สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การหาปริมาณกลูตาไทโอนในผลิตภัณฑ์องุ่น และสารสกัดจากมะระขี้นก

T107850

นางสาวลักขณา ตลิ่งวัน
นายวิษณุ ภูทิพยวงษา
นายอนุชา วงษ์เอี่ยม

เลขหมู่.......
เลขทะเบียน 107850
วัน.เดือน.ปี ... 2553
b.......
i.......

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเคมีอุตสาหกรรม- เครื่องมือวิเคราะห์
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Determination of Glutathione in Grape and Mara khee nok Products

Miss. Lukkana Talingwan

Mr. Witsanu Putippayawongsa

Mr. Anucha Wongeiam

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Major in Industrial Chemistry - Analytical Instrumentation

Department of Science

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การหาปริมาณกลูตาไทโอนในผลิตภัณฑ์องุ่น และสารสกัดจากมะระขี้นก
นักศึกษา	นางสาวลักขณา ตลิ่งวัน นายวิษณุ ภูทิพยวงษา นายอนุชา วงษ์เอี่ยม
ภาควิชา	เคมี คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อ.พรทิพย์ ศัพทอนันต์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ	....
กรรมการ อ.สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล	....
กรรมการ รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล	....

....

(ผศ.ดร.ชลอ จารุสุทธิรักษ์)

หัวหน้าภาคเคมี

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การหาปริมาณกลูตาไทโอนในผลิตภัณฑ์องุ่นและสารสกัดจากมะระขี้นก
นักศึกษา	นางสาวลักขณา ตลิ่งวัน 47050858
	นายวิษณุ ภูทิพยวงษา 47050860
	นายอนุชา วงษ์เอี่ยม 47050872
ภาควิชา	เคมี คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อ.พรทิพย์ ศัพทอนันต์

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้เป็นการหาปริมาณสารกลูตาไทโอนในผลิตภัณฑ์องุ่นและสารสกัดจากมะระขี้นก เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารกลูตาไทโอนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยการทำอนุพันธ์ด้วย DTNB เกิดเป็นสารละลายสีเหลือง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของสารมาตรฐานกลูตาไทโอนมีค่า เท่ากับ 0.9992 ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณกลูตาไทโอนในสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีค่าเท่ากับ 13.95 mg/L ในสารสกัดจากมะระขี้นกเท่ากับ 12.24 mg/L ในไวน์ เท่ากับ 8.70 mg/L และในน้ำองุ่นเท่ากับ 103.48 mg/L โดยใช้วิธีการเทียบกับกราฟมาตรฐาน และปริมาณ กลูตาไทโอนในสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีค่าเท่ากับ 16.58 mg/L ในสารสกัดจากมะระขี้นกเท่ากับ 15.78 mg/L ในไวน์ เท่ากับ 9.08 mg/L และในน้ำองุ่นเท่ากับ 159.53 mg/L โดยใช้วิธีการเติมสารมาตรฐาน วิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วเหมาะกับการวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไทโอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Determination of Glutathione in Grape and Mara khee nok Products
Name	Miss. Lukkana Talingwan
	Mr. Witsanu Putippayawongsa
	Mr. Anucha Wongeiam
Department	Chemistry
Program	Industrial Chemistry - Analytical instrumentation
Acedemic Year	2007
Special Project Advisor	Assoc.Prof.Arunee Kongsakphaisal
Special Project Co-Advisor	Ajarn Porntip Supanan

ABSTRACT

This project presented the determination of glutathione in grape and Mara khee nok product to compare glutathione in products each.By derivatization with DTNB to form yellow solution to measured the absorbance change at 412 nm with UV-visible spectrophotometer. The coefficient of determination (R^2) calibration was 0.9992. As the result, quantity of glutathione with calibration curve method in extraction of grape seed, extraction of Mara khee nok , wine grape and grape juice were 13.95, 12.24, 8.70 and 103.48 mg/L respectively and quantity of glutathione by standard addition method in extraction of grape seed , extraction of Mara khee nok , wine grape and grape juice were 16.58, 15.78, 9.08 and 159.53 mg/L respectively. Both analytical method were simply and rapidly method for the determination of glutathione.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ที่ช่วยทำให้โครงงานพิเศษนี้สามารถลุล่วงไปด้วยดี สืบเนื่องมาจากการได้รับความดูแล เอาใจใส่ ให้คำปรึกษา แนะนำและคอยช่วยเหลือมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ อ.พรทิพย์ ศัพทอนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในการให้คำปรึกษา ช่วยแก้ไขปัญหา เอาใจใส่ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษนี้มาตลอด

ขอขอบพระคุณ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ และ อ.สุจินต์ ตันติพิสิฐกุล อาจารย์คณะกรรมการการตรวจสอบโครงงานพิเศษที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษา ช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษนี้ให้ดำเนินไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆในสาขา เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และคอยให้กำลังใจ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่น้อง รวมถึงรุ่นพี่รุ่นน้อง ทุกคนที่คอยให้ความห่วงใย และช่วยเหลือทุกๆด้านจนโครงงานพิเศษนี้สำเร็จในที่สุด

นอกจากนี้ บุคคลที่มีส่วนช่วยที่มิได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

นางสาวลักขณา ตลิ่งวัน
นายวิษณุ ภูทิพยวงษา
นายอนุชา วงษ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและแรงจูงในในการทำงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตในการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 กลูตาไทโอน	3
2.1.1บทบาทหน้าที่ของกลูตาไทโอน	5
2.1.2 แหล่งที่พบ	7
2.1.3ผลข้างเคียง	7
2.2 เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี	8
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	11
3.1.2 การทำสารละลายสต๊อก (Stock solution)	12
3.1.3 การทำกราฟมาตรฐาน	15
3.1.4 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง	15
3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์	16
3.2.1 ศึกษาความเป็นไปได้ของการวิเคราะห์กลูตาไทโอน	16
3.2.2 การศึกษาค่า pH ของสารละลายที่เหมาะสม	16
3.3 การตรวจวัดปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่าง โดยใช้วิธีการเติมสารมาตรฐาน	16
3.4 ประเมินผล ทดสอบความใช้ได้ของวิธี	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.1 การศึกษาการทดสอบการตอบสนองความเป็นเส้นตรง (Linearity)	17
3.4.2 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์	17
3.4.3 การศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์	18
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	
4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์	19
4.1.1 ศึกษาความไปได้ของการวิเคราะห์กลูตาไทโอน	19
4.1.2 ศึกษาค่า พีเอช ของสารละลายที่เหมาะสม	20
4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน	22
4.3 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)	25
4.4 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์	25
4.5 การศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์	26
4.6 การหาปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่าง โดยใช้วิธีกราฟมาตรฐาน	27
4.7 การหาปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่าง โดยใช้วิธีการเติมสารมาตรฐาน	33
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูตาไทโอน เข้มข้น 80 mg/L ที่ pH ต่างๆ	20
ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดลองค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	23
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์	26
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าร้อยละของการกลับคืนของปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างแต่ละชนิด	27
ตารางที่ 4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างแต่ละชนิดที่ความยาวคลื่น 412 nm	27
ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณลูตาไทโอนในตัวอย่างชนิดต่างๆ โดยวิธีการเทียบกับกราฟมาตรฐาน	28
ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างชนิดต่างๆ	37
ตารางที่4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงสารสกัดจากเมล็ดองุ่น	38
ตารางที่4.9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงสารสกัดจากมะระขี้นก	38
ตารางที่4.10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงไวน์องุ่น	39
ตารางที่4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงน้ำองุ่น	39
ภาคผนวก	
ตารางที่ ก.1 ศึกษาค่า พีเอช ของสารละลายที่เหมาะสม	40
ตารางที่ ก.2 แสดงผลการทดลองค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	42
ตารางที่ ก.3 แสดงค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์	45
ตารางที่ ก.4 แสดงผลการวัดหาปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างกับ spiked sample และค่า %Recovery	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ ก.5 แสดงปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างชนิดต่างๆ	50
ตารางที่ ก.6 แสดงปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างชนิดต่างๆ	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่2.1 โครงสร้างของกลูตาไทโอน 4
รูปที่ 2.2 โครงสร้างองค์ประกอบของกลูตาไทโอน 4
รูปที่ 2.3 เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer Jasco 7800 9
รูปที่ 4.1 แสดงสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนเข้มข้น 80 mg/L ที่ความยาวคลื่นในช่วง 300-600 นาโนเมตร 19
รูปที่ 4.2 แสดงสเปกตรัมที่แสกนได้ที่ค่า pH เป็น 4, 5, 6, 7.2 และ 8 21
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360, 390 และ 412 nm 22
รูปที่ 4.4 แสดงสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน 23
รูปที่ 4.5 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน 24
รูปที่ 4.6 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 29
รูปที่ 4.7 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างสารสกัดจากมะระขี้นก 30
รูปที่ 4.8 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างไวน์องุ่น 31
รูปที่ 4.9 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างน้ำองุ่น 32
รูปที่ 4.10 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากการเติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 100 และ 120 mg/L ลงในตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 33
รูปที่ 4.11 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากการเติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 100 และ 120 mg/L ลงในตัวอย่างสารสกัดจากมะระขี้นก 34
รูปที่ 4.12 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากการเติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 100 และ 120 mg/L ลงในตัวอย่างไวน์องุ่น 35
รูปที่ 4.13 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากการเติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 100 และ 120 mg/L ลงในตัวอย่างน้ำองุ่น 36
รูปที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง 37
ภาคผนวก
รูปที่ ก.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360, 390 และ 412 nm 44
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน ครั้งที่ 1 46
รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน ครั้งที่ 2 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน ครั้งที่ 3 47

รูปที่ ก.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงาน

ในปัจจุบันนี้สารกลูตาไทโอนเริ่มเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวาง ในแวดวงผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ซึ่งมีการโฆษณาผ่านสื่อต่างๆ ไม่ว่าจะผ่านทางโทรทัศน์ วิทยุ อินเตอร์เนท หรือสื่อสิ่งพิมพ์ต่างๆ เพื่อให้ความรู้หรือจำหน่ายผลิตภัณฑ์ กลูตาไทโอนถูกนำมาใช้เป็นสารในการผลิตอาหารเสริม เนื่องมาจากประโยชน์ของสารกลูตาไทโอนซึ่งมีมากมาย เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ชำระล้างสารพิษที่มีอยู่ในร่างกาย และเป็นสารที่ทำให้ผิวขาวขึ้น เป็นต้น

แหล่งที่พบสารกลูตาไทโอน : พบได้ในพืชผักชนิดต่างๆ ผลไม้ทั่วไปและเนื้อสัตว์ แต่จะพบมากใน Asparagus อะโวกาโด และ Walnut ร่างกายเราก็สามารถสร้างกลูตาไทโอนได้และมีสารหลายชนิดที่ช่วยเพิ่มการสร้าง ได้แก่ Alpha, lipoic acid, Glutamine3, Methionine, Whey Protein, Vitamin B-6, Vitamin B-2, Vitamin C4 และ Selenium ขนาดที่มักพบในอาหารเสริมบำรุงผิว 50-600 mg/day

จากการศึกษาพบว่าในน้ำองุ่นมีสารกลูตาไทโอน จึงได้มีการพัฒนาและเปรียบเทียบเทคนิควิเคราะห์หาปริมาณของกลูตาไทโอนในน้ำองุ่น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างน้ำองุ่น และสารสกัดจากมะระขี้นก โดยใช้เทคนิค UV-visible Spectrophotometry
2. ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น
3. นำวิธีที่ศึกษามาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างน้ำองุ่นสด ไวน์องุ่น สารสกัดจากเมล็ดองุ่น และ สารสกัดจากมะระขี้นก
4. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณกลูตาไทโอน ในตัวอย่าง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างน้ำองุ่น 3 ชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์น้ำองุ่น 100 %, ไวน์องุ่น และสารสกัดจากเมล็ดองุ่น และสารสกัดจากมะระขี้นก
2. เปรียบเทียบปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างน้ำองุ่น 3 ชนิด และสารสกัดจากมะระขี้นก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมในการหาปริมาณกลูตาไทโอน
2. ทราบปริมาณกลูตาไทโอนที่อยู่ในตัวอย่างน้ำองุ่นและสารสกัดจากมะระขี้นกเพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกบริโภค

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

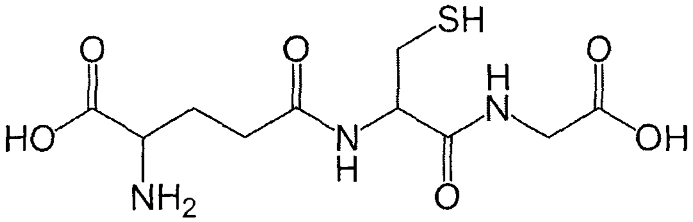
2.1 กลูตาไทโอน

กลูตาไทโอนเป็น thiol containing tripeptide ที่มีหมู่ซัลเฟอร์ (Sulfur) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการเป็นสารรีดิวส์ (reducing agent) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิดคือ cysteine glutamic acid และ glycine กลูตาไทโอนจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (primary antioxidant) ซึ่งพบอยู่ในเซลล์ในรูปรีดิวส์ (reduce form; GSH) และปริมาณอีกร้อยละ 5 จะอยู่ในรูปออกซิไดส์ (oxidized form; GSSG) และในรูป mixed disulphide (2.1)

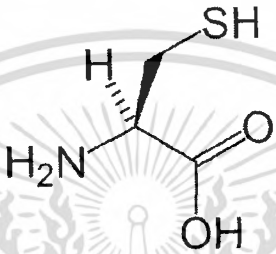
กลูตาไทโอนมีประโยชน์ต่อกระบวนการทางชีวเคมีของร่างกายหลายทาง เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ชนิดละลายน้ำได้ที่สำคัญที่ร่างกายสร้างขึ้น และเป็นพื้นฐานสำหรับสารแอนติออกซิแดนท์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องซึ่งรวมทั้งกลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส สารประกอบกลูตาไทโอนช่วยปกป้องร่างกายจากการทำลายของอนุมูลอิสระ ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยตับในการย่อยสลายสารพิษโดยเป็นโคเอ็นไซม์ เร่งการทำงานของเอ็นไซม์บางชนิดเพื่อให้ร่างกายต่อต้านสิ่งแปลกปลอมได้เสริมประสิทธิภาพการทำงานของวิตามิน C และวิตามิน E กลูตาไทโอนในเซลล์จะอยู่ในรูปของ reduced form (GSH) ซึ่งต่อมาจะถูก oxidized กลายเป็น oxidized glutathion (GSSG)

เนื่องจากกลูตาไทโอนเป็นสารที่มีความสำคัญจึงได้มีการติดตามผลการรับประทานสารชนิดนี้เป็นอาหารเสริมเป็นเวลาหลายปีโดยตั้งคำถามเกี่ยวกับการดูดซึมของสารอาหารชนิดนี้ นักชีววิทยาด้านเซลล์หลายคนเชื่อว่ากลูตาไทโอนถูกย่อยสลายให้เป็นส่วนประกอบย่อยที่มีคุณสมบัติป้องกันการทำปฏิกิริยากับออกซิเจน (ได้แก่ กลูตาเมท ซิสเตอีน และกลัยซีน) ในระหว่างการย่อยสลาย ถ้าขาดกลูตาไทโอนจะเป็นสาเหตุของความเจ็บป่วยหลายประการ เช่น โรคชรา โรคโลหิตจาง มะเร็ง เป็นต้น

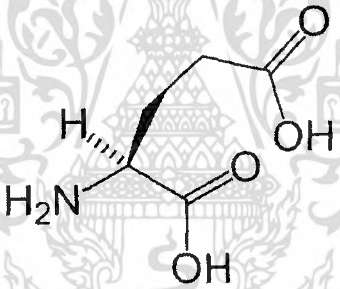
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



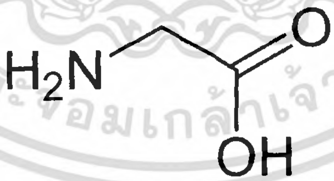
รูปที่2.1 โครงสร้างของกลูตาไทโอน



L-Cystein



Glutamic acid



glycine

รูปที่ 2.2 โครงสร้างองค์ประกอบของกลูตาไทโอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1บทบาทหน้าที่ของกลูตาไทโอน

1. ความขาวเนียนของผิวพรรณ

กลูตาไทโอน สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอมไซม์เริ่มต้นในการสังเคราะห์เมลานิน ปกติเมื่อผิวได้รับรังสียูวี อนุมูลอิสระที่ชื่อ “แอคทีฟออกซิเจน” จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ ก่อให้เกิดการรวมตัวของไขมัน และเมลานิน เป็นผลให้เกิดจุดด่างดำบนผิวหนัง กลูตาไทโอนจะไปสลายการรวมตัวของไขมันและเมลานิน และไปยับยั้ง แอคทีฟออกซิเจน ไม่ให้ก่อตัวภายในเซลล์ด้วย

2. Antioxidant : เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ความเครียด รังสี มลพิษ ล้วนก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ซึ่งจะทำให้อวัยวะในร่างกายทำงานด้อยลง เป็นเหตุให้เกิดโรคร้ายต่างๆ มากมาย กลูตาไทโอนมีคุณสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Antioxidant) ที่มีความสำคัญตัวหนึ่งในร่างกาย สามารถเปลี่ยนอนุมูลอิสระตัวร้ายให้กลายเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็น น้ำกับออกซิเจน และหากขาดไป วิตามินซีและวิตามินอีอาจจะทำงานได้ไม่เต็มที่

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ โมเลกุลของแร่ธาตุในร่างกายที่ไม่คงตัว ปกติแร่ธาตุในร่างกายของเราจะมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ เพื่อจะทำให้โมเลกุลคงตัวเกิดความสมดุลในร่างกาย แต่เมื่อมีการสูญเสียอิเล็กตรอน หรือ รับอิเล็กตรอนมาเพิ่ม จะทำให้โมเลกุลไม่คงตัว กลายเป็นอันตราย เพราะโมเลกุลของแร่ธาตุที่ไม่คงตัวจะไปแย่งจับอิเล็กตรอนมาจากโมเลกุลอื่น เพื่อแทนของตัวเองที่ขาดไป และจะแย่งกันไปเป็นทอดๆ ไม่มีวันสิ้นสุด อนุมูลอิสระ ถ้ามีในร่างกายปริมาณน้อย ร่างกายจะสร้างระบบต้านอนุมูลอิสระขึ้นเอง (antioxidants) ทำให้เซลล์สามารถปรับตัว เพิ่มความทนทานเพื่อต่อสู้ได้ และใช้ให้เป็นประโยชน์ในการทำลายเชื้อโรคบางชนิดได้ แต่ในทางกลับกันถ้ามีอนุมูลอิสระปริมาณมาก และเป็นระยะเวลานาน จะเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อกลุ่มคอลลาเจน อีลาสติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของอวัยวะหลายชนิด เช่น ผิวหนัง เส้นเลือด ตา ตับ หัวใจ เป็นต้น ก่อให้เกิดผิวหนังเหี่ยวย่น ริ้วรอย เซลล์เสื่อมสภาพ โรคหัวใจ หลอดเลือด และมะเร็งเป็นต้น

สาเหตุอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้ 2 ทาง

1. จากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น มลพิษ ฝุ่น ควันบุหรี่ สารกันบูด สีผสมอาหาร รังสี UV เป็นต้น
2. จากร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น ความเครียด การหายใจเอาสารเคมีหลงเหลือจากขบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือ สารที่ช่วยต่อต้านกระบวนการของอนุมูลอิสระ โดยจะไปขัดขวางกระบวนการสร้าง และทำลายอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่มีมากเกินไป หรือทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ เพื่อช่วยป้องกันไม่ให้เกิดสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย แหล่งที่จะพบสารต้านอนุมูลอิสระได้มี 2 แหล่ง

1. ร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น กลูตาไธโอน กรดไลโปอิก คาตาเลส อัลบูมิน กรดยูริก เป็นต้น
2. ได้รับจากภายนอก เช่น วิตามิน ACE เซเรเนียม Q10

3. Detoxification : การชำระล้างสารพิษ และเพิ่มการทำงานของตับ

โดยทั่วไปสารพิษ หรืออาหาร เครื่องดื่ม ที่ก่อให้เกิดพิษ จะถูกสลายตัวในตับ เรียกว่า กระบวนการเมตาบอลิซึมของสารพิษ ซึ่งอนุมูลอิสระจะเกิดขึ้นในกระบวนการนี้ด้วย กลูตาไทโอน สำคัญสำหรับขั้นตอนนี้มาก เพราะกลูตาไทโอนช่วยสร้างเอ็นไซม์ชนิดต่าง ๆ ในร่างกายโดยเฉพาะ Glutathion-S-transferase ที่ช่วยในการกำจัดพิษออกจากร่างกายโดยไปเปลี่ยนสารพิษชนิดไม่ละลายในน้ำ (ละลายในน้ำมัน) เช่น พวกโลหะหนัก สารระเหย ยาฆ่าแมลง แม้แต่ยาบางชนิด ให้เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นและง่ายต่อการกำจัดออกจากร่างกาย นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันตับจากการถูกทำลายโดย แอลกอฮอล์ (สุรา) สารพิษจากบุหรี่ ยาพาราเซตามอลเกินขนาด (Overdose) ฯลฯ ยิ่งมีกลูตาไทโอนมากจะทำให้อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในกระบวนการขับสารพิษได้น้อย แต่ถ้ามี กลูตาไทโอนไม่เพียงพอ จะทำให้มีอนุมูลอิสระมาก เป็นผลให้ไขมันไปสะสมอยู่ในตับ มีความเสี่ยงเป็นโรคตับแข็งได้

4. หน้าที่อื่นๆ

1. ป้องกันการเกิดโรคหัวใจ โดยป้องกันไม่ให้เกิดการรวมตัวของ LDL ที่จะไปรวมตัวกันเกาะที่ผนังของเส้นเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหัวใจอุดตัน
2. ช่วยไม่ให้อนุมูลอิสระทำลายเซลล์ในร่างกายสาเหตุของความแก่ชรา
3. แอลกอฮอล์ และความเครียด เป็นสาเหตุให้เกิดภาวะเลือดออกในกระเพาะอาหาร แต่ผลวิจัยพบว่าเมื่อกินกลูตาไธโอนเข้าไปจะทำให้อาการดังกล่าวดีขึ้น
4. มีผลงานวิจัยเปิดเผยว่า ภาวการณ์ลดลงของกลูตาไธโอนในสมอง เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และพากินสัน
5. Immune Enhancer : ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกาย2 โดยกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์หลายชนิดเพื่อให้ร่างกายต่อต้านสิ่งแปลกปลอมรวมถึงเชื้อแบคทีเรียและไวรัส นอกจากนี้กลูตาไทโอน ยังช่วยสร้างและซ่อมแซม DNA สร้างโปรตีนและ protaglandin
6. ฤทธิ์ของกลูตาไธโอนในเรื่องของการเป็น whitening นั้น พบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่าง หมู่ thiol และ สีผิว โดยจะไปมีผลในการทำงานของเอ็นไซม์ tyrosinase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลักในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินทั้งทางตรงคือจะไปออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งผ่านของ tyrosinase ในเซลล์ และทางอ้อมโดยเพิ่มระดับของ cysteine (cysteine จะทำให้ tyrosine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างเมลานิน โดยจะลดการสร้าง eumelaninซึ่งเป็นเม็ดสีน้ำตาล-ดำเปลี่ยนมาเป็น pheomelanin ซึ่งเป็นเม็ดสีเหลือง หรือ แดง)

2.1.2 แหล่งที่พบ

พบสารชนิดนี้ได้ในพืชผักชนิดต่างๆ ผลไม้ทั่วไปและเนื้อสัตว์ แต่จะพบมากใน Asparagus อะโวกาโด และ Walnut ร่างกายเราก็สามารถสร้างกลูตาไทโอนได้และมีสารหลายชนิดที่ช่วยเพิ่มการสร้างได้แก่ Alpha lipoic acid, Glutamine3, Methionine, Whey Protein, Vitamin B-6, Vitamin B-2 , Vitamin C4 และ Selenium ขนาดที่มักพบในอาหารเสริมบำรังผิว 50-600 mg/day

2.1.3ผลข้างเคียง ยังไม่พบอันตรายจากการรับประทานกลูตาไธโอนในปริมาณสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี[1,2]

การวิเคราะห์ทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopic Method)

หมายถึง การแยก การตรวจสอบ และการบันทึกของพลังงานที่เปลี่ยนไป กับ นิวเคลียส อะตอม ไอออน หรือโมเลกุล พลังงานที่เปลี่ยนไปนั้น เนื่องจาก เกิดการอิมิสชั่น(emission) การดูดกลืน (absorption) การกระเจิง (scattering) ของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าหรือของอนุภาค

UV-VIS Spectrophotometer

หลักการ

UV-VIS Spectrophotometer เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารโดยใช้หลักการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 190-1000 นาโนเมตร(nm) ของสารเคมีนั้น ได้แก่ สารอินทรีย์ (organic compound) สารประกอบเชิงซ้อน (complex compound) หรือสารอนินทรีย์ (inorganic compound) โดยนำสารตัวอย่างใส่ในเซลควอร์ตซ์ (quart) แล้ววางในบริเวณใกล้แหล่งกำเนิดแสง สารตัวอย่างจะดูดกลืนรังสี หรือแสงบางส่วนไว้ แสงที่ไม่ดูดกลืนจะผ่านออกมายังเครื่องวัดแสง (photomultiplier tube) เครื่องวัดแสงจะทำการวัดปริมาณแสงที่ออกมา โดยการหักล้างกับปริมาณของแสงก่อนดูดกลืน จากนั้นจะทำการประมวลผลเป็น curve หรือสเปกตรัม ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) และค่าความยาวคลื่น

ประโยชน์

1. ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น formaldehyde สารกรองรังสียูวี CMC phenol สีย้อม และสารเชิงซ้อนต่าง ๆ

2. ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ Sulphate , Silica , phosphate , iron , nitrate ฯลฯ ในตัวอย่าง น้ำดื่ม น้ำใช้ สารส้มน้ำ

3. ใช้หาค่าความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงมากที่สุด และหา molar absorbtivity ของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer

รูปที่ 2.3 เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer Jasco 7800

เครื่อง Spectrophotometer ชนิดลำแสงคู่

เป็นเครื่องที่ใช้ลำแสง 2 ลำแสง ลำแสงหนึ่งผ่านสารละลาย อีกลำแสงหนึ่งผ่านสารละลายเปรียบเทียบ (Blank) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

1. ชนิด double beam และ double detector หรือ dual channel instruments แสงที่ผ่านโมโนโครเมเตอร์แล้ว จะถูกแยกออกเป็น 2 ลำแสง ด้วยกระจกรูปตัว V เรียกว่า beam splitter ลำแสงหนึ่งผ่านเซลล์ที่ใส่สารละลายตัวอย่าง อีกลำแสงผ่านสารละลาย blank แล้วจะไปยังเครื่องวัดแสงที่แยกกัน เครื่องวัดแสงทั้งคู่นี้จะต้อง เหมือนกัน (matched detectors) ค่าที่วัดจะเข้าเครื่องอิเล็คทรอนิคเพื่อหาอัตราส่วน

2. ชนิด double beam และ single detector อาจเรียก double beam intime configuration แสงที่ผ่านโมโนโครเมเตอร์แล้วจะถูกแบ่งเป็น 2 ลำแสงด้วย rotating mirror หรือ “chopper” จะผ่านสารละลายและ blank สลับกันไป แล้วที่เหลือมารวมกันด้วย grid mirror ซึ่งเป็นช่องแสงผ่านและสะท้อนต่อไปยังมาตรวัดแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. 3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

K. Kusmierek และคณะ[3] ศึกษาการวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อหาความแตกต่างของกลูตาไทโอนและซิสเทอีนในน้ำผลไม้โดยใช้วิธี liquit Chomatrography วิธีการนี้ทำโดยการทำอนุพันธ์ของไทออล ด้วย 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate แล้วตามด้วยการแยกโดย chromatography และทำการตรวจวัดด้วยการดูดกลืนแสงยูวี วิธีการนี้จะแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นในช่วงความเข้มข้นที่กว้างซึ่งจะให้ค่าสัมประสิทธ์การถอยกลับมากกว่า 0.99 ขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์หากลูตาไทโอนและซิสเทอีนคือ 0.1 และ 0.05 μmol/L ตามลำดับ ค่าการกลับคืนและค่าความแม่นยำของกลูตาไทโอนและซิสเทอีน อยู่ในช่วง 99.1-103.3% และ2.0-9.0% ตามลำดับ วิธีการพัฒนานี้ประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์หารีดิวส์กลูตาไทโอน กลูตาไทโอนทั้งหมด รีดิวส์ซิสเทอีนและซิสเทอีนทั้งหมดในน้ำส้มและน้ำองุ่น

J. Agric และคณะ[4] ศึกษาวิธีการใหม่ในการวิเคราะห์หาปริมาณซิสเทอีนและกลูตาไทโอนในน้ำผลไม้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง(LC) โดยจะมีขั้นตอนการทำให้เป็นกรด การเหวี่ยง และการกรองน้ำผลไม้ตามด้วยการแยกโดยโครมาโทกราฟีของเหลวบน Zipax SCX cation-exchange resin และทำการตรวจวัดด้วยขั้วไฟฟ้าปรอทหยด เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย LC ประมาณ 6 นาที ขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์กลูตาไทโอนเท่ากับ $2x10^{-6}$ M และซิสเทอีนเท่ากับ $3x10^{-6}$ M วิธีการนี้เป็นวิธีการทั่วไปและสามารถประเมินค่าปริมาณของซิสเทอีนและไทออลอื่นในโปรตีนจากพืชและผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ

P. Winayanuwattikun และคณะ [5] ศึกษาคุณสมบัติกลูตาไทโอนเอสทรานสเฟอเรส (GST) มีหน้าที่หลักในการทำลายสารพิษต่างๆ รวมทั้ง ยาฆ่าแมลงซึ่งก่อให้เกิดการต้านทานของแมลงต่อยาฆ่าแมลง ในการศึกษานี้ได้อธิบายบทบาทของกรดอะมิโนบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการจับกับกลูตาไทโอน (Glutathione binding residues) ต่อการควบคุมการเร่งปฏิกิริยา และโครงสร้างของเอนไซม์ในยุงก้นปล่อง โดยได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเฉพาะที่ (site-directed mutagenesis) ของเอนไซม์ AdGST D3-3จำนวน 5 ตำแหน่ง คือ Ile-52, Glu-64, Ser-65, Arg-66 and Met-101 ให้เป็น Ala จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่ากรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการจับกับกลูตาไทโอนมีหน้าที่สำคัญดังต่อไปนี้ 1) เกี่ยวข้องกับการจับกับกลูตาไทโอนซึ่งเป็นสารตั้งต้นหลักในการเร่งปฏิกิริยา 2) เกี่ยวข้องกับการแตกตัวเป็นประจุของกลูตาไทโอนซึ่งเป็นขั้นตอนหลักในการเร่งปฏิกิริยา 3) มีส่วนร่วมในการกำหนดขั้นตอนที่กำหนดความเร็วในการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ กรดอะมิโน Ile-52, Glu-64 และ Arg-66 ยังทำหน้าที่สำคัญต่อโครงสร้างของเอนไซม์นี้ทั้งในด้านเสถียรภาพของเอนไซม์ในการทนต่อความร้อน และกระบวนการในการม้วนพับของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. DTNB solution (5-5-Dithio-bis (2-Nitrobenzoic acid)) HPLC Grade ≥97.5 % ของบริษัท Fluka
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) Analytical Grade ของบริษัท Carlo Erba
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) Analytical Grade ของบริษัท Carlo Erba
4. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 99.5 % Analytical Grade ของบริษัท Carlo Erba
5. โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (KHP) Analytical Grade ของบริษัท Merck
6. เอธานอล 99.8 % AR Grade ของบริษัท Carlo Erba
7. รีดิวซ์กลูตาไทโอน (GSH) HPLC Grade ≥97 % ของบริษัท Fluka

อุปกรณ์

1. บีกเกอร์ ขนาด 25,50,100,250,500 mL
2. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10,100,500,1000 mL พร้อมฝาปิด
3. ปิเปต ขนาด 1,2,5,10 mL พร้อมจุกยาง
4. กระบอกตวง ขนาด 5001000 mL
5. แท่งแก้วคนสาร
6. กระดาษกรอง (Filter paper)
7. ช้อนตักสาร
8. หลอดหยดพร้อมจุกยาง
9. กรวยกรอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่อง UV visible spectrophotometer Jasco 7800
2. เครื่อง pH meter Metrohm 654 pH meter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

1. ผลิตภัณฑ์น้ำองุ่น 100 %
2. ไวน์องุ่น
3. สารสกัดจากเมล็ดองุ่น
4. สารสกัดจากมะระขี้นก

3.1.2 การทำสารละลายสต๊อก (stock solution)

3.1.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน กลูตาไทโอน ความเข้มข้น 1000 mg/L

ชั่งกลูตาไทโอน มา 0.1 g ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 mol/L แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL แล้วจะได้สารละลายกลูตาไทโอน เข้มข้น 1000 mg/L

3.1.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน กลูตาไทโอน ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 mg/L

ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนเข้มข้น 1000 mg/L มา 2,4,6,8,10 และ 12 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL แต่ละขวด แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 mol/L จนถึงขีดบอกปริมาตร

3.1.2.3 การทำอนุพันธุ์ของไทออล (derivatization)

การทำอนุพันธุ์ของไทออล ทำโดยการใช้ DTNB

การเตรียม DTNB

ใช้ DTNB solution (5-5-Dithio-bis (2-Nitrobenzoic acid)) 0.06 กรัม ละลายใน Ethanol 10 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย สารละลายฟอตเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.2 ให้ได้ 100 ml

3.1.2.4 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M (pH ประมาณ 4)

1. ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (KHP) 20.422 g ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนถึงขีดบอกปริมาตร

2. ปิเปตกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 8.30 mL ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนถึงขีดบอกปริมาตร

3. นำสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1 มา 500 mL ผสมกับสารละลายในข้อ 2 จำนวน 1 mL

4. นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2.5 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M (pH ประมาณ 5)

1. ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (KHP) 20.422 g ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนถึงขีดบอกปริมาตร

2. ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4.0 g ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

3. นำสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1 มา 500 mL ผสมกับสารละลายในข้อ 2 จำนวน 226 mL

4. นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH

3.1.2.6 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M (pH ประมาณ 6)

1. ชั่ง โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 13.58 g ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนถึงขีดบอกปริมาตร

2. ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) มา 4.000 g ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนถึงขีดบอกปริมาตร

3. แล้วนำสารละลายในข้อที่1 มา 500 mL ผสมกับสารละลายในข้อที่ 2 จำนวน 56 mL

4. นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH

3.1.2.7 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M (pH ประมาณ 7.2)

1. ชั่ง โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 13.609 g ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 mL
แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนถึงขีดบอกปริมาตร

2. ชั่ง โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4.000 g ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนถึงขีดบอกปริมาตร

3. แล้วนำสารละลายในข้อที่ 1 มา 500 mL ผสมกับสารละลายในข้อที่ 2 จำนวน 347 mL

4. นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2.8 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M (pH ประมาณ 8)

1. ชั่ง โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 13.58 g ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 mLแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนถึงขีดบอกปริมาตร

2. ชั่ง โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4.000 g ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนถึงขีดบอกปริมาตร

3. แล้วนำสารละลายในข้อที่ 1 มา 500 mL ผสมกับสารละลายในข้อที่ 2 จำนวน 467 mL

4. นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH

3.1.2.9 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. น้ำองุ่น (Malee)

นำสารตัวอย่างน้ำองุ่น มากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำส่วนที่กรองได้ไปเตรียมวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2. ไวน์ (Wine)

นำสารตัวอย่างไวน์ มากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำส่วนที่กรองได้ไปเตรียมวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3. สารสกัดจากมะระขี้นก

นำตัวอย่างสารสกัดจากมะระขี้นก 1.8989 g (เฉพาะสารไม่รวมแคปซูล) จำนวน 4 แคปซูล มาละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 mol/L แล้วใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร นำมากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำส่วนที่กรองได้ไปเตรียมวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

4. สารสกัดจากเมล็ดองุ่น

นำตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 0.7575 g (เฉพาะสารไม่รวมแคปซูล) จำนวน 2 แคปซูล มาละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก(HCl) 0.1 mol/L แล้วใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร นำมากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำส่วนที่กรองได้ไปเตรียมวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 การทำกราฟมาตรฐาน

1. นำสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 mg/L มา 2 mLใส่ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ และนำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 mL ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนอยู่ ทำการวัด pH และปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1.0 M NaOH) ให้มี pHประมาณ 7 หลังจากนั้นเติม DTNB 1 mL ลงในบีกเกอร์บีกเกอร์แต่ละใบ แล้วทำการถ่ายสารละลาย ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ทำการปรับปริมาตรด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จนถึงขีดบอกปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำมาทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาจากข้อ 3.2.1 โดยแต่ละความเข้มข้น ทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง

2. พลอตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน (แกน x) กับค่าการดูกลืนแสง (แกน y) และใช้วิธี linear test square หาสมการเส้นตรงและคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2)

3.1.4 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 3.1.2.9 ปริมาณ 2 ml ใส่ลงในบีกเกอร์
2. นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 mL ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีสารละลายตัวอย่างอยู่
3. ทำการวัด pH และปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1.0 M NaOH) ให้มี pHประมาณ 7
4. หลังจากนั้นเติม DTNB 1 mL ลงในบีกเกอร์ แล้วทำการถ่ายสารละลาย ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ทำการปรับปริมาตรด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จนถึงขีดบอกปริมาตรแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
5. นำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่อง UV-Vis spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์

3.2.1 ศึกษาความเป็นไปได้ของการวิเคราะห์กลูตาไทโอน

นำสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่ความเข้มข้น 80 mg/L จากข้อ 3.1.2.2 มา 2 mLใส่ลงในบีกเกอร์ และนำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 mL ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนเข้มข้น 80 mg/Lอยู่ ทำการวัด pH และปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1.0 M NaOH) ให้มี pHประมาณ 7 หลังจากนั้นเติม DTNB 1 mL ลงในบีกเกอร์ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วทำการถ่ายสารละลาย ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ทำการปรับปริมาตรด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จนถึงขีดบอกปริมาตรและทำการสแกนหาค่าความยาวคลื่นในช่วง 300-600 nm ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด(ดูที่ค่า spectrum)

3.2.2 การศึกษาค่า pH ของสารละลายที่เหมาะสม

หาค่าความแปรปรวนของค่า pH ของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน โดยนำสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่ความเข้มข้น 80 mg/L ใส่ลงในบีกเกอร์ 5 ใบ ใบละ 2 mL และนำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 mL ใส่ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ทำการวัด pH และปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1.0 M NaOH) ให้มี pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ หลังจากนั้นเติม DTNB 1 mL ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ แล้วทำการถ่ายสารละลายในบีกเกอร์แต่ละใบลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ทำการปรับปริมาตรด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จนถึงขีดบอกปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อหาค่า pH ของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เหมาะสม

3.3 การตรวจวัดปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่าง โดยใช้วิธีการเติมสารมาตรฐาน

นำตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมจากข้อ 3.1.2.4 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Visible โดยใช้เทคนิคการเติมสารมาตรฐาน

นำสารละลายตัวอย่าง 2 mL เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (20, 40, 60, 80, 100 และ120 mg/L) เติมลงไปในบีกเกอร์ 2 mL แล้วปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.2) ใส่ลงในบีกเกอร์ 5 mL แล้วนำไปวัด pH และทำการปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้มี pH ประมาณ 7 แล้วเติม DTNB 1 mL ลงในบีกเกอร์ แล้วถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml และปรับปริมาตรด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH=7.2 จนถึงขีดบอกปริมาตร นำสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่อง UV-Vis spectrometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.4 ประเมินผล ทดสอบความใช้ได้ของวิธี

ใช้หลักทางสถิติประเมินผลดังนี้

3.4.1 การศึกษาการทดสอบการตอบสนองความเป็นเส้นตรง (Linearity)

นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.4 มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination ,R^2) จากสมการต่อไปนี้

$$R = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\left[\left(N\sum x^2\right) - \left(\sum x\right)^2\right]\left[\left(N\sum y^2\right) - \left(\sum y\right)^2\right]}$$

ได้ค่า R แล้วนำมายกกำลังสอง โดยค่า R^2 ต้องไม่น้อยกว่า 0.990

3.4.2 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาโดยการนำสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่ความเข้มข้น 60 mg/L ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.3 มาทำการวัดซ้ำ 3ซ้ำ ที่ความยาวคลื่น 360, 390 และ 412 nm และคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean;) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) และร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation ;%RSD)

$$\text{Mean} = \overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n}$$

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \overline{X})^2}{n-1}}$$

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

107850

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาโดยการตรวจวัดปริมาณกลูตาไทโอนใน spiked sample (เตรียมโดยนำสารละลายตัวอย่างมาเติมสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนเข้มข้น 100 mg/L) และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานลงไป แต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ตัวอย่าง จากสมการต่อไปนี้

$$\%Recovery = \frac{\overline{C}_{spikedsample} - \overline{C}_{sample}}{C_{added}} \times 100$$

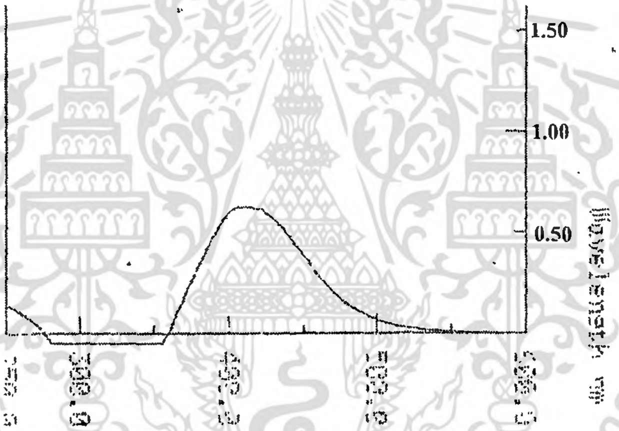
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์

4.1.1 ศึกษาความไปได้ของการวิเคราะห์กลูตาไทโอน

ศึกษาโดยนำสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่ความเข้มข้น 80 mg/L มาสแกนหาค่าความยาวคลื่นในช่วง 300 – 600 นาโนเมตร ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงของกลูตาไทโอนมากที่สุด ซึ่งมีลักษณะของสเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนเข้มข้น 80 mg/L ที่ความยาวคลื่นในช่วง 300-600 นาโนเมตร

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร จะให้ค่าการดูดกลืนแสงของกลูตาไทโอนมากที่สุด คือ 0.625 ดังนั้นในการทดลองนี้จะเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 412 นาโนเมตร เพื่อศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

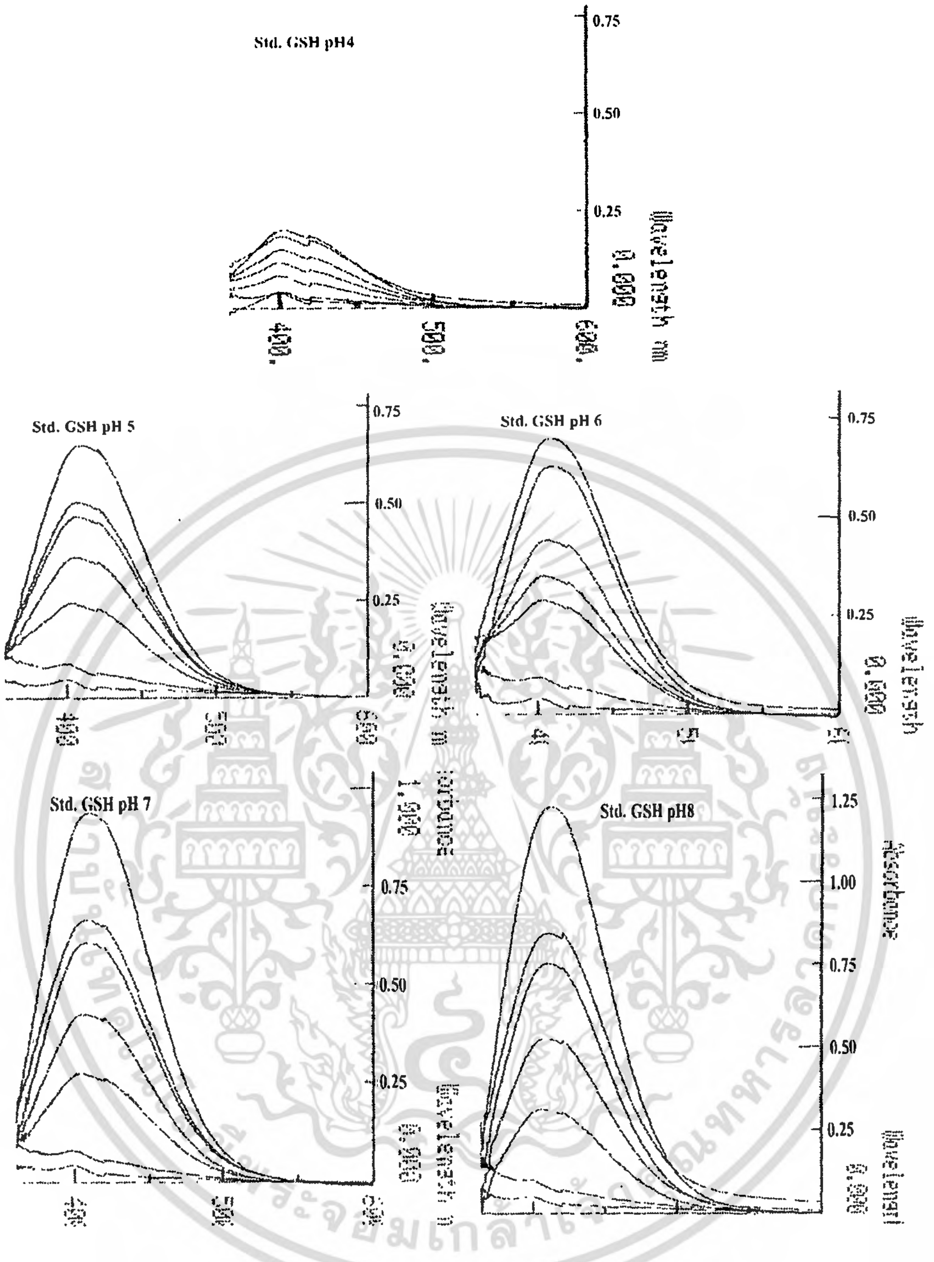
4.1.2 ศึกษาค่า พีเอช ของสารละลายที่เหมาะสม

ศึกษาโดยนำสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนเข้มข้น 80 mg/L มาปรับค่า pH ของสารละลายแต่ละขวดให้เป็น 4, 5, 6, 7.2 และ 8 ตามลำดับ แล้วนำมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ทำการตรวจวัด 3 ซ้ำได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูตาไทโอนเข้มข้น 80 mg/L ที่ pH ต่างๆ

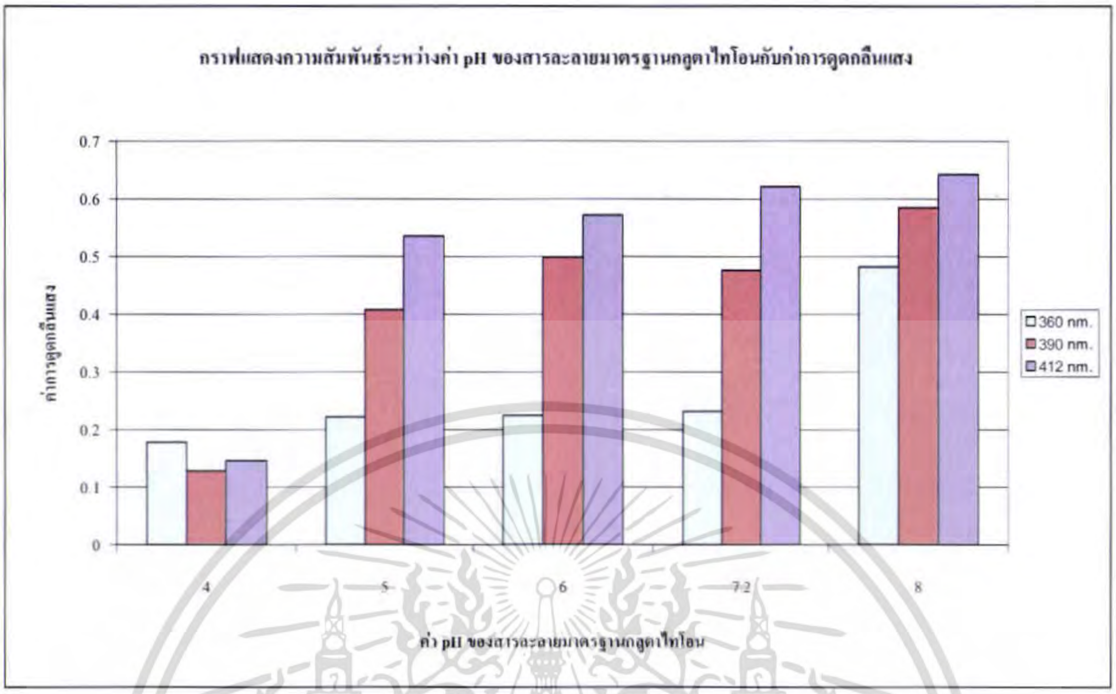
ค่าการดูดกลืนแสง							
pH ของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน	**ที่ความยาวคลื่น 360 nm.**	**ที่ความยาวคลื่น 390 nm.**	**ที่ความยาวคลื่น 412 nm.**				
			ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**ค่าเฉลี่ย**	**±SD**
4	0.178	0.128	0.142	0.137	0.158	0.146	0.011
5	0.222	0.408	0.502	0.603	0.499	0.535	0.059
6	0.224	0.499	0.56	0.585	0.572	0.572	0.039
7	0.231	0.476	0.603	0.642	0.617	0.621	0.019
8	0.482	0.585	0.663	0.643	0.621	0.642	0.021

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงสเปกตรัมที่แสกนได้ที่ค่า pH เป็น 4, 5, 6, 7.2 และ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



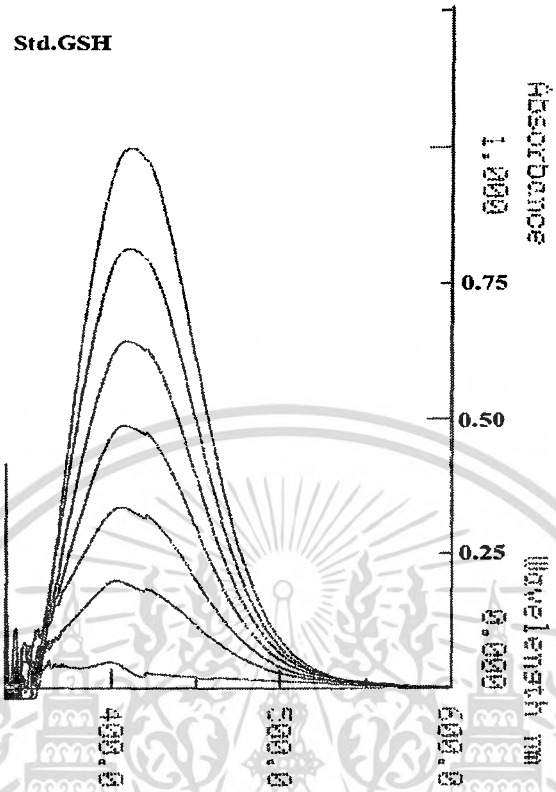
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360, 390 และ 412 nm

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนและความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงคงที่ แต่ปรับเปลี่ยนค่า pH ของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน พบว่าสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่ pH 7 และ 8 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงในปริมาณใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากในสารมาตรฐานมีค่า pH ประมาณ 7 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนให้มีค่า pH 7 เพื่อศึกษาต่อไป

4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน

กราฟมาตรฐานกลูตาไทโอนเตรียมได้จากการนำสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (20, 40, 60, 80, 100 และ 120 mg/L) มาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ได้สเปกตรัมมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพลอตกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน จะได้กราฟเส้นตรงดังแสดงในรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

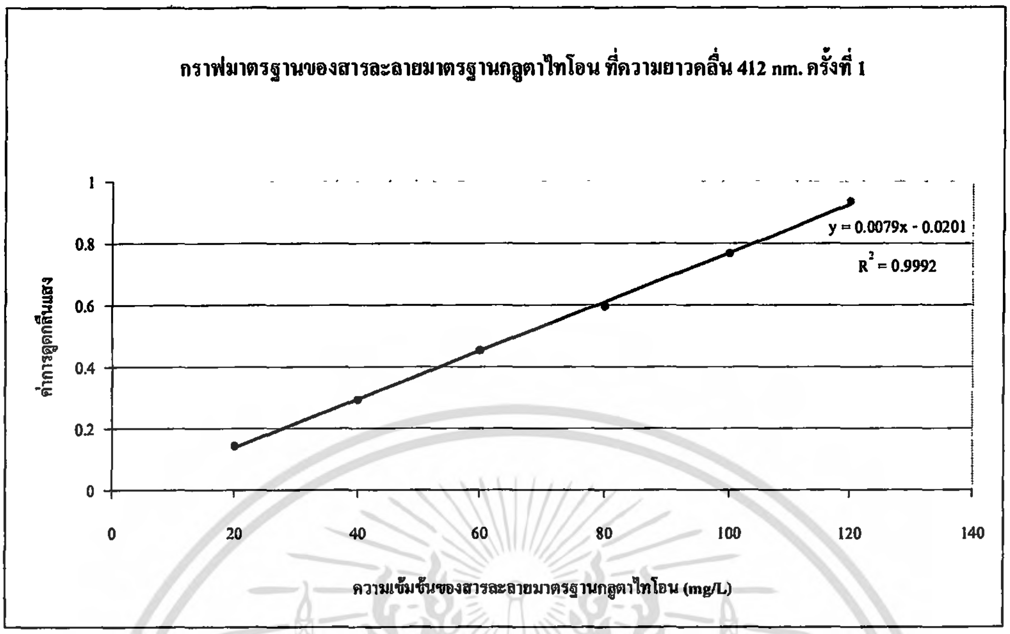


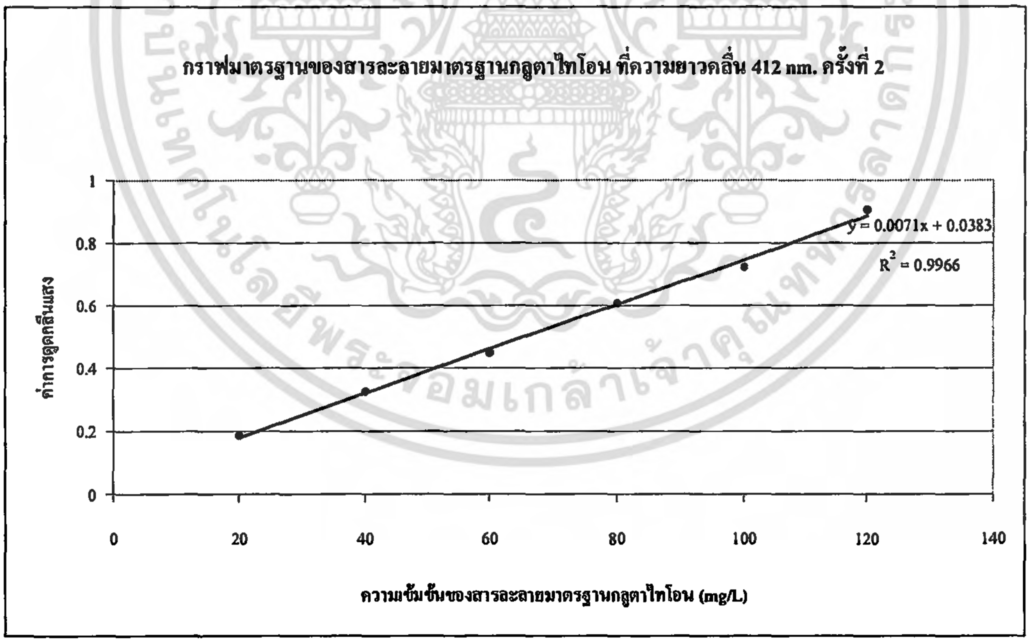
รูปที่ 4.4 แสดงสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดลองค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

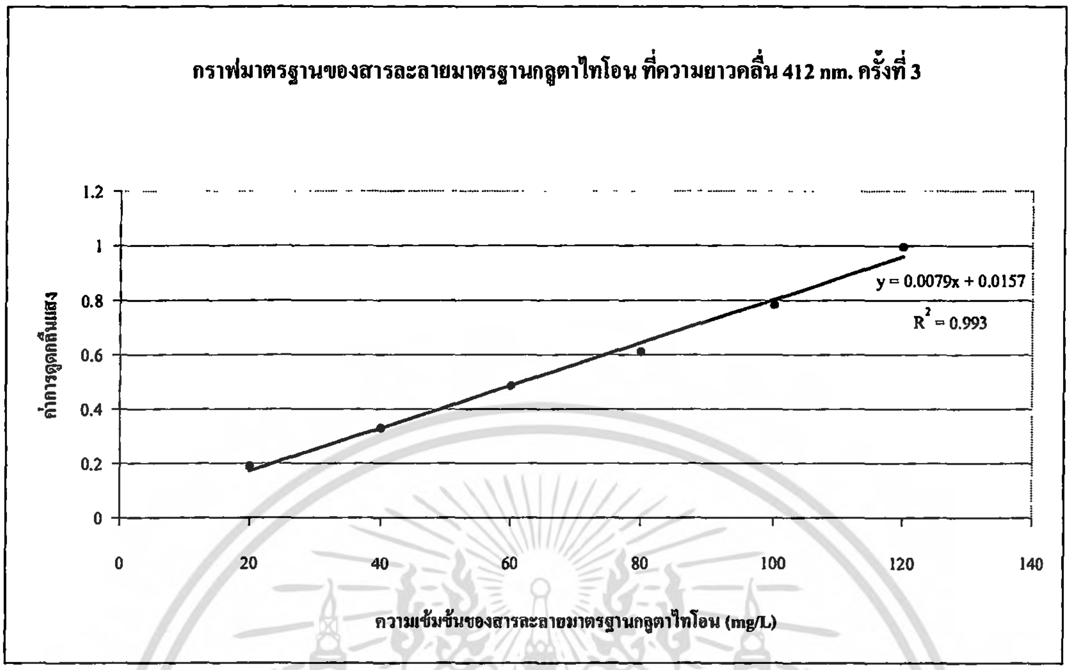
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	±SD
20	0.144	0.187	0.191	0.174	0.026
40	0.294	0.326	0.331	0.317	0.020
60	0.455	0.449	0.486	0.463	0.020
80	0.597	0.608	0.612	0.606	0.008
100	0.768	0.723	0.784	0.758	0.032
120	0.936	0.907	0.996	0.946	0.045

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน

สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกลูตาไทโอนทั้ง 3 ครั้ง คือ y = 0.0079x - 0.0201, y = 0.0071x + 0.0383 และ y = 0.0079x + 0.0157 ตามลำดับ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9992, 0.9966 และ 0.993 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ จากนั้นนำสมการเส้นตรงที่ได้นี้ไปใช้ในการหาปริมาณกลูตาไทโอนในขั้นตอนอื่นๆ ต่อไป

4.3 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

จากกราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน รูปที่ 4.5 คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ได้เท่ากับ 0.9992, 0.9966 และ 0.993 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

4.4 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาได้โดยการนำสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนมา 60 mg/L แล้วทำการตรวจวัด 7 ซ้ำ ที่ความยาวคลื่น 412 nm นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean; $\overline{X}$) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) และร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation; %RSD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm
1	0.448
2	0.432
3	0.449
4	0.465
5	0.424
6	0.486
7	0.455
ค่าเฉลี่ย	**0.451**
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	**0.021**
%RSD	**4.56**

สารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่นำมาศึกษาหาความเที่ยง คือ สารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนเข้มข้น 60 mg/L ผลที่ได้จากการวัดซ้ำ 7 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.451 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.021 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.56

4.5 การศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาได้โดยการตรวจวัดปริมาณกลูตาไทโอนใน spiked sample (เตรียมโดยนำสารละลายตัวอย่างมาเติมสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนเข้มข้น 100 mg/L) และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานลงไป แต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง ได้ร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ดังแสดงในตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าร้อยละของการกลับคืนของปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างแต่ละชนิด

ตัวอย่าง	ร้อยละของการกลับคืน(%Recovery)
สารสกัดจากเมล็ดองุ่น	70.56
สารสกัดจากมะระขี้นก	91.54
ไวน์องุ่น	95.19
น้ำองุ่น	83.82

4.6 การหาปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่าง โดยใช้วิธีกราฟมาตรฐาน

ศึกษานำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างในหัวข้อ 3.1.4 มาตรวจวัดหาค่าการดูดกลืนแสงของกลูตาไทโอน โดยแต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้ไปเทียบหาปริมาณกลูตาไทโอนกับกราฟมาตรฐานกลูตาไทโอนในรูปที่ 4.4ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างแต่ละชนิดที่ความยาวคลื่น 412 nm

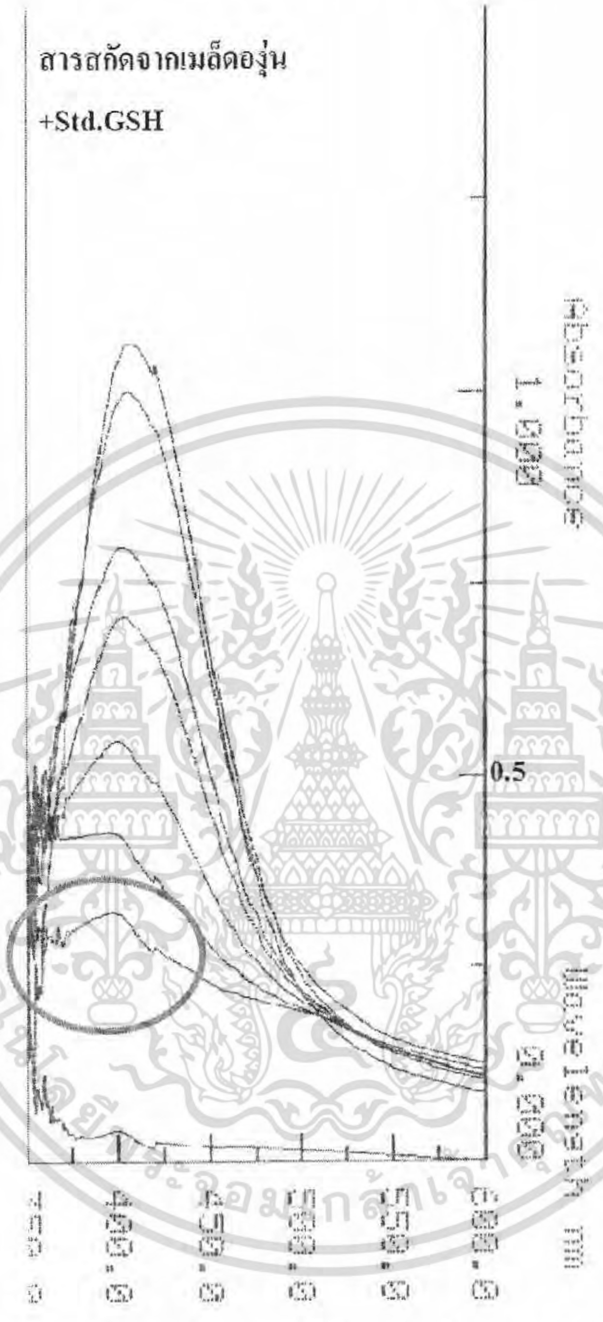
ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
สารสกัดจากเมล็ดองุ่น	0.157	0.168	0.195	0.173
สารสกัดจากมะระขี้นก	0.361	0.358	0.381	0.367
ไวน์องุ่น	0.047	0.102	0.084	0.078
น้ำองุ่น	0.752	0.796	0.853	0.800

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างชนิดต่างๆโดยวิธีการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

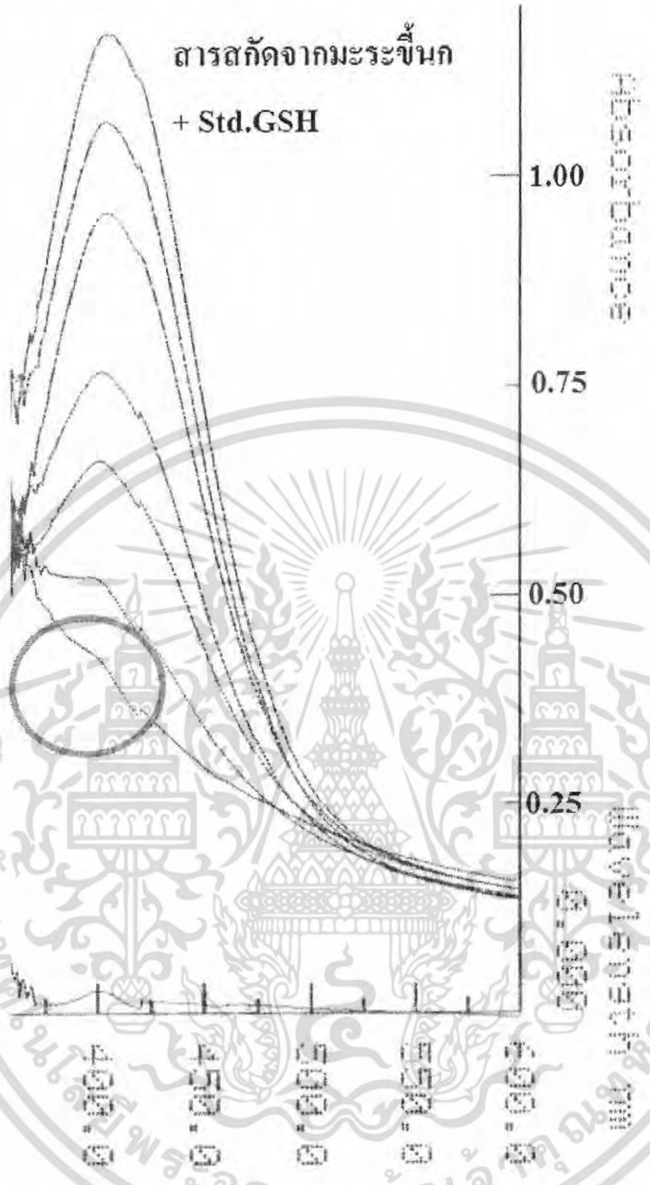
ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของกลูตาไทโอนที่ตรวจวัดได้ (mg/L)				ปริมาณกลูตาไทโอนเริ่มต้น
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
สารสกัดจากเมล็ดองุ่น	22.42	18.27	22.70	21.13	13.95 mg/g
สารสกัดจากมะระขี้นก	48.24	45.03	46.24	46.50	12.24 mg/g
ไวน์องุ่น	8.49	8.97	8.65	8.70	8.70 mg/L
น้ำองุ่น	97.73	106.72	105.99	103.48	103.48 mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



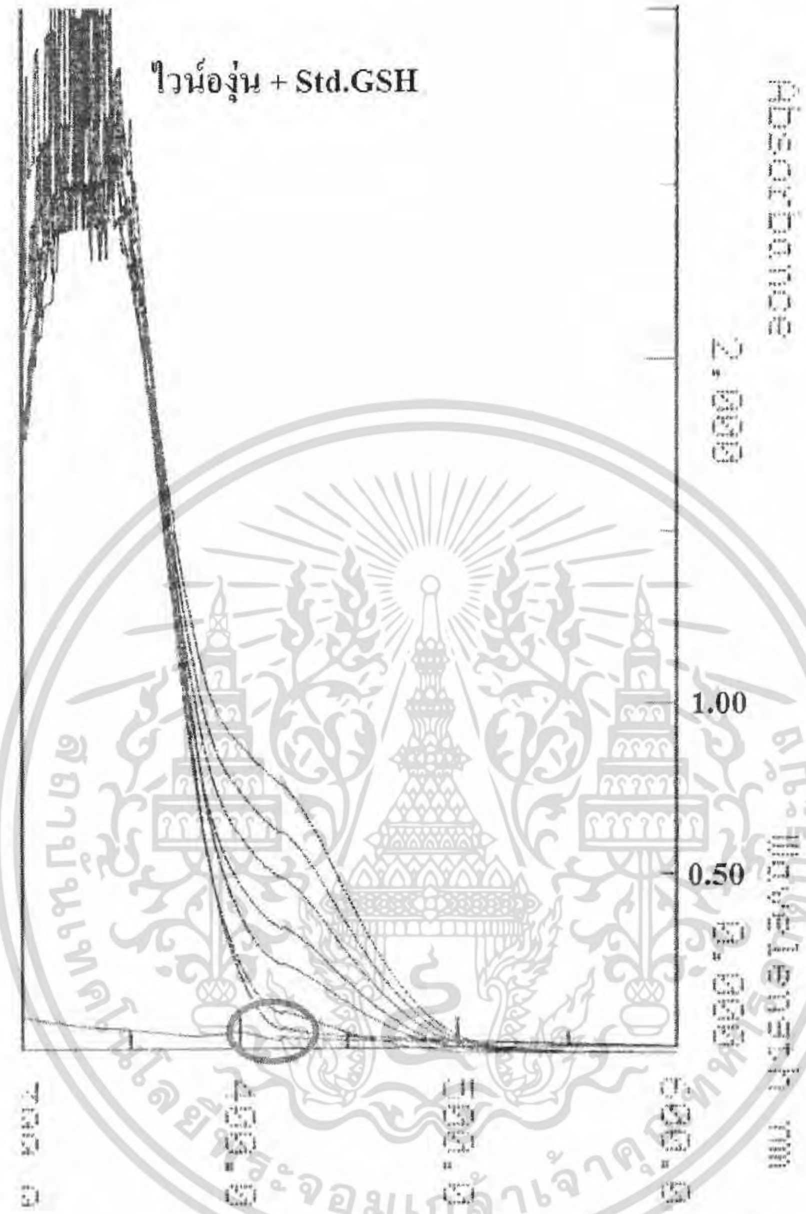
รูปที่ 4.6 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างสารสกัดจากมะระขี้นก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างไวน์องุ่น

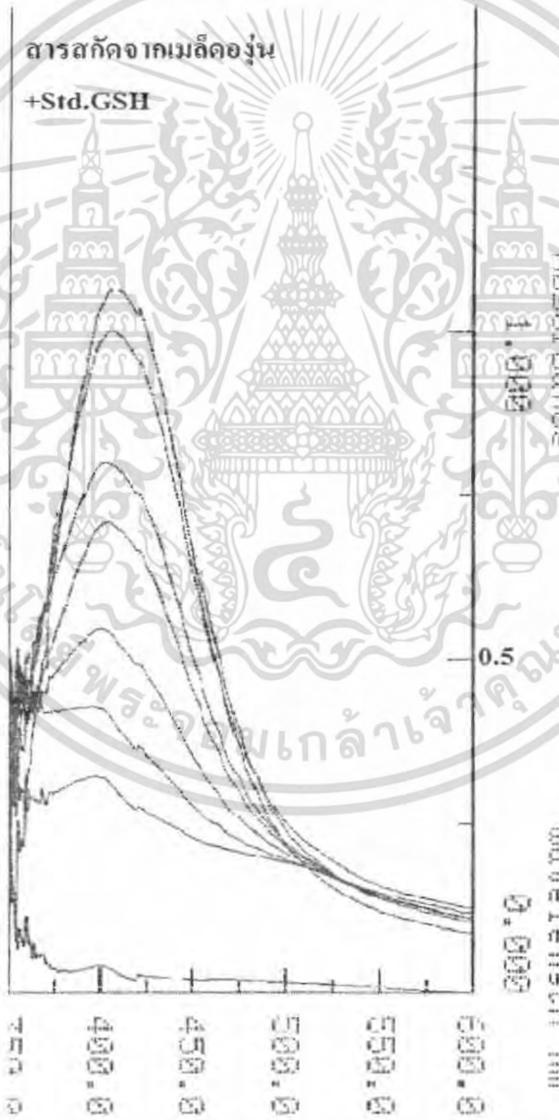
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.9 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างน้ำองุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

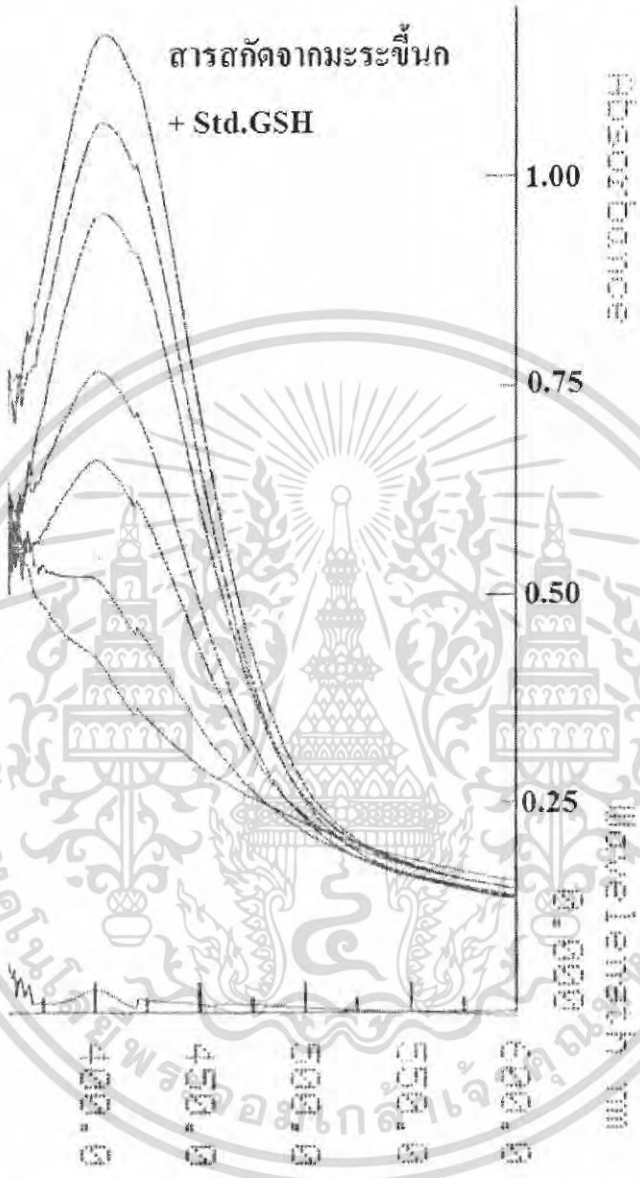
4.7 การหาปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่าง โดยใช้วิธีการเติมสารมาตรฐาน

ศึกษาโดยนำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างในหัวข้อ 3.1.4 มาเติมสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนแต่ละขวดที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 mg/L ตามลำดับ แล้วนำมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร โดยแต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้มาพลอตกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูทาไทโอนที่เติมลงไปในสารละลายตัวอย่าง แล้วลากเส้นกราฟมาตัดแกนนอน จะได้ค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ได้ผลดังตารางที่ 4.6



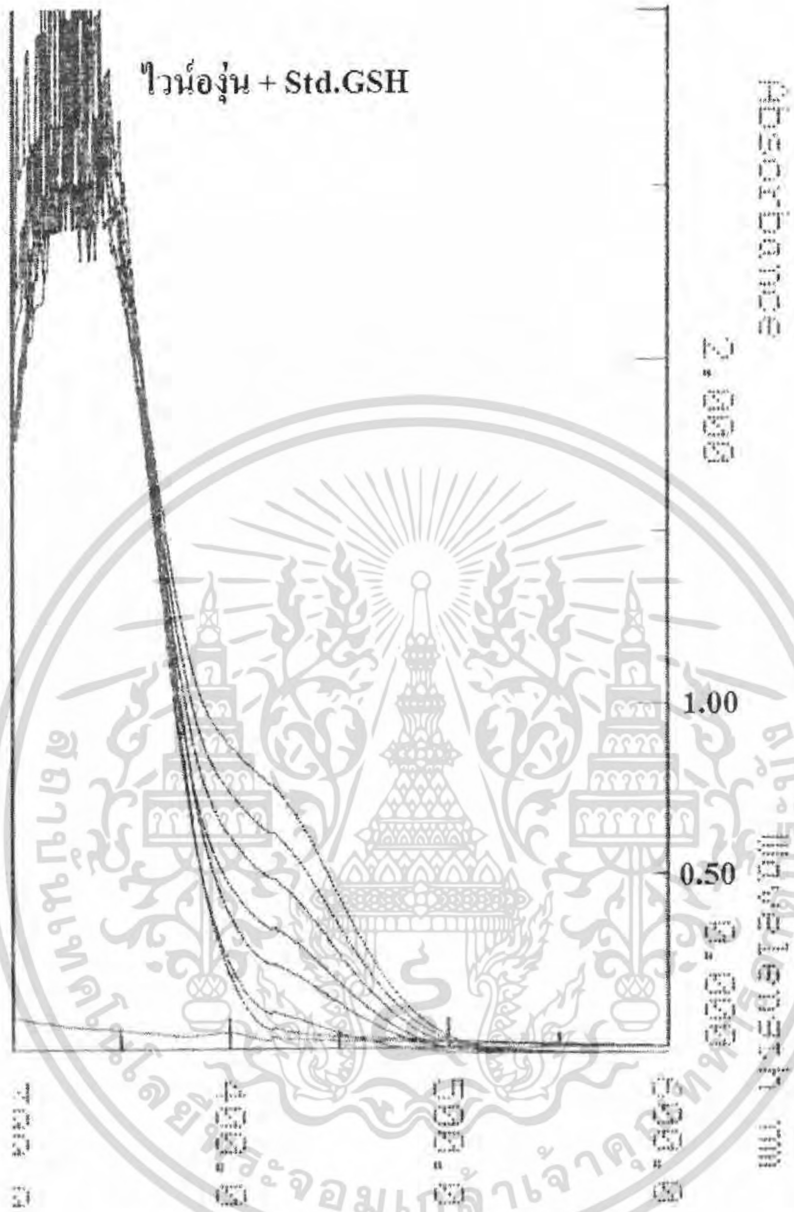
รูปที่ 4.10 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากการเติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 100 และ 120 mg/L ลงในตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



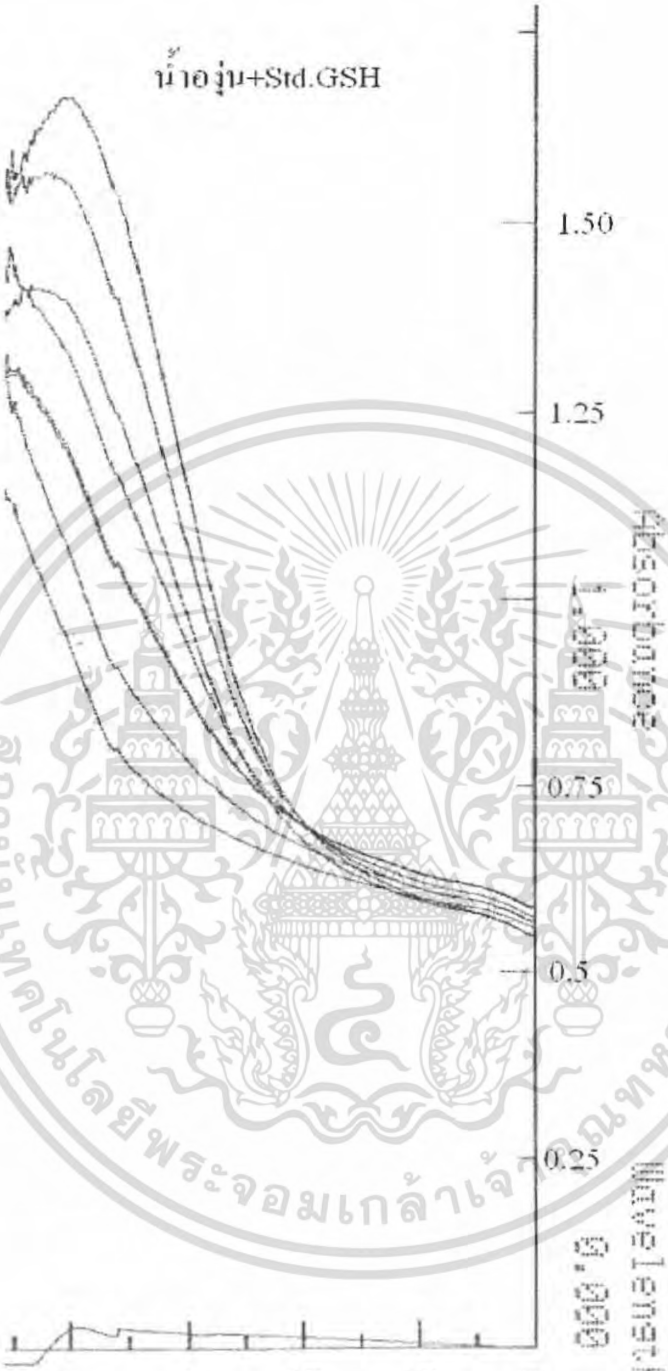
รูปที่ 4.11 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากการเติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 100 และ 120 mg/L ลงในตัวอย่างสารสกัดจากมะระขี้นก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



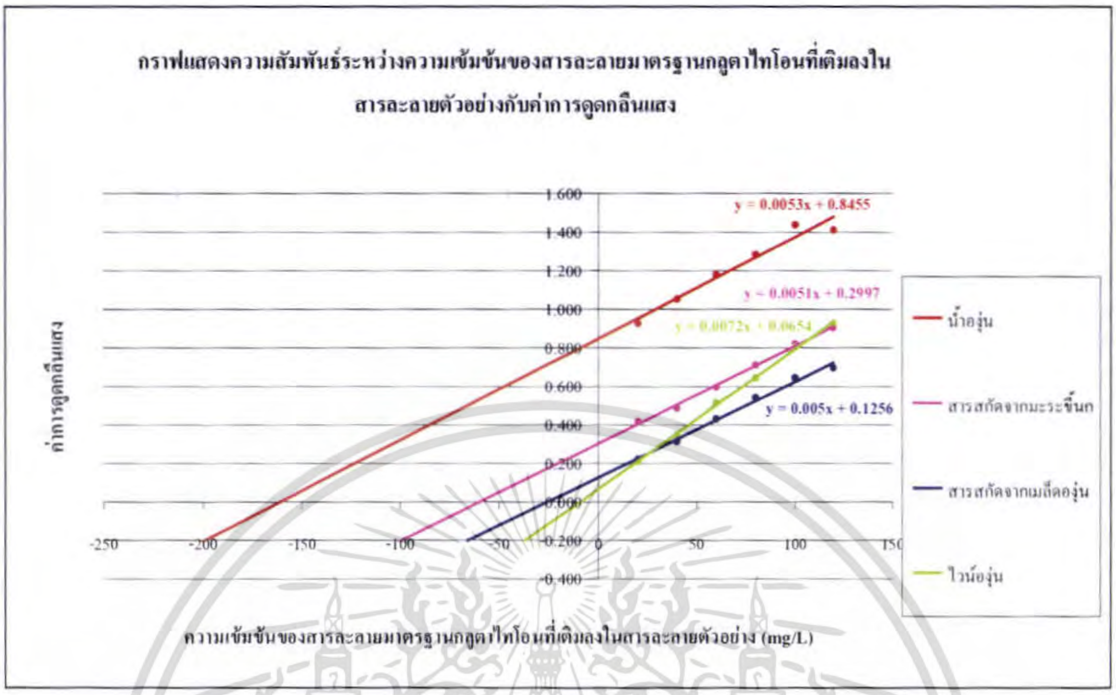
รูปที่ 4.12 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากการเติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 100 และ 120 mg/L ลงในตัวอย่างไวน์องุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากการเติมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 100 และ 120 mg/L ลงในตัวอย่างน้ำองุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างชนิดต่างๆ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของกลูตาไทโอนที่ตรวจวัดได้ (mg/L)	ปริมาณกลูตาไทโอนเริ่มต้น
สารสกัดจากเมล็ดองุ่น	25.12	16.58 mg/g
สารสกัดจากมะระขี้นก	59.94	15.78 mg/g
ไวน์องุ่น	9.08	9.08 mg/L
น้ำองุ่น	159.53	159.53 mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงสารละลายตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
20	0.218	0.394	0.047	0.220
40	0.353	0.517	0.066	0.312
60	0.445	0.692	0.151	0.429
80	0.679	0.78	0.162	0.540
100	0.751	0.994	0.184	0.643
120	0.774	1.106	0.201	0.694

ตารางที่4.9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงสารสกัดจากมะระขี้นก

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงสารละลายตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
20	0.602	0.152	0.494	0.416
40	0.635	0.216	0.604	0.485
60	0.748	0.247	0.787	0.594
80	0.939	0.284	0.906	0.710
100	1.053	0.362	1.042	0.819
120	1.145	0.384	1.175	0.901

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงไวน์องุ่น

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงสารละลายตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
20	0.137	0.217	0.273	0.209
40	0.283	0.341	0.413	0.346
60	0.387	0.601	0.552	0.513
80	0.536	0.676	0.718	0.643
100	0.671	0.874	0.857	0.801
120	0.797	0.952	1.025	0.925

ตารางที่4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงน้ำองุ่น

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงสารละลายตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
20	0.913	0.961	0.902	0.925
40	1.069	1.104	0.981	1.051
60	1.101	1.232	1.201	1.178
80	1.239	1.313	1.295	1.282
100	1.381	1.466	1.465	1.437
120	1.568	1.026	1.636	1.410

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
ผลการทดลองและอภิปรายผล

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย และได้มีการโฆษณาว่ามีการใส่สารกลูตาไทโอนเพื่อความขาวเนียนของผิวพรรณ ในการทดลองนี้จึงได้มีการศึกษาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารกลูตาไทโอนในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์น้ำองุ่น 100 %, ไวน์, สารสกัดจากเมล็ดองุ่น และสารสกัดจากมะระขี้นก โดยวิธีการที่ง่ายและไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ราคาแพง คือการเตรียมสารตัวอย่าง แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ DTNB ได้เป็น Glutathione disulfide (GSSG) กับ 2-nitro-5-thiobenzoic acid ซึ่ง 2-nitro-5-thiobenzoic acid ให้สารละลายสีเหลือง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm

เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาสม จากการทดลองทำให้ทราบว่าค่า pH=7 จะทำให้สารเกิดเป็นสีเหลืองเด่นชัดที่สุด จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm จากการทดลอง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจจากกราฟมาตรฐานได้เท่ากับ 0.9992, 0.9966 และ 0.993 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และปริมาณกลูตาไทโอนในสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีค่าเท่ากับ 13.95 mg/L ในสารสกัดจากมะระขี้นกเท่ากับ 12.24 mg/L ในไวน์องุ่นเท่ากับ 43.50 mg/L และในน้ำองุ่นมีค่าเท่ากับ 517.40 mg/L เมื่อใช้วิธีการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

และเมื่อใช้วิธีการเติมสารมาตรฐานจะได้ปริมาณกลูตาไทโอนในสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีค่าเท่ากับ 16.58 mg/L ในสารสกัดจากมะระขี้นกเท่ากับ 15.78 mg/L ในไวน์องุ่นเท่ากับ 45.40 mg/L และในน้ำองุ่นมีค่าเท่ากับ 797.65 mg/L จะเห็นได้ว่าปริมาณกลูตาไทโอนในน้ำองุ่นมีปริมาณมากที่สุด และวิธีการเทียบกับกราฟมาตรฐาน และวิธีการเติมสารมาตรฐานจะให้ผลการทดลองแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดจากการทดลอง โดยวิธีการเติมสารมาตรฐานจะให้ผลการทดลองที่ดีกว่าวิธีการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ปัญหาและข้อเสนอแนะ

1. น้ำตาลเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์น้ำองุ่น 100 % จึงควรศึกษาว่าน้ำตาลมีผลต่อประสิทธิภาพของการดูกลืนแสงอย่างไร
2. ควรวัด pH ของสารละลายทั้งก่อนและหลังเติมบัฟเฟอร์ เพื่อศึกษาว่า pH มีผลต่อประสิทธิภาพของการดูดกลืนแสงอย่างไร
3. แสงสีม่วงในผลิตภัณฑ์น้ำองุ่น 100 % อาจมีผลต่อการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] อรุณี คงศักดิ์ไพศาล รองศาสตราจารย์ **ปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์** 2 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2546

[2] อรุณี คงศักดิ์ไพศาล รองศาสตราจารย์ **เคมีวิเคราะห์** 2 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

[3] K.Kusmierek, E.Bald **Reduced and total glutathione and cysteine profiles of citrus fruit juices using liquid chromatography** Food Chemistry, Volume 106, Issue 1, 1 January 2008, Pages 340-344

[4] J.Agric **Determination of Cysteine and Glutathione in fruit by High-Performance Liquid Chromatography** Food Chem, Volume 26, No 4, 1978

[5] P.Winayanuwattikun, Albert J. Ketterman **Catalytic and Structural Contributions for Glutathione Binding Residues in a Delta Class Glutathione S-transferase,** Insitute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

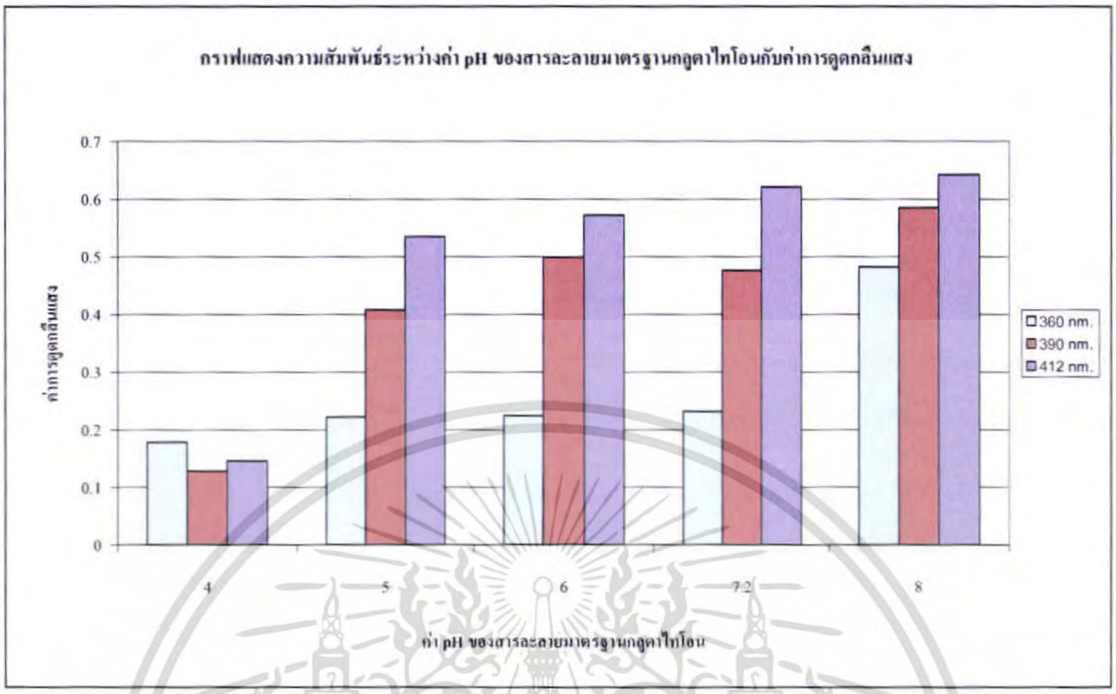
แสดงผลการวิเคราะห์

ก.1 ศึกษาค่า พีเอช ของสารละลายที่เหมาะสม

ตารางที่ ก.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูตาไทโอนเข้มข้น 80 mg/L ที่ pH ต่างๆ

ค่าการดูดกลืนแสง							
pH ของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน	ที่ความยาวคลื่น 360 nm.	ที่ความยาวคลื่น 390 nm.	ที่ความยาวคลื่น 412 nm.				
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
4	0.178	0.128	0.142	0.137	0.158	0.146	0.011
5	0.222	0.408	0.502	0.603	0.499	0.535	0.059
6	0.224	0.499	0.56	0.585	0.572	0.572	0.039
7	0.231	0.476	0.603	0.642	0.617	0.621	0.019
8	0.482	0.585	0.663	0.643	0.621	0.642	0.021

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360, 390 และ 412 nm

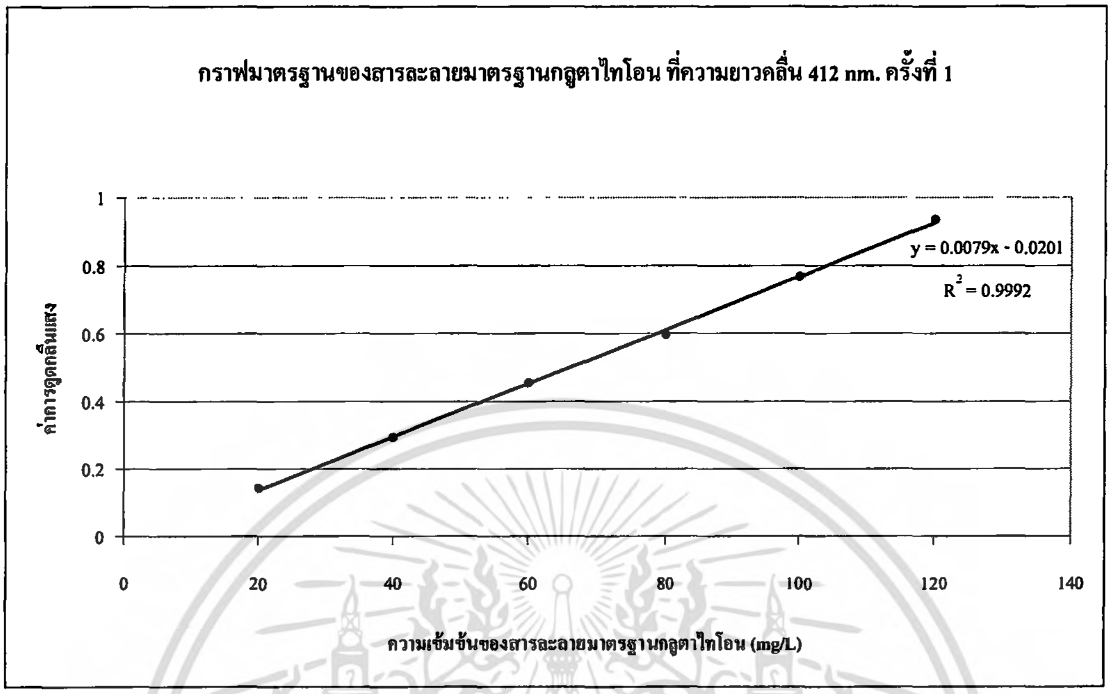
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน และศึกษาการตอบสนองความเป็นเส้นตรง (Linearity)

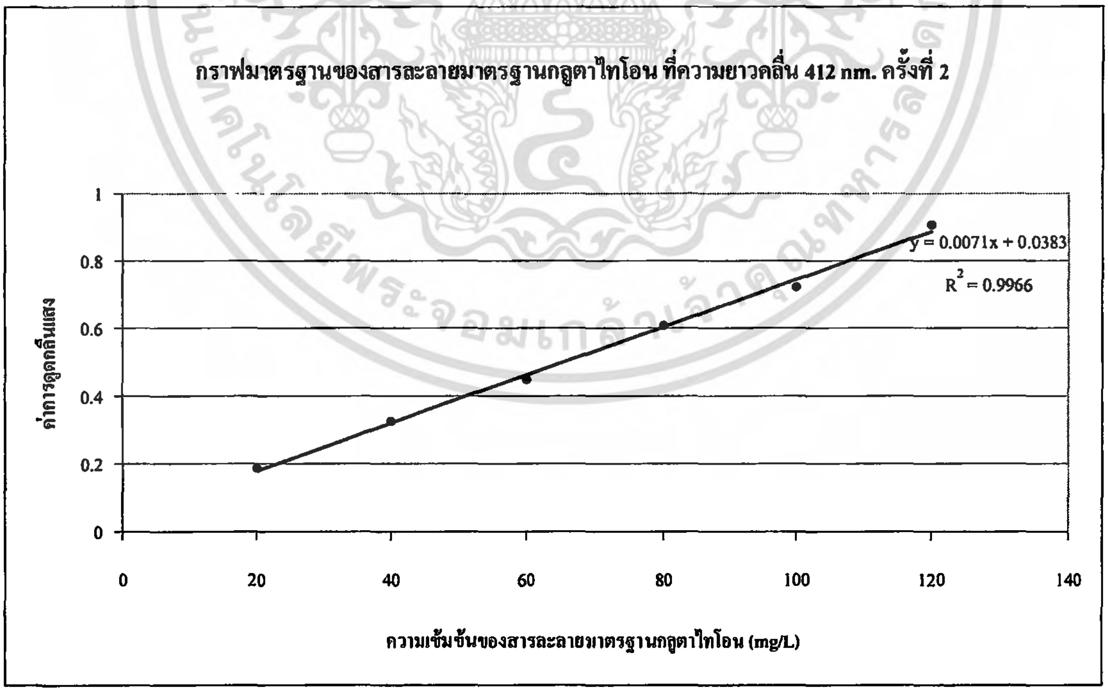
ตารางที่ ก.2 แสดงผลการทดลองค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	±SD
20	0.144	0.187	0.191	0.174	0.026
40	0.294	0.326	0.331	0.317	0.020
60	0.455	0.449	0.486	0.463	0.020
80	0.597	0.608	0.612	0.606	0.008
100	0.768	0.723	0.784	0.758	0.032
120	0.936	0.907	0.996	0.946	0.045

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

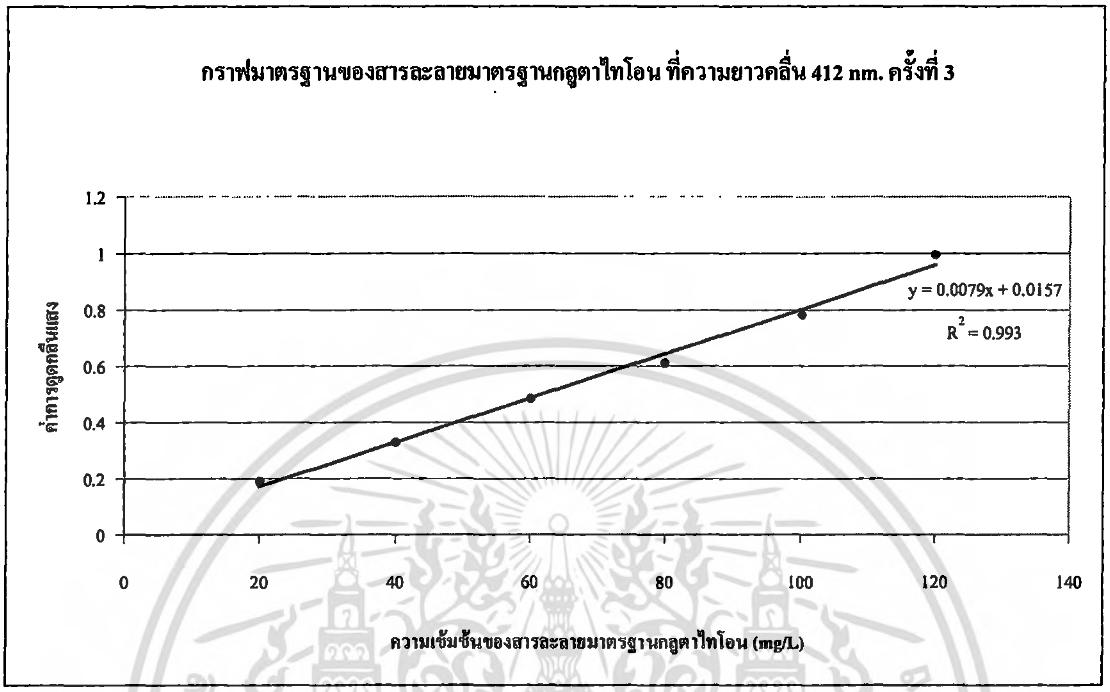


รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน ครั้งที่ 1



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน ครั้งที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอน ครั้งที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

ตารางที่ ก.3 แสดงค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm
1	0.448
2	0.432
3	0.449
4	0.465
5	0.424
6	0.486
7	0.455
ค่าเฉลี่ย	0.451
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.021
%RSD	4.56

<u>คำนวณค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย</u>

จาก $$\overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n}$$

$$\overline{X} = 0.451$$

<u>คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</u>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จาก $$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \overline{X})^2}{n-1}}$$

SD = 0.021

<u>คำนวณค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์</u>

จาก $$\%RSD = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100$$

%RSD = 4.56

ก.4 การศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

ตารางที่ ก.4 แสดงผลการวัดหาปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างกับ spiked sample และค่า %Recovery

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน (mg/L)	ความเข้มข้นเฉลี่ยสารละลายตัวอย่าง (mg/L)	ความเข้มข้นเฉลี่ย spiked sample (mg/L)	%Recovery
สารสกัดจากเมล็ดองุ่น	100	13.95	84.51	70.56
สารสกัดจากมะระขี้นก	100	12.24	103.78	91.54
ไวน์องุ่น	100	8.70	103.89	95.19
น้ำองุ่น	100	103.48	187.30	83.82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>คำนวณค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้</u>

โดยนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาความเข้มข้น จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกลูตาไทโอน ทั้ง 3 กราฟ แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ได้ผลดังตารางที่ ก.2

<u>คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย</u> ทำเช่นเดียวกับข้อ ก.3

<u>คำนวณหาร้อยละของการกลับคืน (%Recovery) ตัวอย่าง</u>

จาก $$\%Recovery = \frac{\overline{C}_{spikedsample} - \overline{C}_{sample}}{C_{added}} \times 100$$

$$\%Recovery = \frac{84.51 - 13.95}{100} \times 100$$

$$\%Recovery = 70.56$$

ตัวอย่างอื่นๆ ทำการคำนวณเช่นเดียวกัน

ก.5 การหาปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่าง โดยใช้วิธีกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ก.5 แสดงปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างชนิดต่างๆ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของกลูตาไทโอนที่ตรวจวัดได้ (mg/L)				ปริมาณกลูตาไทโอนเริ่มต้น
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
สารสกัดจากเมล็ดองุ่น	22.42	18.27	22.70	21.13	13.95 mg/g
สารสกัดจากมะระขี้นก	48.24	45.03	46.24	46.50	12.24 mg/g
ไวน์องุ่น	8.49	8.97	8.65	8.70	43.50 mg/L
น้ำองุ่น	97.73	106.72	105.99	103.48	517.40 mg/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>คำนวณปริมาณกลูตาไทโอนเริ่มต้นของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น</u>

จาก $M_1V_1 = M_2V_2$

ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 21.13 mg/L

M_1 (2 mL) = 21.13 mg/L (10 mL)

$$M_1 = \frac{21.13 \times 10}{2}$$

$$M_1 = 105.65 \text{ mg/L}$$

ในสารละลายตัวอย่าง 1000 mL มีปริมาณกลูตาไทโอน 105.65 mg

ถ้าในสารละลายตัวอย่าง 100 mL มีปริมาณกลูตาไทโอน $\frac{105.65 \times 100}{1000} = 10.565 mg$

เนื่องจากในสารละลายตัวอย่าง 100 mL มีสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 0.7575 g

ดังนั้น ในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 0.7575 g มีปริมาณกลูตาไทโอน 10.565 mg

ถ้าสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 1 g จะมีปริมาณกลูตาไทโอน $\frac{10.565 \times 1}{0.7575} = 13.95$ mg

$\therefore$ ปริมาณกลูตาไทโอนเริ่มต้นของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นเท่ากับ 13.95 mg/g

หมายเหตุ : การคำนวณปริมาณกลูตาไทโอเริ่มต้นของสารสกัดจากมะระขี้นกคำนวณเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>คำนวณปริมาณกลูตาไทโอนเริ่มต้นของไวน์องุ่น</u>

จาก $M_1V_1 = M_2V_2$

ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 8.70 mg/L

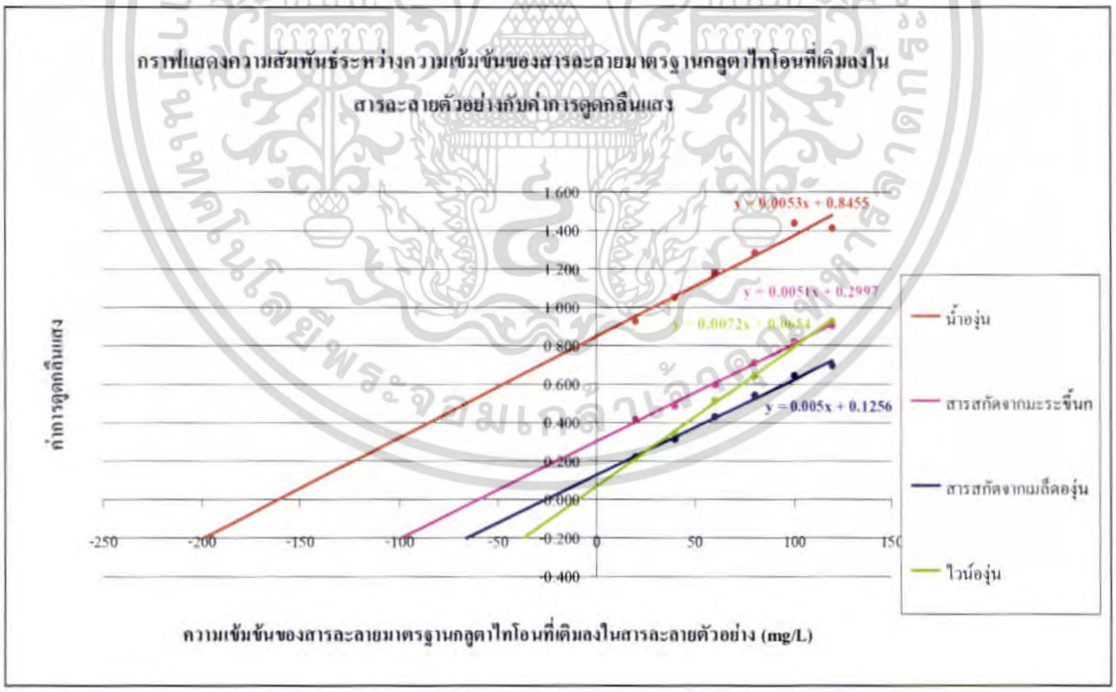
M_1 (2 mL) = 8.70 mg/L (10 mL)

$$M_1 = \frac{8.70 \times 10}{2}$$

$$M_1 = 43.50 \text{ mg/L}$$

หมายเหตุ : การคำนวณหาปริมาณปริมาณกลูตาไทโอเริ่มต้นของน้ำองุ่นคำนวณเช่นเดียวกัน

ก.6 การหาปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่าง โดยใช้วิธีการเติมสารมาตรฐาน



รูปที่ ก.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.6 แสดงปริมาณกลูตาไทโอนในตัวอย่างชนิดต่างๆ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของกลูตาไทโอน ที่ตรวจวัดได้ (mg/L)	ปริมาณกลูตาไทโอน เริ่มต้น
สารสกัดจากเมล็ดองุ่น	25.12	16.58 mg/g
สารสกัดจากมะระขี้นก	59.94	15.78 mg/g
ไวน์องุ่น	9.08	45.40 mg/L
น้ำองุ่น	159.53	797.65 mg/L

<u>คำนวณค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้</u>

โดยนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูตาไทโอนที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างแล้วลากเส้นกราฟมาตัดแกนนอน จะได้กราฟเส้นตรงดังรูปที่ ก.6 จากนั้นนำสมการเส้นตรงที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของกลูตาไทโอนที่ตรวจวัดได้ ดังแสดงในตารางที่ ก.6

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของกลูตาไทโอนที่ตรวจวัดได้ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (สมการเส้นตรงคือ $y = 0.005x + 0.1256$)

เมื่อ $y = 0$

$$X = \frac{-0.1256}{0.005} = -25.12$$

ความเข้มข้นของกลูตาไทโอนที่ตรวจวัดได้เท่ากับ $|x| = |-25.12| = 25.12$ mg/L

ทำการคำนวณเช่นเดียวกันนี้กับตัวอย่างอื่น ได้ผลดังตารางที่ ก.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>คำนวณปริมาณกลูตาไทโอนเริ่มต้นของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นและมะระขี้นก</u>

ทำการคำนวณเช่นเดียวกับข้อ ก.5 ได้ผลดังตารางที่ ก.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้