

**บทที่ 10**  
**การหาปริมาณ vanillin ใน vanilla extract**  
**โดยใช้เทคนิค**  
**High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)**

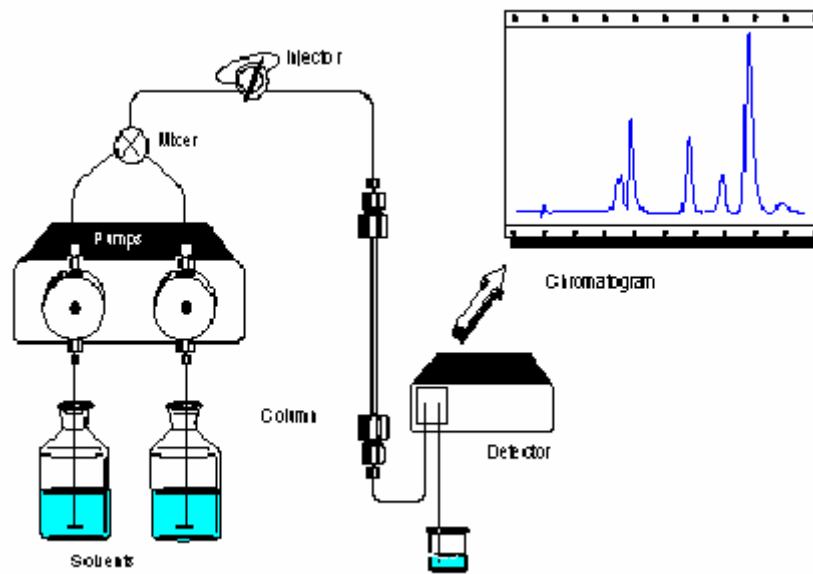
**วัตถุประสงค์**

เพื่อเรียนรู้หลักการทำงานของเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) และ วิธีการหาปริมาณ vanillin ใน vanilla extract โดยใช้เทคนิค HPLC

---

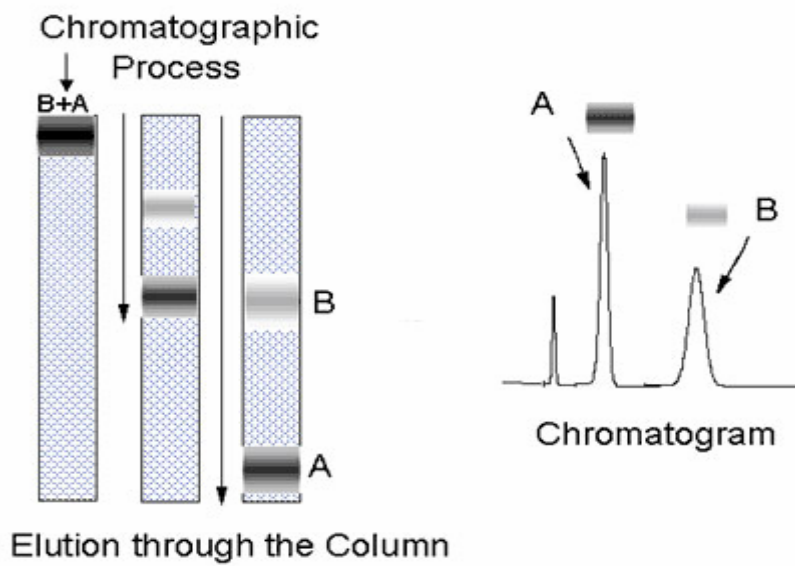
**การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

HPLC เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) จะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือ เฟสที่อยู่กับที่สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโตแกรม



ภาพที่ 10.1 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

ที่มา : [http://www\\_waters\\_com-WatersDivision-images-products-hplc\\_primer\\_fig\\_d\\_jpg](http://www_waters_com-WatersDivision-images-products-hplc_primer_fig_d_jpg)



ภาพที่ 10.2 ลักษณะของ chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

ที่มา : [http://www\\_waters\\_com-WatersDivision-images-products-hplc\\_primer\\_fig\\_d\\_jpg](http://www_waters_com-WatersDivision-images-products-hplc_primer_fig_d_jpg)

## ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

1. Mobile phase / Solvent : ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่เฟสที่อยู่กับที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งกระบวนการแยกจะเกิดขึ้นภายในคอลัมน์
2. Pump : ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ HPLC
3. Injector / Autosampler : ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC
4. Column : ภายในบรรจุด้วยเฟสที่อยู่กับที่ มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล ทำให้เกิดกระบวนการแยกองค์ประกอบของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่ กับ เฟสที่อยู่กับที่
5. Detector : เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก

HPLC สามารถทดสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และทดสอบเชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

## การพิจารณาเลือกใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์จะต้องคำนึงถึง

1. ธรรมชาติของสารตัวอย่าง เช่น สมบัติทางกายภาพและทางเคมี เช่น ความสามารถในการละลายของสารตัวอย่าง ขนาดโมเลกุลของสาร มวลโมเลกุลของสาร สารตัวอย่างมีขี้หรือไม่มีขี้ เป็นต้น
2. ตัวอย่างต้องละลายได้ในเฟสที่เคลื่อนที่
3. กรองตัวอย่างก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
4. เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ต้องเป็น HPLC เกรดเท่านั้น
5. ตัวอย่างที่มีสารรบกวน (matrix) จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อกำจัด matrix นั้นก่อนฉีดเข้าเครื่อง
6. ต้องคำนึงถึงการเข้ากันได้ดีของเฟสเคลื่อนที่ในกรณีที่มีการใช้เฟสเคลื่อนที่มากกว่า 1 ชนิดในการแยก

ตารางที่ 10.1 ชนิดของสารที่ต้องการแยก วิธีการแยก เฟสที่อยู่กับที่ และ เฟสเคลื่อนที่ที่ควรเลือกใช้

Types of Compounds Separated	Mode	Stationary Phase	Mobile Phase
Neutrals Weak Acids Weak Bases	Reversed-Phase	C-18, C-8, C-4, C-2	Water/Organic Phase
Ionics, Bases, Acids	Ion-Pair	C-18, C-8	Water/Organic Ion-Pair Reagent
Compounds Insoluble in Water, Organic Isomers	Normal -Phase	Silica, Amino, Cyano Diol	Organics
Ionics Inorganic Ions	Ion Exchange	Anion or Cation Exchange Resin	Aqueous/Buffer Counter Ion
High MW Compounds Polymers	Size Exclusion	Silica Styrene-Divinylbenzene	Gel Filtration-Aqueous Gel Permeation-Organic

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่อง HPLCประกอบไปด้วย

Pumping system (Spectra system P4000)

Photodiode array detector (Spectra system UV 6000 LP)

Controller with a gradient system

Empower software

Injection volume : 20 ไมโครลิตร

**Column:** Nucleosil C18 150x4.6 mm และ Meta guard column

**Mobile phase :** water:methanol (40:60), อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

**Mobile phase gradient scheme**

0 time water methanol

5 min time methanol (100)

5 min time water:methanol (40:60)

ใช้เวลา run แต่ละครั้ง 15 นาที

Absorbance wavelength : 231 นาโนเมตร

### สารเคมีที่ใช้

1. vanillin
2. methanol (HPLC grade)

เตรียม สารละลายมาตรฐาน vanillin stock solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / 1 มิลลิลิตร โดยใช้ mobile phase เป็นตัวทำละลาย เก็บสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### เครื่อง UV-Visible spectrophotometer

ให้นักศึกษาทำการ scan spectrum การดูดกลืนแสงของ สารละลายมาตรฐาน vanillin ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-370 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เพื่อดูลักษณะการดูดกลืนแสงและหา ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum wavelength) ของ vanillin ในช่วงคลื่นแสง ultraviolet

### การหาปริมาณ vanillin ในสารสกัด vanilla โดยใช้เครื่อง HPLC

#### วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน vanillin ความเข้มข้น 25, 50, 75, และ 100 มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตรโดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลาย
2. กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Millipore filter ขนาด 45 ไมครอน
3. ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
4. นำตัวอย่าง vanilla extract กรองผ่าน Millipore filter ขนาด 45 ไมครอน
5. ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
6. คำนวณหาความเข้มข้นของ vanillin ในตัวอย่าง vanilla extract โดยเทียบความสูงของ peak และหาความเข้มข้นจาก calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน