ว. กรมวิทย. พ. 2539. 38(3) : 231-239

การใช้เอชพีแอลซีเพื่อตรวจวิเคราะห์น้ำตาลในอาหาร

Use of HPLC for the Analysis of Sugars in Food

อุดมเกียรติ พรรธนประเทศ
ศรีสิทธิ์ การุณยะวนิช

กองวิเคราะห์อาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Udomkiat Punthanaprated
Srisit Karunyavanij

Division of Food Analysis
Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

วิธีเอชพีแอลซี ใช้สำหรับแยกชนิดและตรวจสอบปริมาณน้ำตาลในอาหาร เช่น กลูโคส ฟรุคโทส ซูโครส มอลโทส แลคโทส เมลิไบโอส สทาชิโอส แรฟฟิโนส เป็นต้น รวมทั้งน้ำตาลสังเคราะห์ เช่น ซัยคลาเมต แอสพาร์เทม ซัคคาริน สทิวิโอไซด์ อะซีซัลเฟม เค อะลิเทม และดัลซิน โดยการใช้คอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาล วัดปริมาณด้วยเครื่องตรวจวัดสาร ปกติจะใช้เครื่องตรวจวัดสารชนิดวัดดัชนีการหักเหแสงหรือชนิดอุลตร้าไวโอเล็ต ประสิทธิภาพวิธีของน้ำตาลแต่ละชนิดส่วนใหญ่มากกว่าร้อยละ 98 วิธีนี้ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว ง่าย มีความจำเพาะและประยุกต์ใช้กับอาหารต่าง ๆ ได้หลายชนิด

ABSTRACT

HPLC method is presented for separating and determining sugars in food, such as glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose, melibiose, stachyose, raffinose, etc. Artificial sweeteners, such as cyclamate, aspartame, saccharin, stevioside, acesulfame K, alitame and dulcin are also included. A variety of column and mobile phase, which depend on the kind of sugars, are used. Sugars are quantitated by detector, normally with refractive index or ultraviolet detector. By this method, almost all of these sugars are recovered more than 98%. This method is fast, simple, specific and applicable to various kind of food.

Key words : HPLC, Sugars, Food, Analytical method.

บทนำ

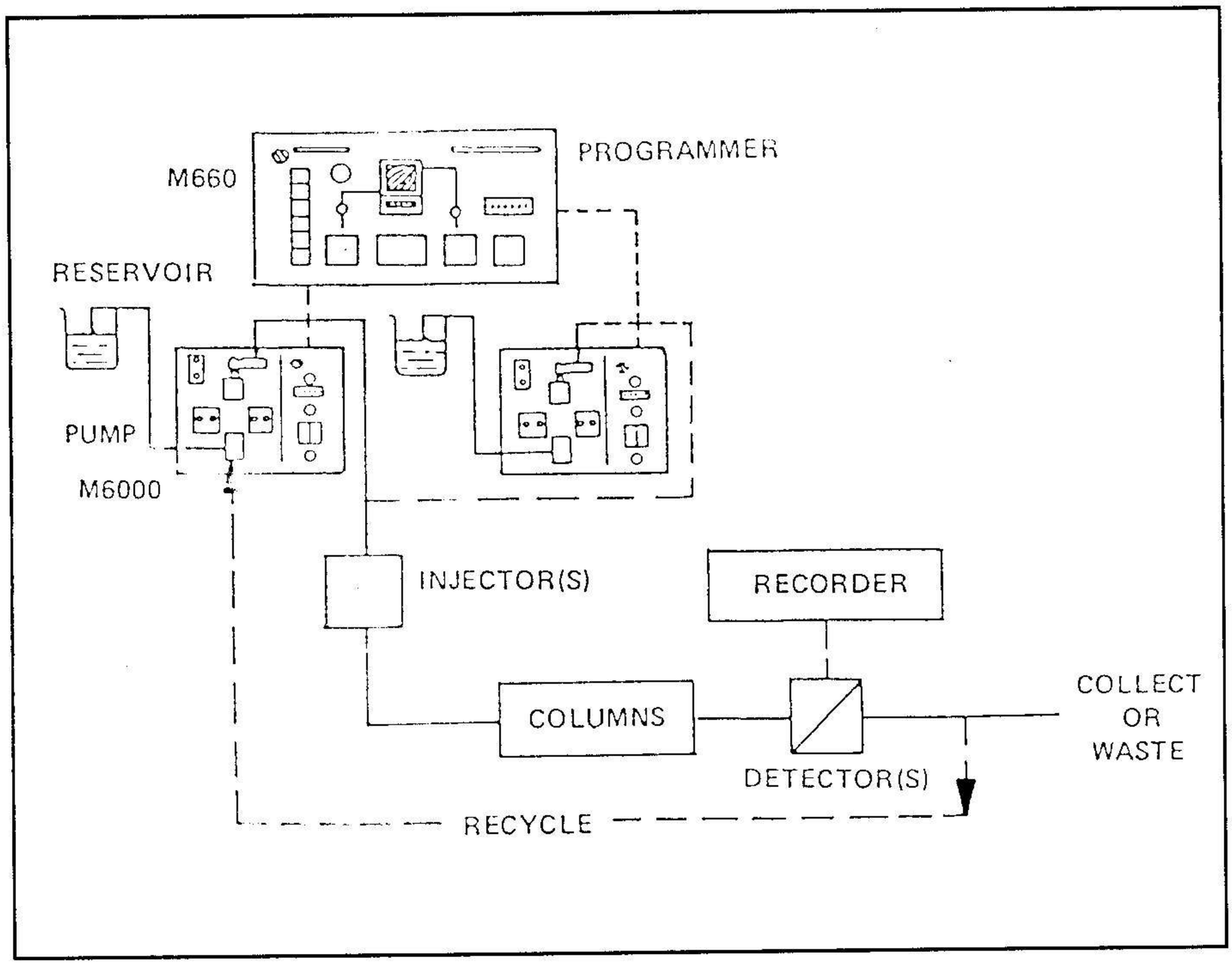
ห้องปฏิบัติการตรวจสอบ เป็นหัวใจสำคัญของงานคุ้มครองผู้บริโภค ความพร้อมของห้องปฏิบัติการทั้ง เรื่องของบุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถ วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ และเครื่องมือที่ใช้ตรวจสอบ จะมีผลต่อการควบคุมคุณภาพอาหารให้ได้มาตรฐาน และปลอดภัยต่อผู้บริโภค และยังมีผลต่อการสนับสนุนยกระดับมาตรฐานการผลิตของผู้ประกอบการให้ได้มาตรฐานสากล โดยผู้ประกอบการผลิตอาหารจะได้รับทราบข้อมูล รายละเอียดของสารอาหารในผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตขึ้นมา และใช้เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่ ๆ เพิ่มเติม ตัวอย่างเช่น การระบุชนิดและปริมาณน้ำตาลบนฉลากอาหาร จะทำให้ผู้บริโภคที่มีปัญหาเรื่องโรคอ้วนหรือโรคเบาหวานได้ระมัดระวังในการเลือกซื้ออาหารมาบริโภค และผู้ประกอบการจะใช้เป็นข้อมูลเพื่อการผลิตอาหาร เนื่องจากน้ำตาลเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีในอาหาร (browning reaction) ซึ่งจะมีผลกระทบต่อกลิ่น รส และสีของอาหารในระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษาอาหาร เป็นต้น

เทคนิคการตรวจสอบน้ำตาลในอาหารจึงมีความสำคัญมาก ที่จะให้ข้อมูลที่ถูกต้องและรวดเร็ว ถึงแม้ว่าจะมีวิธีตรวจสอบทางเคมี เอ็นไซม์หรือเทคนิคทางโครมาโตกราฟีอื่น ๆ เช่น แก๊สโครมาโตกราฟี ส่วนใหญ่จะใช้เวลาตรวจสอบค่อนข้างนาน และมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ต้องเตรียมสารอนุพันธ์ (derivative) เป็นต้น การตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลในอาหารโดยวิธีเอชพีแอลซี เป็นเทคนิคที่น่าสนใจ เนื่องจากให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงควรที่จะมาทำความเข้าใจเกี่ยวกับเครื่องเอชพีแอลซี และการนำมาใช้กับงานตรวจสอบน้ำตาลในอาหาร เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านอื่น ๆ ต่อไป

ส่วนประกอบของเครื่องเอชพีแอลซี

เครื่องโครมาโตกราฟชนิดของเหลวความดันสูง (high pressure liquid chromatograph) เป็นเครื่องมือที่ต้องใช้ความดันสูง อาจสูงถึง 7,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) แต่เมื่อนำมาใช้งานจะพิจารณาถึงความมีประสิทธิภาพสูงมากกว่าความดันสูง จึงมักเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เครื่องโครมาโตกราฟชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatograph) ซึ่งทั้ง 2 ชื่อ ไม่แตกต่างกันแต่อย่างใด คือหมายถึง เครื่องเอชพีแอลซี (HPLC) เหมือนกัน

ระบบพื้นฐานของเครื่องประกอบด้วย[1,2] (ภาพที่ 1) ส่วนบรรจุสารละลาย (reservoir) หรือภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ปั๊ม (pump) เป็นตัวขับดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลด้วยอัตราการไหล (flow rate) คงที่ผ่านท่อไปยังเครื่องฉีดสาร (injector) ซึ่งเป็นจุดที่ฉีดตัวอย่างเข้าสู่ระบบของเครื่องมือ แล้วไหลผ่านคอลัมน์ (column) ซึ่งเป็นหัวใจสำคัญของเครื่องมือ ทำหน้าที่แยกสารผสมออกจากกัน ตามคุณสมบัติที่แตกต่างกันของสาร แต่ละชนิดสู่เครื่องตรวจวัดสาร (detector) ที่จะตรวจวัด ปริมาณสารที่ผ่านเข้ามา ที่ใช้งานค่อนข้างมากเป็นชนิดอุลตร้าไวโอเล็ต (Ultraviolet, UV) และชนิดวัดดัชนีการหักเหแสง (refractive index, RI) แล้วส่งสัญญาณไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ (recorder) สำหรับบันทึกธรรมชาติและระดับการแยกของสารชนิดต่างๆ นอกจากนี้อาจมีส่วนประกอบอื่นเพิ่มเติม เช่น เครื่องควบคุมการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างวิเคราะห์สาร (programmer) เพื่อให้การแยกของสารดีขึ้น



ภาพที่ 1 แผนภูมิของระบบเอชพีแอลซี

หลักการแยกสาร[3] จะอาศัยคุณสมบัติการมีสัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (distribution coefficient) ที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิดระหว่างเฟสเคลื่อนที่ขณะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ ด้วยอัตราเร็วคงที่ กับเฟสนิ่ง (stationary phase) ซึ่งเป็นของเหลวเคลือบอยู่บนสารพยุง (solid support) หรือเกิดพันธะทางเคมีกับสารพยุง เทคนิคนี้เป็นการแยกสารแบบพาทิชั่น (partition) ส่วนการแยกสารแบบอื่น ๆ เช่น การดูดซับ (adsorption) และการแลกเปลี่ยนอิออน (ion exchange) จะอาศัยคุณสมบัติการดูดซับและการแทนที่ของอิออนที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิด บนเฟสนิ่งที่เป็นของแข็งหรือของเหลว จากการมีเทคนิคการแยกหลายแบบ (mode) รวมทั้งความสำเร็จของการพัฒนาสารบรรจุในคอลัมน์ (packing material) และระบบปั๊ม ทำให้สามารถแยกสารชนิดต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตั้งแต่สารที่ปริมาณน้อยมากในอาหาร เช่น สารเคมีกำจัดศัตรูพืช วัตถุเจือปนอาหาร สารปนเปื้อน และสารให้กลิ่นรสต่าง ๆ (flavor substances) จนไปถึงสารอาหารที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน เป็นต้น การแยกองค์ประกอบของตัวอย่าง จะเกิดขึ้นภายในคอลัมน์ ซึ่งปกติทำด้วยเหล็กปลอดสนิมมีความยาว 10-30 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4-6 มิลลิเมตร และขนาดของสารบรรจุภายในคอลัมน์ (packing size) ที่เหมาะสมเท่ากับหรือน้อยกว่า 5 ไมครอน (μm)

การนำมาใช้ตรวจสอบน้ำตาลในอาหาร

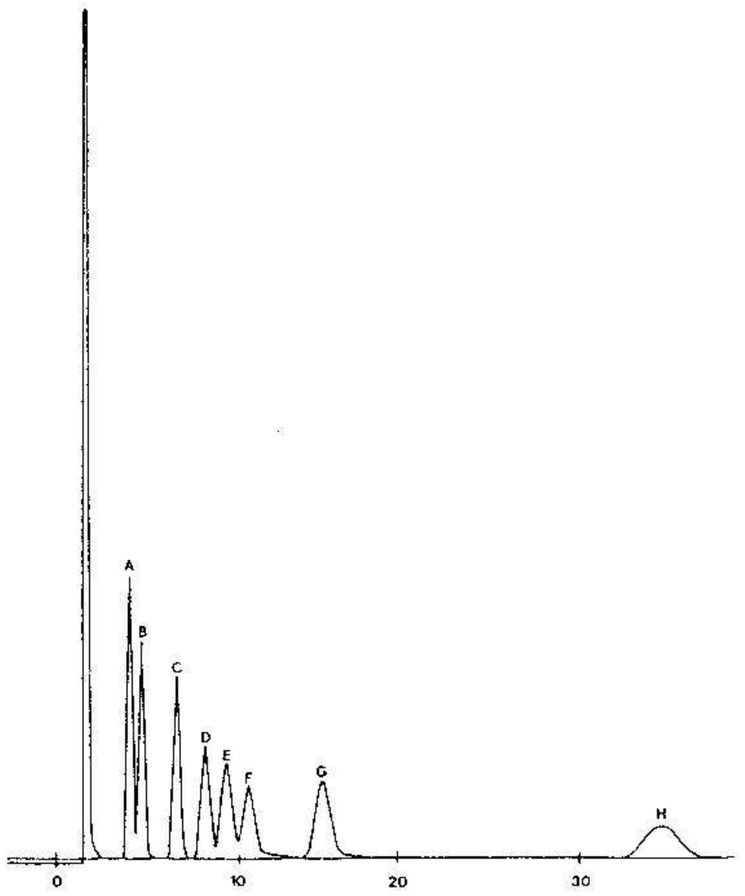
เครื่องเอชพีแอลซี มีประโยชน์ต่องานตรวจสอบน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในอาหารได้อย่างกว้างขวาง สามารถตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลที่มีโมเลกุลเล็ก เช่น กลูโคส (glucose) ฟรุคโทส (Fructose) ซูโครส

(sucrose) ไปจนถึงน้ำตาลที่มีโมเลกุลใหญ่ที่เกิดจากการยึดเกาะกันของกลูโคสจำนวนมาก เช่น 10 โมเลกุล (degree of polymerization, DP10) เป็นต้น โดยให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้อง รวดเร็ว การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้กับเครื่องมือค่อนข้างง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และการวิเคราะห์ส่วนใหญ่ทำที่อุณหภูมิห้องปกติ ในระบบของเครื่องเอชพีแอลซีที่ใช้ตรวจสอบน้ำตาล นิยมใช้เครื่องตรวจวัดสารชนิดวัดดัชนีการหักเหแสงแต่จะใช้คอลัมน์สำหรับแยกชนิดน้ำตาล และอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ต่าง ๆ กันขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร

น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหรือเติมลงไปในอาหาร เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรุคโทส มอลโทส และแลคโทส มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ เสริมรสหวานให้กับอาหาร น้ำตาลแต่ละชนิดมีระดับความหวาน (relative sweetness) เท่ากับ 100, 70, 130-180, 50 และ 15-30 ตามลำดับ[4] โดยฟรุคโทสมีความหวานมากที่สุด รองลงมาคือซูโครส และหวานน้อยที่สุดในกลุ่มนี้คือ แลคโทส เครื่องเอชพีแอลซีสามารถตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างการตรวจสอบ มีดังนี้

Linden และ Lawhead[5] ได้ศึกษาการแยกน้ำตาลผสมของเดกซ์โทรส (dextrose) ซูโครส และแรฟฟิโนส (raffinose) ด้วยคอลัมน์ Bondapak AX/Corasil และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของน้ำ เอทิลอะซีเทต (ethyl acetate) และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ในอัตราส่วน 25 ต่อ 50 ต่อ 35 ได้อย่างชัดเจน และได้ศึกษาการแยกน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ด้วยคอลัมน์ชนิดคาร์โบไฮเดรต (micro Bondapak Carbohydrate) และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซีโทไนไทรล์และน้ำ (acetonitrile-water) ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 75 ต่อ 25 จนถึง 90 ต่อ 10 ซึ่งจะให้ผลการแยกน้ำตาลและเวลาต่าง ๆ กัน โดยขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาลเป็นสำคัญ Rabel และคณะ[6] ได้ศึกษาการแยกน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ด้วยคอลัมน์ Partisil-10 PAC ซึ่งเป็น silica gel ที่เกิดพันธะทางเคมีกับ Organochlorosilanes โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซีโทไนไทรล์ และน้ำในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยปริมาตร และปรับค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5.0 ด้วยกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) สามารถแยกน้ำตาลไซโลส (Xylose) ฟรุคโทส กลูโคส ซูโครส และแลคโทส ได้ภายในเวลา 24 นาที แต่ถ้าใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซีโทไนไทรล์ และโซเดียมอะซีเทต ($NaC_2H_3O_2$) ความเข้มข้น 0.0025 โมลาร์ ในอัตราส่วน 65 ต่อ 35 แล้วปรับค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5.0 ด้วยกรดอะซิติค (CH_3COOH) สามารถแยกน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ได้หลายชนิด

Thean และ Funderburk[7] วิเคราะห์ปริมาณซูโครสในน้ำผึ้งโดยใช้คอลัมน์ชนิดคาร์โบไฮเดรต และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซีโทไนไทรล์และน้ำในอัตราส่วน 83 ต่อ 17 โดยปริมาตร ประสิทธิภาพวิธี (recovery) ร้อยละ 97 Hurst และ Martin[8] สกัดน้ำตาลในผลิตภัณฑ์นมช็อกโกแลตด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 85-90° ซ วิเคราะห์ปริมาณด้วยเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นสารละลายผสมของอะซีโทไนไทรล์ และน้ำในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ได้น้ำตาลซูโครสและแลคโทส โดยมีประสิทธิภาพวิธีร้อยละ 97.4 และ 97.0 ตามลำดับ Dunmire และ Otto[9] สกัดน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น อาหารเด็กอ่อน ธัญพืช ผลไม้แปรรูป อาหารหมักดอง เป็นต้น ด้วยสารละลายผสมของแอลกอฮอล์และน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซีโทไนไทรล์และน้ำ ในอัตราส่วน 75 ต่อ 25 สามารถแยกน้ำตาลฟรุคโทส กลูโคส ซูโครส มอลโทส แลคโทส เมลิไบโอส (melibiose) แรฟฟิโนสและสทาชิโอส (stachyose) ได้อย่างเป็นผลสำเร็จ ภายในเวลา 45 นาที โดยมีขีดจำกัดของการวัด (limit of detection) น้ำตาลแต่ละชนิดดังกล่าวร้อยละ 0.15, 0.18, 0.20, 0.33, 0.37, 0.47, 0.50 และ 1.25 ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

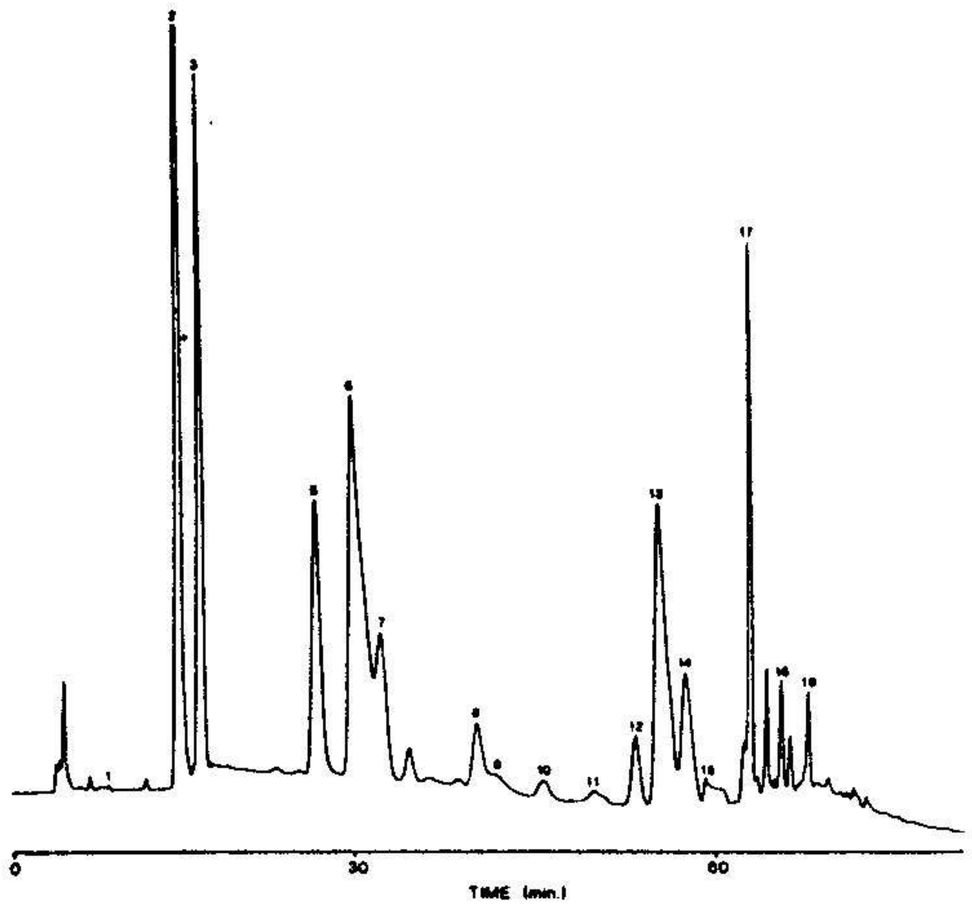


ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของน้ำตาลมาตรฐาน A = ฟรุคโทส; B = กลูโคส C = ซูโครส ; D = มอลโทส; E = แลคโทส F = เมลิไบโอส; G = แรฟฟิโนส ; H = สทาชิโอส

Johncock และ Wagstaffe[10] สกัดน้ำตาลในขนมหวาน (confectionery) ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 40 วิเคราะห์ปริมาณด้วยคอลัมน์ Lichrosorb เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซีโทไนไทรล์ความเข้มข้นร้อยละ 65-73 ในน้ำ ซึ่งเติมสารเอมีน (amine modifier) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยมีกลัยเซอรอล (glycerol) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ (internal standard) Ghernati และคณะ[11] ได้ศึกษาการแยกน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ และไตรแซคคาไรด์ด้วยคอลัมน์ micro Bondapak NH2 และเฟสเคลื่อนที่ต่าง ๆ กัน สำหรับโมโนแซคคาโรด์ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ อะซีโทไนไทรล์ น้ำ และกรดอะซิติค ในอัตราส่วน 90 ต่อ 9 ต่อ 1 ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลอีกสองประเภทใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซีโทไนไทรล์และน้ำในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยปริมาตร แต่เมื่อใช้การแยกแบบเกรเดียนท์ (gradient elution) จะสามารถแยกน้ำตาลได้ทั้ง 3 ประเภทรวม 9 ชนิด จึงนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลในน้ำผึ้งได้เป็นผลสำเร็จ การเตรียมตัวอย่างค่อนข้างง่าย โดยการเจือจางด้วยสารละลายผสมของน้ำและอะซีโทไนไทรล์ในอัตราส่วน 50 ต่อ 46 โดยปริมาตร Vidalvalverde และคณะ[12] ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ โดยการใช้คอลัมน์ Sugar Pak ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 85 °ซ และใช้น้ำกลั่น (bidistilled water) เป็นเฟสเคลื่อนที่ สามารถแยกน้ำตาลในเครื่องดื่มได้อย่างชัดเจน ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโทส

Brooks และ Griffin[13] สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลได้ถึง 10 ชนิด (DP1-DP10) ในตัวอย่างคอร์นไซรัปโซลิด (Corn syrup solids) และมอลโทเดกซ์ทริน (maltodextrins) ด้วยคอลัมน์ Resolve C18 ซึ่งบรรจุในRadial Compression Module 100 (RCM-100) และใช้น้ำซึ่งผ่านเครื่องกรอง Melli Q เป็นเฟสเคลื่อนที่ Swallow และ Low[14] ได้ศึกษาชนิดและปริมาณคาร์ไบไฮเดรตในน้ำผึ้ง ซึ่งปกติประกอบด้วยกลูโคสและฟรุคโทสรวมกัน ประมาณร้อยละ 85-95 ของน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลไดแซคคาไรด์และไตรแซคคาไรด์รวมกันไม่น้อยกว่า 20 ชนิด โดยใช้คอลัมน์ชนิด Dionex 10 μm Carbo Pac PA1 pellicular anionexchange 2 อันต่อกันแบบอนุกรม การแยกเป็นแบบเกรเดียนท์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือผสมกับโซเดียมอะซีเทต มีความเข้มข้นและสัดส่วนต่าง ๆ กันตามช่วงเวลาที่ใช้แยกชนิดน้ำตาล ตรวจวัดด้วยเครื่อง pulse amperometric detector

สามารถแยกชนิดน้ำตาลได้ประมาณ 20 ชนิด (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของคาร์โบไฮเดรตในน้ำผึ้ง ชนิดน้ำตาลที่สำคัญ มีดังนี้ 2 = กลูโคส; 3 = ฟรุคโทส; 5 = มอลทูโลส (maltulose) ; = 6 ซูโครส; 13 = เคสโทส (1- Kestose) 17 = เออโลส (erlose)

สำหรับน้ำตาลที่สังเคราะห์ขึ้นมา (artificial sweetener) เช่น ซัยคลาเมต (cyclamate) แอสพาร์เทม (aspartame) อะซีซัลเฟม เค (acesulfame K) สทิวิโอไซด์ (stevioside) ซูคราโลส (sucralose) ซัคคาริน (saccharin) และอะลิเทม (alitame) มีความหวานเป็น 30, 180, 130, 300, 600, 300 และ 2,000 เท่าของความหวานซูโครสตามลำดับ[15] น้ำตาลเหล่านี้มีความสำคัญต่อผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน และผู้บริโภคที่ต้องการอาหารที่ให้พลังงานต่ำ เพื่อการลดน้ำหนัก หลายประเทศอนุญาตให้ใช้น้ำตาลเหล่านี้ในอาหาร สำหรับประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขจะห้ามใช้สารให้ความหวานแทนน้ำตาล (ซูโครส) ในอาหารควบคุมเฉพาะทุกชนิด ยกเว้นซัยคลาเมตที่สามารถใช้เจือปนในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อการส่งออกเท่านั้น วิธีการตรวจสอบชนิดและปริมาณจึงมีความสำคัญเพื่อควบคุมคุณภาพอาหารหรือมาตรฐานให้เป็นไปตามที่กฎหมายกำหนด ตัวอย่างการตรวจสอบมีดังนี้

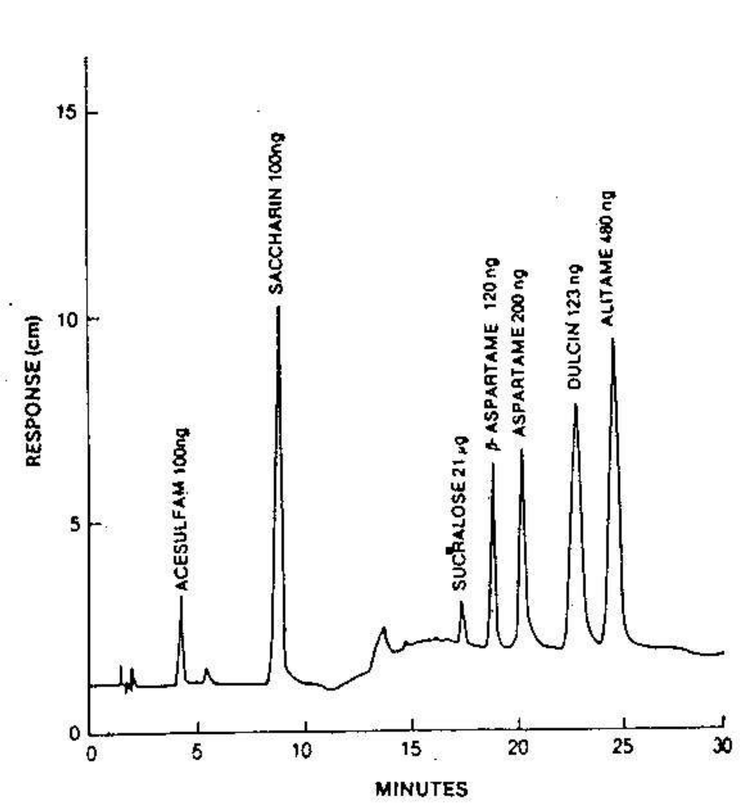
Herrmann และคณะ[16] วิเคราะห์ปริมาณซัยคลาเมตในอาหาร เช่น เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ โยเกิร์ต ช็อกโกแลต เป็นต้น การเตรียมตัวอย่างที่เป็นของเหลวให้กรองและฉีดเข้าเครื่องโดยตรง ตัวอย่างที่ข้นหนืดหรือเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำร้อน และทำให้ใสด้วยสารละลายคาร์เรซ (carrez solution) สำหรับตัวอย่างที่เตรียมแล้วไม่ใสพอหรือตัวอย่างที่มีปริมาณซัยคลาเมตน้อยให้สกัดด้วยเอทิลอะซีเทต วิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยคอลัมน์ Lichrosorb RP-18 กรณีตัวอย่างมีซัยคลาเมตและซัคคารินเจือปนให้ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเตตราบิวทิลแอมโมเนียมพารา โทลูอีนซัลโฟเนต (tetrabutylammonium p-toluenesulphonate) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมล ผสมกับเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 12 กรณีตัวอย่างมีซัยคลาเมต ซัคคาริน แอสพาร์เทม และดัลซินเจือปน จะใช้คอลัมน์ Hypersil MOS (เทียบเท่ากับ RP-8) และเฟสเคลื่อนที่จะเหมือนกัน เพียงแต่เปลี่ยนความเข้มข้นของเมทานอลเป็นร้อยละ 8 วัดปริมาณด้วยเครื่องตรวจวัดสารชนิดอุลตร้าไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 260 นาโนมิเตอร์ ประสิทธิภาพวิธีของสารให้รสหวานแต่ละชนิดร้อยละ 91

Tyler[17] วิเคราะห์ปริมาณโซเดียมซัคคาริน

แคฟเฟอีน แอสพาร์เทมและโซเดียมเบนโซเอตในเครื่องดื่มโคล่าด้วยคอลัมน์ μBondapak C18 และเฟส เคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซีโทไนไทรล์ ความเข้มข้นร้อยละ 15 ในไตรเอทิลแอมโมเนียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (triethyl-ammoniumphosphate buffer) แล้วปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.3 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (1 N NaOH) วัดปริมาณด้วยเครื่องตรวจวัดสารชนิดอุลตร้าไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 214 นาโนมิเตอร์ สามารถแยกสารแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจนภายในเวลา 10 นาที และประสิทธิภาพวิธีของสารแต่ละชนิดดังกล่าวร้อยละ 97.8, 100.7, 100.0 และ 100.4 ตามลำดับ Tsang และคณะ[18] วิเคราะห์ปริมาณแอสพาร์เทม และสารที่เกิดจากการสลายตัวของแอสพาร์เทม ในเครื่องดื่มควบคุมน้ำหนักด้วยคอลัมน์ μ Bondapak C18 และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซีโทไนไทรล์ และฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.0125 โมลาร์ (0.0125 M KH_2PO_4) ในอัตราส่วน 10 ต่อ 90 โดยปริมาตร ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องตรวจวัดสารชนิดอุลตร้าไวโอเล็ต ประสิทธิภาพวิธีของแอสพาร์เทมร้อยละ 99.5

Fujinuma และคณะ[19] วิเคราะห์ปริมาณสทิวิโอไซด์ในเครื่องดื่มและอาหาร โดยใช้น้ำสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์แก้วซึ่งบรรจุ silica gel 60 silanized วิเคราะห์ปริมาณด้วยคอลัมน์ Jasco Finepak Sil NH_2 และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซีโทไนไทรล์ และน้ำในอัตราส่วน 200 ต่อ 45 โดยปริมาตร · โดยมีเตตราบิวทิลแอมโมเนียมฟอสเฟตเจือปนในระดับความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องตรวจวัดสารชนิดอุลตร้าไวโอเล็ต สทิวิโวไซด์จะออกมาที่เวลา 11.2 นาที ขีดจำกัดของการวัด 0.25 ไมโครกรัมและประสิทธิภาพวิธีร้อยละ 97.8-100.3 Lawrence และ Charbonneau[20] ศึกษาวิธีวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาล 7 ชนิดคือ แอสพาร์เทม ซัคคาริน ซัยคลาเมต อะลิเทม อะซีซัลเฟม เค ซูคราโลส และดัลซิน (dulcin) ด้วยคอลัมน์ Supelcosil LC-18 และเฟสเคลื่อนที่เป็นแบบเกรเดียนท์ประกอบด้วยเฟสเคลื่อนที่ A ซึ่งเป็นสารละลายผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ และ อะซีโทไนไทรล์ ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 และเฟสเคลื่อนที่ B ซึ่งเป็นสารละลายผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ และอะซีโทไนไทรล์ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องตรวจวัดสารชนิดอุลตร้าไวโอเล็ต สามารถแยกน้ำตาลได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นซูคราโลส ซึ่งให้ความไวกับเครื่องตรวจวัดสารชนิดนี้ต่ำมาก (ภาพที่ 4) ประสิทธิภาพวิธีของอะซีซัลเฟม เค ซัคคาริน ดัลซินและแอสพาร์เทมที่เติมลงในเครื่องดื่มโคล่า สูงกว่าร้อยละ 98 นอกจากนี้ยังสามารถแยกสารเจือปนอื่นๆ ในเครื่องดื่ม เช่น แคฟเฟอีน กรดซอร์บิค และกรดเบนโซอิคออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยไม่รบกวนกับน้ำตาลที่กำลังศึกษา

ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของน้ำตาลมาตรฐาน



สรุป

เครื่องเอชพีแอลซี สามารถตรวจสอบชนิดและปริมาณน้ำตาลในอาหารได้อย่างเป็นผลสำเร็จ โดยการเลือกใช้คอลัมน์ และเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมตามชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร ถ้าหากห้องปฏิบัติการสามารถนำมาประยุกต์ใช้แทนวิธีการเดิมที่ใช้เป็นประจำ จะทำให้ผลการตรวจสอบถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วยิ่งขึ้น ถึงแม้ว่าเครื่องมือชนิดนี้จะมีราคาแพง แต่จะให้ประโยชน์ที่คุ้มค่าต่องานคุ้มครองผู้บริโภค และผู้ประกอบการผลิตอาหารที่จะได้รับทราบข้อมูลที่ถูกต้อง และเป็นแนวทางสำหรับพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่ๆ ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Conrad, E.C. and Fallick, G.J. 1974. High pressure liquid chromatography and its application in the brewing laboratory. Brewers Dig. 49 (1) : 72-80.
2. Hamilton, R.J. and Sewell, P.A. 1982. Introduction to high performance liquid chromatography. 2 nd (eds.), Chapman and Hall Ltd, New York, p.247.
3. Braithwaite, A. and Smith, F.J. 1985. Chromatographic methods. 4 th (eds.), Chapman and Hall Ltd, London, p. 414.
4. Godshall, M.A.1988. The role of carbohydrates in flavor development. Food Technol. 42 (11) : 71-78.
5. Linden, J.C. and Lawhead, C.L.1975. Liquid chromatography of saccharide. J. Chromatogr. 105 : 125-133.
6. Rabel, F.M., Caputo, A.G. and Butts, E.T.1976. Separation of carbohydrates on a new polar bonded phase material. J. Chromatogr. 126 : 731-740.
7. Thean, J.E. and Funderburk, W.C.1977. High pressure liquid chromatographic determination of sucrose in honey. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60 (4) : 838-841.
8. Hurt, W.J. and Martin, R.A.1977. Rapid high pressure liquid chromatographic determination of carbohydrates in milk chocolate products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60 (5) : 1180-1184.
9. Dunmire, D.L. and Otto, S.E.1979. High pressure liquid chromatographic determination of sugars in various food products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62 (1) : 176-185.
10. Johncock, S.I.M. and Wagstaffe, P.J.1980. Improvements in the determination of sugars in confectionery by high-performance liquid chromatography. Analyst. 105 : 581-588.
11. Ghernati, H.M., Abdeddaim, K.and Guermouche, M.H.1982. Rapid HPLC methods for the separation and quantitation of a mono-, di-, and tri-saccharides mixture and application. J. Liq. Chromatogr. 5 (9) : 1725-1748.
12. Vidal-Valverde, C., Valverde, S. and Martin-Villa, C.1985. High performance liquid chromatographic determination of soluble carbohydrates in commercial drinks. J. Sci. Food Agric. 36 : 43-48.
13. Brooks, J.R. and Griffin, V.K. 1987 Saccharide analysis of corn syrup solids and maltodextrins using high-performance liquid chromatography. Cereal Chem. 64 (4) : 253-255.
14. Swallow, K.W. and Low, N.H.1990. Analysis and

quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 38 (9) : 1828-1832.

15. Jones, J.M.1992. Food Safety. Eagan Press, Minnesota, p.203-229.
16. Herrmann, A., Damawandi, E. and Wagmann, M.1983. Determination of cyclamate by high-performance liquid chromatography with indirect photometry. J.Chromatogr. 280 : 85-90.
17. Tyler, T.A.1984. Liquid chromatographic determination of sodium saccharin, caffeine, aspartame and sodium benzoate in cola beverages. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67 (4) : 745-747.
18. Tsang, W., Clarke, M.A. and Parrish, F.W. 1985. Determination of aspartame and its break down products in soft drinks by reverse-phase chromatography with UV detection. J. Agric. Food Chem. 33(4) : 734-738.
19. Fujinuma, K., Saito, K., Nakazato, M., Kikuchi, Y., Ibe, A. and Nishima, T. 1986. Thin layer chromatographic detection and liquid chromatographic determination of stevioside and rebaudioside A in beverages and foods following reverse phase column chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69 (5) : 799-802.
20. Lawrence, J.F. and Charbonneau, C.F.1988. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71 (5): 934-937.