การพัฒนาระบบตรวจสอบสารอาหารในอาหารไทยโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางประสิทธิภาพสูง

โดย

ยุทธนา วรวุธ

ภูษิต แสงประดับ

สนับสนุนงบประมาณโดย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2558

DEVELOPMENT OF SYSTEMS FOR DETERMINATION OF NUTRIENTS IN THAI FOODS BY HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

By

Yuttana Worawut

Phusit Sangpradub

Granted by

Rajamangala University of Technology Rattanakosin

Fiscal year 2015

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ขอขอบคุณ รศ.ดร.วันชัย ดีเอกนามกูล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาแนะนำและให้คำปรึกษาปัญหาที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ขอขอบคุณ ดร.กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่อำนวยความสะดวกให้งานวิจัยดำเนินไปอย่างเรียบร้อย อีกทั้งยังตรวจสอบแก้ไขงานวิจัยนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ และเป็นกำลังใจด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ คณะศิลปศาสตร์ และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ได้อำนวยความสะดวก ให้คำปรึกษาแนะนำ ในการดำเนินงานต่าง ๆ ด้วยดีมาตลอด

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณเพื่อการวิจัยในครั้งนี้

ยุทธนา วรวุธ และคณะ

กรกฎาคม 2559

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : Social 012/2558

ชื่อโครงการ : การพัฒนาระบบตรวจสอบสารอาหารในอาหารไทยโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางประสิทธิภาพสูง

ชื่อนักวิจัย : ดร.ยุทธนา วรวุธ นายภูษิต แสงประดับ

ได้พัฒนาระบบตรวจสอบสารอาหารในตัวอย่างอาหารไทยโดยใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) และวิเคราะห์โดยเทคนิค TLC densitometry ซึ่งได้พัฒนาระบบวิเคราะห์สารอาหาร 3 ชนิดได้แก่ essential oils, polar compounds และ กรดอะมิโนพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ essential oils ได้แก่การใช้ chloroform เป็นตัวทำละลาย stationary phase คือ silica gel 60F และ mobile phase คือ Toluene: Ethyl acetate ในอัตราส่วน 85:15 จากนั้นทำการ derivatization แผ่น TLC ที่ผ่านการ develop แล้วด้วยการทำปฏิกิริยากับไอโอดีนและตรวจวิเคราะห์การประสิทธิภาพแยกสารอาหารด้วยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 254 nm ในการวิเคราะห์ polar compounds พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้น้ำกลั่นหรือ Formic acid เป็นตัวทำละลายโดยมี stationary phase คือแผ่น TLC ชนิด silica gel 60F และ mobile phase คือ Ethyl acetate: Formic: Acetic acid: dH2O ในอัตราส่วน 100:11:11:26 ทำการตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกด้วยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 366 nm การวิเคราะห์กรดอะมิโนมาตรฐานพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้แก่ stationary phase คือแผ่น TLC ชนิด silica gel 60F และ mobile phase คือ n-butanol : acetic acid : water : methanol ในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 : 1 ตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกด้วยการทำปฏิกิริยากับ Iodine และ Ninhydrin solution และถ่ายภาพโดยใช้แสงขาว นอกจากนี้ผลการทดลองจากการทำ TLC densitometry พบว่าหากเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มที่มีสภาพขั้วแบบเดียวกันจะมี absorption spectrum ที่คล้ายคลึงกันแต่จะมีค่า Rf ที่ไม่เท่ากัน ซึ่งแสดงว่าระบบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจสอบกรดอะมิโนแต่ละชนิดได้ค่อนข้างจำเพาะ

คำสำคัญ: โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง, การวิเคราะห์อาหาร

E-mail Address : yuttana.wor@rmutr.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : ตุลาคม พ.ศ. 2557 – กันยายน พ.ศ. 2558

Abstract

Code of project : Social 012/2558

Project name : Development of systems for determination of nutrients in Thai foods by high performance thin layer chromatography

Researcher : Dr.Yuttana Worawut, Mr.Phusit Saengpradub

Thin layer chromatography (TLC) was employed for detecting nutrients in Thai food and the results from TLC were evaluated by TLC densitometry technique. Three optimized systems for analyzing three groups of each nutrients i.e. essential oils, polar compounds and amino acids were developed. The optimized conditions for analyzing essential oils were as follows; the solvent for extraction was chloroform, the stationary phase was silica gel 60F TLC plate, the mobile phase system was toluene: ethyl acetate (85:15). The developed TLC plate was then subjected to derivatization by iodine and the efficiency for nutrient separation was visualized by photodocumentation under 254 nm light. The optimized conditions for polar compounds were as follows; the solvent for extraction was formic acid or distilled water, the stationary phase was silica gel 60F TLC plate, the mobile phase system was ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:26). The efficiency of nutrient separation was evaluated by visualization under 366 nm light. The optimized conditions for standard amino acids were as follows; the stationary phase was silica gel 60F TLC plate, the mobile phase system was n-butanol: acetic acid: water: methanol (4: 1: 1: 1). The developed TLC plate was subsequently derivatized by iodine and Ninhydrin solution. The efficiency of nutrient separation was evaluated by visualization under visible light. In addition, results from TLC densitometry indicated that there was a similarity in absorption spectrum among amino acids with the same polarity whereas their Rf values were different, suggesting that the developed system was specific for analyzing amino acids.

Keywords: Thin layer chromatography, Food analysis

E-mail Address : yuttana.wor@rmutr.ac.th

Period of project : October 2014 - September 2015

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	1
1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
2.2 การวิเคราะห์สารโดยเทคนิค TLC densitometry	5
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
บทที่ 3 การศึกษาและขั้นตอนดำเนินงาน	11
3.1 ตัวอย่างอาหารไทย	11
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	11
3.3 วัสดุและอุปกรณ์	11
3.4 ขั้นตอนดำเนินงาน	12
3.4.1 การสกัดสารอาหารจากอาหารตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์	12
3.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารอาหาร	12
3.4.4 การแยกสารอาหารโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)	13

3.4.5 การตรวจวิเคราะห์สารอาหารโดยวิธี TLC densitometry 13
3.4.6 การสร้างอนุพันธ์ (derivatization) ของสารอาหารโดยวิธี Iodine staining 13
3.4.7 การสร้างอนุพันธ์ (derivatization) ของสารอาหารโดยวิธี Ninhydrin staining 13

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 14
4.1. การเตรียมอาหารตัวอย่างด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) 14
4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารอาหาร 15
4.2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก essential oils จากอาหารตัวอย่าง 15
4.2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก polar compounds จากอาหารตัวอย่าง 17
4.2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก amino acids 19

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 23
5.1 สรุปผลการทดลอง 23
5.2 ข้อเสนอแนะ 23

บรรณานุกรม 26
ภาคผนวก 27
ประวัติผู้วิจัย 28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 โครมาโตกราฟีแบบต่าง ๆ	3
ตารางที่ 4.1 ค่า Retention Factor (Rf) ของกรดอะมิโนแต่ละชนิด	22

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดงการแต้มสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงบนแผ่น TLC 4
รูปที่ 2.2 แสดงการวางแผ่น TLC ที่แต้มด้วยสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงในถังแยกที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เพื่อทำการแยกสาร 4
รูปที่ 2.3 แสดงการแยกสารและตำแหน่งที่ใช้ในการคำนวณหาค่า Retention factor (Rf) 5
รูปที่ 2.4 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ของสารสกัดจากน้ำมันรำข้าว (gamma oryzanol) เทียบกับสารมาตรฐาน โดยวิเคราะห์โดยเทคนิค TLC densitometry 6
รูปที่ 2.5 แสดงการแยกสาร gamma oryzanol บนแผ่น TLC และถ่ายภาพภายใต้แสงความยาวคลื่น 366 nm 6
รูปที่ 2.6 แสดงการหาปริมาณสาร gamma oryzanol โดยการแสกนผ่านเครื่อง TLC densitometer 7
รูปที่ 2.7 TLC chromatogram แสดงการวิเคราะห์หาปริมาณ MSG 9
รูปที่ 2.8 TLC chromatogram แสดงการแยกสาร plaunotol จากสารสกัดหยาบ โดยวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 220 nm 10
รูปที่ 4.1 เครื่อง Freeze dryer (Dura-dry MP, FTS system) 14
รูปที่ 4.2 อาหารตัวอย่างหลังจากการผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง 15
รูปที่ 4.3 การแยก essential oils ในอาหารตัวอย่าง แสดงเปรียบเทียบระหว่างแผ่น TLC ที่ไม่มีการทำ derivatization และผ่านการ derivatization 16
รูปที่ 4.4 การแยก polar compounds ในอาหารตัวอย่าง แสดงเปรียบเทียบระหว่างแผ่น TLC ที่ไม่มีการทำ derivatization และผ่านการ derivatization 18
รูปที่ 4.5 การแยกกรดอะมิโนมาตรฐาน (standard amino acids) ทั้ง 20 ชนิด 20
รูปที่ 4.6 Absorption spectrum ของกรดอะมิโนมาตรฐาน 21

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เป็นที่ยอมรับกันว่าอาหารไทยนอกจากจะเป็นอาหารที่ได้รับความนิยมอย่างสูงทั่วโลก ยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูงอีกทั้งในบางรายการยังมีคุณสมบัติทางยา เนื่องจากประกอบด้วยสมุนไพรไทยหลายชนิดที่มักนำมาใช้ในตำรับยาแผนโบราณ อย่างไรก็ดีคุณค่าและคุณภาพของอาหารไทยในรายการเดียวกันอาจมีความแตกต่างกันไปตามคุณภาพของวัตถุดิบและสัดส่วนปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้ในการปรุงของแต่ละผู้ผลิต ดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการของอาหารจึงมีความสำคัญในการบ่งชี้และสามารถใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพในการผลิตเพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ในการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการในอาหารมักใช้เทคนิคที่มีความแม่นยำสูงเช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือ Gas Chromatography (GC) แต่เทคนิคเหล่านี้ต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์ของผู้วิเคราะห์ มีค่าใช้จ่ายสูงและวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนไม่มาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาระบบวิเคราะห์สารอาหารโดยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบางประสิทธิภาพสูง (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ได้ครั้งละหลายตัวอย่าง ให้ความแม่นยำและความไวในการวิเคราะห์ไม่แตกต่างจาก HPLC และ GC และมีคาใช้จ่ายต่ำในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเทคนิคนี้เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารอาหารในตัวอย่างต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาและพัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์สารอาหารโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางประสิทธิภาพสูง

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบและปริมาณของสารอาหารในสารสกัดตัวอย่างอาหารที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ บนแผ่น TLC โดยเทียบกับค่ามาตรฐานทางโภชนาการเพื่อเป็นข้อมูลในการควบคุมคุณภาพอาหารต่อไป

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

โครงการวิจัยนี้มีขอบเขตในการศึกษาวิจัยดังนี้คือ

1.3.1 ศึกษาวิธีการสกัดสารอาหารจากตัวอย่างอาหารและการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารอาหาร

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์สารอาหารแต่ละชนิด กล่าวคือการเลือกใช้ stationary phase และ mobile phase, วิธีการตรวจวิเคราะห์สารอย่างจำเพาะโดยการ derivertization หรือการส่องด้วยแสง Ultraviolet (UV), การวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารในสารสกัดโดยวิธี TLC densitometry โดยเทียบกับสารมาตรฐานและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารอาหารแต่ละชนิดโดยการแสกนสเปกตรัม (spectrum scanning)

1.3.3 เปรียบเทียบรูปแบบการแยกของสารอาหาร (band pattern) บนแผ่น TLC และวิเคราะห์ปริมาณของสารอาหารในสารสกัดตัวอย่างอาหาร รวมทั้งเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการระหว่างอาหารรายการเดียวกันที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ

1.3.4 ประเมินและสรุปผลการทดลอง เขียนรายงานและเผยแพร่ผลการวิจัย

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

4.1 Stationary phase คือ วัฏภาคนิ่ง หรือตัวดูดซับ

4.2 Mobile phase คือ วัฏภาคเคลื่อนที่ หรือตัวทำละลาย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สภาวะ และวิธีการวิเคราะห์อาหารซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นวิธีการตรวจวัดสารอาหารต่าง ๆ ในอาหารไทย โดยเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ประหยัด และสามารถตรวจวัดได้ครั้งละหลายๆ ตัวอย่าง และสามารถเปรียบเทียบกับค่าทางโภชนาการที่ได้จากวิธีวิเคราะห์อาหารอื่น ๆ ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในทางโภชนาการต่อไป

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

วิธีโครมาโตกราฟีเป็นวิธีการแยกสารที่นิยมใช้แพร่หลายมาก วิธีนี้สามารถแยกสารที่ผสมกันอยู่โดยอาศัยหลักการคือ สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน สารต่างชนิดกันจึงเดินทางผ่านวัฏภาคนิ่งออกมากับวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ไม่พร้อมกันจึงเกิดการแยกขึ้น ในปัจจุบันมีเทคนิคทางโครมาโตกราฟีหลายประเภท ดังจำแนกไว้ในตารางที่ 2.1

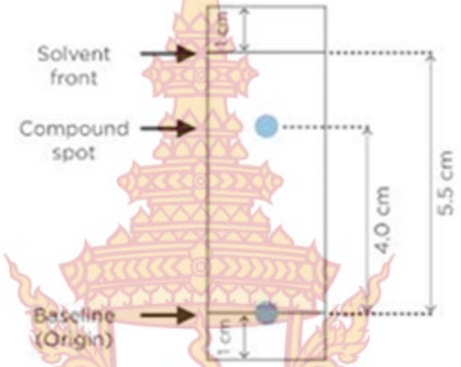
โครมาโตกราฟี	วัฏภาคนิ่ง	วัฏภาคเคลื่อนที่	หลักการทำงาน
Column Chromatography	Solid	Liquid	Adsorption
Thin-Layer Chromatography (TLC)	Solid	Liquid	Adsorption
Gas-Solid Chromatography	Solid	Gas	Adsorption
Paper Chromatography	Liquid	Liquid	Partition
Gas-Liquid Chromatography	Liquid	Gas	Partition

ตารางที่ 2.1 โครมาโตกราฟีแบบต่าง ๆ [1]

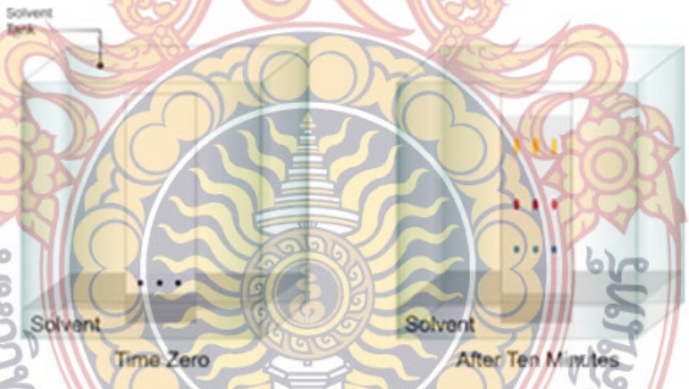
เทคนิคทางโครมาโตกราฟี ที่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง และยังมีการใช้งานกันทั่วไป ได้แก่ คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) และโครมาโทกราฟีแบบแผนบางหรือทินแลร์โครมาโตกราฟี (thin-layer chromatography, TLC) สำหรับงานวิจัยนี้ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางในการแยกและวิเคราะห์สารอาหาร ซึ่งหลักการของการแยกสารโดยวิธีนี้มีดังนี้

หลักการของ TLC นั้น คล้ายคลึงกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี แต่จะต่างกันคือในกรณีของ TLC วัฏภาคนิ่งจะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระจก แผ่นอลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกบาง ๆ สารจะถูกแต้มไว้

ที่ด้านใกล้ปลายด้านหนึ่งของแผ่นโดยใช้หลอดแคปิลลารี จากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าวไปวางลงในภาชนะที่ใส่วัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ตื้น ๆ เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย capillary action ก็จะพาสารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้นด้วยหลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตัวอย่างเช่น หากใช้ซิลิกาเป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่แต่ถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนิ่งได้น้อยจึงเคลื่อนที่ไปได้ดีด้วยระยะที่มากกว่าสารที่มีขั้วสูงซึ่งละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้น้อยแต่ดูดซับบนวัฏภาคนิ่งได้ดี



รูปที่ 2.1 แสดงการแต้มสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงบนแผ่น TLC [2]



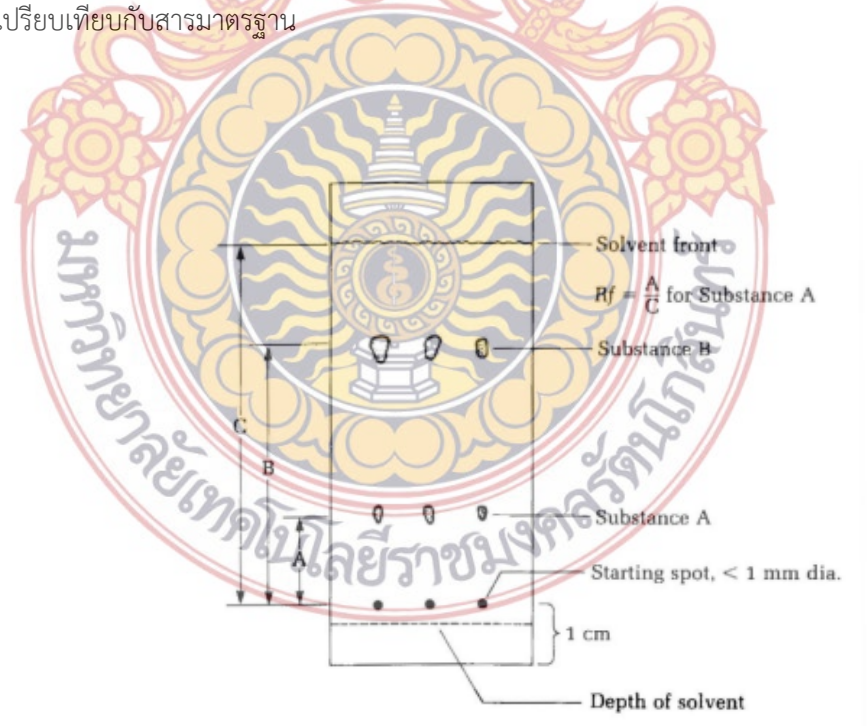
รูปที่ 2.2 แสดงการวางแผ่น TLC ที่แต้มด้วยสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงในถังแยกที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เพื่อทำการแยกสาร [2]

เนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยก เทคนิค TLC จึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือวิเคราะห์มากกว่าที่จะเป็นเครื่องมือในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละองค์ประกอบ ประโยชน์ของ TLC นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังรวมถึงการใช้ในการทดลองหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม

ก่อนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยการใช้วัฏภาคนิ่งชนิดเดียวกับที่จะบรรจุลงคอลัมน์ในการทำ TLC รวมถึงการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่ออกมาจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย

ตัวดูดซับที่นิยมใช้ในเทคนิค TLC ได้แก่ อลูมินา และซิลิกาเจล เช่นเดียวกับที่ใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ดังนั้นระบบตัวทำละลายรวมถึงความเร็วช้าของการเคลื่อนที่ของสารมีขั้วและไม่มีขั้วจึงมีแนวโน้มทำนองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยทั่ว ๆ ไปแล้วนิยมใช้ตัวดูดซับเป็นอลูมินากับสารกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย เช่น ไฮโดรคาร์บอน อัลคิลเฮไลด์ อีเทอร์ และนิยมใช้ซิลิกาเจลกับสารที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอมีน เป็นต้น [1]

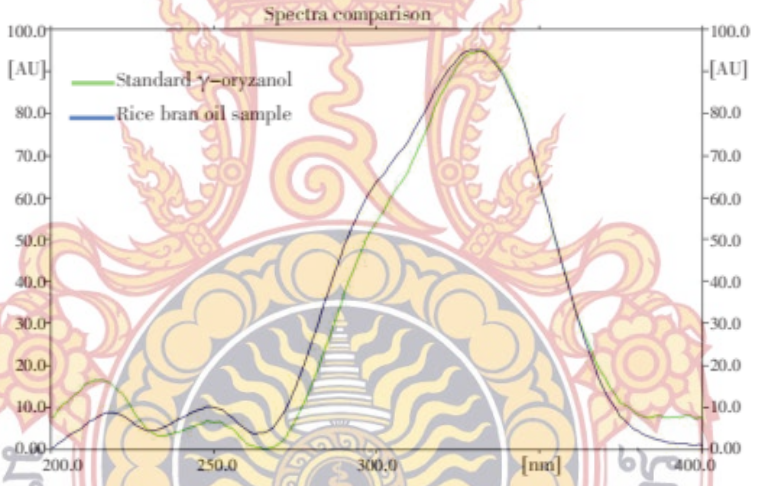
ในการแยกสารโดย TLC สารแต่ละชนิดจะมีความสามารถยึดเกาะบนตัวดูดซับและละลายในตัวทำละลายได้ไม่เท่ากันเนื่องจากความมีขั้วและไม่มีขั้วของหมู่เคมีในสารชนิดนั้น ๆ ทำให้ระยะทางในการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ไม่เท่ากัน เป็นผลทำให้สามารถแยกสารบริสุทธิ์ออกจากสารผสมได้ และยังสามารถคำนวณหาค่าคงที่ที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC โดยคำนวณจากอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดที่ทำการแต้มสาร ไปถึงตำแหน่งสุดท้ายที่สารเคลื่อนที่ เทียบกับระยะทางทั้งหมดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ โดยค่านี้คือค่า Retention factor (Rf) ซึ่งค่า Rf ของสารแต่ละชนิด ในวัฏภาคนิ่ง และวัฏภาคเคลื่อนที่หนึ่ง ๆ จะเป็นค่าคงที่และใช้ในการบ่งบอกชนิดของสารได้โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน



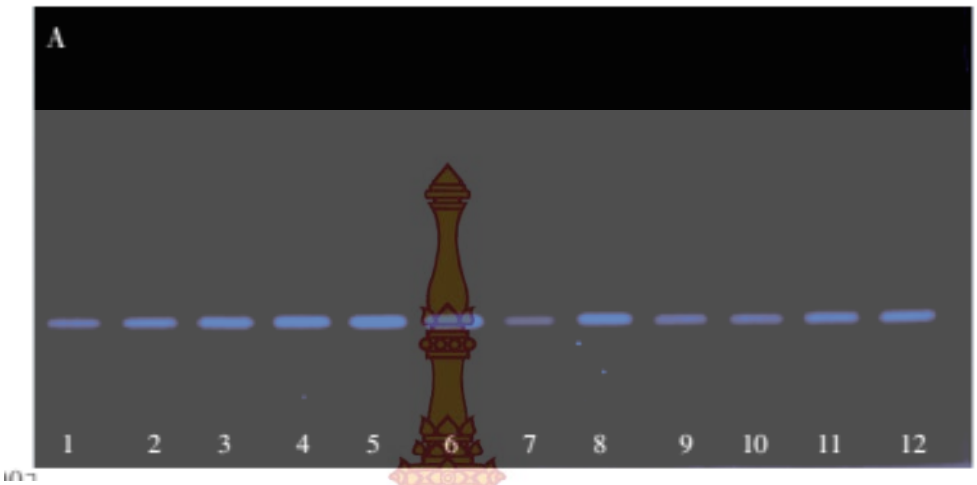
รูปที่ 2.3 แสดงการแยกสารและตำแหน่งที่ใช้ในการคำนวณหาค่า Retention factor (Rf) [1]

2.2 การวิเคราะห์สารโดยเทคนิค TLC densitometry

สารที่ทำการแยกบนแผ่น TLC สามารถนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค TLC densitometry ซึ่งหลักการของเทคนิคนี้คือการสแกนสารที่ผ่านการแยกบนแผ่น TLC โดยใช้แสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ตั้งแต่ความยาวคลื่นแสงช่วง UV ไปจนถึง visible (200-700 nm) โดยสารแต่ละชนิดจะมีสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ได้ดีที่ความยาวคลื่นแตกต่างกันอันเนื่องมาจากหมู่เคมีที่ประกอบขึ้นเป็นสารชนิดนั้น ๆ วิธีนี้จึงสามารถพิสูจน์ชนิดของสารได้ โดยสามารถเทียบความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคนี้ในการหาค่า Rf ของสารที่ต้องการทดสอบ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาประกอบกับการดูดกลืนแสง ก็จะเป็นการยืนยันชนิดของสารได้ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

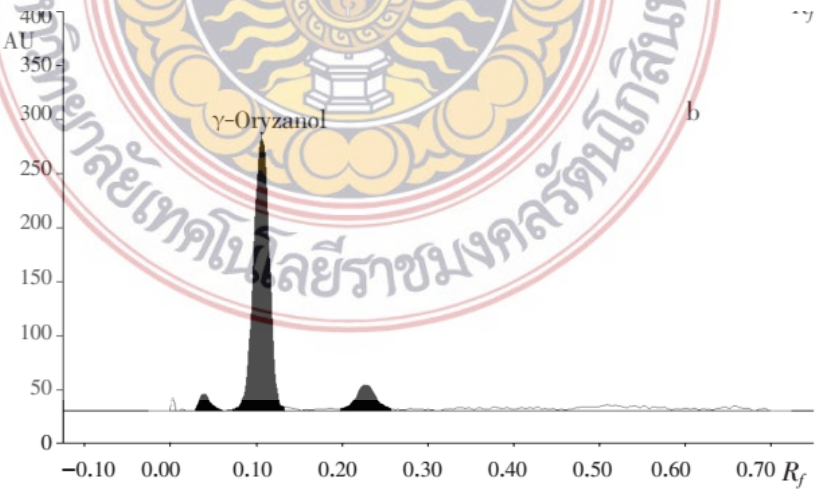


รูปที่ 2.4 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ของสารสกัดจากน้ำมันรำข้าว (gamma oryzanol) เทียบกับสารมาตรฐาน โดยวิเคราะห์โดยเทคนิค TLC densitometry [3]

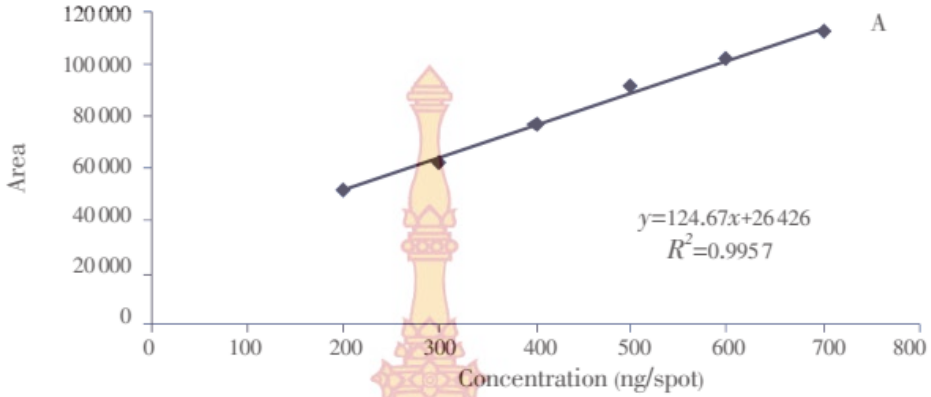


รูปที่ 2.5 แสดงการแยกสาร gamma oryzanol บนแผ่น TLC และถ่ายภาพภายใต้แสงความยาวคลื่น 366 nm [3]

นอกจากการพิสูจน์ชนิดของสารซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพแล้ว เทคนิค TLC densitometry ยังสามารถใช้หาปริมาณสารที่ต้องการในสารสกัดหลังผ่านการแยกบนแผ่น TLC โดยใช้เครื่องแสกน (TLC densitometer) ซึ่งจะต้องเลือกแสกนที่ความยาวคลื่นที่สารนั้นมีค่าการดูดกลืนสูงสุด และนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารที่ทราบปริมาณแล้ว การแสกนโดยเครื่อง TLC densitometer จะแสดงผลออกมาในรูปของ TLC chromatogram ซึ่งสามารถคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่ต้องการวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ แล้วจึงสามารถคำนวณหาปริมาณสารที่แท้จริงในสารสกัดได้ ดังตัวอย่างในรูปที่ 2.6



(A)



(B)

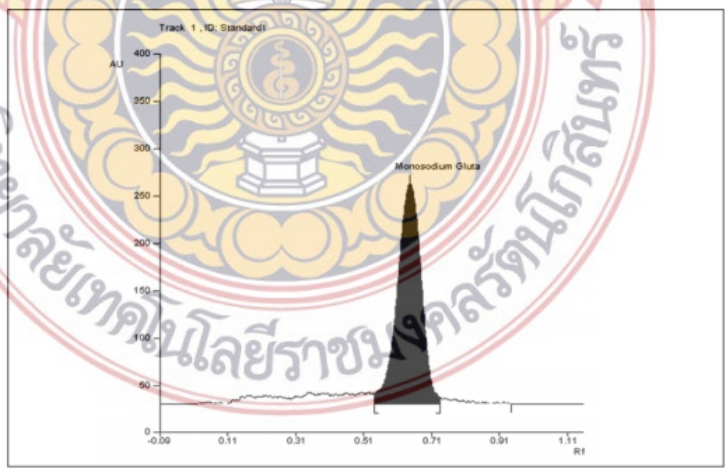
รูปที่ 2.6 แสดงการหาปริมาณสาร gamma oryzanol โดยการแสกนผ่านเครื่อง TLC densitometer (A) TLC chromatogram แสดง peak ของสาร gamma oryzanol และค่า Rf (B) กราฟมาตรฐานของสาร gamma oryzanol ที่วิเคราะห์จากพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของสารแต่ละความเข้มข้น [3]

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

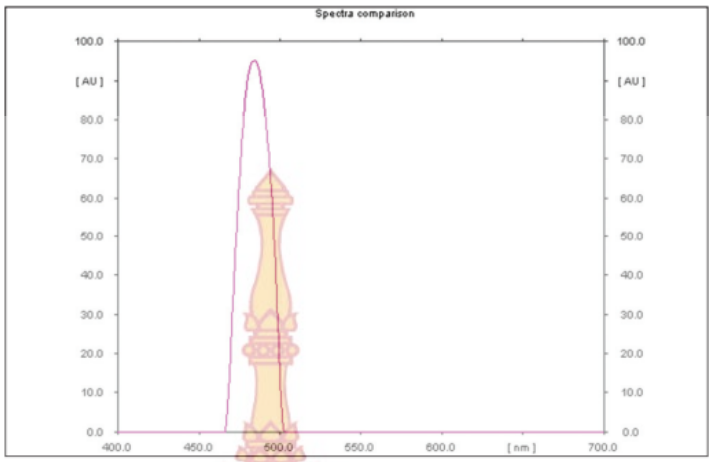
โครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารชนิดต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายต่ำและสามารถวิเคราะห์สารได้หลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมือให้มีขีดความสามารถสูงขึ้นเรียกว่า High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) โดยขั้นตอนต่าง ๆ เช่นการ spot สารบนแผ่น TLC การ develop mobile phase เพื่อการแยกสาร ฯลฯ สามารถดำเนินการผ่านเครื่องมืออัตโนมัติและสามารถตรวจวิเคราะห์ลักษณะสเปคตรัมเฉพาะของสาร และหาปริมาณสารได้น้อยถึงระดับ picogram โดยเครื่อง densitometric scanner ซึ่งให้ความแม่นยำเทียบเคียงกับ Gas Chromatography (GC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ [4]

เทคนิค TLC สามารถใช้ในงานวิจัยได้หลากหลายแขนง เช่น การวิเคราะห์สารอาหารและสารเจือปนในอาหาร การวิเคราะห์สารพิษปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การตรวจหาสารพฤกษเคมีและการ

วิจัยทางการแพทย์ เป็นต้น ในการวิเคราะห์ชนิดสารต่าง ๆ โดย TLC จะมีวิธีการและเทคนิคที่แตกต่างกันไปโดยขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งจำเป็นต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ผลการวิเคราะห์ออกมาถูกต้องและแม่นยำมากที่สุด หลักการสำคัญของการวิเคราะห์คือการเลือกชนิดของแผ่น TLC (stationary phase) ทั้งชนิด Normal Phase (NP) และ Reverse Phase (RP) ให้เหมาะสมกับชนิดของสารที่จะวิเคราะห์ การปรับสัดส่วนของ mobile phase เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารสูงสุด และในสารบางกลุ่มอาจต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารเคมีบางชนิด (derivatization) เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ได้บนแผ่น TLC ตัวอย่างงานวิจัยก่อนหน้าที่ได้ใช้เทคนิค TLC ในการวิเคราะห์สารอาหารได้แก่การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารแต่งรสอาหาร (monosodium glutamate, MSG) ในอาหารชนิดต่าง ๆ [5] พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณ MSG ในอาหารคือใช้แผ่น TLC ชนิด normal phase silica gel 60F เป็น stationary phase โดยมี mobile phase คือ methanol:chloroform:formic acid: อัตราส่วน 5:5:1 (V/V) จากนั้นทำการ derivatization ด้วยสารละลาย 1% ninhydrin และตรวจวัดปริมาณด้วย densitometric scanning ที่ความยาวคลื่น 485 nm. ซึ่งเทคนิคนี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำและมีความไวสูง สามารถตรวจวัดปริมาณ MSG ในอาหารได้แม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อยโดยสามารถตรวจวัดได้ครั้งละหลายๆ ตัวอย่างอีกทั้งมีราคาที่ถูกกว่าการวิเคราะห์ด้วย HPLC



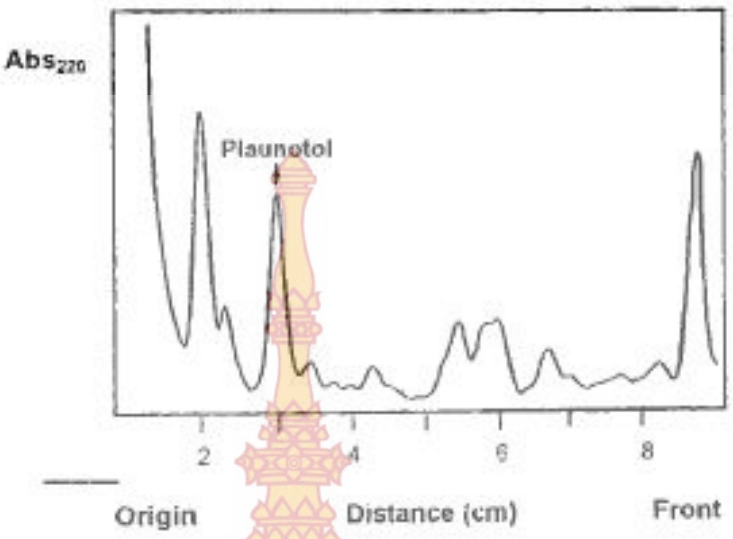
A



B

รูปที่ 2.7 TLC chromatogram แสดงการวิเคราะห์หาปริมาณ MSG ก่อน (A) และหลัง (B) จากผ่านการ derivatization บนแผ่น TLC [5]

นอกจากนี้ได้มีการนำ TLC มาวิเคราะห์สารปนเปื้อนต่าง ๆ ในอาหารเช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสีผสมอาหารในเครื่องดื่มน้ำผลไม้โดยใช้ TLC ควบคู่กับเทคนิค ion pair HPLC [6] การพัฒนาเทคนิค HPTLC เพื่อใช้หาปริมาณ steviol glycoside ในอาหารชนิดต่างๆจำนวน 6 ชนิด พบว่าการวิเคราะห์ด้วย HPTLC ให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำและเที่ยงตรงเมื่อทำการวิเคราะห์ซ้ำ [7] ในส่วนของงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์เช่นการวิเคราะห์สาร plaunotol ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางยา ซึ่งสามารถสกัดได้จากใบของต้นเปล้าน้อยโดยมีสภาวะในการวิเคราะห์คือใช้แผ่น TLC silica gel 60F mobile phase คือ chloroform:n-propanol อัตราส่วน 96:4 (V/V) และหาปริมาณของสาร plaunotol โดยการแสกนด้วย TLC densitometer ที่ความยาวคลื่น 220 nm. เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก GC พบว่าปริมาณสาร plaunotol ที่ได้จากเทคนิคทั้งสองไม่แตกต่างกัน [8]



รูปที่ 2.8 TLC chromatogram แสดงการแยกสาร plaunotol จากสารสกัดหยาบ โดยวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 220 nm [8]

อย่างไรก็ดียังไม่มีรายงานการนำเทคนิค TLC มาใช้ในการวิเคราะห์สารอาหารในอาหารไทย ซึ่งประกอบไปด้วยสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาและสารอาหารที่เป็นประโยชน์จำนวนมาก การคิดค้นและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์โดย TLC ที่ไม่ซับซ้อน ราคาไม่แพงและให้ผลที่แม่นยำจะช่วยให้สามารถลดต้นทุนในการวิเคราะห์และการควบคุมคุณภาพอาหารและอาจนำเทคนิคนี้ไปต่อยอดเพื่อใช้ในสถาบันต่าง ๆ ได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาเทคนิค TLC เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารอาหารชนิดต่างๆ ในอาหารไทยนอกจากนี้อาจต่อยอดเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบสารปนเปื้อนในอาหาร เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหารจากแหล่งต่าง ๆ ต่อไป

บทที่ 3
การศึกษาและขั้นตอนดำเนินการ

ในบทนี้กล่าวถึงรายละเอียดการเก็บและเตรียมสารตัวอย่าง สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ และวิธีการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารอาหารโดยเทคนิค TLC-densitometry

3.1 ตัวอย่างอาหารไทย

ทำการเก็บตัวอย่างอาหารไทยจากแหล่งต่าง ๆ เช่น ตลาดสด ร้านสะดวกซื้อ ศูนย์อาหาร ฯลฯ ทำการชั่งน้ำหนัก ปั่นให้ละเอียดและกรองเอาแต่ส่วนน้ำ จากนั้นนำไปทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง โดยเครื่องfreeze dryer (Dura-dry MP, FTS system) ที่อุณหภูมิ -90 °C จนได้สารตัวอย่างลักษณะเป็นผงแห้ง จากนั้นจึงนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	ผู้ผลิต
Ninhydrin reagent	Sigma-aldrich
Methanol	Merck
Ethyl acetate	Merck
Ethanol	Merck
Chloroform	Merck
n-butanol	Merck
Acetic acid	Merck
Hydrochloric acid	Merck
Formic acid	Merck
L-amino acids standards	Sigma-aldrich
Iodine	Sigma-aldrich
Essential oil standards	Sigma-aldrich

3.3 วัสดุและอุปกรณ์

3.3.1 เครื่องชั่งดิจิทัลความละเอียด 4 ตำแหน่ง

3.3.2 บีกเกอร์

3.3.3 อะลูมิเนียมฟอยล์

3.3.4 เครื่องปั่นละเอียด

3.3.5 TLC developing chamber (Camag)

3.3.6 เครื่องหมุนปั่น Vortex

3.3.7 Hot plate

3.3.8 Micropipette

3.3.9 TLC plate silica gel 60F และ RP-C18 (Merck)

3.3.10 TLC sample application system (Linomat V system (Camag))

3.3.11 TLC visualizer (Camag)

3.3.12 เครื่อง Freeze dryer (Dura-dry MP, FTS system)

3.3.13 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge, Qiagen)

3.4 ขั้นตอนดำเนินงาน

3.4.1 การสกัดสารอาหารจากอาหารตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

อาหารตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) แล้ว จะถูกนำมาละลายในตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ตัวทำละลายที่มีขั้ว คือ Ethanol และ น้ำ เพื่อสกัดสารอาหารที่มีขั้วออกมา เช่น sucrose glucose fructose amino acids ส่วนตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วคือ chloroform จะใช้สกัดสารอาหารประเภทไขมันคือ essential oils และน้ำมันหอมระเหยซึ่งอยู่ในส่วนประกอบของอาหาร โดยใช้อัตราส่วนการละลาย คือ 1 gram ต่อตัวทำละลาย 1,000 microliter ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง vortex จากนั้นปั่นตกตะกอนโดยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ทำการเก็บส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารอาหาร

ในการค้นหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร จะใช้แผ่น TLC ชนิด precoated TLC plate เป็น stationary phase ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิดได้แก่ Silica gel 60F (Merck, Darmstadt, Germany) สำหรับการแยกสารที่มีขั้ว และ Reverse phase RP C-18 (Merck, Darmstadt, Germany) สำหรับสารที่

ไม่มีขั้ว ในการเลือก mobile phase ให้เหมาะสมเพื่อให้สารในอาหารแต่ละชนิดแยกออกจากกันจะทำการผสมและปรับอัตราส่วนของสารละลายต่าง ๆ ให้เหมาะสม สำหรับ mobile phase ที่ใช้ในการแยกกรดอะมิโน ได้ใช้สารละลายผสมระหว่าง n-Propanol: Acetic acid: dH_2O และปรับอัตราส่วนจนกว่ากรดอะมิโนแต่ละชนิดที่อยู่ในอาหารตัวอย่างจะแยกออกจากกัน การแยกสารที่เป็น polar compound เช่น น้ำตาลต่าง ๆ ในอาหารได้ใช้สารละลายผสมระหว่าง Ethyl acetate: Formic acid: Acetic acid: dH_2O และในการแยกสารที่ไม่มีขั้วเช่น Essential oils ซึ่งเป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหารใช้สารผสมระหว่าง Toluene: Ethyl acetate

3.4.4 การแยกสารอาหารโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

สารอาหารที่ผ่านการเตรียมจากขั้นตอนที่ 3.1 แล้วจะนำมาทำการ spot ลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 10 cm ยาว 10 cm หรือ 20 cm แล้วแต่จำนวนของสารตัวอย่าง ซึ่งทำการ spot ด้วยเครื่อง TLC sample application system (Linomat V system (Camag, Muttenz, Switzerland)) ในปริมาณสารตัวอย่าง 2 µl และ 5 µl ต่อ lane โดยแต่ละ band มีความยาว 8 mm และระยะห่างระหว่าง band คือ 15 mm ตามลำดับ จากนั้นจึงนำแผ่น TLC ที่ได้เตรียมแล้วไปแยกสารผ่าน mobile phase ที่เหมาะสมโดยได้ทำให้เป็นระบบที่อิ่มตัว (pre-saturated system) ใน TLC developing chamber (Camag, Muttenz, Switzerland) จนกระทั่งแนวของ mobile phase (solvent front) ห่างจากขอบบนประมาณ 1 cm จึงนำแผ่น TLC ออกมาทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

3.4.5 การตรวจวิเคราะห์สารอาหารโดยวิธี TLC densitometry

แผ่น TLC ที่ผ่านการ develop แล้วจะถูกทำให้แห้งและนำไปวิเคราะห์การแยกสารโดยเครื่อง TLC visualizer (Camag, Muttenz, Switzerland) โดยการถ่ายรูปผ่านแสงขาว (visible light) แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการสแกนแต่ละ band ของสารที่ได้ผ่านการแยกด้วยแสง UV ความยาวคลื่น 200-400 nm เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารจาก absorption spectrum และทำการสแกนโดยใช้แสงความยาวคลื่น 366 nm ซึ่งจะได้เป็น TLC chromatogram เพื่อวิเคราะห์หาค่า Retention factor (Rf) และปริมาณสารอาหารต่อไป

3.4.6 การสร้างอนุพันธ์ (derivatization) ของสารอาหารโดยวิธี Iodine staining

สารอาหารหลายชนิดเป็นสารที่ไม่มีสี ดังนั้นการแยกสารบนแผ่น TLC และทำการสแกนโดยใช้แสง UV เพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถที่จะตรวจพบสารอาหารได้ทุกชนิด จึงต้องทำปฏิกิริยากับสารที่มีสีเช่นไอระเหยของเกล็ด Iodine โดยการนำแผ่น TLC ที่ผ่านการ develop แล้วมาย้อมใน TLC developing chamber ที่ได้ทำให้อิ่มตัวด้วยไอระเหยของ Iodine crystal เป็นเวลา 5 นาที จนสังเกตเห็น band ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาขึ้นบนแผ่น TLC แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.5

3.4.7 การสร้างอนุพันธ์ (derivatization) ของสารอาหารโดยวิธี Ninhydrin staining

สารอาหารประเภทกรดอะมิโนเป็นสารที่ไม่มีสีและบางชนิดไม่สามารถสแกนพบได้โดยวิธี TLC densitometry ดังนั้นจึงต้องทำปฏิกิริยากับสาร Ninhydrin reagent ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนในกรดอะมิโน [9] แล้วเกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีสี โดยการนำแผ่น TLC ที่ผ่านการ develop แล้วมาจุ่มในสารละลาย Ninhydrin solution (8 gram Ninhydrin ใน 100 ml acetone) ทำให้แห้งและนำไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 °C เป็นเวลา 5 นาทีจนสังเกตเห็นสีของสารที่ผ่านการแยกขึ้นบนแผ่น TLC แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.5 ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1. การเตรียมอาหารตัวอย่างด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry)

อาหารตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือแกงเขียวหวานซึ่งได้ทำการเก็บตัวอย่างโดยการซื้อจากร้านอาหารย่านสยามแสควร์ ขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างอาหารเพื่อให้สามารถเก็บไว้ได้นานได้เตรียมโดยการกรองเอาแต่ส่วนน้ำแกง ชั่งน้ำหนักและนำไปทำแห้งโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) โดยเครื่อง Freeze dryer (Dura-dry MP, FTS system; รูปที่ 4.1) ที่สภาวะสุญญากาศ (vacuum) และอุณหภูมิ -90 °C เป็นเวลา 3 วัน พบว่าอาหารตัวอย่างมีลักษณะจับกันเป็นก้อนแข็ง จึงได้ทำผงโดยการบดในไนโตรเจนเหลวและได้สารตัวอย่างอาหารที่มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองแสดงในรูป 4.2

รูปที่ 4.1 เครื่อง Freeze dryer (Dura-dry MP, FTS system)

A B

รูปที่ 4.2 อาหารตัวอย่างหลังจากการผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (A) และอาหารตัวอย่างหลังผ่านการบดในไนโตรเจนเหลว (B)

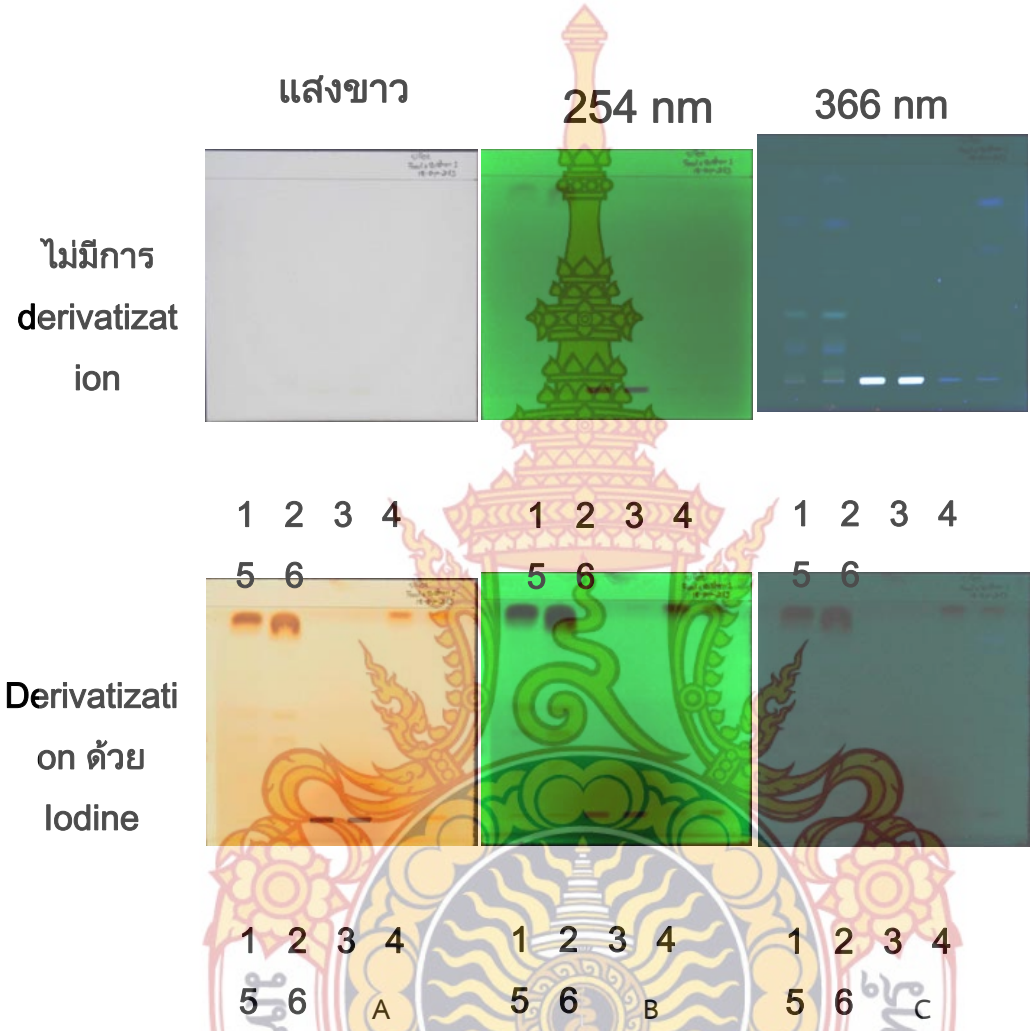
4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารอาหาร

4.2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก essential oils จากอาหารตัวอย่าง

อาหารตัวอย่างผงที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็งได้ถูกละลายใน chloroform ในความเข้มข้น 1% w/v จากนั้นจึงทำการปั่นแยกส่วนน้ำและส่วนตะกอนออกจากกัน และนำส่วนตะกอนไปละลายในตัวทำละลายอื่น ๆ ได้แก่ น้ำ, Formic acid, Ethanol และ Acetone ปั่นแยกส่วนน้ำและตะกอนอีกครั้ง และนำส่วนน้ำของแต่ละตัวทำลายไป spot บนแผ่น TLC ในปริมาณ 2 และ 5 microliter ต่อ band เพื่อทำการแยก essential oils พบว่าสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับการแยก essential oils ได้แก่การใช้ chloroform เป็นตัวทำละลาย stationary phase คือ silica gel 60F และ mobile phase คือ Toluene:Ethyl acetate ในอัตราส่วน 85:15 ทำการ derivatization ด้วยการทำปฏิกิริยากับไอระเหยของไอโอดีนและตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกสารอาหารด้วยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 254 nm แสดงในรูปที่ 4.3

เนื่องจาก essential oils เป็นสารผสมระหว่างน้ำมันหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร บางชนิดมีขั้วน้อยหรือไม่มีขั้วจึงสามารถละลายได้ดีใน chloroform ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเช่นกัน เมื่อนำไปแยกบนแผ่น TLC ชนิด silicagel 60F ซึ่งเป็น stationary phase ที่มีขั้วจึงสามารถจับกับหมู่เคมีบางหมู่ที่มีขั้วภายใน essential oils บางชนิดไว้ได้ และปรากฏเป็นแถบสีขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับไอระเหยของ Iodine ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 254 nm ในขณะที่การวิเคราะห์โดยใช้แผ่น TLC Reverse phase RP-C18 ไม่สามารถแยก essential oils ได้เนื่องจากไม่มีการยึดเกาะของโมเลกุลของสารสารกับ stationary phase ทำให้เกิด

การ smear ในระหว่างการ develop โดย mobile phase ดังนั้นแผ่น TLC Reverse phase RP-C18 จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ essential oils

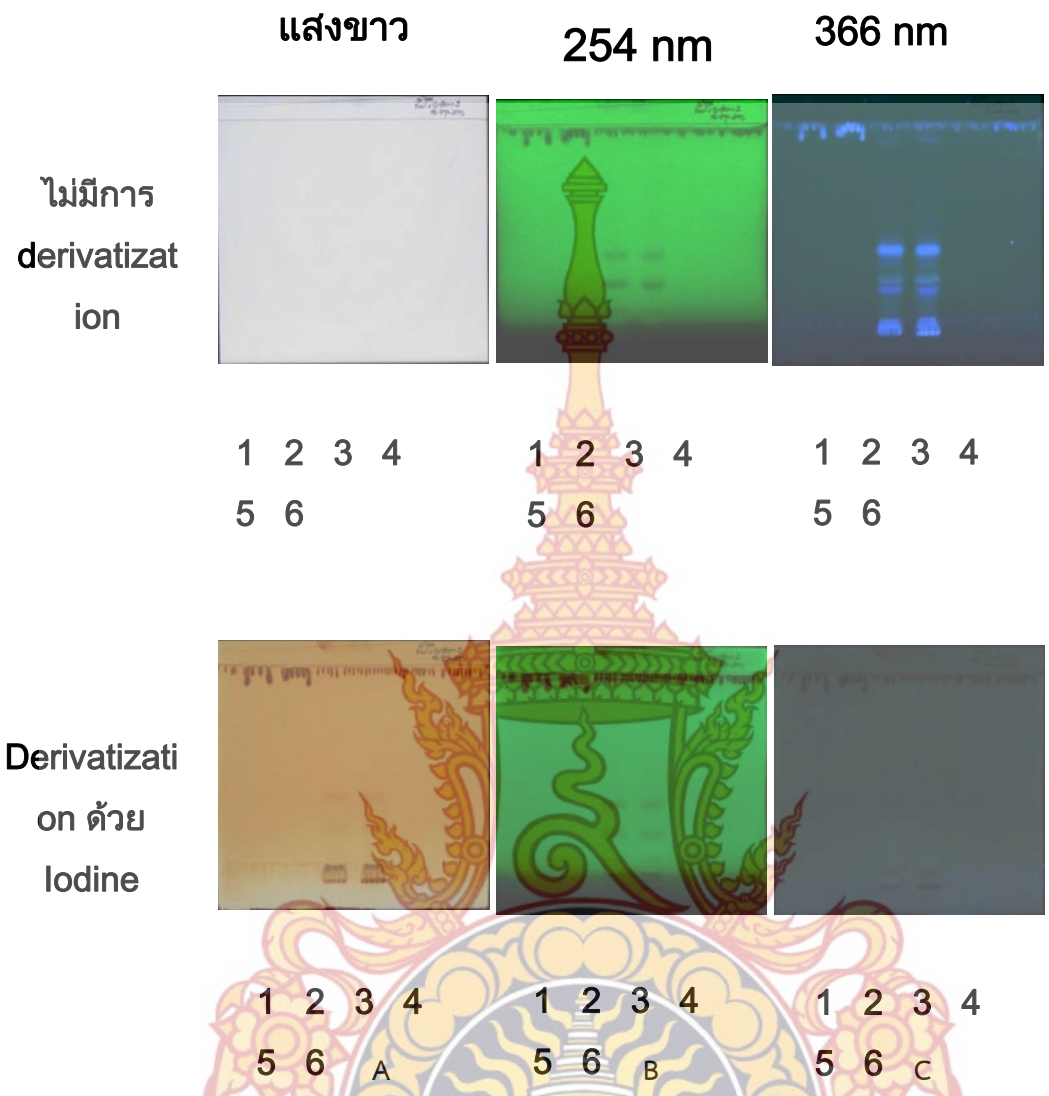


รูปที่ 4.3 การแยก essential oils ในอาหารตัวอย่าง แสดงเปรียบเทียบระหว่างแผ่น TLC ที่ไม่มีการทำ derivatization และผ่านการ derivatization โดยไอโอดีน ตรวจวิเคราะห์โดยการถ่ายภาพจากแสงขาว (A) แสงที่ความยาวคลื่น 254 nm (B) และแสงที่ความยาวคลื่น 366 nm (C) ตามลำดับ lane หมายเลข 1 และ 2 คือส่วนใสของตัวอย่างอาหารที่ละลายใน chloroform โดย spot ที่ปริมาณ 2 และ 5 microliter ตามลำดับ lane หมายเลข 3 คือส่วนตะกอนละลายในน้ำกลั่น lane หมายเลข 4 คือส่วนตะกอนละลายใน Formic acid lane หมายเลข 5 คือส่วนตะกอนละลายใน Ethanol และ lane หมายเลข 6 คือส่วนตะกอนละลายใน Acetone

4.2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก polar compounds จากอาหารตัวอย่าง

ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารประเภท polar compounds เช่น น้ำตาล glucose, sucrose, fructose, maltose และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร โดยภายในโครงสร้างเคมีของสารประเภทนี้ประกอบด้วยหมู่ hydroxyl (OH) ซึ่งมีสภาพความเป็นขั้ว ดังนั้นจึงต้องใช้สภาวะในการแยกสารที่เป็นขั้วเช่นเดียวกัน จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก polar compounds ได้แก่การใช้น้ำกลั่นหรือ Formic acid เป็นตัวทำละลายโดยมี stationary phase คือแผ่น TLC ชนิด silica gel 60F และ mobile phase คือ Ethyl acetate: Formic: Acetic acid: dH_2O ในอัตราส่วน 100:11:11:26 ทำการตรวจวิเคราะห์การแยกด้วยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 366 nm แสดงในรูปที่ 4.4

polar compounds ในอาหารตัวอย่างสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วได้แก่ น้ำกลั่นและ Formic acid แต่ละลายได้น้อยหรือไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วอื่น ๆ เช่น Chloroform, Ethanol และ Acetone โดยสามารถสังเกตจาก band ที่ไม่ปรากฏบนแผ่น TLC นอกจากนี้ polar compounds ยังสามารถจับกับ silica gel บนแผ่น stationary phase ได้เนื่องจากพันธะ hydrogen ระหว่างหมู่ hydroxyl โดยการแยกจะเป็นไปตามสภาพความมีขั้ว ซึ่งสารที่มีขั้วมากจะเคลื่อนที่ได้น้อยบน stationary phase เนื่องจากพันธะ hydrogen มีความแรง จึงสังเกตเห็น band ดังกล่าวอยู่ทางด้านล่างของแผ่น TLC ในขณะที่ polar compound ที่มีสภาพความเป็นขั้วน้อยกว่าจะสามารถเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ไปได้ไกลกว่า สภาวะที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การแยกที่สามารถสังเกตผลการทดลองได้ชัดเจนที่สุดคือแผ่น TLC ที่ผ่านการ develop และไม่มีการทำ derivatization และถ่ายภาพโดยใช้แสงที่ความยาวคลื่น 366 nm โดยจะสามารถสังเกตเห็น band ที่มีการเรืองแสงเนื่องจากการกระตุ้นโดยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่การทำ derivatization โดยไอระเหยของ Iodine จะให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่ชัดเจนเท่าที่ควร เนื่องจากอาจเกิดการบดบัง (Quenching) ของหมู่เคมีที่ทำให้เกิดการเรืองแสงโดย Iodine

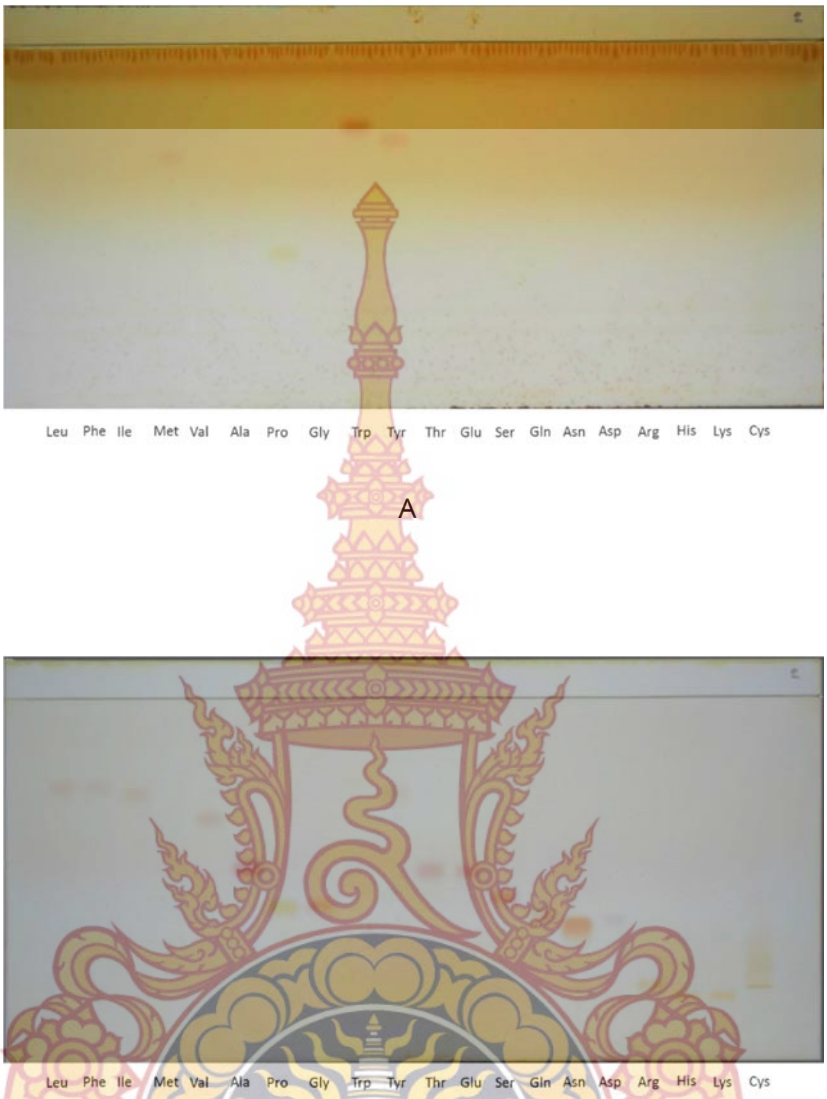


รูปที่ 4.4 การแยก polar compounds ในอาหารตัวอย่าง แสดงเปรียบเทียบระหว่างแผ่น TLC ที่ไม่มีการทำ derivatization และผ่านการ derivatization โดย Iodine ตรวจวิเคราะห์โดยการถ่ายภาพจากแสงขาว (A), แสงที่ความยาวคลื่น 254 nm (B) และแสงที่ความยาวคลื่น 366 nm (C) ตามลำดับ lane หมายเลข 1 และ 2 คือส่วนใสของตัวอย่างอาหารที่ละลายใน chloroform โดย spot ที่ปริมาณ 2 และ 5 microliter ตามลำดับ lane หมายเลข 3 คือส่วนตะกอนละลายในน้ำกลั่น lane หมายเลข 4 คือส่วนตะกอนละลายใน Formic acid lane หมายเลข 5 คือส่วนตะกอนละลายใน Ethanol และ lane หมายเลข 6 คือส่วนตะกอนละลายใน Acetone

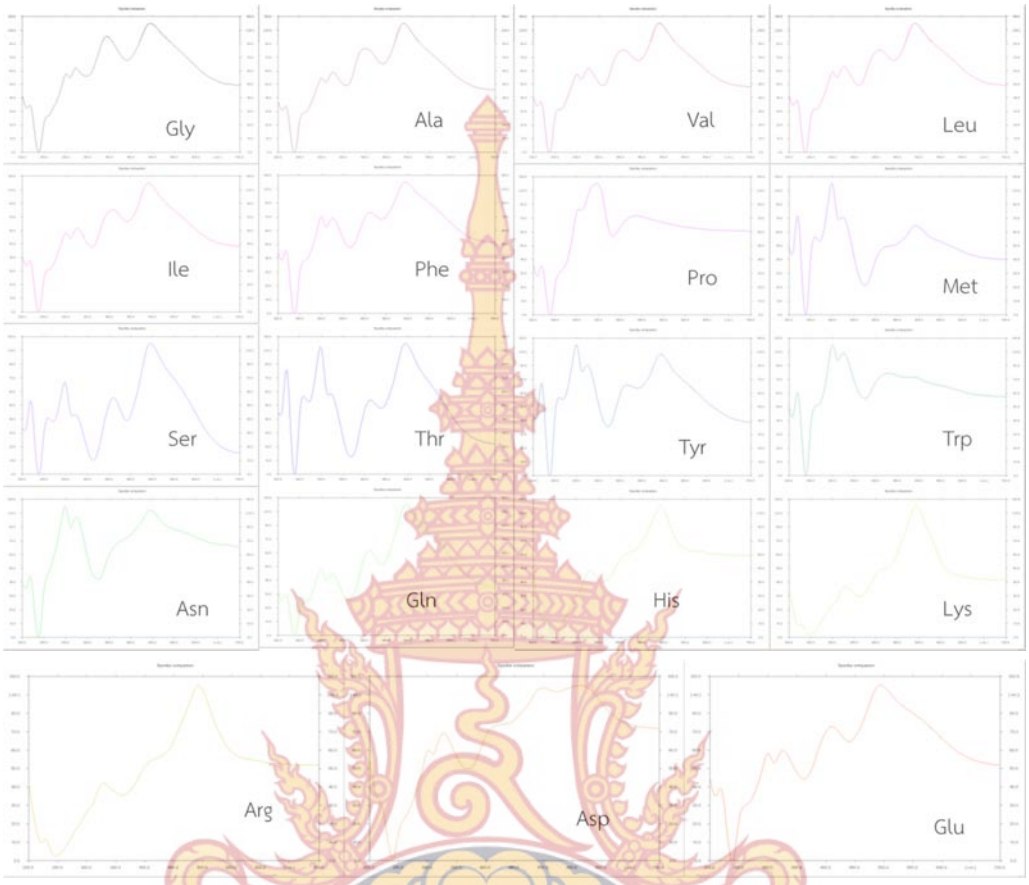
4.2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก amino acids

สารอาหารประเภท amino acids จัดเป็นสารจำพวก polar compound เนื่องจากภายในโครงสร้างเคมีประกอบด้วยหมู่ amine และ carboxylic นอกจากนี้หมู่โซ่ข้าง (side chain) ของ polar amino acid ยังประกอบด้วยหมู่เคมีหลายชนิดซึ่งมีขั้ว ดังนั้นสภาวะที่ใช้ในการแยกจึงต้องเป็นระบบที่มีขั้วเช่นเดียวกัน การทดลองนี้ได้ทำการค้นหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก standard amino acid ทั้ง 20 ชนิด เพื่อพัฒนาระบบที่สามารถจำแนก amino acid แต่ละชนิดออกจากกันโดยพิจารณาจากความแตกต่างกันของค่า Rf ซึ่งอาจนำไปใช้ในการพิสูจน์ชนิดของกรดอะมิโนในสารอาหารตัวอย่างได้ จากการทดลองพบว่าสภาวะที่สามารถใช้ในการแยก standard amino acids ได้แก่ stationary phase คือแผ่น TLC ชนิด silica gel 60F และ mobile phase คือ n-butanol : acetic acid : water : methanol ในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 : 1 ทำการตรวจวิเคราะห์การแยกด้วยการทำปฏิกิริยากับ Iodine และ Ninhydrin solution และถ่ายภาพโดยใช้แสงขาว แสดงในรูปที่ 4.4

การแยกของกรดอะมิโนบนแผ่น TLC มีหลักการเช่นเดียวกับสาร polar compounds กล่าวคือจะสามารถจับกับ silica gel บนแผ่น TLC ได้เนื่องจากพันธะ hydrogen ที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ที่มีขั้วของกรดอะมิโนและโมเลกุลของ silica gel การแยกจะเป็นไปตามสภาพความมีขั้ว โดยกรดอะมิโนที่มีขั้วมาก เช่น Lysine และ Arginine จะเคลื่อนที่ได้น้อยบน stationary phase เนื่องจากมีความแรงของพันธะ hydrogen มาก จึงสังเกตเห็น band อยู่ทางด้านล่างของแผ่น TLC ในขณะที่กรดอะมิโนที่มีขั้วน้อย เช่น Phenylalanine และ Tryptophan จะเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ไปได้ไกลกว่า สภาวะที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การแยกที่สามารถสังเกตผลการทดลองได้ชัดเจนที่สุด คือแผ่น TLC ที่ผ่านการ develop และทำการ derivatization กับสาร Ninhydrin reagent ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ amine ในกรดอะมิโน เมื่อได้รับความร้อนจะเกิดเป็นสารสีม่วงหรือสีฟ้า [9] และสามารถใช้เทคนิค TLC densitometry ในการวิเคราะห์ absorption spectrum ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดโดยการสแกนที่ความยาวคลื่นแสงตั้งแต่ 200-700 nm ซึ่งผลการทดลองพบว่า absorption spectrum ของแต่ละกรดอะมิโนมีลักษณะแตกต่างกัน แต่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันตามกลุ่มของความมีขั้ว (รูป 4.6) นอกจากนี้การวิเคราะห์ค่า Rf ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดโดยการสแกนที่แสงความยาวคลื่น 408 nm พบว่าระบบนี้สามารถแยกกรดอะมิโนแต่ละชนิดออกจากกันได้เนื่องจากมีค่า Rf ที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.5 การแยกกรดอะมิโนมาตรฐาน (standard amino acids) ทั้ง 20 ชนิด โดยใช้ TLC silica gel 60F เป็น stationary phase และ mobile phase คือ n-butanol : acetic acid : water : methanol ในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 : 1 วิเคราะห์การแยกโดยการทำปฏิกิริยากับไอระเหยของ Iodine (A) และการทำปฏิกิริยากับ Ninhydrin Solution (B)



รูปที่ 4.6 Absorption spectrum ของกรดอะมิโนมาตรฐาน (standard amino acids) จำนวน 19 ชนิด โดยการสแกนที่ความยาวคลื่น 200 – 700 nm

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า Retention Factor (Rf) ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดจากการแสกนที่ความยาวคลื่น 408 nm

กรดอะมิโน	Rf
Gly	0.37
Ala	0.47
Val	0.62
Leu	0.72
Ile	0.7
Phe	0.72
Pro	0.36
Met	0.66
Ser	0.39
Thr	0.46
Tyr	0.7
Trp	0.74
Cys	0.1
Asn	0.3
Gln	0.33
His	0.08
Lys	0.07
Arg	0.12
Asp	0.31
Glu	0.46

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

อาหารตัวอย่างได้นำมาเตรียมโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) และทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารอาหารในอาหารตัวอย่างโดยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) และวิเคราะห์ผลการทดลองโดยเทคนิค TLC-densitometry ซึ่งสามารถวิเคราะห์ absorption spectrum ของสาร ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิดได้ พบว่าสารอาหารประเภท essential oils มีสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์คือการใช้ chloroform เป็นตัวทำละลาย stationary phase คือ silica gel 60F และ mobile phase คือ Toluene: Ethyl acetate ในอัตราส่วน 85:15 จากนั้นทำการ derivatization แผ่น TLC ที่ผ่านการ develop แล้วด้วยการทำปฏิกิริยากับไอระเหยของไอโอดีนและตรวจวิเคราะห์การประสิทธิภาพแยกสารอาหารด้วยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 254 nm

ในการวิเคราะห์ polar compounds พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้น้ำกลั่นหรือ Formic acid เป็นตัวทำละลายโดยมี stationary phase คือแผ่น TLC ชนิด silica gel 60F และ mobile phase คือ Ethyl acetate: Formic: Acetic acid: dH2O ในอัตราส่วน 100:11:11:26 ทำการตรวจวิเคราะห์การแยกด้วยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 366 nm

การวิเคราะห์กรดอะมิโนมาตรฐานพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้แก่ stationary phase คือแผ่น TLC ชนิด silica gel 60F และ mobile phase คือ n-butanol : acetic acid : water : methanol ในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 : 1 ตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกด้วยการทำปฏิกิริยากับ Iodine และ Ninhydrin solution และถ่ายภาพโดยใช้แสงขาว นอกจากนี้ผลการทดลองจากการทำ TLC densitometry พบว่าหากเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มที่มีสภาพขั้วแบบเดียวกันจะมี

absorption spectrum ที่คล้ายคลึงกันแต่จะมีค่า Rf ที่ไม่เท่ากัน ซึ่งแสดงว่าระบบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจสอบกรดอะมิโนแต่ละชนิดได้ค่อนข้างจำเพาะ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ศึกษาวิธีการแยกที่เพิ่มประสิทธิภาพและความจำเพาะในการแยกสารอาหารมากขึ้น เช่นการใช้สาร PDBIQ ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนในอาหาร ซึ่งสารนี้จะทำปฏิกิริยาและสามารถทำให้กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ มีสีที่แตกต่างกันไป [10] อันเป็นการเพิ่มความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์หรือการใช้ 2D TLC [11] ในการแยกสารอาหารบริสุทธิ์ออกจากตัวอย่างอาหาร

บรรณานุกรม

[1] คณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. “ปฏิบัติการเคมี บทที่ 9 โครมาโทกราฟี (Chromatography).” http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/chapter9.pdf.

[2] คณาจารย์สาขาวิศวกรรมกระบวนการอาหารและวิศวกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา “ปฏิบัติการที่ 5 โครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography).” http://fe.rmutl.ac.th/2012/wp-content/uploads/lab-5-Chromatography1.doc.

[3] Apirak Sakunpak, Jirapornchai Suksaeree, Chaowalit Monton, Pathamaporn Pathompak, Krisana Kraisintu. “Quantitative analysis of γ-oryzanol content in cold pressed rice bran oil by TLC-image analysis method.” **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 4(2) (2014) : 119-123.

[4] Sherma J . “Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis”. **Journal of Chromatography A**. 2000 (880):129-147.

[5] Krisha Veni N, Kartika D, Surya Devi M, Rubini MF, Vishalini M, and Pradeepa YJ. “Analysis of monosodium l glutamate in food products by high performance thin layer chromatography.” **Journal of Young Pharmacists**. 2(3) (2010) :297-300.

[6] Melock GE, Meyer S, Zimmerman BF and Roussel GM. “High-performance thin-layer chromatography analysis of steviol glycosides in Stevia formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography.” **Journal of Chromatography A**. 1350 (2014): 102–111.

[7] Andradea F, Guedesb MIF, Vieirac IGP, Francisca Mendesc NP, Rodriguesd PAS, Maiab CSC, Ávilaa MMM, Ribeiroe LM. “Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC.” **Food Chemistry**. 157 (2014): 193–198.

[8] Vongchareonsathit A, De-Eknamkul W. “Rapid TLC-densitometric analysis of Plaunotol from Croton sublyratus leaves.” **Planta Medica**. 64(1998):279-280.

[9] Merck Millipore. “Chemicals and reagents 2008–2010.” http://www.merckmillipore.com/TH/en/20140402_111401.

[10] Supriti Sen, Sandipan Sarkar, Pijush Kundu, Subrata Laskar Arthur konze. "Separation of Amino Acids Based on Thin-Layer." **American Journal of Analytical Chemistry**. 3(2012): 669-674.

[11] Elhbieta Matysik, Anna Wofniak, Roman Paduch, Robert Rejdak, Beata Polak, Helena Donica. "The New TLC Method for Separation and Determination of Multicomponent Mixtures of Plant Extracts" **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. 1(2016): 1-6.

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล ดร.ยุทธนา วรวุธ

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170 โทร. 02-8894585 ต่อ 2922 มือถือโทร 0970702445 โทรสาร. 02-8894585 ต่อ 2920

E-mail: yuttana.wor@rmutr.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วท.ด. (ชีวเคมี) คณะวิทยาศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2554
วท.บ. (ชีวเคมี) คณะวิทยาศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2547

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Molecular biology, Microbiology, Natural products

ผู้ช่วยวิจัย คนที่ 1

1. ชื่อ-นามสกุล นายภูษิต แสงประดับ

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170 โทร. 02-8894585 ต่อ 2922 มือถือโทร 0868778567 โทรสาร. 02-8894585 ต่อ 2920

E-mail : jphusit@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
กศ.บ. (วิทยาศาสตร์-เคมี)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภาคใต้	2537
วท.ม. (เคมี)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2545

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เคมีอินทรีย์, เคมีคอมพิวเตอร์ (Computational Chemistry)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์