สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์กรดอะมิโนในวัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารสัตว์

นายกฤษดา สัตย์เจริญ
นายอรรณพ พุฒธรรม

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่
เลขทะเบียน 39880
วัน, เดือน, ปี 11 ก.ค. 2544
.b.....
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Analysis of amino acids in raw materials for feed production

Mr. Krisada satcharoen
Mr. Annop putthum

A special Project submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การวิเคราะห์กรดอะมิโนในวัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารสัตว์
โดย นายกฤษดา สัตย์เจริญ
นายอรรณพ พุฒธรรม
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์
ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนในวัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารสัตว์ 10 ตัวอย่างโดยใช้วิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) ด้วยเทคนิค pre-column derivatization สารที่ใช้ในการทำ derivative คือ phenylisothiocyanate (PITC) โดยชนิดของ HPLC ที่ใช้ คือ HPLC ชนิดปั๊มเดี่ยว Shimadzu รุ่น LC-6AD มี C-18 เป็นคอลัมน์ในการแยกสาร และใช้เครื่อง UV–detector ในการตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโน สภาวะและสิ่งที่ HPLC ต้องการใช้ในการวิเคราะห์ คือ เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลาย acetonitrile 60 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นโดยปริมาตร อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารที่ฉีดวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร หน่วยของปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้กำหนดให้อยู่ในรูปพื้นที่พีกต่อมิลลิกรัมตัวอย่าง

จากผลการทดลองสามารถแบ่งชนิดของสารตัวอย่างตามปริมาณกรดอะมิโนในวัตถุดิบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้เป็น 3 กลุ่ม และเรียงลำดับปริมาณกรดอะมิโนจากมากไปหาน้อยคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไข่ทั้งฟอง และเศษเนื้อไก่, กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เศษไก่ กากถั่วเหลืองนอกประเทศจากบริษัท ก กากถั่วเหลืองจากบริษัท ข กากถั่วเหลืองในประเทศจากบริษัท ก ถั่วเหลือง และรำข้าว, และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ กากถั่วเหลืองนอกประเทศจากบริษัท ก กากถั่วเหลืองจากบริษัท ข กากถั่วเหลืองในประเทศจากบริษัท ก ถั่วเหลือง รำข้าว ถั่วเขียว หญ้า และเปลือกฝรั่ง โดยตัวอย่างภายในกลุ่มเดียวกันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project title	Analysis of amino acids in raw materials for feed production
Name	Mr. Krisada satcharoen
	Mr. Annop putthum
Dapartment	Applied Biology
Special Project Advisor	Miss Kulwadee Tongpubesra
Academic year	2000

Abstract

The contents of amino acids in 10 raw materials for feed and feed production were analysed by using high performance liquid chromatography (HPLC) method. Amino acids modification, the technique to prepare amino acid derivatives before analysis, was pre-column derivatization. Derivatizing agent for the derivatization was phenylisothiocyanate (PITC). Single-pump HPLC for amino acids seperation was Shimadzu model with C-18 column, while UV-detector was used for detection. Mobile phase in this experiment is 60 percent acetonitrile (vol/vol). Flow rate of mobile phase was 0.8 ml/min. Injection volume of each sample was 20 µl. The content unit of amino acids was defined as peak area of amino acid/mg sample.

From the results, 3 groups of raw materials could be classified by means of the significant difference at 95 percent confidence of amino acids contents among each group. The raw materials were arranged in decreasing order of amino acid. Egg and chicken-meat were classified in the first group. Chicken-meat, imported soybean oil meal of company A, soybean oil meal of company B, indeginous soybean oil meal of company A, and rice bran were classified in the second group. Where as imported soybean oil meal of company A, soybean oil meal of company B, indeginous soybean oil meal of company A, rice bran mongbean, pasture grass, and peel of guava were classified in the third group. By the way, the comparisons of raw materials in the same group indicated that they were not significantly different at 95 percent confidence.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ **การวิเคราะห์กรดอะมิโนในวัตถุดิบที่นำมาทำอาหารสัตว์**

Analysis of amino acids in raw materials for feed production

โดย นายกฤษดา สัตย์เจริญ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 40053002

นายอรรณพ พุฒธรรม นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 40053080

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาควิชา

(ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

..... ประธานคณะกรรมการ

(รศ.สุขใจ ชูจันทร์)

..... กรรมการ

(อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ลินจง สุขลำภู)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ คณะกรรมการโครงงานพิเศษ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ และอาจารย์ลินจง สุขลำภู ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ยิ่ง ทางคณะผู้จัดทำขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์และฝ่ายธุรการ ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกต่างๆ ตลอดระยะเวลาปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกท่านที่สละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

คณะผู้จัดทำ
มีนาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 การวิจัยและการดำเนินการ	43
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	67
เอกสารอ้างอิง	68
ภาคผนวก ก	70
ภาคผนวก ข	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของกรดอะมิโน	10
2.2	คุณสมบัติทางกายภาพบางประการของกรดอะมิโน	13
2.3	ประเภทของกรดอะมิโน	15
2.4	ปริมาณโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ	21
2.5	ปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ในโปรตีนจากพืชและสัตว์	22
2.6	ความต้องการประมาณกรดอะมิโนของหมูและไก่ในช่วงอายุต่างๆ	23
2.7	ชนิดของกรดอะมิโนที่มีน้อยหรือไม่พอ และกรดอะมิโนที่มีมากในอาหารประเภทธัญพืช ถั่วเมล็ดแห้ง และงา	25
2.8	ชนิดของสารที่เหมาะสมกับชนิดของตัวดูดซับที่บรรจุในคอลัมน์	35
2.9	ดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC	35
2.10	ตัวอย่าง Derivatization reagent ที่ใช้ในการทำ Derivatization ของกรดอะมิโน	38
3.1	พารามิเตอร์ของ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน	56
4.1	retention time เฉลี่ยของสารตัวอย่าง	57
4.2	พื้นที่พีกเฉลี่ยต่อมิลลิกรัมของสารตัวอย่าง	66
ก-1	ข้อมูลดิบของพื้นที่พีกต่อมิลลิกรัมสารตัวอย่าง	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของโปรตีนเส้นใย	4
2.2	โครงสร้างโปรตีนกลอบูลาร์	5
2.3	โครงสร้างของโปรตีนทั้ง 4 ชนิด	6
2.4	(ก) สูตรทั่วไปของกรดอะมิโน (ข) คุณสมบัติเป็น dipolar ion ของกรดอะมิโน	9
2.5	ลักษณะของ equilibrium ของกรดอะมิโนในร่างกาย	12
2.6	โครงสร้าง D และ L-form ของกรดอะมิโน	12
2.7	การย่อยโปรตีนและการดูดซึมกรดอะมิโนในร่างกาย	17
2.8	Ornithine Cycle	18
2.9	เมตาบอลิสมของกรดอะมิโน	19
2.10	กลไกการแยกของผสมของสาร 3 ชนิด	27
2.11	วิธีการแยกสารของลิควิดโครมาโทกราฟี 4 ชนิด	30
2.12	แผนภาพของเครื่องมือ HPLC	31
2.13	การแยกสารโดยใช้โปรแกรมตัวทำละลายแบบต่างๆ ของ HPLC	33
2.14	six-port rotary sample injection value สำหรับ HPLC	34
2.15	แผนภาพของยูวี ดีเทคเตอร์	36
2.16	กลไกปฏิกิริยาของกรดอะมิโนกับ OPA	39
2.17	กลไกของ ninhydrin กับกรดอะมิโน	40
2.18	ปฏิกิริยาอนุพันธ์ของกรดอะมิโนกับ PITC	41
2.19	ปฏิกิริยาของกรดอะมิโนกับ FMOC-Cl (9-fluorenylmethyl chloroformate)	41
3.1	เครื่อง HPLC	44
3.2	ตัวอย่างเปลือกฝรั่งที่ผ่านการอบและบด	46
3.3	ตัวอย่างถั่วเหลืองที่ผ่านการอบและบด	47
3.4	ตัวอย่างถั่วเขียวที่ผ่านการอบและบด	47
3.5	ตัวอย่างหญ้าขนที่ผ่านการอบและบด	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.6	ตัวอย่างกากถั่วเหลืองนอกประเทศจากบริษัท ก ที่ผ่านการอบและบด	48
3.7	ตัวอย่างกากถั่วเหลืองในประเทศจากบริษัท ก ที่ผ่านการอบและบด	49
3.8	ตัวอย่างกากถั่วเหลืองจากบริษัท ข ที่ผ่านการอบและบด	49
3.9	ตัวอย่างไข่ทั้งฟองที่ผ่านการอบและบด	50
3.10	ตัวอย่างรำข้าวที่ผ่านการอบและบด	50
3.11	ตัวอย่างเศษเนื้อไก่ที่ผ่านการอบและบด	51
3.12	สารตัวอย่างที่ติดตั้งในเครื่องย่อย	51
3.13	หญ้าขนหลังจากการย่อย	52
3.14	ถั่วเขียวหลังจากการย่อย	52
3.15	ไข่ทั้งฟองหลังจากการย่อย	53
3.16	เศษเนื้อไก่หลังจากการย่อย	53
3.17	ถั่วเหลืองหลังจากการย่อย	54
3.18	เปลือกฝรั่งหลังจากการย่อย	54
3.19	กากถั่วเหลืองต่างๆ หลังจากการย่อย	55
3.20	รำข้าวหลังจากการย่อย	55
4.1	โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐานลิวซีน (Leucine standard)	59
4.2	โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐานไลซีน (Lysine standard)	60
4.3	โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐานวาลีน (Valine standard)	60
4.4	โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนผสม (Leucine+Lysine+Valine)	61
4.5	โครมาโตแกรมของเปลือกฝรั่ง	61
4.6	โครมาโตแกรมของถั่วเขียว	62
4.7	โครมาโตแกรมของถั่วเหลือง	62
4.8	โครมาโตแกรมของกากถั่วเหลืองในประเทศบริษัท ก	63
4.9	โครมาโตแกรมของกากถั่วเหลืองนอกประเทศบริษัท ก	63
4.10	โครมาโตแกรมของกากถั่วเหลืองบริษัท ข	64
4.11	โครมาโตแกรมของไข่ทั้งฟอง	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.12	โครมาโตแกรมของหญ้าขน	65
4.13	โครมาโตแกรมของเศษเนื้อไก่	65
4.14	โครมาโตแกรมของรำข้าว	66
ข-1	หน้าจอของโปรแกรม SPSS	71
ข-2	ตัวอย่างการเติมข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์ลงในตาราง SPSS	72
ข-3	หน้าจอการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-Way ANOVA	73
ข-4	Post Hoc Multiple Comparison	74
ข-5	Option การวิเคราะห์ทางสถิติ	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

กรดอะมิโนมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นมนุษย์หรือสัตว์เลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโนจำเป็นบางชนิดที่ร่างกายไม่สามารถผลิตขึ้นเองได้ จะได้รับโดยการบริโภคอาหารซึ่งมีกรดอะมิโนจำเป็นนั้น ๆ อยู่ การที่เราสามารถทราบชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่มีอยู่ในวัตถุดิบที่จะนำมาแปรรูปเพื่อบริโภคนั้น จะช่วยให้สามารถเลือกวัตถุดิบเพื่อผลิตอาหารให้มีคุณประโยชน์ตรงตามความต้องการของผู้บริโภค จะเป็นการช่วยใช้ทรัพยากรที่มีเหลืออยู่น้อยลงทุกวันเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดและลดต้นทุนในการผลิตไปได้อย่างมาก

ในโครงงานพิเศษนี้ได้เลือกวิเคราะห์กรดอะมิโนในวัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารสัตว์ เนื่องจากมนุษย์ได้รับประโยชน์จากสัตว์เลี้ยงมากมายไม่ว่าจะใช้บริโภค ใช้สร้างฐานะความมั่งคั่ง หรือแม้แต่ใช้เลี้ยงไว้ดูเล่นเพื่อความต้องการส่วนบุคคล ประโยชน์ที่ได้รับจากสัตว์เลี้ยงมีมากมายปัจจัยสำคัญที่จะส่งผลให้สัตว์เลี้ยงมีความสมบูรณ์ก็คือ อาหาร ดังนั้นถ้าเราดูแลให้อาหารที่มีคุณค่าผลผลิตที่ได้จากสัตว์เลี้ยงเหล่านั้นจะเพิ่มขึ้นส่งผลประโยชน์สูงสุดที่ดีต่อมนุษย์มากยิ่งขึ้น

อาหารสัตว์มักจะผลิตจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพืชและสัตว์ เช่น ถั่วเหลือง และข้าวโพดซึ่งมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นอยู่ 2 ชนิดที่มีปริมาณมาก คือ ไลซีน (Lysine) และทรีโอนีน (Threonine) แต่จะมีปริมาณเมไทโอนีน (Methionine) ที่ต่ำและไม่เพียงพอ ส่วนในข้าวโพดไม่มีกรดอะมิโนใดมีมากและในบางชนิดยังมีปริมาณทริปโตเฟน (trytophan) ไลซีน (lysine) และทรีโอนีน (Threonine) ในปริมาณที่น้อยและไม่เพียงพอ (สิริพันธุ์, 2541) จึงมีความจำเป็นที่ต้องวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารสัตว์ เพื่อใช้วัตถุดิบที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อทราบชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนบางชนิดที่มีความจำเป็นในอาหารสัตว์จากการวิเคราะห์ในวัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารสัตว์
2. เพื่อศึกษาวิธีไฮโดรไลซิสโปรตีนโดยวิธี Acid hydrolysis
3. เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
4. เพื่อนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารสัตว์

วิธีดำเนินการ

1. รวบรวมตัวอย่างวัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารสัตว์
2. ไฮโดรไลซิสตัวอย่างโดยวิธี acid hydrolysis
3. วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทราบชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในวัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารสัตว์
2. สามารถเป็นข้อมูลช่วยในการประยุกต์เลือกวัตถุดิบให้มีคุณค่าเหมาะสมกับสัตว์เลี้ยงเพื่อลดต้นทุนการผลิต
3. ใช้วัตถุดิบที่มีอยู่แปรรูปเพื่อใช้ประโยชน์ได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

โปรตีน (สิริพันธุ์, 2541)

โปรตีนเป็นสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ ที่มีโมเลกุลใหญ่และซับซ้อนมากเป็นส่วนสำคัญทั้งในโปรโตพลาสซึม และนิวเคลียสของเซลล์ต่างๆ โปรตีนเป็นส่วนสำคัญเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการสมดุลของส่วนที่เป็นของเหลวทั่วไปในร่างกายด้วย

ประเภทของโปรตีน (อาภัสสรา, 2537)

โปรตีนแบ่งเป็น 2 พวกใหญ่ๆ โดยอาศัยส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้คือ

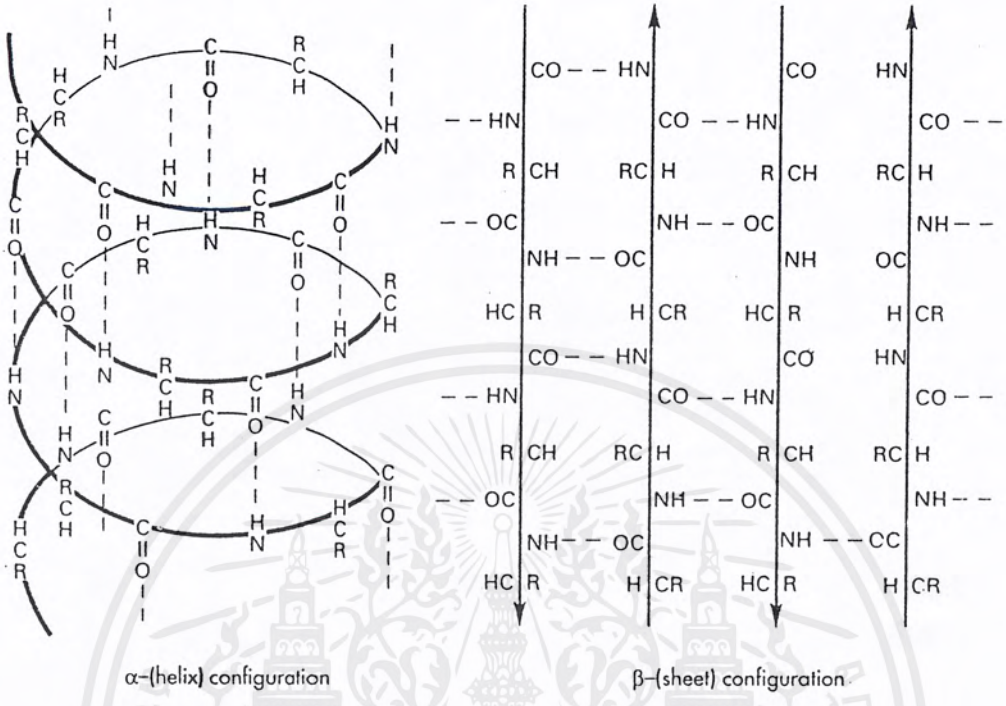
1. โปรตีนเชิงเดี่ยว (Simple protein) ประกอบด้วยกรดอะมิโนเท่านั้นเป็นส่วนประกอบไม่มีหมู่เคมีอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน เพราะฉะนั้นเมื่อนำโปรตีนชนิดนี้มาไฮโดรไลซ์ จะได้กรดอะมิโนเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างโปรตีนประเภทนี้ เช่น อัลบูมิน (albumin) กลอบูลิน (globulin) ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) และไคโมรทริปซิโนเจน (chymotrypsinogen)

2. โปรตีนคู่ (Conjugated protein) ประกอบด้วยกรดอะมิโนและส่วนที่ไม่ใช่กรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ เพราะฉะนั้นเมื่อถูกไฮโดรไลซ์จะได้กรดอะมิโนและผลผลิตที่เป็นทั้งผลผลิตอินทรีย์หรืออนินทรีย์ด้วย ส่วนที่ไม่ใช่กรดอะมิโนนี้เรียกว่า หมู่พรอสเธติก (prosthetic group) ซึ่งมีหน้าที่ทางชีวภาพ ตัวอย่างของโปรตีนคู่ เช่น นิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) และไลโปโปรตีน (lipoprotein) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอยู่รวมกันกับกรดนิวคลีอิกและลิพิดตามลำดับ

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งโปรตีนออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ โดยอาศัยโครงรูป (conformation) หรือรูปร่าง 3 มิติ (three-dimensional shape) ของมันได้ดังนี้คือ

1. โปรตีนเส้นใย (Fibrous protein) ประกอบด้วยโซ่พอลิเพปไทด์เป็นเส้นยาวขนานกับแกนในลักษณะเป็นเส้นใย (fiber) หรือเป็นแผ่น (sheet) ดังแสดงในรูปที่ 1 มีความแข็ง เหนียว และอาจจะยืดหยุ่นได้ ไม่ละลายในน้ำหรือในสารละลายเกลือที่เจือจาง โปรตีนพวกนี้เป็นโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ของสัตว์ชั้นสูง ตัวอย่างเช่น คอลลาเจน (collagen) ที่อยู่ในเอ็น (tendon) เมทริกซ์ (matrix) กระดูก, คีราทิน (keratin) ที่อยู่ในเส้นผม ขน เครา และเล็บ, และไฟโบรอิน (fibroin) ที่อยู่ในเส้นไหม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

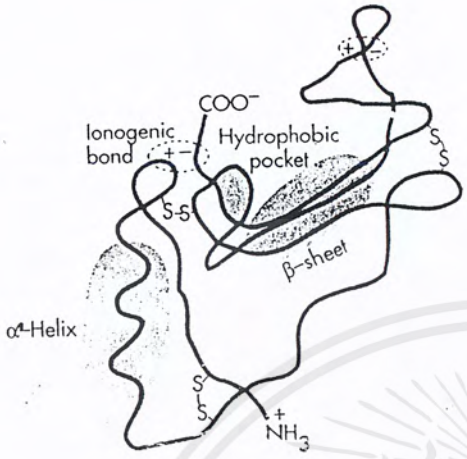


รูปที่ 2.1 โครงสร้างของโปรตีนเส้นใย
ที่มา : อาภัสสรา (2537)

2. โปรตีนกลอบูลาร์ (Globular protein) ประกอบด้วยโซ่พอลิเพปไทด์มาขดม้วนแน่นในลักษณะกลม โดยเอาหมู่ R ที่โพลาร์ ของกรดอะมิโนอยู่ข้างนอกโมเลกุล ซึ่งจะถูกไฮเดรต (hydrate) ด้วยน้ำและเอาหมู่ R ที่ไฮโดรโพบิกไว้ข้างในโมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โครงสร้างของโปรตีนพวกนี้ประกอบด้วยเกลียวอัลฟา (α-helix) และโครงรูปเบตา (β-conformation) ในปริมาณต่างๆกัน ส่วนที่ละลายในน้ำได้ ตัวอย่างเช่นเอนไซม์เกือบทุกชนิด แอนติบอดี (antibody) ฮอร์โมนบางชนิด และโปรตีนขนส่ง เช่น อัลบูมินในซีรัม และฮีโมโกลบิน

โปรตีนบางชนิดมีคุณสมบัติของทั้งโปรตีนเส้นใยและโปรตีนกลอบูลาร์ เช่น ไมโอซิน (myosin) ซึ่งทำหน้าที่ในการหดตัวของกล้ามเนื้อ และไฟบริโนเจน (fibinogen) โปรตีนเหล่านี้มีโครงสร้างเป็นเส้นใย แต่สามารถสะลายได้ในสารละลายเกลือเหมือนโปรตีนกลอบูลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของโปรตีนกลอบูลาร์
ที่มา : อาภัสสรา (2537)

<u>โครงสร้างของโปรตีน</u> (อาภัสสรา, 2537)

โครงสร้างของโปรตีน (Structure of Protein) สามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิด (ในรูปที่ 2.3) ดังนี้

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) หมายถึงโครงสร้างของโปรตีนที่ประกอบด้วยเรียงลำดับของกรดอะมิโนที่จำเพาะเป็นสายยาวของโซ่พอลิเพปไทด์ด้วยพันธะเพบไทด์

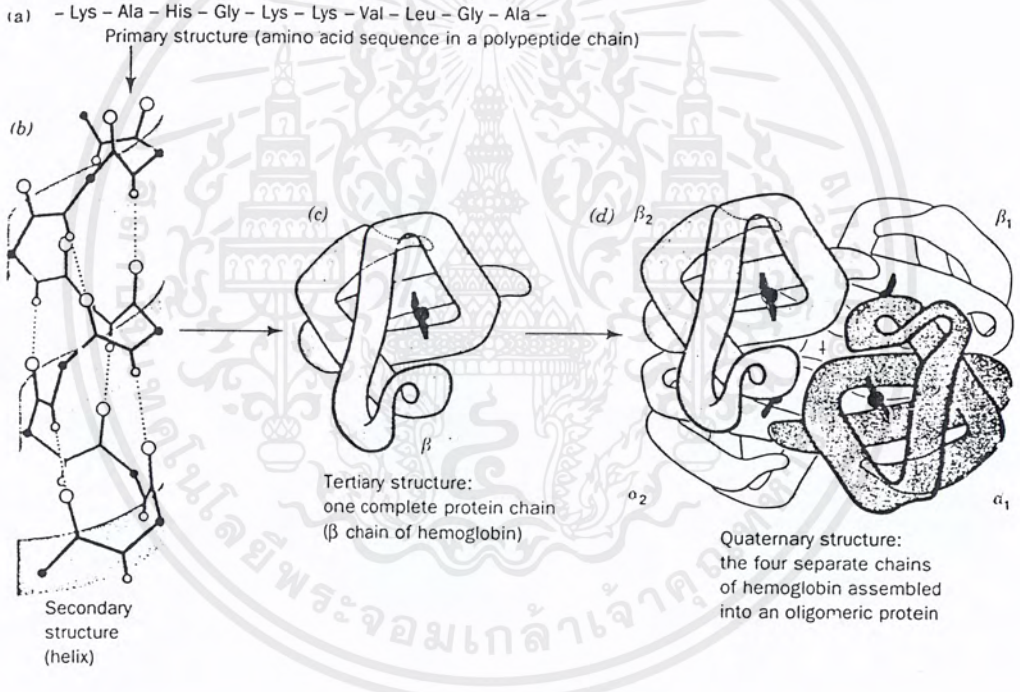
2. โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) หมายถึงโครงสร้างของโปรตีนที่มีโซ่พอลิเพปไทด์มาขดม้วนเป็นเกลียวในลักษณะที่เรียกว่า เกลียวอัลฟา และโครงสร้างที่มีโซ่พอลิเพปไทด์ในลักษณะโครงรูปแบบซิกแซกมาเรียงขนานกันเป็นแผ่นจีบ (pleated sheet) ลักษณะของขดม้วนของเกลียวอัลฟา และการเรียงขนานกันของโซ่พอลิเพปไทด์ถูกยึดให้เกิดขึ้น โดยพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่คาร์บอนิล (carbomyl group, –C=O) และหมู่อิมิโด (imido group, –NH-) ของโซ่เพปไทด์ และพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) โครงสร้างนี้พบในโปรตีนเส้นใย นอกจากนี้เกลียวคอลลาเจน (collagen helix) ก็เป็นตัวอย่างของโครงสร้างทุติยภูมิ

3. โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) หมายถึงโครงสร้างที่มีโซ่พอลิเพปไทด์มาขดม้วนแน่นในลักษณะกลมของโปรตีนกลอบูลาร์ พันธะที่เข้ามาเกี่ยวข้องทำให้โครงสร้างนี้เสถียรอยู่ได้นี่คือ พันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนท์และพันธะอ่อน (weak bond) เช่น พันธะไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธะไฮโดรโฟบิก หรือ พันธะนอนโพลาร์ (nonpolar bond) และแรงวันเดอร์วาลส์ (Van der Waals forces)

4. โครงสร้างจตุรภูมิ (Quaternary structure) หมายถึงโครงสร้างที่ประกอบด้วยโซ่พอลิเพปไทด์มากกว่าหนึ่งโซ่อยู่ร่วมกันด้วยพันธะอ่อน แต่ละโซ่พอลิเพปไทด์ หรือหน่วยย่อย (subunit) หรือโปรโตเมอร์ (protomer) อาจจะเหมือนกันหรือต่างกันก็ได้ โปรตีนที่มีโครงสร้างลักษณะนี้เรียกว่าโอลิโกเมอริกโปรตีน (oligomeric protein) ตัวอย่างเช่น ฮีโมโกลบินประกอบด้วยโซ่อัลฟา 2 โซ่ และโซ่เบตา 2 โซ่



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของโปรตีนทั้ง 4 ชนิด
ที่มา : อาภัสสรา (2537)

<u>หน้าที่และความสำคัญของโปรตีน</u> (สิริพันธุ์, 2541)

1. สร้างและซ่อมแซมเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งไขมันและคาร์โบไฮเดรตไม่สามารถทำหน้าที่นี้ได้ เพราะไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โปรตีนในอาหารถูกย่อยได้กรดอะมิโนซึ่งจะถูกดูดซึมไปใช้สังเคราะห์เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างร่างกาย และเป็นเนื้อเยื่อโปรตีน เพื่อการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าที่ใช้ในการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ เช่น ระยะตั้งครรภ์ ทารกกำลังเจริญเติบโตจะต้องการโปรตีนมากว่าระยะที่สร้างเนื้อเยื่อเมื่อถูกน้ำร้อนลวก ไฟไหม้ ผ่าตัด เป็นต้น

2. สร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานต่างๆ ภายในร่างกาย เช่น น้ำย่อย ฮอร์โมน สารภูมิคุ้มกัน และโปรตีนชนิดต่างๆ ในร่างกาย

3. ช่วยรักษาดุลของน้ำในร่างกาย โปรตีนในเลือดมีส่วนช่วยควบคุมการแลกเปลี่ยนหรือการเคลื่อนที่ของของเหลวระหว่างเลือดกับเซลล์ โปรตีนโมเลกุลมีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านผนังเส้นเลือดได้ผิดกับน้ำและสารอื่นๆ ที่ละลายในรูปของสารละลาย ซึ่งสามารถผ่านผนังเส้นเลือดได้โดยอิสระ การที่โปรตีน (ส่วนใหญ่คืออัลบูมิน) คงอยู่ในเลือดนี้ทำให้เกิดความดันออสโมติคขึ้น ซึ่งจะช่วยให้น้ำคงอยู่ในเส้นเลือด จึงช่วยควบคุมความเข้มข้นของเลือดและดุลของน้ำในร่างกายให้คงที่ ในคนหรือสัตว์ที่มีโปรตีนในเลือดต่ำ ความดันออสโมติคในเส้นเลือดจะต่ำลงเมื่อความดันเลือดสูงกว่าความดันออสโมติค น้ำจะออกจากเลือดไปสะสมในของเหลวที่อยู่รอบๆ เซลล์มากผิดปกติทำให้เกิดการบวมขึ้น

4. รักษาดุล กรด ด่าง ของร่างกาย เนื่องจากโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนและในตัวกรดอะมิโนเองมีหน่วยคาร์บอกซิล ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดและหน่วยอะมิโนมีฤทธิ์เป็นด่าง โปรตีนจึงมีคุณสมบัติรักษากรดด่างของร่างกายซึ่งมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาต่างๆ ภายในร่างกาย การรักษาความเป็นกรดด่างให้คงที่ได้นี้เกิดจากโปรตีนในน้ำเลือดและฮีโมโกลบิน ในเม็ดเลือดเป็นพวกโปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งกรดและด่าง จึงสามารถทำปฏิกิริยากับกรดและด่างได้ทั้งสองอย่าง นอกจากนี้ฮีโมโกลบินยังสามารถนำเอาของเสียหรือ คาร์บอนไดออกไซด์ส่วนใหญ่ไปขับออกที่ปอด เป็นการป้องกันไม่ให้คาร์บอนไดออกไซด์สะสมอยู่ในเลือด เพราะเมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ละลายน้ำ จะมีฤทธิ์เป็นกรดและทำให้ความเป็นกรดของเลือดและของเหลวภายในร่างกายผิดไป ซึ่งจะมีผลให้อวัยวะต่างๆ ทำงานผิดปกติได้

5. ให้พลังงาน ถ้าร่างกายได้รับพลังงานจากอาหาร คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ไม่พอจะใช้พลังงานจากโปรตีน โปรตีน 1 กรัม ให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี่ และถ้าได้รับโปรตีนจากอาหารไม่เพียงพอจะทำให้ขาดโปรตีนที่จะทำหน้าที่อื่นๆ ในร่างกาย การที่ร่างกายไม่นิยมนำโปรตีนมาให้พลังงานเพราะจะมีผลเสียหายที่เกิดจากการเผาผลาญของสารอาหารโปรตีนด้วย เช่น ทำให้เกิดการสูญเสียความร้อนที่ไร้ประโยชน์มากขึ้น และเมื่อเหลือจากการใช้แล้วร่างกายจะต้องใช้พลังงานในการสลายออกเพื่อเป็นแอมโมเนีย และทำเป็นสารที่ไร้ประโยชน์ ซึ่งผลการสลายนั้นคือ ยูเรีย ซึ่งจะต้องถูกขับออกจากร่างกาย อวัยวะที่ต้องทำหน้าที่ที่หนักในวิธีการที่กล่าวมานี้คือ ไตและตับ นอกจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

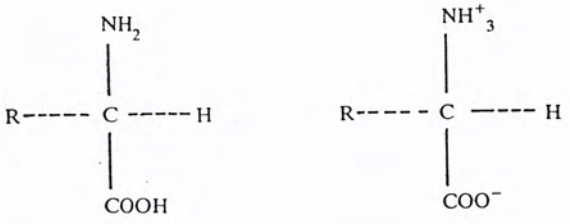
นี้ในการขับถ่ายของเสียออกนี้ยังต้องใช้น้ำเป็นจำนวนมากด้วย ในรายที่อดอาหาร ร่างกายจะใช้พลังงานจากคาร์โบไฮเดรตและไขมันที่เก็บสะสมในร่างกายจนเกือบหมด และจึงสลายเนื้อเยื่อโปรตีนมาใช้เป็นพลังงาน เพราะความต้องการพลังงานของร่างกายมีความสำคัญเป็นอันดับแรก ในกรณีที่มีโปรตีนมากเกินความต้องการของร่างกายที่จะนำไปสร้างเนื้อเยื่อหรือพลังงานแล้ว โปรตีนส่วนที่เหลือนี้สามารถเปลี่ยนเป็นไขมันในเนื้อเยื่อของร่างกายโดยตับ

6. ช่วยกำจัดสารพิษบางอย่าง เช่น ถ้าร่างกายได้รับกรดเบนโซอิก ที่ใช้เป็นสารกันบูดในอาหารกระป๋อง ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกาย ตับจะทำลายโดยการนำมารวมกับไกลซีนให้กลายเป็นกรดฮิปพิวริกที่กำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะ

<u>กรดอะมิโน</u>

โปรตีนเมื่อถูกสลายด้วยน้ำ (Hydrolysis) ในกรดหรือด่างเข้มข้น หรือความร้อน หรือ น้ำย่อยจะแตกตัวออกเป็นสารเล็กๆ ซึ่งจะมีปฏิกิริยาเป็นได้ทั้งกรดหรือด่างจึงตั้งชื่อว่า กรดอะมิโน เพราะกรดอะมิโน แต่ละตัวจะประกอบด้วยกลุ่มคาร์บอกซิล (carboxyl group, COOH) ซึ่งมีสมบัติเป็นกรด และกลุ่มอะมิโน (amino group, NH_2) ซึ่งมีสมบัติเป็นด่าง โครงสร้างของกรดอะมิโนพื้นฐานและกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 2.4 (ก) และตารางที่ 2.1 ตามลำดับ (สิริพันธุ์, 2541) จากองค์ประกอบภายในของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งกรดและด่าง จึงสามารถทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ได้เพราะเป็นพวก dipolar ion (Zwittes ions, a hermaphrodite คือ มีทั้งขั้ว + และ – อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.4(ข)) ดังนั้นเมื่อไปอยู่ในสารละลายที่เป็นกรดอย่างแรง กรดอะมิโนจะประกอบด้วย cation มากแสดงคุณสมบัติของการเป็นด่างออกมา แต่เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นด่างอย่างแรง ตัวมันเองจะมี anion ประกอบอยู่มาก แสดงคุณสมบัติเป็นกรดออกมา การเคลื่อนย้ายโปรตอนจาก acidic carboxyl group ไปยัง basic amino group ในสภาวะของเหลว จะเกิดการเคลื่อนย้ายไปลักษณะที่เรียกว่า equilibrium โดยมีการเปลี่ยนรูปแบบดังแสดงในรูปที่ 2.5 กรดอะมิโนแต่ละตัวมีหมู่กรดอะมิโนและหมู่คาร์บอกซิล ในปริมาณที่แตกต่างกันออกไป เพราะฉะนั้นสภาวะที่เกิด dipolar ion สูงที่สุด เรียกว่า isoelectric point (pI) ซึ่งกรดอะมิโนแต่ละตัวจะมีค่านี้ไม่เท่า และค่านี้ไม่ได้อยู่ที่ pH เป็นกลางเสมอไป แต่จะขึ้นอยู่กับความเป็นเบสของหมู่อะมิโนและความเป็นกรดของหมู่คาร์บอกซิล ซึ่งจะแปรไปตามธรรมชาติของหมู่อัลคิล กรดอะมิโนที่มีหมู่อะมิโนมากกว่าหมู่คาร์บอกซิล หรือมีในทางกลับ จะมีผลต่อค่า pI ทำให้กรดอะมิโนแต่ละตัวมีคุณสมบัติที่ต่างกันออกไป ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของกรดอะมิโนแสดงในตารางที่ 2.2 (พันทิพา, 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

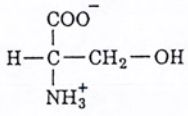
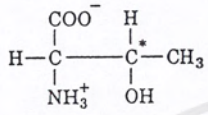
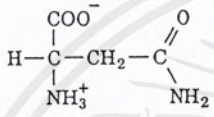
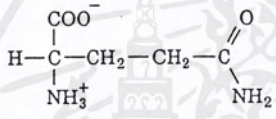
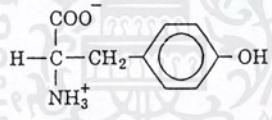
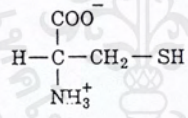
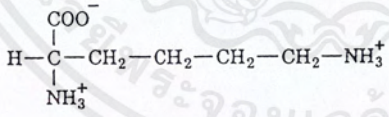
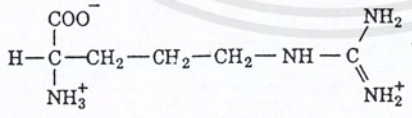
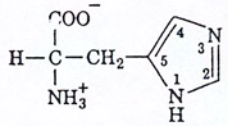
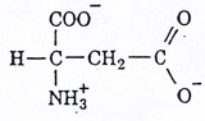
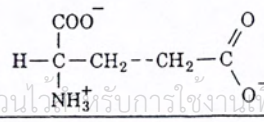
รูปที่ 2.4 : (ก) สูตรทั่วไปของกรดอะมิโน (ข) คุณสมบัติเป็น dipolar ion ของกรดอะมิโน
ที่มา พันทิพา (2535)

การที่มีค่า pI แตกต่างกันจะเป็นประโยชน์ในการใช้แยกชนิดของกรดอะมิโน หรือโปรตีนได้ เพราะโดยปกติที่ระดับ pI ทั้งกรดอะมิโนและโปรตีนจะละลายได้น้อยที่สุด ฉะนั้นถ้าเปลี่ยน pH ของสารละลายไปเรื่อย ๆ ก็จะมีการตกตะกอน หรือเกิดผลึกของกรดอะมิโน หรือเกิดผลึกของกรดอะมิโน หรือโปรตีนเป็นชนิด ๆ ไปตามลำดับ (พันทิพา, 2535)

กรดอะมิโนนี้จะเป็นสารประกอบอยู่ในโปรตีนเป็นจำนวนมาก ซึ่งแต่ละโมเลกุลเชื่อมติดกันโดยพันธะทางเคมี เปรียบเหมือนลูกโซ่ติดต่อกันเป็นสาย แต่โปรตีนที่มีกรดอะมิโนติดต่อกันเป็นสายยาวนั้นอาจพับไปพับมารวมเป็นกลุ่ม บางชนิดเป็นเกลียงหรือขด เป็นวง เพราะมีการเชื่อมกันระหว่างกรดอะมิโนด้วยกัน กรดอะมิโนในโปรตีน ทำปฏิกิริยากันเกิดพันธะเคมี ชนิดหนึ่งระหว่างโมเลกุลขึ้น เรียกว่า " พันธะเพปไทด์ (peptide linkage) " โดยปกติโปรตีน จะประกอบด้วยกรดอะมิโน 35-300 หน่วย ถ้าโปรตีนที่มีขนาดเล็ก เช่น ไดเพปไทด์ (dipeptides) จะประกอบด้วยกรดอะมิโน 2 หน่วยมาเชื่อมต่อกัน ไตรเพปไทด์ (tripeptides) ประกอบด้วย กรดอะมิโน 3 หน่วยมาเชื่อมต่อกัน แต่ถ้าเป็น โพลิเพปไทด์ (polypeptides) จะประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 4 หน่วยมารวมกัน กรดอะมิโนเป็นสารประกอบเคมี ซึ่งในโครงสร้างประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน แต่กรดอะมิโนบางชนิด เช่น ซีสทีน (cystine) ซีเทอีน (cystein) และเมไทโอนีน (methionine) จะมีกำมะถันประกอบอยู่ด้วย (สิริพันธุ์, 2541)

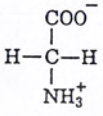
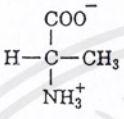
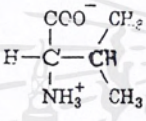
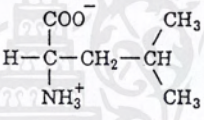
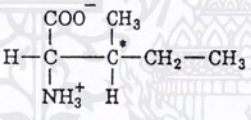
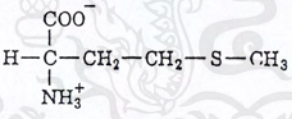
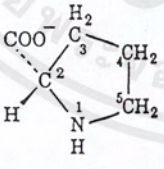
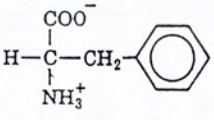
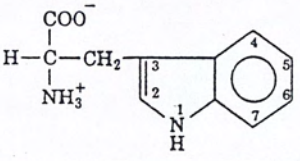
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างของกรดอะมิโน

Name	Structural Formula	Residue Mass (D)	Average Occurrence in Proteins (%)
Amino acids with uncharged polar side chains			
Serine Ser		87.0	7.1
Threonine Thr		101.1	6.0
Asparagine Asn		114.1	4.4
Glutamine Gln		128.1	3.9
Tyrosine Tyr		163.1	3.5
Cysteine Cys		103.1	2.8
Amino acids with charged polar side chains			
Lysine Lys		129.1	7.0
Arginine Arg		157.2	4.7
Histidine His		137.1	2.1
Aspartic acid Asp		114.0	5.5
Glutamic acid Glu		128.1	6.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

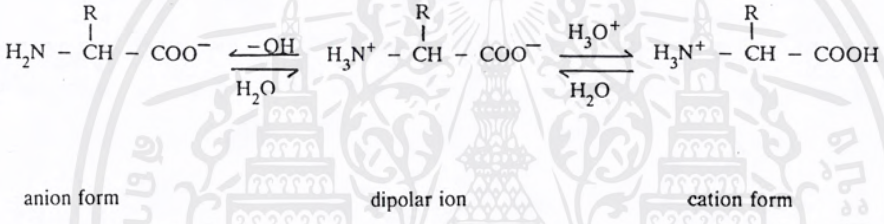
ตารางที่ 2.1 โครงสร้างของกรดอะมิโน (ต่อ)

Name	Structural Formula	Residue Mass (D)	Average Occurrence in Proteins (%)
Amino acids with nonpolar side chains			
Glycine Gly		57.0	7.5
Alanine Ala		71.0	9.0
Valine Val		99.1	6.9
Leucine Leu		113.1	7.5
Isoleucine Ile		113.1	4.6
Methionine Met		131.1	1.7
Proline Pro		97.1	4.6
Phenylalanine Phe		147.1	3.5
Tryptophan Trp		186.2	1.1

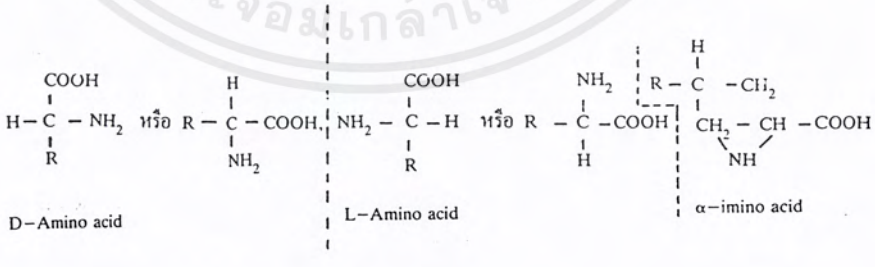
ที่มา : อาภัสสรา (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะมิโนจะมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ D-form และ L-form ซึ่งในธรรมชาติมักปรากฏอยู่ในรูป L-form มากกว่า D-form ซึ่งกรดอะมิโนชนิด L-form สัตว์จะนำไปใช้ทันที ส่วน D-form สัตว์ไม่สามารถใช้ได้ทันที เช่น ถ้ามี L-form สัตว์นำไปใช้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเป็น DL-form สัตว์จะใช้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ยกเว้นกรดอะมิโน 4 ตัว ที่สัตว์ใช้ได้ทั้ง D และ L-form เข้าสู่ร่างกายสัตว์ในรูป D-form จุลินทรีย์ที่อยู่ตามทางเดินอาหารจะเปลี่ยน D-form ให้เป็น L-form กรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เมไทโอนีน ฮีสทีดีน ฟีนิลอะลานีน และทริปโตเฟน พวก D-form จะมีหมู่อะมิโนอยู่ด้านขวา ส่วน L-form จะอยู่ด้านซ้ายมือ โครงสร้างของรูปแบบดังกล่าวแสดงในรูปที่ 2.6 (พันทิพา, 2535)



รูปที่ 2.5 ลักษณะของ equilibrium ของกรดอะมิโน
ที่มา : พันทิพา (2535)



รูปที่ 2.6 โครงสร้าง D และ L-form ของกรดอะมิโน
ที่มา : พันทิพา (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางกายภาพบางประการของกรดอะมิโน

	IUPAC–IUB abbreviations		MW	*Decomposition temperature* (°C)	*Water solubility* (g/100 g 25°C)	p*K* α-CO_2H	p*K* α-NH_3^+	p*K side chain*	*Isoelectric* pH	$[\alpha]_D^{25}$ H_2O	$[\alpha]_D^{25}$ 5 M HCl	*Taste in aqueous solution* (pH 6.0)
1. Alanine	Ala	A	89.10	297	16.5	2.34	9.69		6.01	+ 1.6	+ 13.0	sweet
2. Arginine	Arg	R	174.21	238	15.0†	2.17	9.04	12.84	10.76	+ 21.8	+ 48.1	bitter
3. Asparagine	Asn	N	132.12	236	3.1	2.02	8.60		5.41	− 7.4	+ 37.8	bitter
4. Aspartic acid	Asp	D	133.11	270	0.5	1.88	9.60	3.65	2.77	+ 6.7	+ 33.8	bitter
5. Cysteine	Cys	C	121.16	178*	v. sol	1.71	8.18	10.28	5.02	− 20.0	+ 7.9	sulphurous
6. Glutamic acid	Glu	E	147.14	249	0.84	2.16	9.67	4.32	3.24	+ 17.7	+ 46.8	tasty
7. Glutamine	Gln	Q	146.15	185	3.6	2.17	9.13		5.65	+ 9.2	+ 46.5	sweet
8. Glycine	Gly	G	75.07	292	25	2.34	9.60		5.97	—	—	sweet
9. Histidine	His	H	155.16	277	7.59	1.82	9.17	6.00	7.59	− 59.8	+ 18.3	bitter
10. Isoleucine	Ile	I	131.18	284	4.12	2.36	9.68		6.02	+ 16.3	+ 51.8	bitter
11. Leucine	Leu	L	131.18	337	2.3	2.36	9.60		5.98	− 14.4	+ 21.0	bitter
12. Lysine	Lys	K	146.19	224	v. sol	2.18	9.12	10.53	9.82	+ 19.7	+ 37.9	flat
13. Methionine	Met	M	149.22	283	3.5	2.28	9.21		5.74	− 14.9	+ 34.6	tasty
14. Phenylalanine	Phe	F	165.20	284	2.97	1.83	9.13		5.48	− 57.0	− 7.4	bitter
15. Proline	Pro	P	115.14	222	162.3	1.99	10.6		6.30	− 99.2	− 69.5	sweet
16. Serine	Ser	S	105.10	228	5.0	2.21	9.15		5.68	− 7.9	+ 15.9	sweet
17. Threonine	Thr	T	119.12	253	20.5	2.71	9.62		6.16	− 33.9	− 17.9	sweet
18. Tryptophan	Trp	W	204.23	282	1.14	2.38	9.39		5.89	− 68.8	− 5.7	bitter
19. Tyrosine	Tyr	Y	181.20	344	0.05	2.20	9.11	10.07	5.66	N.S.	− 18.1	bitter
20. Valine	Val	V	117.15	315	8.85	2.32	9.62		5.96	+ 6.6	+ 33.1	bitter

*as HCl
†21°C

ที่มา : Barrett (1985)

ประเภทของกรดอะมิโน (สิริพันธุ์, 2541)

กรดอะมิโนแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ กรดอะมิโนจำเป็น และกรดอะมิโนไม่จำเป็น ดังแสดงในตารางที่ 2.1

1. กรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ กรดอะมิโนที่ร่างกายสังเคราะห์ไม่ได้หรือสังเคราะห์ได้ แต่ไม่เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร กรดอะมิโนเหล่านี้แสดงในตารางที่ 2.3 ในเด็กพบว่าเด็กต้องการกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย 9 ตัว ยกเว้น อาร์จีนีน ส่วนผู้ใหญ่ต้องการกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย 8 ตัว เพื่อรักษาดุลของไนโตรเจน กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับผู้ใหญ่นั้นเหมือนกับกรดอะมิโนที่เด็กต้องการ ยกเว้น ฮีสทิดีน ตัวเดียวทั้งนี้เพราะผู้ใหญ่สามารถสังเคราะห์ ฮีสทิดีน ได้เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย

2. กรดอะมิโนไม่จำเป็น ได้แก่ กรดอะมิโนที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นได้เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย ไม่จำเป็นต้องได้รับจากอาหารคือ อาจสังเคราะห์ขึ้นจากสารประกอบพวกไนโตรเจนหรือจากกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกายหรือจากไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโนแสดงในตารางที่ 2.3 แม้ว่าร่างกายจะไม่ต้องการกรดอะมิโนไม่จำเป็นเพราะสังเคราะห์ขึ้นเองได้ แต่ถ้าอาหารขาดกรดอะมิโนไม่จำเป็นก็อาจทำให้การสังเคราะห์โปรตีนในร่างกายมีขีดจำกัดเท่าที่ความเร็วของร่างจะสังเคราะห์กรดอะมิโนไม่จำเป็นได้เพียงพอ ดังนั้นถ้าได้รับอาหารที่มีทั้งกรดอะมิโนจำเป็น และกรดอะมิโนไม่จำเป็นเพียงพอ ร่างกายจะสังเคราะห์โปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ประเภทของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนจำเป็นต่อร่างกาย	กรดอะมิโนไม่จำเป็นต่อร่างกาย
ทรีโอนีน (threonine)	อะลานีน (alanine)
เวลีน (valine)	กรดแอสพาร์ทิก (aspartic acid)
ทริปโทเฟน (tryptophan)	ซีสเตอีน (cystein)
ไอโซลูซีน (isoleucine)	ซีสทีน (cystine)
ลูซีน (leusine)	กรดกลูตามิก (glutamic acid)
ไลซีน (lysine)	กลูตานีน (glutamine)
เฟนิลอะลานีน (phenylalanine)	ไกลซีน (glycine)
เมไทโอนีน (methionine)	โพรลีน (proline)
ฮิสทิดีน (histidine**)	เซรีน (serine)
อาร์จินีน (arginine*)	ไทโรซีน (tyrosine)

* กรดอะมิโนจำเป็นสำหรับหนูขาว

** กรดอะมิโนจำเป็นสำหรับเด็ก

ที่มา สิริพันธุ์ (2541)

<u>เมตาบอลิสมของกรดอะมิโน</u> (นิธิยา และ วิบูลย์, 2537)

โปรตีนโดยทั่วไปจะมีน้ำหนักโมเลกุลมากทำให้ไม่สามารถดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็กไปหล่อเลี้ยงร่างกายได้ จะต้องผ่านการย่อยในกระเพาะและลำไส้เล็กด้วยน้ำย่อยหลายชนิด จนได้เป็นกรดอะมิโนแต่ละโมเลกุลเสียก่อน จึงจะซึมผ่านผนังลำไส้เล็กไปเลี้ยงร่างกายได้ (สิริพันธุ์, 2541) การย่อยโปรตีนและการดูดซึมกรดอะมิโนในร่างกายแสดงในรูปที่ 2.7

กรดอะมิโนที่ได้จากโปรตีนในอาหารที่กินเข้าไป เป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่ร่างกายได้รับจากภายนอก (exogenous amino acid) เมื่อถูกดูดเข้าสู่กระแสเลือด จะถูกพาไปยังตับและเนื้อเยื่อต่างๆ ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนั้น ยังมีกรดอะมิโนที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีนในร่างกาย ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ได้ภายในร่างกาย (endogenous amino acid) ซึ่งจะรวมกับ กรดอะมิโนภายนอกร่างกาย เป็นกรดอะมิโนทั้งหมดของร่างกาย ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นกรดอะมิโนที่ได้จากอาหารภายนอกประมาณ 1 ใน 3 ส่วน และได้จากการสลายตัวของโปรตีนในร่างกาย ประมาณ 2 ใน 3 ส่วน

กรดอะมิโนในร่างกาย ส่วนใหญ่ถูกนำไปสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่างๆที่ตับ โดยเฉพาะโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาสารต่างๆ ในเลือด นอกจากนั้น ยังนำไปสังเคราะห์เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ สังเคราะห์เป็นฮอร์โมน ภูมิคุ้มกัน และสารอื่นๆ อีกมากมายที่จำเป็นต่อร่างกาย

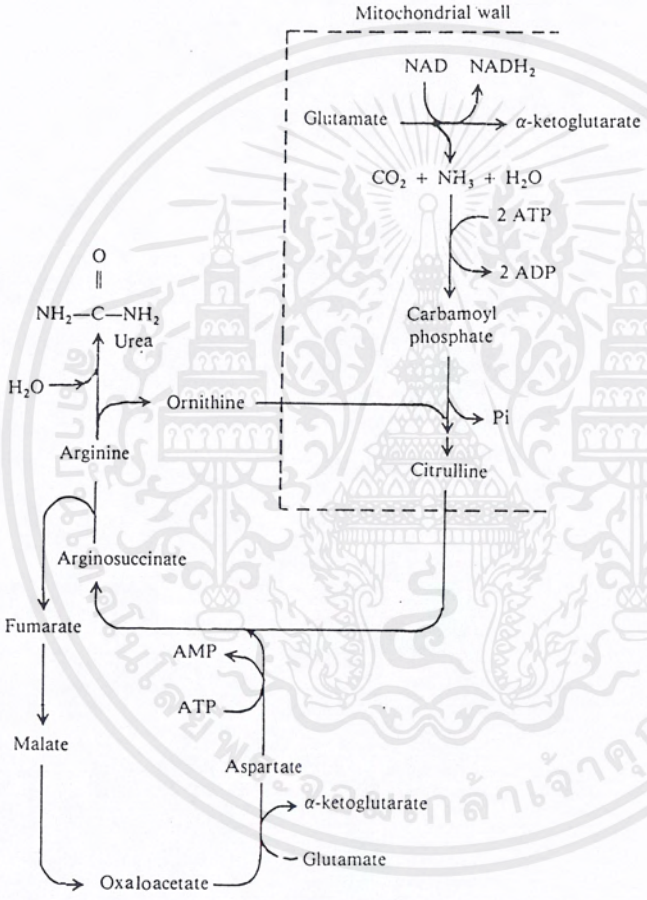
กรดอะมิโนที่เหลือจากที่ร่างกายต้องการจะถูกออกซิไดซ์ให้เป็นพลังงาน หรือถูกเปลี่ยนให้เป็นคาร์โบไฮเดรตและไขมัน ในกรณีที่ร่างกายได้รับพลังงานจากคาร์โบไฮเดรตและไขมันเพียงพอ โปรตีนที่เหลือจะถูกสะสมไว้ในรูปไขมัน ถ้าร่างกายได้รับพลังงานไม่เพียงพอ กรดอะมิโนจะถูกสะสมไว้ในรูปไขมัน ถ้าร่างกายได้รับสารอาหารที่ให้พลังงานไม่เพียงพอ กรดอะมิโนจะถูกนำมาใช้เปลี่ยนให้เป็นพลังงาน โดยผ่านปฏิกิริยาดีแอมมิเนชั่นหรือทรานส์แอมมิเนชั่น แยกเอาหมู่อะมิโนออกได้เป็นกรดแอลฟา- คีโต ซึ่งจะเปลี่ยนต่อให้เป็นกลูโคสหรืออนุพันธ์ของกลูโคสและเปลี่ยนต่อเป็นพลังงานต่อไป หมู่อะมิโนที่ได้อาจนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอื่น โดยผ่านปฏิกิริยาทรานส์แอมมิเนชั่น หมู่อะมิโนที่ถูกแยกออกมาจากกรดอะมิโนในรูปของแอมโมเนีย ส่วนใหญ่จะถูกนำไปสังเคราะห์เป็นยูเรีย โดยใช้หมู่อะมิโนสองหมู่รวมกับคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล ผ่าน ornithine cycle (ในรูปที่ 2.8) ที่ได้เป็นยูเรียขับออกทางปัสสาวะ นอกจากนั้น หมู่อะมิโนอาจรวมกับกรดกลูตามิคเป็นกลูตามีนอยู่ในกระแสเลือดไหลผ่านไต กลูตามีนจะปล่อยหมู่อะมิโนออกมาในรูปแอมโมเนีย ขับออกทางไตปนออกมากับปัสสาวะเช่นเดียวกับยูเรีย

กรดแอลฟา-คีโต ที่เกิดขึ้นจะผ่านกระบวนการเมตาบอลิสม์ของคาร์บอไฮเดรต หรืออาจถูกนำไปสังเคราะห์เป็นกลูโคสและคีโตนบอดี้ กรดอะมิโนบางชนิดจะผ่านกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชั่นแยกเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออก ได้เป็นสารประกอบจำพวกเอมีน ซึ่งบางชนิดก็เป็นประโยชน์แก่ร่างกาย บางชนิดก็ไม่มีประโยชน์และอาจเป็นพิษต่อร่างกายได้ด้วย

กรดอะมิโนที่เปลี่ยนเป็นกรดแอลฟา-คีโต และเปลี่ยนต่อเป็นกลูโคส หรืออนุพันธ์อื่น ๆ ของกลูโคสในวิถีกลัยโคลัยลิส และวงจรเครบส์เรียกว่า กรดอะมิโนประเภทกลูโคจีนิก (glycogenic amino acid) ส่วนกรดอะมิโนที่เปลี่ยนเป็นคีโตนบอดีได้ เรียกว่า กรดอะมิโนประเภทคีโตนจีนิก (ketogenic amino acid) ซึ่งสรุปเมตาบอลิสมของกรดอะมิโนแสดงในรูปที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

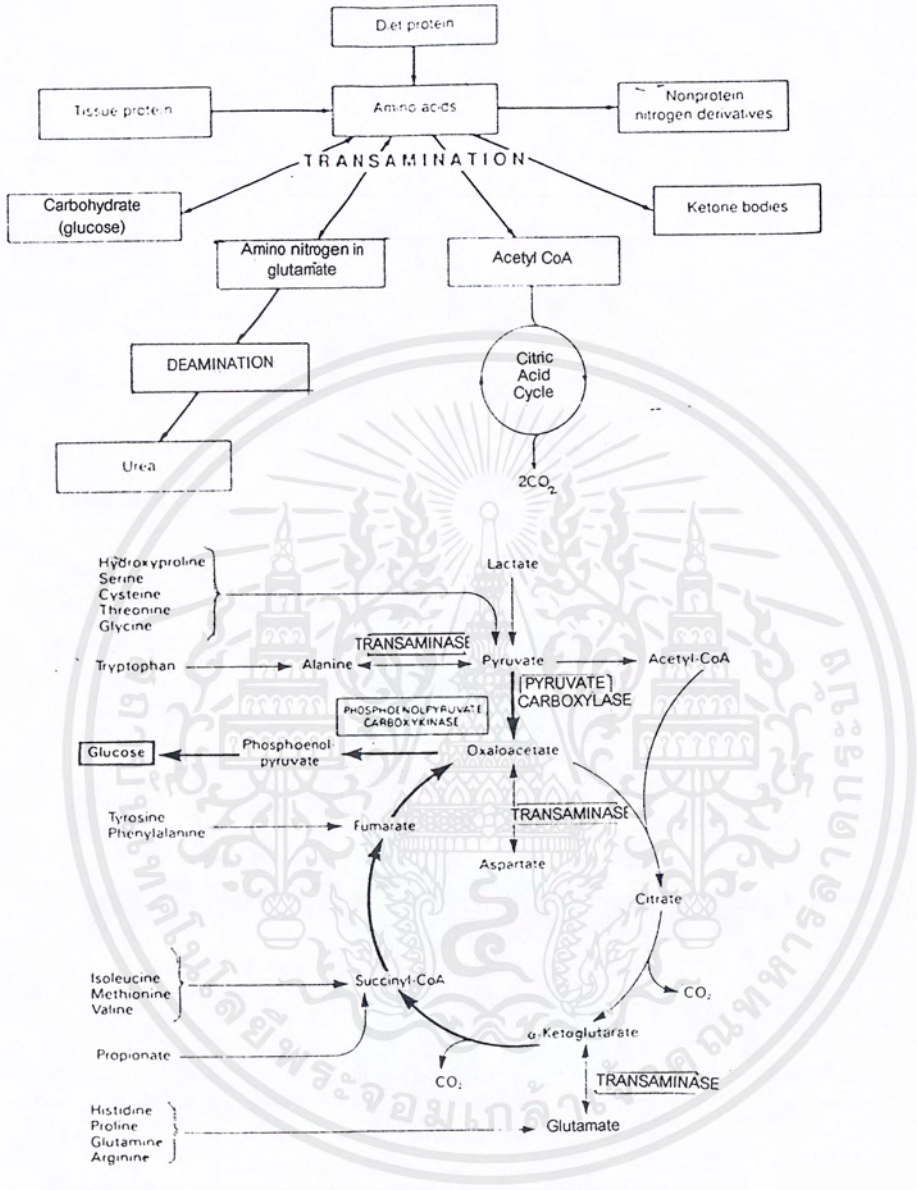


รูปที่ 2.7 การย่อยโปรตีนและการดูดซึมกรดอะมิโนในร่างกาย

ที่มา : นิธิยา และ วิบูลย์ (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

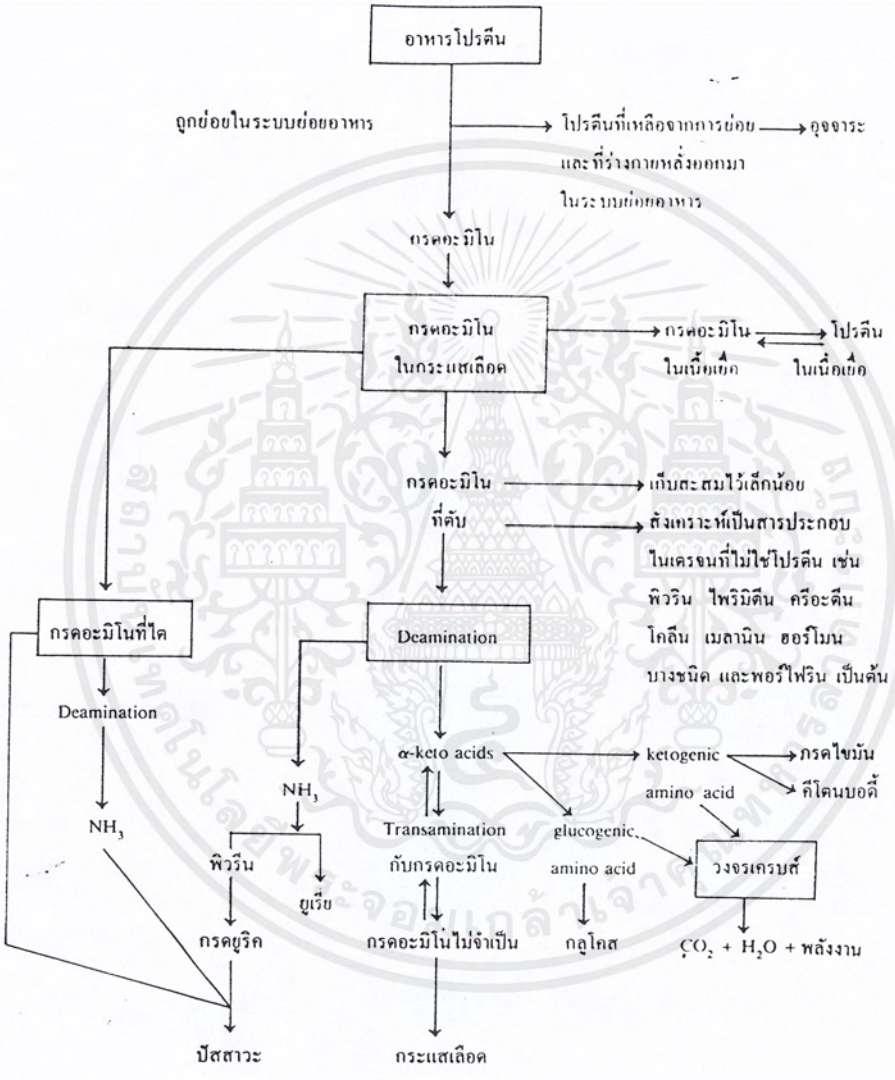
39880



รูปที่ 2.8 ornithine cycle

ที่มา : ศรีสกุล (2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 เมตาบอลิสม์ของกรดอะมิโน

ที่มา : นิธิยา และ วิบูลย์ (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ (ชวนิศนดากร และคณะ, 2531)

ปริมาณโปรตีนและกรดในอาหารชนิดต่างๆ ที่สามารถใช้ประกอบเป็นวัตถุดิบในอาหารสัตว์สามารถแสดงได้ในตารางที่ 2.4 และ 2.5 วัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารสัตว์จำเป็นต้องมีปริมาณของกรดอะมิโนที่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ (ตารางที่ 2.6) ซึ่งถ้าได้รับอาหารที่มีปริมาณกรดอะมิโนที่ต้องการเพียงพอก็จะส่งผลให้สัตว์ได้รับคุณค่าทางอาหารอย่างเต็มที่ สิ่งที่นำมาเป็นอาหารสัตว์สามารถจำแนกเป็นประเภทของอาหารสัตว์ได้ดังนี้

1. อาหารหยาบ หมายถึงอาหารที่มีเยื่อใยสูง มีปริมาณโภชนะย่อยได้ต่ำส่วนใหญ่ได้แก่ ต้นและใบพืชที่ใช้เป็นอาหารหลักของสัตว์กินหญ้า เช่น โค กระบือ แพะ แกะ และม้า เป็นต้น อาหารหยาบยังแยกออกเป็นชนิดสดหรือชนิดอวบน้ำ เช่น หญ้าสด หญ้าหมัก และชนิดแห้ง เช่น หญ้าแห้ง ฟางข้าว เป็นต้น

2. อาหารข้น หมายถึงอาหารที่มีเยื่อใยน้อย มีโภชนะย่อยได้สูง ซึ่งใช้เป็นอาหารหลักของไก่และสุกร อาหารข้นยังแยกออกเป็นหลายประเภทตามความเข้มข้นของโภชนะอย่างหนึ่งอย่างใด คือ

2.1. อาหารมาตรฐาน (basal foods) เป็นอาหารที่เป็นหลักของอาหารซึ่งปกติจะเป็นอาหารที่ให้คาร์โบไฮเดรทสูงและมักจะมีโปรตีนต่ำ เช่น เมล็ดธัญพืช รากมีหัว และผลพลอยได้จากอาหารที่กล่าวนี้ เช่น รำ ปลายข้าว อื่นๆ

2.2. อาหารเสริมโปรตีน (protein supplements) เป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง มักจะใช้เป็นส่วนประกอบเจือปนกับอาหารฐานเพื่อยกจำนวนโปรตีนในอาหารผสมให้สูงขึ้น อาหารเสริมโปรตีนอาจได้มาจากแหล่งพืช เช่น เมล็ดถั่วต่างๆ เมล็ดฝ้าย และกากที่เป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันเมล็ดพืชต่างๆ เป็นต้น และได้จากแหล่งสัตว์ เช่น ปลาป่น เนื้อป่นและนม เป็นต้น

2.3. อาหารเสริมแร่ธาตุ (Mineral supplements) เป็นอาหารที่มีแร่ธาตุที่สัตว์ต้องการอยู่สูง เช่น กระดูกป่น เกลือ และอาจใช้สารเคมีในรูปข้น เช่น โปแตสเซียมไอโอไดท์ จุณสี อื่นๆ

2.4. อาหารเสริมวิตามิน (Vitamin supplements) เป็นอาหารที่มีวิตามินเข้มข้น เช่น น้ำมันตับปลา และวิตามินสังเคราะห์ชนิดเข้มข้นผลิตจากโรงงานเพื่อเป็นยาและอาหารสัตว์โดยเฉพาะ

2.5. สารเพิ่มเติม สารเพิ่มเติมไม่ใช่อาหาร แต่เป็นตัวช่วยเพิ่มคุณค่าอาหารโดยเป็นตัวกระตุ้นหรือเป็นยา เช่น ฮอร์โมน และปฏิชีวนะต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 ปริมาณโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ

อาหาร	เปอร์เซ็นต์โปรตีน	อาหาร	เปอร์เซ็นต์โปรตีน
หมูหยอง	55.2	งาดำ	17.1
ฟองเต้าหู้	47.0	เมล็ดทานตะวัน	169.7
ยีสต์แห้ง	36.9	ปลาไหล	16.5
ถั่วเหลือง	34.1	กุ้งน้ำจืด	16.2
ถั่วพู (เมล็ดแห้ง)	32.0	เต้าหู้เหลือง	15.6
เมล็ดฟักทองแห้ง	29.4	ปลาหมึกสด	15.3
ถั่วลิสงคั่ว (ไม่มีเปลือก)	28.6	ปลาร้า	13.9
เนยแข็ง	25.4	รำข้าว	13.8
ถั่วเขียว	24.4	ไข่เป็ดทั้งฟอง	13.2
เมล็ดแตงโมแห้ง	22.7	ถั่วเหลืองฝักอ่อน	13.0
ถั่วดำ	22.7	ไข่ไก่ทั้งฟอง	12.9
ปลาทู	21.5	ข้าวโพดคั่ว	12.7
เนื้อกบ	20.9	หอยแครงสด	12.2
ถั่วแดงหลวง	20.3	ลูกเดือย	12.0
เนื้อวัวไม่มีมัน	20.0	เต้าเจี้ยว	12.0
เลือดไก่	20.0	ไข่ขาว	10.7
ตับหมู	19.9	เต้าหู้ยี้	10.1
งาขาว	19.7	หอยแมลงภู่	9.1
กะปิ	19.5	ใบแค	8.7
ถั่วมะแฮะ	19.4	ยอดกระถิน และฝักอ่อน	8.4
ปลาช่อน	19.1	สะตอ	8.0
ตับวัว	19.0	เต้าหู้ขาวอ่อน	7.9
เมล็ดมะม่วงหิมพานต์	18.4	ถั่วงอกหัวโต	7.7
มันฮ่อ	18.2	ใบขี้เหล็ก	7.4
ปลาดุก	18.2	น้ำปลาอย่างดี	6.1
เนื้อไก่	18.0	เห็ดโคน	4.2
ตับไก่	17.8	เห็ดฟาง	2.1
เนื้อควาย	17.7	เห็ดหูหนูสด	1.0

ที่มา : นิธิยา และ วิบูลย์ (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ปริมาณกรดอะมิโนที่อยู่ในโปรตีนจากพืชและสัตว์

กรดอะมิโน (เปอร์เซ็นต์)	น้ำมันวัว	ไข่ทั้งฟอง	เนื้อปลา	เนื้อไก่	เนื้อวัว	เจลาติน	ข้าวโพด	ข้าวสาลี	ถั่วเหลือง	ยีสต์
ฮิสติดีน	2.7	2.4	2.9	2.0	2.8	0.8	2.4	1.8	2.9	3.0
ไลซีน	8.0	6.9	10.1	7.7	8.5	4.8	2.7	2.5	6.8	7.5
ทริฟโตเฟน	1.3	1.6	0.9	1.0	1.1	0.01	0.7	1.2	1.4	1.3
ฟีนิลอะลานีน	5.1	5.8	3.9	4.1	4.5	2.0	4.5	4.4	5.3	4.5
เมไธโอนีน	2.4	3.3	2.8	2.4	2.5	0.9	1.8	1.2	1.7	2.0
ธรีโอนีน	4.7	5.0	4.5	4.0	4.6	1.7	4.7	3.9	3.9	5.5
ลูซีน	9.9	9.4	7.9	8.2	8.0	3.5	12.7	6.9	8.0	7.5
ไอโซลูซีน	6.5	6.9	5.2	4.2	4.7	1.4	4.0	4.4	6.0	6.0
วาลีน	6.7	7.4	5.5	4.1	5.5	2.7	5.3	4.5	5.3	5.8

ที่มา : นิธิยา และ วิบูลย์ (2537)

ตารางที่ 2.6 ความต้องการปริมาณกรดอะมิโนของหมูและไก่ในช่วงอายุต่าง ๆ

กรดอะมิโน (เปอร์เซ็นต์)	ไก่ก่อนไข่			ไก่ไข่และไก่พันธุ์	สุกรหย่านม	สุกรรุ่น	สุกรขุน
	1-6 สัปดาห์	6-14 สัปดาห์	14-20 สัปดาห์				
ไลซีน	0.85	0.60	0.45	0.64	1.00	0.74	0.60
ลิวซีน	1.00	0.83	0.67	0.73	0.84	0.67	0.45
วาลีน	0.62	0.52	0.41	0.55	0.67	0.46	0.36
ฮีสทิดีน	0.26	0.22	0.17	0.16	0.34	0.23	0.14
ทริปโตเฟน	0.17	0.14	0.11	0.14	0.14	0.12	0.11
ฟีนิลอะลานีน	0.54	0.45	0.36	0.40	0.63	0.45	0.37
เมไทโอนีน+ซิสทีน	0.60	0.50	0.45	0.64	0.60	0.50	0.30
ทรีโอนีน	0.68	0.57	0.37	0.45	0.66	0.45	0.37
ไอโซลูซีน	0.60	0.50	0.40	0.50	0.70	0.52	0.40

ที่มา : ศรีสกุล (2528)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ (ชวนิศนดากร และคณะ, 2531)

อาหารเสริมโปรตีนที่ได้จากพืช

1. ธัญพืชและผลพลอยได้ ธัญพืชเป็นอาหารที่ให้แป้งและมีค่ายอดโภชนะย่อยได้สูงแต่มีจำนวนโปรตีนต่ำ ปริมาณกรดอะมิโนที่น้อยและที่มีมากของธัญญพืชบางชนิด แสดงในตารางที่ 2.7

1.1. ข้าว เป็นธัญพืชที่สำคัญที่สุดของประเทศไทย ข้าวเมื่อขัดเมล็ดเมื่อสีหรือตำแยกเปลือกหรือแกลบออกได้ข้าวกล้อง ก่อนที่จะใช้เป็นอาหารมนุษย์มักจะขัดสีเอาเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวออกอีกชั้นหนึ่งซึ่งจะได้รำข้าว ส่วนที่เหลือจึงเป็นข้าวสาร แต่ในกรรมวิธีสีข้าวมักจะได้ผลพลอยได้หลายอย่างซึ่งสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้โดยแต่ละอย่างมีคุณค่าต่างๆกัน คือ

1.1.1. ข้าวเปลือก ข้าวเปลือกคือข้าวทั้งเมล็ดมีเปลือกหุ้ม เมื่อแยกเอาเปลือกออกจะเป็นส่วนแกลบประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเป็นส่วนที่เสียเปล่าเพราะใช้เป็นอาหารสัตว์ไม่ได้ ส่วนข้าวเปลือกนั้นไม่เป็นที่นิยมใช้เป็นอาหารสัตว์นอกจากใช้เป็นอาหารเลี้ยงม้า ถ้าใช้เป็นอาหารสัตว์ต้องบดข้าวเปลือกเสียก่อน

1.1.2. รำข้าว การสีข้าวแบบที่ทำในประเทศไทยจะได้รำข้าว 2 ชนิด คือ รำหยาบ และ รำละเอียด หรือรำข้าวขาวรำข้าวมีน้ำมันอยู่ 14-18 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวที่สกัดเอาน้ำมันออกแล้วจะเก็บไว้ได้นานและมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นด้วย แต่ค่าพลังงานจะต่ำลง รำข้าวละเอียดมีโปรตีนประมาณ 13-15 เปอร์เซ็นต์ และวิตามินต่างๆสูงมาก

1.2. ข้าวโพด ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่สำคัญรองจากข้าว ข้าวโพดมีคุณค่าทางอาหารสูง มียอดโภชนะย่อยได้สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ มีแป้งมาก มีสารเยื่อใยต่ำ มีปริมาณโปรตีน 10 เปอร์เซ็นต์ และคุณค่าโปรตีนไม่สูง การใช้ข้าวโพดเป็นอาหารสัตว์ทำได้หลายวิธี ไม่ควรให้สัตว์กินทั้งเมล็ดโดยไม่บด การใช้เป็นอาหารผสมควรบดข้าวโพดอย่างหนาพอเมล็ดแตกเพื่อสะดวกในการผสมและทำให้สัตว์เคี้ยวและย่อยได้ดีขึ้น

2. ถั่วและผลพลอยได้ ถั่วมีหลายชนิดและเมล็ดถั่วส่วนใหญ่ใช้เป็นอาหารของคนและมักจะมีราคาสูงเกินกว่าที่จะนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์โดยตรง ส่วนใหญ่อาหารสัตว์จะเป็นผลพลอยได้เป็นจากการสกกัดน้ำมันซึ่งเรียกว่า "กากถั่ว" ซึ่งเป็นอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางอาหารค่อนข้างสูงเพราะได้แยกเอาน้ำมันออกเพียงอย่างเดียว

2.1. ถั่วเหลืองและกากถั่วเหลือง เมล็ดถั่วเหลืองสกัดน้ำมันออกมาใช้เป็นอาหารคน กากถั่วเหลืองที่ได้เป็นผลพลอยได้เป็นอาหารเสริมโปรตีนของสัตว์ที่มีโปรตีนสูงกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนของถั่วเหลืองมีคุณภาพสูงเกือบเท่าโปรตีนจากสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 ชนิดของกรดอะมิโนที่มีน้อยหรือไม่พอ และกรดอะมิโนที่มีมากในอาหารประเภทธัญพืช ถั่วเมล็ดแห้ง และงา

แหล่งอาหาร	กรดอะมิโนที่มีน้อยหรือมีไม่พอ	กรดอะมิโนที่มีมาก
ธัญพืช		
ข้าวโรงสี	ไลซีน	-
ข้าวโอ๊ต	ไลซีน	-
ข้าวโพด	ทริปโทเฟน ไลซีน ทรีโอนีน	-
ข้าวซ้อมมือ	ทรีโอนีน	เมไทโอนีน ไลซีน
แป้งสาลี	ไลซีน	-
ถั่วเมล็ดแห้ง		
ถั่วเหลือง	เมไทโอนีน	ไลซีน ทรีโอนีน
ถั่วลิสง	ไลซีน เมไทโอนีน ทรีโอนีน	-
งา	ไลซีน	กรดอะมิโนที่มีกำมะถัน ทริปโตเฟน

ที่มา : สิริพันธุ์ (2541)

2.2. ถั่วเขียวและผลพลอยได้ การใช้ถั่วเขียวเมล็ดเป็นอาหารสัตว์ไม่เป็นที่นิยมกันนอกจากใช้เป็นอาหารของนกพิราบหรือในกรณีที่ราคาของถั่วเขียวมีราคาถูกมาก ถั่วเขียวมีปริมาณโปรตีนไม่สูงนักและคุณภาพของโปรตีนก็ไม่สูงเหมือนถั่วลิสง แต่การทำวุ้นเส้นจากถั่วเขียวจะได้ผลพลอยได้สำคัญ 2 ชนิดคือ กากถั่วเขียวและกากตะกอนถั่วเขียว กากถั่วเขียวมีน้ำมากและมีปริมาณแป้งอยู่สูงสามรถนำมาใช้เลี้ยงสุกรได้ทันที หรือจะทำให้แห้งโดยวิธีตากแดดก็จะได้อาหารสัตว์ชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางอาหารสูงพอสมควร ส่วนกากตะกอนถั่วเขียวนั้นเป็นส่วนที่ได้จากน้ำทิ้งมาตกตะกอนด้วยกรดและทำให้แห้งจะได้อาหารเสริมโปรตีนเข้มข้นที่มีโปรตีนสูงอยู่ถึง 87 เปอร์เซ็นต์ และมีโปรตีนมีคุณภาพสูงปานกลางสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ทุกชนิด

3. หญ้า หญ้าหมายถึงกลุ่มของพืชที่ขึ้นอยู่บนพื้นที่และใช้เป็นที่เลี้ยงสัตว์ หญ้าเป็นอาหารสำคัญของสัตว์กินหญ้าเป็นอาหารหลักเพราะเป็นอาหารราคาถูกเนื่องจากปล่อยให้สัตว์เข้าไปหากินเอง หญ้าธรรมชาติที่ขึ้นในแปลงหญ้าส่วนใหญ่จะเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารต่ำแต่ทนทานต่อสภาพอากาศได้ดี เช่นหญ้าคา ส่วนหญ้าที่เกิดจากการปลูกนั้นมักจะเป็นพืชชนิดที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเสริมโปรตีนที่ได้จากสัตว์ (ชวนิศนดากร และคณะ, 2531)

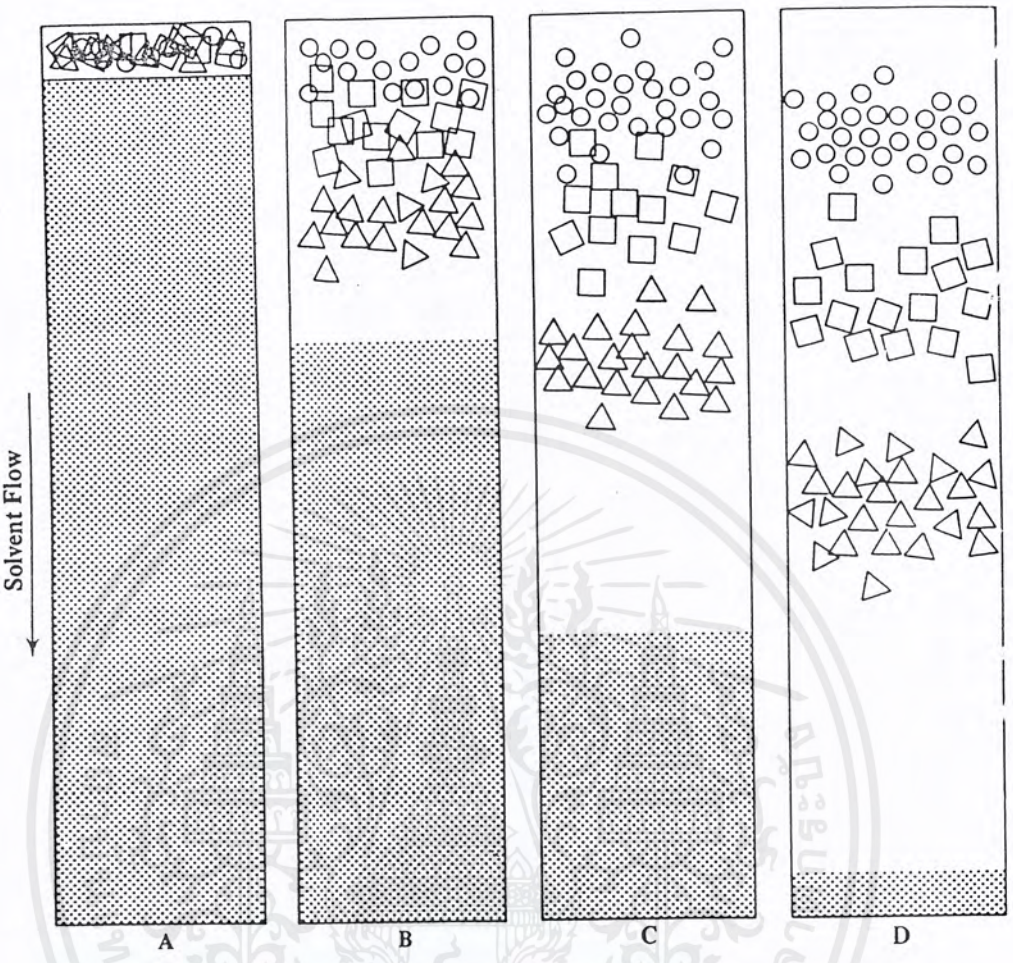
อาหารเสริมโปรตีนที่ได้จากสัตว์มีโปรตีนคุณภาพสูงอยู่มากกว่าอาหารที่ได้จากพืช อาหารเสริมประเภทนี้จำเป็นสำหรับประกอบอาหารไก่ เป็ดและสุกร เพื่อทำให้สัตว์เติบโตเร็ว ให้ไข่ดกและประหยัดอาหาร เช่น เนื้อป่น โรงงานฆ่าสัตว์ในต่างประเทศมักจะมีผลพลอยได้จากเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อป่น เศษเนื้อป่น เนื้อป่นเป็นอาหารที่มีคุณภาพสูง มีโปรตีนสูงประมาณ 55-60 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารไก่ เป็ด และสุกร

โดยปกติราคาอาหารโปรตีนจากสัตว์จะแพงกว่าอาหารพืช ฉะนั้นการใช้เป็นอาหารสัตว์ต้องระมัดระวังใช้โดยประหยัด

การแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟี (ธวัชชัย, 2534)

กรรมวิธีในการทำโครมาโตกราฟี (Separation by Chromatography) คือ การทำให้ส่วนผสมของสารตัวอย่างแยกตัวออกจากกันเป็นโซน หรือแบ่งเป็นตอน ๆ ซึ่งเกิดขึ้นได้จากการกระจายของสารตัวอย่างระหว่างเฟสสองเฟส ซึ่งเฟสหนึ่งคือเฟสที่เคลื่อนที่ได้ (mobile phase) อีกเฟสหนึ่งคือเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) การเคลื่อนที่ของเฟสที่เคลื่อนที่ได้จะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารผสมแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่างแตกต่างกัน จึงทำให้สารผสมแยกออกจากกันเป็นตอน ๆ หรือเป็นโซนได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.10 กระบวนการที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่แยกออกจากกันได้โดยมีตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ได้เป็นตัวพาเรียกว่า อีลูชัน (elution) หรือการชะ ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวพาตัวถูกละลายนั้นจะถูกเรียกว่าตัวชะ (eluent) และตัวถูกละลายซึ่งถูกชะจะเรียกว่า อีลูเอท (eluate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 กลไกการแยกของผสมของสาร 3 ชนิด

สาร A เป็น Δ

สาร B เป็น □

สาร C เป็น O

ที่มา : แม้น และ อมร (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของโครมาโตกราฟี (ธวัชชัย, 2534)

วิธีโครมาโตกราฟีแบ่งได้เป็น 2 แบบ ตามชนิดของเฟสที่เคลื่อนที่ได้ คือ ของเหลวและก๊าซ ดังนี้

1. ก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) ประกอบด้วยเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์ 2 วิธี คือ วิธีที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสที่อยู่กับที่ เรียกว่า gas-liquid chromatography (GLC) เฟสที่เขียนขึ้นก่อนหมายถึงเฟสที่เคลื่อที่ได้ ส่วนเฟสที่เขียนตามทีหลังหมายถึงเฟสที่อยู่กับที่ และวิธีที่ใช้ของแข็งเป็นเฟสที่อยู่กับที่ เรียกว่า gas-solid chromatography (GSC)

2. ลิควิดโครมาโตกราฟี (Liquid Chromatography) คือ เทคนิคของการทำโครมาโตกราฟีที่ใช้เฟสที่เคลื่อนที่ได้เป็นของเหลว ส่วนเฟสที่อยู่กับที่จะเป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้ ถ้าเป็นของแข็งจะเรียกว่า Liquid-Solid Chromatography (LSC) ถ้าเป็นของเหลวจะเรียกว่า Liquid-Liquid Chromatography สามารถแบ่งได้อีกหลายวิธีขึ้นอยู่กับเทคนิคของการทำโครมาโตกราฟี คือ

2.1 การทำโครมาโตกราฟีแบบแผ่น ที่เรียกว่า plane chromatography ถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นเฟสที่เป็นของเหลวจะเรียกว่า Liquid-Liquid Chromatography (LLC) ตัวอย่างเช่น การทำ Paper Chromatography (PC) หรือ Thin Layer Chromatography (TLC) บางชนิดถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งจะรียกว่า Liquid-Solid Chromatography (LSC) ตัวอย่างเช่น การทำ Thin Layer Chromatography

2.2 การทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography) การทำโครมาโตกราฟีแบบนี้เป็นที่รู้จักกันดี และใช้กันมากทั่ว ๆ ไป สามารถใช้ได้กับเฟสที่อยู่กับที่ที่เป็นของเหลว ซึ่งเรียกว่า LLC ก็ได้ หรือที่เป็นของแข็งซึ่งเรียกว่า LSC ก็ได้เช่นกัน การทำลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์นี้ ได้ถูกพัฒนาโดยใช้ความดันช่วย เพื่อทำให้การแยกดีขึ้น ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ที่เรียกว่า High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.3 ถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ เช่น เรซิน จะทำให้เกิดเทคนิคการวิเคราะห์ที่เรียกว่า ion exchange chromatography

2.4 ถ้าเฟสที่อยู่กับที่คือสารที่ไม่สามารถเกิดการดูดซับหรือแบ่งส่วนหรือแลกเปลี่ยนไอออน แต่เป็นสารที่สามารถกีดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารตัวอย่างเนื่องจากมีรูพรุนให้สารตัวอย่างผ่านเข้าไปได้จะเรียกเทคนิคการวิเคราะห์นี้ว่า เอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟี (exclusion Chromatography)

เมื่อพิจารณากลไกที่เกิดขึ้นในการทำโครมาโตกราฟี พบว่าประกอบด้วย 2 กระบวนการ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. กระบวนการดูดซับ (Adsorption) กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อใช้เฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็ง ที่เรียกว่า LSC (Liquid-Solid Chromatography) การดูดซับจะขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของของแข็งด้วย

2. กระบวนการแบ่งส่วน (Partition) กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อใช้เฟสที่อยู่กับที่เป็นของเหลวที่เรียกว่า LLC (Liquid-Liquid Chromatography)

<u>คอลัมน์โครมาโตกราฟี</u> (ธวัชชัย, 2534)

การทำลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography) สามารถแบ่งได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ที่ทำหน้าที่เป็นเฟสที่อยู่กับที่ ดังนี้

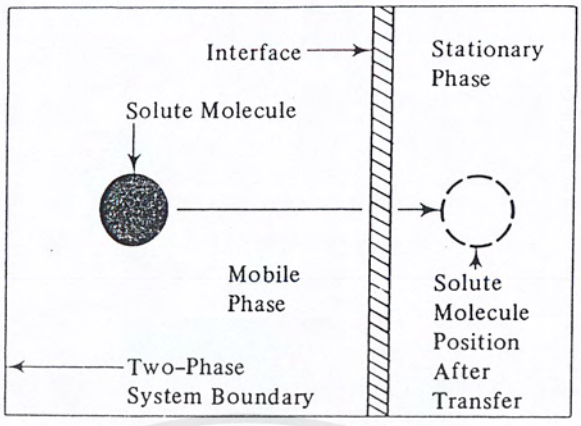
1. ถ้าสารที่บรรจุคือของแข็งที่ทำหน้าที่ดูดซับจะเรียกวิธีการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบนี้ว่า โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) หรือ Liquid-Solid Chromatography (LSC) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายในคอลัมน์จะขึ้นอยู่กับเวลาที่ตัวถูกละลายนั้นถูกดูดซับที่ผิวของของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นเฟสที่อยู่กับที่ ถ้าการดูดซับมีค่ามาก เวลาที่ใช้อยู่ในคอลัมน์จะนานทำให้ค่า retention time มีค่ามาก

2. ถ้าสารที่บรรจุในคอลัมน์ คือ ของแข็งที่ฉาบด้วยของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นเฟสที่อยู่กับที่ หรือของเหลวฉาบที่ผิวของคอลัมน์เมื่อใช้คอลัมน์เล็กมาก ๆ จะเรียกว่า โครมาโตกราฟีแบบแบ่งส่วน (Partition chromatography) หรือ Liquid-Liquid Chromatography (LLC) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายในคอลัมน์จะขึ้นอยู่กับการละลายของตัวถูกละลายของตัวถูกละลายในเฟสทั้งสองที่เป็นของเหลว ถ้าการละลายของตัวถูกละลายในเฟสของเหลวที่อยู่กับที่มีค่ามาก ค่า retention time จะมีค่ามาก

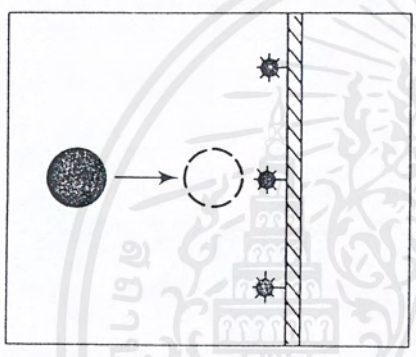
3. ถ้าสารที่บรรจุในคอลัมน์ คือ เรซินที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ จะเรียกวิธีการนี้ว่า ไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ion-exchange chromatography) ค่ารีเทนชันไทม์ของตัวถูกละลายขึ้นอยู่กับความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างไอออนของตัวถูกละลายกับไอออนในเรซิน ไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี ต่างจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบอื่น คือ ตัวถูกละลายที่ถูกแยกคือไอออน ในขณะที่วิธีอื่น คือโมเลกุลที่เป็นกลาง

วิธีการแยกสารโดยใช้โครมาโตกราฟีชนิดต่างๆ นี้แสดงได้ดังรูป 2.11

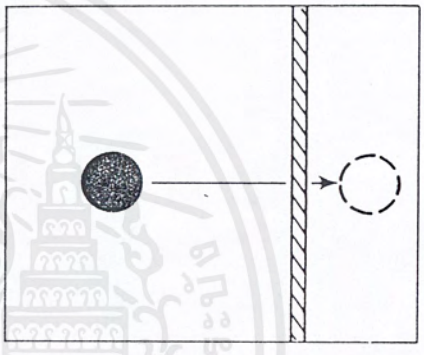
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



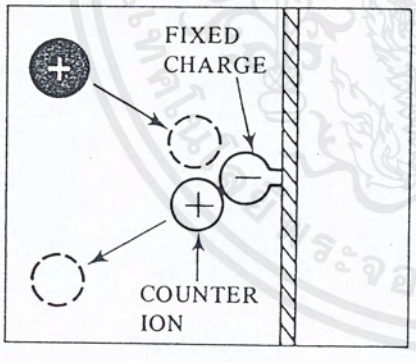
A. Transfer of Solute to a Generalized Stationary Phase



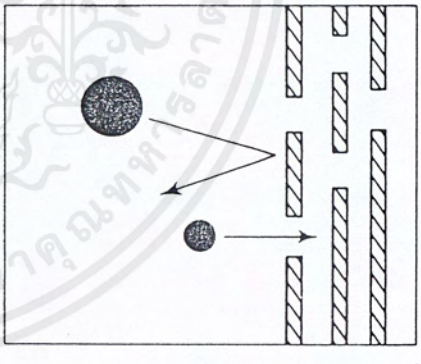
B. Liquid-Solid



C. Liquid-Liquid



D. Ion-Exchange



E. Exclusion

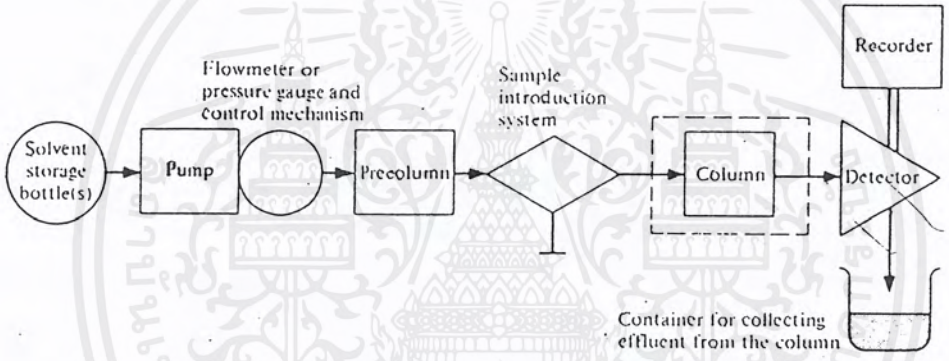
รูปที่ 2.11 วิธีการแยกสารของลิควิดโครมาโทกราฟี 4 ชนิด

ที่มา : แม้น และ อมร (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

High Performance Liquid Chromatography (ธวัชชัย, 2534)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) คือ เทคนิคหนึ่งของลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่สามารถแยกได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ เพราะใช้ความดันช่วยและของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์มีขนาดเล็ก เนื่องจากการทำ HPLC ต้องใช้ความดันช่วยจึงต้องมีเครื่องมือสำหรับปั๊มตัวชะ และเนื่องจากปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้มีจำนวนน้อย ดังนั้นหลังจากที่สารตัวอย่างถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ต้องมีเครื่องมือที่เรียกว่า ดีเทคเตอร์วัดสารปริมาณน้อย ๆ ที่ถูกชะออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนประกอบของเครื่องมือต่างๆ ที่ช่วยในการวิเคราะห์จะรวมกันเข้าเป็นเครื่องมือ 1 ชุดของ HPLC ซึ่งสรุปเป็นแผนภาพได้ดังแสดงในรูป 2.12



รูปที่ 2.12 แผนภาพของเครื่องมือ HPLC

- - - - - หมายถึง เตาที่สามารถควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ได้

ที่มา : ธวัชชัย (2534)

ส่วนประกอบต่าง ๆ แต่ละส่วนของ HPLC ทำหน้าที่ดังต่อไปนี้ (ธวัชชัย, 2534)

1. ภาชนะบรรจุตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ (Solvent reservoir) ภาชนะบรรจุตัวทำละลายทำด้วยแก้วหรือสเตนเลสก็ได้ มีขนาดบรรจุ 1-2 ลิตร ตามปกติควรต่อกับอุปกรณ์กำจัดก๊าซ (degassing system) เพื่อดูดก๊าซออกซิเจนหรือไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายออก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดฟองก๊าซในคอลัมน์ หรืออาจรบกวนเครื่องดีเทคเตอร์ (detector) อุปกรณ์กำจัดก๊าซประกอบด้วยเครื่องปั๊มสูญญากาศ ส่วนให้ความร้อน ตัวคนสารละลาย และส่วนทำการกลั่น (distillation system) ถ้าการวิเคราะห์ใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว เครื่องมือก็มีถังใส่ตัวทำละลาย และตัวทำลายก๊าซเพียงชุดเดียว แต่ถ้าต้องใช้ตัวทำละลายผสมในการชะต้องมีเครื่องมือ 2 ชุด ต่อเชื่อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันเพื่อทำให้ตัวทำละลายสามารถผสมกันและเปลี่ยนโพลาริตีได้อย่างต่อเนื่อง (gradient elution) ซึ่งเรียกว่า การโปรแกรมตัวทำละลาย (solvent programming)

การชะโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเพียงตัวเดียว (isocratic condition) จะทำให้ใช้เวลาในการแยกนาน และสารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกมาทีหลังมักจะมีหาง ดังแสดงในรูป 2.13a แต่ถ้าเปลี่ยนตัวอีลูทโดยทำการโปรแกรมตัวทำละลาย พบว่า การแยกจะใช้เวลาน้อยลง ลักษณะพีก (peak) ที่ได้ดีขึ้น ดังแสดงในรูป 2.13c การโปรแกรมตัวทำละลายสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง โดยการเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายขึ้นเรื่อย ๆ หรือทำเป็นขั้น (stepwise) คือเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายขึ้นเรื่อย ๆ ในช่วงเวลาหนึ่ง ต่อจากนั้นก็ควบคุมให้คงที่ในช่วงเวลาหนึ่ง และก็เพิ่มขึ้นอีก จากนั้นควบคุมให้คงที่อีกเช่นนี้ตลอดการทดลอง

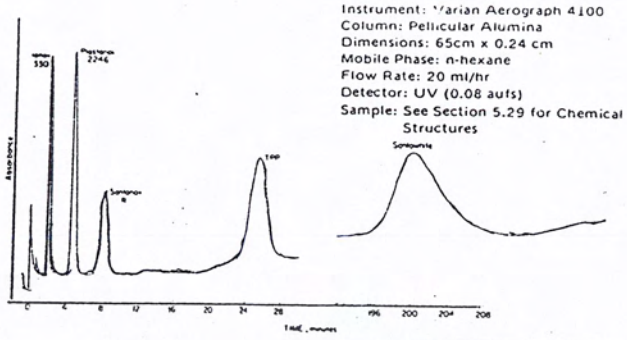
2. เครื่องปั๊ม (pump) ทำหน้าที่ปั๊มตัวทำละลายเข้าคอลัมน์ด้วยความดันอย่างน้อย 1000 psi (lbs/in^2) ความดันที่เหมาะสมและใช้ได้ดีคือ 4000 ถึง 6000 psi ซึ่งจะทำให้อัตราการไหลของตัวทำละลายมีค่าเท่ากับ 3 มิลลิลิตร/นาที อัตราการไหลควรควบคุมให้คงที่ เบี่ยงเบนได้ไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการไหลมีผลโดยตรงต่อเวลาที่ใช้ในการแยก ถ้าเพิ่มความเร็วของการไหลของตัวทำละลายจะทำให้สารตัวอย่างถูกอีลูทได้เร็วขึ้น ดังนั้นในการแยก ถ้าทำการโปรแกรมอัตราการไหลของตัวทำละลาย พบว่า การแยกจะใช้เวลาน้อยลง ลักษณะพีกที่ได้ดีขึ้น ดังแสดงในรูป 2.13b การโปรแกรมอัตราการไหลของตัวทำละลายสามารถทำได้ทั้งแบบต่อเนื่องและแบบเป็นขั้น เช่นเดียวกับการโปรแกรมตัวทำละลาย

3. พรีคอลัมน์ (Precolumn) เครื่องมือ HPLC บางเครื่องต้องมีคอลัมน์เพิ่มขึ้นอีก 1 อัน เรียกว่า พรีคอลัมน์ มีสารบรรจุอยู่เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้งาน แต่ขนาดของสารที่บรรจุอยู่ใหญ่กว่าเพื่อไม่ให้ความดันของตัวทำละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์นี้ลดลง คอลัมน์นี้มีหน้าที่แยกเอามลทิน (contaminant) ที่ติดอยู่ในตัวทำละลายออกไป หรือทำให้ตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะบริสุทธิ์ขึ้น

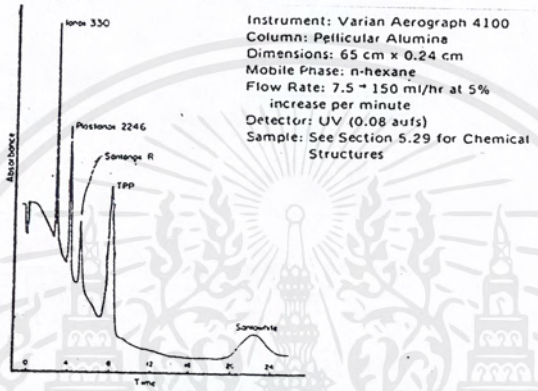
4. ส่วนฉีดสารตัวอย่าง (sample injection system) ที่นิยมใช้คือ ใช้ microsampling valve (รูปที่ 2.14) สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ในท่อซึ่งอยู่ภายนอกที่ต่อเข้ากับ valve นี้ microsampling valve ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันสามารถนำมาใช้ได้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5 µl จนกระทั่งถึงหลายมิลลิลิตร ซึ่งมีท่ออยู่ภายนอกยอมให้ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปได้ในปริมาณมาก นอกจากนี้ valve ประเภทนี้ยังสามารถใช้งานได้ที่ความดันสูงถึง 5000-6000 psi โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล (แม้น และ อมร , 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

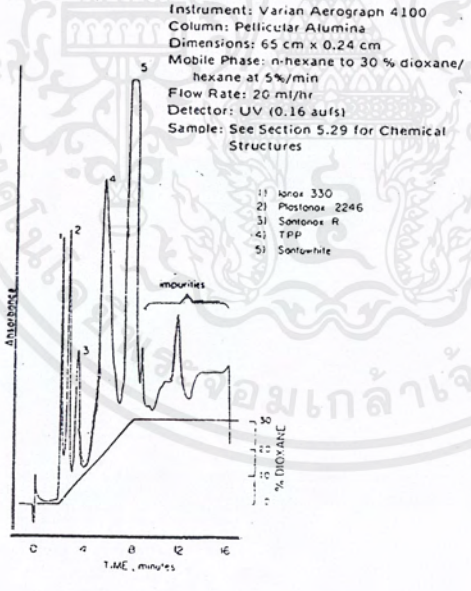
(a)



(b)



(c)



รูปที่ 2.13 การแยกสารโดยใช้โปรแกรมตัวทำละลายแบบต่างๆ ของ HPLC

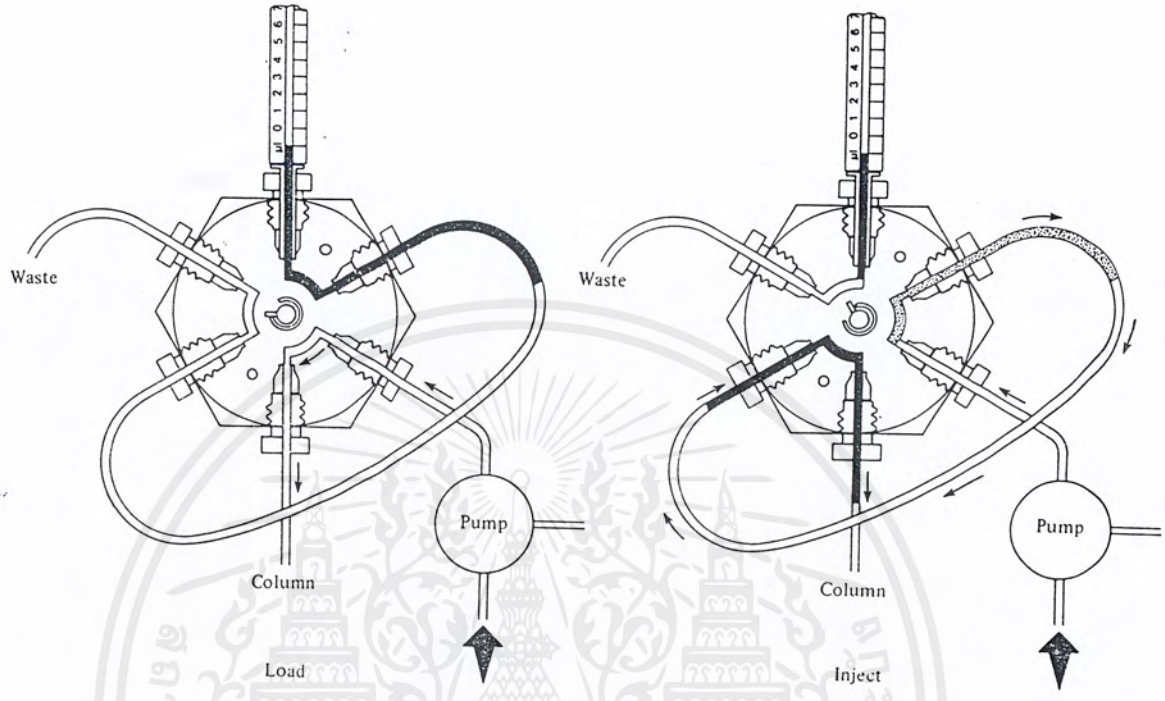
(a) Isocratic conditions

(b) Flow programming

(c) Solvent programming

ที่มา : ธวัชชัย (2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.14 six-port rotary sample injection value สำหรับ HPLC

↑ แสดงทางการเดินของการไหลของตัวทำละลาย

ที่มา : แม้น และ อมร (2535)

5. คอลัมน์ (column) คอลัมน์สำหรับใช้ในงานวิเคราะห์ HPLC ทำด้วยหลอดแก้วอย่างหนา หรือสเตนเลส มีขนาดความยาว 15 ถึง 150 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2-3 มิลลิเมตร คอลัมน์ขนาดที่ยาวเป็นเมตรก็สามารถใช้ได้เช่นกันโดยขดเป็นวงกลม

สารที่บรรจุในคอลัมน์มี 2 ชนิดเช่นกัน คือ ชนิดที่เป็นของแข็งดูดซับ ซึ่งต้องมีขนาดเล็กมาก และมีได้หลายขนาด มีชื่อเรียกทางการค้าต่างๆ กัน อีกชนิดหนึ่งเป็นของเหลวฉาบบน solid support ซึ่งมีทั้งแบบธรรมดาและรีเวอร์สเฟส (reverse phase)

ของแข็งตัวดูดซับที่นิยมใช้ใน HPLC คือ ซิลิกา และอะลูมินา การเลือกใช้สามารถจัดแบ่งตามประเภทของสารที่นำมาวิเคราะห์ได้ดังตารางที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.8 ชนิดของสารที่เหมาะสมกับชนิดของตัวดูดซับที่บรรจุในคอลัมน์

ใช้อลูมินาเป็นตัวดูดซับ	ใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ
เป็นสารประเภทกรด (acid compound) เป็นโมเลกุลไม่อิ่มตัว เช่น Olefinic และ aromatic เป็นสารที่มีกลุ่มฮาโลเจน เป็นสารที่ไวต่อกรด	เป็นสารที่เป็นเบสเล็กน้อย pK น้อยกว่า 5 เป็นสารที่ไวต่อเบส

ที่มา : ธวัชชัย (2534)

6. ส่วนควบคุมอุณหภูมิ (temperature control) ตามปกติการทำลิควิดโครมาโตกราฟีทั่วๆ ไป นิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นส่วนควบคุมอุณหภูมิอาจใช้เป็นถังน้ำหุ้มคอลัมน์ไว้เพื่อทำให้อุณหภูมิคงที่ แต่ถ้าต้องการให้ retention time ของสารตัวอย่างสั้นขึ้น อาจเพิ่มอุณหภูมิให้แก่คอลัมน์ก็ได้เช่นเดียวกับก๊าซโครมาโตกราฟี โดยใช้เตาที่ควบคุมอุณหภูมิได้

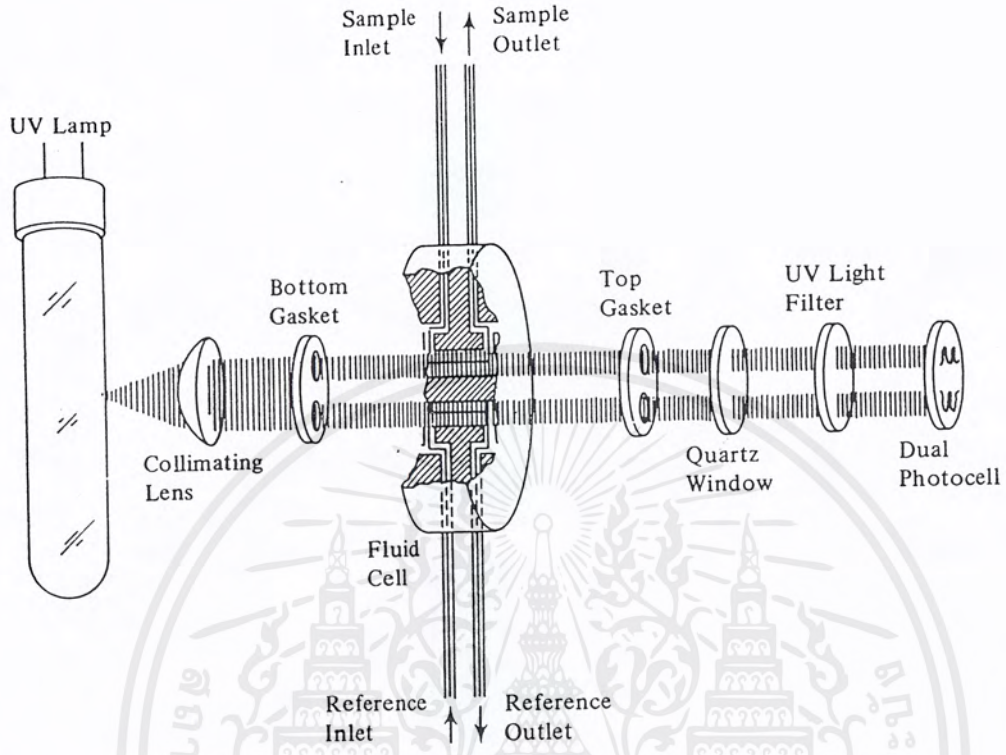
7. ดีเทคเตอร์ (detector) ดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC ไม่มีชนิดที่มีความไวสูงแบบก๊าซโครมาโตกราฟี ดีเทคเตอร์จะเป็นชนิดใดขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง ซึ่งสามารถวัดปริมาณของสารได้ตามคุณสมบัติของสารนั้นๆ ตารางที่ 2.9 ได้แสดงชนิดต่างๆ ของดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC สำหรับดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตหรือแสงขาว (UV Spectophotometer) มีลักษณะการทำงาน ดังแสดงในรูปที่ 2.15

ตารางที่ 2.9 ดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC

Detector Basis	Type	Maximum Sensitivity	Flow Rate Sensitivity?	Temperature Sensitivity	Useful with Gradient?	Available Commercially?
UV absorption	S	$5*10^{-10}$	No	Low	Yes	Yes
IR absorption	S	10^{-6}	No	Low	Yes	Yes
Fluorometry	S	10^{-10}	No	Low	Yes	Yes
Refractive index	G	$5*10^{-7}$	No	$\pm10^{-4}$ °C	No	Yes
Conductometric	S	10^{-8}	Yes	±1 °C	No	Yes
Moving wire	G	10^{-8}	Yes	None	Yes	Yes
Mass spectrometry	S	10^{-10}	No	None	-	Yes
Polarography	S	10^{-10}	Yes	±1 °C	-	No
Radioactivity	S	-	No	None	Yes	No

ที่มา : ธวัชชัย (2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.15 แผนภาพของยูวี ดีเทคเตอร์
ที่มา : แม้น และ อมร (2535)

<u>การเตรียมกรดอะมิโนจากโปรตีนตัวอย่างที่ผ่านการไฮโดรไลซิส</u> (Barrett, 1985)

โดยปกติการเตรียมกรดอะมิโนจากตัวอย่างโปรตีนด้วยวิธีการไฮโดรไลซิส นิยมใช้กรดเป็นตัวไฮโดรไลซ์ (acid hydrolysis) เพื่อสลายพันธะเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนในโปรตีนนั้นๆ อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนเกิดการสลายตัว ซึ่งเป็นผลจากขบวนการต่างๆ ต่อไปนี้

1. Racemization ทำให้เกิด diasterisomer ซึ่งจะทำให้คุณสมบัติทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไปจากกรดอะมิโนชนิดเดิม และมีผลต่อการวิเคราะห์ได้ มักเกิดกับพันธะที่สลายตัวได้ง่าย (labile bond) มากกว่าพันธะเพปไทด์ เช่น disulphide หรือการสูญเสียฟอสเฟตจาก phosphorylated amino acid ซึ่งทริปโตเฟนเป็นกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงง่ายที่สุด

2. Ester formation เกิดในกรณีที่การระเหยกรดหลัง hydrolysis ไม่รวดเร็วพอ ทำให้เกิด sulphate ester จากกรดอะมิโน และ heteropolysaccharide ที่มีซัลเฟตสูง ได้ง่าย เช่น sulphate ester ของเซรีน ทรีโอนีน และไทโรซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Elimination of simple substituents จากการศึกษาพบว่า แอสพาราจีน และกลูตามีน สลายไปจนหมดภายในชั่วโมงแรกของการทำ acid hydrolysis กลายเป็น กรดแอสพาติค และกรดกลูตามิค

4. Degradation leading to loss of amino acid structure กรดอะมิโนที่เป็นปัญหาในการ hydrolysis เนื่องจากโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไป ได้แก่

4.1. ทริปโตเฟน เกิด free-radical autooxidation

4.2. ไทโรซีน หลังจาก 22 ชั่วโมง จะเหลือเพียง 90 เปอร์เซ็นต์ เพราะเกิด halogenations ที่ phenolic ring ในปฏิกิริยา acid hydrolysis หรือเกิด p-hydroxybenzaldehyde ใน alkali hydrolysis

4.3. ซิสทีน และซิสเทอีน acid hydrolysis ทำให้สูญเสีย disulphide bridges นอกจากนั้น หากมีออกซิเจน จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็น กรดซิสเทอิก

4.4. เซรีน และทรีโอนีน มีการเปลี่ยนแปลงได้เนื่องจากปฏิกิริยา ester formation เหลือประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการทำ acid hydrolysis ประมาณ 24 ชั่วโมง

4.5. เมไทโอนีน และเมไทโอนีน ซัลฟอกไซด์ สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่ออยู่ในสภาวะ alkali hydrolysis ทั้งมี และไม่มีอากาศ

4.6. กรดอะมิโนอื่นๆ กรดแอสปาติค กรดกลูตามิค ไลซีน อาร์จินีน และโพรลีน ก็สามรถสูญเสียเนื่องจาก acid hydrolysis ได้ โดย กรดแอสปาติค และกรดกลูตามิค สามารถเกิดปฏิกิริยา ester formation ในขณะที่หมู่ อัลฟาอะมิโน ของไลซีน สามารถทำปฏิกิริยาได้หลายแบบ เช่น ทำปฏิกิริยากับ ดีไฮโดรอะลานีน, ปฏิกิริยา schiff base formation กับ หมู่อัลดีไฮด์จากกรดอะมิโนหรือน้ำตาล, deaminative oxidation ให้เกิดเป็นไลซีนอัลดีไฮด์ ซึ่งเกิดได้ง่ายในสภาวะที่เป็นกลางหรือด่างอ่อน

การทำ Derivatization สำหรับการวิเคราะห์ HPLC (รวีวรรณ, 2536)

ในการทำการทดลองบางครั้งเราจะพบปัญหาเรื่องสารตัวอย่างที่เราจะวัดนั้นมีปริมาณต่ำ ตัวอย่างมีสิ่งรบกวนมากทำให้ยากแก่การวิเคราะห์ หรือสารที่เราสนใจไม่สามารถ ดูดกลืนแสงได้ ด้วยเหตุนี้ทำให้มีการนำ รีเอเจนต์ (reagent) มาทำปฏิกิริยากับสารที่เราสนใจโดยทำปฏิกิริยาที่หมู่ ฟังก์ชัน (functional group) ซึ่งเราเรียกการกระทำนี้ว่า derivatization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารรีเอเจนต์ที่ใช้ควรมีคุณสมบัติดังนี้ (รวีวรรณ, 2536)

1. รีเอเจนต์ เมื่อทำปฏิกริยากับหมู่ฟังก์ชัน ต้องให้ผลเร็ว และถูกต้อง
2. สารอนุพันธ์ (Derivative) ที่ได้ต้องแยกได้ดีบนคอลัมน์ เมื่อมีตัวอย่างหลายชนิด และแต่ละชนิดให้ผลผลิตที่แตกต่างกันด้วย
3. รีเอเจนต์ที่มากเกินและผลผลิตที่เกิดขึ้นจาก reagent จะต้องแยกออกจาก derivative ที่เราสนใจได้ด้วย HPLC และไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์
4. รีเอเจนต์ ที่ใช้ต้องไม่เป็นพิษ
5. สารอนุพันธ์ที่ได้เมื่อเก็บไว้จะต้องไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
6. สารอนุพันธ์ ควรจะไม่เปลี่ยนแปลงภายใต้สภาวะที่ใช้ในการแยกในคอลัมน์

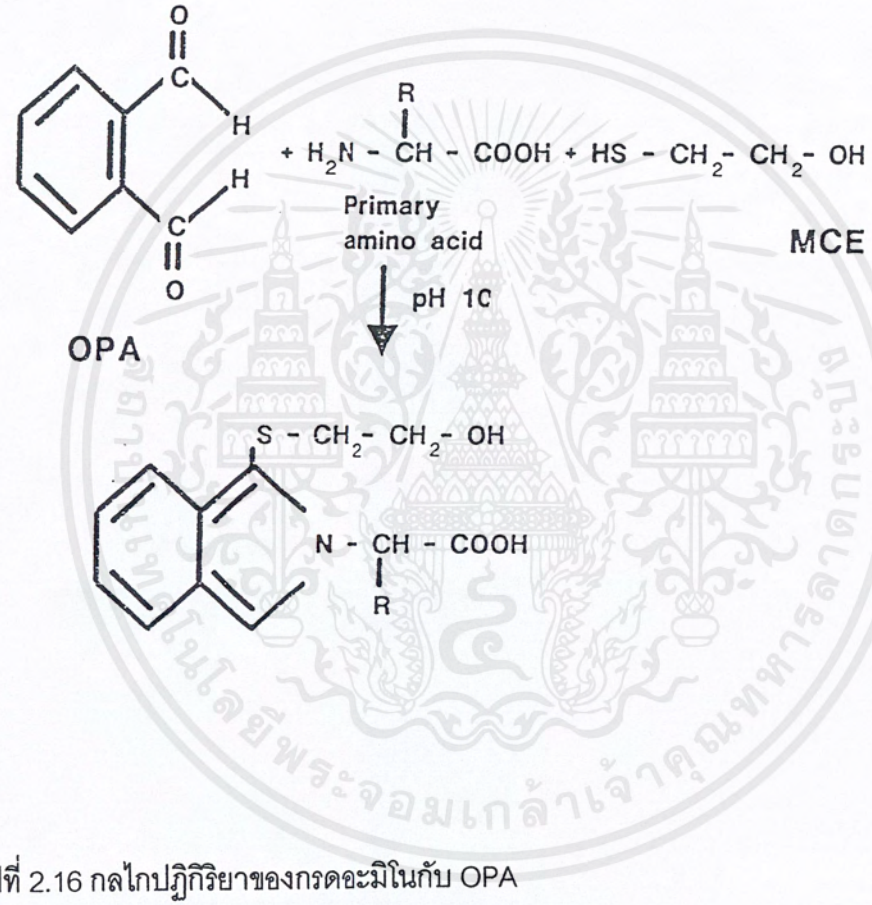
รีเอเจนต์ที่นิยมใช้ในการทำ derivatization มีหลายชนิด ดังตารางที่ 2.10 โดยตัวอย่างกลไกการเกิดปฏิกริยากับกรดอะมิโน แสดงในรูปที่ 2.16-2.19

ตารางที่ 2.10 ตัวอย่าง Derivatization reagent ที่ใช้ในการทำ Derivatization ของกรดอะมิโน

Derivatization agent	ชนิดของดีเทคเตอร์	วิธีการทำ Derivatization
Ninhydrin	Colorimetric Detection	Post-column derivatization
Orthophthalaldehyde	Fluorence Detection	Pre-column derivatization (automatic injection), Post-column derivatization
Phenyl-isothiocyanate	UV Detection	Pre-column derivatization
9-Fluorenylmethyl Chloroformate	Fluorence Detection	Pre-column derivatization
Dansyl Chloride	Fluorence Detection	Pre-column derivatization
Dabsyl Chloride	Light Detection	Post-column derivatization
2,4,6-Trinitrobenzene-Sulfonic Acid	UV Detection	Pre-column derivatization, Post-column derivatization
Ammonium-4-Chloro-7-Sulfobenzofurazan	Fluorence Detection	Pre-column derivatization
1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene	Light Detection	Pre-column derivatization

ที่มา : Judy and hart (1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

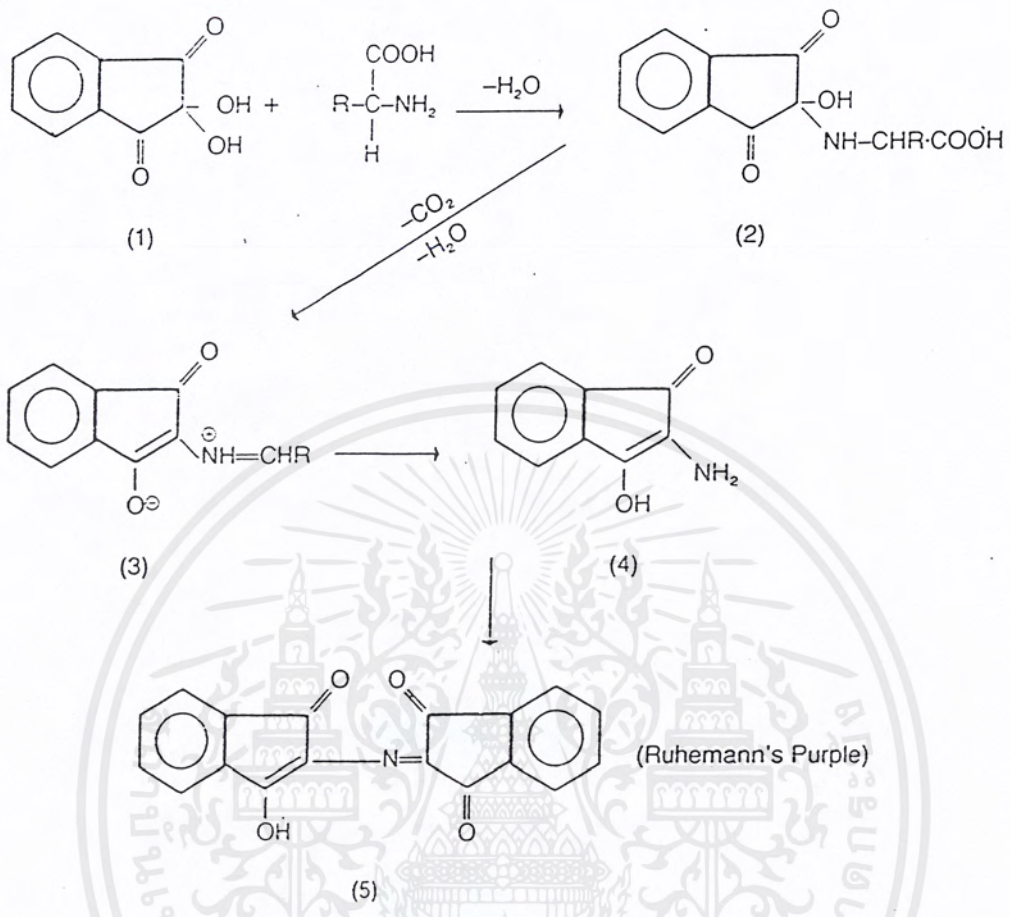


รูปที่ 2.16 กลไกปฏิกิริยาของกรดอะมิโนกับ OPA

MCE=2-mercaptoethanol

ที่มา : Judy and hart (1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.17 กลไกของ ninhydrin กับกรดอะมิโน

(1) Ninhydrin (2,2-dihydroxy-1,3-indandione) ทำปฏิกริยากับกรดอะมิโน

(2) ได้สารตัวกลางจากปฏิกริยาแรก

(3) ทำให้สารตัวกลางมีสองขั้วมากขึ้นด้วย ดึงคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำออก

(4) ขั้วทั้งสองจะหายไปเป็น amine

(5) amine จะรวมกับโมเลกุลที่ 2 ของ ninhydrin ให้ Ruhemann's Purple

ที่มา : Judy and hart (1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเภทของการทำ derivatization (Barret, 1985)

การทำ derivatization มีด้วยกัน 2 วิธีคือ

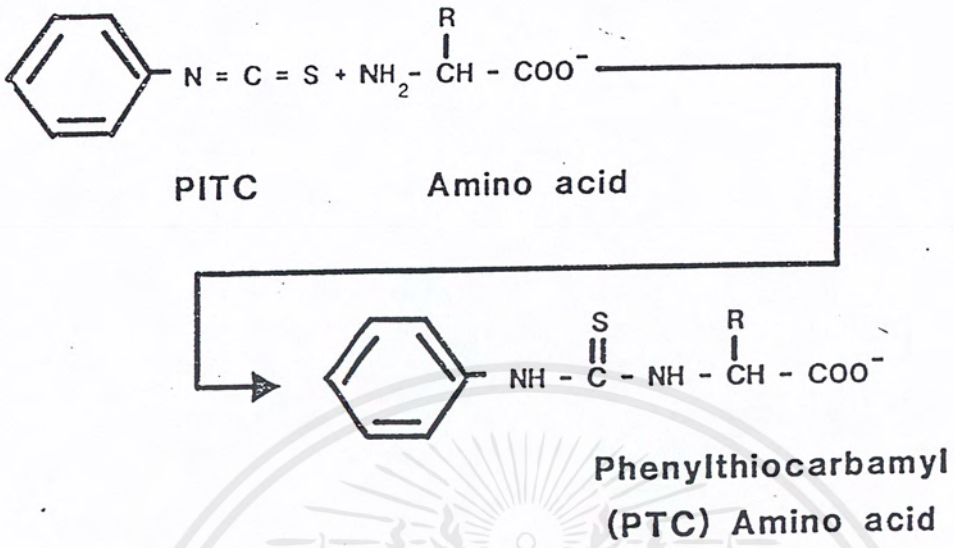
1. Pre-column derivatization คือการนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ก่อนที่จะผ่านเข้าคอลัมน์ (รวีวรรณ, 2536) ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ต้องเติมสารรีเอเจนต์ ซึ่งสามารถเติมในช่วงก่อนหรือหลังการย่อยสารตัวอย่างก็ได้ ไม่ต้องการใช้เครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์สารอนุพันธ์ใหม่เพิ่มในการทำงานแต่จะต้องเปลี่ยนสภาวะใหม่ สารรีเอเจนต์ที่ใช้จะเติมในปริมาณน้อย ถ้าคาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์หลายๆ ตัว ต้องแน่ใจว่าสามารถทำให้เป็นสารละลายเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้ ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาต้องเสถียร สารรีเอเจนต์ที่เหลือหลังการเกิดปฏิกิริยาต้องไม่สามารถถูกตรวจวัดได้ หรือรวมเป็นพีกเดียวกันกับพีกของสารที่เราสนใจ

Precolumn derivatization อาจเป็นสาเหตุให้คุณสมบัติด้านโครมาโตกราฟีของสารตัวอย่างเปลี่ยน เนื่องจากโครงสร้างของสารตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไป เช่น การสูญเสียหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ในโมเลกุลของกรดอะมิโน หลังการทำ derivatization จะทำให้การแยกสารโดยวิธี Cation-exchange ไม่สามารถประยุกต์ใช้งานได้มากนัก ซึ่งความเป็นขั้วที่เปลี่ยนไปของหมู่กรดคาร์บอกซิล จะมีความสำคัญการประยุกต์ใช้ในการแยกสาร

2. Post-column derivatization คือการนำตัวอย่างมาทำปฏิกริยากับรีเอเจนต์ หลังจากผ่านคอลัมน์ (รวีวรรณ, 2536) ซึ่งเทคนิคนี้ไม่ทำให้ระบบการวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีมีสภาวะเปลี่ยนไป เพราะไม่จำเป็นต้องทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างก่อน จึงไม่ทำให้โครงสร้างของสารตัวอย่างเปลี่ยนไป ใช้ได้ดีกับกรณีที่มีปัญหาของสารรีเอเจนต์ทำปฏิกิริยากับสารปนเปื้อนในสารตัวอย่างหรือปริมาณสารปนเปื้อนมีน้อยจนเครื่องไม่สามารถตรวจวัดได้ วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องทำให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ และสารอนุพันธ์ที่ไม่เสถียรก็ยังสามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้

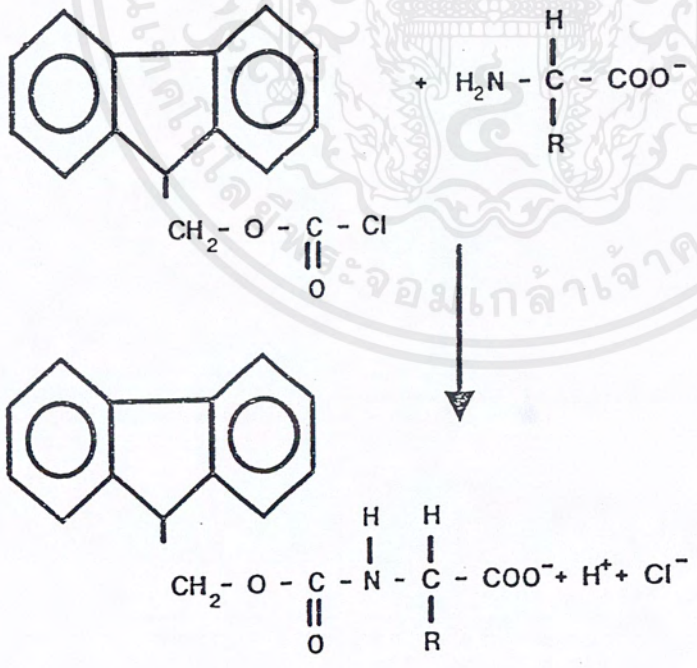
อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ต้องปรับสภาวะของคอลัมน์เพื่อลดความไวต่อสิ่งเร้า เนื่องจากระบบอาจสูญเสียคุณสมบัติการแยกทางโครมาโตกราฟีภายใน flow reactor และอาจทำให้สัญญาณรบกวน (noise) สูงขึ้น เนื่องจากการผสมกันของสารตั้งต้น จึงจำเป็นต้องเพิ่มเครื่องมือสำหรับปั๊มรีเอเจนต์ ที่เรียกว่า reagent delivery pump ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้เกิดการผสมและเกิดปฏิกิริยากันระหว่างสารกับรีเอเจนต์ หรือบางครั้งต้องการเครื่องมือแบบ on-line ดังนั้นจะทำให้ค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับอุปกรณ์ และสารเพิ่มสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.18 ปฏิกิริยาอนุพันธ์ของกรดอะมิโนกับ PITC

ที่มา : Judy and hart (1977)



รูปที่ 2.19 ปฏิกิริยาของกรดอะมิโนกับ FMOC-Cl (9-fluorenylmethyl chloroformate)

ที่มา : Judy and hart (1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

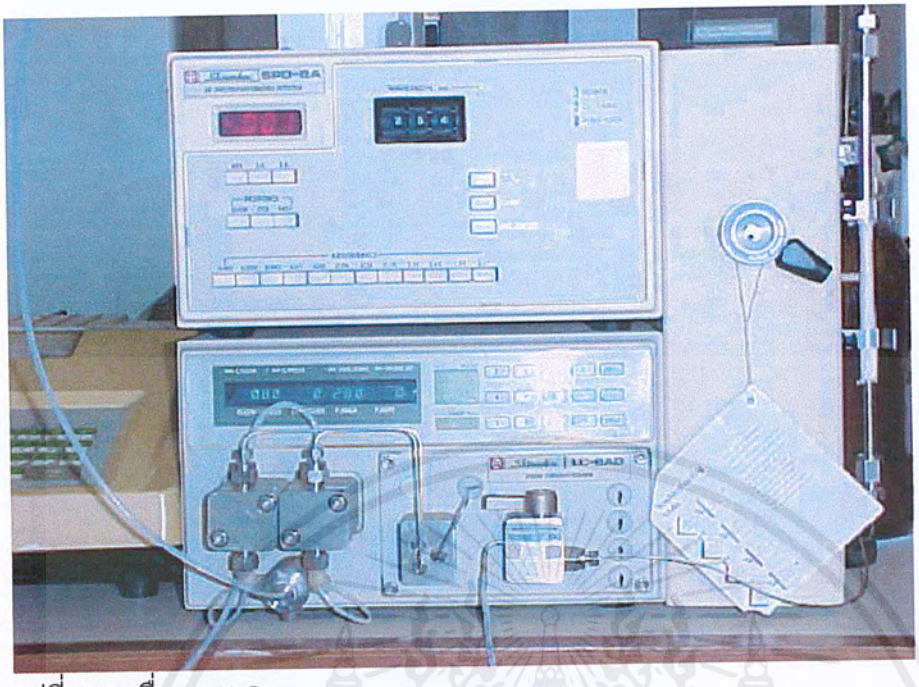
บทที่ 3
การวิจัยและการดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส และการทำ derivatization
   1.1. หลอดย่อย (Digestion tube)
   1.2. ชุดเครื่องมือย่อย (Digester) VELP SCIENTIFICA รุ่น DK 20
   1.3. เครื่องปั๊มสูญญากาศ
   1.4. เครื่องระเหย (Evaporator)
   1.5. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
   1.6. เครื่องชั่ง
   1.7. ปิเปตวัดปริมาตร (Volumn pipette)
   1.8. ขวดวัดปริมาตร (Volumn flask)
   1.9. ไมโครปิเปต
   1.10. ทิปขนาดต่างๆ

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกชนิดและหาปริมาณของกรดอะมิโนที่ต้องการ ได้แก่ เครื่อง high performence liquid chromatography (HPLC) Shimadzu รุ่น LC-6AD ซึ่งต้องการองค์ประกอบต่าง ๆ คือ ปั๊ม 1 ปั๊ม คอลัมน์ภายในบรรจุเฟสอยู่กับที่ คือ C18 Shimadzu รุ่น CLC (M) เครื่องตรวจวัดชนิด UV (UV-VIS detector) Shimadzu รุ่นที่ SPD-6A (รูปที่ 3.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 เครื่อง HPLC

<u>สารเคมี</u>

1. การไฮโดรไลซิสและการทำ derivatization

1.1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 6 นอร์มอล

1.2. Redry solution ซึ่งประกอบด้วย เอทานอล:น้ำกลั่น:ไตรเอทิลามีน (Triethylamine) ในอัตราส่วน 2:2:1 โดยปริมาตร

1.3. Derivatization solution ซึ่งประกอบด้วย เอทานอล:น้ำกลั่น:ไตรเอทิลามีน:ฟีนิลไอโซไทโอไซยาเนต (Phenylisothiocyanate) ในอัตราส่วน 7:1:1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีก่อนใช้

1.4. Amino acid standard ต้องการทราบ 3 ชนิด คือ ไลซีน (lysine) ลิวซีน (leucine) และวาลีน (valine)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5. สารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.5.1. Amino acid standard 3 ชนิด คือ ไลซีน (lysine) ลิวซีน (leucine) และวาลีน (valine)

1.5.2. ตัวอย่างพืชและสัตว์ ได้แก่ หญ้า เปลือกฝรั่ง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออกแล้ว ไข่ทั้งฟอง รำข้าว

2. การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟี

ใช้เฟสที่เคลื่อนที่ คือ Acetonitrileในน้ำกลั่น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในการเตรียมปริมาตร 1 ลิตร ใช้ Acetonitrile 600 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเซลล์ลูโลสอะซิเทรตที่มีรูกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร นำไปกำจัดก๊าซด้วยอุปกรณ์กำจัดก๊าซ

<u>วิธีการทดลอง</u>

1.1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1.1 นำตัวอย่างโปรตีนอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

1.1.2 นำตัวอย่างที่ได้บดให้ละเอียดแล้วนำมาเกลี่ยลงบนถาดอะลูมิเนียม

1.1.3. นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2 อบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.1.4. นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3 เข้าโถดูดความชื้น ทิ้งให้เย็น (รูปที่ 3.2-3.11)

1.2. การทำไฮโดรไลซิส และ Derivatization

1.2.1 ชั่งตัวอย่าง 150 มิลลิกรัมใส่ในหลอดย่อย ตัวอย่างละ 4 หลอด

1.2.2. เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มอล 150 มิลลิตร ลงในแต่ละหลอด

1.2.3. นำหลอดย่อยที่มีตัวอย่างทั้งหมดติดตั้งที่เครื่องย่อย (รูปที่ 3.12) เปิดเครื่องปรับอุณหภูมิที่ 110 องศาเซลเซียส และเปิดเครื่องดูดไอกรดเป็นเวลา 22 ชั่วโมง

1.2.4. เมื่อครบ 22 ชั่วโมง ปิดเครื่องย่อย ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงปิดเครื่องดูดไอกรด

1.2.5. เติม Redry solution 30 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม จากนั้นระเหยจนแห้งด้วย เครื่องระเหย

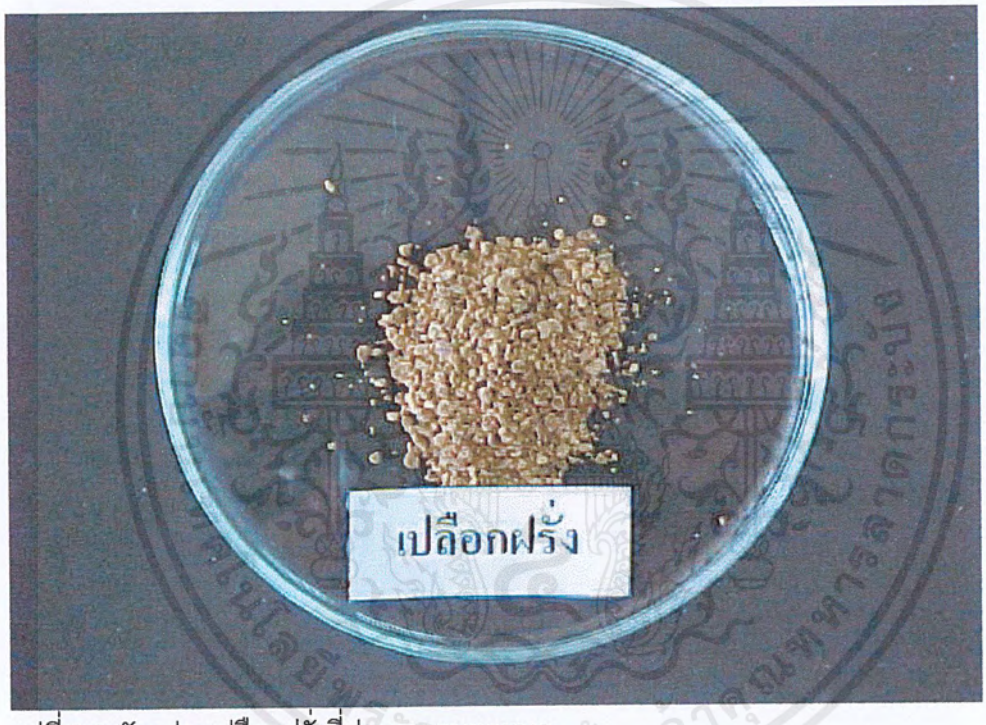
1.2.6. เติม Redry solution 50 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม เจือจาง 10 เท่า โดยการดูดเก็บไว้เพียง 5 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.13-3.20)

1.2.7. ดูดตัวอย่างที่ปริมาณความเข้มข้นของกรดอะมิโนประมาณ 2.5 นาโนโมล นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

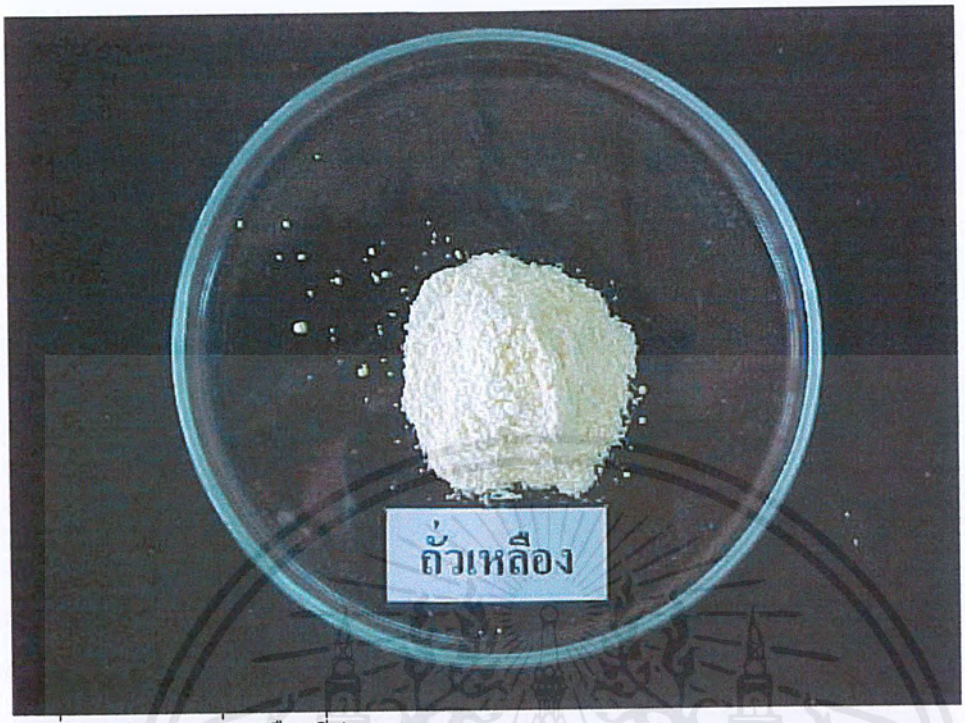
1.2.8. เติมน้ำกลั่นลงละลายกรดอะมิโน 1 มิลลิลิตร นำไปผสม derivatization solution 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที

1.2.9. นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหย จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปละลายกรดอะมิโนที่ได้เติม derivatization ลงไปแล้ว 1 มิลลิลิตร

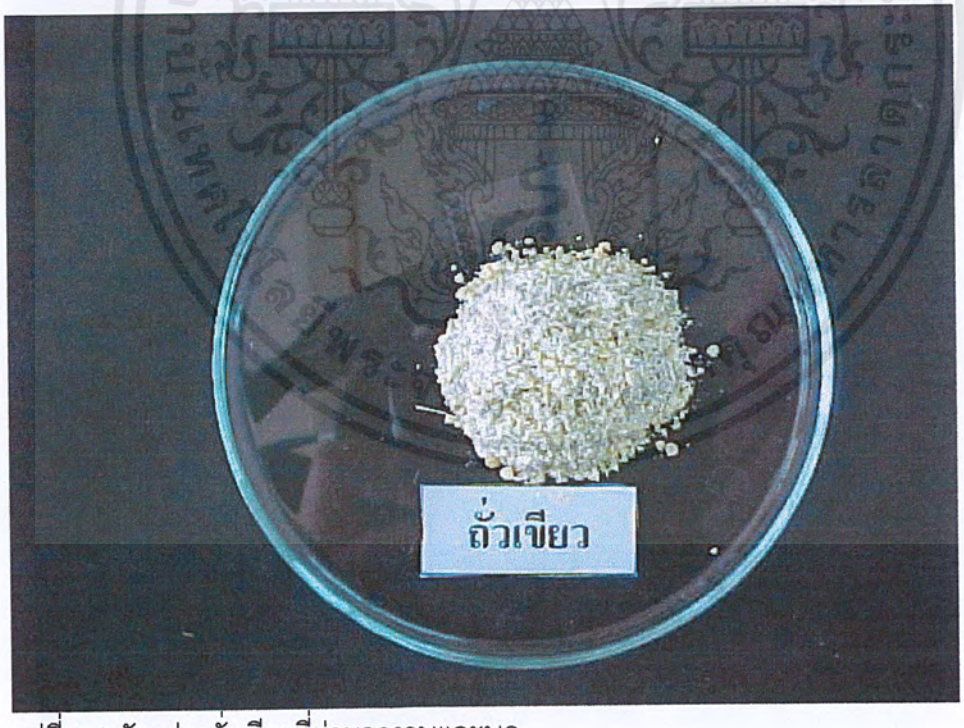


รูปที่ 3.2 ตัวอย่างเปลือกฝรั่งที่ผ่านการอบและบด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

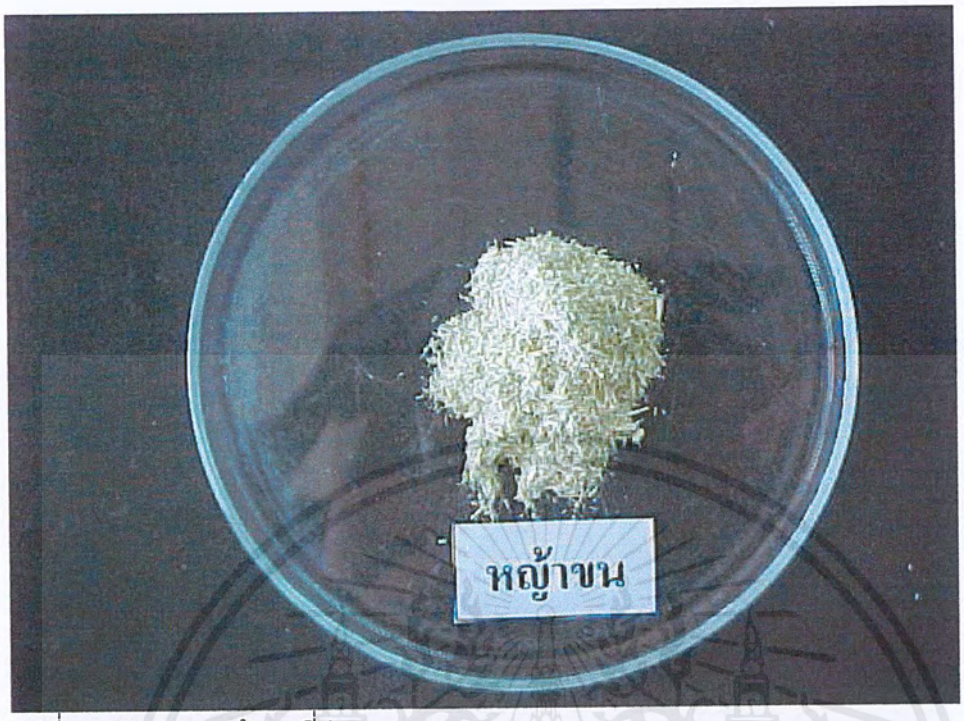


รูปที่ 3.3 ตัวอย่างถั่วเหลืองที่ผ่านการอบและบด



รูปที่ 3.4 ตัวอย่างถั่วเขียวที่ผ่านการอบและบด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.5 ตัวอย่างหญ้าขนที่ผ่านการอบและบด

รูปที่ 3.6 ตัวอย่างกากถั่วเหลืองนอกประเทศจากบริษัท ก ที่ผ่านการอบและบด

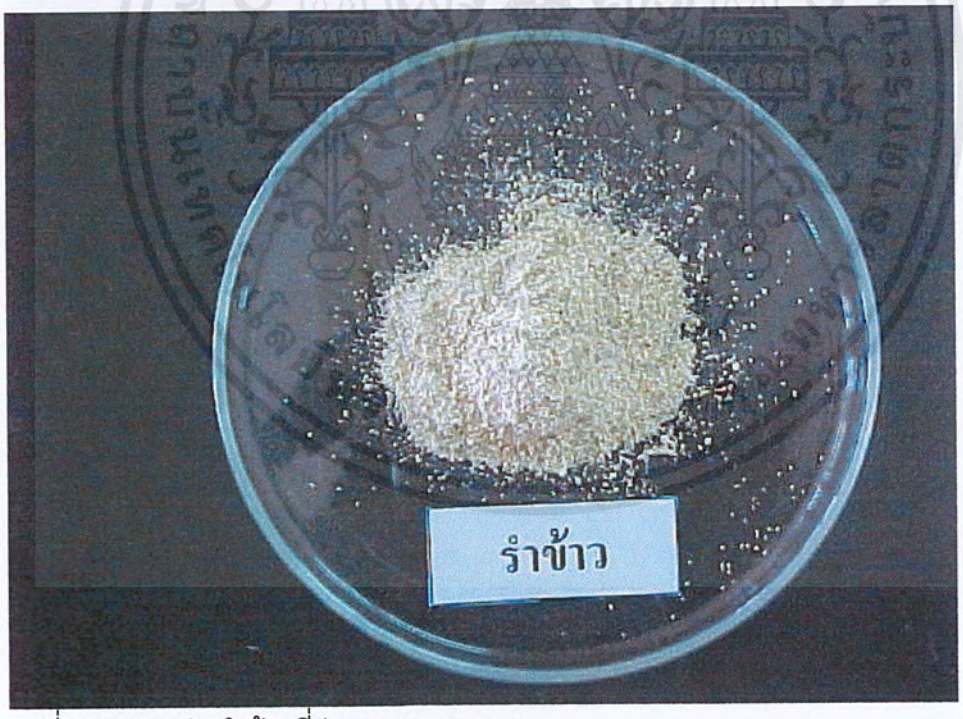
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.7 ตัวอย่างกากถั่วเหลืองในประเทศจากบริษัท ก ที่ผ่านการอบและบด

รูปที่ 3.8 ตัวอย่างกากถั่วเหลืองจากบริษัท ข ที่ผ่านการอบและบด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

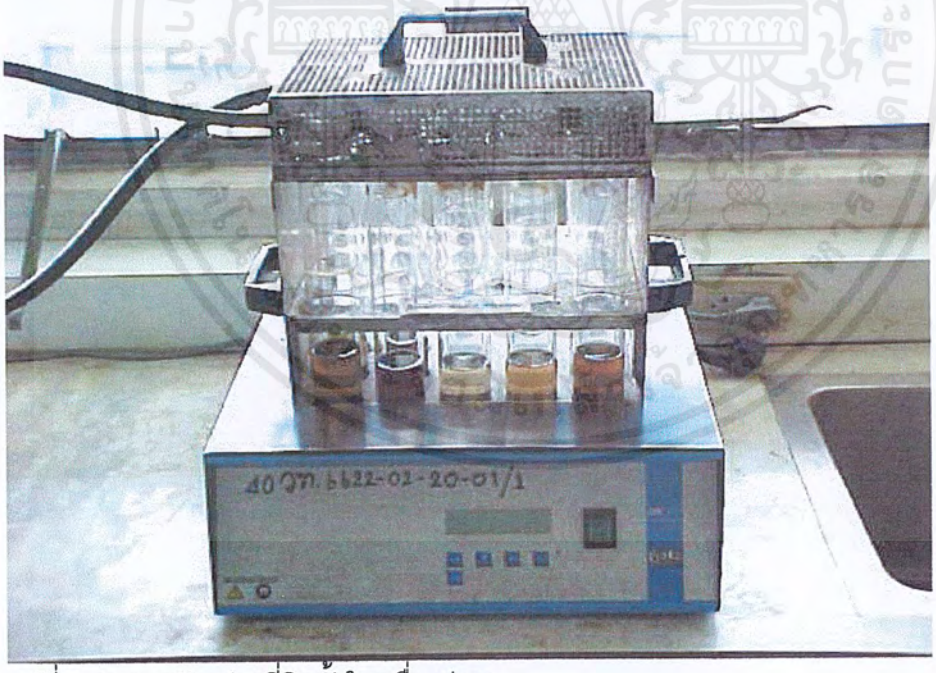
รูปที่ 3.9 ตัวอย่างไข่ทั้งฟองที่ผ่านการอบและบด



รูปที่ 3.10 ตัวอย่างรำข้าวที่ผ่านการอบและบด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

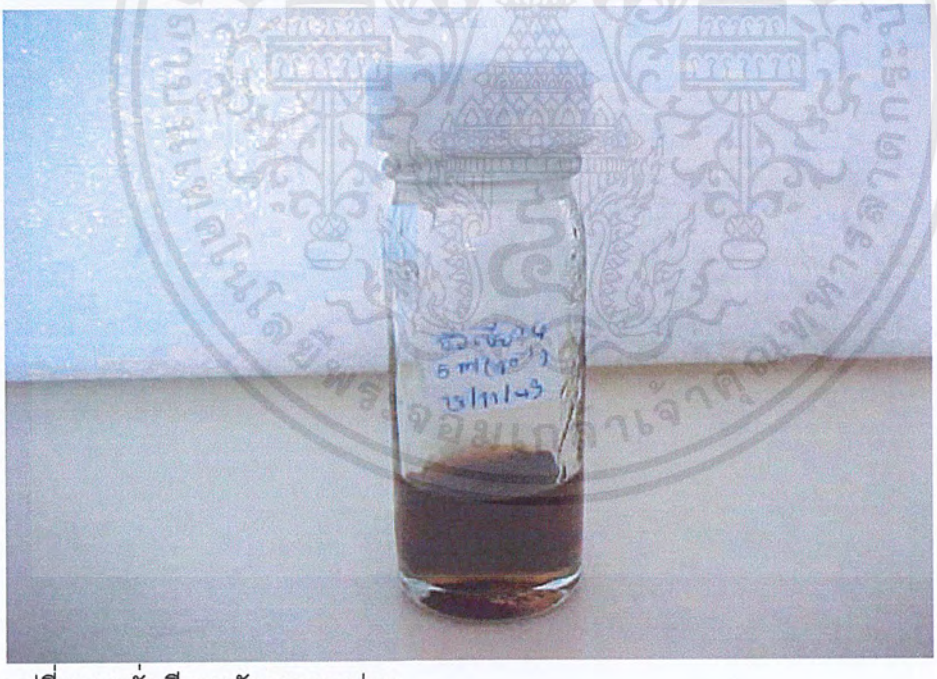
รูปที่ 3.11 ตัวอย่างเศษเนื้อไก่ที่ผ่านการอบและบด



รูปที่ 3.12 สารตัวอย่างที่ติดตั้งในเครื่องย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.13 หญ้าขนหลังจากการย่อย



รูปที่ 3.14 ถั่วเขียวหลังจากการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.15 ไข่ทั้งฟองหลังจากการย่อย

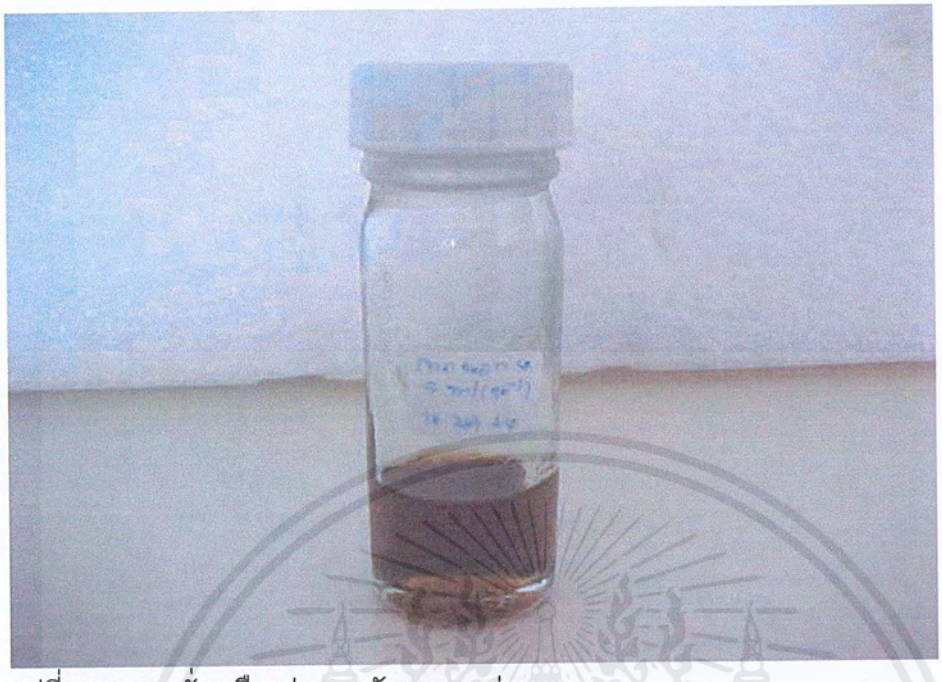
รูปที่ 3.16 เศษเนื้อไก่หลังจากการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.17 ถั่วเหลืองหลังจากการย่อย

รูปที่ 3.18 เปลือกฝรั่งหลังจากการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.19 กากถั่วเหลืองต่างๆ หลังจากการย่อย

รูปที่ 13.20 รำข้าวหลังจากการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3. การวิเคราะห์โดยใช้โครมาโตกราฟี

1.3.1. ตรวจสอบองค์ประกอบต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC ให้ตรงตามสภาวะที่กำหนดไว้ดังตารางที่ 3.1

1.3.2. ทำการล้างปั๊มด้วยการปล่อยให้เฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านปั๊มเป็นเวลา 30 นาที

1.3.3. ปิดการไหลผ่านนั้นเพื่อปรับค่าความดันในคอลัมน์ให้คงที่เป็นเวลา 90 นาที

1.3.4. ฉีดกรดอะมิโนมาตรฐาน 20 ไมโครลิตร เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับสารตัวอย่างที่มีอยู่

1.3.5 ฉีดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร บันทึกผลและคำนวณผลที่ได้ทางสถิติ

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ของ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน

พารามิเตอร์	ค่าที่ใช้
อัตราการไหลเข้าคอลัมน์	0.8 มิลลิลิตรต่อนาที
ค่าดูดกลืนคลื่นแสงของเครื่องดีเทคเตอร์	254 นาโนเมตร
absorbance range	0.08 AUFS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

เนื่องจากในการทดลองไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนโดย HPLC แบบ 2 ปั๊มตามปกติได้ ผู้ทดลองจึงต้องปรับสภาวะของการทดลองให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ HPLC แบบปั๊มเดี่ยวที่มีอยู่ Shimadzu รุ่น LC-6AD ซึ่งไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนแบบเป็นชนิดต่างๆ ได้เนื่องจากไม่สามารถปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิดได้ จึงทำให้ได้สารซึ่งคาดว่าจะเป็นกรดอะมิโนในตัวอย่างออกมาเพียง 1 พีก และเพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดด้วย HPLC แบบปั๊มเดี่ยว ว่าพีกที่ได้สามารถเป็นตัวแทนกรดอะมิโนทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง จึงทดลองฉีดสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน 3 ชนิดที่ผ่านการทำ derivatization ด้วย phenylisothiocyanate (PITC) คือ ไลซีน ลิวซีน วาลีน ทั้งแบบฉีดแยกชนิด และแบบกรดอะมิโนผสม เพื่อสังเกต retention time ที่ได้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนทั้งหมดในตัวอย่างที่ผ่านการทำ derivatization สามารถแสดงผลในตารางที่ 4.1 ซึ่งจะเห็นได้ว่า retention time ของพีกกรดอะมิโนในตัวอย่างที่ได้จากตารางที่ 4.1นั้นอยู่ในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับ retention time ของพีกกรดอะมิโนมาตรฐาน ซึ่งแนวโน้มของ retention time จะลดลงเมื่อมีชนิดของกรดอะมิโนในสารตัวอย่างที่ฉีดมากจึงแสดงให้เห็นว่า สามารถใช้สภาวะการวิเคราะห์ไปตรวจหาปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในวัตถุดิบได้จากพีกของกรดอะมิโนมาตรฐาน และกรดอะมิโนทั้งหมดในตัวอย่างวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์แสดงได้ในรูปที่ 4.1 ถึง 4.14

ตารางที่ 4.1 retention time เฉลี่ยของสารตัวอย่าง

สารตัวอย่าง	retention time เฉลี่ย	สารตัวอย่าง	retention time เฉลี่ย
ลิวซีน	5.45	กากถั่วเหลืองบริษัท ข	3.86
วาลีน	5.03	ไข่ทั้งฟอง	4.55
ไลซีน	5.07	หญ้า	4.28
ลิวซีน+วาลีน+ไลซีน	4.91	เศษเนื้อไก่	4.04
เปลือกฝรั่ง	4.38	รำข้าว	4.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 retention time เฉลี่ยของสารตัวอย่าง (ต่อ)

สารตัวอย่าง	retention time เฉลี่ย	สารตัวอย่าง	retention time เฉลี่ย
ถั่วเหลือง	4.07	กากถั่วเหลืองนอกประเทศบริษัท ข	4.16
ถั่วเขียว	3.78	กากถั่วเหลืองในประเทศบริษัท ก	4.04

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC สามารถเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดได้ในรูปพื้นที่ของพีก/ปริมาณสารตัวอย่าง ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.2 จากผลของการวิเคราะห์ทางสถิติของพื้นที่พีกที่ได้ต่อมิลลิกรัมของสารตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างไข่มีพื้นที่พีกมากที่สุด แสดงถึงปริมาณกรดอะมิโนที่มากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ คือ เศษไก่ แต่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับตัวอย่างพืช ดังนั้นถ้าต้องการวัตถุดิบที่ให้ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดเทียบเท่ากับไข่ในปริมาณตัวอย่างที่เท่ากัน ควรใช้ตัวอย่างเนื้อสัตว์ คือ เศษไก่ และไม่ควรใช้ตัวอย่างพืช ซึ่งมีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบในปริมาณสารตัวอย่างที่เท่ากัน และหากต้องการใช้ตัวอย่างพืชเป็นแหล่งกรดอะมิโน ควรเพิ่มปริมาณตัวอย่างพืชให้มากขึ้นเพื่อให้เทียบเท่ากับปริมาณกรดอะมิโนของไข่ได้

ส่วนตัวอย่างเศษไก่ ซึ่งเป็นตัวแทนของวัตถุดิบที่ได้จากเนื้อสัตว์ มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดไม่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ไปจากตัวอย่างพืช คือ กากถั่วเหลืองนอกประเทศ กากถั่วเหลืองในประเทศ ถั่วเหลือง และรำข้าว ตามลำดับ แต่จะแตกต่างจากตัวอย่าง ถั่วเขียว หญ้า และเปลือกฝรั่ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นถ้าต้องการวัตถุดิบที่ให้ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดเทียบเท่ากับเศษไก่ในปริมาณสารตัวอย่างที่เท่ากัน สามารถเลือกใช้ตัวอย่างพืชข้างต้น และถ้าต้องการใช้วัตถุดิบจาก ถั่วเขียว หญ้าขน และเปลือกฝรั่งให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนที่เทียบเท่ากับเศษไก่ต้องเพิ่มปริมาณตัวอย่างให้มากขึ้น

นอกจากนั้นตัวอย่างของพืชเป็นกลุ่มที่มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดต่ำที่สุด ซึ่งมีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสามารถใช้สารตัวอย่างดังกล่าวทดแทนกันได้

จากข้อจำกัดของอุปกรณ์ในการทดลอง ที่ไม่สามารถแยกชนิดของกรดอะมิโนที่ต้องการศึกษา คือ ไลซีน ลิวซีน และวาลีน ในสารตัวอย่างได้ แต่สามารถวิเคราะห์ในรูปกรดอะมิโนทั้งหมด ดังนั้นปริมาณกรดอะมิโนบางชนิด ที่สลายตัวในขณะทำ acid hydrolysis อาจทำให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดเกิดการคลาดเคลื่อนได้ อย่างไรก็ตามผลกระทบจากการศึกษาและรวบรวมข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า acid hydrolysis ไม่มีผลกระทบกับกรดอะมิโนที่ต้องการศึกษาทั้ง 3 ชนิด แต่จะมีผลต่อกรดอะมิโนบางชนิดที่ไม่ต้องการศึกษาในการทดลองนี้ โดยพบว่า acid hydrolysis ทำให้ทริปโตเฟนจะสลายตัวอย่างสมบูรณ์, แอสพาราจีน และกลูตามีน จะเปลี่ยนไปเป็น กรดแอสพาติค และกรดกลูตามิก ตามลำดับ, เซรีน ทรีโอนีน และไทโรซีน สลายตัวอย่างช้าๆ (ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่เริ่ม hydrolysis ที่ 110 องศาเซลเซียส), นอกจากนั้นยังทำให้เมไทโอนีน ซิสเทอีน และ ซิสทีน สลายตัวไปบางส่วนอีกด้วย (Irvine, 1996) จากการศึกษาดังกล่าว จึงทำให้ผู้ทดลองคาดว่า จะสามารถใช้วิธี acid hydrolysis ในการย่อยโปรตีนเพื่อให้ได้กรดอะมิโนที่ต้องการ เพื่อศึกษาปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในสารตัวอย่างแต่ละชนิดได้

CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 3728

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.85	56733			0.2242	
2	5.542	14062422			55.5729	
3	6.658	11185307	V		44.2029	
	TOTAL	25304460			100	

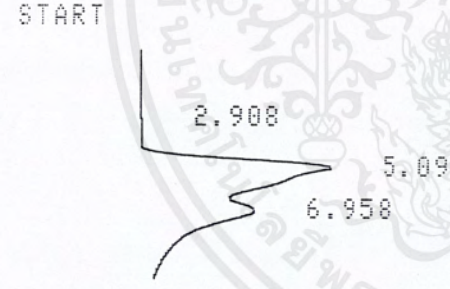
รูปที่ 4.1 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐานลิวซีน (Leucine standard)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 3755

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.923	61129			0.1418	
2	5.275	43052960			99.8582	
	TOTAL	43114088			100	

รูปที่ 4.2 **โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐานไลซีน** (Lysine standard)

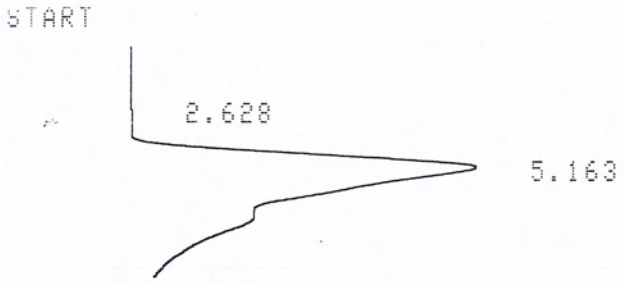


CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 3743

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.908	121102			0.4796	
2	5.092	15382278			60.9191	
3	6.958	9746936	V		38.6012	
	TOTAL	25250314			100	

รูปที่ 4.3 **โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐานวาลีน** (Valine standard)

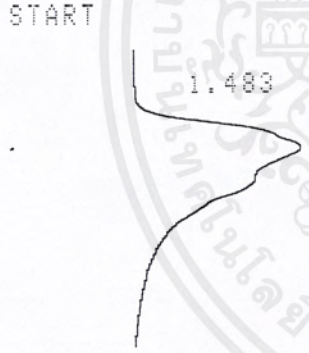
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 3797

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.628	125692			0.4848	
2	5.163	25803414			99.5152	
		---			---	
	TOTAL	25929104			100	

รูปที่ 4.4 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนผสม (Leucine+Lysine+Valine)

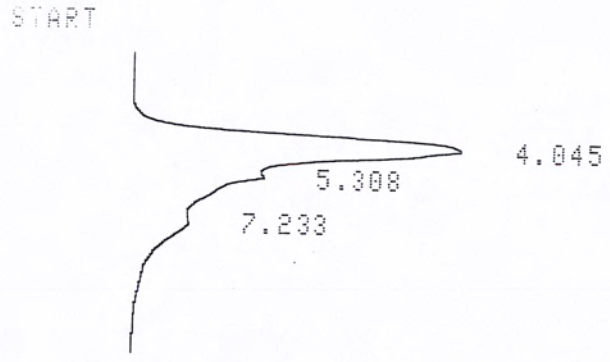


CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 4149

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.328	36091052	V		100	
		---			---	
	TOTAL	36091052			100	

รูปที่ 4.5 โครมาโตแกรมของเปลือกฝรั่ง

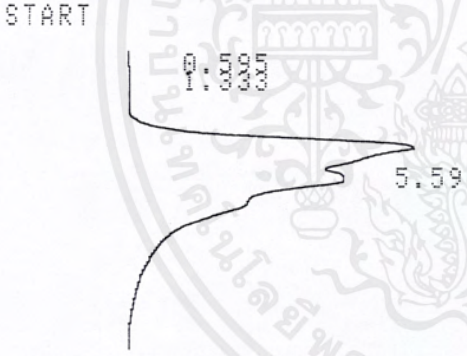
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 3982

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.045	26648608			63.516	
2	5.308	9124412	V		21.7477	
3	7.233	6182727	V		14.7363	
	TOTAL	41955744			100	

รูปที่ 4.6 โครมาโตแกรมของถั่วเขียว

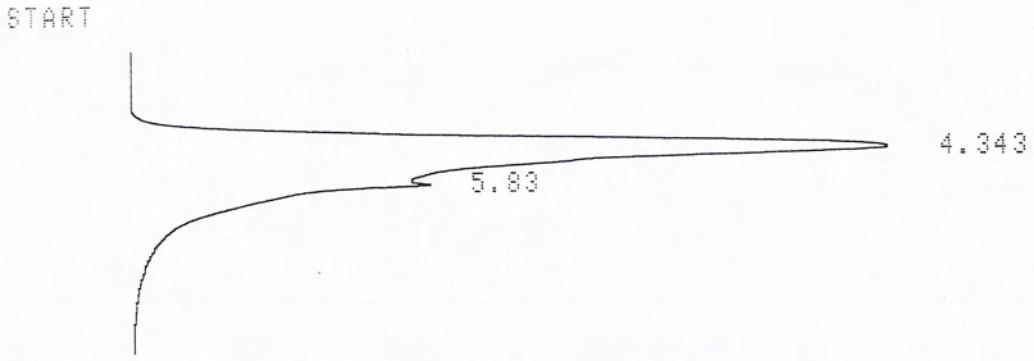


CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 3950

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.333	6443			0.0131	
2	4.192	22878358			46.6145	
3	5.59	26195120	V		53.3724	
	TOTAL	49079920			100	

รูปที่ 4.7 โครมาโตแกรมของถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 4103

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.343	63727896			76.2006	
2	5.83	19903826	V		23.7994	
		---------			----------	
	TOTAL	83631720			100	

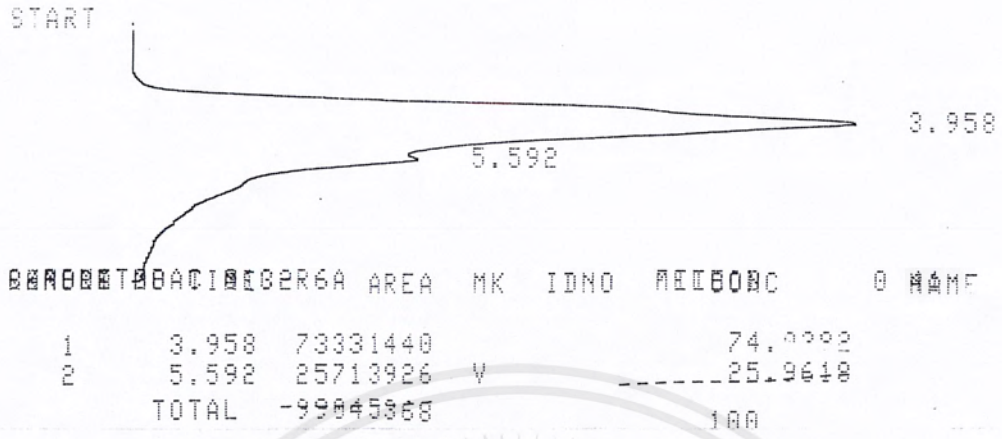
รูปที่ 4.8 โครมาโตแกรมของกากถั่วเหลืองในประเทศบริษัท ก

CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 3914

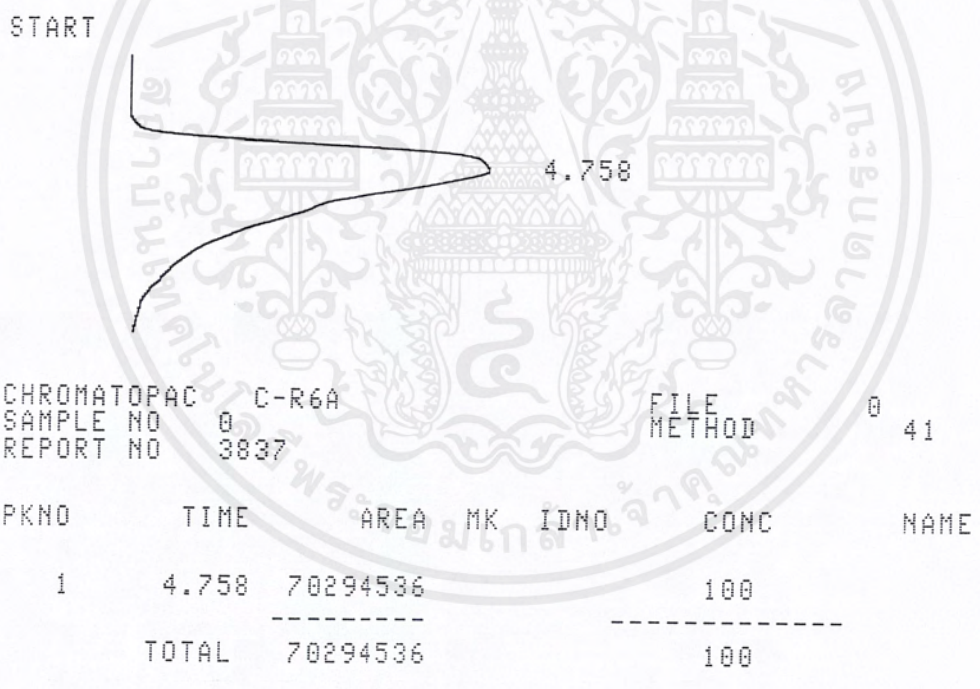
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.658	1156			0.0009	
2	1.683	1656			0.0012	
3	4.223	133358336			99.9979	
		---------			----------	
	TOTAL	133361136			100	

รูปที่ 4.9 โครมาโตแกรมของกากถั่วเหลืองนอกประเทศบริษัท ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

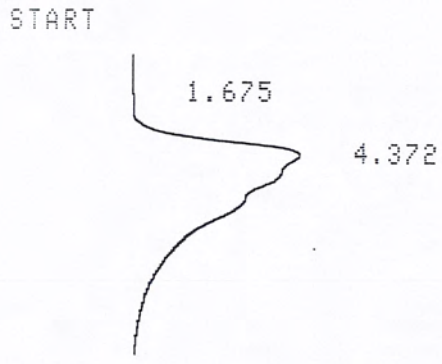


รูปที่ 4.10 โครมาโตแกรมของกากถั่วเหลืองบริษัท ข



รูปที่ 4.11 โครมาโตแกรมของไข่ทั้งฟอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 3875

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.675	7614			0.0205	
2	4.372	37043692			99.9794	
	TOTAL	37051304			100	

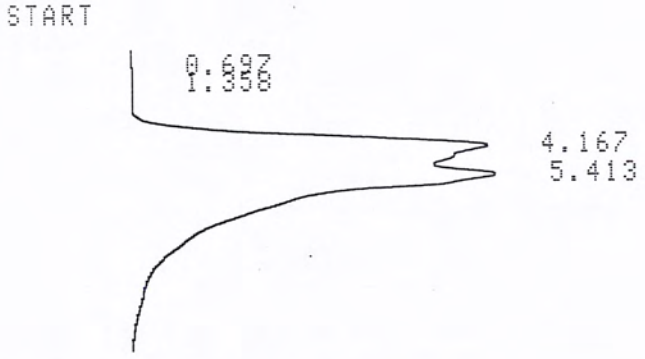
รูปที่ 4.12 โครมาโตแกรมของหญ้าขน

CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 4067

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.498	10080			0.0076	
2	4.183	132565640	E		99.9924	
	TOTAL	132575712			100	

รูปที่ 4.13 โครมาโตแกรมของเศษเนื้อไก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 3938

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.358	6534			0.0095	
2	4.167	28086392			40.6591	
3	5.413	40984800	V		59.3314	
	TOTAL	69077728			100	

รูปที่ 4.14 โครมาโตแกรมของรำข้าว

ตารางที่ 4.2 พื้นที่พีกเฉลี่ยต่อมิลลิกรัมของสารตัวอย่าง

สารตัวอย่าง	พื้นที่พีกเฉลี่ยต่อมิลลิกรัมสารตัวอย่าง
ไข่ทั้งฟอง	5,233,779.84 [a]
เศษเนื้อไก่	3,649,932.60 [ab]
กากถั่วเหลืองนอกประเทศ บริษัท ก	2,604,901.66 [ab]
กากถั่วเหลือง บริษัท ข	2,550,501.35 [bc]
กากถั่วเหลืองในประเทศ บริษัท ก	2,367,419.77 [bc]
ถั่วเหลือง	1,189,197.73 [bc]
รำข้าว	916,802.97 [bc]
ถั่วเขียว	638,723.24 [c]
หญ้าขน	225,990.95 [c]
เปลือกฝรั่ง	205,209.69 [c]

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดโดยวิธี HPLC แบบปั๊มเดี่ยว พบว่า retention time ลดลงเมื่อชนิดของกรดอะมิโนในสารตัวอย่างที่ฉีดมีมากขึ้น เมื่อนำสารตัวอย่างมาวิเคราะห์สามารถเรียงลำดับปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของสารตัวอย่างจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ ไข่ทั้งฟอง เศษเนื้อไก่ กากถั่วเหลืองนอกประเทศจากบริษัท ก กากถั่วเหลืองจากบริษัท ข กากถั่วเหลืองในประเทศจากบริษัท ก ถั่วเหลือง รำข้าว ถั่วเขียว หญ้า และเปลือกฝรั่ง โดยเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในวัตถุดิบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ไข่ทั้งฟอง และเศษเนื้อไก่

กลุ่มที่ 2 เศษเนื้อไก่ กากถั่วเหลืองนอกประเทศจากบริษัท ก กากถั่วเหลืองจากบริษัท ข กากถั่วเหลืองในประเทศจากบริษัท ก ถั่วเหลือง และรำข้าว

กลุ่มที่ 3 กากถั่วเหลืองนอกประเทศจากบริษัท ก กากถั่วเหลืองจากบริษัท ข กากถั่วเหลืองในประเทศจากบริษัท ก ถั่วเหลือง รำข้าว ถั่วเขียว หญ้า และเปลือกฝรั่ง

ซึ่งกากถั่วเหลืองที่ได้ใช้ในการทดลองนี้เป็นกากถั่วเหลืองที่ได้ทำการสกัดเอาไขมันออกแล้ว

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองที่ผ่านมาผู้ทำการทดลองเห็นว่า ควรเพิ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ ควรใช้อุปกรณ์และสภาวะให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์กรดอะมิโนให้มากขึ้น เช่น HPLC แบบ 2 ปั๊ม ซึ่งจะต้องใช้สารชะ 2 ชนิดในการวิเคราะห์ และเพิ่มชนิดของกรดอะมิโนมาตรฐานให้มากขึ้น เพื่อให้การทดลองสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชวนิศนดากร วรวรรณ และคณะ. หลักการเลี้ยงสัตว์ทั่วไป, พิมพ์ครั้งที่ 1, หน้า 114–121, สมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย, กรุงเทพมหานคร, 2531.

ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. เคมีวิเคราะห์ 2, พิมพ์ครั้งที่ 4, หน้า 426–652, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพมหานคร, 2534.

รวีวรรณ สุวณิชย์. "การทำ Derivatization สำหรับการวิเคราะห์ HPLC." Sittiphorn Newsletter VOL 4 No 1,น. 18-21 Sithiporn associates co. LTD. กรุงเทพมหานคร. 1993.

นิธิยา รัตนาปนนท์ และ วิบูลย์ รัตนาปนนท์. โภชนศาสตร์เบื้องต้น, พิมพ์ครั้งที่ 1, หน้า 81–95, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร, 2537.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. การผลิตอาหารสัตว์ เล่ม 1 โภชนะ, พิมพ์ครั้งที่ 1, หน้า 69–70, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร, 2535.

แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. Principles and Techniques of instrumental Analysis, พิมพ์ครั้งที่ 1, หน้า 715–751. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์, กรุงเทพมหานคร, 2535.

ศรีสกุล วรจันทรา. การคำนวนสูตรอาหารและเทคโนโลยีอาหารสัตว์, พิมพ์ครั้งที่ 1, หน้า 267-315. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร, 2528.

ศรีสกุล สรจันทรา และรณชัย สิทธิไกรพงษ์. โภชนศาสตร์สัตว์, พิมพ์ครั้งที่ 1, หน้า 123, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร, 2539.

สิริพันธ์ จุลกรังคะ. โภชนศาสตร์เบื้องต้น, พิมพ์ครั้งที่ 1, หน้า 64–83, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 2541.

อาภัสสรา ชมิดท์. ชีวเคมี, พิมพ์ครั้งที่ 2, หน้า 13 – 49, โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซท, กรุงเทพมหานคร , 2537.

Barrett, G.C. in Chemistry and biochemistry of the amino acid, First published, pp. 380-436, Chapman and Hall, London, 1985.

Irvine G. B. Amino Acid Analysis Using Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate in The Protein Protocols Handbook (Walker J. M. ed.), pp. 469-472, Humana Press Inc., New Jersey, 1996.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

White J. A. and Hart R. J. Derivatization Methods for Liquid Chromatographic Separation of Amino Acids in Amino acid, peptides and proteins : an introduction (Jakubke H. D. and Jeschkeit H. eds.), pp. 55-72, Macmillan, London,1997.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
ข้อมูลดิบของพื้นที่พีกต่อมิลลิกรัมสารตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

ตาราง ก-1 ข้อมูลดิบของพื้นที่พีกต่อมิลลิกรัมสารตัวอย่าง

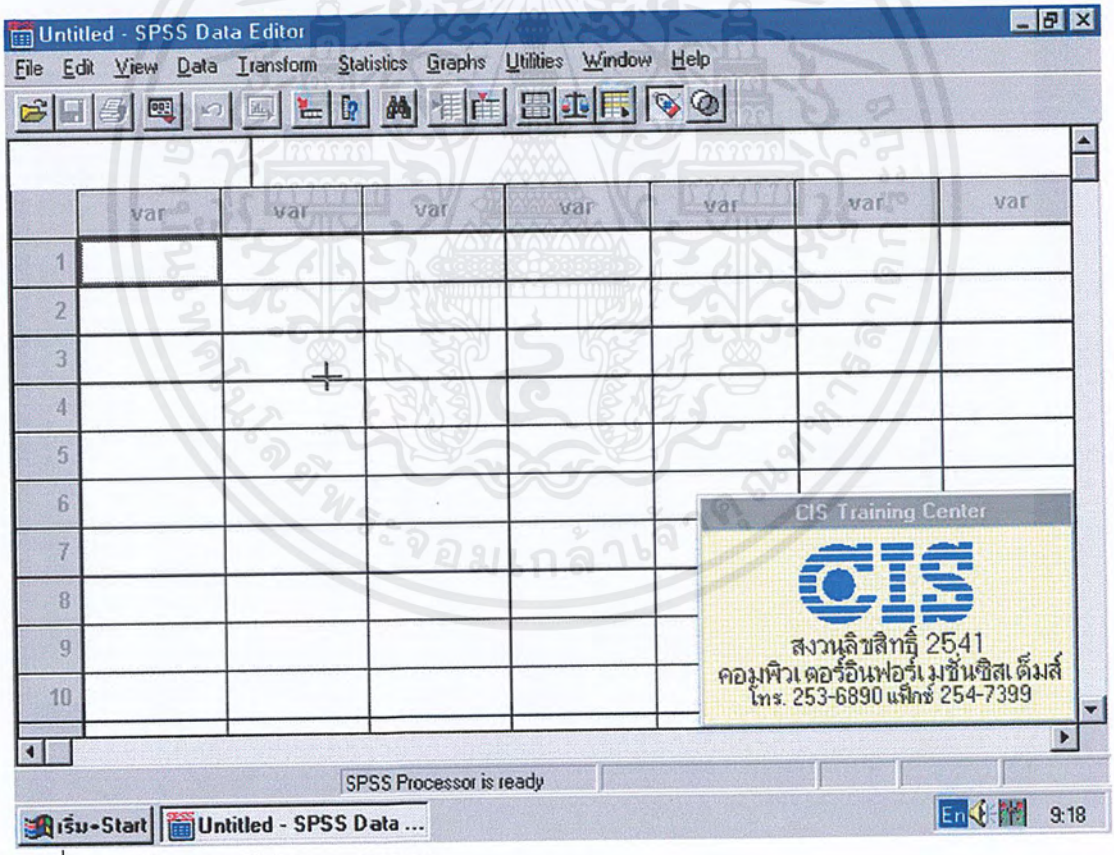
จำนวนซ้ำที่ได้ทำการทดลอง	พื้นที่พีก/มิลลิกรัมสารตัวอย่าง									
	สารตัวอย่าง									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	83,913.13	1,354,442.71	850,237.40	2,713,615.54	2,110,434.46	201,606.46	3,294,967.74	932,372.47	,764,040.00	1,589,343.18
2	695,535.37	1,425,556.53	975,953.13	3,291,004.45	2,510,139.55	22,057.05	3,744,230.41	450,086.55	2,136,861.12	2,420,766.38
3	129,156.00	929,589.12	716,125.20	2,125,246.74	1,984,300.70	9,552.74	2,787,215.05	480,233.72	1,803,003.93	2,488,304.40
4	129,063.65	792,927.29	963,657.32	1,880,998.46	7,902,471.48	14,229.65	2,667,458.06	1,117,898.48	1,466,618.05	2,669,922.62
5	31,596.03	7,044,869.72	1,048,156.77	1,958,615.54	2,863,498.96	711,970.68	3,483,359.75	1,080,353.88	2,857,012.64	2,566,947.48
6	282,887.91	155,505.32	2,160,496.71	2,824,524.70	2,527,389.11	184,515.77	4,108,691.01	1,126,876.79	1,385,366.15	1,732,513.54
7	286,304.54	138,867.46	1,176,148.42	3,757,300.10	2,952,579.41	125,968.93	5,227,500.08	867,995.33	2,647,572.83	3,323,468.15
8	3,220.87	208,823.11	2,043,896.94	2,724,060.03	3,093,152.85	259,722.31	3,914,852.28	1,084,170.49	2,765,967.58	3,226,911.15
9	-	168,578.17	996,881.40	1,825,595.17	2,695,580.36	370,549.67	2,203,092.79	919,684.20	2,448,756.02	3,015,626.62
10	-	168,072.96	960,423.97	2,404,052.78	2,926,758.72	359,736.21	5,067,958.83	1,108,357.80	3,398,999.41	3,015,213.12

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผู้ทดลองได้ใช้โปรแกรม SPSS for Windows (Statistical Package for Social Science) เวอร์ชัน 9 เป็นโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของสารตัวอย่างแต่ละชนิด ซึ่งมีลำดับขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้

1. เปิดโปรแกรม SPSS ที่ได้ทำการติดตั้งใน Window 98 โดยใช้คำสั่งดังนี้

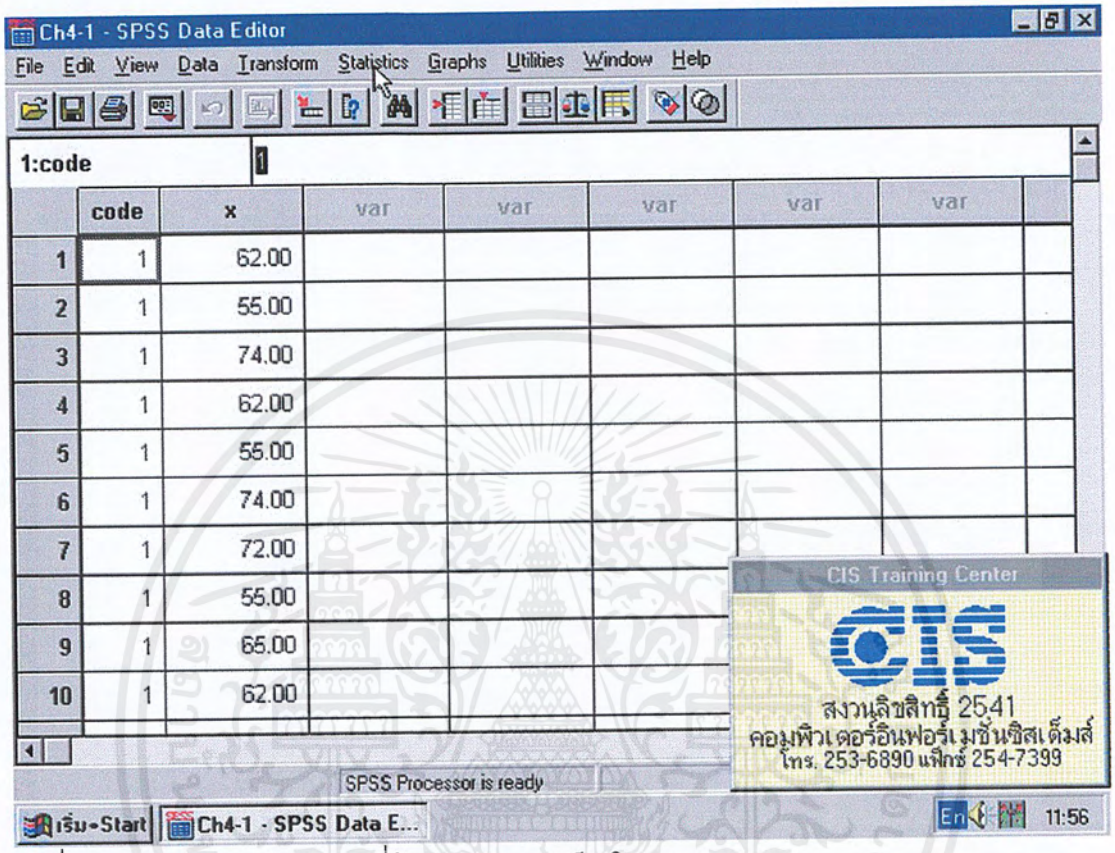
   Start → Programs → SPSS for Windows จะได้หน้าจอดังในรูปที่ ข-1



รูปที่ ข-1 หน้าจอของโปรแกรม SPSS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เติมข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์ดังรูปที่ ข-2

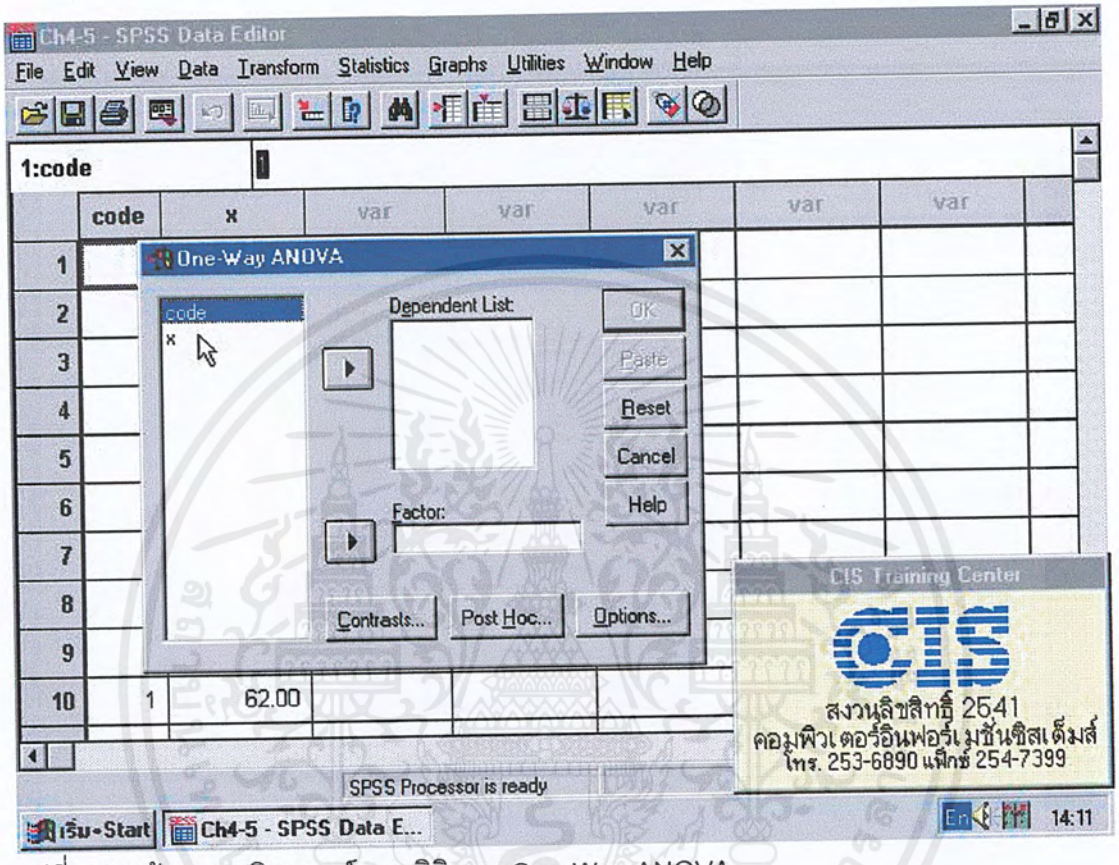


รูปที่ ข-2 ตัวอย่างการเติมข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์ลงในตาราง SPSS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ทำการวิเคราะห์ดังนี้

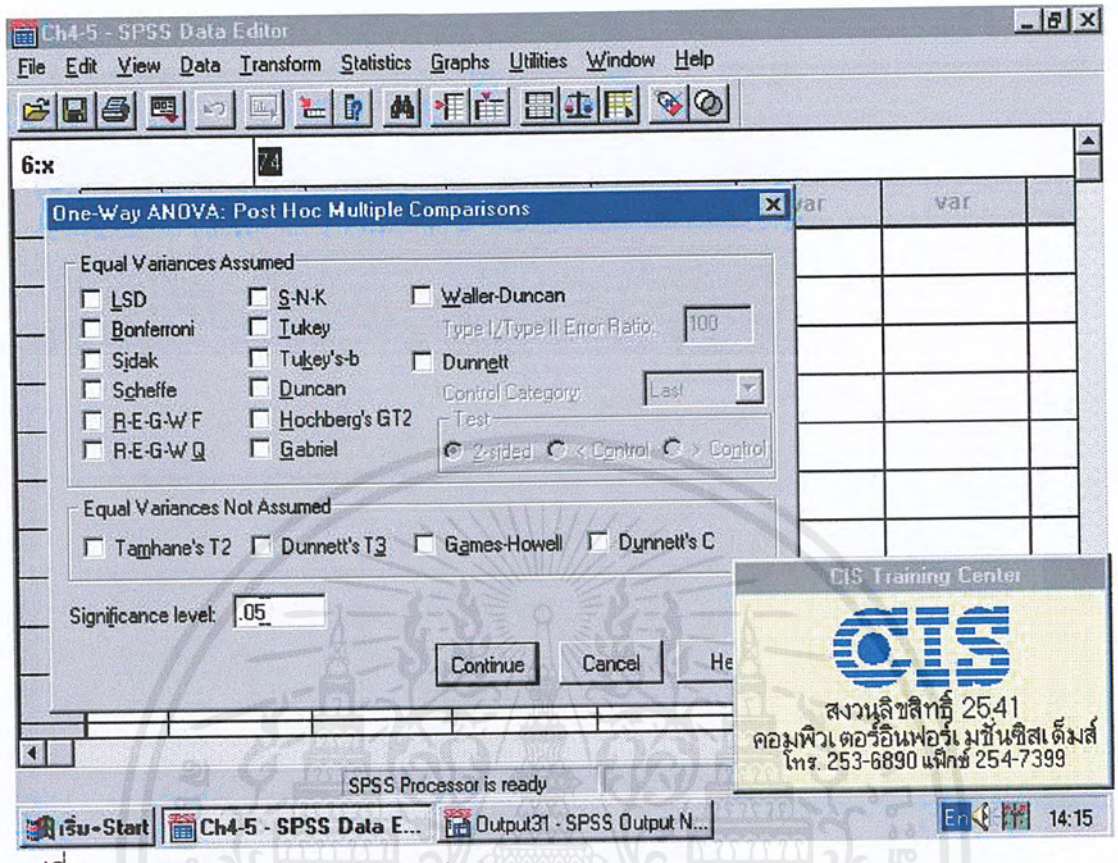
Analyze → Compare Means → One-Way ANOVA จะได้หน้าจอดังรูปที่ ข-3



รูปที่ ข-3 หน้าจอการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-Way ANOVA

จากรูปที่ ข-3 เลือกตัวแปรใส่ใน Dependent List โดยตัวแปรนั้นจะต้องเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ เนื่องจากเป็นตัวแปรที่ต้องการเปรียบเทียบ และใน Factor จะต้องเลือกตัวแปรที่เป็นตัวแปรเชิงกลุ่ม และมีค่าตัวเลขจำนวนเต็ม เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม เลือก Post Hoc... จะได้หน้าจอดังรูปที่ ข-4

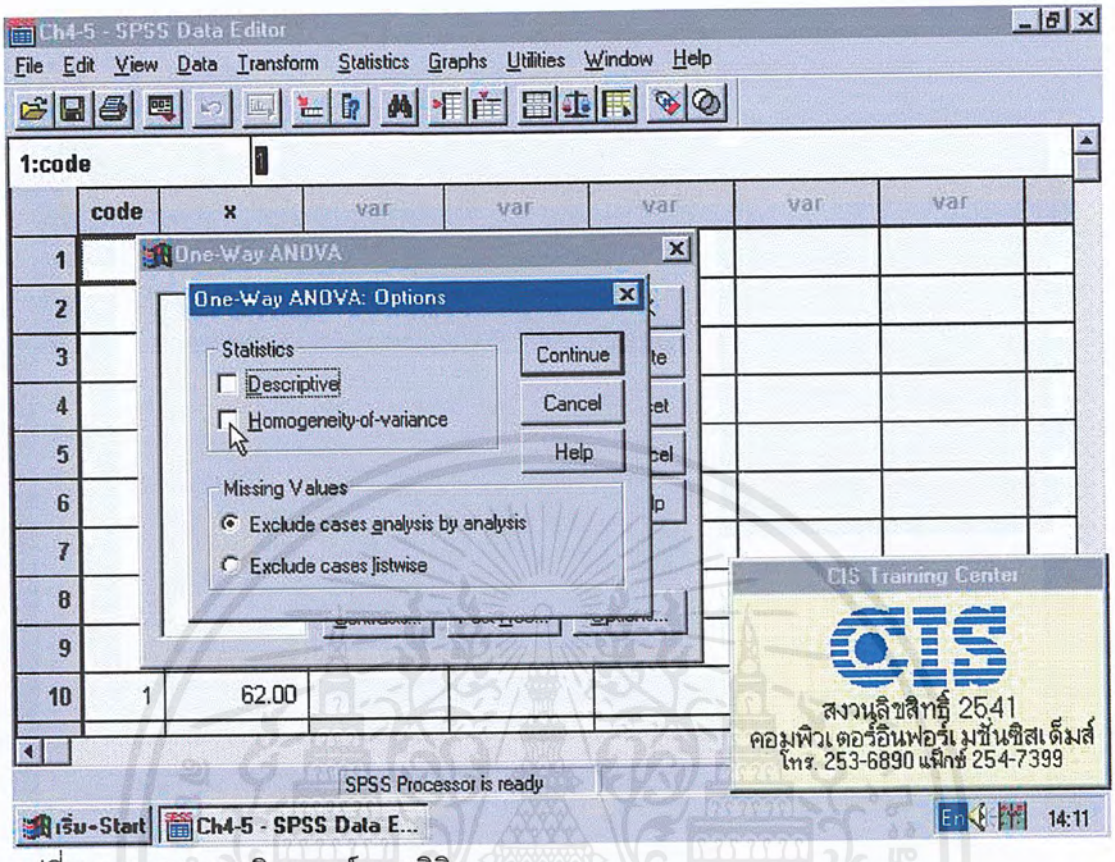
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-4 Post Hoc Multiple Comparison

จากรูปที่ ข-4 ให้เลือกช่อง LSD จากนั้นกด Continue ออกสู่หน้าจอของรูปที่ ข-3 แล้วจึงเลือก Option ซึ่งจะได้หน้าจอดังรูปที่ ข-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-5 Option การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากรูปที่ ข-5 ในส่วนของ Statistics จะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Descriptive จะแสดงจำนวน case ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และค่าประมาณแบบช่วงของตัวแปรเชิงปริมาณใน dependent list แต่ละตัว และของแต่ละกลุ่มย่อยที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ Homogeneity-of-variance จะหาค่าสถิติทดสอบ Levene ของการทดสอบความเท่ากันของค่าแปรปรวนให้ ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะเลือกส่วน Descriptive แล้วเลือก Continue จากนั้นจะออกสู่หน้าจอในรูปที่ ข-3 เลือก OK เพื่อแสดงค่าการเปรียบเทียบสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ได้แสดงอยู่ในหน้าที่ 73-79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

One way ANOVA

Descriptives

PEAK

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	8	205,209.6875	223,691.7452	79,086.9750	18,198.7085	392,220.6665	3,220.87	695,535.37
2.00	10	638,723.2390	528,668.7003	167,179.7221	260,536.4333	1,016,910.0447	138,867.46	1,425,556.53
3.00	10	1,189,197.7260	496,471.0743	156,997.9387	834,043.7143	1,544,351.7377	716,125.20	2,160,496.71
4.00	10	2,550,501.3510	637,953.8718	201,738.7277	2,094,136.6431	3,006,866.0589	1,825,595.17	3,757,300.10
5.00	10	5,233,779.8360	8,230,430.3029	2,602,690.5880	-653,915.3203	11,121,474.9923	1,984,300.70	28,634,991.72
6.00	10	225,990.9470	216,460.3381	68,450.7691	71,144.5493	380,837.3447	9,552.74	711,970.68
7.00	10	3,649,932.6000	985,769.9264	311,727.8216	2,944,755.2754	4,355,109.9246	2,203,092.79	5,227,500.08
8.00	10	916,802.9710	255,402.5748	80,765.3857	734,098.9753	1,099,506.9667	450,086.55	1,126,876.79
9.00	10	2,367,419.7730	654,276.7509	206,900.4753	1,899,378.3808	2,835,461.1652	1,385,366.15	3,398,999.41
10.00	10	2,604,901.6640	585,555.1135	185,168.7854	2,186,020.7697	3,023,782.5583	1,589,343.18	3,323,468.15
Total	98	1,994,022.2303	2,993,138.3428	302,352.6313	1,393,935.9526	2,594,108.5080	3,220.87	28,634,991.72

PEAK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	233911309558557.700	9	25990145506506.410	3.601	.001
Within Groups	635099772930851.000	88	7217042874214.220		
Total	869011082489409.000	97			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PEAK

LSD

(I) SAMPLE	(J) SAMPLE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-433,513.5515	1,274,297.7072	.735	-2,965,912.4699	2,098,885.3669
	3.00	-983,988.0385	1,274,297.7072	.442	-3,516,386.9569	1,548,410.8799
	4.00	-2,345,291.6635	1,274,297.7072	.069	-4,877,690.5819	187,107.2549
	5.00	-5,028,570.1485(*)	1,274,297.7072	.000	-7,560,969.0669	-2,496,171.2301
	6.00	-20,781.2595	1,274,297.7072	.987	-2,553,180.1779	2,511,617.6589
	7.00	-3,444,722.9125(*)	1,274,297.7072	.008	-5,977,121.8309	-912,323.9941
	8.00	-711,593.2835	1,274,297.7072	.578	-3,243,992.2019	1,820,805.6349
	9.00	-2,162,210.0855	1,274,297.7072	.093	-4,694,609.0039	370,188.8329
	10.00	-2,399,691.9765	1,274,297.7072	.063	-4,932,090.8949	132,706.9419
2.00	1.00	433,513.5515	1,274,297.7072	.735	-2,098,885.3669	2,965,912.4699
	3.00	-550,474.4870	1,201,419.4001	.648	-2,938,043.0842	1,837,094.1102
	4.00	-1,911,778.1120	1,201,419.4001	.115	-4,299,346.7092	475,790.4852
	5.00	-4,595,056.5970(*)	1,201,419.4001	.000	-6,982,625.1942	-2,207,487.9998
	6.00	412,732.2920	1,201,419.4001	.732	-1,974,836.3052	2,800,300.8892
	7.00	-3,011,209.3610(*)	1,201,419.4001	.014	-5,398,777.9582	-623,640.7638
	8.00	-278,079.7320	1,201,419.4001	.817	-2,665,648.3292	2,109,488.8652
	9.00	-1,728,696.5340	1,201,419.4001	.154	-4,116,265.1312	658,872.0632
	10.00	-1,966,178.4250	1,201,419.4001	.105	-4,353,747.0222	421,390.1722
3.00	1.00	983,988.0385	1,274,297.7072	.442	-1,548,410.8799	3,516,386.9569
	2.00	550,474.4870	1,201,419.4001	.648	-1,837,094.1102	2,938,043.0842

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	4.00	-1,361,303.6250	1,201,419.4001	.260	-3,748,872.2222	1,026,264.9722
	5.00	-4,044,582.1100(*)	1,201,419.4001	.001	-6,432,150.7072	-1,657,013.5128
	6.00	963,206.7790	1,201,419.4001	.425	-1,424,361.8182	3,350,775.3762
	7.00	-2,460,734.8740(*)	1,201,419.4001	.044	-4,848,303.4712	-73,166.2768
	8.00	272,394.7550	1,201,419.4001	.821	-2,115,173.8422	2,659,963.3522
	9.00	-1,178,222.0470	1,201,419.4001	.329	-3,565,790.6442	1,209,346.5502
	10.00	-1,415,703.9380	1,201,419.4001	.242	-3,803,272.5352	971,864.6592
4.00	1.00	2,345,291.6635	1,274,297.7072	.069	-187,107.2549	4,877,690.5819
	2.00	1,911,778.1120	1,201,419.4001	.115	-475,790.4852	4,299,346.7092
	3.00	1,361,303.6250	1,201,419.4001	.260	-1,026,264.9722	3,748,872.2222
	5.00	-2,683,278.4850(*)	1,201,419.4001	.028	-5,070,847.0822	-295,709.8878
	6.00	2,324,510.4040	1,201,419.4001	.056	-63,058.1932	4,712,079.0012
	7.00	-1,099,431.2490	1,201,419.4001	.363	-3,486,999.8462	1,288,137.3482
	8.00	1,633,698.3800	1,201,419.4001	.177	-753,870.2172	4,021,266.9772
	9.00	183,081.5780	1,201,419.4001	.879	-2,204,487.0192	2,570,650.1752
	10.00	-54,400.3130	1,201,419.4001	.964	-2,441,968.9102	2,333,168.2842
5.00	1.00	5,028,570.1485(*)	1,274,297.7072	.000	2,496,171.2301	7,560,969.0669
	2.00	4,595,056.5970(*)	1,201,419.4001	.000	2,207,487.9998	6,982,625.1942
	3.00	4,044,582.1100(*)	1,201,419.4001	.001	1,657,013.5128	6,432,150.7072
	4.00	2,683,278.4850(*)	1,201,419.4001	.028	295,709.8878	5,070,847.0822
	6.00	5,007,788.8890(*)	1,201,419.4001	.000	2,620,220.2918	7,395,357.4862
	7.00	1,583,847.2360	1,201,419.4001	.191	-803,721.3612	3,971,415.8332
	8.00	4,316,976.8650(*)	1,201,419.4001	.001	1,929,408.2678	6,704,545.4622
	9.00	2,866,360.0630(*)	1,201,419.4001	.019	478,791.4658	5,253,928.6602
	10.00	2,628,878.1720(*)	1,201,419.4001	.031	241,309.5748	5,016,446.7692
6.00	1.00	20,781.2595	1,274,297.7072	.987	-2,511,617.6589	2,553,180.1779
	2.00	-412,732.2920	1,201,419.4001	.732	-2,800,300.8892	1,974,836.3052
	3.00	-963,206.7790	1,201,419.4001	.425	-3,350,775.3762	1,424,361.8182
	4.00	-2,324,510.4040	1,201,419.4001	.056	-4,712,079.0012	63,058.1932

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	5.00	-5,007,788.8890(*)	1,201,419.4001	.000	-7,395,357.4862	-2,620,220.2918
	7.00	-3,423,941.6530(*)	1,201,419.4001	.005	-5,811,510.2502	-1,036,373.0558
	8.00	-690,812.0240	1,201,419.4001	.567	-3,078,380.6212	1,696,756.5732
	9.00	-2,141,428.8260	1,201,419.4001	.078	-4,528,997.4232	246,139.7712
	10.00	-2,378,910.7170	1,201,419.4001	.051	-4,766,479.3142	8,657.8802
7.00	1.00	3,444,722.9125(*)	1,274,297.7072	.008	912,323.9941	5,977,121.8309
	2.00	3,011,209.3610(*)	1,201,419.4001	.014	623,640.7638	5,398,777.9582
	3.00	2,460,734.8740(*)	1,201,419.4001	.044	73,166.2768	4,848,303.4712
	4.00	1,099,431.2490	1,201,419.4001	.363	-1,288,137.3482	3,486,999.8462
	5.00	-1,583,847.2360	1,201,419.4001	.191	-3,971,415.8332	803,721.3612
	6.00	3,423,941.6530(*)	1,201,419.4001	.005	1,036,373.0558	5,811,510.2502
	8.00	2,733,129.6290(*)	1,201,419.4001	.025	345,561.0318	5,120,698.2262
	9.00	1,282,512.8270	1,201,419.4001	.289	-1,105,055.7702	3,670,081.4242
	10.00	1,045,030.9360	1,201,419.4001	.387	-1,342,537.6612	3,432,599.5332
8.00	1.00	711,593.2835	1,274,297.7072	.578	-1,820,805.6349	3,243,992.2019
	2.00	278,079.7320	1,201,419.4001	.817	-2,109,488.8652	2,665,648.3292
	3.00	-272,394.7550	1,201,419.4001	.821	-2,659,963.3522	2,115,173.8422
	4.00	-1,633,698.3800	1,201,419.4001	.177	-4,021,266.9772	753,870.2172
	5.00	-4,316,976.8650(*)	1,201,419.4001	.001	-6,704,545.4622	-1,929,408.2678
	6.00	690,812.0240	1,201,419.4001	.567	-1,696,756.5732	3,078,380.6212
	7.00	-2,733,129.6290(*)	1,201,419.4001	.025	-5,120,698.2262	-345,561.0318
	9.00	-1,450,616.8020	1,201,419.4001	.231	-3,838,185.3992	936,951.7952
	10.00	-1,688,098.6930	1,201,419.4001	.164	-4,075,667.2902	699,469.9042
9.00	1.00	2,162,210.0855	1,274,297.7072	.093	-370,188.8329	4,694,609.0039
	2.00	1,728,696.5340	1,201,419.4001	.154	-658,872.0632	4,116,265.1312
	3.00	1,178,222.0470	1,201,419.4001	.329	-1,209,346.5502	3,565,790.6442
	4.00	-183,081.5780	1,201,419.4001	.879	-2,570,650.1752	2,204,487.0192
	5.00	-2,866,360.0630(*)	1,201,419.4001	.019	-5,253,928.6602	-478,791.4658
	6.00	2,141,428.8260	1,201,419.4001	.078	-246,139.7712	4,528,997.4232

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	7.00	-1,282,512.8270	1,201,419.4001	.289	-3,670,081.4242	1,105,055.7702
	8.00	1,450,616.8020	1,201,419.4001	.231	-936,951.7952	3,838,185.3992
	10.00	-237,481.8910	1,201,419.4001	.844	-2,625,050.4882	2,150,086.7062
10.00	1.00	2,399,691.9765	1,274,297.7072	.063	-132,706.9419	4,932,090.8949
	2.00	1,966,178.4250	1,201,419.4001	.105	-421,390.1722	4,353,747.0222
	3.00	1,415,703.9380	1,201,419.4001	.242	-971,864.6592	3,803,272.5352
	4.00	54,400.3130	1,201,419.4001	.964	-2,333,168.2842	2,441,968.9102
	5.00	-2,628,878.1720(*)	1,201,419.4001	.031	-5,016,446.7692	-241,309.5748
	6.00	2,378,910.7170	1,201,419.4001	.051	-8,657.8802	4,766,479.3142
	7.00	-1,045,030.9360	1,201,419.4001	.387	-3,432,599.5332	1,342,537.6612
	8.00	1,688,098.6930	1,201,419.4001	.164	-699,469.9042	4,075,667.2902
	9.00	237,481.8910	1,201,419.4001	.844	-2,150,086.7062	2,625,050.4882

* The mean difference is significant at the .05 level.

จากนั้นเปิดหน้าจอดังรูปที่ ข-4 เลือก Duncan แล้วเลือก Continue เลือก Option ในหน้าจอรูปที่ ข-3 จะได้หน้าจอในรูปที่ ข-5 แล้วเลือก Homogeneity-of-variance เลือก Continue จะเข้าสู่หน้าจอในรูปที่ ข-6 เลือก OK ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงอยู่ในตารางในหน้าที่ 80-81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

PEAK

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
4.105	9	88	.000

ANOVA

PEAK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	233911309558557.700	9	25990145506506.410	3.601	.001
Within Groups	635099772930851.000	88	7217042874214.220		
Total	869011082489409.000	97			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

PEAK

Duncan

SAMPLE	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1.00	8	205,209.6875		
6.00	10	225,990.9470		
2.00	10	638,723.2390		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.00	10	916,802.9710	916,802.9710	
3.00	10	1,189,197.7260	1,189,197.7260	
9.00	10	2,367,419.7730	2,367,419.7730	
4.00	10	2,550,501.3510	2,550,501.3510	
10.00	10	2,604,901.6640	2,604,901.6640	
7.00	10		3,649,932.6000	3,649,932.6000
5.00	10			5,233,779.8360
Sig.		.096	.050	.196

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.756.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้