

การพัฒนาระบบซีเควนเชียลอินเจคชันสำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบ  
อัตโนมัติและตรวจวัดหาปริมาณกาบด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

**DEVELOPMENT OF SEQUENTIAL INJECTION SYSTEM FOR  
AUTOMATED DERIVATIZATION WITH SUBSEQUENT  
SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF GABA**



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2557

KMITL-2004-SC-M-012-029

**DEVELOPMENT OF SEQUENTIAL INJECTION SYSTEM FOR  
AUTOMATED DERIVATIZATION WITH SUBSEQUENT  
SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF GABA**



**PORNRAVEE TANPRAMOON**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2014  
KMITL-2004-SC-M-012-029**



**COPYRIGHT 2014**

**FACULTY OF SCIENCE**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**คณะวิทยาศาสตร์**  
**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**  
**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาระบบซีควนเชียลอินเจคชันสำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์  
 แบบอัตโนมัติและตรวจวัดหาปริมาณกาบาด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี  
 Development of Sequential Injection System for Automated  
 Derivatization with Subsequent Spectrophotometric  
 Determination of GABA

นักศึกษา

นางสาวพรวิ แทนประมูล

รหัสประจำตัว

54651002

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วิบูลย์	ประดิษฐ์เวียงคำ	
ดร.เสาวภาคย์	ธีราทรง	
ดร.วรารุช	தியங்க்பพัฒนา	
ดร.ณัฐวุฒิ	เชิงชั้น	

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 16 พฤษภาคม พ.ศ. 2557 เวลา 10.00 – 12.00 น.  
 สถานที่สอบ ณ ห้อง 502 ชั้น 5 อาคารจุฬารณวลัยลักษณะ 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุชนิ ธนะบริพัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่..... ๒7 ..เดือน..... พ.ศ..... ๕๖

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาระบบซีควอนเชียลอินเจคชันสำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบอัตโนมัติและตรวจวัดหาปริมาณกาบาคด้วยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมทรี
นักศึกษา	นางสาวพรวิ แทนประมูล
รหัสประจำตัว	54651002
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมี
พ.ศ.	2556
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. ณัฐวุฒิ เชิงชั้น

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ทำการพัฒนาระบบอัตโนมัติสำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบอัตโนมัติเพื่อหาปริมาณแกมมาอะมิโนบิวทิริกแอซิด หรือ กาบาค โดยอาศัยเทคนิคซีควอนเชียลอินเจคชันอะนาไลซิส (เอสไอเอ) ร่วมกับเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมทรี กาบาคจะทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสภาวะเบสโดยใช้บอเรนัทเพอร์ (พีเอช 8.0) โดยมีอะซิโตนไตรลเป็นสารละลายตัวพา พบว่า ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดคือ 420 นาโนเมตร ซึ่งใช้ในการติดตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น กราฟมาตรฐานของระบบเอสไอเอมีความเป็นเส้นตรงที่ดีในช่วงความเข้มข้น 300 – 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค่าการดูดกลืนแสง<sub>420</sub> =  $2.21 \times 10^{-3}$  [กาบาค] - 0.0418,  $R^2 = 0.999$ ) พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียส ขณะทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ ส่งผลให้ความไวในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นและยังพบว่า ระบบเอสไอเอมีความเที่ยงสูง (ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.17 เมื่อศึกษาที่กาบาคความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีความแม่นยำสูง (ร้อยละค่าการวิเคราะห์คืนกลับอยู่ในช่วง 94.28 ถึง 106.84) ได้ประยุกต์ระบบเอสไอเอที่พัฒนาขึ้นเพื่อหาปริมาณกาบาคในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้งชนิดเม็ดและชนิดแคปซูล แล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องของระบบเอสไอเอโดยใช้วิธีทางสถิติ คือ Paired *t*-test เพื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้กับวิธีแบบแบทช์ซึ่งอาศัยหลักการตรวจวัดเดียวกัน พบว่า ผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $t_{\text{stat}} = 0.27$ ,  $t_{\text{crit.}} = 2.23$ ) จึงอาจกล่าวได้ว่าระบบเอสไอเอมีความถูกต้องน่าเชื่อถือ

**คำสำคัญ :** กาบาค, การทำอนุพันธ์แบบอัตโนมัติ, เอสไอเอ, สเปคโตรโฟโตเมทรี

<b>Thesis Title</b>	Development of Sequential Injection System for Automated Derivatization with Subsequent Spectrophotometric Determination of GABA
<b>Student</b>	Pornravee Tanpramoon
<b>Student ID</b>	54651002
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Chemistry
<b>Year</b>	2013
<b>Thesis Advisor</b>	Dr. Nathawut Choengchan

### ABSTRACT

In this work, a method for automated derivatization with subsequent determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid or GABA was presented. The method was developed based on using sequential injection analysis (SIA) with spectrophotometric detection. GABA was derivatized with 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (6 % w/v) in the presence of borate buffer (pH 8.0). Acetonitrile was exploited as carrier. The maximum absorption wavelength of the derivative was located at 420 nm and was employed as the monitored wavelength. Linear calibration (from SIA) was observed in the concentration range of 300 to 2,000 mg L<sup>-1</sup> GABA with good linearity ( $Abs_{420} = 2.21 \times 10^{-3} [GABA] - 0.0418$ ,  $R^2 = 0.999$ ). It was also observed that increasing derivatization temperature from room temperature to 60 °C resulted in increasing sensitivity. The SIA method provided high precision (RSD = 0.17 % at 300 mg/L GABA) and high accuracy (recovery = 94.28 - 106.84 %). The developed method was applied to GABA supplemented tablet and capsule and was validated against batchwise method based on the same detection reaction. From the statistical paired t-test, it was found that the results obtained by the SIA and by the batchwise method were not significantly different at 95 % confidence level ( $t_{stat} = 0.27$ ,  $t_{crit} = 2.23$ ). This implies that the developed was successfully validated.

**Keywords:** GABA, Automated Derivatization, SIA, Spectrophotometry

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในทุกๆ ขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์นี้ อย่างใกล้ชิด ซึ่งผู้เขียนต้องขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ จากสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์ เวียงคำ และดร.เสาวภาคย์ ธีราทรง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ รวมถึงชี้แนะแนวทางในการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและเรียบร้อย

ขอขอบคุณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์จากภายนอก คือ ดร.วรารุช ดิยพงศ์พัฒนา อาจารย์ประจำ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ขอขอบคุณ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อในการซื้อตัวอย่างสำหรับงานวิจัย

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ บิดา มารดา และครอบครัว ที่สนับสนุนและให้กำลังใจผู้เขียน ด้วยดีเสมอมา

นางสาวพรวิ แทนประมุข

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ .....	IV
สารบัญตาราง .....	VII
สารบัญรูป .....	XI
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	XVI
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	4
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....</b>	<b>5</b>
2.1 ข้อมูลเกี่ยวกับกาบา.....	5
2.1.1 ประโยชน์ของกาบา.....	5
2.1.2 แหล่งอาหารที่พบกาบา .....	6
2.2 เทคนิคซีแวนเจิลอินเจกชันอะนาไลซิส (Sequential Injection Ananlysis, SIA).....	7
2.3 อัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (UV-VIS Spectroscopy) .....	11
2.3.1 สาเหตุของการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี – วิสิเบิล (UV-VIS Spectroscopy).....	12
2.3.2 กฎของเบียร์ (Beer’s Law) .....	18
2.3.3 ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer) .....	19
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	20
2.4.1 การทำอนุพันธ์ด้วยวิธีไม่ต่อเนื่อง (Batch derivativazation).....	20
2.4.2 การทำอนุพันธ์ด้วยวิธีแบบต่อเนื่อง (Continuous liquid flow derivatization).....	24

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง .....</b>	<b>27</b>
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ .....	27
3.1.1 สารเคมี.....	27
3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องตรวจวัด .....	27
3.2 การเตรียมสารละลาย.....	28
3.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาสำหรับวิธีวิเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่อง (Batch method).....	28
3.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาสำหรับระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส.....	29
3.2.3 การเตรียมสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (พีเอช 8.0).....	30
3.2.4 การเตรียมสารละลาย 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ (2- hydroxynaphthaldehyde).....	30
3.2.5 การเตรียมตัวอย่าง.....	30
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง.....	31
3.3.1 ศึกษาการทำอนุพันธ์ด้วยวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง.....	31
3.3.2 ออกแบบระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส.....	31
3.3.3 ศึกษาการทำอนุพันธ์แบบอัตโนมัติด้วยระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส.....	32
3.3.4 การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์.....	33
3.3.5 การสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสม.....	35
3.3.6 ประเมินลักษณะเด่นของวิธีการวิเคราะห์.....	36
3.3.7 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วยวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง .....	37
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....</b>	<b>39</b>
4.1 ผลการศึกษาเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดสารอนุพันธ์ของกาบา.....	39
4.2 ออกแบบระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส.....	41

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.3 การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์.....	41
4.3.1 ผลการศึกษาปัจจัยทางกายภาพ .....	42
4.3.2 ผลปัจจัยทางด้านเคมี.....	48
4.4 กราฟมาตรฐานที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสม.....	52
4.5 ประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์ .....	53
4.5.1 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์.....	53
4.5.2 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์.....	54
4.5.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ เชิงปริมาณ .....	54
4.6 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ปริมาณกาบา โดยอาศัยเทคนิคการทำอนุพันธ์แบบไม่ต่อเนื่อง.....	54
<b>บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....</b>	<b>57</b>
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	57
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	58
<b>เอกสารอ้างอิง .....</b>	<b>59</b>
<b>ภาคผนวก.....</b>	<b>62</b>
<b>ประวัติผู้เขียน.....</b>	<b>102</b>

# สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณกาบาที่พบในแหล่งอาหารชนิดต่างๆ .....	6
ตารางที่ 2.2 แสดงการดูดกลืนแสงของโครโมฟอร์ต่างๆ .....	16
ตารางที่ 2.3 แสดงการดูดกลืนแสงซึ่งมีลักษณะเฉพาะของโครโมฟอร์บางชนิดที่พบเห็นเสมอๆ..	17
ตารางที่ 2.4 แสดงผลของมัลติโครโมฟอร์ต่อการดูดกลืนแสง .....	17
ตารางที่ 2.5 แสดงการดูดกลืนแสงซึ่งมีลักษณะเฉพาะของสารประกอบอะโรมาติก และผลของออกโซโครมต่อเบนซีนโครโมฟอร์.....	18
ตารางที่ 2.6 สรุปงานวิจัยเกี่ยวกับการทำอนุพันธ์ด้วยวิธีไม่ต่อเนื่องและวิธีต่อเนื่อง .....	25
ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง .....	28
ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับวิเคราะห์ด้วยระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส .....	29
ตารางที่ 4.1 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและสัมประสิทธิ์การตัดสนใจเมื่อใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน .....	42
ตารางที่ 4.2 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและสัมประสิทธิ์การตัดสนใจเมื่อใช้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบาที่คูดเข้าสู่ระบบในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน .....	43
ตารางที่ 4.3 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและสัมประสิทธิ์การตัดสนใจเมื่อใช้เวลาในการให้ความร้อนของปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน .....	44
ตารางที่ 4.4 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและสัมประสิทธิ์การตัดสนใจเมื่อให้ความยาวของมิกซิงคอยด์ในระบบเอสไอเอสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกาบาต่างๆ กัน.....	45
ตารางที่ 4.5 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและสัมประสิทธิ์การตัดสนใจเมื่อใช้ลำดับที่ต่างกัน .....	47
ตารางที่ 4.6 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและสัมประสิทธิ์การตัดสนใจเมื่อใช้อัตราการไหลที่ต่างๆกัน	48
ตารางที่ 4.7 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสนใจ เมื่อใช้พีเอชของการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ต่างๆ กัน .....	49
ตารางที่ 4.8 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสนใจเมื่อใช้ความเข้มข้นของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ต่างๆ กัน .....	50

## สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.9 สรุปการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกาบา โดยอาศัยระบบ ซีเควนเชียลอินเจกชัน.....	51
ตารางที่ 4.10 ผลการคำนวณหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์ที่คืนกลับ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ กาบา.....	53
ตารางที่ 4.11 สรุปคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยระบบ ซีเควนเชียลอินเจกชัน .....	54
ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นและเทคนิคการทำอนุพันธ์แบบ ไม่ต่อเนื่อง .....	55
ตารางที่ ก.1 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ อุณหภูมิห้อง.....	62
ตารางที่ ก.1 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้อุณหภูมิขณะทำปฏิกิริยา อนุพันธ์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส.....	64
ตารางที่ ก.1 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้อุณหภูมิขณะทำปฏิกิริยา อนุพันธ์เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส.....	65
ตารางที่ ก.1 (ง) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้อุณหภูมิขณะทำปฏิกิริยา อนุพันธ์เท่ากับ 70 องศาเซลเซียส.....	66
ตารางที่ ก.2 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐานที่ดูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 50 ไมโครลิตร .....	67
ตารางที่ ก.2 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐานที่ดูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 100 ไมโครลิตร .....	68
ตารางที่ ก.2 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐานที่ดูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 150 ไมโครลิตร .....	70
ตารางที่ ก.3 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำ ปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 1 นาที .....	71
ตารางที่ ก.3 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำ ปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 3 นาที .....	72

## สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ก.3 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำ ปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 5 นาที .....	73
ตารางที่ ก.4 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ใน ขั้นตอน การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 100 เซนติเมตร .....	74
ตารางที่ ก.4 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ใน ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 200 เซนติเมตร .....	76
ตารางที่ ก.4 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ใน ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 300 เซนติเมตร .....	77
ตารางที่ ก.4 (ง) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ใน ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 400 เซนติเมตร .....	78
ตารางที่ ก.5 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยา อนุพันธ์แบบ non-sandwich.....	80
ตารางที่ ก.5 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยา อนุพันธ์แบบ sandwich .....	82
ตารางที่ ก.6 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะ เข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร/นาที .....	83
ตารางที่ ก.6 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะ เข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร/นาที .....	85
ตารางที่ ก.6 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะ เข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 100 ไมโครลิตร/นาที .....	86
ตารางที่ ก.7 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ใน การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 8.....	88
ตารางที่ ก.7 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ใน การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 9 .....	89

## สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ก.7 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ในการ ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 10 .....	90
ตารางที่ ก.8 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ ของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 0.3 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) .....	92
ตารางที่ ก.8 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ ของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 3 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) .....	93
ตารางที่ ก.8 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ ของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) .....	94
ตารางที่ ก.8 (ง) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ ของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 7.5 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) .....	95
ตารางที่ ข. ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม .....	96
ตารางที่ ค.1 ค่าการดูดกลืนแสงสารอนุพันธ์กาบา ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ที่เติม สารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 มิลลิกรัม/ลิตรลงไป .....	98
ตารางที่ ค.2 ค่าการดูดกลืนแสงสารอนุพันธ์ของสารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้น 300 . มิลลิกรัม/ลิตร ซ้ำๆ เป็นจำนวน 10 ครั้ง.....	100
ตารางที่ ง. การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ paired $t$ – test.....	101

# สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงกลไกการเกิดกาบา.....	5
รูปที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบระบบ FIA และ SIA .....	7
รูปที่ 2.3 แสดงการแพร่ของสารละลายภายในท่อ .....	9
รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของ syringe pump .....	10
รูปที่ 2.5 แสดง ก. ภายในลักษณะของ 8- port-multi-position selection valve; ข. ลักษณะภายนอกของ 8- port-multi-position selection valve .....	10
รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของ mixing system.....	11
รูปที่ 2.7 แสดงการเกิดอันตรกิริยาของสารเคมีกับการแผ่รังสีหรือแสงตกกระทบ .....	12
รูปที่ 2.8 แสดงกระบวนการเปลี่ยนระดับพลังงานเมื่อถูกกระตุ้นทำให้เกิดการดูดกลืนแสง .....	12
รูปที่ 2.9 แสดง electronic energy level และ transition .....	13
รูปที่ 2.10 แสดงการเกิดทรานซิชันของโมเลกุลลักษณะต่างๆ .....	14
รูปที่ 3.1 แสดงระบบซีเควนเชียลอินเจกชันที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ แบบอัตโนมัติในการหาปริมาณกาบา; C: อะซิโตนไนไตรล์, R: สารละลาย 2-ไฮดรอก ซีแนปทาลดีไฮด์, B: สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0, S: สารละลายมาตรฐานกาบา, SP: ไชริงค์ปั๊ม, HC: โฮลดิ้งคอยล์ ความยาว 60 เซนติเมตร, MV: มัลติซีเลกชันวาล์ว, IS: ระบบให้ความร้อน, D: ยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ .....	31
รูปที่ 3.2 แสดงหน้าจอของซอฟต์แวร์ MGC Auto-Pret Version 4 ซึ่งระบุลำดับขั้นตอนการหา ปริมาณกาบาโดยอาศัยระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส .....	33
รูปที่ 3.3 แสดงลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ non-sandwich; std.GABA: สารละลายมาตรฐานกาบา ความเข้มข้น 100-2000 มิลลิกรัม/ลิตร, buffer: บอเรตบัฟเฟอร์พีเอช 8, HN: 2-ไฮดรอก ซีแนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) .....	34
รูปที่ 3.4 แสดงลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ sandwich; std.GABA: สารละลายมาตรฐานกาบา ความเข้มข้น 100-2000 มิลลิกรัม/ลิตร, buffer: บอเรตบัฟเฟอร์พีเอช 8, HN: 2-ไฮดรอก ซีแนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) .....	35

## สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.1 แสดงสมการการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างกาบกับ 2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์.....	39
รูปที่ 4.2 แสดง (ก) สเปกตรัมที่ได้จากสารอนุพันธ์ของกาบในช่วงยูวีและวิสิเบิล, (ข) สเปกตรัมที่ได้จากสารอนุพันธ์ของกาบในช่วงวิสิเบิล และ(ค) กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกาบในช่วงความเข้มข้น 50 – 400 มิลลิกรัม/ลิตร.....	40
รูปที่ 4.3 แสดงระบบซีเควนเชียลอินเจกชันที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบอัตโนมัติในการหาปริมาณกาบ; C: อะซิโตนไตรัล, R: สารละลาย 2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์, B: สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0, S: สารละลายมาตรฐานกาบ, SP: ไชริงค์ปั๊ม, HC: โฮลดิ้งคอยล์ ความยาว 60 เซนติเมตร, MV: มัลติซีเลกชันวาล์ว, IS: ระบบให้ความร้อน, D: ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์.....	41
รูปที่ 4.4 แสดงผลของการให้อุณหภูมิห้อง, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบ ตามลำดับ .....	42
รูปที่ 4.5 แสดงผลปริมาตรที่ดูดเข้าสู่ระบบของสารละลายมาตรฐานกาบ 50 - 150 มิลลิกรัม/ลิตร ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบตามลำดับ.....	43
รูปที่ 4.6 แสดงผลของเวลาในการให้ความร้อนของปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ 1, 3 และ 5 นาที ซึ่งส่งผลต่อค่าการดูดกลืนของสารอนุพันธ์ของกาบ ตามลำดับ .....	44
รูปที่ 4.7 แสดงผลของความยาวของมิกซิงคอยล์ที่ 100, 200, 300 และ 400 เซนติเมตร ซึ่งส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบ ตามลำดับ .....	45
รูปที่ 4.8 แสดงผลของลำดับในการทำปฏิกิริยาแบบ sandwich และ non-sandwich ซึ่งส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบ ตามลำดับ .....	46
รูปที่ 4.9 แสดงผลของอัตราการไหลของสารละลายภายในท่อขณะผลึกเข้าสู่ระบบตรวจวัดที่ส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบ ตามลำดับ.....	47
รูปที่ 4.10 แสดงผลของพีเอช 8, 9 และ 10 ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบ ตามลำดับ .....	49
รูปที่ 4.11 แสดงผลของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 3, 6 และ 7.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบ ตามลำดับ .....	50

## สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4. 12 สัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกาบาความเข้มข้น 300 – 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร .....	52
รูปที่ 4. 13 กราฟมาตรฐานของสารละลายกาบา ช่วงความเข้มข้น 300 – 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร ...	52
รูปที่ ก.1 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้อง.....	62
รูปที่ ก.1 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส .....	63
รูปที่ ก.1 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส .....	65
รูปที่ ก.1 (ง) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส .....	66
รูปที่ ก.2 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ดูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 50 ไมโครลิตร .....	67
รูปที่ ก.2 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ดูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 100 ไมโครลิตร .....	68
รูปที่ ก.2 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ดูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 150 ไมโครลิตร .....	69
รูปที่ ก.3 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 1 นาที .....	71
รูปที่ ก.3 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 3 นาที .....	72
รูปที่ ก.3 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 5 นาที .....	73
รูปที่ ก.4 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 100 เซนติเมตร .....	74
รูปที่ ก.4 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 200 เซนติเมตร .....	75

## สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ ก.4 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอน การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 300 เซนติเมตร .....	77
รูปที่ ก.4 (ง) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอน การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 400 เซนติเมตร .....	78
รูปที่ ก.5 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ แบบ non-sandwich .....	80
รูปที่ ก.5 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ แบบ sandwich .....	81
รูปที่ ก.6 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะที่ สู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร/นาที่ .....	83
รูปที่ ก.6 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะที่ สู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร/นาที่ .....	84
รูปที่ ก.6 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะที่ สู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 100 ไมโครลิตร/นาที่ .....	86
รูปที่ ก.7 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ใน กาบาทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 8 .....	87
รูปที่ ก.7 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ในการ ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 9 .....	89
รูปที่ ก.7 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ในการ ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 10 .....	90
รูปที่ ก.8 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ ของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 0.3 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) .....	91
รูปที่ ก.8 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ ของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 3 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) .....	93

## สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ ก.8 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ ของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) .....	94
รูปที่ ก.8 (ง) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ ของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 7.5 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) .....	95
รูปที่ ข. แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม.....	96
รูปที่ ค. แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบา ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร ซ้ำๆเป็น จำนวน 10 ครั้ง .....	99
รูปที่ จ. แสดงปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่าง 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์กับกาบาในสภาวะที่พี เอชเท่ากับ 8.0.....	102

## สัญลักษณ์และคำย่อ

SIA	sequential injection analysis
GABA	gamma amino butyric acid
HN	2 – hydroxy-1-naphthaldehyde
ACN	acetonitrile



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กาบาหรือแกมมาอะมิโนบิวทิริก แอซิด ( $\gamma$ -Aminobutyric acid, GABA) เป็นกรดอะมิโนที่ผลิตจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) ของกรดอะมิโนชนิดกลูตามิก (Glutamic acid) ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (Neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง ช่วยรักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้นทำให้ผ่อนคลาย อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อ (Anterior pituitary) ซึ่งทำหน้าที่ผลิตฮิวแมน โกรท ฮอร์โมน (Human Growth Hormone, HGH) ที่ช่วยในการเจริญเติบโตและการสร้างเนื้อเยื่อ หน้าที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และโรคพาร์กินสัน [1]

แหล่งอาหารตามธรรมชาติที่พบกาบา ได้แก่ ข้าวกล้องงอก พักทอง เต้าหู้ เป็นต้น หากบริโภคอาหารเหล่านี้แต่เพียงแหล่งเดียว อาจได้รับกาบาไม่เพียงพอต่อความต้องการกาบาในแต่ละวันของผู้บริโภค ดังนั้น ในปัจจุบัน จึงมีผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มเสริมกาบาวางจำหน่ายเป็นจำนวนมาก โดยพบในรูปแบบ นม เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพและในรูปกาบาอัดเม็ด (GABA-Tablet) ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเหล่านี้จำเป็นต้องได้รับการควบคุมคุณภาพเพื่อตรวจสอบว่ามีปริมาณกาบาตรงกับที่ระบุไว้ข้างฉลากหรือไม่ การวิเคราะห์หาปริมาณกาบาในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมกาบานี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อประโยชน์ในการคุ้มครองผู้บริโภค

งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาการหาปริมาณกาบา นิยมใช้เทคนิคลิควิด โครมาโทกราฟี ร่วมกับการตรวจวัดด้วยหลักการต่างๆ [2-9] อย่างไรก็ตามก็จะต้องนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ (Derivatization) ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อไป พบว่าวิธีเหล่านั้น ให้ผลวิเคราะห์ ที่ถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ แต่ข้อจำกัดที่เลี่ยงไม่ได้คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เครื่องมือมีราคาแพง อีกทั้งขั้นตอนการทำอนุพันธ์เป็นแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch derivatization) อาจทำการทดลองได้ไม่สะดวก และอาจเพิ่มเวลาในการวิเคราะห์ให้ยาวนานขึ้น ทำให้ได้ผลวิเคราะห์ช้า ซึ่งอาจสร้างความเสียหายต่อกระบวนการผลิตอาหารเสริมกาบา ในกรณีที่ตรวจพบว่า มีปริมาณกาบาไม่สอดคล้องกับที่ระบุข้างฉลาก ทำให้ไม่สามารถหยุดการผลิตได้ทัน

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงจะพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกาบาในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่มเสริมกาบา โดยมุ่งหวังให้เป็นวิธีที่สามารถทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ได้อย่างอัตโนมัติแล้วตรวจวัดสารอนุพันธ์และรู้ผลวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว โดยจะพัฒนาวิธีดังกล่าว อาศัยหลักการของเทคนิคซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส (Sequential Injection Analysis, SIA) ซึ่งนอกจากสามารถ

ทำอนุพันธ์ได้อย่างอัตโนมัติแล้ว ยังสามารถตรวจวัดได้อย่างต่อเนื่องอีกด้วย โดยการตรวจวัดจะใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการและเป็นเครื่องมือที่มีราคาถูกเมื่อเทียบกับเครื่องโครมาโทกราฟี

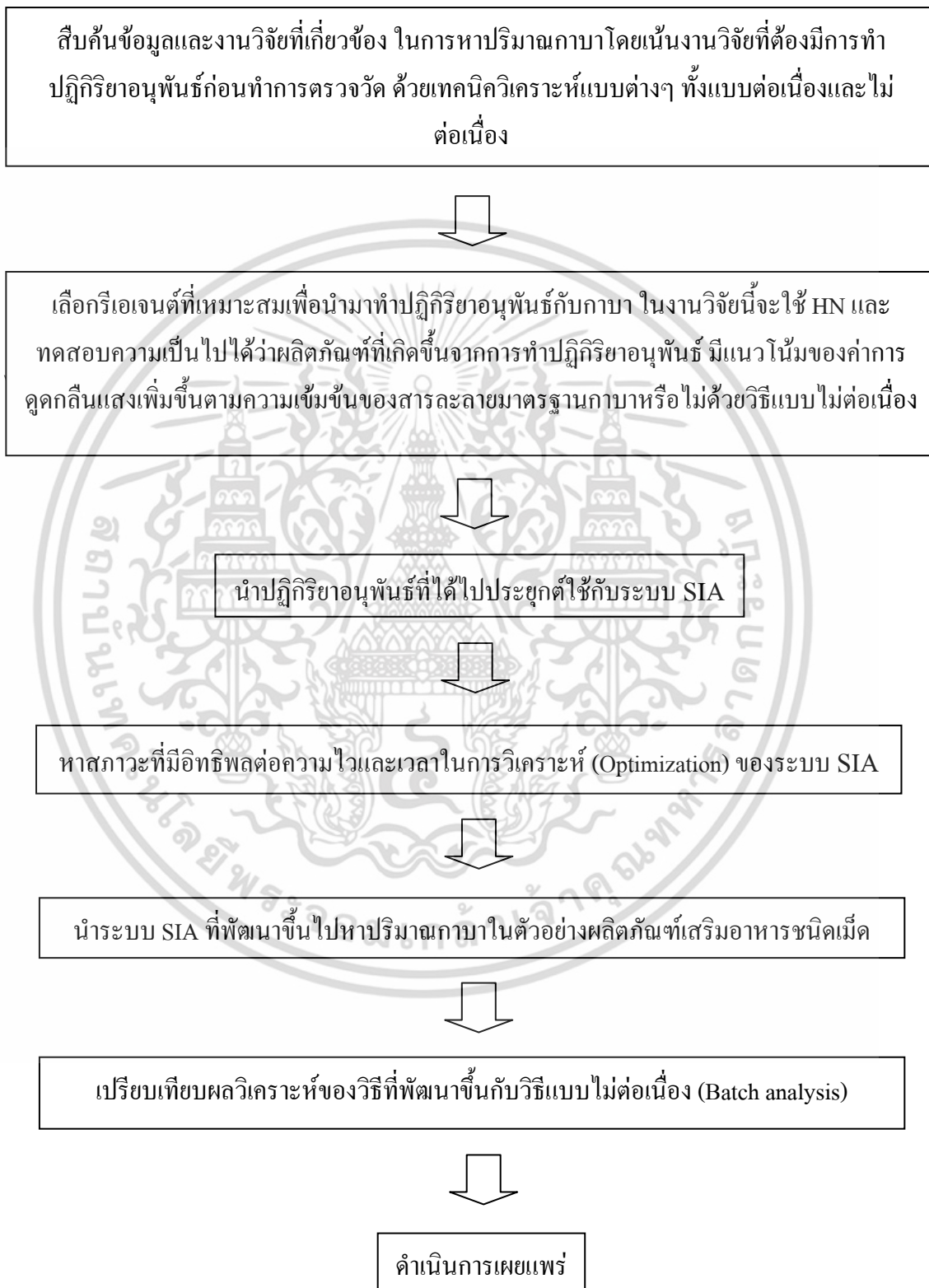
## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาระบบ SIA สำหรับตรวจหาปริมาณกาบาโดยเป็นระบบที่สามารถทำอนุพันธ์ได้อย่างอัตโนมัติและตรวจวัดได้ต่อเนื่อง
2. เพื่อประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีกาบาเป็นองค์ประกอบ
3. เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกาบาแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch analysis)

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

เริ่มจากทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณกาบา โดยเน้นงานวิจัยที่มีการทำอนุพันธ์ก่อนการตรวจวัดด้วยเทคนิควิเคราะห์แบบต่างๆ ทั้งแบบต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง จากนั้นจะเลือกรีเอเจนต์ที่เหมาะสมเพื่อนำมาทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ (2-hydroxynaphthaldehyde, HN) เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถติดตามด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีอยู่โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการ อีกทั้งขั้นตอนในการทำอนุพันธ์ไม่ยุ่งยาก เมื่อเทียบกับการใช้สารอนุพันธ์แบบอื่น ลำดับต่อไปจะได้ศึกษาปฏิกิริยาที่ใช้ทำอนุพันธ์ โดยพิจารณาว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มของค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาบาหรือไม่ โดยจะศึกษาด้วยวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch analysis) ก่อน เมื่อพบว่ามีความเป็นไปได้ จึงจะนำสภาวะที่ได้จากวิธีแบบไม่ต่อเนื่องไปใช้กับระบบ SIA ที่ออกแบบขึ้น แล้วจึงทำการหาสภาวะต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อความไวและเวลาในการวิเคราะห์ (Optimization) โดยสภาวะที่เหมาะสมจะพิจารณาจากสภาวะที่ให้ความไวในการวิเคราะห์สูงและใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นาน เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงนำระบบที่พัฒนาขึ้นไปประเมินหาคุณลักษณะเด่นของระบบ เช่น ความเที่ยง ความแม่นยำ และค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ เป็นต้น จากนั้นนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้หาปริมาณกาบาในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ดและแคปซูล และนำผลลัพธ์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกาบาแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch analysis) เพื่อทดสอบว่าให้ผลวิเคราะห์แตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญหรือไม่โดยใช้วิธีทางสถิติในการเปรียบเทียบ ขั้นตอนสุดท้ายจะนำงานวิจัยไปเผยแพร่ต่อไป จากขอบเขตงานวิจัยดังกล่าวจะสรุปเป็นแผนภาพดังต่อไปนี้



#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ระบบที่สามารถทำปฏิกิริยาอนุพันธ์อย่างอัตโนมัติโดยอาศัยเทคนิค SIA ในการหาปริมาณกาบา
2. ได้วิธีในการหาปริมาณกาบาที่มีความถูกต้อง แม่นยำ
3. สามารถนำระบบ SIA ที่พัฒนาขึ้นไปควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ดและแคปซูลได้

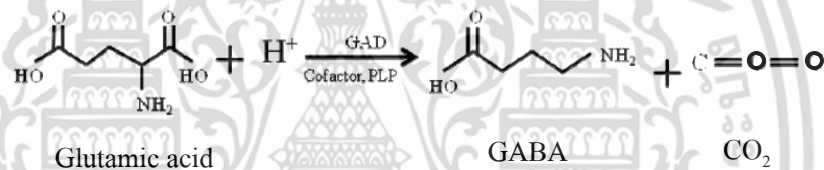


## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ข้อมูลเกี่ยวกับกาบา [10-11]

กาบา (Gamma-aminobutyric acid, GABA) เป็นกรดอะมิโนที่ผลิตจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) ของกรดกลูตามิก (Glutamic acid) และย่อยสลายโดยเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส (Glutamate decarboxylase, GAD) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 กาบามีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (Neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง นอกจากนี้กาบายังทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้น ทำให้สมองเกิดการผ่อนคลาย อีกทั้งยังทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อ (Anterior pituitary) ให้ผลิตฮิวแมน โกรท ฮอร์โมน (Human growth hormone, HGH) ที่ช่วยในการเจริญเติบโตทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อและกล้ามเนื้อ



รูปที่ 2.1 แสดงกลไกการเกิดกาบา (Gamma-aminobutyric acid, GABA) [10]

กาบา (Gamma-aminobutyric acid, GABA) มีสมบัติทางกายภาพ ดังต่อไปนี้

- เป็นผงละเอียด สีขาว
- สูตรโมเลกุล: C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>, มวลโมเลกุล: 103.120 กรัม/โมล
- ความสามารถในการละลายน้ำ: 130 กรัม/100 มิลลิลิตร
- จุดหลอมเหลว: 195 องศาเซลเซียส

##### 2.1.1 ประโยชน์ของกาบา [12-16]

1.ลดความดันโลหิตสูง โดยมีงานวิจัยที่ให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคความดันโลหิตสูงในระดับกลาง ดื่มนมเปรี้ยวที่มีส่วนผสมของกาบาและพบว่าความดันโลหิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายในระยะเวลา 2 - 4 สัปดาห์ และยังคงลดต่อเนื่องนานถึง 12 สัปดาห์ ตลอดระยะเวลาที่ได้มีการดื่มนมดังกล่าวเข้าไป โดยพบว่าค่าความดันโลหิตที่ลดลง สำหรับความดันโลหิตช่วงหัวใจบีบตัว (Systolic BP) มีค่าลดลงเฉลี่ยประมาณ 17.4 ± 4.3 มิลลิเมตรปรอท และความดันโลหิตในช่วงหัวใจคลายตัว (Diastolic BP) มีค่าเฉลี่ยลดลงประมาณ 7.2 ± 5.7 มิลลิเมตรปรอท [12]

2. ยับยั้งการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ [13]

3. ผลต่อการรักษาผู้ป่วยพิษสุราเรื้อรัง [14] พบว่า กาบามีบทบาทในการบำบัดรักษาอาการตับอักเสบซึ่งเป็นผลมาจากโรคพิษสุราเรื้อรังได้ หากได้รับกาบใน ระดับความเข้มข้นสูงๆ

4. ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ โดยป้องกันไม่ให้เปปไทด์ชนิด อะไมลอยด์ เบต้า เปปไทด์ (Amyloid Beta peptide) ทำลายสมอง ซึ่งอาจส่งผลให้สมองทำงานไม่ปกติ เป็นสาเหตุของการสูญเสียความทรงจำ [15]

5. ลดภาวะเครียด ซึมเศร้าและวิตกกังวล เนื่องด้วยกาบ จัดเป็นสารสื่อประสาทประเภท สารยับยั้ง (Inhibitor) โดยจะช่วยควบคุมสมดุลในการทำงานของระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับอารมณ์และความรู้สึก เช่น การลดความเครียด ความกังวล ความเศร้าต่างๆ ได้ จากงานวิจัย [16] พบว่าทดลองนำชอคโกแลต 10 กรัมที่ผสมกาบปริมาณ 28 มิลลิกรัม ให้ผู้ที่ผ่านการเพิ่มความเครียดโดยการทำแบบทดสอบทางคณิตศาสตร์ รับประทาน และตรวจวัดค่า Heart rate variability, HRV และ Salivary chromogranin A, CgA ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราการเต้นของหัวใจของผู้ทดสอบภายในเวลา 45 และ 50 นาทีตามลำดับ พบว่าปริมาณตัวชี้วัดต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ทดลองที่ได้รับชอคโกแลตผสมกาบ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับชอคโกแลตไม่ผสมกาบ การทดลองสนับสนุนว่า ชอคโกแลตผสมกาบช่วยลดภาวะเครียดได้

### 2.1.2 แหล่งอาหารที่พบกาบ

กาบเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่นใน พืช ผัก ผลไม้ เป็นต้น โดยจะพบในปริมาณแตกต่างกันไปดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณกาบที่พบในแหล่งอาหารชนิดต่างๆ [17]

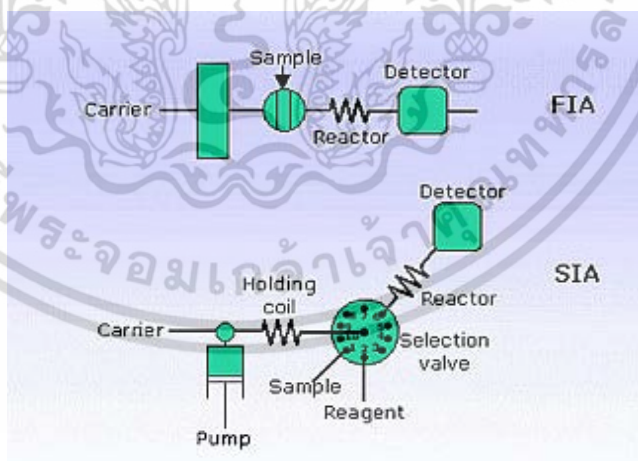
ชนิดของแหล่งอาหาร	ปริมาณกาบที่พบ (mg/100g)
ใบชาแห้ง	100-200
แดงเมลอน	74.5
มะเขือเทศ	62.6
กิมจิ	59.4
ชอคโกแลต	14.5
ข้าวกล้องงอก	10.0
ฟักทอง	9.7
เต้าหู้	6.4

เนื่องด้วยเป็นแหล่งสารอาหารจากธรรมชาตินี้เองจึงมีปริมาณกาบาที่ไม่คงที่และอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการที่จะทำให้เกิดประสิทธิผลตามที่ผู้บริโภคคาดหวัง ดังนั้นจึงมีการเติมกาบาลงในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามปริมาณการได้รับกาบาเพื่อให้มีประสิทธิผล (Effective dose) ในการผ่อนคลายความเครียดอยู่ที่ประมาณ 20-30 มิลลิกรัม [8] แต่ในปัจจุบันยังไม่มีกำหนดร้อยละของปริมาณการได้รับกาบาแต่ละวัน (% Daily Value) อย่างเป็นทางการ ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมบางชนิดจึงมีการเพิ่มกาบาถึง 500 มิลลิกรัมเพื่อให้ได้ประโยชน์อย่างถึงที่สุด

## 2.2 เทคนิคซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส (Sequential Injection Analysis, SIA) [18]

เทคนิคซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิสได้รับการพัฒนาโดย Ruzicka และ Marshall เริ่มต้นจากความต้องการพัฒนาวิธีที่มีความอัตโนมัติมากกว่าเทคนิคฟลูอิดอินเจกชันอะนาไลซิส (Flow injection analysis, FIA) เพื่อให้กระบวนการวิเคราะห์ง่ายขึ้น ลดปริมาณรีเอเจนต์ที่ใช้ สามารถควบคุมการไหลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

หลักการของเทคนิคซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส คือการอาศัยการแพร่ของสารในท่อขนาดเล็กเช่นเดียวกับฟลูอิดอินเจกชันอะนาไลซิส แต่ก็ยังมีส่วนที่แตกต่างดังแสดงในรูปที่ 2.2



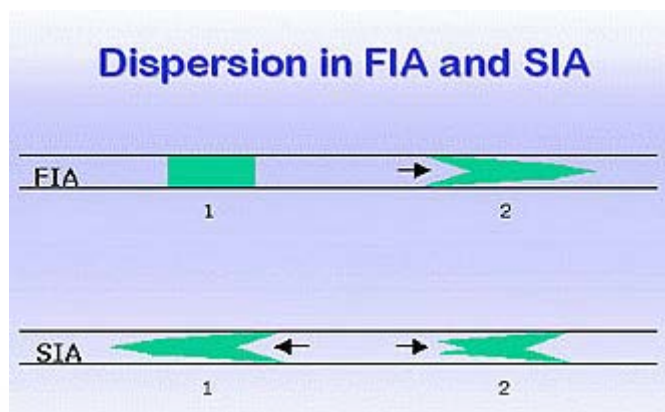
รูปที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบระบบ FIA และ SIA [19]

หลักการการทำงานของโฟลอินเจกชันอะนาไลซิสและซีเวนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสต่างกันดังต่อไปนี้

เมื่อพิจารณาที่ระบบอย่างง่ายของโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส จะเห็นว่าในการวิเคราะห์จะอาศัยการฉีดตัวอย่างลงในตัวพา (Carrier) ในที่นี้ใช้เป็นรีเอเจนต์ โดยที่ปริมาณของตัวอย่างขึ้นอยู่กับขนาดลูปในอินเจกชันวาล์ว หลังจากนั้นก็จะอาศัยตัวพาผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างท่อน โชนของตัวอย่างที่ฉีดกับรีเอเจนต์ไปยังรีเอกชันคอยล์ เข้าสู่เครื่องตรวจวัด (Detector) ทำให้เกิดฟีกของสัญญาณ และนำผลการทดลองที่ได้ไปทำการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของฟีกหรือพื้นที่ใต้ฟีกกับความเข้มข้นต่อไป

ในส่วนของซีเวนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิส จะไม่พบอินเจกชันวาล์วแต่จะใช้มัลติโพซิชันซีเลกชันวาล์วแทน นอกจากนั้นแล้วในส่วนของปั๊ม ก็จะเปลี่ยนจากเพอริสตาลติกปั๊มมาเป็นไซริงค์ปั๊ม และเพิ่มส่วนที่มีการกักเก็บสาร เรียกว่าโฮลดีคคอยล์ และใช้ไซริงค์ปั๊มบรรจุสารละลายตัวพา มัลติโพซิชันซีเลกชันวาล์วจะหมุนไปยังตำแหน่งที่ต่อกับท่อที่จุ่มอยู่ในขวดบรรจุตัวอย่าง เพื่อดูดไปเก็บไว้ที่โฮลดีคคอยล์ตามปริมาตรที่ระบุไว้ในโปรแกรมควบคุม ลำดับถัดมา มัลติโพซิชันซีเลกชันวาล์วจะหมุนไปยังตำแหน่งที่ต่อกับท่อเพื่อดูดสารละลายรีเอเจนต์ไปที่โฮลดีคคอยล์ จากนั้นไซริงค์ปั๊มจะผลักดันสารละลายผ่านรีเอกเตอร์หรือมิกซิงคอยล์ เกิดผลิตภัณฑ์ซึ่งจะถูกลำเลียงผ่านไปยังโฟลเซลล์ในเครื่องตรวจวัด ทำให้เกิดฟีกของสัญญาณ และนำผลการทดลองที่ได้ไปทำการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของฟีกหรือพื้นที่ใต้ฟีกกับความเข้มข้นเช่นเดียวกับโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส

จากขั้นตอนการวิเคราะห์ พบว่าในส่วนของโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส ท่อน โชนของสารละลายจะถูกผลักดันให้เคลื่อนที่ไปตามการเคลื่อนไหวของสารละลายตัวพา เกิดการแพร่ของท่อน โชนตัวอย่าง แต่ในส่วนของซีเวนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิส จะดูดตัวอย่างเข้ามาเก็บไว้ในโฮลดีคคอยล์ก่อน หลังจากนั้นจะทำการผลักดันตัวอย่างจากโฮลดีคคอยล์ในทิศทางกันข้ามเพื่อส่งสารละลายเข้าเครื่องตรวจวัดต่อไป ทำให้พฤติกรรมการแพร่ภายในท่อของทั้งสองเทคนิคเกิดขึ้นแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ส่งผลให้ขนาดของฟีกในระบบซีเวนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสมีลักษณะที่ฟอมกว่าฟีกในระบบโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส นอกจากนั้นแล้วระบบซีเวนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสยังมีการผสมที่เกิดขึ้นภายในท่อระหว่างรีเอเจนต์และตัวอย่างดีกว่าในโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส



รูปที่ 2.3 แสดงการแพร่ของสารละลายภายในท่อของระบบ FIA และ SIA [19]

เมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะของระบบซีควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสและระบบโพลอินเจกชันอะนาไลซิสดังกล่าวข้างต้น จึงขอสรุปข้อดีของระบบซีควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสที่ดีกว่าระบบโพลอินเจกชันอะนาไลซิส คือ

1. ใช้รีเอเจนต์ปริมาณน้อย เช่น ในระบบโพลอินเจกชันอะนาไลซิสใช้รีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตรต่อการตรวจวัดครั้งหนึ่ง ระบบซีควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสจะใช้รีเอเจนต์เพียง 50 ไมโครลิตร หมายถึงว่าหากทำการวิเคราะห์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่ 1 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ได้ 60 ตัวอย่าง จำเป็นต้องใช้รีเอเจนต์ในระบบโพลอินเจกชันอะนาไลซิสถึง 1440 มิลลิลิตร ในทางตรงกันข้ามในระบบซีควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสใช้รีเอเจนต์เพียง 72 มิลลิลิตร

2. ขั้นตอนการทำงานสามารถเปลี่ยนได้ง่ายเพียงแค่เปลี่ยนคำสั่งในโปรแกรมที่ควบคุมการทำงาน

3. ระบบซีควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสสามารถทำกราฟมาตรฐานได้อย่างอัตโนมัติ เนื่องจากมีดีโพลีซีชันซีเลกชันวาล์วสามารถหมุนเลือกตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานได้ในแต่ละพอร์ตที่กำหนด

4. ระบบซีควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสมีความกะทัดรัดสามารถนำไปทำการวิเคราะห์นอกสถานที่หรือวิเคราะห์ ณ ตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่างได้

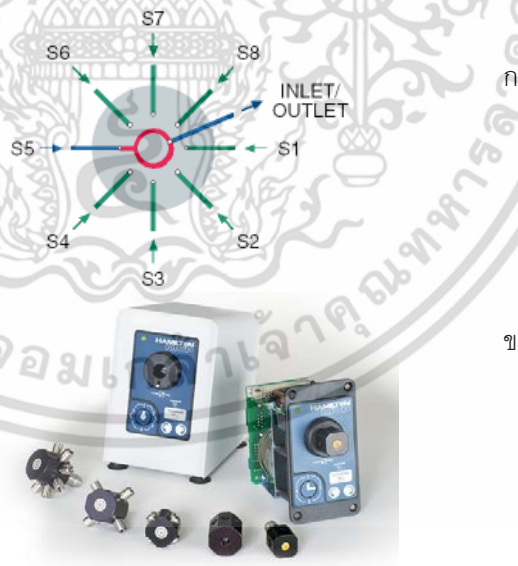
องค์ประกอบของระบบซีเควนเซียลอินเจคชันอะนาไลซิสมีดังต่อไปนี้

1. ไชริงค์ปั๊ม (Syringe pump) ใช้เพื่อดูดหรือขับเคลื่อนฟอนโซนและสารละลายไปยังเครื่องตรวจวัด



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของ syringe pump [20]

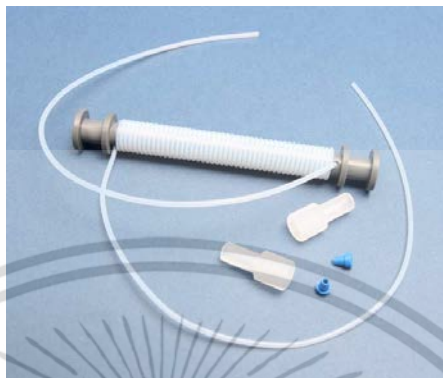
2. ระบบฉีด (Injection system) ในระบบซีเควนเซียลอินเจคชันอะนาไลซิสใช้มัลติโพซิชั่นซีเลกชันวาล์ว มีด้วยกันหลายแบบตามจำนวนของพอร์ต เช่น 4-พอร์ตมัลติโพซิชั่นซีเลกชันวาล์ว, 6-พอร์ตมัลติโพซิชั่นซีเลกชันวาล์ว, 8-พอร์ตมัลติโพซิชั่นซีเลกชันวาล์ว เป็นต้น ซึ่งจะมีช่องตรงกลางทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างปั๊มกับพอร์ตรอบข้างซึ่งต่อเข้ากับท่อที่ใช้ดูดสารละลายแต่ละชนิดที่ต้องใช้ดังรูป 2.5



รูปที่ 2.5 แสดง ก. ภายในลักษณะของ 8- port-multi-position selection valve;

ข. ลักษณะภายนอกของ 8- port-multi-position selection valve [20]

3. ระบบการผสม (Mixing system) ระบบจะประกอบด้วย โฮลดิ้งคอยล์ (Holding coil) และ มิกซิงคอยล์ (Mixing coil) โดยใช้ท่อชนิดเป็นลักษณะต่างๆ เพื่อช่วยให้เกิดการผสมของสารภายในท่อได้ดีขึ้น ดังแสดงในรูป 2.6



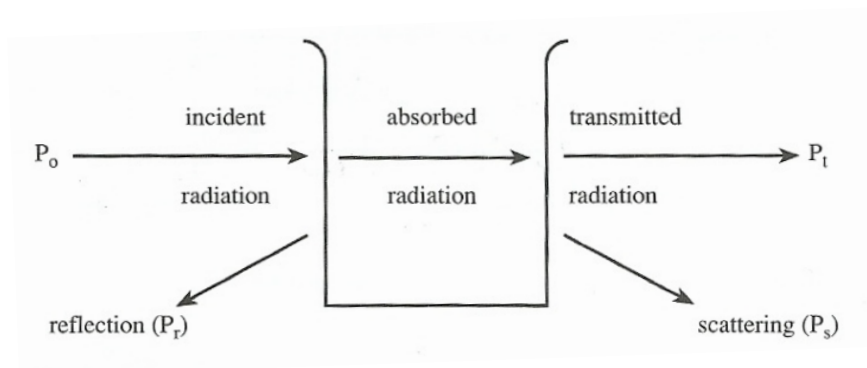
รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของ mixing system [21]

4. ระบบตรวจวัด (Detection system) จะใช้ โฟลทรูเซลล์ (Flow through cell) เป็นภาชนะที่ให้สารละลายไหลผ่าน โดยจะวางโฟลทรูเซลล์ในเครื่องตรวจวัดที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาที่เลือกใช้ในการตรวจวัด

### 2.3 อัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-VIS Spectroscopy) [22]

สารที่ดูดกลืนแสงช่วงอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล (190-800 นาโนเมตร (nm)) ส่วนใหญ่ได้แก่พวกสารอินทรีย์ (Organic compound) หรือสารประกอบเชิงซ้อน (Complex compound) หรือสารอนินทรีย์ (Inorganic compound) ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สมบัติของสารดังกล่าวได้รับการพัฒนามาใช้เป็นหลักการของวิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณอย่างกว้างขวาง วิธีนี้ให้ความเที่ยงและแม่นยำ อีกทั้งมีสภาพไว (Sensitivity) สูง โดยอาจทำการวิเคราะห์ในรูปของธาตุหรือโมเลกุลก็ได้

หลักการโดยสรุปของเทคนิคนี้คือ เมื่อให้ลำแสงที่เคลื่อนที่อย่างต่อเนื่อง (Continuous beam of radiation) ผ่านเข้าไปในวัตถุใสจะพบว่าแสงบางส่วนถูกดูดกลืน บางส่วนจะสะท้อน บางส่วนกระเจิง และบางส่วนผ่านทะลุออกไป ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ถ้าให้แสงที่ทะลุออกไปนั้นผ่านเข้าเครื่องกระจายแสง (เช่น ปริซึม หรือเกรตติง) จะเห็นว่าสเปกตรัมหายไปส่วนหนึ่ง ส่วนที่หายไปนี้เรียกว่า Absorption spectrum พลังงานที่ถูกดูดกลืนไปนั้นจะทำให้โมเลกุลหรืออะตอมเปลี่ยนระดับของพลังงานจากสถานะพื้น (Ground state) ไปยังสถานะกระตุ้น (Excited state) คือการดูดกลืนแสงนั่นเอง ดังแสดงในรูปที่ 2.8



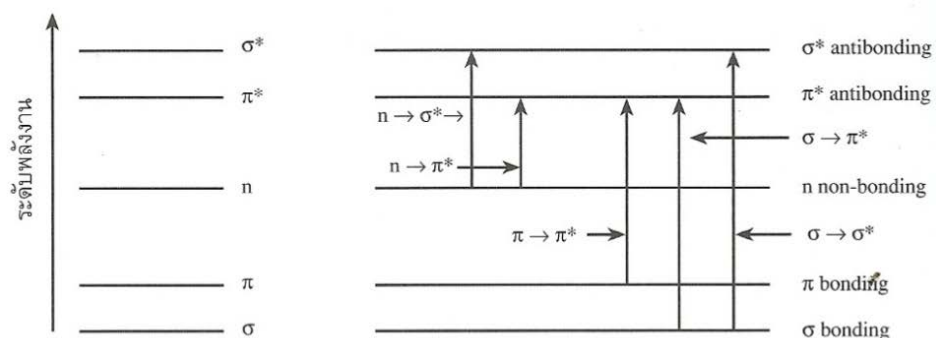
รูปที่ 2.7 แสดงการเกิดอันตรกิริยาของสารเคมีกับการแผ่รังสีหรือแสงตกกระทบ [22]



รูปที่ 2.8 แสดงกระบวนการเปลี่ยนระดับพลังงานของโมเลกุลหรืออะตอมเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงทำให้เกิดการดูดกลืนแสง [22]

### 2.3.1 สาเหตุของการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี – วิสิเบิล (UV-VIS Absorption)

เมื่อแสงที่อยู่ในช่วงยูวี-วิสิเบิล ผ่านเข้าไปในโมเลกุลของสาร สารนั้นจะดูดกลืนเฉพาะบางช่วงทำให้เกิดมีการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอน (Electronic transition) ซึ่งโดยมากจะใช้พลังงานประมาณ 30-150 กิโลแคลลอรี่/โมล และอิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้องคืออิเล็กตรอนที่อยู่ในวงนอกสุดหรืออิเล็กตรอนที่เกิดพันธะแล้วหรืออิเล็กตรอนที่ยังไม่เกิดพันธะ (Non-bonding electrons) ซึ่งแต่ละชนิดจะใช้พลังงานแตกต่างกัน อิเล็กตรอนที่ได้รับพลังงานสูงขึ้นนี้จะขึ้นไปอยู่ที่ Antibonding orbitals ดังแสดงในรูปที่ 2.9



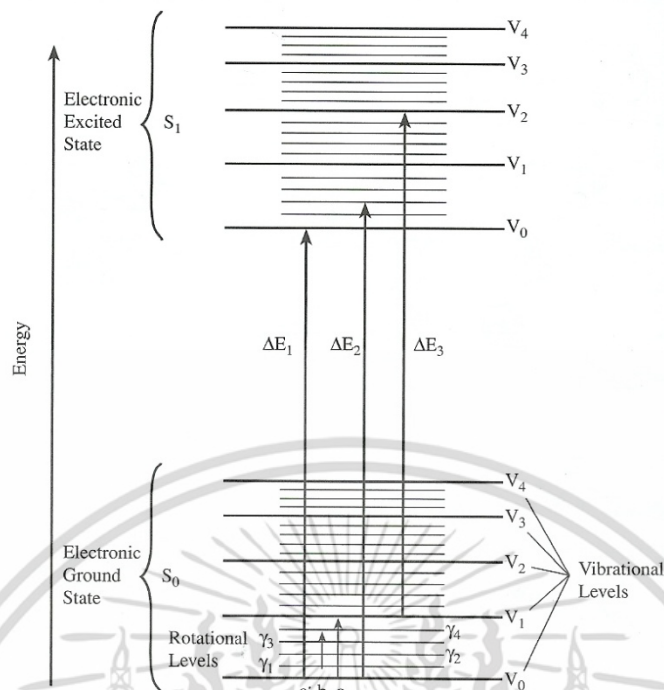
รูปที่ 2.9 แสดง Electronic energy levels และ transition [22]

การดูดกลืนแสงของโมเลกุลของสารนั้นมักจะเกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่นที่กว้าง และยุ่งยากกว่าการดูดกลืนแสงของอะตอมของธาตุ เนื่องจากอะตอมไม่มีการสั่นและหมุนของแต่ละระดับพลังงาน แต่ของโมเลกุลจะมีระดับพลังงานเหล่านี้ด้วย ดังนั้นจึงเขียนพลังงานทั้งหมดในการดูดกลืนแสงของโมเลกุลได้ดังสมการด้านล่างต่อไปนี้

$$E_{\text{total}} = E_{\text{el}} + E_{\text{rot}} + E_{\text{vib}}$$

$E_{\text{el}}$  = ระดับพลังงานอิเล็กตรอนิกซ์ของโมเลกุล  
 $E_{\text{rot}}$  = ระดับพลังงานการหมุนของโมเลกุล  
 $E_{\text{vib}}$  = ระดับพลังงานการสั่นของโมเลกุล

ระดับพลังงานอิเล็กตรอนิกซ์ของโมเลกุลจะมีค่ามากกว่าระดับพลังงานการหมุนของโมเลกุลและระดับพลังงานการสั่นของโมเลกุล เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานอิเล็กตรอนิกซ์ของโมเลกุลจึงมักจะมีการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานการหมุนของโมเลกุลและระดับพลังงานการสั่นของโมเลกุลควบคู่ไปด้วยเสมอ แต่เนื่องจากระดับพลังงานเหล่านี้ที่อยู่ใกล้กันมาก ทำให้ Absorption spectra แยกไม่ออก จึงมีลักษณะเป็นแถบ แตกต่างกับ Atomic absorption spectra ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้น แผนผังการเกิดทรานซิชันของโมเลกุลขณะเกิดการดูดกลืนแสง แสดงดังรูป 2.10



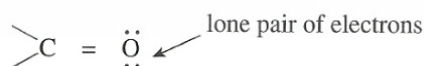
**รูปที่ 2.10** แสดงการเกิดทรานซิชันของโมเลกุล a เกิด electronic transitions, b และ c เกิด rotation และ vibrational transitions [22]

สารอินทรีย์ใดที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ไม่อิ่มตัว (Unsaturated functional group) สามารถดูดกลืนแสงในช่วง ยูวี-วิสิเบิลได้ จะเรียกหมู่เหล่านี้ว่า โครโมฟอร์ (Chromophore) มีด้วยกัน 3 แบบ คือ

1. โครโมฟอร์ที่มี multi bond ระหว่าง 2 อะตอมของธาตุ โดยที่ไม่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว เช่น สารประกอบที่มีหมู่



2. โครโมฟอร์ที่มี Multi bond ระหว่าง 2 อะตอมของธาตุโดยที่อะตอมของธาตุหนึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว เช่น สารประกอบที่มีหมู่



3. โครโมฟอร์ที่มีวงเบนซีน ได้แก่ สารประกอบพวกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งจะให้อbsorption spectrum ถึง 3 bands อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงพลังงานจาก  $\pi \rightarrow \pi^*$  เช่น เบนซีน เป็น Cyclic conjugate polynene จะให้ Strong absorption peak ที่ความยาวคลื่น 184 นาโนเมตร ( $E_{\max} = 60000$ ) และให้ Weak band ซึ่งเรียกว่า E2 band ที่ 204 นาโนเมตร ( $E_{\max} = 7900$ ) และให้ weaker band ซึ่งเรียกว่า B band ที่ 256 นาโนเมตร ( $E_{\max} = 200$ ) ตัวอย่างการดูดกลืนแสงของโครโม

ฟอร์ต่างๆ การดูดกลืนแสงของโครโมฟอร์บางชนิดที่พบเห็นเสมอๆ และมัดติโครโมฟอร์ต่อการดูดกลืนแสง ดังแสดงในตารางที่ 2.2-2.5 และหากโครโมฟอร์เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Absorption spectrum ไปทางความยาวคลื่นเพิ่มขึ้นมักเป็นผลของหมู่บางชนิดเข้าไปแทนที่ไฮโดรเจนในวงเบนซีน ซึ่งเรียกว่า ออกโซโครม (Auxochrome)

**ออกโซโครม (Auxochrome)** เป็นกลุ่มธาตุที่ไม่ดูดกลืนแสง หรือถ้าดูดกลืนได้ก็เป็นแต่เพียงเล็กน้อยในช่วงยูวี หรือวิสิเบิล แต่สามารถมีผลต่อ Absorption spectrum ของโครโมฟอร์ที่ออกโซโครมไปเกาะอยู่เปลี่ยนไป โดยอาจทำให้ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้นหรือลดลงดังปรากฏการณ์ต่อไปนี้

1. เกิด Bathochromic shift (Red shift) จะทำให้ Absorption spectrum เปลี่ยนไปในทางความยาวคลื่นมากขึ้น ( $\lambda_{\max}$  เพิ่ม)
2. เกิด Hypsochromic shift (Blue shift) ทำให้ Absorption spectrum เปลี่ยนไปในทางความยาวคลื่นลดลง ( $\lambda_{\max}$  ลดลง)
3. เกิด Hyperchromic effect ทำให้เกิดการเพิ่ม Intensity หรือ การดูดกลืนแสงมากขึ้น ( $\epsilon_{\max}$  เพิ่ม)
4. เกิด Hypochromic effect ทำให้เกิดการลด Intensity หรือ การดูดกลืนแสงลดลง ( $\epsilon_{\max}$  ลด)

ออกโซโครมที่มีผลกระทบต่อโครโมฟอร์ ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับโพลาริตี (Polarity) ของออกโซโครม เช่น หมู่เมทิล ( $-\text{CH}_3$ ) เอทิล ( $-\text{C}_2\text{H}_5$ ) และฮาโลเจน ( $-\text{X}$ ) มีผลต่อการดูดกลืนแสงของโครโมฟอร์เล็กน้อยโดยทำให้เกิด Red shift เพียง 5-10 นาโนเมตร แต่ถ้าเป็นหมู่ของ  $-\text{NH}_2$  หรือ  $-\text{NO}_2$  ซึ่งมีโพลาริตีมาก จะมีผลต่อการดูดกลืนแสงของโครโมฟอร์มาก

ตารางที่ 2.2 แสดงการดูดกลืนแสงของโครโมฟอร์ต่างๆ [22]

Chromophore	System	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max}$	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max}$	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\max}$
Ether	-O-	185	1000				
Thioether	-S-	194	4600	215	1600		
Amine	-NH <sub>2</sub>	195	2800				
Thiol	-SH	195	1400				
Disulfide	-S-S-	194	5500	255	400		
Bromide	-Br	208	300				
Iodide	-I	260	400				
Nitrile	-C≡N	160	-				
Acetylide	-C≡C-	175-180	6000				
Sulfone	-SO <sub>2</sub> -	180	-				
Oxime	-NOH	190	5000				
Azido	>C=N-	190	5000				
Ethylene	-C=C-	190	8000				
Ketone	>C=O	195	1000	270-285	18-30		
Thioketone	>C=S	205	strong				
Esters	-COOR	205	50				
Aldehyde	-CHO	210	strong	280-300	11-18		
Carboxyl	-COOH	200-210	50-70				
Sulfoxide	>S→O	210	1500				
Nitro	-NO <sub>2</sub>	210	strong				
Nitrite	-ONO	220-230	1000-2000	300-400	10		
Azo	-N=N-	285-400	3-25				
Nitroso	-N=O	302	100				
Nitrate	-ONO <sub>2</sub>	270	12				
	(shoulder)						
	-(C=C) <sub>2</sub> - (acyclic)	210-230	21,000				
	-(C=C) <sub>3</sub> -	260	35,000				
	-(C=C) <sub>4</sub> -	300	52,000				
	-(C=C) <sub>5</sub> -	330	118,000				
	-(C=C) <sub>2</sub> - (alicyclic)	230-260	3000-8000				
	C=C-C=C	219	6,500				
	C=C-C=N	220	23,000				
	C=C-C=O	210-250	10,000-20,000			300-350	weak
	C=C-NO <sub>2</sub>	229	9,500				
Benzene		184	46,700	202	6,900	255	170
Diphenyl				246	20,000		
Naphthalene		220	112,000	275	5,600	312	175
Anthracene		252	199,000	375	7,900		
Pyridine		174	80,000	195	6,000	251	1,700
Quinoline		227	37,000	270	3,600	314	2,750
Isoquinoline		218	80,000	266	4,000	317	3,500

ตารางที่ 2.3 แสดงการดูดกลืนแสงของโครโมฟอร์บางชนิดที่พบเห็นเสมอๆ [22]

Chromophore	Example	Solvent	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$	Type of transitions
Alkene	$C_6H_{13}CH=CH_2$	n-Heptane	177	13,000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Alkyne	$C_5H_{11}C\equiv C-CH_3$	n-Heptane	178	10,000	$\pi \rightarrow \pi^*$
			196	2000	-
			225	160	-
Carbonyl	$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_3CCH_3 \end{array}$	n-Hexane	186	1000	$n \rightarrow \sigma^*$
			280	16	$\pi \rightarrow \pi^*$
	$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_3CH \end{array}$	n-Hexane	180	large	$n \rightarrow \sigma^*$
			293	12	$n \rightarrow \pi^*$
Carboxyl	$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_3COH \end{array}$	Ethanol	204	41	$n \rightarrow \pi^*$
Amido	$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_3CNH_2 \end{array}$	Water	214	60	$n \rightarrow \pi^*$
Azo	$CH_3N=NCH_3$	Ethanol	339	5	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro	$CH_3NO_2$	Isooctane	280	22	$n \rightarrow \pi^*$
Nitroso	$C_4H_9NO$	Ethyl ether	300	100	-
			665	20	$n \rightarrow \pi^*$
Nitrate	$C_2H_5ONO_2$	Dioxane	270	12	$n \rightarrow \pi^*$

ตารางที่ 2.4 แสดงผลของมัลติโครโมฟอร์ต่อการดูดกลืนแสง [22]

Compound	Type	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$
$CH_3CH_2CH_2CH=CH_2$	Olefin	184	~10,000
$CH_2=CHCH_2CH_2CH=CH_2$	Diolefin (unconjugated)	185	~20,000
$H_2C=CHCH=CH_2$	Diolefin (conjugated)	217	21,000
$H_2C=CHCH=CHCH=CH_2$	Triolefin (conjugated)	250	-
$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_3CH_2CH_2CH_2CCH_3 \end{array}$	Ketone	282	27
$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_2=CHCH_2CH_2CCH_3 \end{array}$	Unsaturated ketone (unconjugated)	278	30
$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_2=CHCCH_3 \end{array}$	Unsaturated ketone (conjugated)	324	24
		219	3600

ตารางที่ 2.5 แสดงการดูดกลืนแสงซึ่งมีลักษณะเฉพาะของสารประกอบอะโรมาติก และผลของออกโซโครมต่อเบนซีนโครโมฟอร์ [19]

Compound		E <sub>2</sub> Band		B Band	
		$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$
Benzene	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	204	7900	256	200
Toluene	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	207	7000	261	300
m-Xylene	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	263	300
Chlorobenzene	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl	210	7600	265	240
Phenol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	211	6200	270	1450
Phenolate ion	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sup>-</sup>	235	9400	287	2600
Aniline	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	230	8600	280	1430
Anilinium ion	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	203	7500	254	160
Thiophenol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SH	236	10,000	269	700
Naphthalene	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	286	9300	312	289
Styrene	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=CH <sub>2</sub>	244	12,000	282	450

### 2.3.2 กฎของเบียร์ (Beer's Law) [22]

เบียร์ได้ศึกษากระบวนการดูดกลืนแสง พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย ว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น ดังสมการต่อไปนี้

$$A = abc$$

โดยที่

A = ค่าการดูดกลืนแสง

a = แอปซอร์ปติวิตี (ลิตรต่อกรัม.เซนติเมตร)

b = ความกว้างของเซลล์ (เซนติเมตร)

c = ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)

และเมื่อสารละลายที่ศึกษามีความเข้มข้นในหน่วยโมลต่อลิตร สามารถหาค่าการดูดกลืนแสงจากสมการต่อไปนี้

$$A = \epsilon bc$$

โดยที่

A = ค่าการดูดกลืนแสง

$\epsilon$  = โมลาร์แอปซอร์ปติวิตี (ลิตรต่อโมล.เซนติเมตร)

b = ความกว้างของเซลล์ (เซนติเมตร)

c = ความเข้มข้น (โมลต่อลิตร)

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นได้กราฟเป็นเส้นตรงเรียกว่า กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ซึ่งสามารถนำไปใช้คำนวณเพื่อหาความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารตัวอย่างได้

### 2.2.3 ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer)

#### 1. แหล่งกำเนิดแสง

สำหรับเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์นั้น ต้นกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นหลอดไฮโดรเจน (Hydrogen lamp) หรือหลอดดีวเทอเรียม (Deuterium lamp) ให้แสงอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 185-375 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากการคายพลังงานของไฮโดรเจน หรือดีวเทอเรียมอะตอมที่อยู่ในสถานะกระตุ้น ส่วนหลอดทังสเตน (Tungsten filament lamp) ประกอบด้วยหลอดทังสเตนอยู่ในหลอดสุญญากาศซึ่งให้รังสีที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ช่วงยูวี จนถึงช่วงอินฟราเรด

#### 2. โมโนโครมาเตอร์

เป็นส่วนสำคัญในการกำหนดคุณภาพของสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำหน้าที่แยกลำรังสีที่มีความยาวคลื่นต่อเนื่องออกเป็นรังสีความยาวคลื่นเดียว ในช่วงแสงที่เห็นได้อาจใช้ปริซึมแก้ว ส่วนในช่วงยูวีจำเป็นต้องใช้ปริซึมที่ทำด้วยควอตซ์สำหรับสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีราคาแพง มักใช้โมโนโครมาเตอร์แบบ Diffraction grating ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่มีร่องเป็นจำนวนมากและความกว้างของร่องใกล้เคียงกับความยาวคลื่นของรังสี

#### 3. เซลล์บรรจุตัวอย่าง (Cuvette)

เซลล์บรรจุสารตัวอย่าง บางครั้งเรียกว่า คิวเวทท์ (Cuvettes) มีด้วยกันหลายแบบ เช่น เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดาจะใช้ได้เฉพาะในช่วงวิสิเบิลไม่สามารถใช้ในช่วงยูวีได้ เนื่องจากเนื้อแก้วธรรมดาดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้ เซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา (Silica) และ ควอร์ตซ์ (Quartz) ใช้ได้ทั้งในช่วงยูวีและวิสิเบิล

4. เครื่องตรวจจับ (Detector) เป็นอุปกรณ์สำหรับตรวจจับแสงที่ผ่านสารตัวอย่างออกมา มีหลายชนิด ได้แก่

4.1 Photomultiplier tube เป็นเครื่องตรวจจับที่ไวต่อแสงทั้งในช่วงยูวีและวิสิเบิล โดยสามารถตรวจจับได้อย่างรวดเร็ว และตรวจจับสารที่มีปริมาณต่ำๆ ได้ดี ในช่วงความยาวคลื่น 190-900 นาโนเมตร

4.2 Photodiode array detector เป็นเครื่องตรวจจับที่สามารถตรวจจับในทุกความยาวคลื่นของแสงได้ในเวลาเดียวกัน และตรวจจับได้ตั้งแต่ช่วง 190-1100 นาโนเมตร

## 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.4.1 การทำอนุพันธ์ด้วยวิธีไม่ต่อเนื่อง (Batch derivatization)

M. J. Lu และคณะ [23] ได้ตรวจวัดกาบารวมถึงกรดอะมิโนอื่นๆ ได้แก่ ไกลซีน, กลูตามีน และกลูตาเมท โดยอาศัยเทคนิคแคพิลลารีอเล็กโตรโฟรีซิส ร่วมกับการตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วย Light-emitting diode-induced fluorometer ซึ่งทำโดยนำตัวอย่างของเหลวจากระบบประสาทส่วนกลาง (Cerebrospinal fluid; CSF) มาทำอนุพันธ์กับ Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) ก่อนจะผ่านกระบวนการแยกด้วยวิธีแคพิลลารีอเล็กโตรโฟรีซิส โดยภายในแคพิลลารีคอลัมน์ บรรจุ Poly (ethylene oxide) รั้อยละ 0.6 ที่เตรียมใน 10 มิลลิโวลต์ของเตตระโบเรต (พีเอช 9.3) พบว่าได้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) อยู่ในระดับ 10-30 นาโนโวลต์ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวข้างต้นยังคงไม่เหมาะหากต้องการตรวจวัดตัวอย่างที่มีปริมาณมากๆ เนื่องจากข้อจำกัดในการทำอนุพันธ์ที่ยังคงเป็นระบบที่ไม่อัตโนมัติ

Y. Song และคณะ [2] ได้พัฒนาวิธีในการหาปริมาณกาบารวมในตัวอย่างทางชีวภาพโดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (LC) ร่วมกับวิธีแมสสเปคโตรเมตรี (MS) ซึ่งทำโดยนำตัวอย่างพลาสมาและของเหลวจากระบบประสาทส่วนกลางของมนุษย์ มาทำการวิเคราะห์ด้วยแคพิลลารีลิควิดโครมาโทกราฟี (Capillary liquid chromatography) ตรวจวัดด้วยแมสสเปคโตรเมตรี (MS/MS) โดยมีการติดฉลากสารที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยดิวทีเรียม (Deuterium-labeled) แล้วจึงนำมาทำอนุพันธ์กับ 7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazole (NBD-F) จากนั้นจึงทำการเพิ่มความเข้มข้นให้สารที่ต้องการตรวจวัดแบบ In-line preconcentration ด้วยการสกัดโดยใช้คอลัมน์ซันนิตรีเวิร์สเฟส ( $C_{18}$ ) ขนาด 10 มิลลิเมตร x 0.25 มิลลิเมตร ที่มีอนุภาคขนาด 7 ไมโครเมตร สารที่สกัดได้จะถูกแยกองค์ประกอบในคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์ (Analytical column) ขนาด 50 มิลลิเมตร x 0.25 มิลลิเมตร ภายในบรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร ในส่วนของ MS กำหนดการตรวจวัดที่  $m/z$  267  $\rightarrow$  249 สำหรับ nitrobenzoxadiazole- $\gamma$ -aminobutyric acid (NBD-GABA) และ  $m/z$  269  $\rightarrow$  251 สำหรับ NBD-GABA- $d_2$  พบว่า ได้ความเป็นเส้นตรงในช่วง 10-250 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ได้ค่า  $r^2$  เท่ากับ 0.9994 สำหรับในพลาสมาและในของเหลวจากระบบประสาทส่วนกลาง พบปริมาณกาบารวมเท่ากับ  $44.3 \pm 10.0$  นาโนกรัม/มิลลิลิตร ( $n=6$ ) และ  $98.6 \pm 33.9$  นาโนกรัม/มิลลิลิตร ( $n=12$ ) ตามลำดับ ซึ่งวิธีดังกล่าวข้างต้นให้ผลการวิเคราะห์ในระดับความเข้มข้นต่ำ (ppb) และมีความไวในการวิเคราะห์ดี แต่อย่างไรก็ตาม เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ประมาณ 10 นาทีต่อ 1 การวิเคราะห์ ซึ่งค่อนข้างนาน รวมถึงขั้นตอนการทำอนุพันธ์ที่มีหลายขั้นตอนและยังคงไม่เป็นอัตโนมัติจึงไม่สะดวกเท่าใดนัก

ปนัดดา จันทรน้อยและคณะ [24] ได้ศึกษาหาปริมาณกาบาในใบและเมล็ดข้าวที่กำลังออก และเมล็ดข้าวที่ผ่านการขัดสีแล้ว โดยตัวอย่างจะถูกนำมาทำอนุพันธ์กับ 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS และพบว่าปริมาณกาบาจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการงอกทั้งในเมล็ดและในใบข้าว นอกจากนี้ยังพบอีกว่าปริมาณกาบาในใบข้าวมีมากกว่าในเมล็ดข้าวถึง 2 หรือ 3 เท่า และในส่วนของเมล็ดข้าวนั้น จะพบว่าปริมาณกาบาจะมากที่สุดในช่วง 20-30 วันหลังจากเริ่มงอก และจะค่อยๆลดลงหลังจากวันที่ 20 เป็นต้นไป ปริมาณกาบาที่พบในเมล็ดข้าวสายพันธุ์ต่างๆ เป็นดังนี้ 0.19-1.25 มิลลิกรัม/กรัมในพันธุ์พิษณุโลก 2 (PL2), 0.30-2.01 มิลลิกรัม/กรัมในพันธุ์ชัชวาท 1 (CN1), 0.51-2.45 มิลลิกรัม/กรัมในข้าวดอกมะลิพันธุ์ 105 (KDML 105), 0.34-1.74 มิลลิกรัม/กรัมในพันธุ์สุพรรณ 1 (SP1) และ 0.39-1.59 มิลลิกรัม/กรัมในพันธุ์ปทุม 1 (PT1) แต่ในทางกลับกันพบว่ากาบาในใบข้าวมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นหลังจาก 30 วันเป็นต้นไป ซึ่งพบปริมาณดังต่อไปนี้ 1.45-3.14 มิลลิกรัม/กรัมในข้าวพันธุ์พิษณุโลก, 1.36-2.85 มิลลิกรัม/กรัมในข้าวพันธุ์ชัชวาท 1, 2.39-2.52 มิลลิกรัม/กรัมในข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105, 0.82-2.09 มิลลิกรัม/กรัมในข้าวพันธุ์สุพรรณ 1, และ 1.33-1.50 มิลลิกรัม/กรัมในข้าวพันธุ์ปทุม 1 ข้อมูลที่ได้นำไปใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านการบริโภคและด้านเภสัชศาสตร์ อนึ่งพบว่าการทำอนุพันธ์ยังไม่เป็นอัตโนมัติ และเครื่องมือในการตรวจวัดไม่มีในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป อาจเป็นข้อจำกัดหากมีผู้ต้องการนำวิธีจากการทดลองดังกล่าวไปใช้

L. Y. Zhang และคณะ [3] ได้ทำการตรวจวัดหาปริมาณ กาบา กลูตาเมท และ อะลานีน โดยอาศัยเทคนิค LC แล้วตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งทำโดยการนำตัวอย่างของเหลวซึ่งผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างจากใบยาสูบมาทำอนุพันธ์กับ Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) แล้วทำการแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟี ซึ่งใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 8.7 ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 24 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมโอดีซิลซัลเฟต 26 มิลลิโมลาร์ เพื่อทำให้เกิดการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากกรดอะมิโนตัวอื่นๆ พบว่ามีปริมาณกาบา กลูตาเมท และ อะลานีนเท่ากับ  $4.0 \times 10^{-8}$ ,  $1.1 \times 10^{-8}$  และ  $1.3 \times 10^{-8}$  โมลาร์ตามลำดับ และนำผลเหล่านี้ไปประกอบการรักษาผู้ป่วยที่มีอาการเครียด เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารดังกล่าวเพื่อการวินิจฉัยและหาแนวทางในการรักษาต่อไป พบว่าการทำอนุพันธ์ตามวิธีต้องใช้เวลา 30 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง

S. Zhang และคณะ [25] ได้ทำการพัฒนาวิธีในการตรวจหาปริมาณกาบาและกลูตาเมทที่มีความไวในการตรวจวัดสูง ซึ่งทำโดยการใช้ ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) เริ่มด้วยการนำของเหลวจากสมองหนูมาทำอนุพันธ์กับ o-phthalaldehyde (OPA) สภาวะแยกใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่คงที่ (Isocratic elution) ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคแอมเพอโรเมทรีซึ่งมีความไวสูง ส่งผลให้สามารถหาปริมาณกาบาได้ต่ำถึง

0.03 พิโคโมล และหาปริมาณกลูตามेट ได้ต่ำถึง 0.8 พิโคโมล แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างประมาณ 30 นาที

H. L. Rowley และคณะ [4] ได้พัฒนาวิธีในการหาปริมาณกรดอะมิโนต่างๆ ที่ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทของระบบประสาทส่วนกลางในน้ำจากกระดูกไขสันหลังของหนูทดลอง โดยทำอนุพันธ์กับ OPA ที่อุณหภูมิห้อง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีความเสถียรอย่างน้อย 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแยกด้วยลิกนินโครมาโทกราฟีโดยอาศัยเฟสเคลื่อนที่มีอัตราส่วนคงที่ (Isocratic elution) ผลการทดลองพบว่า ในตัวอย่างประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ชนิด แยกออกมาตามลำดับดังนี้ ไซีรีน, โกลซีน, ทิวรีน, กลูตามेट, อะกรีนิน, อะลานีน และ กาบา ซึ่งเวลาในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างนาน 25 นาที

I. M. Perl และคณะ [26] ได้ศึกษาความเสถียรของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำอนุพันธ์ระหว่างกรดอะมิโนกับ o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine (OPA/NAC) และกับ o-phthalaldehyde/ 3-mercaptopropionic acid (OPA/MPA) ทำโดยการนำตัวอย่างที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 24 ชนิด ทำอนุพันธ์กับสารละลาย OPA/MPA และ OPA/NAC เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสม ก่อนจะนำสารอนุพันธ์ที่ได้จากรีเอเจนต์ทั้งสองไปแยกด้วยเทคนิค LC แล้วตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์และการดูดกลืนแสง พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำอนุพันธ์ของตัวอย่างกับ OPA/MPA มีความเสถียรและมีประสิทธิภาพในการแยกดีกว่า OPA/NAC แต่อย่างไรก็ดีพบว่าวิธีการทำอนุพันธ์ทั้งสองแบบยังคงใช้เวลาในการทำอนุพันธ์ค่อนข้างนาน

J. Kehr [5] ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณกาบาจากของเหลวในสมองของมนุษย์ โดยใช้ LC ร่วมกับการตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ และมีการใช้ระบบฉีดตัวอย่างอย่างอัตโนมัติ (Autosampler) เพื่อทำการหาปริมาณของกาบาในตัวอย่างที่น้อยกว่า 1.5 นาโนโมลาร์ โดยนำตัวอย่างมาทำอนุพันธ์กับ Phthalaldehyde-2-mercaptoethanol ก่อนที่ผลิตภัณฑ์จะถูกแยกโดยคอลัมน์  $C_{18}$  ที่มีความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตรภายในบรรจุเม็ดซิลิกาขนาด 30 ไมโครเมตร สำหรับสภาวะในการแยกองค์ประกอบของตัวอย่างใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นโซเดียมอะซิเตตผสมกับอะซิโตน ไตรลออัตราส่วน 4 ต่อ 1 มีพีเอชประมาณ 5.4 และใช้อัตราการไหล (Flow rate) 50 ไมโครลิตรต่อนาที แต่อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีดังกล่าวอาศัยเวลาในการวิเคราะห์สารค่อนข้างนานรวมไปถึงการทำอนุพันธ์ที่ยังไม่เป็นอัตโนมัติ

T. P. Piepponen และคณะ [6] ได้พัฒนาวิธี LC ที่รวดเร็วและมีความไวในการตรวจวัดสูงสำหรับหาปริมาณ กลูตามेट, โกลซีน, ทิวรีน และ กาบาโดยอาศัยการตรวจวัดด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ ซึ่งทำโดยการนำตัวอย่างทำอนุพันธ์กับ o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol ก่อนเข้าสู่กระบวนการแยกสาร โดยการฉีดสารอนุพันธ์เข้าสู่ ODS-II HPLC คอลัมน์ พบว่าในหนึ่งตัวอย่างใช้ระยะเวลาในการแยก 12 นาที รวมขั้นตอนการล้างระบบก่อนฉีดตัวอย่างถัดไป พบว่ามีปริมาณกาบา 80 เฟมโตโมล ในตัวอย่างปริมาตร 15 ไมโครลิตร ในส่วนของ กลูตามेट, โกลซีน, ทิวรีน

ไม่สามารถทำการตรวจหาปริมาณได้เนื่องจากมีปริมาณต่ำกว่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD เท่ากับ 23 เฟมโตโมล) วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความง่าย รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายต่ำต่อการวิเคราะห์หนึ่งตัวอย่าง แต่การทำอนุพันธ์ยังคงเป็นแบบไม่เป็นอัตโนมัติ

X. Kang และคณะ [7] ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดตัวอย่างของเหลวจากสมอง ด้วยเทคนิค LC ซึ่งทำโดยการนำตัวอย่างสมองของหนูและพลาสมาของกระต่ายมาทำการหาปริมาณ โดยการทำอนุพันธ์กับแดนซิลคอลลอยด์ เพื่อหา ทัวรีน, แอสปาเตต, กลูตาเมต, โกลซีน, อะลานีน และกาบา โดยอาศัยระบบการชะแบบอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่คงที่ สารแต่ละตัวจะถูกตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรมิเตอร์ พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ 35 นาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จึงได้พีคของกรดอะมิโน 12 ตัว ในครั้งเดียว เป็นผลให้สามารถตรวจวัดกรดอะมิโนดังกล่าวได้ในคราวเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามการทำอนุพันธ์ยังคงไม่เป็นแบบอัตโนมัติและใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างค่อนข้างนาน

M. Y. Khuhawar และคณะ [8] ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณกาบาด้วยการทำอนุพันธ์แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี LC ซึ่งทำโดยการนำตัวอย่างซึ่งประกอบด้วย โกลซีน, ไลซีน, ไตรเอมีน และกาบามาทำอนุพันธ์กับ 2-ไฮดรอกซีแนปทาเลดีไฮด์ ก่อนจะทำการแยกโดยใช้คอลัมน์ชนิด Phenomenex C<sub>18</sub> เฟสเคลื่อนที่เป็น Methanol: Water (62:38 ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อการแยกเสร็จสมบูรณ์ จะทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร พบว่าได้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 1.2 - 28.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) คือ 2.8 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตรการฉีดคือ 5 ไมโครลิตร และพบว่าในตัวอย่างของเหลวจากระบบประสาทส่วนกลางมีปริมาณกาบาอยู่ในช่วง 19.0-22.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of variation; CV) เท่ากับร้อยละ 2.4 จากวิธีข้างต้นเครื่องมือในการตรวจวัดและขั้นตอนในการทำอนุพันธ์ค่อนข้างง่าย ให้ผลการทดลองที่ดี ซึ่งจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น หากมีการทำให้เป็นอัตโนมัติ

#### 2.4.2 การทำอนุพันธ์ด้วยวิธีแบบต่อเนื่อง (Continuous liquid flow derivatization)

C. K. Zacharis และคณะ [27] ได้ทำการตรวจวัดหาปริมาณกาบา ด้วยระบบ SIA ร่วมกับเทคนิคลิควิด โครมาโทกราฟีในตัวอย่างทางชีวภาพ ซึ่งทำโดยการนำตัวอย่างสารชีวภาพจากมนุษย์ ซึ่งเป็นของเหลวจากระบบประสาทส่วนกลาง (Cerebrospinal fluid; CSF) มาทำอนุพันธ์ด้วย o-phthalaldehyde (OPA) อย่างอัตโนมัติด้วยระบบ SIA แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้เข้าสู่ส่วนที่เป็นการแยกด้วย HPLC ก่อนทำการวัดด้วยฟลูออโรมิเตอร์ และพบว่าสามารถวิเคราะห์หาปริมาณกาบา ได้ต่ำระดับ ppb แต่อย่างไรก็ตาม รีเอเจนต์ที่ใช้คือ Mercaptoethanol มีความเป็นพิษสูงซึ่งก่อให้เกิดอันตรายได้หากสูดดมเข้าสู่ร่างกาย

M. T. Kelly และคณะ [28] ได้พัฒนาวิธีที่รวดเร็วและอัตโนมัติในการหาปริมาณกรดอะมิโนหลายชนิดในคราวเดียวกัน ในตัวอย่างไวน์ ผลไม้ และน้ำผึ้ง โดยจะนำตัวอย่างมาทำอนุพันธ์กับ o-phthalaldehyde, N-acetyl-L-cysteine อย่างอัตโนมัติ ก่อนนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค LC ที่เป็นระบบ Automated in-loop derivatization โดยใช้คอลัมน์  $C_{18}$  ขนาด 3 มิลลิเมตร x 25 เซนติเมตร และได้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.25–10 ไมโครกรัม/ลิตร ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 2-7 และขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดสำหรับ แอสปาดิก, กรดกลูตามิก, แอททานิโกลามีน และกาบา เท่ากับ 10 ไมโครกรัม/ลิตร และสำหรับ ไทโรซีน, ฟีนิลอะลานีน, พูแทสเซซิน และ คาดาวารีน เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/ลิตร ใช้เวลาในการตรวจวัดต่อหนึ่งตัวอย่างนาน 40 นาที

สามารถสรุปรายละเอียดของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังที่ได้พบทวนไว้ข้างต้นในตารางที่ 2.6





ตารางที่ 2.6 สรุปงานวิจัยเกี่ยวกับการทำอนุพันธ์ด้วยวิธีไม่ต่อเนื่องและวิธีต่อเนื่อง

ลำดับ	รีเอเจนต์ ที่ใช้ทำอนุพันธ์	ประเภทการทำ อนุพันธ์	เทคนิคการตรวจวัด	ช่วงความเป็น เส้นตรง	ขีดจำกัดต่ำสุดใน การตรวจวัด	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน สัมพัทธ์	เอกสาร อ้างอิง
1	naphthalene-2,3- dicarboxaldehyde(NDA)	Batch	Fluorometry	-	10 - 30 nM	-	[23]
2	7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazole	Batch	Mass spectrometry	10-250 ng/L	µg/L (ppb)	-	[2]
3	2-hydroxynaphthaldehyde	Batch	Mass spectrometry	-	-	-	[24]
4	Naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde	Batch	Fluorometry	$4 \times 10^{-8}$ - $4 \times 10^{-6}$ M	$4 \times 10^{-8}$ M	6-2	[3]
5	o-phthalaldehyde (OPA)	Batch	Electrochemistry	0.00625-0.1 µM	-	2	[25]
6	o-phthalaldehyde (OPA)	Batch	Electrochemistry	0.1-40 pmol	10 fmol	7.5	[4]
7	OPA-3-mercaptopropionic	Batch	Fluorometry	-	-	4.4	[26]
8	OPA-2-mercaptoethanol	Batch	Fluorometry	15-120 pmol	80 fmol	4.2	[5]
9	OPA-2-mercaptoethanol	Batch	Fluorometry	5 mM-1µM	23 fmol	2.3	[6]
10	2-hydroxynaphthaldehyde	Batch	UV-Vis spectrometry	1.2-28.0 µg/mL	2.8 ng	2.4	[8]

ตารางที่ 2.7 สรุปงานวิจัยเกี่ยวกับการทำอนุพันธ์ด้วยวิธีไม่ต่อเนื่องและวิธีต่อเนื่อง (ต่อ)

ลำดับ	รีเอเจนต์ ที่ใช้ทำอนุพันธ์	ประเภทการทำ อนุพันธ์	เทคนิคการ ตรวจวัด	ช่วงความเป็น เส้นตรง	ขีดจำกัดต่ำสุดใน การตรวจวัด	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์	เอกสารอ้างอิง
11	o-phthalaldehyde (OPA)	Continuous flow	Fluorometry	0.01-3 mg/L	1 µg/L	2.3 - 5	[27]
12	N-acetyl-L-cysteine and o-phthalaldehyde (OPA)	Continuous flow	Fluorometry	0.25-10 µg/L	0.25 µg/L	0.1	[28]

### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการทดลอง

### 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

#### 3.1.1. สารเคมี

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ความบริสุทธิ์ (%)	ยี่ห้อและประเทศผู้ผลิต
แกมมา อะมิโนบิวทิริก แอซิด ( $\gamma$ -aminobutyric acid)	$C_4H_9NO_2$	99.00	Sigma, USA
2-ไฮดรอกซีแนฟทาลดีไฮด์ (2-hydroxynaphthaldehyde)	$C_{11}H_8O_2$	-	Aldrich, USA
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	NaOH	98.00	Rankem, India
กรดบอริก (Boric acid)	$H_3BO_3$	99.00	Sigma, USA
โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)	KCl	99.50	Merck, USA
อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)	$CH_3CN$	99.98	RCI Labscan, Thailand

#### 3.1.2. อุปกรณ์และเครื่องตรวจวัด

1. ขวดวัดปริมาตร
2. บีกเกอร์
3. ปิเปต และ ไมโครปิเปต
4. ขวดรูปชมพู่
5. หลอดหยด
6. กระจกตวง
7. ขวดทดลองแบบมีฝาปิด
8. ช้อนตักสาร
9. อลูมิเนียมฟอยล์
10. แท่งแก้วคนสาร

11. นาฬิกาจับเวลา
12. เครื่องวัดพีเอช – Metrohm, 827 pH Lab Meter, USA
13. เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า – Heidolph, MR 1000, Germany
14. เครื่องยูวี - วิลิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ - Jasco V630, USA
15. อุปกรณ์สำหรับสร้างระบบซีเควนเซียลอินเจกชัน ได้แก่
  - 15.1 8 – พอร์ตมัลติซีเควนเซียลวาล์ว - HAMILTON, Serial MVP, Switzerland
  - 15.2 โมลาร์วาล์วโพซิชั่นเนอร์– HAMILTON, HVC ‘T’ 3-2, Switzerland
  - 15.3 โซริงค์ไดรฟ์โมดูล– HAMILTON, PSD/ 4, Switzerland
  - 15.4 โพลทรูเซลล์สำหรับใช้กับเครื่องยูวี-วิลิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์- Hellma, 176.052-QS, USA
  - 15.5 PTFE tube ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.0 มิลลิเมตร- Vici AG International, JR-T6807-M 25, Switzerland

### 3.2 การเตรียมสารละลาย

สารละลายทั้งหมดใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนในการเตรียม สารเคมีทุกตัวเป็นเกรดสำหรับงานวิเคราะห์ทางเคมี (Analytical reagent grade)

#### 3.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกานาสำหรับวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch method)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกานา 2000 มิลลิกรัม/ลิตร (Stock solution) โดยชั่งกานา 0.05xx กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 25.00 มิลลิลิตร และนำสารละลายมาตรฐานกานาที่ได้ไปใช้สำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐานกานาความเข้มข้นอื่นๆ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกานาที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกานา (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาตรสารละลายที่ต้องปิเปต* (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสุดท้าย** (มิลลิลิตร)
50	0.25	10.00
100	0.50	10.00
200	1.00	10.00

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาบา (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาตรสารละลายที่ต้องปิเปต* (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสุดท้าย** (มิลลิลิตร)
300	1.50	10.00
400	2.00	10.00

\* ปิเปตจากสารละลายมาตรฐานกาบาความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัม/ลิตร

\*\* ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

### 3.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาสำหรับระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกาบา 5000 มิลลิกรัม/ลิตร (Stock solution) โดยชั่งกาบา 0.125x กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25.00 มิลลิลิตร และนำสารละลายมาตรฐานกาบาที่ได้ไปใช้สำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาความเข้มข้นอื่นๆ ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับวิเคราะห์ด้วยระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาบา (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาตรสารละลายที่ต้องปิเปต* (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสุดท้าย** (มิลลิลิตร)
100	0.20	10.00
300	0.60	10.00
500	1.00	10.00
700	1.40	10.00
1000	2.00	10.00
2000	4.00	10.00
3000	6.00	10.00

\* ปิเปตจากสารละลายมาตรฐานกาบาความเข้มข้น 5000 มิลลิกรัม/ลิตร

\*\* ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

### 3.2.3 การเตรียมสารละลายบอริคความเข้มข้น (พีเอช 8.0)

1. เตรียมสารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่งกรดบอริกมา 0.62xx กรัม ละลายด้วยน้ำ และปรับปริมาตรจนครบ 100.00 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.74xx กรัม ละลายด้วยน้ำ และปรับปริมาตรจนครบ 100.00 มิลลิลิตร
3. เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.04xx กรัม ละลายด้วยน้ำ และปรับปริมาตรจนครบ 10.00 มิลลิลิตร
4. จากนั้นนำสารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100.00 มิลลิลิตร (จากข้อ 1) มาผสมกับสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100.00 มิลลิลิตร (จากข้อ 2) และปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

### 3.2.4 การเตรียมสารละลาย 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ (2-hydroxy-naphthaldehyde)

เตรียมสารละลาย 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยชั่ง 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ 1.50 กรัม ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 25.00 มิลลิลิตร ด้วยอะซิโตนไตริล

### 3.2.5 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างทั้งหมดแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

#### 3.2.5.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ด

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีกาบาชนิดเม็ดมาบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักให้ได้ 0.30xx กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25.00 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้กรองผ่านไนลอนเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (Agela Technologies, USA) ก่อนนำไปวิเคราะห์

#### 3.2.5.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดแคปซูล

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีกาบาชนิดแคปซูลแกะและเทเอาผงตัวอย่างภายในออกใส่บีกเกอร์ ชั่งน้ำหนักให้ได้ 0.76xx กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25.00 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้กรองผ่านไนลอนเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (Agela Technologies, USA) ก่อนนำไปวิเคราะห์

### 3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.3.1 ศึกษาการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วยวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกาบาแต่ละความเข้มข้น (50, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัม/ลิตร) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และสารละลาย 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) 2000 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไตรล์ (สำหรับรีเอเจนต์แปลงค่าใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายมาตรฐานกาบา)

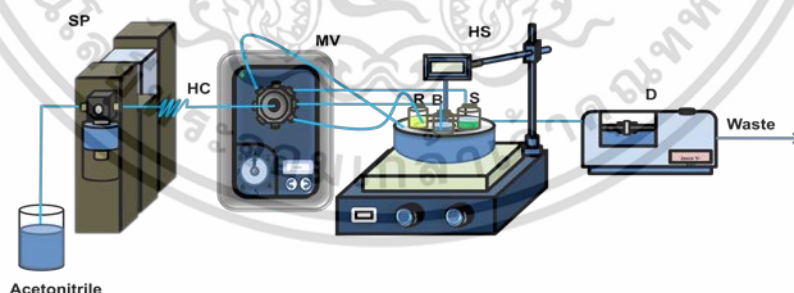
2. นำสารละลายจากข้อ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. นำสารละลายจากข้อ 2 มาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยปรับเป็นศูนย์ด้วยรีเอเจนต์แปลงค่า จากนั้นทำการวัดสเปกตรัมของสารอนุพันธ์แต่ละความเข้มข้น ที่ความยาวคลื่น 400 - 800 นาโนเมตร บันทึกสเปกตรัมและหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเพื่อใช้เป็นความยาวคลื่นในการติดตามสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น

4. นำผลการทดลองที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นสูงสุดกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาบา

#### 3.3.2 ออกแบบระบบซีเควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิส

ระบบซีเควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิส ที่ใช้ในการทำอนุพันธ์แบบอัตโนมัติ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกาบา แสดงดังรูปที่ 3.1

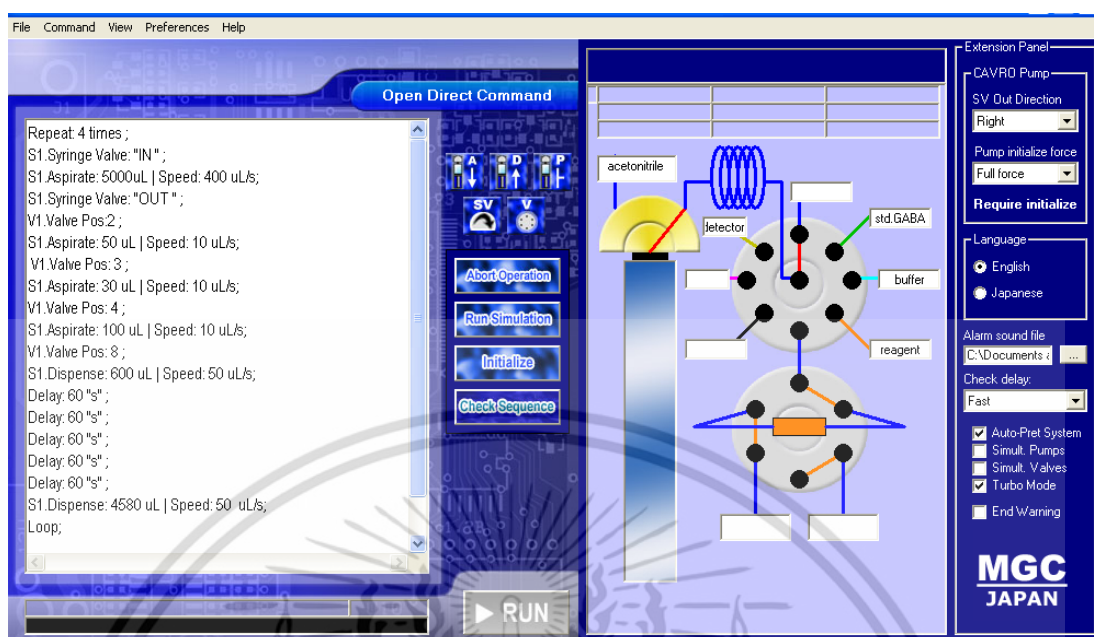


รูปที่ 3.1 แสดงระบบซีเควนเซียลอินเจกชันที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบอัตโนมัติในการหาปริมาณกาบา; C: อะซิโตไนไตรล์, R: สารละลาย 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ (ร้อยละ 6 น้ำหนัก/ปริมาตร), B: สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0, S: สารละลายมาตรฐานกาบา, SP: โซริงค์ปั๊ม, HC: โวลติคคอยล์ ความยาว 200 เซนติเมตร, MV: มัลติซีเลกชันวาล์ว, IS: ระบบให้ความร้อน, D: ยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

### 3.3.3 ศึกษาการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบอัตโนมัติด้วยระบบซีเควนเซียลอินเจคชันอะนาไลซิส

ในการทดลองจะใช้ซอฟต์แวร์ MGC Auto-Prep Version 4 ในการควบคุมการทำงานของระบบซีเควนเซียลอินเจคชันอะนาไลซิสทั้งหมด โดยลำดับขั้นตอนในการหาปริมาณกาบามี ดังต่อไปนี้

1. คูดสารละลายตัวพา (อะซิโตไนไตรล์) ปริมาตร 5000 ไมโครลิตร เข้าสู่ระบบด้วยอัตราเร็ว 400 ไมโครลิตร/วินาที
  2. คูดสารละลายมาตรฐานกาบามาแต่ละความเข้มข้น (100, 500, 1000, 2000 และ 3000 มิลลิกรัม/ลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ด้วยอัตราเร็ว 10 ไมโครลิตร/วินาที เข้าสู่ระบบโดยเก็บไว้ที่โพลดิ้งคอยด์
  3. คูดสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์พีเอช 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ด้วยอัตราเร็ว 10 ไมโครลิตร/วินาที เข้าสู่ระบบโดยเก็บไว้ที่โพลดิ้งคอยด์
  4. คูดสารละลาย 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ด้วยอัตราเร็ว 10 ไมโครลิตร/วินาที เข้าสู่ระบบและเก็บไว้ที่โพลดิ้งคอยด์ เป็นลำดับสุดท้าย
  5. ผลักสารละลายที่เก็บไว้ในโพลดิ้งคอยด์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เข้าสู่ระบบให้ความร้อน (Incubation system) โดยกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
  6. ผลักผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปยังเครื่องตรวจวัดเพื่อตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง
- ลำดับขั้นตอนข้างต้น สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3.2 โดยรูปดังกล่าวเป็นขั้นตอนที่ได้จากโปรแกรมที่ใช้ควบคุมการทำงานของระบบซีเควนเซียลอินเจคชันอะนาไลซิส



รูปที่ 3.2 แสดงหน้าจอของซอฟต์แวร์ MGC Auto-Prep Version 4 ซึ่งระบุลำดับขั้นตอนการหาปริมาณกาบาโดยอาศัยระบบซีควเอนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิส

### 3.3.4 การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

ในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกาบาได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ทั้งทางด้านเคมีและทางด้านกายภาพที่สามารถส่งผลต่อการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ โดยระบบที่ใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมนี้จะใช้ระบบดังแสดงในรูปที่ 3.1 และมีลำดับการวิเคราะห์เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.3 ดังแสดงในรูปที่ 3.2

#### 3.3.4.1 การศึกษาปัจจัยทางกายภาพ

##### 1. ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยานุพันธ์

ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในขั้นตอนการทำอนุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ที่เลือกศึกษาคือ อุณหภูมิห้อง 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับ

##### 2. ศึกษาอิทธิพลของปริมาตรสารละลายมาตรฐานกาบาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยานุพันธ์

ทำการศึกษาอิทธิพลสำหรับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยานุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยมีปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบาที่เลือกศึกษาคือ 50, 100 และ 150 ไมโครลิตร

### 3. ศึกษาอิทธิพลของเวลาในการให้ความร้อน

ทำการศึกษาอิทธิพลของเวลาในการให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยใช้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบาเท่ากับ 150 ไมโครลิตรและเวลาที่เลือกศึกษาคือ 1, 3 และ 5 นาที

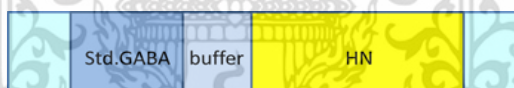
### 4. ศึกษาอิทธิพลของความยาวมิกซิงคอยด์

ทำการศึกษาอิทธิพลของความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ ใช้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบาเท่ากับ 150 ไมโครลิตรและความยาวที่เลือกศึกษาคือ 100, 200, 300 และ 400 เซนติเมตร

### 5. ศึกษาอิทธิพลของลำดับในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์

ทำการศึกษาอิทธิพลของลำดับในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยใช้มิกซิงคอยด์ความยาว 200 เซนติเมตร และลำดับในการทำปฏิกิริยาที่เลือกศึกษาคือ

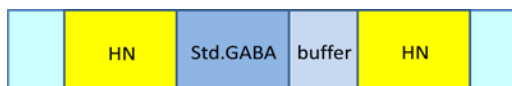
1. ลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ non-sandwich ใช้สารละลายมาตรฐานกาบาปริมาตร 150 ไมโครลิตร บอเรตบัฟเฟอร์พีเอช 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และรีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์) ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยสามารถแสดงเป็นรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แสดงลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ non-sandwich; std.GABA: สารละลายมาตรฐานกาบา ความเข้มข้น 100-2000 มิลลิกรัม/ลิตร, buffer: บอเรตบัฟเฟอร์พีเอช 8, HN: 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

2. ลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ sandwich ใช้รีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์) ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) 50 ไมโครลิตร สารละลายมาตรฐานกาบา ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บอเรตบัฟเฟอร์พีเอช 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และรีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์) ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ

หมายเหตุ มีขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.3 และแสดงได้ดังรูปที่ 3.2 แต่กำหนดให้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบาในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 150 ไมโครลิตรตามลำดับโดยสามารถแสดงเป็นรูปที่ 3.4



**รูปที่ 3.4** แสดงลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ sandwich; std.GABA: สารละลายมาตรฐานกาบา ความเข้มข้น 100-2000 มิลลิกรัม/ลิตร, buffer: บอเรตบัฟเฟอร์พีเอช 8, HN: 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

## 6. ศึกษาอิทธิพลของอัตราการไหล

ทำการศึกษาอิทธิพลของอัตราการไหลของสารในขณะที่เข้าสู่ระบบตรวจวัดที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยใช้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบาในการทำปฏิกิริยานุพันธ์เท่ากับ 150 ไมโครลิตร ความยาวมิกซิงคอยด์ 200 เซนติเมตร และลำดับการทำปฏิกิริยานุพันธ์แบบ sandwich และอัตราการไหลที่เลือกศึกษาคือ 25, 50 และ 100 ไมโครลิตร/นาที

### 3.3.4.2 ศึกษาปัจจัยทางเคมี

#### 1. ศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเกิดปฏิกิริยานุพันธ์

การศึกษอิทธิพลของพีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยานุพันธ์ ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์โดยพีเอชที่เลือกศึกษาคือ 8, 9 และ 10 ตามลำดับ

#### 2. ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นรีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์) ต่อการเกิดปฏิกิริยานุพันธ์

การศึกษอิทธิพลของความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์ ที่ใช้ในการทำอนุพันธ์ ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบาในการทำปฏิกิริยานุพันธ์เท่ากับ 150 ไมโครลิตรและความเข้มข้นที่เลือกศึกษาคือร้อยละ 0.3, 3, 6 และ 7.5 (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

### 3.3.5 การสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้จากสถานะที่เหมาะสม

เมื่อได้สถานะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยระบบซีเควนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิสแล้ว จึงได้ทำการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกาบา โดยสารละลายทุกชนิดจะถูกดูดเข้าสู่ระบบที่มีลำดับการดูดสารแบบ sandwich ดังนี้ รีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์) ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สารละลายมาตรฐานกาบาปริมาตร 150 ไมโครลิตร บอเรตบัฟเฟอร์พีเอช 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และรีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีเนปทาลดีไฮด์) ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ เคลื่อนที่เข้าสู่มิกซิงคอยด์ความยาว 200 เซนติเมตร

พร้อมการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และใช้อัตราการไหลของสารในขณะส่งเข้าสู่ระบบตรวจวัดเป็น 50 ไมโครลิตรต่อวินาที โดยมีอะซิโตนในไตรล์เป็นสารละลายตัวพา

### 3.3.6 ประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์

#### 3.3.6.1 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ในการหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ จะพิจารณาโดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานกาบาทที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน และคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Spiked sample} - \text{Sample}}{\text{Standard}}$$

เมื่อ Spiked sample คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน  
 Sample คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง  
 Standard คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

#### 3.3.6.2 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ในการหาความเที่ยงของวิธี จะพิจารณาจากค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกาบาทที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร ซ้ำๆ เป็นจำนวน 10 ครั้ง จากนั้นหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100$$

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
 $\bar{X}$  คือ ค่าเฉลี่ย

### 3.3.6.2 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) [24]

ในส่วนนี้เป็นการหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ของวิธี ซึ่งคำนวณได้ตามสูตรดังนี้

$$\text{LOD} = y_B + 3S_B$$

$$\text{LOQ} = y_B + 10S_B$$

เมื่อ  $y_B$  คือ จุดตัดแกน y  
 $S_B$  คือ  $\sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$   
 $y_i$  คือ ค่าจริงที่อ่านได้จากเครื่องมือ  
 $\hat{y}_i$  คือ ค่าที่ได้จากแทนค่า x ลงในสมการเส้นตรง  
 $n$  คือ จำนวนข้อมูล

### 3.3.7 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วยวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง

ทำการตรวจวัดปริมาณกาบาในตัวอย่างและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วยระบบเอสไอเอทีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วยวิธีแบบไม่ต่อเนื่องด้วยวิธีการทางสถิติ โดยตัวอย่าง คือ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ดและชนิดแคปซูล ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. เปิดตัวอย่าง ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และสารละลาย 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) 2000 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไครล์ (สำหรับรีเอเจนต์เบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)
2. นำสารละลายจากข้อ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. นำสารละลายจากข้อ 2 มาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยปรับค่าศูนย์ด้วยรีเอเจนต์เบลงค์ จากนั้นทำการวัดสเปกตรัมของสารอนุพันธ์ ที่ความยาวคลื่น 400 - 800

นาโนเมตร บันทึกสเปกตรัมและหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเพื่อใช้เป็นความยาวคลื่นในการติดตามสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น

4. นำผลการทดลองที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นสูงสุดกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาบา

5. คำนวณหาปริมาณกาบาโดยแทนค่าลงในสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานในข้อ 4

6. นำปริมาณกาบาที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณกาบาที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วย Paired *t*-test แบบ two tailed test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



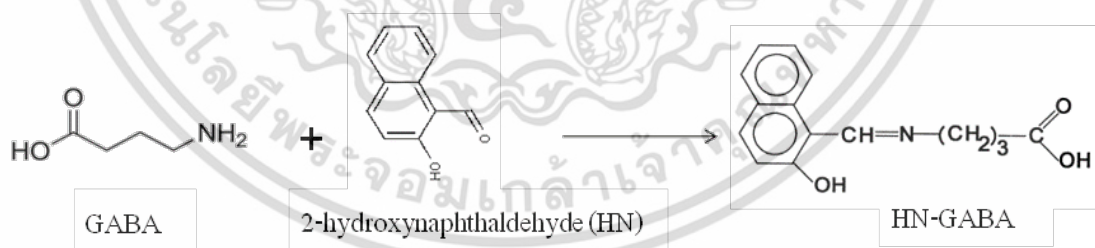
## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

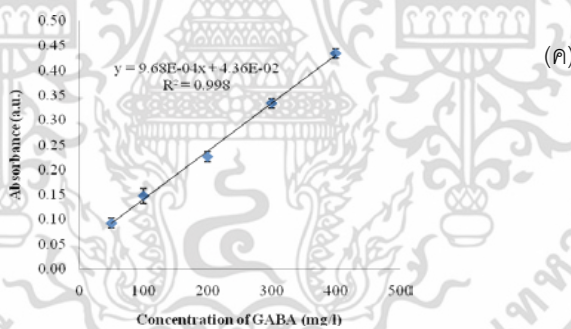
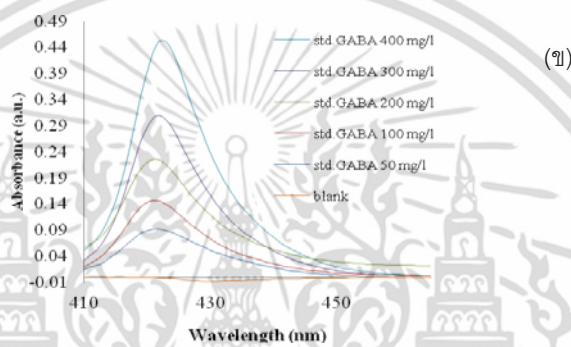
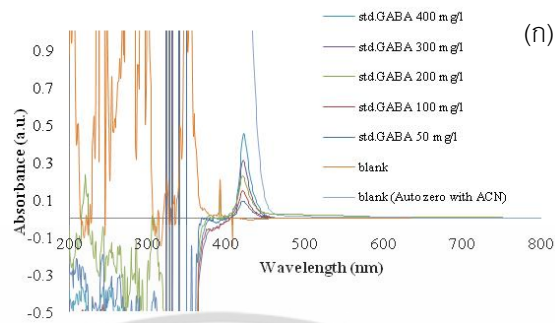
งานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบซีเควอนเซิลอินเจคชันอะนาไลซิส (เอสไอเอ) ในการทำอนุพันธ์แบบอัตโนมัติเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกาบา ในบทนี้จะได้กล่าวถึงผล และการอภิปรายผล การศึกษาปฏิกิริยาการตรวจวัด การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ การประเมินคุณลักษณะต่างๆ ของวิธี การนำระบบที่พัฒนาขึ้นนี้มาประยุกต์ใช้สำหรับหาปริมาณกาบาในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของระบบที่พัฒนาขึ้น

#### 4.1 ผลการศึกษาเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดสารอนุพันธ์ของกาบา

การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับติดตามสารอนุพันธ์ของกาบา ได้ศึกษาโดยใช้สารละลายมาตรฐานกาบาคความเข้มข้นในช่วง 50 - 400 มิลลิกรัม/ลิตร ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ตั้งสมการในรูปที่ 4.1 ในสภาวะที่เป็นเบสโดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 แล้วให้อุณหภูมิในการทำอนุพันธ์ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปติดตามสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร โดยใช้รีเจนต์เป็นแบลคค์สำหรับปรับค่าศูนย์ (Auto zero) เพื่อหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด



รูปที่ 4.1 แสดงสมการการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างกาบากับ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ [8]

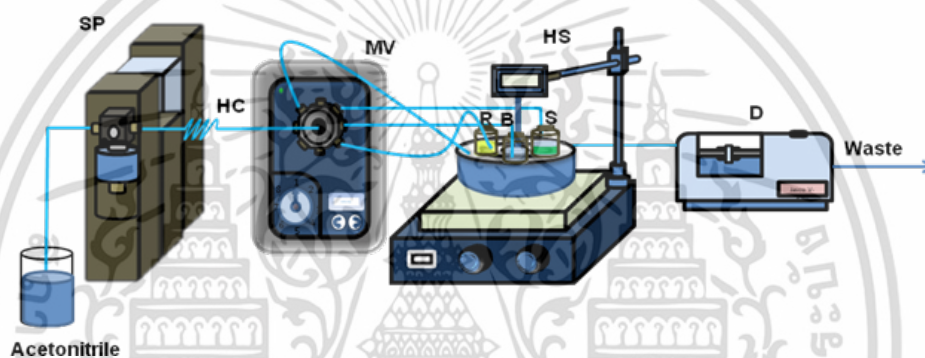


รูปที่ 4.2 แสดง (ก) สเปกตรัมที่ได้จากสารอนุพันธ์ของกาบาในช่วงยูวีและวิสิเบิล, (ข) สเปกตรัมที่ได้จากสารอนุพันธ์ของกาบาในช่วงวิสิเบิล และ(ค) กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกาบา ช่วงความเข้มข้น 50 – 400 มิลลิกรัม/ลิตรที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

จากสเปกตรัมที่ได้พบว่า ในรูปที่ 4.2(ก) สารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นไม่สามารถติดตามค่าการดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้ แต่อย่างไรก็ตามในรูปที่ 4.2(ข) สำหรับช่วงวิสิเบิล พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาบาโดยค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 420 นาโนเมตร ( $\lambda_{max}$ ) และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานดังรูป 4.2(ค) ได้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2 = 0.998$ ) และความเที่ยงที่ดี ดังนั้นจึงใช้ความยาวคลื่นดังกล่าวในการติดตามสารอนุพันธ์ของกาบาตลอดงานวิจัยนี้

## 4.2 ออกแบบระบบซีเวนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส

เมื่อพบว่าปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่าง 2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์ กับสารละลายมาตรฐาน กาบามีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ จึงได้ทำการออกแบบระบบซีเวนเชียลอินเจกชันอะนาไลซิส โดยความยาวของโสดคิงคอยด์ และมิกซิงคอยด์พิจารณาจากปริมาตรรวมทั้งหมดของสารที่ถูกดูดเข้าสู่ระบบ โดยแรกเริ่มจะอ้างอิงจากอัตราส่วนในการทำปฏิกิริยาที่ใช้จากการศึกษาการทำอนุพันธ์แบบไม่ต่อเนื่อง ระบบที่ออกแบบแสดงดังรูปที่ 4.3 โดยระบบนี้จะใช้เพื่อการศึกษาในหัวข้ออื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 4.3 แสดงระบบซีเวนเชียลอินเจกชันที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบอัตโนมัติในการหาปริมาณกาบามี; C: อะซิโตไนไตรล์, R: สารละลาย 2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์ (ร้อยละ 6 น้ำหนัก/ปริมาตร), B: สารละลายบอเรนัทเพอร์ พีเอช 8.0, S: สารละลายมาตรฐานกาบามี, SP: โซริงค์ปั๊ม, HC: โสดคิงคอยด์ ความยาว 100 เซนติเมตร, MV: มัลติซีเลกชันวาล์ว, IS: ระบบให้ความร้อน, D: ยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (420 นาโนเมตร)

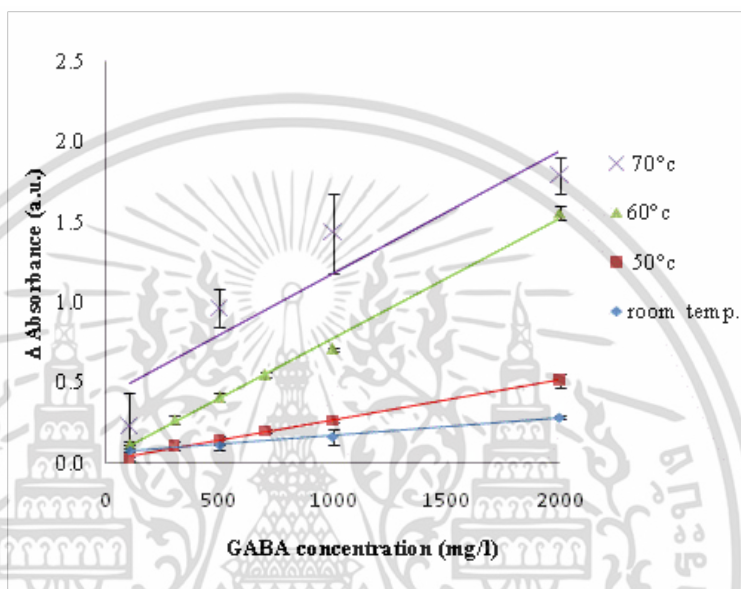
## 4.3 ผลการศึกษาเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

ในการศึกษาเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกาบามี โดยการทำอนุพันธ์อย่างอัตโนมัติด้วยระบบเอสไอเอ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งลำดับขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.3 มีเกณฑ์ในการเลือกสถานะที่เหมาะสมคือ จะเลือกสถานะที่เมื่อนำผลการทดลองมาสร้างกราฟมาตรฐานแล้วให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสนใจ และให้ความไวในการวิเคราะห์ รวมถึงความเที่ยงที่ดี

### 4.3.1 ผลการศึกษาปัจจัยทางกายภาพ

#### 4.3.1.1 ผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์

ในการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยา ใช้สารละลายมาตรฐานกาบาความเข้มข้นในช่วง 100 – 2000 มิลลิกรัม/ลิตร อุณหภูมิที่เลือกใช้ในขั้นตอนการทำอนุพันธ์ที่ศึกษาได้แก่ อุณหภูมิห้อง 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 และตาราง 4.1



รูปที่ 4.4 แสดงผลของการให้อุณหภูมิห้อง, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเมื่อใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน

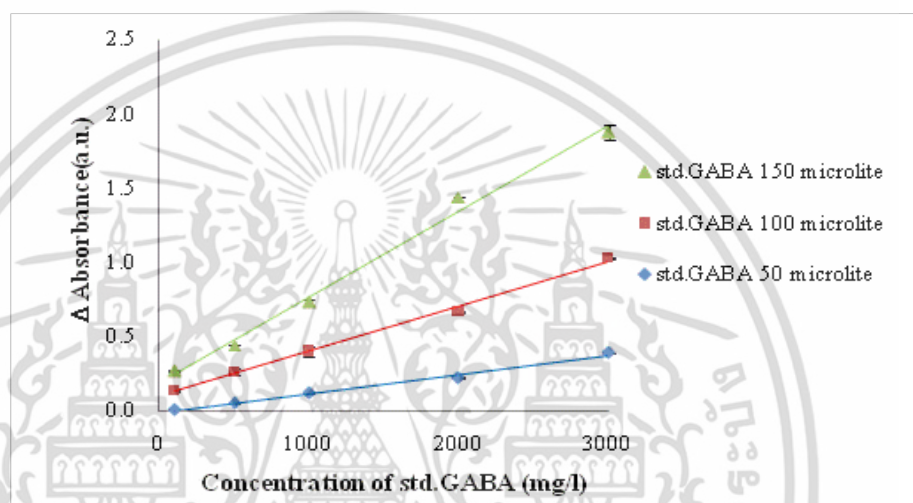
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	สมการเชิงเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R <sup>2</sup> )
room temp	$y = 9.00 \times 10^{-5}x + 0.068$	0.998
50	$y = 2.50 \times 10^{-4}x + 0.018$	0.996
60	$y = 7.47 \times 10^{-4}x + 0.031$	0.995
70	$y = 7.64 \times 10^{-4}x + 0.042$	0.866

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.4 พบว่าความไวในการตรวจวัดเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเพราะโมเลกุลสามารถชนกันได้เร็วและแรงขึ้น ปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดีมากขึ้น พิจารณาจากความชันของสมการเส้นตรงที่เพิ่มขึ้น แต่ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ให้ค่า

สัมประสิทธิ์การตัดสีใจที่ไม่ดี ( $R^2$ ) น้อยกว่า 0.9 เนื่องจากปัญหาการเกิดฟองในระบบเอสไอเอ ส่งผลให้รบกวนการตรวจวัดทำให้สัญญาณมีความเที่ยงต่ำ จึงเลือกใช้อุณหภูมิรองลงมาคือ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์การตัดสีใจ ( $R^2 = 0.995$ ) และความไวในการตรวจวัดที่ดี ไม่แตกต่างจากที่ 70 องศาเซลเซียสเท่าใดนัก

#### 4.3.1.2 ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกาบาที่ฉีดเข้าสู่ระบบ

ทำการศึกษาปริมาตรสารละลายมาตรฐานกาบาที่ฉีดเข้าสู่ระบบ ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยปริมาตรที่เลือกศึกษาคือ 50, 100 และ 150 ไมโครลิตร ตามลำดับ แสดงผลดังรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.5 แสดงผลของปริมาตรที่ฉีดเข้าสู่ระบบของสารละลายมาตรฐานกาบาที่ส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสีใจเมื่อใช้ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบาที่ฉีดเข้าสู่ระบบในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน

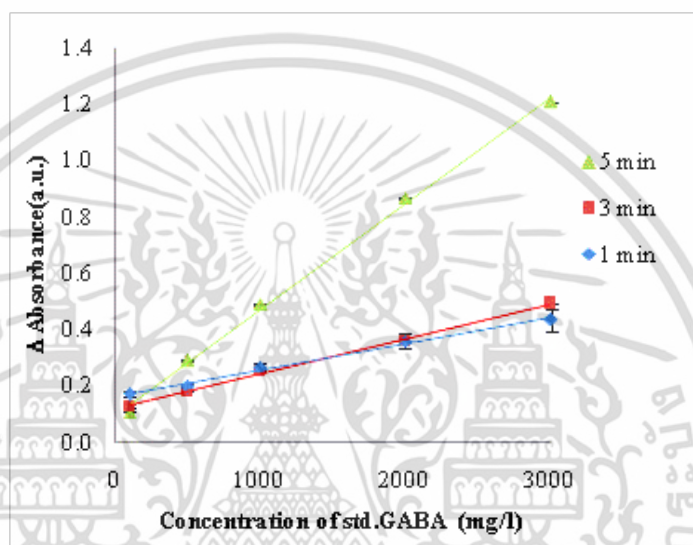
ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน กาบา (ไมโครลิตร)	สมการเชิงเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสีใจ ( $R^2$ )
50	$y = 1.30 \times 10^{-4} x + 0.014$	0.992
100	$y = 3.11 \times 10^{-4} x + 0.079$	0.995
150	$y = 5.77 \times 10^{-4} x + 0.188$	0.993

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.5 พบว่าความไวในการตรวจวัดเพิ่มขึ้นตามปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบา พิจารณาจากความชันของสมการเส้นตรงที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบาเพิ่มขึ้นส่งผลให้จำนวนโมลที่เข้าทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับบรีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์) มีมากขึ้น ปฏิกิริยาจึงสามารถเกิดได้ดีขึ้น

จากข้อมูลผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการดูดสารละลายมาตรฐานกาบาเข้าสู่ระบบที่ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ให้ความไวในการตรวจวัดที่ดีที่สุดรวมถึงให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ดี ( $R^2 = 0.993$ ) จึงเลือกปริมาตรดังกล่าวในการทำปฏิริยาอนุพันธ์

#### 4.3.1.3 ผลการศึกษาอิทธิพลของเวลาในการให้ความร้อนของปฏิริยาอนุพันธ์

ทำการศึกษาอิทธิพลของเวลาในการให้ความร้อนของปฏิริยาอนุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยเวลาที่เลือกศึกษาคือ 1, 3 และ 5 นาที แสดงผลดังรูปที่ 4.6 และตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.6 แสดงผลของเวลาในการให้ความร้อนของปฏิริยาอนุพันธ์ที่ 1, 3 และ 5 นาที ซึ่งส่งผลต่อค่าการดูดกลืนของสารอนุพันธ์ของกาบา ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเมื่อใช้เวลาในการให้ความร้อนของปฏิริยาอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน

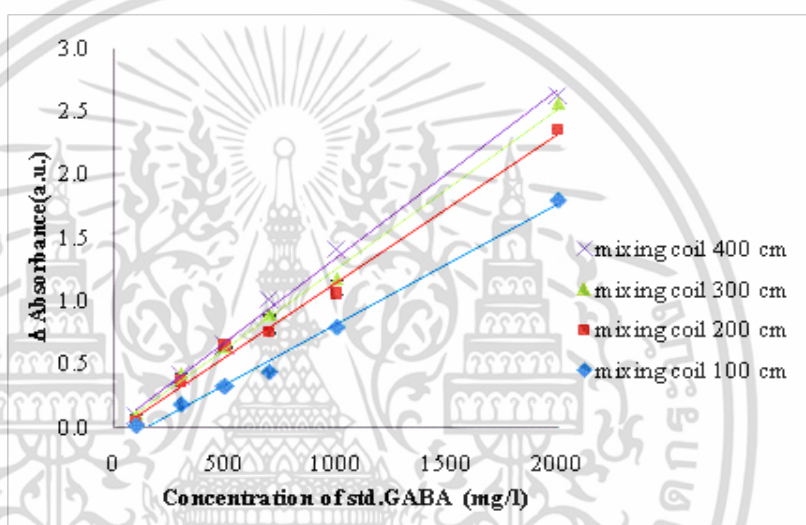
เวลาในการให้ความร้อน (นาที)	สมการเชิงเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ )
1	$y = 9.00 \times 10^{-5} x + 0.163$	0.992
3	$y = 1.24 \times 10^{-4} x + 0.120$	0.998
5	$y = 3.76 \times 10^{-4} x + 0.070$	0.998

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.6 พบว่า ความไวในการตรวจวัดเพิ่มขึ้นตามเวลาในการให้ความร้อนของปฏิริยาอนุพันธ์ พิจารณาความชันของสมการเส้นตรงที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากเมื่อเพิ่มเวลาในการให้ความร้อนแก่สารละลายภายในท่อทำให้มีเวลาในการผสมของ

สารละลายแต่ละชนิดเข้าหากันเกิดการปฏิกิริยาอนุพันธ์ได้มากขึ้น ดังนั้นจากข้อมูลผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนขณะทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ 5 นาที ให้ความไวในการตรวจวัดมากที่สุด และให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2 = 0.998$ ) จึงเลือกเวลาดังกล่าวในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์

**4.3.1.4 ผลการศึกษาอิทธิพลความยาวของมิกซิงคอยด์**

ทำการศึกษาอิทธิพลของความยาวของมิกซิงคอยด์ซึ่งอยู่ภายในระบบให้ความร้อนแก่สารละลายภายในท่อที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยใช้ความยาวมิกซิงคอยด์เป็น 100, 200, 300 และ 400 เซนติเมตร แสดงผลดังรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.4



รูปที่ 4.7 แสดงผลของความยาวของมิกซิงคอยด์ที่ 100, 200, 300 และ 400 เซนติเมตร ซึ่งส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเมื่อให้ความยาวของมิกซิงคอยด์ในระบบเอสไอเอสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกาบาต่างๆ กัน

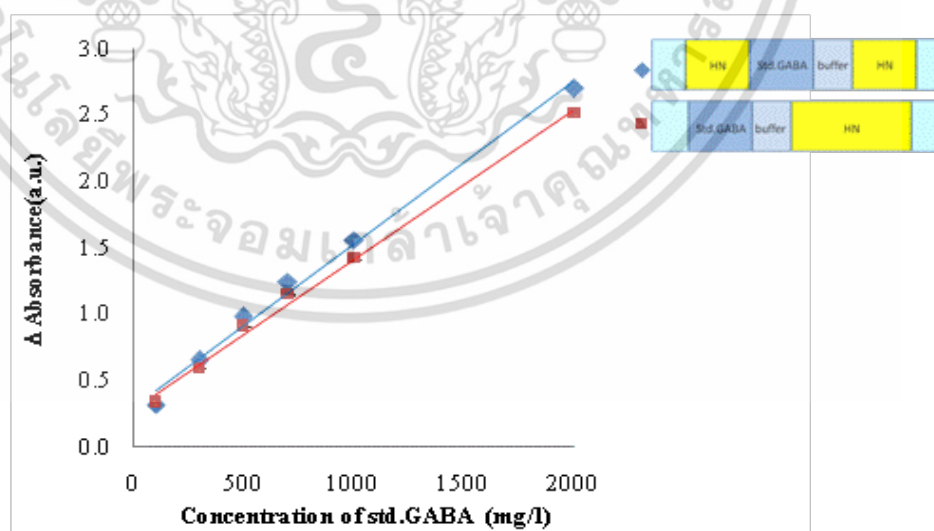
ความยาวของมิกซิงคอยด์ (เซนติเมตร)	สมการเชิงเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ )	อัตราการวิเคราะห์ (ตัวอย่าง / ชั่วโมง)
100	$y = 9.50 \times 10^{-4} x - 0.132$	0.996	9
200	$y = 1.18 \times 10^{-3} x - 0.0373$	0.996	8
300	$y = 1.23 \times 10^{-3} x - 0.005$	0.993	7
400	$y = 1.33 \times 10^{-3} x + 0.0111$	0.994	6

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.7 พบว่าความไวในการตรวจวัดเพิ่มขึ้นเมื่อความยาวของมิกซิงคอยด์เพิ่มขึ้น พิจารณาความชันของสมการเส้นตรงที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อความยาวของมิกซิงคอยด์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ระยะทางในการผสมของสารละลายภายในท่อเกิดได้มากขึ้น ปฏิกิริยาอนุพันธ์จึงเกิดได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามอัตราในการวิเคราะห์ก็จะต่ำลงตามความยาวของมิกซิงคอยด์ที่เพิ่มขึ้น จึงเลือกให้ความยาวมิกซิงคอยด์ที่ไม่มากเกินไปแต่ยังคงให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดคือที่ 200 เซนติเมตร ที่ให้ความไวในการตรวจวัดและความเป็นเส้นตรงที่ดีที่สุด ( $R^2 = 0.993$ )

#### 4.3.1.5 ผลการศึกษาอิทธิพลของลำดับในการทำปฏิกิริยา

ทำการศึกษาอิทธิพลของลำดับในการทำปฏิกิริยาที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยลำดับที่เลือกศึกษา

1. ลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ non-sandwich ใช้ลำดับดังนี้สารละลายมาตรฐานกาบา 150 ไมโครลิตร บอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตรและรีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีแนปทาเลตไฮด์) ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ
2. ลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ sandwich ใช้รีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีแนปทาเลตไฮด์) ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) 50 ไมโครลิตร สารละลายมาตรฐานกาบาปริมาตร 150 ไมโครลิตร บอเรตบัฟเฟอร์พีเอช 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และรีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีแนปทาเลตไฮด์) ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามลำดับได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.8 แสดงผลของลำดับในการทำปฏิกิริยาแบบ sandwich และ non-sandwich ซึ่งส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา ตามลำดับ

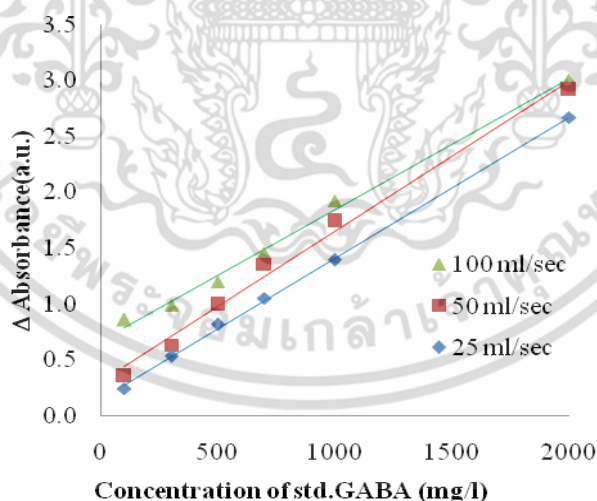
ตารางที่ 4.5 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดล้นใจเมื่อใช้ลำดับที่ต่างกัน

ลำดับของปฏิกิริยา	สมการเชิงเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดล้นใจ ( $R^2$ )
Std.GABA/ buffer/ HN (non sandwich)	$y = 1.13 \times 10^{-3} x + 0.289$	0.995
HN/ Std.GABA/ buffer/ HN (sandwich)	$y = 1.22 \times 10^{-3} x + 0.304$	0.992

จากผลการทดลองพบว่าจากรูปที่ 4.8 เมื่อใช้ลำดับปฏิกิริยาแบบ sandwich จะให้ความไวในการวิเคราะห์ดีกว่าเล็กน้อย เนื่องจากมีพื้นที่ผิวในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่าง 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ กับสารละลายมาตรฐานกาบามากกว่า เป็นผลให้ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ดีขึ้น ดังนั้นจากข้อมูลผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ sandwich ให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดีกว่าและให้ความเป็นเส้นตรงที่ดี ( $R^2 = 0.992$ ) จึงเลือกลำดับดังกล่าวในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์

#### 4.3.1.6 ผลการศึกษาอิทธิพลของอัตราการไหล

ทำการศึกษาอัตราการไหลของสารละลายภายในห้องขณะผลึกเข้าสู่ระบบตรวจวัดที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยอัตราการไหลที่ศึกษาคือ 25, 50 และ 100 ไมโครลิตร/วินาที ตามลำดับ แสดงผลดังรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.9 แสดงผลของอัตราการไหลของสารละลายภายในห้องขณะผลึกเข้าสู่ระบบตรวจวัดที่ส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเมื่อใช้อัตราการไหลที่ต่างกัน

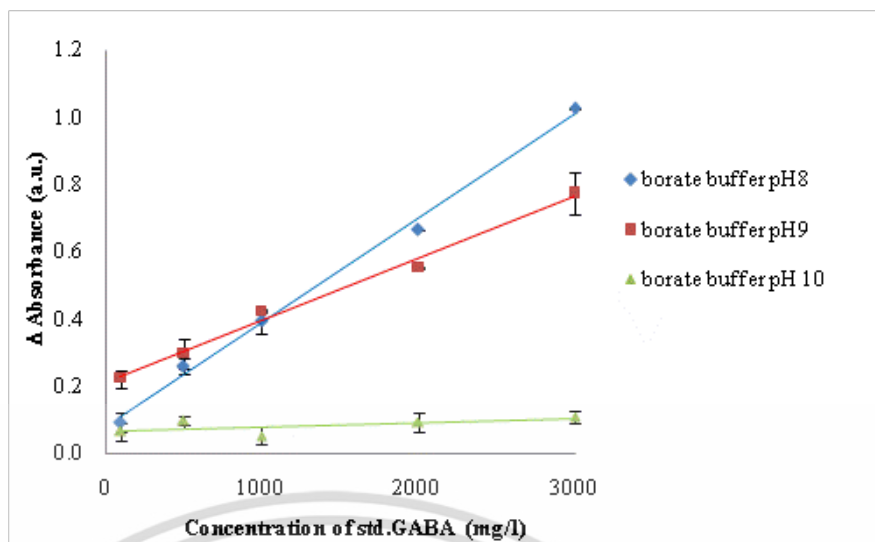
อัตราการไหล (ไมโครลิตร / วินาที)	สมการเชิงเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์การ ตัดสินใจ ( $R^2$ )	อัตราการวิเคราะห์ (ตัวอย่าง / ชั่วโมง)
25	$y = 1.26 \times 10^{-3} x + 0.069$	0.990	7
50	$y = 1.34 \times 10^{-3} x + 0.261$	0.990	9
100	$y = 1.17 \times 10^{-3} x + 0.673$	0.994	11

จากผลการทดลองพบว่า ที่อัตราการไหล 50 ไมโครลิตร/วินาที ให้ความไวในการวิเคราะห์ดีที่สุดรองลงมาคือ 25 ไมโครลิตร/วินาที และที่อัตราการไหลเท่ากับ 100 แต่อย่างไรก็ตามความไวในการวิเคราะห์ของแต่ละสภาวะรวมถึงค่าความเป็นเส้นตรงก็ให้ผลที่ดีและมีค่าไม่ต่างกันมากนัก จึงเลือกพิจารณาที่อัตราเร็วในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ดังนั้นจากข้อมูลผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอัตราการไหลที่ 100 ไมโครลิตร/วินาที ให้อัตราเร็วในการวิเคราะห์ดีที่สุดรวมถึงให้ความไวในการวิเคราะห์และให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี ( $R^2 = 0.994$ ) จึงเลือกอัตราเร็วดังกล่าวในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์

### 4.3.3 ผลการศึกษาปัจจัยทางเคมี

#### 4.3.3.1 ผลการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์

ในการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเกิดปฏิกิริยา ใช้สารละลายมาตรฐานกาบความเข้มข้นในช่วง 100 – 3000 มิลลิกรัม/ลิตร ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ 2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยพีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำอนุพันธ์ที่ศึกษาได้แก่ พีเอช 8, 9 และ 10 ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.7



รูปที่ 4.10 แสดงผลของพีเอช 8, 9 และ 10 ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา ตามลำดับ

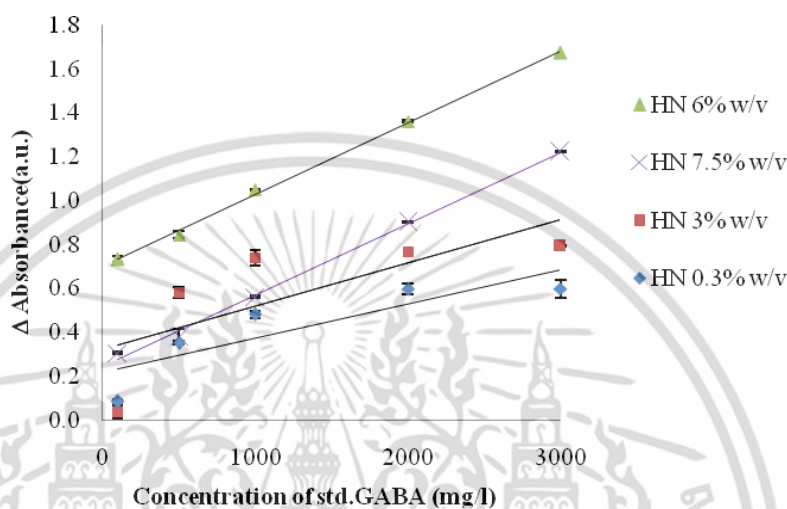
ตารางที่ 4.7 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เมื่อใช้พีเอชของการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ต่างๆกัน

พีเอช	สมการเชิงเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R <sup>2</sup> )
8.0	$y = 3.11 \times 10^{-4} x + 0.072$	0.996
9.0	$y = 1.85 \times 10^{-4} x + 0.210$	0.992
10.0	$y = 0.76 \times 10^{-6} x + 0.079$	0.180

จากผลการทดลองพบว่าจากรูปที่ 4.10 ความไวในการตรวจวัดลดลงเมื่อค่าพีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ที่เพิ่มขึ้น พิจารณาจากความชันของสมการเส้นตรงที่ลดลงและที่พีเอช 10 แทบจะไม่เห็นความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงจากสารอนุพันธ์ของกาบาที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน จากข้อมูลผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าที่พีเอช 8 หมู่อะมิโนสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่แอลดีไฮด์ในโครงสร้างของรีเอเจนต์ได้ดีเนื่องจากเป็นสภาวะที่ทำให้เกิดกรดช่วยในการเร่งปฏิกิริยา โดยพิจารณาจากความไวในการตรวจวัด และความเป็นเส้นตรงที่ดี (R<sup>2</sup> = 0.996) จึงเลือกบอเรตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 8 ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์

#### 4.3.3.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของรีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์) ต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์

ทำการศึกษาความเข้มข้นของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยความเข้มข้นของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ที่เลือกศึกษาคือร้อยละ 0.3, 3, 6 และ 7.5 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) ตามลำดับ แสดงผลดังรูปที่ 4.11 และตารางที่ 4.8



รูปที่ 4.11 แสดงผลของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 3, 6 และ 7.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 สรุปสมการเชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเมื่อใช้ความเข้มข้นของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ต่างๆกัน

ร้อยละความเข้มข้นของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ (น้ำหนัก/ ปริมาตร)	สมการเชิงเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ )
0.3	$y = 1.56 \times 10^{-4} x + 0.216$	0.773
3	$y = 1.88 \times 10^{-4} x + 0.344$	0.551
6	$y = 3.27 \times 10^{-4} x + 0.246$	0.998
7.5	$y = 3.24 \times 10^{-4} x + 0.699$	0.997

จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 0.3 และ 3 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาบาต่างๆ และเริ่มคงที่เมื่อสารละลายมาตรฐานกาบาเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจาก

มีปริมาณโมลของสารละลายรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไม่เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับสารละลายมาตรฐานกาบา แต่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 และ 7.5 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) โมลของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์ เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยาจึงให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจและความไวในการตรวจวัดที่ดีและใกล้เคียงกันมากจึงเลือกใช้ 2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) เพราะใช้สารเคมีดังกล่าวปริมาณน้อยกว่า ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์

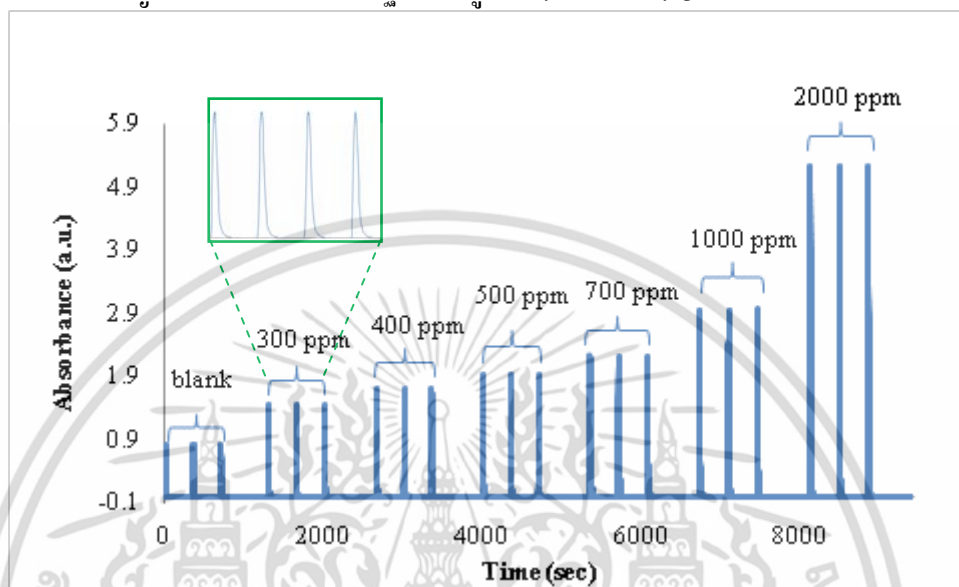
จากที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 สรุปการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยระบบซีเควนเชียล อินเจกชัน

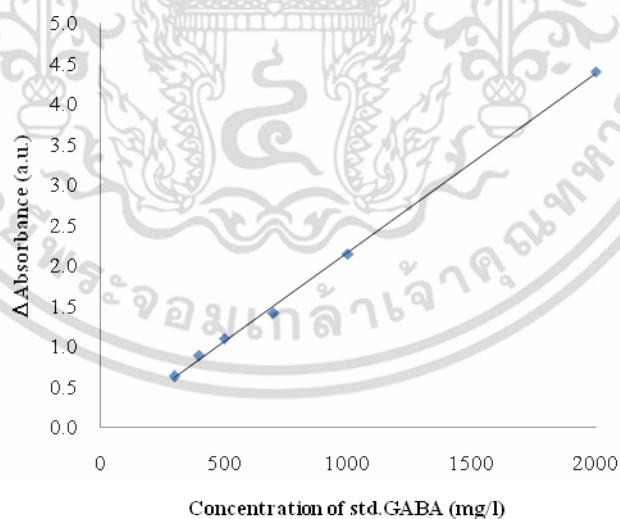
ปัจจัยที่ศึกษา	ชนิด / ช่วงที่ศึกษา	ค่าที่เลือก
อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์	40 -70 องศาเซลเซียส	60 องศาเซลเซียส
ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบา	50 -150 ไมโครลิตร	150 ไมโครลิตร
เวลาในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์	1 – 5 นาที	5 นาที
ความยาวมิกซิงคอยด์	100 – 400 เซนติเมตร	200 เซนติเมตร
ลำดับการทำปฏิกิริยา	1. Std.GABA/ buffer/ HN 2. HN/ Std.GABA/ buffer/ HN	HN/ Std.GABA/ buffer/ HN
อัตราการไหล	25 – 100 ไมโครลิตร/วินาที	100 ไมโครลิตร/วินาที
พีเอชของบัฟเฟอร์	8.0 – 10.0	8.0
ความเข้มข้นของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์	ร้อยละ 0.3 – 7.5 น้ำหนัก/ ปริมาตร	ร้อยละ 6 น้ำหนัก/ ปริมาตร

#### 4.4 กราฟมาตรฐานที่ได้จากสถานะที่เหมาะสม

เมื่อได้สถานะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยระบบซีควนเซียล-อินเจกชันอะนาไลซิสแล้ว จึงได้ทำการสร้างมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกาบา แสดงตัวอย่างลักษณะสัญญาณและกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.12 และ 4.13 ตามลำดับ



รูปที่ 4.12 แสดงสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกาบาความเข้มข้น 300 – 2000 มิลลิกรัม/ลิตร



รูปที่ 4.13 กราฟมาตรฐานของสารละลายกาบา ช่วงความเข้มข้น 300 – 2000 มิลลิกรัม/ลิตร

จากการศึกษาพบว่าระบบซีควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณกาบาได้ในช่วง 300 – 2000 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีสมการเส้นตรงตามความสัมพันธ์ เป็น  $Abs = 2.21 \times 10^{-3} [GABA] - 0.0418$  และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2 = 0.999$ )

## 4.5 ประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์

### 4.5.1 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ในการหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์จะประเมินจากค่าร้อยละของการวิเคราะห์ที่คืนกลับ โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ด จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน และค่าร้อยละของการวิเคราะห์ที่คืนกลับ ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ผลการคำนวณหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์ที่คืนกลับ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกาบา

ตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาบา (มิลลิกรัม/เม็ด)			ร้อยละของ การวิเคราะห์ที่คืนกลับ
		ที่มีอยู่เดิม	ที่เติมลงไป	ที่ตรวจพบ	
1	เม็ด	107.39	203.00	303.47±0.0013	96.59
2	เม็ด	107.53	203.00	312.01±0.0083	100.73
3	เม็ด	110.22	203.00	307.99±0.0103	97.42
4	เม็ด	110.42	203.00	305.49±0.0042	96.09
5	เม็ด	111.34	203.00	302.73±0.0018	94.28
6	แคปซูล	502.78	203.00	709.41±0.0004	101.79
7	แคปซูล	511.40	203.00	728.30±0.0080	106.84
8	แคปซูล	488.31	203.00	683.56±0.0010	96.18
9	แคปซูล	505.94	203.00	704.88±0.0100	98.00
10	แคปซูล	504.92	203.00	701.15±0.0020	96.66
11	แคปซูล	504.45	203.00	708.48±0.0001	100.51

จากตารางที่ 4.10 จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์ปริมาณกาบามีร้อยละค่าคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 94.28 - 106.84 นั่นคือ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ไม่ถูกรบกวนจากองค์ประกอบภายในตัวอย่าง จึงถือได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำสูง

#### 4.5.2 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ในการหาความเที่ยงของวิธี จะพิจารณาจากค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกาบา ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร ซ้ำๆ เป็นจำนวน 10 ครั้ง จากนั้นหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 0.17 จึงถือได้ว่าวิธีนี้มีความเที่ยงที่สูง

#### 4.5.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ในส่วนนี้เป็นการหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ ของวิธีซึ่งคำนวณได้ตามสูตรดังนี้

$$\text{LOD} = y_B + 3S_B$$

$$\text{LOQ} = y_B + 10S_B$$

เมื่อ  $y_B$  คือ จุดตัดแกน y

$$S_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2}{n-2}}$$

$y_i$  คือ ค่าจริงที่อ่านได้จากเครื่องมือ

$\bar{y}_i$  คือ ค่าที่ได้จากแทนค่า x ลงในสมการเส้นตรง

n คือ จำนวนข้อมูล

เมื่อแทนค่าที่วิเคราะห์ได้ลงในสมการจะได้ LOD เท่ากับ 80.79 และ LOQ เท่ากับ 307.13 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

จากที่ได้คุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังตารางที่ 4.11

**ตารางที่ 4.11** สรุปคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยระบบซีเควนเซียลอินเจกชัน

คุณลักษณะเด่น	ค่าที่ได้
ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัม/ลิตร)	300 - 2000
สมการเชิงเส้นตรง	$Abs = 2.21 \times 10^{-3} [GABA] - 0.0418$
ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ )	0.999
ร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)	94.28 - 106.84
ความเที่ยง (% RSD) n = 10	0.17
ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (มิลลิกรัม/ลิตร)	80.79
ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	307.13
อัตราการใช้วิเคราะห์(ตัวอย่าง/ชั่วโมง)	11

#### 4.6 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยเทคนิคการทำอนุพันธ์แบบไม่ต่อเนื่อง

ทำการตรวจวัดปริมาณกาบาในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ด ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้นต่างๆลงไป และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้ จากวิธีที่พัฒนาขึ้น และเทคนิคการทำอนุพันธ์แบบไม่ต่อเนื่อง ด้วยวิธีการทางสถิติ ผลการวิเคราะห์และการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติแสดงผลดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นและเทคนิค การทำอนุพันธ์แบบไม่ต่อเนื่อง

ตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาบา (มิลลิกรัม/เม็ด)		
		ระบุข้างฉลาก	การทำอนุพันธ์แบบไม่ต่อเนื่อง	งานวิจัยนี้
1	เม็ด	20	20.90 ± 0.0006	21.48 ± 0.0033
2	เม็ด	20	21.20 ± 0.0001	21.51 ± 0.0006
3	เม็ด	20	21.30 ± 0.0001	22.04 ± 0.0047
4	เม็ด	20	21.45 ± 0.0007	22.08 ± 0.0025
5	เม็ด	20	21.40 ± 0.0002	22.27 ± 0.0059
6	แคปซูล	500	501.00 ± 0.0051	502.78 ± 0.0010
7	แคปซูล	500	502.00 ± 0.0001	511.40 ± 0.0020
8	แคปซูล	500	501.00 ± 0.0009	488.31 ± 0.0005
9	แคปซูล	750	757.00 ± 0.0001	758.91 ± 0.0050
10	แคปซูล	750	758.00 ± 0.0002	757.38 ± 0.0040
11	แคปซูล	750	755.00 ± 0.0003	756.67 ± 0.0010

จากผลการวิเคราะห์และการเปรียบเทียบผลด้วยวิธีการทางสถิติพบว่า การวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ( $t_{\text{stat}} = 0.27 < t_{\text{critical}} = 2.23$ ) จึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำสูงและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกาบาในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดต่างๆ ได้

## บทที่ 5

# สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1.1 ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจวัดปริมาณกาบาในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ดและชนิดแคปซูล โดยอาศัยเทคนิคสเปกโตรเมทรีร่วมกับระบบซีเควนเซียลอินเจกชันอะนาไลซิส และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นของสารอนุพันธ์ระหว่างสารละลายมาตรฐานกาบากับ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ พบว่าได้สภาวะที่เหมาะสมดังต่อไปนี้

- (1) อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ 60 องศาเซลเซียส
- (2) พีเอชของบัฟเฟอร์ 8.0
- (3) ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกาบา 150 ไมโครลิตร
- (4) ความเข้มข้นของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ร้อยละ 6 น้ำหนัก/ ปริมาตร
- (5) เวลาในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ 5 นาที
- (6) ความยาวมิกซิงคอยด์ 200 เซนติเมตร
- (7) ลำดับการทำปฏิกิริยา Sandwich
- (8) อัตราการไหลที่ใช้ผลึกเข้าสู่เครื่องตรวจวัด 100 ไมโครลิตร/วินาที

5.1.2 ผลจากการประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธี เป็นดังนี้

- (1) ช่วงความเป็นเส้นตรง เท่ากับ 300-2000 มิลลิกรัม/ลิตร ของกาบา
- (2) สมการเชิงเส้นตรงตามความสัมพันธ์  $Abs = 2.21 \times 10^{-3} [GABA] - 0.0418$
- (3) สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.999
- (4) ค่าร้อยละของการวิเคราะห์หาค่ากลับอยู่ในช่วง 94.28 – 106.84
- (5) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 0.17 เมื่อศึกษาด้วยสารละลายมาตรฐานกาบาคความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร
- (6) ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 80.79 และ ขีดจำกัดในการวิเคราะห์เท่ากับ 307.13 มิลลิกรัม/ลิตรตามลำดับ
- (7) อัตราการวิเคราะห์ เท่ากับ 11 ตัวอย่าง/ชั่วโมง

5.1.3 เมื่อพัฒนาวิธีได้แล้ว จึงนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณกาบาในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ด พบว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกาบาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทำปฏิกิริยานุพันธ์ จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที อาจเกิดเป็นฟองอากาศขึ้นภายในระบบ ส่งผลให้รบกวนการตรวจวัด การเพิ่มความดันภายในระบบ และบริเวณปลายท่อที่ปล่อยสารออกจากระบบสามารถช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้



## เอกสารอ้างอิง

1. PhamaGABA: Natural support for stress, anxiety and insomnia. **Bioclinic naturals. A.** 835: 73 – 91.
2. Y. Song, M. Shenwu, D.M. Dhossche and Y. Liu. 2005. A capillary liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the quantification of  $\gamma$ -aminobutyric acid in human plasma and cerebrospinal fluid. **Journal of Chromatography B.** 814: 295 – 302.
3. L. Zhang and M. Sun. 2005. Selective determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid, glutamate and alanine by mixed micellar electrokinetic chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A.** 1095: 185 – 188.
4. H. L. Rowley, K.F. Martin and C.A. Marsden. 1995. Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high – performance liquid chromatography with *o* – phthalaldehyde-sulphite derivatisation. **Journal of Neuroscience Methods.** 57: 93 – 99.
5. J. Kehr. 1998. Determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in microdialysis samples by microbore column liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B.** 708: 49 – 54.
6. T.P. Piepponen and A. Skujins. 2001. Rapid and sensitive step gradient assays of glutamate, glycine, taurine and  $\gamma$ -aminobutyric acid by high – performance liquid chromatography-fluorescence detection with *o* – phthalaldehyde – mercaptoethanol derivatization with an emphasis on microdialysis samples. **Journal of Chromatography B.** 757: 277 – 283.
7. X. Kang, J. Xiao, X. Huang and Z. Gu. 2006. Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. **Clinica Chimica Acta.** 366: 352 – 356.
8. M.Y. Khuhawar and A.D. Rajper. 2003. Liquid chromatographic determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluid using 2 – hydroxynaphthaldehyde as derivatizing reagent. **Journal of Chromatography B.** 788: 413 – 418.
9. I. M.Perl and A. Vasanits. 1999. Stability and characteristics of the *o* – phthalaldehyde/ 3 – mercaptopropionic acid and *o* – phthalaldehyde/ *N*– acetyl – L – cysteine reagents and their amino acid derivatives measured by high – performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A.** 835: 73 – 91.

10. gamma – Aminobutyric acid. **CN bioscience**. 757: 277 – 283.
11. [http://en.wikipedia.org/wiki/Gamma-Aminobutyric\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Gamma-Aminobutyric_acid) (สืบค้นเมื่อ วันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557).
12. K. Inoue, T. Shirai, H. Ochiai, M. Kasao, K. Hayakawa, M. Kimura and H. Sansawa. 2003. Blood – pressure – lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. **European Journal of Clinical Nutrition**. 57: 490 – 495.
13. A. Ortega. 2003. A new role for GABA: inhibition of tumor cell migration. **TRENDS in Pharmacological Sciences**. 24: 151 – 154.
14. V. T. Tran, S.H. Snyder, L.F. Major and R.J. Hawley. 1981. GABA receptors are increased in brains of alcoholics. **Annals of Clinical and Translational Neurology**. 9: 289 – 292
15. P.J. Pike and C.W. Cotman. 1993. Cultured GABA – immunoreactive neurons are resistant to toxicity induced by beta – amyloid. **Neuroscience**. 56: 269 – 274.
16. H. Nakamura, T. Takishima, T. Kometani and H. Yokogoshi. 2009. Psychological stress – reducing effect of chocolate enriched with gamma – aminobutyric acid (GABA) in humans: assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. 60: 106- 113.
17. GABA in tea. **Tea Institute. (Mae Fah Luang University)**. 9: 289 – 292
18. [http://www.globalfia.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=54:lesson-7&catid=34:lessons&Itemid=86](http://www.globalfia.com/index.php?option=com_content&view=article&id=54:lesson-7&catid=34:lessons&Itemid=86).
19. <http://www.globalfia.com> (สืบค้นเมื่อ วันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557).
20. <http://www.hamiltoncompany.com> (สืบค้นเมื่อ วันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557).
21. <http://www.psanalytical.com> (สืบค้นเมื่อ วันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557).
22. แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ. 2553. “หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ”. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : บริษัท ชวนพิมพ์ 50 จำกัด.
23. M. Lu, T. Chiu, P. Chang, H. Ho and H. Chang. 2005. Determination of glycine, glutamine, glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluids by capillary electrophoresis with light – emitting diode – induced fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**. 538: 143 – 150.
24. P. Jannoey, H. Niamsup, S. Lumyong, S. Tajima, M. Nomura and G. Chairrote. 2010.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) Accumulations in rice during germination. **Chiang Mai**

**Journal of Science.** 37: 124 – 133.

25. S. Zhang, Y. Takeda, S. Hagioka, K. Takata, H. Aoe, H. Nakatsuka, M. Yokoyama and K. Morita. 2005. Measurement of GABA and glutamate in vivo levels with high sensitivity and frequency. **Brain Research Protocols.** 14: 61 – 66.
26. I.M. Perl and I. Bozoar. 1998. Comparison of the stability and UV and fluorescence characteristics of the *o*-phthaldialdehyde / 3-mercaptopropionic acid and *o*-phthaldialdehyde / N-acetyl-L-cysteine reagents and those of their amino acid derivatives. **Journal of Chromatography A.** 798: 37 – 46.
27. C. K. Zacharis, G. A. Theodoridis and A. N. Voulgaropoulos. 2004. On – line coupling of sequential injection with liquid chromatography for the automated derivatization and determination of  $\gamma$ -Aminobutyric acid in human biological fluids. **Journal of Chromatography B.** 808: 169 – 175.
28. M. T. Kelly, A. Blaise and M. Larroque. 2010. Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey. **Journal of Chromatography A.** 1217: 7385 – 7392.

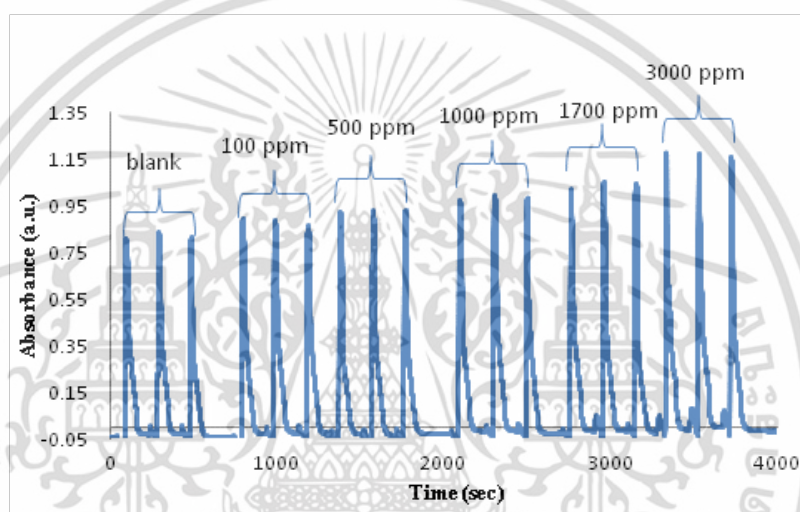
## ภาคผนวก ก

# ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

### 1. การศึกษาปัจจัยทางกายภาพ

#### 1.1 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์

ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในขั้นตอนการทำอนุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยเลือกศึกษาที่อุณหภูมิห้อง 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ



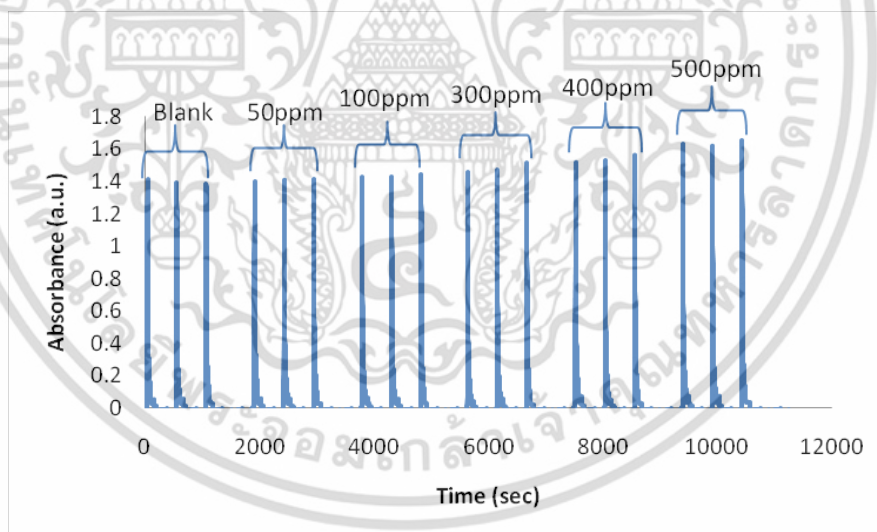
รูปที่ ก.1 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้สารอนุพันธ์กลับมาเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ ก.1 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้อง

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	0.8004	0	0.8121	0.015	1.955
	0.8302				
	0.8058				
100	0.8956	0.0836	0.0800	0.005	3.56
	0.8860	0.0740			
	0.8945	0.0825			
500	0.9229	0.1109	0.1119	0.001	0.94
	0.9238	0.1118			
	0.9250	0.1130			

ตารางที่ ก.1 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้อง (ต่อ)

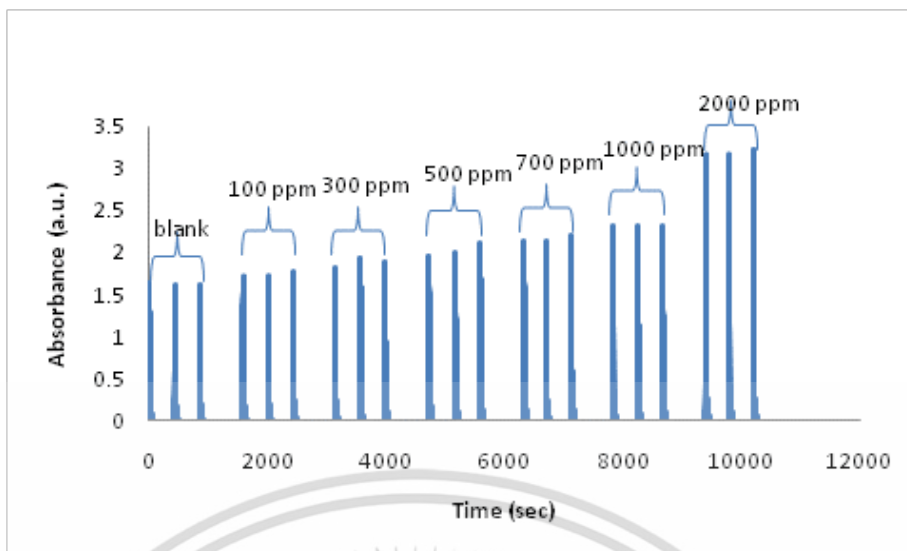
Conc (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
1000	0.9686	0.1566	0.1671	0.013	2.70
	0.9957	0.1837			
	0.9730	0.1610			
1700	1.0111	0.1991	0.2207	0.019	8.63
	1.0472	0.2352			
	1.0396	0.2276			
3000	1.1513	0.3393	0.3491	0.011	3.28
	1.1737	0.3617			
	1.1583	0.3463			



รูปที่ ก.1 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ก.1 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อให้อุณหภูมิขณะทำปฏิกิริยา  
อนุพันธ์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส

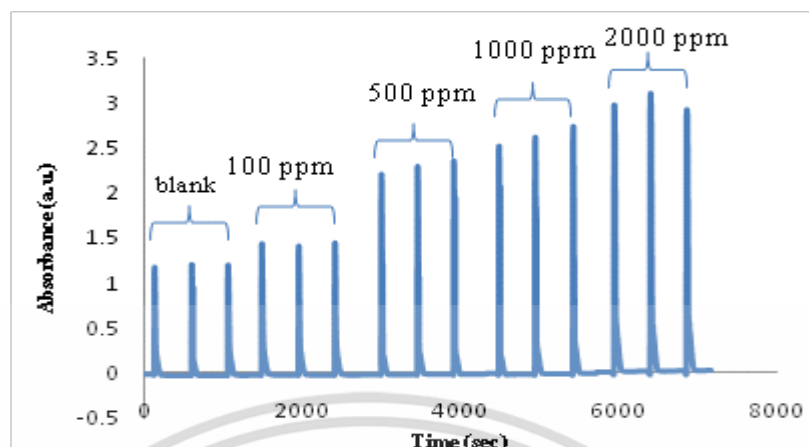
Conc. (ppm)	abs	avg	corr	SD	%RSD
blank	1.4103	1.396	0	0.014	0.97
	1.3937				
	1.3835				
50	1.3965	1.405	0.0096	0.008	0.57
	1.4079				
	1.4118				
100	1.4246	1.431	0.0355	0.008	0.57
	1.4292				
	1.4403				
300	1.4562	1.479	0.0832	0.029	1.99
	1.4687				
	1.5122				
400	1.5179	1.536	0.1397	0.022	1.45
	1.5281				
	1.5606				
500	1.6327	1.635	0.2390	0.017	1.05
	1.6189				
	1.6531				



รูปที่ ก.1 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ก.1 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อให้อุณหภูมิขณะทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

Conc. (ppm)	abs	avg	corr	SD	%RSD
blank	1.5780	1.6039	0	0.025	1.54
	1.6270				
	1.6067				
100	1.7090	1.7296	0.1257	0.033	1.88
	1.7128				
	1.7671				
500	1.8156	1.8741	0.2702	0.053	2.84
	1.9198				
	1.8870				
700	1.9490	2.0140	0.4101	0.083	4.10
	1.9860				
	2.1070				
1000	2.1248	2.1532	0.5493	0.047	2.19
	2.1271				
	2.2077				
2000	2.7152	2.3136	0.7097	0.002	0.09
	2.7144				
	2.7112				



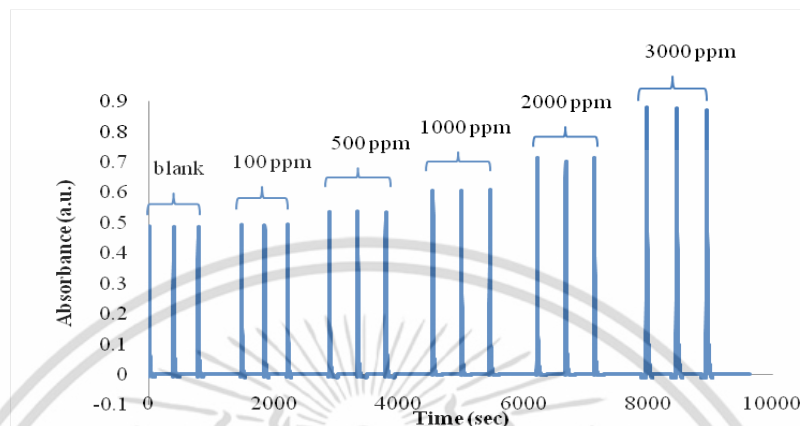
รูปที่ ก.1 (ง) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกานาเมื่อทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 70 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ก.1 (ง) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกานาเมื่อให้อุณหภูมิขณะทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 70 องศาเซลเซียส

Conc. (ppm)	abs	avg	corr	SD	%RSD
blank	1.1687	1.1900	0	0.016	1.38
	1.1997				
	1.1932				
100	1.4269	1.4200	0.23	0.018	1.24
	1.4043				
	1.4392				
500	1.8250	2.1600	0.97	0.289	13.39
	2.2897				
	2.354				
1000	2.5192	2.6200	1.43	0.109	4.14
	2.6175				
	2.7362				
2000	2.9200	2.9800	1.79	0.105	3.52
	3.1044				
	2.9243				

## 1.2 ศึกษาอิทธิพลของปริมาณสารละลายมาตรฐานกาบาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยานุพันธ์

ทำการศึกษาอิทธิพลสำหรับปริมาณของสารละลายมาตรฐานกาบาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยานุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยมีปริมาณของสารละลายมาตรฐานกาบาที่เลือกศึกษาคือ 50, 100 และ 150 ไมโครลิตร



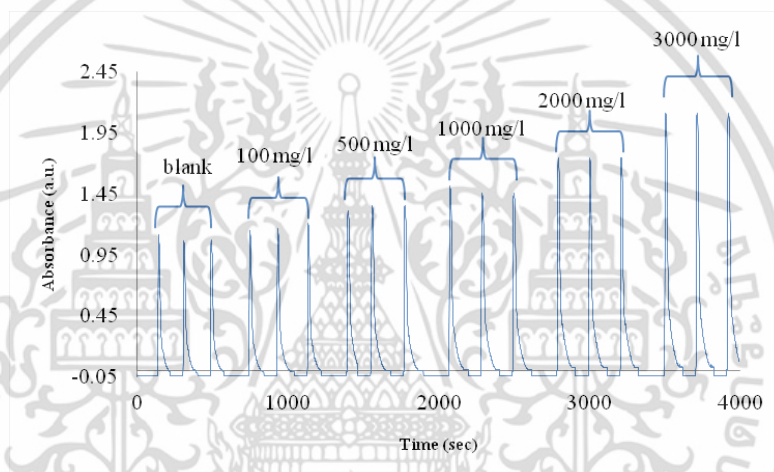
รูปที่ ก.2 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่คูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 50 ไมโครลิตร

ตารางที่ ก.2 (ก) ค่าการคูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่คูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 50 ไมโครลิตร

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	% RSD
blank	0.4882	0	0.4870	0.001	0.20
	0.4867				
	0.4863				
100	0.4929	0.0060	0.0062	0.002	3.04
	0.4910	0.0040			
	0.4957	0.0090			
500	0.5360	0.0490	0.0493	0.001	2.72
	0.5378	0.0510			
	0.5351	0.0480			
1000	0.6051	0.1180	0.1192	0.002	1.63
	0.6051	0.1180			
	0.6085	0.1210			

ตารางที่ ก.2 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อให้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่คูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 50 ไมโครลิตร (ต่อ)

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	% RSD
2000	0.7151	0.2280	0.2234	0.007	3.06
	0.7025	0.2160			
	0.7136	0.2270			
3000	0.8794	0.3920	0.3886	0.004	1.05
	0.8763	0.3890			
	0.8713	0.3840			



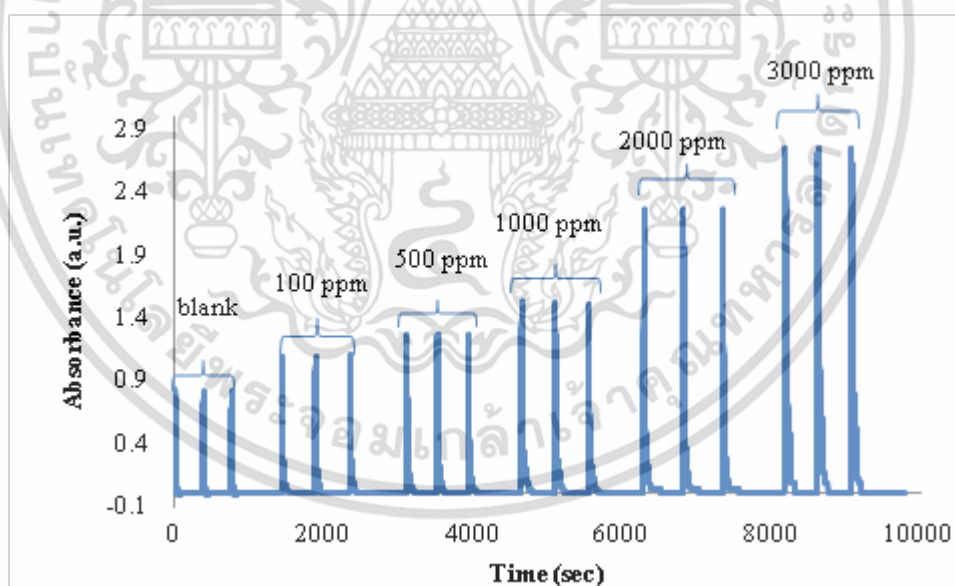
รูปที่ ก.2 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อให้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่คูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 100 ไมโครลิตร

ตารางที่ ก.2 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อให้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่คูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 100 ไมโครลิตร

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
0	1.1110	0	1.0797	0.028	2.60
	1.0568				
	1.0713				
100	1.2195	0.1398	0.1363	0.006	4.28
	1.2193	0.1396			
	1.2093	0.1296			

ตารางที่ ก.2 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อให้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่คูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 100 ไมโครลิตร (ต่อ)

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
500	1.3113	0.2316	0.2590	0.024	9.17
	1.3524	0.2727			
	1.3524	0.2727			
1000	1.5192	0.4395	0.3996	0.035	8.65
	1.4597	0.3800			
	1.4590	0.3793			
2000	1.7454	0.6657	0.6638	0.002	0.32
	1.7412	0.6615			
	1.7441	0.6644			
3000	2.1155	1.0358	1.0296	0.005	0.52
	2.1071	1.0273			
	2.1054	1.0257			



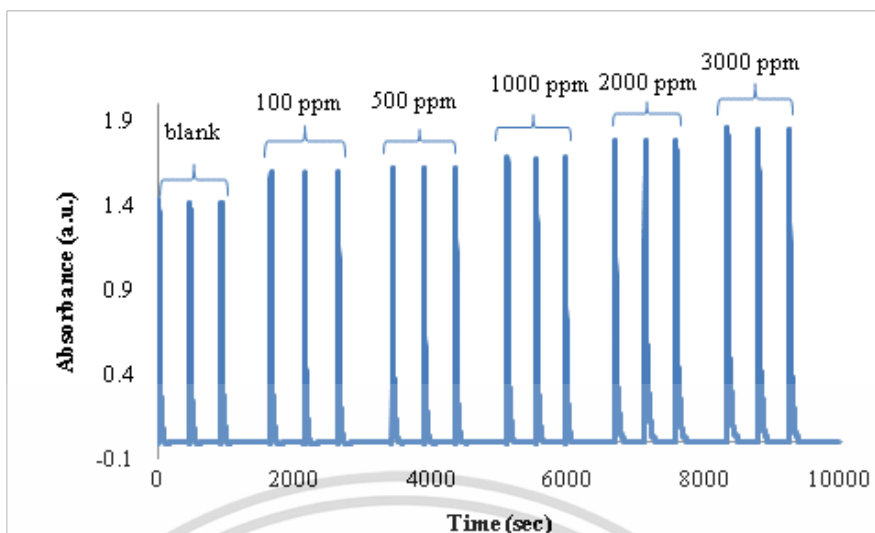
รูปที่ ก.2 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อให้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่คูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 150 ไมโครลิตร

ตารางที่ ก.2 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อให้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่ดูดเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าทำปฏิกิริยาเท่ากับ 150 ไมโครลิตร

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	% RSD
<b>blank</b>	0.8295	0	0.824	0.005	0.62
	0.8200				
	0.8215				
<b>100</b>	1.0885	0.264	0.2666	0.008	2.90
	1.0841	0.260			
	1.0992	0.275			
<b>500</b>	1.2697	0.446	0.4427	0.003	0.75
	1.2672	0.443			
	1.2631	0.439			
<b>1000</b>	1.5812	0.757	0.7317	0.022	3.05
	1.5458	0.722			
	1.5400	0.716			
<b>2000</b>	2.2622	1.438	1.4381	0.001	0.08
	2.2610	1.437			
	2.2632	1.439			
<b>3000</b>	2.7537	1.930	1.8736	0.049	2.60
	2.6730	1.849			
	2.6662	1.842			

### 1.3 ศึกษาอิทธิพลของเวลาในการให้ความร้อน

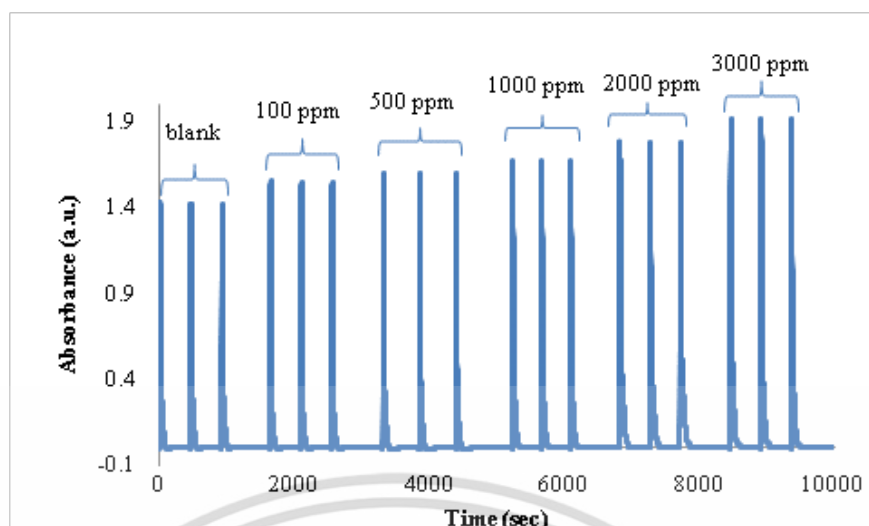
ทำการศึกษาอิทธิพลของเวลาในการให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยใช้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานกามาเท่ากับ 150 ไมโครลิตร และเวลาที่เลือกศึกษาคือ 1, 3 และ 5 นาที



รูปที่ 3 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 1 นาที

ตารางที่ 3 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 1 นาที

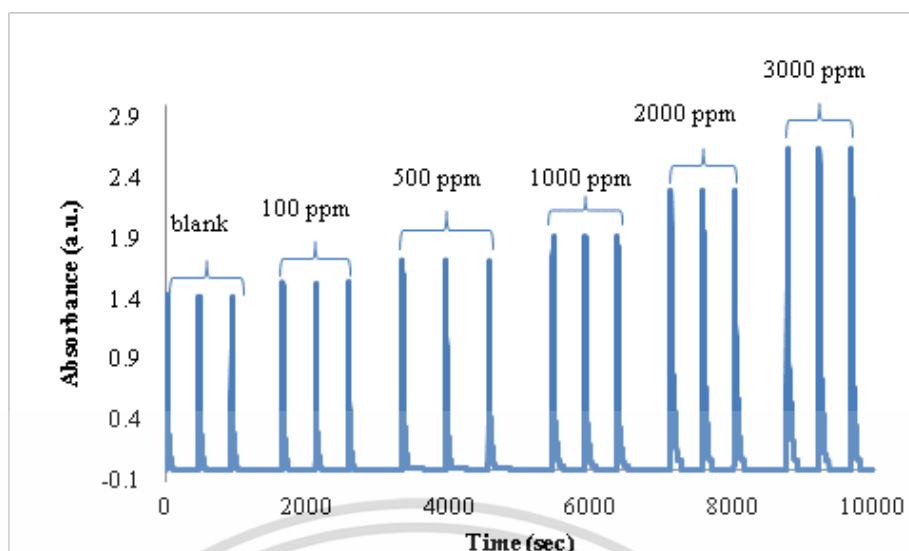
Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	1.4330	0	1.4234	0.008	0.58
	1.4190				
	1.4183				
100	1.5972	0.1738	0.1728	0.001	0.55
	1.5953	0.1719			
	1.5963	0.1729			
500	1.6116	0.1882	0.1889	0.002	0.96
	1.6144	0.1910			
	1.6110	0.1876			
1000	1.6553	0.2319	0.2310	0.004	1.73
	1.6500	0.2266			
	1.6579	0.2345			
2000	1.7242	0.3008	0.3006	0.001	0.43
	1.7226	0.2992			
	1.7251	0.3017			
3000	1.8069	0.3835	0.3837	0.002	0.60
	1.8049	0.3815			
	1.8095	0.3861			



รูปที่ ก.3 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาวาเมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 3 นาที

ตารางที่ ก.3 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาวา เมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 3 นาที

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
<b>blank</b>	1.4330	0	1.4234	0.008	0.58
	1.4190				
	1.4183				
<b>100</b>	1.5913	0.1679	0.1683	0.000	0.28
	1.5916	0.1682			
	1.5922	0.1688			
<b>500</b>	1.6059	0.1825	0.1820	0.001	0.56
	1.6060	0.1826			
	1.6042	0.1808			
<b>1000</b>	1.6760	0.2526	0.2523	0.001	0.26
	1.6761	0.2527			
	1.6749	0.2515			
<b>2000</b>	1.7859	0.3625	0.3602	0.002	0.60
	1.7816	0.3582			
	1.7832	0.3598			
<b>3000</b>	1.9169	0.4935	0.4935	0.002	0.47
	1.9146	0.4912			
	1.9192	0.4958			



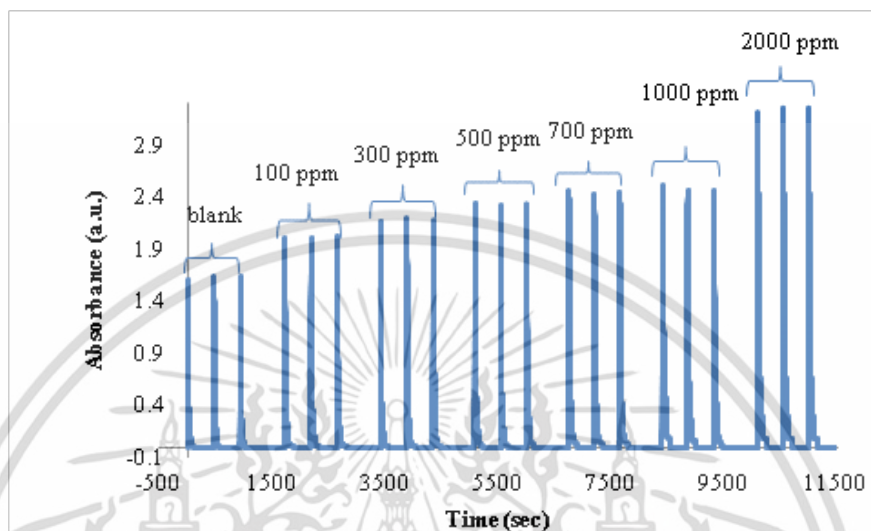
รูปที่ 3 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 3 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามา เมื่อให้ความร้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เป็นเวลา 5 นาที

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	1.4330	0	1.4234	0.008	0.58
	1.4190				
	1.4183				
100	1.6024	0.1790	0.1794	0.002	0.99
	1.6012	0.1778			
	1.6047	0.1813			
500	1.7142	0.2908	0.2913	0.001	0.31
	1.7157	0.2923			
	1.7141	0.2907			
1000	1.9121	0.4887	0.4915	0.003	0.53
	1.9154	0.4920			
	1.9172	0.4938			
2000	2.2901	0.8667	0.8676	0.002	0.21
	2.2899	0.8665			
	2.2931	0.8697			
3000	2.6300	1.2066	1.2071	0.002	0.15
	2.6291	1.2057			
	2.6325	1.2091			

### 1.4 ศึกษาอิทธิพลของความยาวมิกซิงคอยด์

ทำการศึกษาอิทธิพลของความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ ใช้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานกาบาเท่ากับ 150 ไมโครลิตรและความยาวที่เลือกศึกษาคือ 100, 200, 300 และ 400 เซนติเมตร



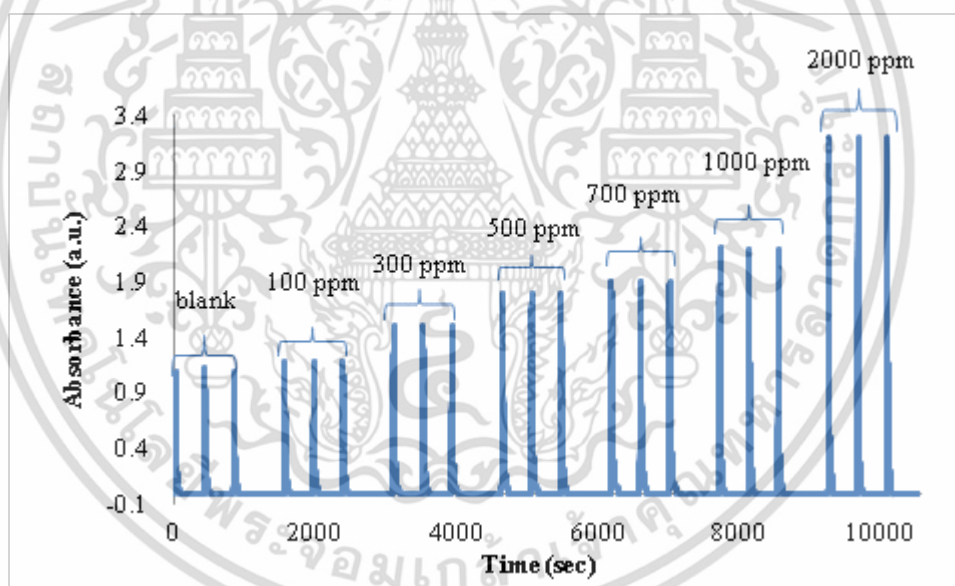
รูปที่ ก.4 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 100 เซนติเมตร

ตารางที่ ก.4 (ก) ค่าการคูณคลื่นแสงของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 100 เซนติเมตร

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	1.6150	0	1.6271	0.011	0.70
	1.6290				
	1.6374				
100	2.0157	0.3886	0.3916	0.006	1.42
	2.0152	0.3881			
	2.0251	0.3980			
300	2.1742	0.5471	0.5564	0.015	2.63
	2.2004	0.5733			
	2.1761	0.5490			
500	2.3414	0.7143	0.7061	0.007	1.04
	2.3275	0.7004			
	2.3306	0.7035			

ตารางที่ ก.4 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 100 เซนติเมตร (ต่อ)

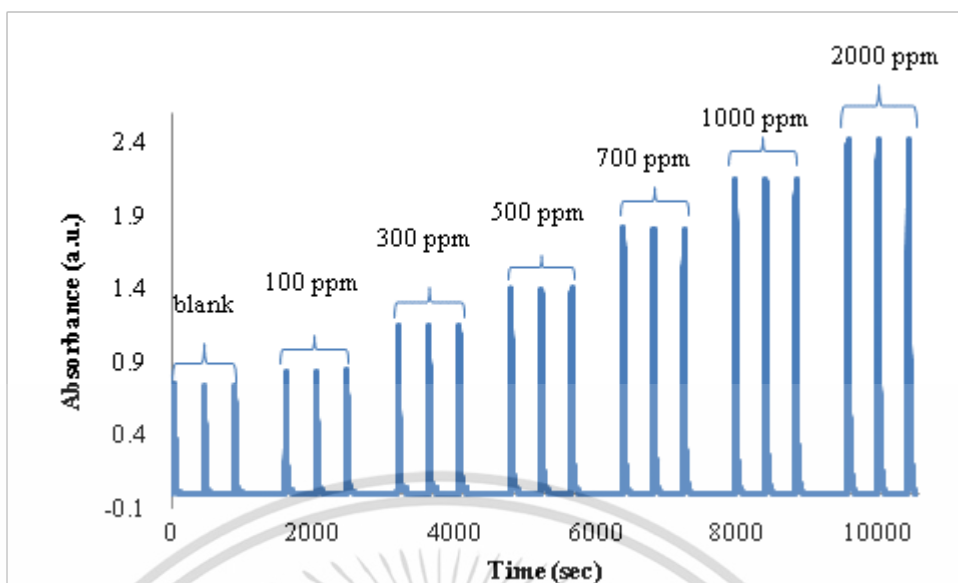
Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
700	2.4595	0.8324	0.8190	0.012	1.52
	2.4351	0.8080			
	2.4436	0.8165			
1000	2.5907	0.9636	0.9652	0.003	0.27
	2.5909	0.9638			
	2.5952	0.9681			
2000	3.1752	1.5481	1.5485	0.002	0.10
	3.1773	1.5502			
	3.1743	1.5472			



รูปที่ ก.4 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 200 เซนติเมตร

ตารางที่ ก.4 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกบาวา เมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ใน  
ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 200 เซนติเมตร

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
<b>blank</b>	1.1017	0	1.1477	0.043	3.76
	1.1872				
	1.1541				
<b>100</b>	1.1872	0.0395	0.037	0.003	8.60
	1.1854	0.0377			
	1.1811	0.0334			
<b>300</b>	1.5183	0.3706	0.363	0.007	1.88
	1.5058	0.3581			
	1.5073	0.3596			
<b>500</b>	1.7087	0.5610	0.618	0.049	7.97
	1.7925	0.6448			
	1.7953	0.6476			
<b>700</b>	1.9008	0.7531	0.755	0.003	0.39
	1.9059	0.7582			
	1.9008	0.7531			
<b>1000</b>	2.2095	1.0618	1.058	0.003	0.32
	2.2032	1.0555			
	2.2043	1.0566			
<b>2000</b>	3.5100	2.3623	2.356	0.005	0.22
	3.5010	2.3533			
	3.5007	2.3530			



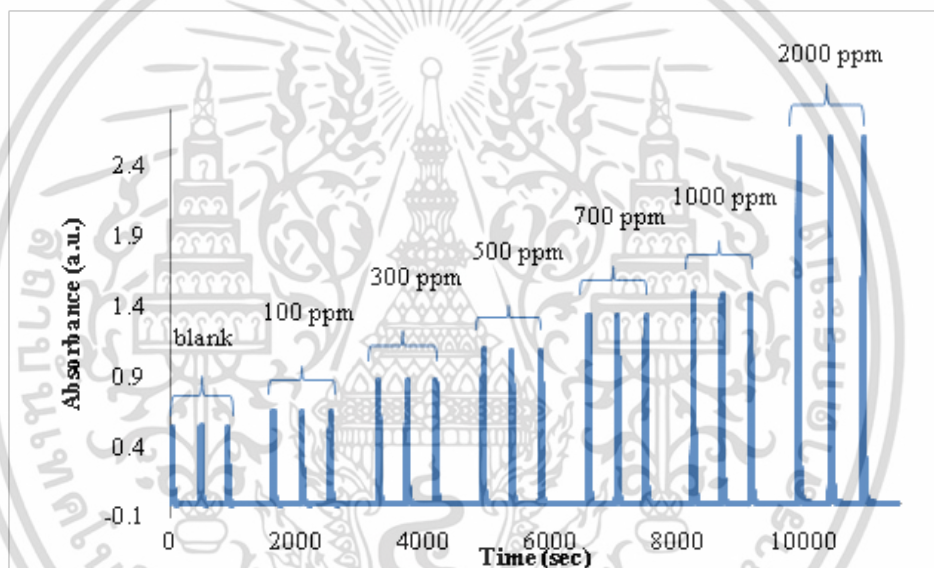
รูปที่ ก.4 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 300 เซนติเมตร

ตารางที่ ก.4 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 300 เซนติเมตร

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	0.7489	0	0.7452	0.004	0.49
	0.7452				
	0.7415				
100	0.8469	0.1017	0.1021	0.0007	0.67
	0.8481	0.1029			
	0.8470	0.1018			
300	1.1702	0.4250	0.4269	0.002	0.43
	1.1738	0.4286			
	1.1724	0.4272			
500	1.3545	0.6093	0.6220	0.025	3.95
	1.3515	0.6063			
	1.3955	0.6503			
700	1.6275	0.8823	0.8810	0.001	0.13
	1.6252	0.8800			
	1.6259	0.8807			

ตารางที่ ก.4 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามา เมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ใน  
ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 300 เซนติเมตร (ต่อ)

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
1000	1.9176	1.1724	1.1711	0.003	0.28
	1.9125	1.1673			
	1.9188	1.1736			
2000	3.3232	2.5780	2.5772	0.001	0.03
	3.3215	2.5763			
	3.3225	2.5773			



รูปที่ ก.4 (ง) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ในขั้นตอน  
การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 400 เซนติเมตร

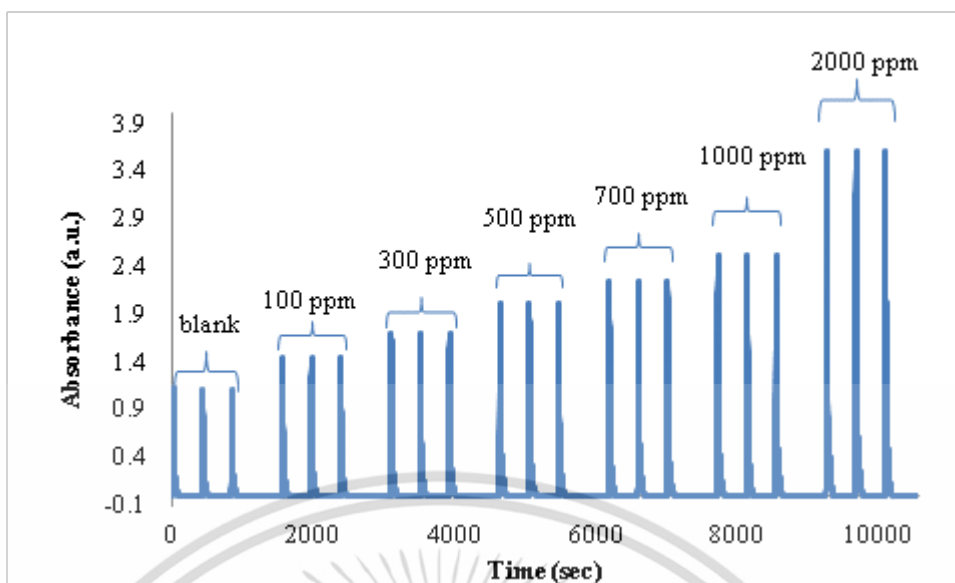
ตารางที่ ก.4 (ง) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกบา เมื่อใช้ความยาวมิกซิงคอยด์ใน  
ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 400 เซนติเมตร

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	0.5485	0	0.5487	0.001	0.10
	0.5493				
	0.5483				
100	0.6398	0.0911	0.0905	0.0009	0.96
	0.6382	0.0895			
	0.6395	0.0908			
300	0.9577	0.4090	0.4050	0.004	0.92
	0.9503	0.4016			
	0.9532	0.4045			
500	1.1912	0.6425	0.6457	0.004	0.65
	1.1992	0.6505			
	1.1929	0.6442			
700	1.5623	1.0136	1.0139	0.0003	0.03
	1.5630	1.0143			
	1.5625	1.0138			
1000	1.9586	1.4099	1.4070	0.003	0.19
	1.9551	1.4064			
	1.9533	1.4046			
2000	3.1757	2.6270	2.6268	0.0003	0.01
	3.1755	2.6268			
	3.1752	2.6265			

### 1.5 ศึกษาอิทธิพลของลำดับในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์

ทำการศึกษาอิทธิพลของลำดับในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยใช้มิกซิงคอยด์ความยาว 200 เซนติเมตร และลำดับในการทำปฏิกิริยาที่เลือกศึกษาคือ

1. ลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ non-sandwich
2. ลำดับการทำปฏิกิริยาแบบ sandwich



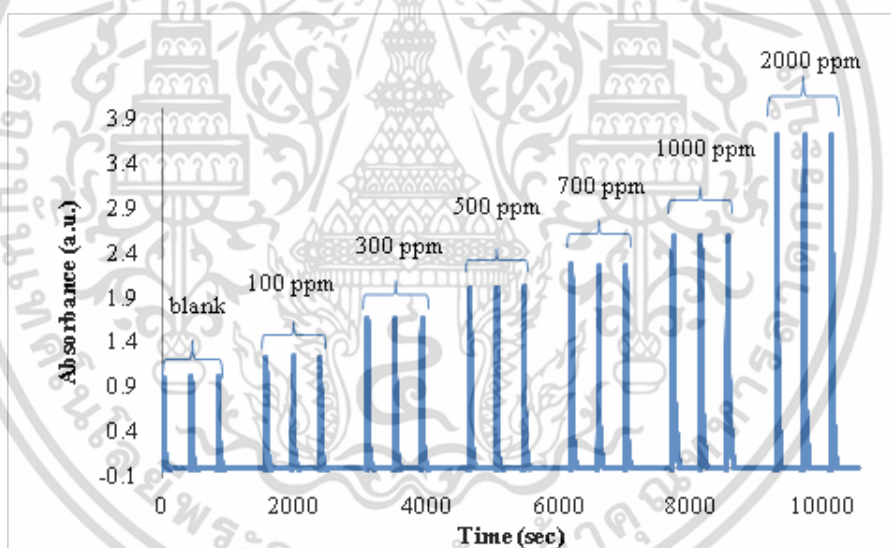
รูปที่ ๓.๕ (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกบามาเมื่อใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบ non-sandwich

ตารางที่ ๓.๕ (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกบามา เมื่อใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบ non-sandwich

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	1.1002	0	1.1037	0.004	0.40
	1.1022				
	1.1087				
100	1.4415	0.3378	0.338	0.001	0.23
	1.4418	0.3381			
	1.4429	0.3392			
300	1.6963	0.5926	0.592	0.001	0.18
	1.6952	0.5915			
	1.6941	0.5904			
500	2.0165	0.9128	0.910	0.003	0.36
	2.0100	0.9063			
	2.0140	0.9103			

ตารางที่ ก.5 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบ non-sandwich (ต่อ)

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
700	2.2512	1.1475	1.148	0.001	0.06
	2.2518	1.1481			
	2.2525	1.1488			
1000	2.5230	1.4193	1.419	0.000	0.01
	2.5233	1.4196			
	2.5233	1.4196			
2000	3.6131	2.5094	2.511	0.001	0.05
	3.6144	2.5107			
	3.6157	2.5120			



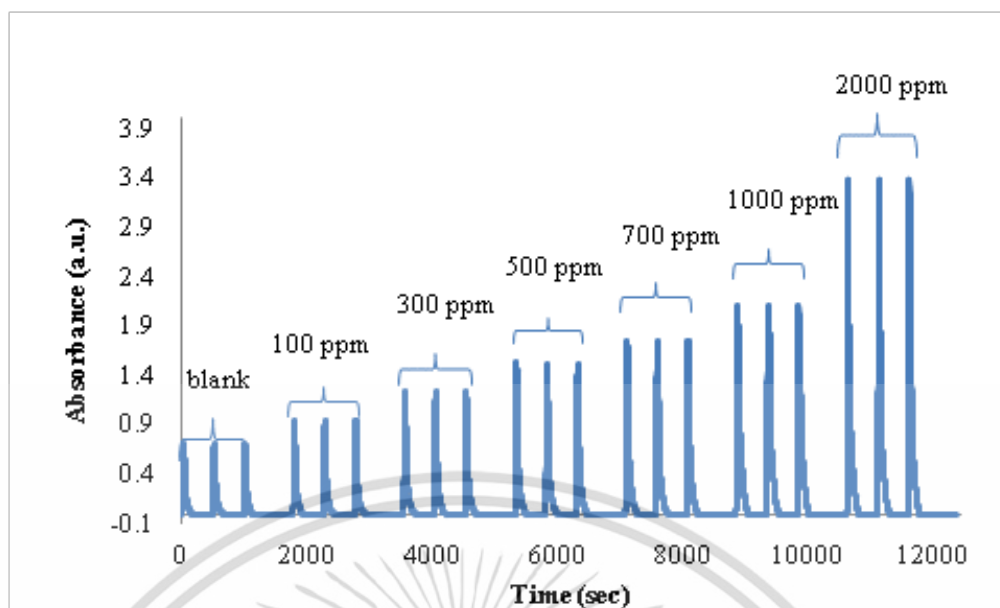
รูปที่ ก.5 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบ sandwich

ตารางที่ ก.5 (๗) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกบาว เมื่อใช้ลำดับในการทำปฏิกิริยา  
อนุพันธ์แบบ sandwich

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	1.0109	0	1.0220	0.010	1.01
	1.0237				
	1.0312				
100	1.3399	0.3179	0.3200	0.003	0.89
	1.3454	0.3234			
	1.3412	0.3192			
300	1.6758	0.6538	0.6510	0.003	0.53
	1.6730	0.6510			
	1.6690	0.6470			
500	2.0035	0.9815	0.9810	0.000	0.03
	2.0036	0.9816			
	2.0031	0.9811			
700	2.2655	1.2435	1.2440	0.003	0.25
	2.2631	1.2411			
	2.2692	1.2472			
1000	2.5832	1.5612	1.5600	0.001	0.06
	2.5815	1.5595			
	2.5817	1.5597			
2000	3.7216	2.6996	2.7000	0.000	0.01
	3.7212	2.6992			
	3.7220	2.7000			

### 1.6 ศึกษาอิทธิพลของอัตราการใช้

ทำการศึกษาอิทธิพลของอัตราการใช้ของสารในขณะที่เข้าสู่ระบบตรวจวัดที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยใช้ปริมาณของสารละลายมาตรฐานกบาวในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 150 ไมโครลิตร ความยาวมิกซิงคอยด์ 200 เซนติเมตร และลำดับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แบบ sandwich และอัตราการใช้ที่เลือกศึกษาคือ 25, 50 และ 100 ไมโครลิตร/นาที่



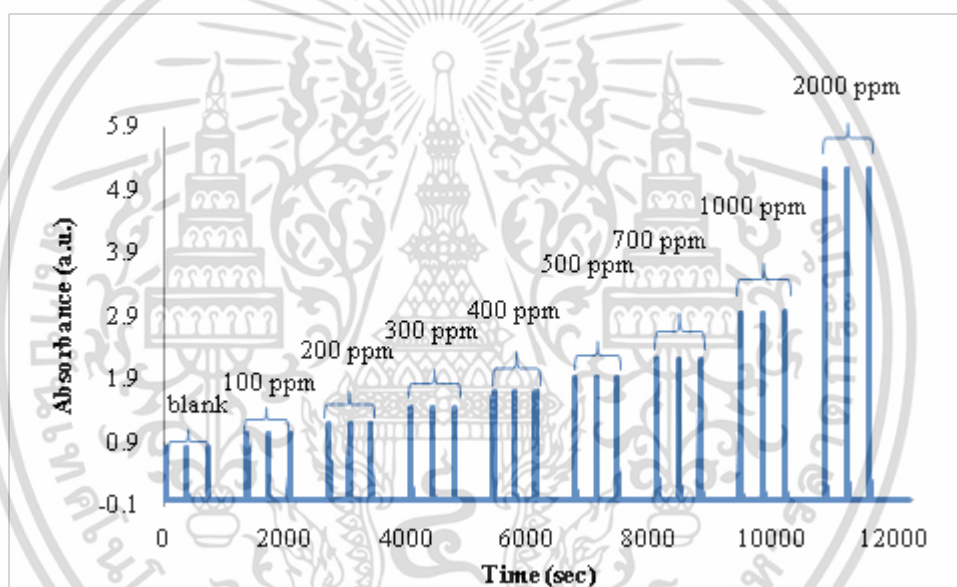
รูปที่ 6 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะเข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร/นาที

ตารางที่ 6 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะเข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร/นาที

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	0.7061	0	0.7051	0.002	0.33
	0.7068				
	0.7025				
100	0.9471	0.2420	0.242	0.003	1.33
	0.9508	0.2457			
	0.9443	0.2392			
300	1.2355	0.5304	0.532	0.002	0.36
	1.2388	0.5337			
	1.2355	0.5304			
500	1.5208	0.8157	0.816	0.001	0.07
	1.5216	0.8165			
	1.5219	0.8168			
700	1.7539	1.0488	1.049	0.001	0.08
	1.7549	1.0498			
	1.7532	1.0481			

ตารางที่ ก.6 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะเข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร/นาที (ต่อ)

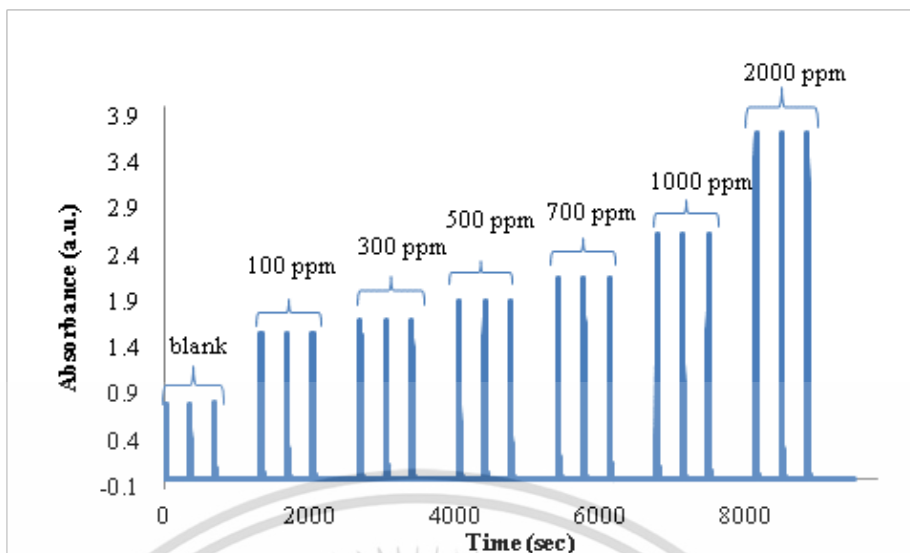
Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
1000	2.0951	1.3900	1.390	0.000	0.03
	2.0956	1.3905			
	2.0958	1.3907			
2000	3.3752	2.6701	2.669	0.001	0.05
	3.3740	2.6689			
	3.3727	2.6676			



รูปที่ ก.6 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกามา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะเข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร/นาที

ตารางที่ ก.6 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะ  
เข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร/นาที

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
<b>blank</b>	0.7589	0	0.7567	0.003	0.35
	0.7575				
	0.7538				
<b>100</b>	1.1241	0.3674	0.3540	0.012	3.42
	1.1020	0.3453			
	1.1046	0.3479			
<b>300</b>	1.3920	0.6353	0.6330	0.002	0.37
	1.3874	0.6307			
	1.3890	0.6323			
<b>500</b>	1.7730	1.0163	0.9950	0.019	1.88
	1.7408	0.9841			
	1.7405	0.9838			
<b>700</b>	2.1154	1.3587	1.3560	0.003	0.23
	2.1127	1.3560			
	2.1092	1.3525			
<b>1000</b>	2.4951	1.7384	1.7390	0.000	0.02
	2.4956	1.7389			
	2.4958	1.7391			
<b>2000</b>	3.6752	2.9185	2.917	0.001	0.04
	3.6740	2.9173			
	3.6727	2.9160			



รูปที่ 6 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกานา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะที่เข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 100 ไมโครลิตร/นาที

ตารางที่ 6.6 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกานา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะที่เข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 100 ไมโครลิตร/นาที

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	0.8018	0	0.8057	0.003	0.43
	0.8069				
	0.8085				
100	1.5621	0.8564	0.8580	0.003	0.39
	1.5676	0.8619			
	1.5614	0.8557			
300	1.6940	0.9883	0.9890	0.002	0.16
	1.6959	0.9902			
	1.6928	0.9871			
500	1.9044	1.1987	1.1980	0.001	0.12
	1.9045	1.1988			
	1.9019	1.1962			
700	2.1500	1.4443	1.4460	0.002	0.11
	2.1514	1.4457			
	2.1532	1.4475			

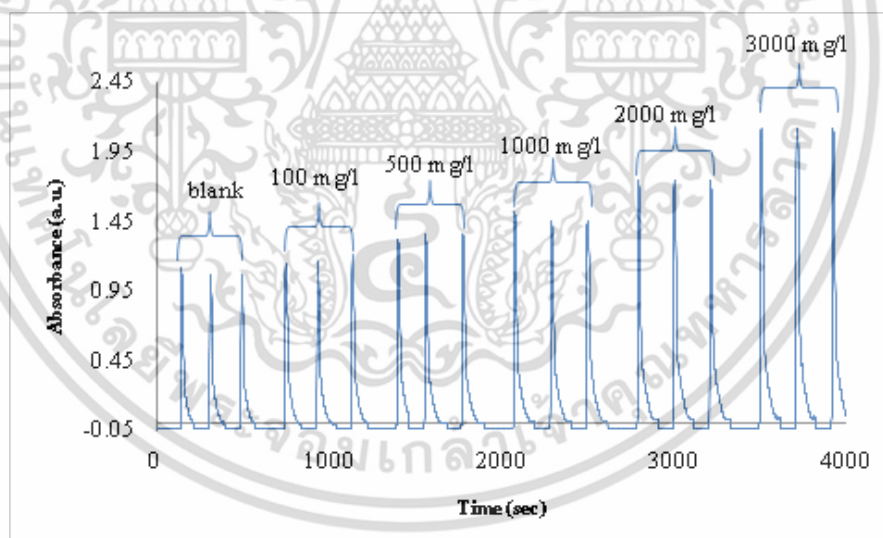
ตารางที่ ก.6 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามา เมื่อใช้อัตราการไหลของสารในขณะเข้าสู่ระบบตรวจวัดเท่ากับ 100 ไมโครลิตร/นาที (ต่อ)

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
1000	2.6325	1.9268	1.9260	0.001	0.03
	2.6312	1.9255			
	2.6316	1.9259			
2000	3.7101	3.0044	3.0050	0.0003	0.02
	3.7110	3.0053			
	3.7104	3.0047			

## 2. การศึกษาปัจจัยทางเคมี

### 2.1 ศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์

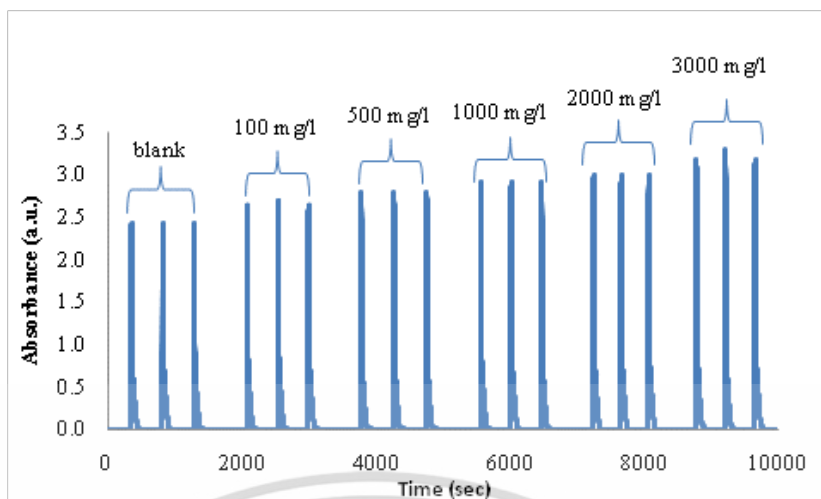
การศึกษอิทธิพลของพีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์โดยพีเอชที่เลือกศึกษาคือ 8, 9 และ 10 ตามลำดับ



รูปที่ ก.7 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 8.0

ตารางที่ ก.7 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ใน  
การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 8.0 (ต่อ)

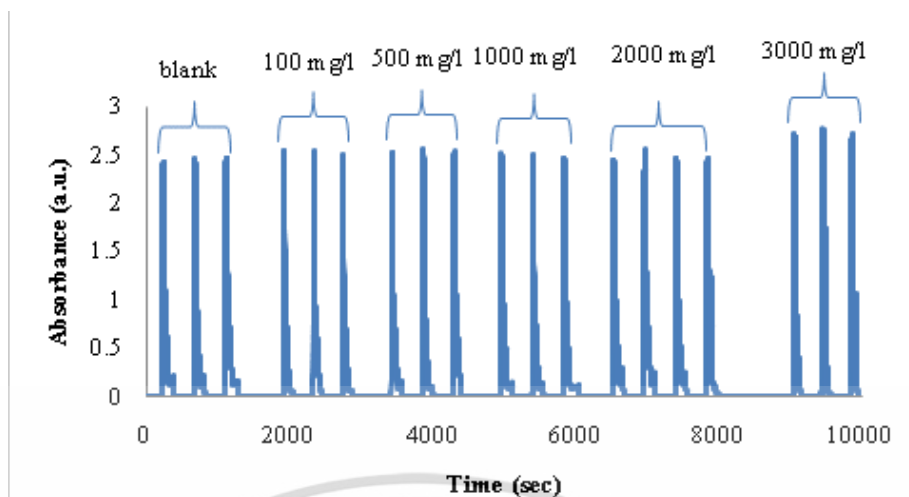
Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
<b>blank</b>	1.1110	0	1.0797	0.028	2.60
	1.0568				
	1.0713				
<b>100</b>	1.1513	0.0715	0.0936	0.031	32.76
	1.1603	0.0806			
	1.2083	0.1286			
<b>500</b>	1.3113	0.2316	0.2590	0.024	9.17
	1.3524	0.2727			
	1.3524	0.2727			
<b>1000</b>	1.5152	0.4355	0.3936	0.036	9.24
	1.4547	0.3750			
	1.4500	0.3703			
<b>2000</b>	1.7459	0.6662	0.6650	0.001	0.15
	1.7442	0.6645			
	1.7441	0.6644			
<b>3000</b>	2.1105	1.0308	1.0269	0.003	0.33
	2.1041	1.0243			
	2.1054	1.0257			



รูปที่ ก.7 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 9.0

ตารางที่ ก.7 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามา เมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 9.0

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	2.4234	0	2.443	0.046	1.88
	2.4956				
	2.4100				
100	2.6373	0.194	0.2228	0.026	11.79
	2.6890	0.246			
	2.6711	0.228			
500	2.7871	0.344	0.2967	0.044	14.86
	2.7000	0.257			
	2.7319	0.289			
1000	2.8667	0.424	0.4217	0.003	0.81
	2.8608	0.418			
	2.8667	0.424			
2000	2.9986	0.556	0.5535	0.003	0.59
	2.9981	0.555			
	2.9927	0.550			
3000	3.1798	0.737	0.7734	0.063	8.18
	3.2895	0.847			
	3.1800	0.737			



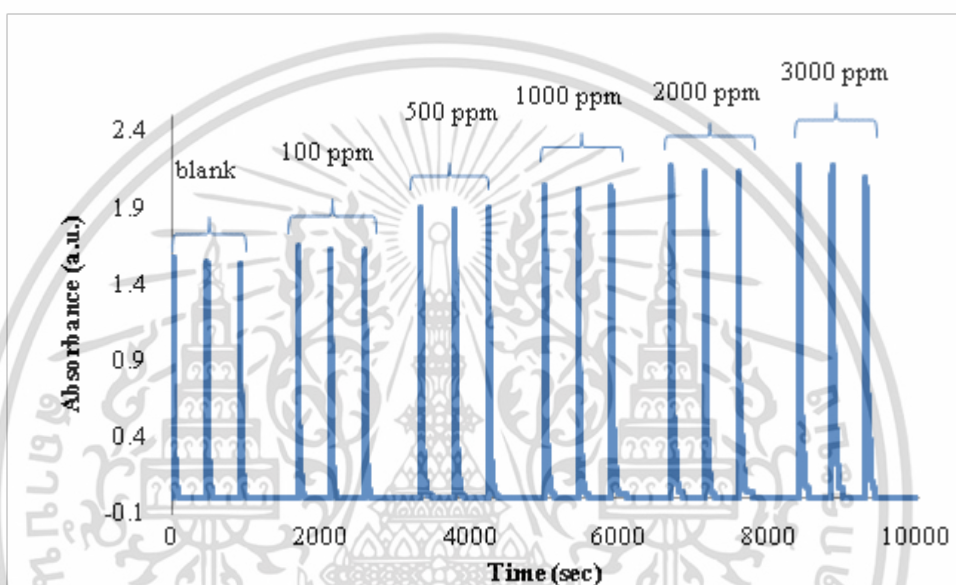
รูปที่ ก.7 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกามาเมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 10.0

ตารางที่ ก.7 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกามา เมื่อใช้พีเอชของบอเรตบัฟเฟอร์ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 10.0

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
<b>blank</b>	2.4044	0	2.4387	0.030	1.22
	2.4568				
	2.4548				
<b>100</b>	2.5060	0.0670	0.0665	0.005	7.12
	2.5099	0.0710			
	2.5005	0.0620			
<b>500</b>	2.5288	0.0900	0.0976	0.013	1.49
	2.5518	0.1130			
	2.5292	0.0900			
<b>1000</b>	2.5105	0.0710	0.0540	0.025	4.84
	2.5045	0.0660			
	2.4640	0.0250			
<b>2000</b>	2.5174	0.0780	0.0944	0.028	2.82
	2.5659	0.1270			
	2.5169	0.0780			
<b>3000</b>	2.5298	0.0910	0.1103	0.017	1.74
	2.5630	0.1240			
	2.5552	0.1160			

## 2.2 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นรีเอเจนต์ (2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์) ต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์

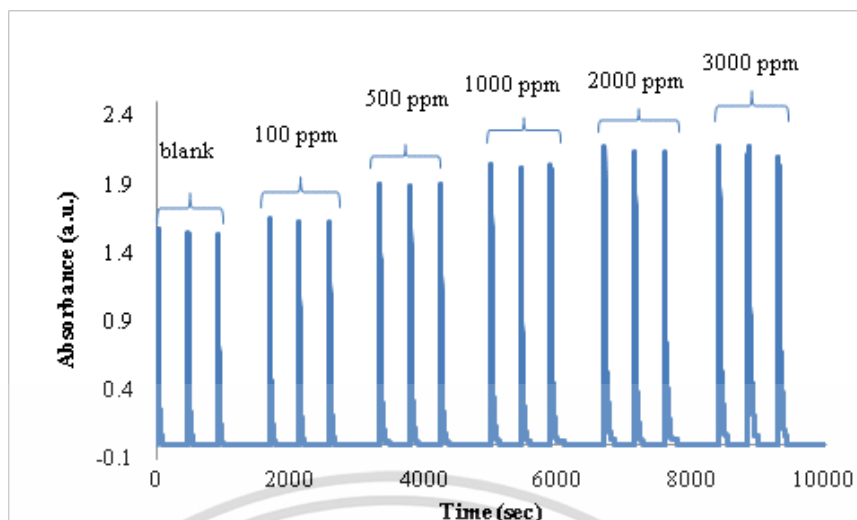
การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ที่ใช้ในการทำอนุพันธ์ ที่ส่งผลต่อความไวในการวิเคราะห์ โดยปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน กาบามาในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ 150 ไมโครลิตรและความเข้มข้นที่เลือกศึกษาคือร้อยละ 3, 5, 6 และ 7 (น้ำหนัก/ ปริมาตร)



รูปที่ ก.8 (ก) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบามาเมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 0.3 (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

ตารางที่ ก.8 (ก) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ของ 2-ไฮดรอกซีเนปทาเลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 0.3 (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

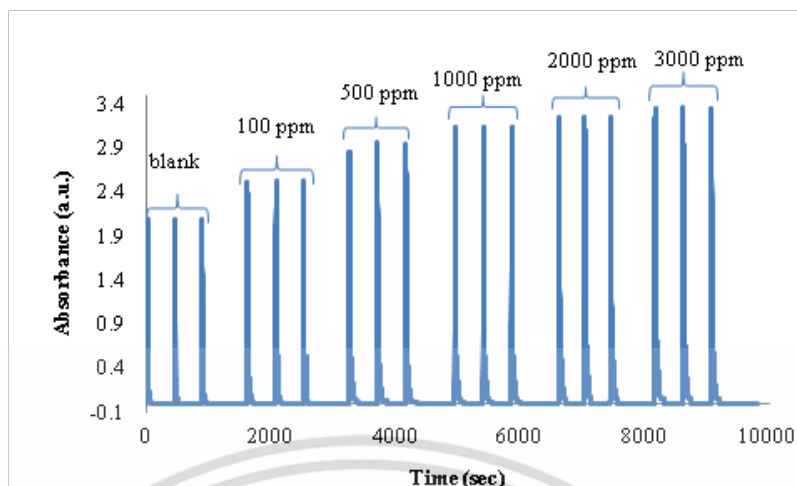
Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
<b>blank</b>	1.5715	0	1.5512	0.019	1.21
	1.5479				
	1.5342				
<b>100</b>	1.6491	0.0979	0.0842	0.012	14.25
	1.6308	0.0796			
	1.6264	0.0752			
<b>500</b>	1.9047	0.3535	0.3504	0.007	2.11
	1.8932	0.3420			
	1.9070	0.3558			
<b>1000</b>	2.0469	0.4957	0.4822	0.017	3.48
	2.0147	0.4635			
	2.0388	0.4876			
<b>2000</b>	2.1769	0.6257	0.5967	0.025	4.22
	2.1321	0.5809			
	2.1346	0.5834			
<b>3000</b>	2.1734	0.6222	0.5977	0.042	7.05
	2.1731	0.6219			
	2.1003	0.5491			



รูปที่ ก.8 (ข) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาวาเมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับปริเอเจนต์ของ 2-ไอโดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 3 (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

ตารางที่ ก.8 (ข) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาวา เมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับปริเอเจนต์ของ 2-ไอโดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 3 (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

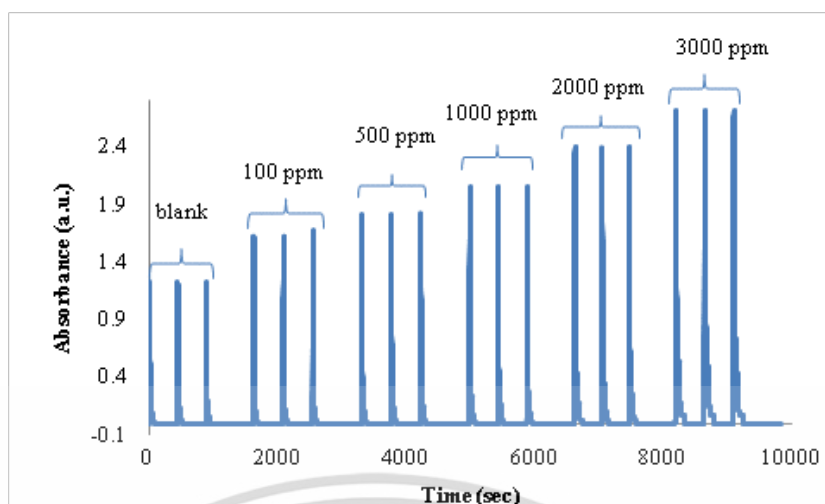
Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	1.6415	0	1.6392	0.005	0.29
	1.6337				
	1.6423				
100	1.6758	0.0366	0.0388	0.002	5.05
	1.6795	0.0404			
	1.6785	0.0393			
500	2.2178	0.5786	0.5811	0.036	6.22
	2.2576	0.6184			
	2.1854	0.5463			
1000	2.3843	0.7452	0.7390	0.005	0.72
	2.3750	0.7358			
	2.3753	0.7361			
2000	2.4076	0.7684	0.7670	0.017	2.26
	2.3882	0.7490			
	2.4227	0.7836			
3000	2.4312	0.7920	0.7916	0.001	0.08
	2.4300	0.7908			
	2.4310	0.7918			



รูปที่ 8 (ค) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกานาเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ของ 2-ไอดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

ตารางที่ 8 (ค) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกานา เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ของ 2-ไอดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	% RSD
blank	2.0936	0	2.0927	0.001	0.07
	2.0935				
	2.0911				
100	2.8095	0.7165	0.7316	0.013	1.80
	2.8334	0.7404			
	2.8311	0.7381			
500	2.9184	0.8254	0.8428	0.016	1.87
	2.9398	0.8468			
	2.9491	0.8561			
1000	3.1423	1.0493	1.0492	0.001	0.11
	3.1410	1.0480			
	3.1433	1.0503			
2000	3.4510	1.3580	1.3610	0.005	0.35
	3.4514	1.3584			
	3.4594	1.3664			
3000	3.7650	1.6720	1.6729	0.001	0.06
	3.7659	1.6729			
	3.7669	1.6739			



รูปที่ 8.8 (ง) แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบาเมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 7.5 (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

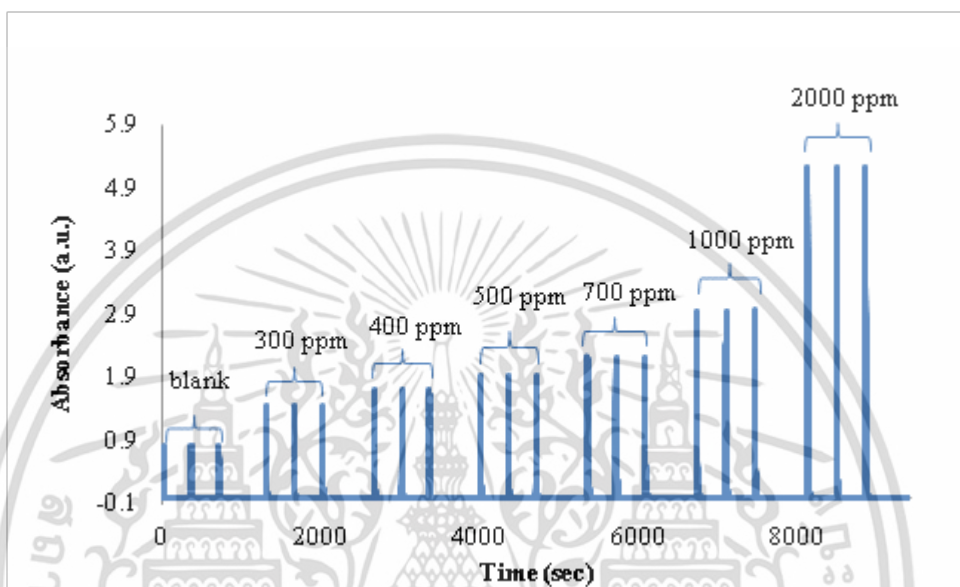
ตารางที่ 8.8 (ง) ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา เมื่อใช้ความเข้มข้นสำหรับรีเอเจนต์ของ 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์ ในการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 7.5 (น้ำหนัก/ ปริมาตร)

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	% RSD
blank	1.2284	0	1.4929	0.004	0.28
	1.2201				
	1.2232				
100	1.6140	0.1210	0.1430	0.032	22.20
	1.6215	0.1290			
	1.6724	0.1790			
500	1.8705	0.3780	0.3817	0.004	1.16
	1.8742	0.3810			
	1.8794	0.3860			
1000	2.0539	0.5610	0.5607	0.000	0.09
	2.0539	0.5610			
	2.0531	0.5600			
2000	2.3959	0.9030	0.9002	0.003	0.28
	2.3910	0.8980			
	2.3925	0.9000			
3000	2.7106	1.2180	1.2217	0.004	0.29
	2.7159	1.2230			
	2.7174	1.2240			

## ภาคผนวก ข

### กราฟมาตรฐานที่ได้จากสถานะที่เหมาะสม

เมื่อได้สถานะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยอาศัยระบบซีเควินเซียลอินเจกชันอะนาไลซิสแล้ว จึงได้ทำการสร้างมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกาบา



รูปที่ ข. แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบา ภายใต้สถานะที่เหมาะสม

ตารางที่ ข. ค่าการควบคุมถิ่นแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา ภายใต้สถานะที่เหมาะสม

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
blank	0.8135	0	0.8135	0.00001	0.00
	0.8135				
	0.8135				

ตารางที่ ข. ค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกาบา ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ต่อ)

Conc. (ppm)	abs	corr	avg	SD	%RSD
300	1.4439	0.6283	0.628	0.001	0.14
	1.4428	0.6272			
	1.4446	0.6290			
400	1.7071	0.8915	0.890	0.002	0.17
	1.7041	0.8885			
	1.7062	0.8906			
500	1.9135	1.0979	1.099	0.002	0.18
	1.9174	1.1018			
	1.9143	1.0987			
700	2.2254	1.4098	1.409	0.001	0.05
	2.2240	1.4084			
	2.2242	1.4086			
1000	2.9542	2.1386	2.139	0.001	0.05
	2.9539	2.1383			
	2.9558	2.1402			
2000	5.2134	4.3978	4.398	0.0003	0.01
	5.2135	4.3979			
	5.2130	4.3974			

## ภาคผนวก ค

## ประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์

## 1. ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ในการหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ จะประเมินจากค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ที่เติมสารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 มิลลิกรัม/ลิตรลงไป จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน และค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ

ตารางที่ ค.1 ค่าการดูดกลืนแสงสารอนุพันธ์กาบา ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ที่เติมสารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 มิลลิกรัม/ลิตรลงไป

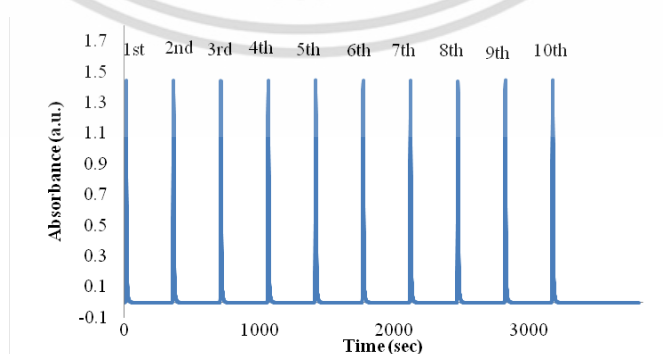
sample	corr	original conc.	spiked	found	%recovery
GABA tablet 1	0.1993	107.39	203.00	303.47±0.0013	96.59
	0.1931				
	0.1942				
GABA tablet 2	0.1965	107.53	203.00	312.01±0.0083	100.73
	0.1955				
	0.1955				
GABA tablet 3	0.1989	110.22	203.00	307.99±0.0103	97.42
	0.1992				
	0.2072				
GABA tablet 4	0.2039	110.42	203.00	305.49±0.0042	96.09
	0.1994				
	0.2035				
GABA tablet 5	0.2011	111.34	203.00	302.73±0.0018	94.28
	0.2111				
	0.2006				
GABA 500 mg 1	1.0696	502.78	203.00	709.41±0.0004	101.79
	1.0698				
	1.0686				

ตารางที่ ค.1 ค่าการดูดกลืนแสงสารอนุพันธ์กาบา ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ที่เติมสารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 มิลลิกรัม/ลิตรลงไป (ต่อ)

sample	Corr.	original conc.	spiked	found	%recovery
GABA 500 mg 2	1.0884	511.40	203.00	728.30±0.0080	106.84
	1.0867				
	1.0901				
GABA 500 mg 3	1.0372	488.31	203.00	683.56±0.0010	96.18
	1.0379				
	1.0370				
GABA 750 mg 1	1.0816	505.94	203.00	704.88±0.0100	98.00
	1.0738				
	1.0736				
GABA 750 mg 2	1.0784	504.92	203.00	701.15±0.0020	96.66
	1.0737				
	1.0701				
GABA 750 mg 3	1.0742	504.45	203.00	708.48±0.0001	100.51
	1.0729				
	1.0720				

#### 4.2 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ในการหาความเที่ยงของวิธี จะพิจารณาจากค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกาบา ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร ซ้ำๆเป็นจำนวน 10 ครั้ง จากนั้นหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์



รูปที่ ค. แสดงสัญญาณที่ได้ของสารอนุพันธ์ของกาบา ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร ซ้ำๆเป็นจำนวน 10 ครั้ง

ตารางที่ ค.2 ค่าการดูดกลืนแสงสารอนุพันธ์ของสารละลายมาตรฐานกาบาที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร ซ้ำๆเป็นจำนวน 10 ครั้ง

No.	abs	avg	SD	%RSD
1	1.4439	1.4442	0.003	0.17
2	1.4428			
3	1.4396			
4	1.4451			
5	1.4422			
6	1.4436			
7	1.4492			
8	1.4457			
9	1.4453			
10	1.4449			

ภาคผนวก ง

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับการวิเคราะห์  
ปริมาณภาษาโดยอาศัยเทคนิคแบบไม่ต่อเนื่อง

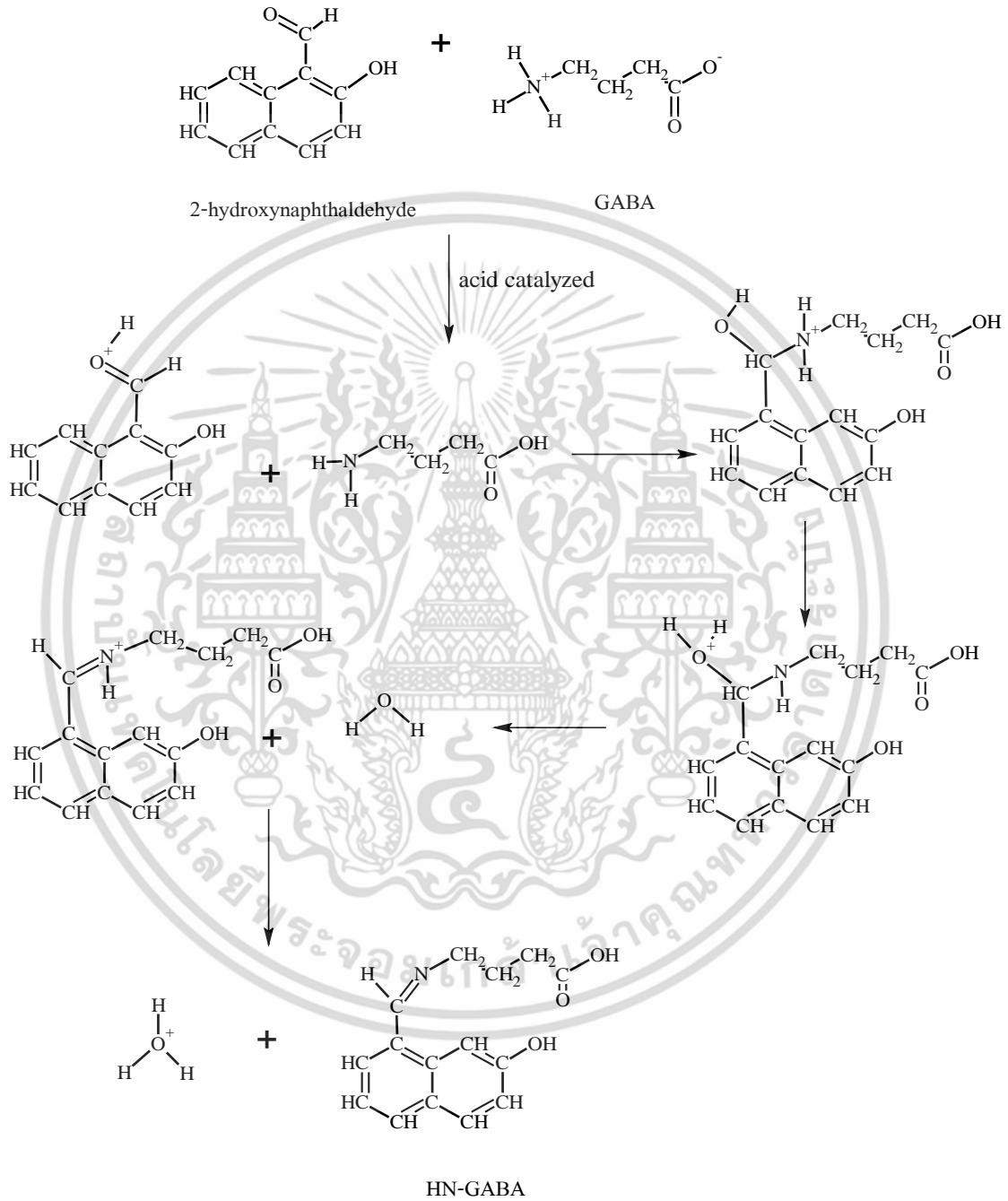
ตารางที่ ง การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ Paired  $t$  - test

t-Test: Paired Two Sample for Means

	Variable 1	Variable 2
Mean	353.1663636	352.75
Variance	110528.4713	110514.3815
Observations	11	11
Pearson Correlation	0.999882553	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	10	
t Stat	0.271022932	
P(T<=t) one-tail	0.395942764	
t Critical one-tail	1.812461102	
P(T<=t) two-tail	0.791885528	
t Critical two-tail	2.228138842	

ภาคผนวก จ

ปฏิกิริยาระหว่าง 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์กับกาบา



รูปที่ จ. แสดงปฏิกิริยาอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่าง 2-ไฮดรอกซีแนปทาลดีไฮด์กับกาบาในสภาวะที่พีเอชเท่ากับ 8.0

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวพรวิ แทนประมุข  
วัน เดือน ปีเกิด 1 ตุลาคม 2530  
ที่อยู่ 575/84 หมู่บ้านถาวรวิมล ตำบลคลองขุด อำเภอเมือง จังหวัดสตูล 91000  
โทร 083-601-0091  
ประวัติการศึกษา 2552 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย

พ.ศ. 2554-2556 อาจารย์ผู้ช่วยสอนในรายวิชา ปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ 1 และ 2  
พ.ศ. 2557 นำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ paccon 2014 ในหัวข้อ  
“Derivatization With Subsequent Colorimetric Determination of  
GABA”

