

## บทความวิจัย

# เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรวดเร็ว สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลใน น้ำผึ้งและน้ำผลไม้

ลลิตา รุ่งนิรันดร พัทธินันท์ ชัยสุวรรณ และ ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ\*

### บทคัดย่อ

ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราล หรือ HMF เป็นสารประกอบที่พบได้ในอาหารที่มีน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรต เป็นองค์ประกอบและมีอายุการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานหรือผ่านขบวนการให้ความร้อน ปริมาณของ HMF จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสดและคุณภาพของอาหารได้ ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีที่สะดวก รวดเร็ว และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมสำหรับการวิเคราะห์ HMF ในตัวอย่างน้ำผึ้งและน้ำผลไม้ โดยใช้หม้อโนลิทิกคอลัมน์ชนิด C18 (Chromolith Speed Rod, 50 x 4.6 mm i.d.) ร่วมกับสารละลายไอออนิกลิควิดเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่แบบเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และทำการตรวจวัดด้วยความยาวคลื่น 284 นาโนเมตร พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถแยก HMF ออกจากสารรบกวนที่มีในตัวอย่างได้เป็นอย่างดี และการใช้สารละลายไอออนิกลิควิดชนิด 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมเตตระฟลูออโรโบเรตความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่ออนาทินั้น ส่งผลให้การวิเคราะห์ HMF มีความรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียงแค่ 3.0 นาทีเท่านั้น โดยไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่ม วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 1.0-70 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้นเท่ากับ 0.999 นอกจากนี้วิธีดังกล่าวยังมีความไวและความแม่นยำเป็นที่น่าพอใจ เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ HMF ในตัวอย่างน้ำผึ้งและน้ำผลไม้พบว่ามีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 97.3-102.9 จะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างจริงได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากอีกทั้งยังเป็นวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

**คำสำคัญ:** ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราล น้ำผึ้ง น้ำผลไม้ หม้อโนลิท ไอออนิกลิควิด โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

\*ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

\*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: piyadaj@swu.ac.th

# A Fast HPLC Method for Determination of Hydroxymethylfurfural in Honey and Fruit Juices

Lalita Rungnirundorn, Patcharin Chaisuwan and Piyada Jittangprasert\*

---

## ABSTRACT

Hydroxymethylfurfural (HMF) is naturally produced in sugar-and carbohydrate-containing foods during storage or heat-treatment. HMF is an indicator for freshness and quality of foods. In this work, a simple, rapid and green chromatographic method for analysis of HMF in honey and fruit juices has been developed. The method was performed on a C18 monolithic column (Chromolith Speed Rod, 50 x 4.6 mm i.d.) with aqueous solution of ionic liquid as a “green” mobile phase and UV detection at 284 nm. Good separation of HMF from matrix interferences could be achieved. The use of 25 mM 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, ionic liquid solution provided a fast separation of HMF within only 3.0 min at a flow rate of 1.0 mL/min without need of organic solvent modifier. A linear calibration curve was obtained in the concentration range of 1.0-70 mg/L with correlation coefficient of 0.999. Satisfied sensitivity and precision were achieved. The contents of HMF in honey and several fruit juice samples were successfully determined with recoveries from 97.3 to 102.9. The developed “green” method could be applied to real samples without need of any sample pretreatment.

**Keywords:** hydroxymethylfurfural, honey, fruit juice, monolith, ionic liquid, HPLC

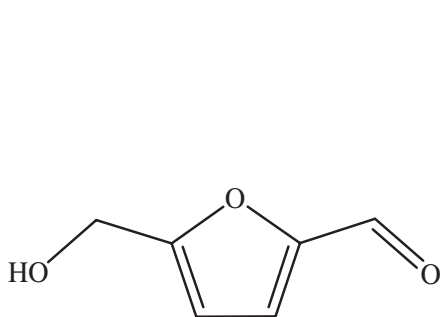
## บทนำ

ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัล (Hydroxymethylfurfural) เป็นสารประกอบที่สามารถเกิดขึ้นได้เองในอาหารที่มีน้ำตาล กรดอะมิโน และโปรตีนเป็นส่วนประกอบ (โครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1) ซึ่งอาจเกิดจากปฏิกิริยาการสูญเสียของน้ำตาลเฮกโซสที่อุณหภูมิสูง และปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลเฮกโซสกับกรดอะมิโนหรือโปรตีน ที่เรียกว่า ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) หรือเกิดจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่ใช้เอนไซม์ (Non-enzymatic browning) โดยมีไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลเป็นสารมัธยันตร์ของปฏิกิริยา สำหรับปฏิกิริยาเมลลาร์ดปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ ความชื้น อุณหภูมิ และเวลาในการเก็บรักษา รวมทั้งความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี กลิ่น และรสชาติของอาหาร รวมทั้งอาจส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่ลดลงอีกด้วย จากงานวิจัยที่ผ่านมาสามารถตรวจพบสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลได้ในอาหารประเภทต่างๆ เช่น น้ำผึ้ง [1-3] น้ำผลไม้ [4, 5] แยม [6] และนม [7, 8] เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับโทษของไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลเมื่อเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ แต่ได้มีรายงานวิจัยที่ศึกษาผลกระทบจากการได้รับไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลในปริมาณสูง พบว่าสารดังกล่าวสามารถส่งผลกระทบต่อระบบเซลล์และหน่วยพันธุกรรมในร่างกาย รวมทั้งมีแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย [9] ดังนั้นเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของอาหารและเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค สถาบัน Codex Alimentarius of the World Health Organisation (Alinorm 01/25, 2001) และ European Union (EU Directive 2001/110/EC, 2001) จึงได้กำหนดปริมาณของไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลในน้ำผึ้งสำหรับประเทศเขตร้อนขึ้นไว้ไม่เกิน 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [1] ซึ่งเป็นปริมาณเดียวกับข้อกำหนดของกระทรวงสาธารณสุขประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2543 [10] สำหรับปริมาณของไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลในน้ำผลไม้พร้อมดื่มและน้ำผลไม้เข้มข้น สถาบัน International Federation of Fruit Juice Processors (IFFJP) ได้กำหนดไว้ไม่เกิน 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

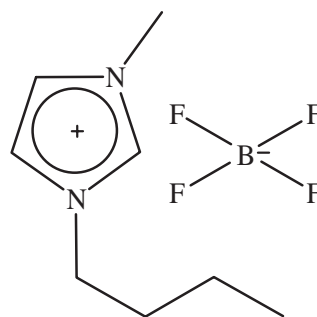
โดยวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลในน้ำผึ้งนั้นมี 3 วิธี คือ วิธีของวินเคอร์ วิธีของไวท์ และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง [11] โดยวิธีของวินเคอร์และไวท์นั้นเป็นการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี ซึ่งเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว แต่ยังคงมีความจำเพาะเจาะจงและความไวในการวิเคราะห์ อีกทั้งในวิธีของวินเคอร์ยังมีการใช้สารพารา-โทลูอิดีน (p-toluidine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง จึงทำให้ทั้ง 2 วิธีดังกล่าวไม่ได้รับความนิยมเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องมากกว่า และมีความไวที่ดีกว่า [1] อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวยังคงใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เนื่องจากการใช้วัสดุภาคคงที่ประเภทอนุภาคซิลิกาทำให้ไม่สามารถใช้อัตราการไหลที่สูงได้ เพราะมีความดันย้อนกลับที่ค่อนข้างมาก อาจส่งผลกระทบต่ออุปกรณ์ภายในระบบ อีกทั้งยังมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม จึงทำให้นักวิจัยได้มีการพัฒนาวัฏภาคคงที่ชนิดใหม่ที่เรียกว่า มอนอลิธ (Monolith) โดยมอนอลิธนี้มีลักษณะเด่น คือ ความเป็นรูพรุนสูงและมีพื้นที่ผิวในการเกิดอันตรกิริยากับสารตัวอย่างมาก จึงทำให้สามารถใช้อัตราการไหลที่สูงได้ โดยมีความดันย้อนกลับน้อย และมีประสิทธิภาพในการแยกสูง การวิเคราะห์จึงทำได้รวดเร็วมากขึ้น [12] และสามารถนำมอนอลิธคอลัมน์มาประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารในตัวอย่างไม่มีความซับซ้อนได้ เช่น ชาเขียว ไวน์แดง และส้ม [13] และพริกไทย [14] เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีผลงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพและความไวที่ดีกว่าของการใช้ไอออนิกคอลลัมน์เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้คอลัมน์ที่มีลักษณะเป็นอนุภาคซิลิกา [15-16] สำหรับตัวทำละลายที่ใช้เป็นวิทยาศาสตร์เคลื่อนที่นั้นในปัจจุบันได้มีการพัฒนาตัวทำละลายชนิดใหม่ที่เรียกว่า ไอออนิกลิควิด (Ionic liquid) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีคุณสมบัติ คือ เป็นเกลือที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ ระเหยได้น้อย มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ [17] โดยมีรายงานวิจัยที่นำไอออนิกลิควิดชนิด 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมเตตระฟลูออโรโบเรต (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate; [BMIM]BF<sub>4</sub>) โครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1 มาใช้เป็นวิทยาศาสตร์เคลื่อนที่ในการแยกสารประเภทเอมีน [18] และเอพิดรีน [19] ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิทยาศาสตร์เคลื่อนที่ชนิดนี้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามยังคงมีงานวิจัยไม่มากนักที่นำไอออนิกลิควิดมาใช้เป็นวิทยาศาสตร์เคลื่อนที่ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแทนตัวทำละลายอินทรีย์

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์พิวราลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ไอออนิกคอลลัมน์ร่วมกับไอออนิกลิควิดชนิด [BMIM]BF<sub>4</sub> เป็นวิทยาศาสตร์เคลื่อนที่แทนตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเดิมที่นิยมใช้ทั่วไป เช่น เมทานอล และแอซิโตไนไตรล์ ซึ่งเป็นสารระเหยและก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่งน้ำคั้นน้ำผลไม้พร้อมดื่ม และน้ำผลไม้เข้มข้นที่มีจำหน่ายและได้รับความนิยมในประเทศไทย เพื่อให้ได้วิธีการวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย



ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์พิวราล  
(HMF)



1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมเตตระฟลูออโรโบเรต  
([BMIM]BF<sub>4</sub>)

รูปที่ 1 โครงสร้างของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์พิวราล และ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมเตตระฟลูออโรโบเรต

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดในการทดลองนี้เป็นประเภทสำหรับงานวิเคราะห์ (AR grade) ยกเว้นตัวทำละลายเมทานอลเป็นประเภทสำหรับงานโครมาโทกราฟี (HPLC grade) และใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนสำหรับการเตรียมสารละลายทุกครั้ง

สารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมได้จากการชั่งน้ำหนักที่ทราบค่าละเอียดของสารมาตรฐาน 10 มิลลิกรัม นำมาละลายพร้อมปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนในขวดปรับปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานนี้ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อไป โดยสารละลายมาตรฐานทุกความเข้มข้นถูกกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์

สารละลาย  $\text{BMIMBF}_4$  ความเข้มข้น 20 25 และ 30 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง  $\text{BMIMBF}_4$  นหนัก 1.1300 1.4120 และ 1.6950 กรัม ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนในขวดปรับปริมาตรขนาด 250.00 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในระบบโครมาโทกราฟี

### 2. เครื่องมือและอุปกรณ์

ในการวิเคราะห์ใช้เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟีของบริษัท Shimadzu รุ่น LC-20A และคอลัมน์ลิทโทสเฟียร์ชนิด C18 (Chromolith<sup>®</sup> Speed Rod RP-18 endcapped column, 50 mm x 4.6 mm i.d.) ของบริษัท Merck และสารละลาย  $\text{BMIMBF}_4$  ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดสัญญาณค่าการดูดกลืนแสงด้วยตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 284 นาโนเมตร

### 3. การเตรียมตัวอย่าง

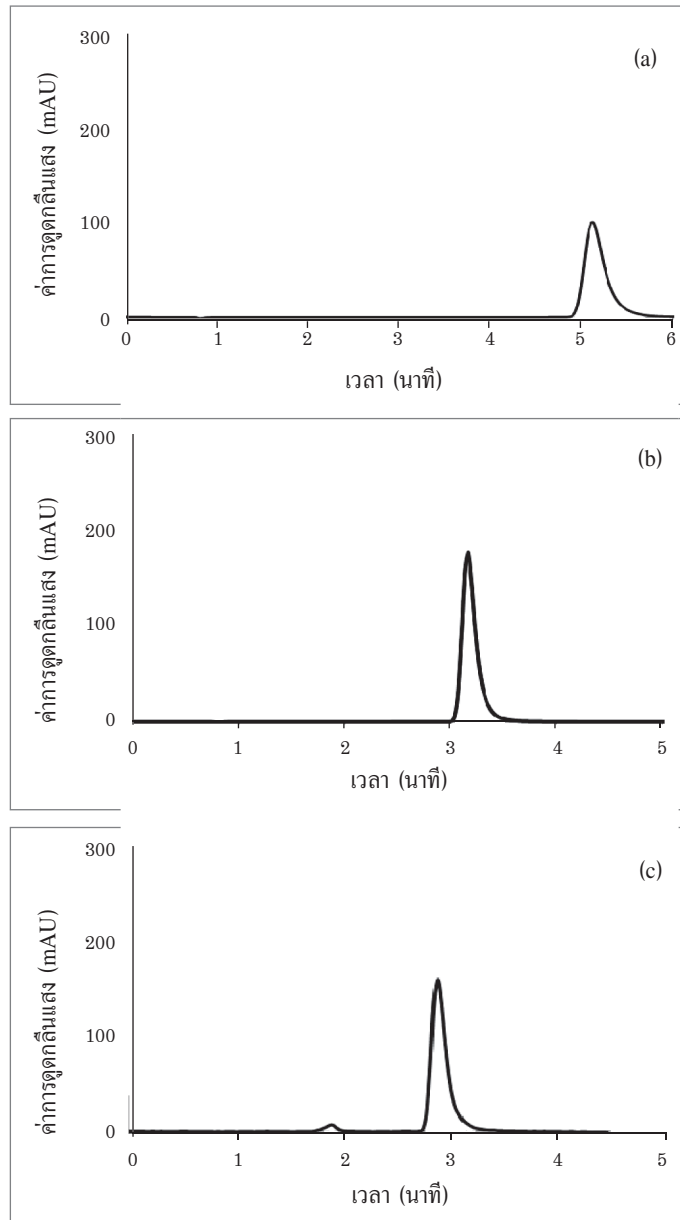
ในการวิเคราะห์ใช้ตัวอย่างน้ำผึ้ง น้ำผลไม้พร้อมดื่ม (น้ำแอปเปิ้ล และน้ำองุ่น) และน้ำผลไม้เข้มข้น (น้ำลูกพรุน) ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไปทั้งหมด 11 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างน้ำผึ้งเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 10 เท่าในขวดปรับปริมาตร สำหรับน้ำผลไม้พร้อมดื่ม และน้ำผลไม้เข้มข้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 2 และ 100 เท่าในขวดปรับปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำการฉีดตัวอย่างเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราล

#### 1.1 ความเป็นไปได้ของการใช้ไอออนิกลิควิดเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดใหม่สำหรับการแยกไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราล

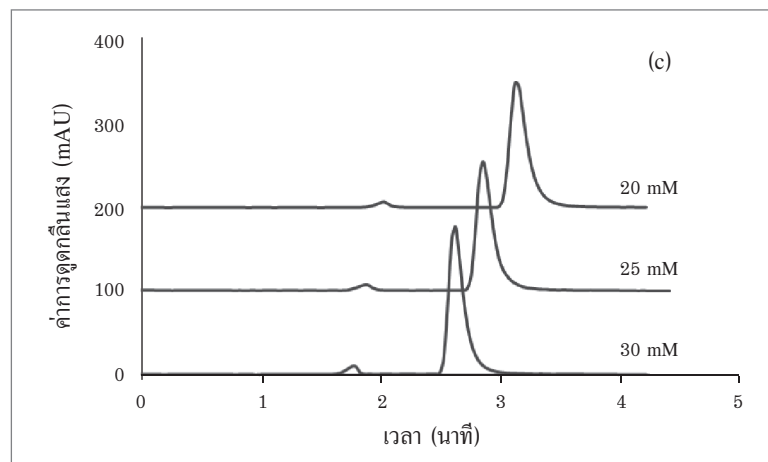
เนื่องจากไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลเป็นสารประกอบที่มีขั้วเล็กน้อย ในเบื้องต้นจึงได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการแยกสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลโดยใช้น้ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่เปรียบเทียบกับการใช้สารละลายผสมระหว่างเมทานอลและน้ำซึ่งเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่นิยมใช้กันทั่วไปสำหรับการแยกสารในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส ผลการทดลองพบว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ทั้งสองชนิดให้พีคการแยกที่มีลักษณะสมมาตร แต่เวลาการคงอยู่ ( $R_f$ ) ของไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลมีค่าลดลง และได้พีคที่มีลักษณะแคบกว่าเมื่อใช้สารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (รูปที่ 2a-b) เนื่องจากการเติมเมทานอลทำให้ความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลง (ความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น) เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้เมทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ไอออนิกลิควิดซึ่งมีสมบัติเป็นเกลือที่ละลายน้ำได้ดี มีความสามารถในการละลายสารที่มีขั้วต่ำได้ดี และได้รับการยอมรับว่าเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่แทนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการแยกสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราล ผลการทดลองแสดงดังโครมาโทแกรมในรูปที่ 2c เห็นได้ว่าการใช้สารละลายไอออนิกลิควิดชนิด  $\text{BMIMBF}_4$  ให้ผลการแยกที่ดีไม่แตกต่างจากการใช้ตัวทำละลายเมทานอล ทั้งในด้านความสมมาตรของพีคและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลาย  $\text{BMIMBF}_4$  เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำผึ้งและน้ำผลไม้ เพื่อเป็นแนวทางใหม่สำหรับการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รวมทั้งเป็นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้นอีกด้วย



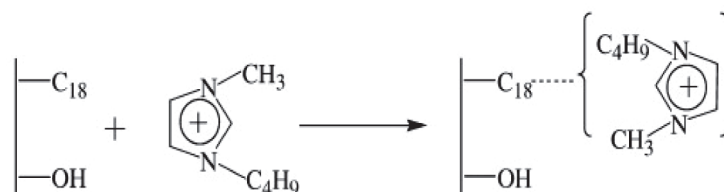
**รูปที่ 2** โครมาโทแกรมของไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวราลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้มอนอลิติกคอลัมน์ชนิด C18 (50 x 4.6 mm i.d.) และ a. น้ำ ( $R_t = 5.10$  นาที) b. สารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร ( $R_t = 3.10$  นาที) และ c. สารละลาย BMIMBF<sub>4</sub> ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ( $R_t = 2.80$  นาที) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 284 นาโนเมตร

### 1.2 ความเข้มข้นของไอออนิกลิควิดชนิด BMIMBF<sub>4</sub> ต่อการแยกไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราล

เมื่อทำการศึกษาผลของการแยกไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลเมื่อใช้สารละลาย BMIMBF<sub>4</sub> ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BMIMBF<sub>4</sub> ส่งผลให้ค่าเวลาการคงอยู่ของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลลดลง ซึ่งคาดว่าเป็นผลเนื่องจากความมีขั้วของ วัสดุภาคเคลื่อนที่ลดลง และเนื่องจากมอโนลิธิกคอลลัมน์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มีการกำจัดหมู่ silanol อิสระที่อยู่บนอนุภาคซิลิกา (endcapping) จึงสามารถอธิบายผลได้อีกทางหนึ่งว่าเกิดจากการที่หมู่บิวทิลของประจุบวก (BMIM<sup>+</sup>) ไปเกิดอันตรกิริยาแบบไม่มีขั้วกับ C18 ของมอโนลิธิกคอลลัมน์ [19] (รูปที่ 4) ส่งผลให้คอลลัมน์มีขั้วเพิ่มขึ้น ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลเกิดการดูดซับบนคอลลัมน์ได้น้อยลง จึงทำให้ค่าเวลาการคงอยู่ลดลง ดังนั้นในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารละลาย BMIMBF<sub>4</sub> ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ เนื่องจากเป็นสภาวะที่สามารถแยกไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลออกจากสารรบกวนต่างๆ ที่อยู่ในตัวอย่าง น้ำผึ้งและน้ำผลไม้ได้เป็นอย่างดี โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 3.0 นาทีเท่านั้น อีกทั้งยังช่วยประหยัดการใช้สารเคมี โดยสภาวะดังกล่าวนี้ยังคงมีประสิทธิภาพการแยกที่ดีไม่แตกต่างจากการใช้สารละลาย BMIMBF<sub>4</sub> ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์อีกด้วย



**รูปที่ 3** โครมาโทแกรมของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้มอโนลิธิกคอลลัมน์ชนิด C18 (50 x 4.6 mm i.d.) และใช้สารละลาย BMIMBF<sub>4</sub> ความเข้มข้น 20 ถึง 30 มิลลิโมลาร์ เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 284 นาโนเมตร



**รูปที่ 4** ความเป็นไปได้ในการเกิดอันตรกิริยาแบบไม่มีขั้วระหว่าง BMIM<sup>+</sup> กับ C18 ภายในมอโนลิธิกคอลลัมน์ [19]



## 2. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น

### 2.1 ความเสถียรของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัล

การศึกษาความเสถียรของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลทำได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วทำการวิเคราะห์เป็นระยะเวลา 5 วัน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ผลการทดลองพบว่าสัญญาณพื้นที่ใต้พีคมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่วันที่ 2 ของการเก็บ และเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 5 วันสัญญาณลดลง 30% แสดงให้เห็นถึงความไม่เสถียรของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัล ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือจำเป็นต้องใช้สารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลที่เตรียมขึ้นใหม่ทุกครั้ง

### 2.2 กราฟมาตรฐาน

จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลในช่วงความเข้มข้น 1.0-70 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วฉีดเข้าระบบการวิเคราะห์โดยตรง เมื่อนำสัญญาณพื้นที่ใต้พีคกับค่าความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.999 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ( $r^2$  มากกว่า 0.995)

### 2.3 ความไวของวิธีวิเคราะห์

ค่าความไวในการวิเคราะห์ในเทอมของค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) โดยเลือกจากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่มีสัดส่วนสัญญาณของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความไวที่ดี โดยมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.11 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

### 2.4 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

การศึกษาความเที่ยงภายในวันเดียวกันทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 10 ครั้ง และความเที่ยงระหว่างวันทำการวิเคราะห์ซ้ำเป็นระยะเวลา 3 วันต่อเนื่องกัน โดยใช้สารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาพบว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวให้ความเที่ยงของการวิเคราะห์เป็นที่น่าพอใจ โดยมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของสัญญาณพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 1.52 สำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน และ 1.60 สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน

## 3. การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลในตัวอย่างน้ำผึ้งและน้ำผลไม้

ผลการทดลองในตารางที่ 1 แสดงปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลในตัวอย่างน้ำผึ้งแท้ที่อายุการเก็บรักษาไม่เกิน 1 ปี จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างน้ำผึ้งที่นำมาวิเคราะห์มีปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลอยู่ในช่วงความเข้มข้น 14.2-144.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่มีปริมาณมากกว่ามาตรฐานข้อกำหนดของกระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2543 [10] และข้อกำหนดสากลของ WHO และ EU ซึ่งได้กำหนดปริมาณที่ยอมรับได้ของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลในน้ำผึ้งสำหรับประเทศเขตร้อนไว้ไม่เกิน 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [1] สำหรับการศึกษาค่าร้อยละของการคืนกลับทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในตัวอย่างน้ำผึ้ง ผลการทดลองพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 97.3-102.9 และค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 5.1 (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลที่วิเคราะห์ได้ ค่าร้อยละการคืนกลับ และค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ตัวอย่างน้ำผึ้ง	ปริมาณ HMF $\pm$ SD <sup>a</sup> (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	ร้อยละของการคืนกลับ	%RSD <sup>b</sup>
ตัวอย่างที่ 1	144.6 $\pm$ 6.0	98.9	3.7
ตัวอย่างที่ 2	20.5 $\pm$ 1.3	102.0	3.5
ตัวอย่างที่ 3	37.0 $\pm$ 3.3	97.3	2.9
ตัวอย่างที่ 4	35.3 $\pm$ 3.2	98.2	5.1
ตัวอย่างที่ 5	14.2 $\pm$ 0.6	102.9	1.3

**หมายเหตุ:** <sup>a</sup>ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัล  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

<sup>b</sup>ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลในตัวอย่างน้ำผลไม้แบบพร้อมดื่มและแบบเข้มข้น ได้แก่ น้ำแอปเปิ้ล น้ําองุ่น และน้ำลูกพรุนเข้มข้น รวมทั้งหมด 6 ตัวอย่าง แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 2 พบว่าน้ำผลไม้ที่มีปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลมากที่สุด คือ น้ำลูกพรุนเข้มข้น โดยปริมาณที่ตรวจพบนี้เป็นปริมาณที่เกินกว่าข้อกำหนดมาตรฐาน ซึ่งได้กำหนดปริมาณในน้ำผลไม้เข้มข้นไว้ไม่เกิน 25 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น สำหรับตัวอย่างน้ำแอปเปิ้ลและน้ำองุ่นแบบพร้อมดื่มตรวจพบปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลอยู่ในช่วง 2.6-6.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ไม่เกินข้อกำหนดมาตรฐานของสถาบัน IFFJP ที่กำหนดปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลในน้ำผลไม้ไว้ไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร การวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำผลไม้ทั้งหมดได้ค่าร้อยละการคืนกลับ และค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 97.6-101.4 และ 1.6-3.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

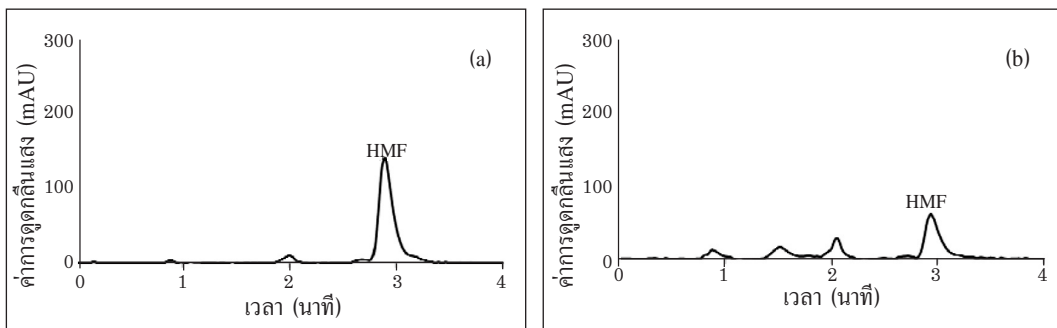
**ตารางที่ 2** ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลที่วิเคราะห์ได้ ค่าร้อยละการคืนกลับ และค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในตัวอย่างน้ำผลไม้บางชนิด

ตัวอย่างน้ำผลไม้	ปริมาณ HMF $\pm$ SD <sup>a</sup> (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของการคืนกลับ	%RSD <sup>b</sup>
น้ำแอปเปิ้ล 1	6.1 $\pm$ 0.5	99.7	2.6
น้ำแอปเปิ้ล 2	2.6 $\pm$ 0.2	100.4	1.6
น้ำองุ่น 1	4.5 $\pm$ 0.2	97.9	3.6
น้ำองุ่น 2	6.8 $\pm$ 0.5	101.4	2.1
น้ำลูกพรุนเข้มข้น 1	82.7 $\pm$ 7.0	98.2	3.6
น้ำลูกพรุนเข้มข้น 2	101.2 $\pm$ 9.5	97.6	1.8

หมายเหตุ: <sup>a</sup>ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัล  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

<sup>b</sup>ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลในตัวอย่างจริงได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถแยกออกจากสารรบกวนที่อยู่ในตัวอย่างได้ดี อีกทั้งยังใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นอีกด้วย ดังแสดงในตัวอย่างโครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้ง 1 และน้ำแอปเปิ้ล 1 ในรูปที่ 5 นอกจากนี้การวิเคราะห์ในตัวอย่างทั้งหมดให้ผลค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เป็นที่น่าพอใจ แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลในตัวอย่างที่มีสิ่งเจือปนมากได้เป็นอย่างดี โดยไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากซับซ้อน เพียงแค่เจือจางตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์เท่านั้น



**รูปที่ 5** โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผึ้ง 1 (a) และน้ำแอปเปิ้ล 1 (b)

## สรุปผลการทดลอง

จากการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้มอโนลิธิกคอลัมน์ร่วมกับการใช้ออตนิกลิควิดเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวราลที่มีความสะดวก รวดเร็ว และไม่สิ้นเปลืองสารเคมี อีกทั้งยังได้วิธีวิเคราะห์แนวทางใหม่ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากยิ่งขึ้น ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพและสามารถประยุกต์ใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างที่มีสิ่งเจือปนได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก เพียงแค่เตรียมตัวอย่างโดยการเจือจางเท่านั้น สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวราลในตัวอย่างน้ำผึ้งแท้และน้ำผลไม้ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถวิเคราะห์ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวราลที่เกิดขึ้นในตัวอย่างได้หลากหลายประเภท

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2553

## เอกสารอ้างอิง

1. Spano, N., Casula, L., Panzanelli, A., Pilo, M. I., Piu, P. C., Scanu, R., Tapparo, A., and Sanna, G. 2006. An RP-HPLC Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey: The Case of Strawberry Tree Honey. *Talanta* 68: 1390-1395.
2. Kalábová, K., Vorlová, L., Borkovcová, I., Smutná, M., and Vecerek, V. 2003. Hydroxymethylfurfural in Czech Honeys. *Czech Journal of Animal Science* 48: 551-557.
3. Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., and Gan, S. H. 2010. High 5-Hydroxymethylfurfural Concentrations are Found in Malaysian Honey Samples Stored for More Than One Year. *Food and Chemical Toxicology* 48: 2388-2392.
4. Versari, A., Parpinello, G. P., Mattioli, A. U., and Galassi, S. 2008. Characterization of Italian Commercial Apricot Juices by High-Performance Liquid Chromatography Analysis and Multivariate Analysis. *Food Chemistry* 108: 334-340.
5. Atilla, S., Ender, S. P., Suleyman, K., and Sedat, V. 2007. Response Surface Methodological Study on HMF and Fluorescent Accumulation in Red and White Grape Juices and Concentrates. *Food Chemistry* 101: 987-994.
6. Maite, R. M., Agustin, O., and Mar, V. 2002. Determination of Hydroxymethylfurfural in Commercial Jams and In Fruit-Based Infant Foods. *Food Chemistry* 79: 513-516.
7. Boekel, M. A. J. S. van. 1998. Effect of Heating on Maillard Reactions in Milk. *Food Chemistry* 62: 403-414.
8. Emilia, F., Amparo, A., Rosaura, F., Pedro A., and Fernando, R. 2005. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Furfural Compounds in Infant Formulas during Full Shelf-Life. *Food Chemistry* 89: 639-645.

9. Gaspar, E. M. S. M., and Lucena, A. F. F. 2009. Improved HPLC Methodology for Food Control-Furfurals and Patulin as Markers of Quality. *Food Chemistry* 114: 1576-1582.
10. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 211) พ.ศ. 2543 เรื่อง น้ำผึ้ง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 118 ตอนพิเศษ 6ง. 24 มกราคม 2544. หน้า 96-98.
11. Bogdanov, S. 2002. Harmonised Methods of the International Honey Commission. Available from URL: [http://www.apiculturacluj.com/ApiculturaCluj/italiano/Documents/IHCmethods\\_e.pdf](http://www.apiculturacluj.com/ApiculturaCluj/italiano/Documents/IHCmethods_e.pdf). 20 March 2011.
12. Unger, K. K., Skudas, R., and Schulte, M. M. 2008. Particle Packed Columns and Monolithic Columns in High-Performance Liquid Chromatography-Comparison and Critical Appraisal. *Journal of Chromatography A* 1184: 393-415.
13. Carme, R., José, M. H. M., and Clara, R. 2006. Analysis of Prominent Flavonoid Aglycones By High-Performance Liquid Chromatography Using a Monolithic Type Column. *Journal of Chromatography A* 1131: 51-57.
14. Barbero, G. F., Liazid, A., Palma, M., and Barroso, C. G. 2008. Fast Determination of Capsaicinoids from Peppers by High-Performance Liquid Chromatography Using a Reversed Phase Monolithic Column. *Food Chemistry* 107: 1276-1282.
15. Khayoon, W. S., Saad, B., Salleh, B., Ismail, N. A., Abdul M. N. H., and Abdul, L. A. 2010. A Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Fumonisin B1 and B2 in Food and Feed Using Monolithic Column and Positive Confirmation By Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 679: 91-97.
16. Tzanavaras, P. D., Zacharis, C. K., and Themelis, D. G. 2010. Rapid Determination of Methylxanthines in Real Samples by High-Performance Liquid Chromatography Using the New FastGradient® Narrow-Bore Monolithic Column. *Talanta* 81: 1494-1501.
17. Berthod, A., Ruiz-Ángel, M. J., and Carda-Broch, S. 2008. Ionic Liquids in Separation Techniques. *Journal of Chromatography A* 1184: 6-18.
18. Xiaohua, X., Liang, Z., Liu, X., and Jiang, S. 2004. Ionic Liquids as Additives in High Performance Liquid Chromatography Analysis of Amines and the Interaction Mechanism of Ionic Liquids. *Analytica Chimica Acta* 519: 207-211.
19. He, L., Zhang, W., Zhao, L., Liu, X., and Jiang, S. 2003. Effect of 1-Alkyl-3-Methylimidazolium-Based Ionic Liquids as the Eluent on the Separation of Ephedrine by Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* 1007: 39-45.

ได้รับบทความวันที่ 11 มีนาคม 2556

ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 29 เมษายน 2556

