โดยปริมาณ  
 วิตามินที่วิเคราะห์ได้ มีดังนี้  
 ตารางที่ 35 ปริมาณวิตามินที่วิเคราะห์ได้

| บริษัทน้ำผัก<br>และผลไม้<br>(วันหมดอายุ) | B1<br>%RDI (mg)    | จากการ<br>วิเคราะห์<br>(mg) | B2<br>%RDI (mg)    | จากการ<br>วิเคราะห์<br>(mg) | C<br>%RDI (mg)       | จากการ<br>วิเคราะห์<br>(mg) |
|------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| A<br>(9/07/19)                           | 25%<br>(0.3750 mg) | 0.7960                      | 25%<br>(0.4250 mg) | 0.0244                      | 80%<br>(48.0000 mg)  | 13.2253                     |
| B<br>(17/08/19)                          | 30%<br>(0.4500 mg) | 0.5241                      | 30%<br>(0.5100 mg) | 0.4847                      | 50%<br>(30.0000 mg)  | 35.5402                     |
| C<br>(19/12/18)                          | 20%<br>(0.3000 mg) | 2.2676                      | 20%<br>(0.3400 mg) | 0.3342                      | 160%<br>(96.0000 mg) | 40.2224                     |

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่วิเคราะห์ได้เทียบกับ %RDI ที่ระบุข้างกล่อง พบว่า  
 บริษัท A มีปริมาณวิตามิน B1 มากกว่าที่ระบุ แต่มีปริมาณวิตามิน B2 และ C น้อยกว่าที่ระบุ  
 บริษัท B มีปริมาณวิตามิน B1 และ C มากกว่าที่ระบุ แต่มีปริมาณวิตามิน B2 น้อยกว่าที่ระบุ และ  
 บริษัท C มีปริมาณวิตามิน B1 มากกว่าที่ระบุ แต่มีปริมาณวิตามิน C น้อยกว่าที่ระบุ ส่วนวิตามิน  
 B2 พบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกับที่ระบุ

โดยจากการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในน้ำผักและผลไม้ พบว่าบางบริษัทมีปริมาณ  
 วิตามินที่มากกว่าที่ระบุไว้ อาจเนื่องมาจากการใส่ปริมาณวิตามินลงในน้ำผักและผลไม้มากเกินไป  
 กว่าที่ระบุ และบางบริษัทมีปริมาณวิตามินที่น้อยกว่าที่ระบุ อาจเนื่องมาจากการใส่ปริมาณวิตามิน

ลงในน้ำผักและผลไม้เนิ่นกว่าที่ระบุ หรือเกิดการสลายตัวของวิตามิน ทำให้ปริมาณวิตามินที่ตรวจพบมีปริมาณน้อยกว่าที่ระบุ

#### ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัย

จากผลการวิเคราะห์พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ข้อดีคือ สามารถแยกวิตามิน B1, B2 และ C ได้ ใช้เวลาวิเคราะห์ไม่นาน (ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 25 นาที) มีความสะดวกรวดเร็ว mobile phase ที่ใช้เป็นพิษต่อร่างกายและสิ่งแวดล้อมต่ำ แต่ผลการวิเคราะห์บางค่าไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน จึงเสนอแนะในการปรับวิธีวิเคราะห์ จากการปรับ pH ในหัวข้อ Robustness พบว่าวิตามิน B1 และ C แยกออกจากกันได้ดีขึ้น สำหรับ %Recovery และ %RSD ถ้าพัฒนาศักยภาพในการทำการปฏิบัติการ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยมีความเที่ยงตรงมากขึ้น คาดว่าทำให้ผลการวิจัยที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้

ภาคผนวก

## แบบฟอร์มรายงานการเงิน

## รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

**ชื่อโครงการ** การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่ละลายน้ำในน้ำผัก และผลไม้สำเร็จรูปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

**ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน** ภญ.อ.ดร. สมาวดี เปลี่ยนวงษ์

**รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่** 1 ตุลาคม 2560 **ถึงวันที่** 30 กันยายน 2561

**ระยะเวลาดำเนินการ** 1 ปี - เดือน

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 10,500 บาท เมื่อ 29 สิงหาคม 2561

รายจ่าย

| รายการ                                                                                            | งบประมาณที่ตั้งไว้ | งบประมาณที่ใช้<br>จริง                     | จำนวนเงินคงเหลือ/<br>เกิน |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
| <b>1. ค่าอุปกรณ์และสารเคมี</b><br>- Methanol, HPLC grade<br>- Filter<br>- pipet tips<br>- Syringe | 8,500              | 3,321.28<br>1,851.10<br>2,782.00<br>462.00 | 83.62                     |
| <b>2. ค่าวัสดุสำนักงาน</b>                                                                        | 200                | 147                                        | 53                        |
| <b>3. ค่าใช้สอย</b><br>- ค่าโปสเตอร์                                                              | 300                | 300                                        | -800                      |

|                                |               |                  |                |
|--------------------------------|---------------|------------------|----------------|
| - ค่าถ่ายเอกสารและเล่มงานวิจัย |               | 800              |                |
| 4. ค่านำเสนองานวิจัย           | 1,500         | 1,500            | 0              |
| <b>รวม</b>                     | <b>10,500</b> | <b>11,163.38</b> | <b>-663.38</b> |

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการงานวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

1. Bellows L, Moore R, Anderson J, Young L. Water-soluble vitamins: B-complex and vitamin C. Food and nutrition series Health; no 9312. 2012.
2. แผนงานวิจัยนโยบายอาหารและโภชนาการ เพื่อการสร้างเสริมสุขภาพ. หลักโภชนาการ 2541 [cited 2018 13 Feb]. Available from: <http://www.fhpprogram.org/general-information/nutrition-guide>.
3. Abano E, Dadzie RG. Simultaneous detection of water-soluble vitamins using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-a review. Croatian journal of food science and technology. 2014;6(2):116-23.
4. Ciulu M, Solinas S, Floris I, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, et al. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. Talanta. 2011;83(3):924-9.
5. Heudi O, Kilinc T, Fontannaz P. Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: application to polyvitaminated premixes. Journal of Chromatography A. 2005;1070(1-2):49-56.
6. Horwitz W. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA. 2002;1219.
7. Branch SK. Guidelines from the international conference on harmonisation (ICH). Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2005;38(5):798-805.
8. สำนักงานราชบัณฑิตยสภา. พจนานุกรม ฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ.๒๕๕๔ 2018 [cited 2018 22 Feb]. Available from: <http://www.royin.go.th/dictionary/>.
9. Canada Do. Functions and Food Sources of Common Vitamins 2018 [Available from: <https://www.dietitians.ca/Your-Health/Nutrition-A-Z/Vitamins/Functions-and-Food-Sources-of-Common-Vitamins.aspx>.
10. Horwitz W, Chichilo P, Reynolds H. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1970.

11. บทที่13 : เครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (FLUOROMETER) [Internet]. Available from: <https://home.kku.ac.th/chuare/12/fluorometer.pdf>.
12. ณปภัช พิมพดี. การไทเทรต (Titration): สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.); 2017 [cited 2018 27 Mar]. Available from: <http://www.scimath.org/lesson-chemistry/item/7197-titration>.
13. Moldoveanu SC, David V. Essentials in modern HPLC separations: Newnes; 2012.
14. มหาวิทยาลัยรามคำแหง. บทที่2 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) [cited 2018 27 Feb]. Available from: <http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM437/CM437-2.pdf>.
15. รศ. ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. บทที่ 16 โครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY) 2018 [cited 2018 22 Feb]. Available from: <https://home.kku.ac.th/chuare/12/HPLC.pdf>.
16. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต. ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC 2007 [cited 2018 27 Feb]. Available from: [http://www.geocities.ws/chem\\_friend\\_club/component.html](http://www.geocities.ws/chem_friend_club/component.html).
17. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ(วช.). ภาคผนวก ง เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ 2018 [cited 2018 27 Feb]. Available from: [http://doi.nrct.go.th/ListDoi/Download/126109/c611854edb39d882cd2ca0424a6d75b4?Resolve\\_DOI=10.14457/MJU.the.2014.30](http://doi.nrct.go.th/ListDoi/Download/126109/c611854edb39d882cd2ca0424a6d75b4?Resolve_DOI=10.14457/MJU.the.2014.30).
18. Editors L. Diode Array Detector Settings - Five Minutes to Change Your Chromatography Forever 2014 [cited 2018 27 Feb]. Available from: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-diode-array-detector-settings-five-minutes-change-your-chromatography-forever>.
19. Convention USP. United States Pharmacopeia Dispensing Information: USP DI: United States Pharmacopeia; 2014.
20. ญัฐภาพ พันชน. Validation and Verification of Analytical Procedure for Impurity. 2558 เมษายน-มิถุนายน. In: วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม [Internet]. องค์การเภสัชกรรม. 2. [19-22]. Available from: <https://www.gpo.or.th/Portals/6/Newsletter/RDINewsYr22No2->

6.pdf?fbclid=IwAR2XMDvjQR1Kw2Cwh96JZKdaeZdTrdAp1XLL8FvNcDJXw6oGAM5vrJ5D78U.

21. GUIDELINES ON VALIDATION – APPENDIX 4 ANALYTICAL METHOD VALIDATION [Internet]. 2016. Available from:  
[http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/Guideline\\_Validation\\_AnalyticalMethodValidationQAS16-671.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/Guideline_Validation_AnalyticalMethodValidationQAS16-671.pdf).
22. Tyagi G, Jangir DK, Singh P, Mehrotra R, Ganesan R, Gopal E. Rapid determination of main constituents of packed juices by reverse phase-high performance liquid chromatography: an insight in to commercial fruit drinks. *Journal of food science and technology*. 2014;51(3):476-84.
23. Reuter WM, Shelton C. Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by HPLC and UV Detection. Application note PerkinElmer. 2015.
24. Scherer R, Rybka ACP, Ballus CA, Meinhart AD, Teixeira Filho J, Godoy HT. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*. 2012;135(1):150-4.
25. Grotzkyj Giorgi M, Howland K, Martin C, Bonner AB. A novel HPLC method for the concurrent analysis and quantitation of seven water-soluble vitamins in biological fluids (plasma and urine): a validation study and application. *The Scientific World Journal*. 2012;2012.
26. Pharmacopoeia US. Physical Test <621>Chromatography. 34] USP-NF, editor. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc: U.S. Pharmacopeia; 2012.
27. FDA RG. Validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation Research (CDER), Washington, USA. 1994.

# Plagiarism Checking Report

Created on Dec 17, 2018 at 00:57 AM

## Submission Information

| ID      | SUBMISSION DATE          | SUBMITTED BY          | ORGANIZATION     | FILENAME     | STATUS    | SIMILARITY INDEX |
|---------|--------------------------|-----------------------|------------------|--------------|-----------|------------------|
| 1078202 | Dec 17, 2018 at 00:57 AM | 57210025@go.buu.ac.th | มหาวิทยาลัยบูรพา | บทต่างๆ.docx | Completed | 0.00 %           |

## Match Overview

| NO.                        | TITLE | AUTHOR(S) | SOURCE | SIMILARITY INDEX |
|----------------------------|-------|-----------|--------|------------------|
| No data available in table |       |           |        |                  |

| TEXT FROM SUBMITTED DOCUMENT | TEXT FROM SOURCE DOCUMENT(S) |
|------------------------------|------------------------------|
|------------------------------|------------------------------|