วิธีอย่างง่ายในการหาปริมาณกาบาโดยอาศัยการเกิดสนุพีโดยใช้ 2-Hydroxynaphthaldehyde ในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี

SIMPLE DERIVERTIZATION FOR SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF GABA IN GERMINATED BROWN RICE AND SUPPLEMENTARY FOOD

ชุติมา เขียวหวาน

ฌาตีกา ศรีเจริญวงศ

วัชรา ทองน้ำ

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

วิธีอย่างง่ายในการหาปริมาณกาบาโดยอาศัยการเกิดอนุพันธ์กับ 2-Hydroxynaphthaldehyde ในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและผลิตภัณฑ์เสริมกาบาด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี

SIMPLE DERIVERTIZATION FOR SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF GABA IN GERMINATED BROWN RICE AND SUPPLEMENTARY FOOD

ชุติมา เขียวหวาน

ญาติกา ศรีเงินยวง

วัชพล ทองแก้ว

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

SIMPLE DERIVERTIZATION FOR SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF GABA IN GERMINATED BROWN RICE SUPPLEMENTARY FOOD

CHUTIMA KHIEWWAN

YATIKA SRINGERNYUANG

WATCHAPON TONGKEAW

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL CHEMISTRY FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2013

หัวข้อโครงงานพิเศษ	วิธีอย่างง่ายในการหาปริมาณกาบาโดยอาศัยการเกิดอนุพันธ์กับ 2-Hydroxynaphthaldehyde ในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและผลิตภัณฑ์อาหารเสริมด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี Simple delivertization for spectrophotometric determination of GABA in germinated brown rice and supplementary food		
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ชุติมา	เขียวหวาน	53050208
	นางสาว ญาติกา	ศรีเงินยวง	53050210
	นาย วัชพล	ทองแก้ว	53050341
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา2556

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ	
ดร.เสาวภาคย์ ธีราทรง	
ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้องานวิจัย	วิธีอย่างง่ายในการหาปริมาณกาบาโดยอาศัยการเกิดอนุพันธ์กับ 2-Hydroxynaphthaldehyde ในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและผลิตภัณฑ์เสริมกาบาด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี
ชื่อนักศึกษา	ชุติมา เขียวหวาน 53050208
	ญาติกา ศรีเงินยวง 53050210
	วัชพล ทองแก้ว 53050341
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขา	วิชาเคมีอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2556
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ เป็นการนำเสนอวิธีการทำอนุพันธ์ของ GABA และตรวจวัดหาปริมาณด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ของ γ-aminobutyric acid หรือ GABA กับ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสภาวะที่ใช้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 8.0 และปรับปริมาตรด้วยสารละลายอะซีโทไนไทล์เก็บสารละลายที่ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากกนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ผลการศึกษาพบว่า ความยาวคลื่นสูงสุดที่สารอนุพันธ์ดูดกลืน (λ_{max}) คือ 424 นาโนเมตรจึงเลือกความยาวคลื่นนี้เพื่อติดตามค่าการดูดกลืนแสง โดยนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน ได้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้นของ GABA ตั้งแต่ 5 ถึง 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี (Abs_{424} = 0.00087 [GABA] + 0.0166, R^2 = 0.9962) ได้ทดลองนำวิธีดังกล่าวไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเม็ด GABAและตัวอย่างข้าวกล้องงอก พบว่าได้ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ อยู่ในช่วงร้อยละ 95.1 ถึง 98.9 เมื่อวิเคราะห์เม็ด GABA และมีค่าประมาณร้อยละ 95 เมื่อวิเคราะห์ข้าวกล้องงอก นอกจากนี้พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 2 เมื่อศึกษาที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน GABA เป็น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการศึกษาทั้งหมดจึงกล่าวได้ว่าวิธีนี้มีความแม่นและความเที่ยงสูง

คำสำคัญ : GABA, เม็ดGABA,ข้าวกล้องงอก, การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์,เทคนิคสเปคโทรโฟโตเมทรี

Title	Simple delivertization for spectrophotometric determination of GABA in germinated brown rice and supplementary food		
Student	Chutima	Khieowan	53050208
	Yatika	Sringernyuang	53050210
	Watchapon	Tongkeaw	53050341
Degree	Bachelor of Science		
Major	Industrial Chemistry		
Academic Year	2013		
Advisor	Dr.Nathawut	Choengchan	

Abstract

A method for derivatization with subsequent spectrophotometric determination of γ-aminobutyric acid (GABA) is presentedin this work. GABA was derivatized with 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (6% w/v) in the presence of borate buffer (pH 8.0) and acetonitrile. The solution was left over night at ambient temperature. Maximum absorption wavelength of the derivatives was located at 424 nm and this wavelength was employed as the monitored wavelength. Linear calibration was observed in the concentration range from 5 to 40 mg GABA l^{-1} with good linearity (Abs_{424} = 0.00087 [GABA] + 0.0166, R^2 = 0.9962). The proposed method was applied to GABA tablets and germinated GABA rice. Results were agreed very well to the label concentration. Recoveries were found from 95.1 to 98.9 % for supplemented tablets and was around 95 % for rice samples. Relative standard deviation was lower than 2 % when 40 mg GABA l^{-1} was studied. This implies that the method provided high accuracy and high precision

Keywords : GABA, Tablet, Germinated rice, Derivatization, Spectrophotometr

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำ ความเอาใจใส่ในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ และ ดร.เสาวภาคย์ ธีราทรง ที่กรุณาเป็นกรรมการตรวจสอบและช่วยกรุณาแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ประสิทธิ์ประศาสน์วิชาความรู้

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ภาคเคมี และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกๆท่านที่เอื้อเฟื้อความสะดวกในเรื่องอุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนเครื่องมือต่างๆ

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องเป็นอย่างยิ่งที่คอยสนับสนุน ให้กำลังใจ คำแนะนำ คำตักเตือนในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณนางสาวพรรวี แท่นประมูล ที่ให้ความรู้ แนวทางให้คำปรึกษาและช่วยเหลือต่างๆในการทำงานวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณพี่ๆเพื่อนๆทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือต่างๆและกำลังใจ ทำให้งานวิจัยดำเนินไปด้วยดี

ชุติมา เขียวหวาน

ญาติกา ศรีเงินยวง

วัชพล ทองแก้ว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV-VI
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII-X
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1-2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับกาบา	4-6
2.2 หลักการทำงานของเทคนิคสเปกโตรโฟโตรเมทรี	7-17
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18-20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	21-22
3.2 การเตรียมสารละลาย	
3.2.1 การเตรียมสารละลาย 2-hydroxynaphthaldehyde (3%w/v Acetronitrile)	22
3.2.2 การเตรียมสารละลาย2-hydroxynaphthaldehyde (4.5% w/v Acetronitrile)	22
3.2.3 การเตรียมสารละลาย2-hydroxynaphthaldehyde (6% w/v Acetronitrile)	22-23
3.2.4 การเตรียมสารละลาย2-hydroxynaphthaldehyde (7.5% w/v Acetronitrile)	23
3.2.5 การเตรียมสารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์	23

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.2.6 การเตรียมสารละลาย Borax buffer pH 8,pH 9,pH10 23

3.2.7 การเตรียมสารละลาย 70% v/v Ethanol 24

3.2.8 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน GABA ความเข้มข้น 1000 ppm 24

3.2.9 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องงอก 24-25

3.2.10 การเตรียมตัวอย่าง GABA เม็ด 25

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 ศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณ GABA ในเครื่อง UV-Visible spectrometer 25-26

3.3.2 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 26

3.3.3 ศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 26

3.3.4 ศึกษาอัตราส่วนของ ACN:H_2O ในการปรับปริมาตรผลิตภัณฑ์ระหว่าง GABA กับ Reagent 27

3.3.5 ศึกษาอิทธิพลของการให้อุณหภูมิ 27-28

3.3.6 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้น Reagent ในการทำปฏิกิริยากับ GABA 28

3.3.7 การหาปริมาณ GABA ในตัวอย่าง 28-29

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการติดตามผลิตภัณฑ์ 30

4.2 การศึกษาความเป็นเส้นตรงของค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ 31

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

4.3.1 อิทธิพลของตัวทำละลาย 32

4.3.2 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 33-34

4.3.3 ศึกษาอัตราส่วนของ Acetronitrile:H_2O ในการปรับปริมาตรผลิตภัณฑ์ระหว่าง GABA กับ Reagent 34-35

4.3.4 ศึกษาpHที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 36-37

4.3.5 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของ Reagent ในการทำปฏิกิริยากับ GABA 37

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.4 การศึกษาความถูกต้องของวิธีการทดลองในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและผลิตภัณฑ์เสริมกาบา	
4.4.1 การหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (%Recovery) ในอาหารเสริมกาบา	38
4.4.2 การหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (%Recovery) ในข้าวกล้องงอก	39
บทที่ 5 ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	40
5.2 ข้อเสนอแนะ	40-41
อ้างอิง	42-43
ภาคผนวก	44-48

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ปริมาณกาบาที่พบในอาหารประเภทต่างๆ 5

ตารางที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืนกับสีของสารที่มองเห็น 8

ตารางที่ 3.1 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน GABA ที่ความเข้มข้นต่างๆ 24

ตารางที่ 3.2 แสดงการเตรียมสารละลายสำหรับการทำ Recovery 28

ตารางที่ 4.1 แสดงสมการเส้นตรงของอัตราส่วน Acetronitrile:H_2O 34

ตารางที่ 4.2 แสดงสมการเส้นตรงความเข้มข้นของ Reagent 37

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (%Recovery) ในอาหารเสริมกาบา 38

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (%Recovery) ในข้าวกล้องงอก 39

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ Gamma-aminobutyricacid : GABA 4

รูปที่ 2.2 การหักเหของแสงเมื่อเดินทางผ่านปริซึม 7

รูปที่ 2.3 วงล้อสี (color wheel) 8

รูปที่ 2.4 ลำแสงที่ผ่านเข้าออกสารละลายความเข้มข้น C_1 และ C_2 9

รูปที่ 2.5 ลำแสงที่ผ่านเข้าออกสารละลายความเข้มข้น C เป็นระยะทาง 1 9

รูปที่ 2.6 แสดงการสร้างกราฟมาตรฐาน 11

รูปที่ 2.7 สเปกโตรโฟโตรมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยว 12

รูปที่ 2.8 สเปกโตรโฟโตรมิเตอร์แบบลำแสงคู่ 13

รูปที่ 2.9 สเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญาณ 13

รูปที่ 2.10 แผนภาพเครื่อง UV-Visible Spectrometer อย่างง่าย 14

รูปที่ 2.11 หลอดดิวเทอเรียม (ซ้าย) และหลอดทังสเตน (ขวา) 15

รูปที่ 2.12 เกรตติ้งใช้แยกความยาวคลื่น 15

รูปที่ 2.13 คิวเวทท์ (cuvette) ควอตซ์ (quartz) 16

รูปที่ 2.14 (ซ้าย) ภาพตัดขวางของหลอด PMT (ขวา) ลักษณะหลอด PMT ในสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 17

รูปที่ 2.15 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญาณ 17

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูดกลืนแสง 30

รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 424 นาโนเมตร 31

รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย Methanol และ Acetronitrile 32

รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาที) กับค่าการดูดกลืนแสง 33

รูปที่ 4.5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่แต่ละช่วงเวลา 33

รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงอัตราส่วน Acetronitrile:H_2O 80:20,70:30,60:40,50:50 และ 40:60 34

รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูดกลืนแสงอัตราส่วน Acetronitrile:H_2O 30:70 35

รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนของ pH8 และ pH9 36

รูปที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของ pH10 36

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
กับค่าการดูดกลืนแสงความเข้มข้นของ Reagent 3%,4.5%,6% และ 7.5% 37

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

สารกาบา (GABA) หรือ γ-aminobutyric acid ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลางและเป็นสารสื่อประสาทประเภทยับยั้ง โดยจะทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้น ทำให้สมองเกิดการผ่อนคลาย อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อที่ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต เกิดการสร้างกล้ามเนื้อ

ในปัจจุบันมีการนำสาร GABA มาใช้ในทางการแพทย์เพื่อรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทต่างๆหลายโรค เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีผลการวิจัยด้านสุขภาพกล่าวว่า ข้าวกล้องงอกที่ประกอบด้วย GABA มีผลช่วยลดความดันโลหิต ลดอาการอัลไซเมอร์ ลดน้ำหนัก และทำให้ผิวพรรณดี

แม้ว่า GABA จะเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอย่างมาก แต่ก็ยังไม่มีการกำหนดปริมาณของ GABA ในอาหารอย่างแน่นอน ซึ่งในกระบวนการผลิตอาหารที่มีสาร GABA นั้นผู้ผลิตจะเป็นผู้กำหนดปริมาณที่เติมลงในผลิตภัณฑ์เองและมีการบ่งชี้ปริมาณของสารไว้ที่บรรจุภัณฑ์นั้นๆซึ่งก็จะแตกต่างกันไปตามประเภทของผลิตภัณฑ์ โดยส่วนของปริมาณ GABA ในข้าวกล้องงอกจะขึ้นกับการงอกของข้าวแต่ละชนิด ขึ้นกับวัตถุดิบที่ใช้และกระบวนการผลิต ซึ่งทำให้ไม่ทราบปริมาณที่แน่นอนของสารได้

วิธีที่ใช้กันทั่วไปในการหาปริมาณ GABA จะมีการใช้สารอนุพันธ์หลายตัวเช่น naphthalene-2, 3-dicarbaldehyde (NDA), 2-Hydroxynaphthaldehyde (HN) และ Ninhydrin รวมถึงต้องควบคุมอุณหภูมิทำให้มีขั้นตอนมากในการเตรียมสารอนุพันธ์ต่างๆและเกิดความยุ่งยากในการวิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณกาบาโดยใช้ 2-Hydroxynaphthaldehyde (HN) เป็นสารอนุพันธ์เพียงชนิดเดียว แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย มีความสะดวกรวดเร็ว และให้ประสิทธิภาพที่ดี

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1. เพื่อหาปริมาณกาบาโดยใช้ 2-Hydroxynaphthaldehyde (HN) เป็นสารเคมีในการทำปฏิกิริยาและตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี

1.2.2. เพื่อนำวิธีนี้ไปพัฒนาขึ้นเพื่อหาปริมาณกาบาในตัวอย่าง

1.2.3. เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวัด (Validation)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เริ่มจากการทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการตรวจวัดหาปริมาณสากาบาด้วยวิธีต่างๆ แล้วทำการศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารกาบาโดยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี จากนั้นก็จะประยุกต์มาใช้ในงานวิจัยนี้ เมื่อพบว่ากาบาที่เกิดอนุพันธ์กับสารรีเอเจนต์สามารถดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น UV-Visible ได้ จากนั้นก็ศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารกาบา โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่อง (Batch analysis) เพื่อตรวจการหาปริมาณสารกาบาโดยทำให้เกิดอนุพันธ์กับ 2-Hydroxynaphthaldehyde ในตัวอย่างข้าวกล้องงอกด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ก็จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสมของตัวทำละลาย แล้วจึงเริ่มดำเนินการทดลอง และจะประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธีวิเคราะห์ อีกทั้งยังพัฒนางานวิจัยเพื่อนำไปใช้หาปริมาณกาบาในอาหารเสริมที่เกี่ยวกับสุขภาพอีกด้วย และสุดท้ายจึงทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบผลกับวิธีมาตรฐาน ขั้นสุดท้ายก็จะดำเนินการเผยแพร่งานวิจัยต่อไป

สามารถสรุปเป็นขั้นตอนการดำเนินงานได้ดังนี้

1.ทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.ศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารกาบาโดยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี

3.ศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารกาบาโดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Batch

4.ทำให้กาบาเกิดอนุพันธ์กับ 2-Hydroxynaphthaldehyde

5.ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

6.ประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธี

7.พัฒนางานวิจัยเพื่อนำไปใช้หาปริมาณกาบาในอาหารเสริมสุขภาพ

8.ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบผลกับวิธีมาตรฐาน

9.ดำเนินการเผยแพร่งานวิจัย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ใช้ในการหาปริมาณกาบาในตัวอย่างข้าวได้โดยเทคนิคสเปกโตรโฟโทเมทรีและใช้ 2-Hydroxynaphthaldehyde (HN) เป็นสารทำให้เกิดอนุพันธ์

2.วิธีที่ใช้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

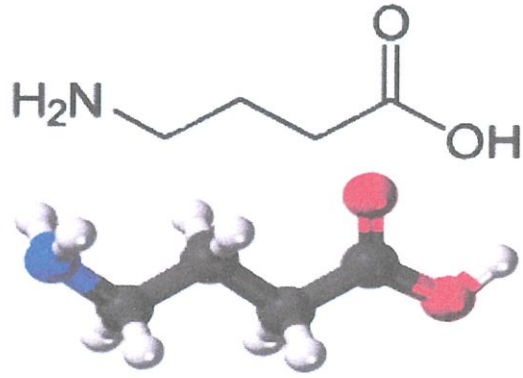
บทที่2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับกาบา

2.1.1 GABA (Gamma-aminobutyric Acid) [1]

GABA เป็นกรดอะมิโนที่ผลิตจากกระบวนการ decarboxylation ของกรดอะมิโน (glutamic acid) กรดนี้จะมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง นอกจากนี้ GABA ยังถือเป็นสารสื่อประสาทประเภท สารยับยั้ง (inhibitor) โดยจะทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้นซึ่งช่วยทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายและนอนหลับสบาย อีกทั้งยังทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อ (anterior pituitary) ซึ่งทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต (HGH) ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ ทำให้กล้ามเนื้อเกิดความกระชับและเกิดสาร lipotropic ซึ่งเป็นสารป้องกันการสะสมไขมันและจะสามารถป้องกันการทำลายสมอง เนื่องจากสารเบต้าอไมลอยด์เปปไทด์ (Beta-amyloid peptide) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคสูญเสียความทรงจำ (อัลไซเมอร์) ดังนั้นจึงได้มีการนำสาร GABA มาใช้ในวงการแพทย์ เพื่อการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทต่างๆ หลายโรค เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ โรคลมชัก เป็นต้น

2.1.2 โครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของ GABA



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ Gamma-aminobutyricacid:GABA [1]

ชื่อทางเคมี : Gamma-aminobutyric acid or 4-aminobbutanoic acid

สูตรโครงสร้าง : $C_4H_9NO_2$

มวลโมเลกุล : 103.120 g/mol

จุดเดือด : 247.9 °C, 521 K, 478 °F

จุดหลอมเหลว : 203.7 °C, 477 K, 399 °F

จุดวาบไฟ : 103.8°C

ความหนาแน่น : 1.11 g/mL

ความดันไอ : 0.0079mmHg at 25 °C

2.1.3 แหล่งที่พบ [2]

GABAนั้นเป็นที่รู้จักกันมานานแล้วในหลายประเทศซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติของอาหารหลายประเภท ซึ่งจะมีปริมาณแตกต่างกันไป และด้วยความเป็นธรรมชาตินี้เองจึงมีปริมาณไม่คงที่ และอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการ

ตาราง2.1 ปริมาณค่ากาบาที่พบในอาหารประเภทต่างๆ [2]

Food Item	GABA Content (mg/100g)
ใบชาแห้ง	100-200
แตงเมลอน	74.5
มะเขือเทศ	62.6
กีมจิ	59.4
ช็อกโกแล็ต	14.5
ข้าวกล้องงอก	10.0
ฟักทอง	9.7
เต้าหู้	6.4

ซึ่งตามหลักฐานการทดลองอย่างต่อเนื่อง พบว่าปริมาณการได้รับกาบาเพื่อให้มีประสิทธิผล (Effectivedose) ในการผ่อนคลายความเครียดอยู่ที่ประมาณ 20-30 มิลลิกรัม แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการกำหนดร้อยละของปริมาณการได้รับกาบาแต่ละวัน (% Daily Value) อย่างเป็นทางการ ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมบางชนิดจึงมีการเพิ่มกาบาถึง 500 มิลลิกรัม เพื่อให้ได้ประโยชน์อย่างถึงที่สุด นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่เพิ่มกาบาโดยเฉพาะ เพื่อให้ได้รับสารกาบาเพิ่ม

มากขึ้น สารสกัดกาบา 1 เมล็ด (750 มล.) นั้นมีประโยชน์เทียบเท่ากับการรับประทานข้าวกล้องงอก 4 จาน

2.1.4 ประโยชน์ของสาร GABA

1. เป็นสารสื่อประสาทประเภทสารยับยั้งในระบบประสาทส่วนกลางของสัตว์กระดูกสันหลัง โดยGABA ทำหน้าที่ส่ง Cl^{-1}กระจายเข้าสู่ภายในเซลล์ประสาทหรือส่ง K^{+}ออกจากเซลล์ ทำให้เนื้อเยื่อมีขั้วประจุเพิ่มขึ้นและเกิดการกระตุ้นเซลล์ ลักษณะดังกล่าวเรียกว่า hyperpolarizing inhibition ดังนั้นการกระตุ้นการรับส่ง GABA จะยับยั้งกิจกรรมภายในเซลล์ได้ไม่ว่าจะเกิดแบบ hyperpolarizes หรือ depolalizes

2. ทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมองหยุดการกระตุ้นสื่อประสาท ที่ทำให้จิตใจเกิดการกระวนกระวาย จึงนำมาใช้เป็นยากล่อมประสาทเพื่อลดความเครียด ความวิตกกังวลและการนอนไม่หลับ เช่น valium

3. ช่วยลดความดันโลหิต ซึ่งจากผลการทดสอบผู้ป่วยความดันโลหิตสูง 6 รายหลังจากบริโภคคัพภะข้าวงอกที่มีสาร GABA สูง นาน 8 สัปดาห์พบว่าทำให้ความดันโลหิตลดลง

4. ทำให้การทำงานของตับและไตดีขึ้น จากรายงานการวิจัยพบว่า คัพภะข้าวงอกที่มีสาร GABAปริมาณสูง จะกระตุ้นการทำงานของไต ทำให้โปรตีน BUN (blood Urea Nitrogen) ลดลง ร้อยละ 26

5. ป้องกันโรคอ้วนโดยการลดปริมารไตรกลีเซอไรด์ในตับและในกระแสเลือดทำให้น้ำหนักลดลง

6. ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ในหนูทดลอง และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง

7. เพิ่มเมแทบอไลต์ของเอทิลแอลกอฮอล์และอะเซทัลดีไฮด์ เมื่อปริมาณคัพภะของข้าวที่มีสาร GABA ปริมาณ 10 กรัม มีผลทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์และอะเซทัลดีไฮด์ลดลงร้อยละ 15 และ 25 ตามลำดับ จึงช่วยลดอาการเมาค้างมึนศีรษะจากการดื่มแอลกอฮอล์ได้

8. มีคุณสมบัติเป็นสารระงับกลิ่น จากผลการทดสอบใช้สาร GABA ในคัพภะข้าวต่อการระงับกลิ่นของสาร methyl mercaptan และ ammonia ในหลอดทดลองด้วยการดมกลิ่นสารระเหยบริเวณช่องว่างด้านบนภาชนะพบว่า สาร GABAมีประสิทธิภาพในการระงับกลิ่นได้เช่นเดียวกับสารที่ใช้ระงับกลิ่นสำหรับอาหาร

9. รักษาโรคลมชักและอาการอัลไซเมอร์

10. ช่วยขับปัสสาวะ

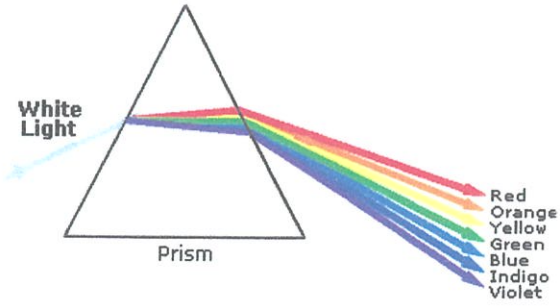
2.2 หลักการทำงานของเทคนิคสเปกโตรโฟโตรเมทรี

2.2.1 เครื่อง UV-Visblespectrometer [3]

UV-Vis spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัด ปริมาณแสง ในช่วงรังสียูวี และช่วงแสงขาว ที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืน โดยตัวอย่าง ที่วางอยู่ ใน เครื่องมือ ความยาวคลื่นแสง จะมีความสัมพันธ์กับ ปริมาณ และ ชนิดของ สาร ที่มีอยู่ในตัวอย่างซึ่งโดย ส่วนใหญ่ จะเป็น สารอินทรีย์ สารประกอบ เชิงซ้อน และสารอนินทรีย์ที่สามารถ ดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น เหล่านี้ได้เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ในปัจจุบันได้รับการพัฒนาให้มีขนาดที่ เล็กลง มีความ ไวมากขึ้น ให้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น รวมไปถึงการ พัฒนา โปรแกรมที่ใช้ควบคู่กันกับ เครื่องมือในการวิเคราะห์ และการพ่วงต่อ ด้วย เทคนิคอื่นๆ ทำให้สามารถ นำไป ใช้งาน ได้กว้าง ขึ้น

1. แสงที่มองเห็นได้ (visible light)

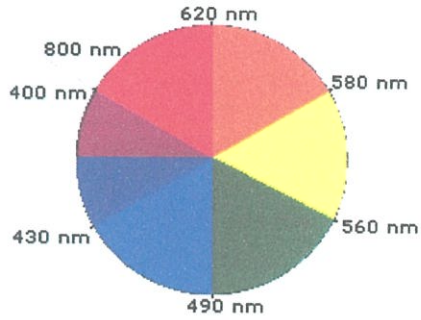
แสงขาวที่จริงแล้วยังประกอบด้วยแสงสีที่รวมกันเรียกว่า สเปกตรัม (spectrum) ประกอบด้วยเจ็ดสีได้แก่ ม่วง คราม น้ำเงิน เขียว เหลือง ส้ม แดง โดยสีม่วงจะมีพลังงานมากสุด (ความยาวคลื่นสั้น) และพลังงานจะลดลงเรื่อยๆตามลำดับ จนกระทั่งสีแดงที่มีพลังงานต่ำสุด (ความยาวคลื่นยาว) ปรากฏการณ์การเกิดสเปกตรัมของแสงขาวเช่น ถ้าเราเอาปริซึมไปวางให้แสงส่องผ่าน เมื่อแสงเดินทางผ่านตัวกลางที่มีดัชนีหักเหแตกต่างกัน ความยาวคลื่นที่ต่างกันจะหักเหด้วยมุมที่ไม่เท่ากัน เราจึงมองเห็นสีแสงขาวแยกสเปกตรัมเป็นสีต่างๆได้เมื่อนำฉากไปรับ ปรากฏการณ์ธรรมชาติอีกอย่างหนึ่งได้แก่ การเกิดรุ้ง ซึ่งเกิดจากการที่แสงเดินทางผ่านหยดไอน้ำในอากาศทำให้เกิดการหักเหของแสง เกิดเป็นสเปกตรัมของแสงขาวขึ้นนั่นเอง



รูปที่ 2.2 การหักเหของแสงเมื่อเดินทางผ่านปริซึม

2. สเปกตรัมของแสงขาว (colors of visible light)

คลื่นแสงที่ตาของมนุษย์สามารถมองเห็นได้อยู่ในช่วงประมาณ 400-800 nm ถ้านัยน์ตาถูกกระตุ้นด้วยแสงตลอดทั้งช่วงความยาวคลื่น (400-800 nm) ผลก็คือจะมองเห็นแสงนั้นเป็นแสงขาว แต่ถ้าคลื่นแสงถูกดูดกลืนแสงไปบางส่วน แสงที่ตามองเห็นจะเป็นสีผสม (complementary) หรือสีที่อยู่ตรงข้ามของสีที่ถูกดูดกลืนเมื่อเทียบตามวงล้อสี



รูปที่ 2.3 วงล้อสี (color wheel)

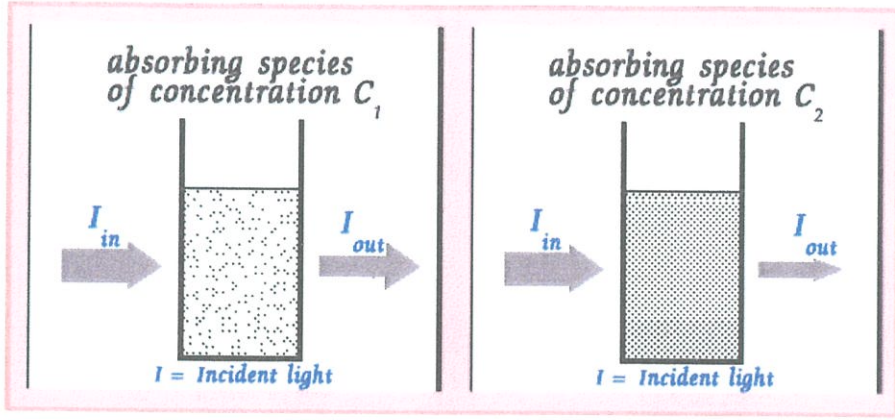
ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืนกับสีของสารที่มองเห็นมีประโยชน์สำหรับใช้ในการทำนายว่าสารประกอบที่มีสีจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วงใด ยกตัวอย่าง เช่น สารประกอบ iron(III)thiocyanateหรือ$Fe(SCN)^{2+}$ เป็นสารละลายที่มีสีแดง อาจทำนายได้ว่า $Fe(SCN)^{2+}$ ดูดกลืนแสงในช่วงแสงสีน้ำเงิน-เขียว (470-500 nm) ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณ $Fe(SCN)^{2+}$โดยวิธีทางสเปกโทรสโคปี จึงต้องเลือกใช้ความยาวคลื่นในช่วง 470-500 nm

ตารางที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืนกับสีของสารที่มองเห็น

ความยาวคลื่น (nm)	สีที่ถูกดูดกลืน	สีที่มองเห็น
380-420	ม่วง	เขียว-เหลือง
420-440	ม่วง-ฟ้า	เหลือง
440-470	น้ำเงิน	ส้ม
470-500	เขียว-น้ำเงิน	แดง
500-550	เขียว-เหลือง	ม่วง
550-580	เหลือง	ม่วง-น้ำเงิน
580-620	ส้ม	น้ำเงิน
620-780	แดง	เขียว-น้ำเงิน

3. กฎของเบียร์ (Beer's law) [4]

กฎของเบียร์ กล่าวว่า "เมื่อแสงที่มีความยาวคลื่นเดี่ยวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว สัดส่วนของความเข้มของแสงที่ถูกตัวกลางนั้นดูดกลืนไว้จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณของตัวกลางที่ดูดกลืนแสงนั้น

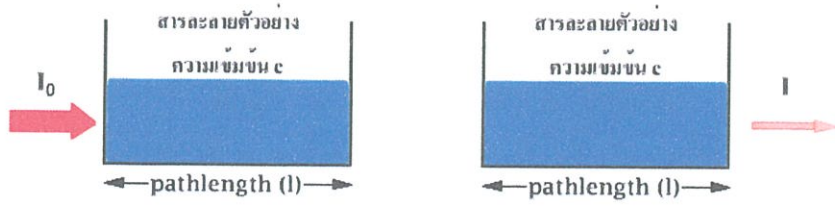


รูปที่ 2.4 ลำแสงที่ผ่านเข้าออกสารละลายความเข้มข้น C_1 และ C_2

จากรูปถ้าความเข้มข้น $C_2 > C_1$ ดังนั้นแสงที่ผ่านสารละลาย C_2 ออกมาจะเหลือน้อยกว่าแสงที่ผ่านออกมาจากสารละลาย C_1 เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงกว่าจะมีโมเลกุลที่สามารถดูดกลืนแสงขวางทางเดินแสงอยู่มากกว่า เมื่อเราวัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย ปริมาณความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนจะขึ้นอยู่กับทั้งความเข้มข้นของสารละลายและความหนาของสารละลายที่ลำแสงต้องผ่าน จึงจำเป็นต้องรวมกฎของเบียร์และกฎของแลมเบิร์ต เรียกเป็น **กฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert law)**

4. กฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert law)

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเราสามารถทำได้โดยให้ลำแสงผ่านเข้าไปในตัวอย่าง (Incident light: I_0) แล้ววัดปริมาณแสงที่เหลือผ่านออกมา (I) โดยเทียบกับแสงที่ผ่านออกมาเมื่อไม่มีสารตัวอย่าง



รูปที่ 2.5 ลำแสงที่ผ่านเข้าออกสารละลายความเข้มข้น c เป็นระยะทาง l

Transmittance (T) เป็นสัดส่วนปริมาณแสงที่ผ่านออกมา (I) ต่อปริมาณแสงที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่าง (I_0) เขียนสมการได้ว่า

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Absorbance (A) นิยามสมการได้เป็น

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T$$

โดยทั่วไปจะรายงานค่า transmittance เป็นเปอร์เซ็นต์ (%T) ดังนั้น

$$\%T = 100 \frac{I}{I_0}$$

$$\log \%T = \log 100 \frac{I}{I_0}$$

$$\log \%T = 2 + \log \frac{I}{I_0}$$

$$\log \%T = 2 - A \text{ หรือ}$$

$$A = 2 - \log \%T$$

5. ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น(absorbance and concentration)

ค่าการดูดกลืนแสงของสารมีความสำคัญอย่างยิ่งในเชิงปริมาณวิเคราะห์เนื่องจากค่าการดูดกลืนจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นตามกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert law) ดังสมการ

$$A = \varepsilon cl$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสาร (absorbance)

ε = เป็นสมบัติจำเพาะของสารที่ดูดกลืนและวัดที่ความยาวค่าหนึ่งเรียกว่า molar absorptivity ($L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)

l = ระยะทางที่แสงผ่านตัวอย่าง หรือความกว้างของเซลล์นั่นเอง (cm)

c = ความเข้มข้นเป็น โมล/ลิตร หรือโมลาร์ (M)

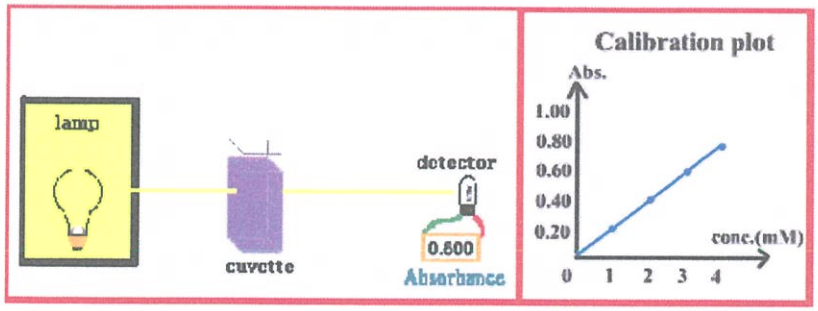
ถ้าความเข้มข้นของสารอยู่ในหน่วยอื่นจะเขียนสมการเป็น

$$A = acl$$

โดยที่ a = absorptivity ซึ่งเป็นค่าคงที่ขึ้นกับชนิดของสารและความยาวคลื่น

6. กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve)

เราทราบแล้วว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารมีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นของสารหรือปริมาณของเนื้อสารนั้นตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต ดังนั้นถ้าเรานำความสัมพันธ์นี้มาสร้างกราฟและได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เราจะเรียกกราฟนี้ว่า กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve) กราฟความเข้มข้นมาตรฐานนี้มีประโยชน์มากในเชิงปริมาณวิเคราะห์ เพราะสามารถใช้เทียบเพื่อหาความเข้มข้นของสารที่ไม่ทราบค่าได้ โดยที่สารที่ไม่ทราบค่าความเข้มข้นนั้นจะต้องอยู่ในช่วงความเข้มข้นมาตรฐานที่ทราบค่าแล้ว และเส้นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานจะต้องเป็นเส้นตรงเสมอ วิธีการสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน คือ นำสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอนอย่างน้อย 3-4 ความเข้มข้น มาวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นก็นำความสัมพันธ์ที่ได้ไปสร้างกราฟ ส่วนความเข้มข้นที่ไม่ทราบค่าก็นำไปวัดค่าการดูดกลืนเช่นเดียวกัน แล้วนำค่าการดูดกลืนนั้นไปเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐานหรือคำนวณจากสมการเชิงเส้นของกราฟความเข้มข้นมาตรฐานเพื่อย้อนกลับมาเป็นความเข้มข้น เราก็จะทราบค่าความเข้มข้นของสารนั้นได้ ดังนั้น ค่า T มีค่าอยู่ในช่วง 0-1และ %T มีค่าตั้งแต่ 0-100 ส่วน A=0 เมื่อแสงที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างไม่ถูกดูดกลืนไว้ และผ่านออกมา 100%, A=1 เมื่อแสงผ่านออกมาเพียง 10% และ A=2 ถ้าแสงผ่านออกมาน้อยมากเพียง 1%



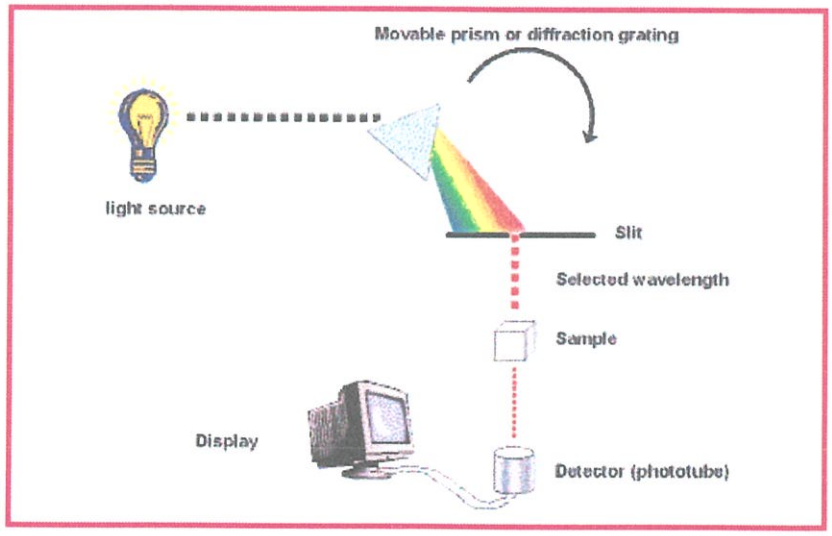
รูปที่ 2.6 แสดงการสร้างกราฟมาตรฐาน

7. รูปแบบของเครื่อง UV-Visble Spectrometer [5]

7.1 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยว (single beam spectrophotometer)

หลักการของสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยวนั้น เมื่อแสงออกจากแหล่งกำเนิดแสงแล้ว จะผ่านโมโนโครเมเตอร์ที่เป็นเกรตติ้ง และสารตัวอย่างตามลำดับ แล้วจึงเข้าสู่ตัวตรวจจับสัญญาณตลอดเส้นทางของลำแสงนี้มีลำแสงเดียว จึงเรียก สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ประเภทนี้ว่าแบบ

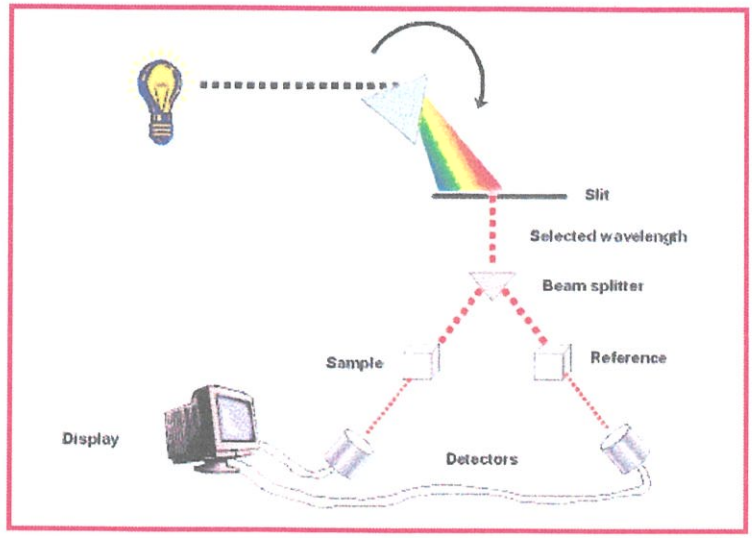
ลำแสงเดี่ยว เนื่องจาก สเปกโทรโฟโต มิเตอร์ประเภทนี้ใช้ลำแสงเพียงลำเดียวผ่านจากโมโนโครเมเตอร์ไปสู่สารละลายที่ต้องการวัดและเข้าสู่ตัวตรวจจับสัญญาณเลย ดังนั้นการวัดจึงต้องวัด 2 ครั้งดังนี้ ครั้งแรกเซลล์บรรจุแบลงค์ (blank) ซึ่งเป็นตัวทำละลายของตัวอย่างที่เราต้องการวัด เมื่อลำแสงผ่านเซลล์ ปรับเครื่องให้อยู่ในตำแหน่ง "ศูนย์" (set zero) ส่วนครั้งหลังบรรจุสารละลายที่ต้องการวัด (sample) แล้วจึงให้ลำแสงผ่านเซลล์ ความแตกต่างระหว่างการดูดกลืนแสงของทั้ง 2 ครั้งจะปรากฏบนหน้าปัดมิเตอร์ จากนั้นก็สามารถวัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นอื่นๆ ต่อไปได้เลย โดยไม่ต้องกลับไปวัดแบลงค์อีก การเปลี่ยนความยาวคลื่นจะต้องวัดแบลงค์ใหม่ทุกครั้ง



รูปที่2.7 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยว

7.2 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่(double beam spectrophotometer)

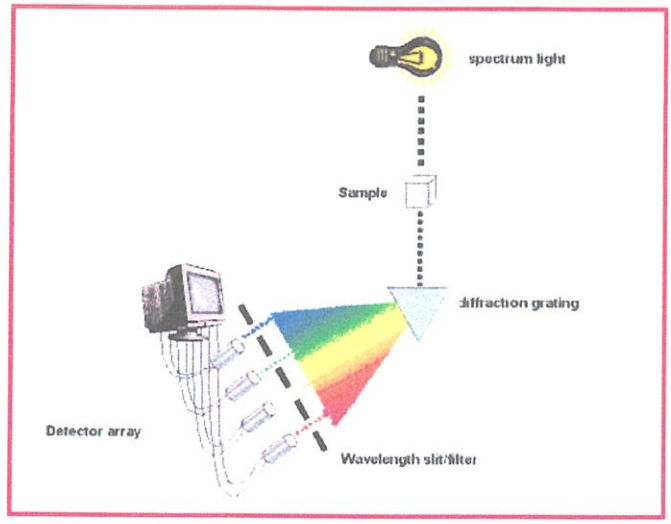
สำหรับสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่ เมื่อลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสงออกจากช่องแสงออก (exit slit) แล้ว ลำแสงจะไปสู่อุปกรณ์ตัดลำแสง (beam chopper) ซึ่งจะทำหน้าที่สะท้อนลำแสงไปผ่านสารตัวอย่าง (sample)ในขณะต่อมาจะสะท้อนลำแสงไปผ่านสารอ้างอิง (reference) ซึ่งก็คือแบลงค์นั่นเอง โดยที่ลำแสงทั้งสองจะมีความเข้มแสงเท่ากันก่อนที่จะผ่านสารตัวอย่างหรือสารอ้างอิง เมื่อลำแสงทั้งสองนี้ไปตกกระทบบนตัวตรวจจับสัญญาณ ความแตกต่างของความเข้มแสงหลังจากผ่านสารตัวอย่างหรือสารอ้างอิงจะกลายเป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง



รูปที่ 2.8 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่

7.3 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญาณ (spectrophotometer แบบ diode array detector)

diode array detector เป็นการตรวจจับสัญญาณ โดยวัดการดูดกลืนของแสง เช่นเดียวกับสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ทั่วไป เพียงแต่การเก็บข้อมูลมิใช่การเก็บเพียง 1 หรือ 2 ความยาวคลื่นเท่านั้น แต่สามารถเก็บข้อมูลได้เป็นช่วงของความยาวคลื่น ที่ผู้วิเคราะห์สามารถเลือกได้ โดยใช้เวลาเพียงนิดเดียว เนื่องจากสามารถวัดทุก ความยาวคลื่นได้ในเวลาเดียวกัน เหมาะสำหรับการเก็บข้อมูลที่เป็นสเปกตรัม หรือต้องการติดตามการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนของสารที่หลายความยาวคลื่น

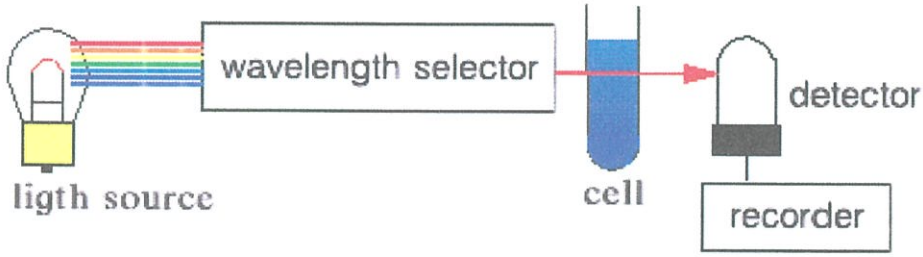


รูปที่2.9 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญาณ

7.4 ส่วนประกอบหลักของเครื่อง UV-Visble Spectrometer [6]

มี5 ส่วนด้วยกันดังนี้คือ

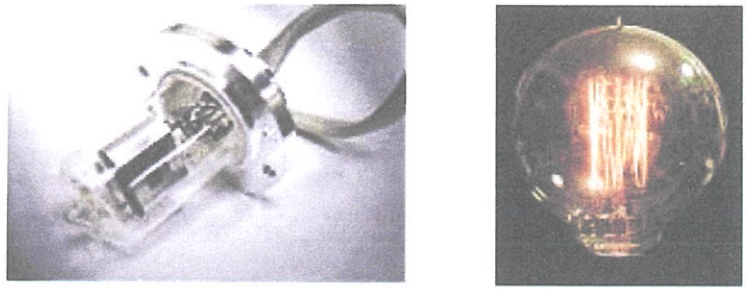
1. แหล่งกำเนิดแสง (light source)
2. ส่วนเลือกความยาวคลื่น (wavelength selector)
3. ภาชนะใส่สาร (cell หรือ cuvette)
4. ตัวตรวจจับสัญญาณ (detector)
5. ส่วนบันทึกและแปรผลสัญญาณ (recorder and processor)



รูปที่ 2.10 แผนภาพเครื่องUV-Visble Spectrometer อย่างง่าย

7.4.1 แหล่งกำเนิดแสง (light source)

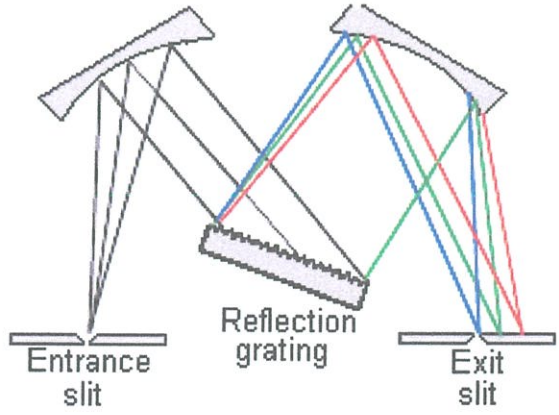
แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลา รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอด้วยสำหรับความยาวคลื่นในช่วงอัลตราไวโอเลตจะใช้หลอดดิวเทอเรียม (deuterium lamp) เป็นแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งให้แสงในช่วง 185-375 nm หลักการคือทำให้อะตอมดิวเทอเรียมที่อยู่ในสภาวะเร้าคายพลังงานออกมา ส่วนหลอดทังสเตน (tungsten filament lamp) จะให้ความยาวคลื่นครอบคลุมช่วงแสงที่มองเห็นได้ คือตั้งแต่ 320-2500 nm หลักการจะคล้ายกับหลอดไฟทังสเตนธรรมดาคือ ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไปจนกระทั่งลวดทังสเตนร้อนและเปล่งรังสีออกมา โดยปกติจะเปิดเครื่องทิ้งไว้ก่อนใช้งานประมาณ 30 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าหลอดดิวเทอเรียมหรือหลอดทังสเตนให้แสงที่มีความเข้มสม่ำเสมอ



รูปที่2.11 หลอดดิวเทอเรียม (ซ้าย) และหลอดทังสเตน (ขวา)

7.4.2 ส่วนเลือกความยาวคลื่น (wavelength selector)

เป็นส่วนที่ใช้แยกความยาวคลื่นที่ออกมาจากแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งเป็นแสงที่มีหลายๆ ความยาวคลื่น (polychromatic wavelength) ให้เป็นแถบแสงในช่วงแคบๆ หรือ เป็นความยาวคลื่นเดี่ยว (monochromatic wavelength) เครื่องมือสมัยก่อนจะใช้ปริซึมหรือ ฟิลเตอร์สำหรับแยกความยาวคลื่น แต่ปัจจุบันเปลี่ยนมาใช้โมโนโครเมเตอร์ (monochromater) แบบเกรตติ้ง (grating) สะท้อนแสงซึ่งมีลักษณะเป็นร่องเล็กๆ ขนานกันจำนวนมาก แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะตกกระทบลงบนผิวหน้าของร่อง แล้วสะท้อนออกมาที่มุมต่างๆ เฉพาะความยาวคลื่นที่เราเลือกเท่านั้นจึงจะผ่าน ช่องแสงออก (exit slit) ไปสู่สารตัวอย่าง

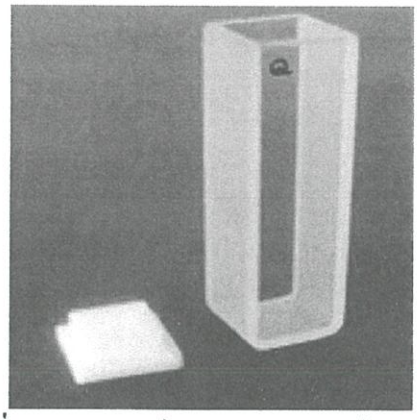


รูปที่2.12 เกรตติ้งใช้แยกความยาวคลื่น

7.4.3 ภาชนะใส่สารตัวอย่าง (cell หรือ cuvette)

ภาชนะใส่สารตัวอย่างสำหรับสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะเรียกว่า เซลล์หรือคิวเวทท์ (cuvette) มีหลายแบบหลายขนาดด้วยกันขึ้นกับการใช้งาน หลักสำคัญในการเลือกใช้ก็คือ การวัด

ในช่วงแสงอัลตราไวโอเลต จะต้องใช้เซลล์ที่ทำจากควอตซ์ (quartz) เท่านั้น เนื่องจากแก้วสามารถดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตได้ ส่วนเซลล์ที่ทำจากแก้วจะใช้วัดในช่วงแสงที่มองเห็นได้ นั่นหมายความว่าถ้าเราต้องการวัดสารในช่วงแสงที่มองเห็นได้ก็ควรจะใช้เซลล์ที่ทำจากแก้ว การใช้เซลล์ควอตซ์ไม่ได้มีผลให้การวัดแสงดีขึ้น แต่จะสิ้นเปลืองเปล่า ประโยชน์เพราะควอตซ์ราคาแพงกว่าแก้วมาก



รูปที่ 2.13 คิวเวทท์ (cuvette) ควอตซ์ (quartz)

นอกจากนี้การวิเคราะห์โดยใช้ spectrophotometric detection ถ้างานวิเคราะห์นั้นมี ความไว (sensitivity) ต่ำ เราสามารถเพิ่มความไวให้สูงขึ้นได้ง่ายๆ โดยใช้เซลล์ที่มีความกว้างมากขึ้น เพราะจากกฎของเบียร์-แลมเบิร์ตค่าการดูดกลืนแสงของสารยังขึ้นกับความหนาของตัวกลางที่แสงเดินทางผ่าน (l)ดังสมการ $A = \varepsilon cl$ ซึ่งเซลล์ที่ใช้ในงานทั่วไปมีความกว้างตั้งแต่ 1-10 cmหรือถ้าสารมีราคาแพงและปริมาณน้อย ก็มีเซลล์ขนาดเล็กที่ปริมาตรต่ำกว่า 1 mL

ส่วนการทำความสะอาดเซลล์เพียงแค่กลั้วด้วยน้ำกลั่นหรือกลั้วด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมตามด้วยน้ำกลั่นก็เพียงพอ ห้ามขัดถูเพราะจะทำให้เซลล์มีรอยขีดข่วน

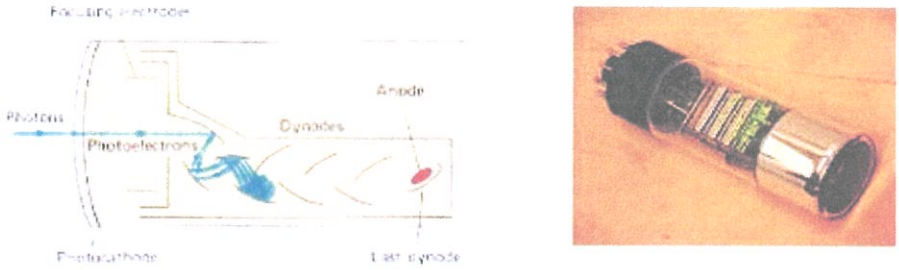
7.4.4 ตัวตรวจจับสัญญาณ (detector)

เครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง คือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย ก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ ปัจจุบันเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ส่วนใหญ่ นิยมใช้ตัวตรวจจับสัญญาณ 2 ชนิดคือ

1. หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube; PMT)

หลอด PMT ประกอบไปด้วยแคโทด (cathode) ที่ฉาบผิวด้วยสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้เมื่อถูกแสงจำนวน 9 ชุด เรียกว่า ไดโนด (dynode) แต่ละไดโนดจะมีศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อ

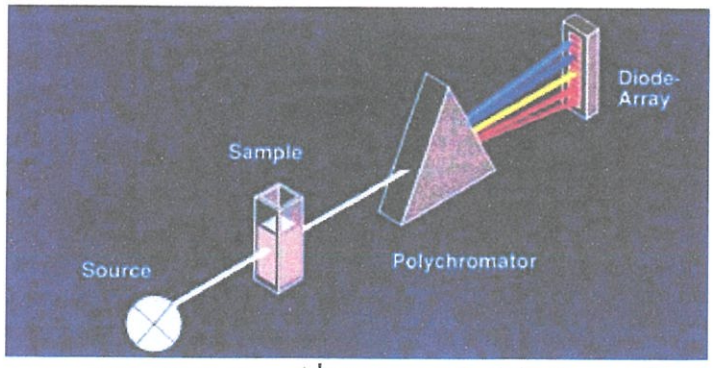
แสงตกกระทบกับไดโนดตัวที่หนึ่งสารที่ฉาบผิวจะเกิดอิเล็กตรอนขึ้น แล้ววิ่งไปกระทบไดโนดที่สอง สาม สี่ จนครบทั้งเก้าตัว ดังนั้นปริมาณอิเล็กตรอนจะเพิ่มขึ้นถึง 10^6-10^7 เท่า แล้วจึงชนแอโนดให้กระแสไฟฟ้าออกมาเข้าเครื่องขยายสัญญาณต่อไป



รูปที่ 2.14 (ซ้าย) ภาพตัดขวางของหลอด PMT (ขวา) ลักษณะหลอด PMT ในสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

2. โฟโตไดโอดอาร์เรย์ (photodiode arrays; PDA)

ตัวตรวจจับสัญญาณชนิดนี้สามารถจับสัญญาณได้ครอบคลุมทั้งสเปกตรัมโดยใช้ไดโอดนีมาเรียงต่อกันเป็นแถว ซึ่งสามารถวัดครอบคลุมสเปกตรัมได้ตั้งแต่ 200-1100 nm ตัวตรวจจับสัญญาณนี้ประกอบไปด้วยโฟโตไดโอดและตัวเก็บประจุ (capacitor) ประมาณ 200- 4000 ตัวเรียงต่อกันเป็นแถว หลักการเริ่มต้นด้วยการให้ประจุผ่านผิวหน้าไดโอด ซึ่งไดโอดก็จะเก็บประจุไว้ที่ตัวเก็บประจุ เมื่อแสงตกลงบนไดโอดจะทำให้เกิดประจุไฟฟ้าไปทำลายประจุที่เก็บไว้ที่ตัวเก็บประจุ ทำให้ต้องใส่ประจุเพิ่มเข้าไปใหม่ซึ่งเป็นช่วงของการสแกนแต่ละครั้งนั่นเอง ปริมาณของประจุที่ต้องใส่เข้าไปใหม่ จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มแสงที่วัดได้ของแต่ละไดโอด ดังนั้นจากการวัดปริมาณแสงที่แตกต่างกันตลอดช่วงความยาวคลื่นจะได้เป็นสเปกตรัมการดูดกลืนของสารนั้นออกมา



รูปที่ 2.15 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญาณ

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วราภรณ์ โพธิ์อ่อน และ สุวรรณทิพย์ จางวางศิลป์ [7] ได้พัฒนาวิธีการอย่างง่ายสำหรับการหาปริมาณกาบาด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตรเมตรี โดยการทำอนุพันธ์กับ 2-hydroxynaphthaldehyde ที่เตรียมในสารละลายบอแรกซ์ บัฟเฟอร์ (pH 8) โดยไม่ใช้ความร้อนในการทำปฏิกิริยา วัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสง พบว่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) อยู่ที่ 240 นาโนเมตร พบช่วงความเป็นเส้นตรงที่ดีมาก ($R^2 = 0.996$) เมื่อประยุกต์ใช้วิธีนี้ในตัวอย่างนมที่มีการเติมกาบา พบว่าได้ค่าความแม่นที่ไม่ดี ซึ่งอาจมีสาเหตุจากผลของตัวรบกวนเนื่องจากในนมมีกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ เป็นองค์ประกอบปนอยู่ด้วย

M.Y. Khuhawar [8] ทำการวิเคราะห์ปริมาณ Grammaaminobutyric acid (GABA) ในน้ำหล่อสมองและไขสันหลัง (cerebrospinal fluid) โดยใช้ 2-hydroxynaphthaldehyde เป็น derivatizing reagent โดยเทคนิค pre-column derivatization โดยการเติม 2-hydroxynaphthaldehyde และ elution ในคอลัมน์ Phenomenex C_{18} ขนาด 5 ไมโครเมตร ด้วยสารละลาย Methanol: น้ำ (62:38 v/v) และทำการตรวจวัดรังสีUVที่ 330 นาโนเมตร ในน้ำหล่อสมองและไขสันหลังประกอบไปด้วย glycine, l-lysine, tyramineและ GABA จำนวนของ Amines และ amino acids ไม่มีผลกระทบต่อการตอบสนองในการวัด GABA กราฟมาตรฐานเส้นตรงของGABAอยู่ในช่วง 1.2-28.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดอยู่ที่ 2.8 นาโนกรัม/การฉีดหนึ่งครั้ง (ปริมาตรเข็มอยู่ที่ 5 ไมโครลิตร) ในวิธีการนี้การตรวจวัดGABAในน้ำหล่อสมองและไขสันหลังให้ผลอยู่ที่ 19.0-22.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน 2.4%

สยาม ชนะมาตย์ [9] ได้ศึกษาวิธีการพัฒนาการวิเคราะห์หาปริมาณกาบาที่ง่าย รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยการสร้างสารอนุพันธ์และวัดด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี ทำการทดลองโดยทำการสกัดกาบาด้วยด้วยสารละลาย 50% เมทานอล จากนั้นทำปฏิกิริยากับ Naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde (NDA), 2-Hydroxynaphthadehyde (HN) และ Ninhydrin ด้วย buffer pH 9 ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดปริมาณกาบาที่ความยาวคลื่น 451.5 nm ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกาบาในข้าวพบว่าในข้าวกล้องมีกาบาอยู่ 20.00-22.31 mg/100mg ซึ่งมีปริมาณมากกว่าข้าวขัดสีที่มีกาบาอยู่ 17.31mg/100mg

วีรวัฒน์ รอดคุ้ม [10] เป็นการหาปริมาณกาบาโดยการทำให้เกิดอนุพันธ์กับ Fluorenylmethloxycarbonyl chloride (Fmoc chloride) ก่อนฉีดเข้าเครื่อง Capillary Electrophoresis background electrolyte ที่เหมาะสมประกอบด้วย 20 mM boric acid และ 20 mM sodium tetra borate ที่ pH 9.40, applied potential มีค่า +30 kV และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 265 nm ค่าต่ำสุด

ของการตรวจวัดของอนุพันธ์กาบา เท่ากับ 0.165 µg/ml, %RSD ของ migration time และ peak area เท่ากับ 0.448 และ 0.854 ตามลำดับ ค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงระหว่าง 0.25-50 µg/ml (R^2=0.9993) เทคนิค Capillary Electrophoresis ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณ GABAในตัวอย่างข้าวกล้องงอกของข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวหอมนิล และ ข้าวก่ำ การเตรียมตัวอย่างข้าวต้องมีการกำจัดไขมันและโปรตีนก่อนที่จะทำให้เกิดอนุพันธ์ด้วย Fmoc chloride อย่างไรก็ตามก่อนชีดเข้าเครื่อง Capillary Electrophoresis ต้องมีการกำจัด metrix ที่เหลือจากตัวอย่างโดยการผ่านเข้า C18 cartridge พบว่าข้าวทั้งสามสายพันธุ์คือ ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวหอมนิล และ ข้าวก่ำ มี GABA เท่ากับ 7.57, 10.97 และ 10.07 mg/100Gตามลำดับ

Gerard Clarke, Siobhain O'Mahony, Gwen Malone และ Timothy G. Dinan [11] ได้ศึกษาการใช้วิธีการHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC) แบบวิธี electrochemical หรือ fluorescent ในการตรวจวัดหาปริมาณกาบา และ กลูตาเมท ที่ทำปฏิกิริยากับสารอนุพันธ์ Naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde (NDA) ที่ปรากฏในไซยาไนด์ไอออน อีลูชั่นขึ้นอยู่กับ isocratic protocol และใช้เวลาเพียง 20 นาทีหรือน้อยกว่านั้นวิธีการทำซ้ำแสดงให้เห็นถึงความเป็นเส้นตรงที่ดีและการสร้างอนุพันธ์ที่มีความเสถียรนาน 16 ชั่วโมง การประยุกต์ใช้ที่ประสบความสำเร็จของวิธีการที่จะระบุการหาปริมาณกาบาและกลูตาเมตในhippocampus และก้านสมอง

Takeshi Iimure และชาวคณะ [12] ได้พัฒนาวิธีการอย่างง่ายในการผลิตGABAจาก Sodium glutamate ที่ใช้น้ำมันรำข้าวโดยไม่ต้องใช้บัฟเฟอร์หรือโคเอมไซม์ใดๆ สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตปฏิกิริยา GABA ใช้ที่รำข้าวบาร์เลย์ทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 20°C และปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันรำข้าวบาร์เลย์เริ่มต้น: 150 mg / ml, ความเข้มข้นเริ่มต้นของโซเดียมกลูตาเมต: 10 มิลลิโมลปฏิกิริยาใช้เวลา: 6ชั่วโมง ได้ปริมาณGABA 11.0 มิลลิโมลจาก 10.0 มิลลิโมลของโซเดียมกลูตาเมตแต่ในข้าวสาลีและรำข้าวมีGABAเพียง 3.9 และ 0.8 มิลลิโมลตามลำดับ

Panatda jannoey และคณะ [13] ได้ศึกษาหาปริมาณGABA จากใบอ่อน ของเสีย จากกระบวนการสีข้าว และ เมล็ดข้าวงอก ถูกเก็บรวบรวมเพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของ GABA โดย LC -MS หลังจากการสร้างอนุพันธ์กับ 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) ความเข้มข้นของ GABA ในเมล็ดข้าว และใบ เพิ่มขึ้นอย่างมากกับต่างจากวันที่งอก แต่ในใบข้าวมีปริมาณ GABA มากกว่าในเมล็ดข้าว 2-3 เท่า ใน พันธุ์ข้าวทั้งหมด ความเข้มข้นสูงสุดของ GABA ในเมล็ดข้าวและใบอ่อนจะถูกพบในช่วง 20 และ 30 วันหลังจากการงอกตามลำดับ หลังจาก 20 วันของการงอกความเข้มข้นของ GABA ใน เมล็ดข้าวมีปริมาณลดลง ความเข้มข้นของ GABA ในที่พบเมล็ดข้าวหลังการงอกจะพบ 0.19-1.25 mg/g ในข้าว พิษนุโลก 2 (PL2) 0.30-2.01 mg/g ในข้าว ชัยนาท 1 (CN1) 0.51-2.45

mg/g ใน ข้าวดอกมะลิ 105 0.34-1.74 mg/g ในข้าว สุพรรณ 1 (SP1) และ 0.39-1.59 mg/g ในข้าวปทุม1 (PT1) ในทางตรงกันข้ามในระหว่างการงอก ใบข้าวกลับมีปริมาณความเข้มข้นของ GABA เพิ่มขึ้น จนงอกถึง 30 วัน ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของ GABAอยู่ที่ 1.45-3.14 mg/g, 1.36-2.85 mg/g, 2.39-2.52 mg/g, 0.82-2.09 mg/g และ 1.33-1.50 mg/g ใน ข้าว PL2 , CN1 , ข้าวดอกมะลิ 105 , SP1 และ PT1 เพิ่มขึ้นตามลำดับ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

1. แกมมา แอมิโนบิวทิริก (Gamma-Amino Butyric Acid, GABA)-Sigma,USA
2. 2-ไฮดรอกซี-แนฟทาลแอลดีไฮด์ (2-hydroxy -1-naphtaldehyde reagent)-Aldrich,USA
3. บอริก (Boric Acid)-CabloErba,Italy
4. โพแตสซียมคลอไรด์ (Postassiumchloride)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodiumhydroxide)-Sdfcl,India
6. เมทานอล(Methanol)-CabloErba,Italy
7. อะซิโตไนไทท์ (Acetonitrile)-Fisons,England
8. น้ำกลั่น

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องตรวจวัด

1. ขวดวัดปริมาตร	ขนาด	10	มิลลิลิตร
	ขนาด	25	มิลลิลิตร
2. ไมโครปิเปต	ขนาด	1000	ไมโครลิตร

ขนาด 200 ไมโครลิตร

3. ไมโครปิเปตทิป
4. บีกเกอร์ ขนาด 10 มิลลิลิตร

ขนาด 25 มิลลิลิตร

ขนาด 100 มิลลิลิตร

5. ขวดทดลองแบบมีฝาปิด(Vial)
6. แท่งแก้วคนสาร
7. ช้อนตักสาร
8. กระจกนาฬิกา
9. หลอดหยด
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง Vetex- Genie2,USA
11. เครื่องชั่งสาร- Suimadzu Aux 220,Japan
12. เครื่องวัด pH-Metrohm 827 pH Lab Meter,USA
13. เครื่อง UV-Visible spectrophotometer

3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 การเตรียมสารละลาย 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (3% w/v Acetronitrile)

1. ชั่ง 2-hydroxy-1-naphthaldehyde มา 0.75 กรัม
2. นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิโตไนไทท์ และปรับปริมาตรจนได้ 25 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.2.2 การเตรียมสารละลาย 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (4.5 % w/v Acetronitrile)

1. ชั่ง 2-hydroxy-1-naphthaldehyde มา 1.125 กรัม
2. นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิโตไนไทท์ และปรับปริมาตรจนได้ 25 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.2.3 การเตรียมสารละลาย 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (6% w/v Acetronitrile)

1. ชั่ง2-hydroxy-1-naphthaldehyde มา 1.5 กรัม
2. นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิโตไนไทท์ และปรับปริมาตรจนได้25 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.2.4 การเตรียมสารละลาย 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (7.5% w/v Acetronitrile)

1. ชั่ง2-hydroxy-1-naphthaldehyde มา 1.875 กรัม
2. นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิโตไนไทท์ และปรับปริมาตรจนได้25 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.2.5 การเตรียมสารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

1. นำ Sodium hydroxide มา0.04กรัม
2. จากนั้นนำ Sodium hydroxide มาละลายด้วยน้ำกลั่น
3. นำสารละลายที่ได้ มาปรับปริมาตรจนได้ 10 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

3.2.6 การเตรียมสารละลาย Borate buffer pH 8

1. ชั่ง Boric Acid ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จำนวน 0.6180 กรัม จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่น
2. ชั่ง KCl ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จำนวน 0.7455 กรัม จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่น
3. นำ Boric Acid และ KCl ที่เตรียมไว้มาผสมกันแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ด้วย NaoH เป็นให้ได้ pH8
4. วัดค่า pH ด้วย pH-meter ซึ่งผ่านการ Calibrate ด้วยสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ pH4 และ pH7 แล้ว
5. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 1 ถึงข้อ 4 เปลี่ยน pH 8 เป็น pH 9 และpH 10 ตามลำดับ

3.2.7 การเตรียมสารละลาย 70% v/v Ethanol

1. ปิเปตเอทานอลมา14 มิลลิลิตร เทใส่บีกเกอร์
2. ปิเปตน้ำกลั่นมา 6 มิลลิลิตร เทผสมกับที่เตรียมไว้คนให้เข้ากัน ปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์

3.2.8 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน GABA ความเข้มข้น 1000 ppm

1. ชั่งสารมาตรฐาน GABA ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จำนวน 0.025 กรัม
2. ละลายด้วยน้ำกลั่นใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน GABA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตาราง 3.1 ตารางแสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน GABA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ปริมาตร Stock Solution (ml)	ความเข้มข้น Standard Soluion (ppm)	ปริมาตรสุดท้าย Standard Soluion (ml)	สารละลายที่ใช้ปรับปริมาตร
0.1	10	10	ACN
0.5	50	10	
1.0	100	10	
1.5	150	10	
2.0	200	10	
3.0	300	10	
5.0	500	10	

3.2.9 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องงอก

1. นำข้าวกล้องงอกมาบดให้เป็นผง
2. ชั่งผงข้าวกล้องงอกมา 2 กรัม โดยละเอียดนำมาใส่ Cetrifuge tube เติม 70% v/v เอทานอล 3200 ไมโครลิตร

3. เขย่าให้สารผสมกัน 1 นาที
4. นำเข้าเครื่อง Cetrifuge ที่ความเร็วรอบ 6500 รอบเป็นเวลา 20 นาที
5. เก็บส่วนสารละลายใสชั้นบน ใส่บีกเกอร์ปิดด้วยพาราฟิล์ม
6. ตะกอนที่เหลือนำมาเติมด้วย 70% v/v เอทานอล 800 ไมโครลิตร เพื่อทำการสกัดซ้ำ
7. เก็บส่วนที่ใสให้ครบ 3 มิลลิลิตร
8. นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วย Nylon 0.22 μm
9. นำไปทำ derivatization ต่อไป

3.2.10 การเตรียมตัวอย่าง GABA แบบเม็ด

1. นำอาหารเสริมที่มี GABA มาบดให้ได้ประมาณ 0.30 กรัม
2. นำมาละลายด้วยน้ำให้ได้ 25 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วย Nylon 0.22 μm
4. นำไปทำ derivatization ต่อไป

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 ศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณ GABA ในเครื่อง UV-Visible spectrometer

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน GABA 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 10,50,100,150,200,300,500 ppm ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Borate buffer pH8 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายรีเอเจนต์ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (3% w/v Acetronitrile) จำนวน 2 มิลลิลิตร
4. ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไทท์ จนได้ 10 มิลลิลิตร
5. วางทิ้งไว้ 20 ชั่วโมงในที่มืด
6. นำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV- Visible spectrometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร

หมายเหตุ

1. ผสมข้อที่ 1 และข้อที่ 2 วางทิ้งไว้ 3 นาที
2. พอครบ 3นาที ต้องเติมข้อที่ 3 และข้อที่ 4 ภายใน 30 วินาที

3.3.2 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน GABA 1 มิลลิลิตรความเข้มข้น 5,30,50 ppm ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Borate buffer pH8 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายรีเอเจนต์ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (3% w/v Acetronitrile) จำนวน 2 มิลลิลิตร
4. ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไทท์ จนได้ 10 มิลลิลิตร
5. วัดทุก 5 นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่วโมงที่ 2 วัดทุกๆ 15 นาทีหลังจากนั้นวัดทุกๆครึ่งชั่วโมงจนครบ 5 ชั่วโมง แล้ววางทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 424 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV- Visible spectrometer
7. ทำการทดลองซ้ำตั่งแต่ข้อ 1 ถึงข้อ 6 แต่เปลี่ยนสารละลายรีเอเจนต์ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde เป็น 6% w/v Acetronitrile

3.3.3 ศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน GABA 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 10,20,30,40 ppm ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Borate buffer pH8จำนวน 0.6 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายรีเอเจนต์ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (6% w/v Acetronitrile) จำนวน 2 มิลลิลิตร
4. ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไทท์ จนครบ 10 มิลลิลิตร
5. วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
6. นำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV- Visible spectrometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร
7. ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 1 ถึงข้อ 6 เปลี่ยน pH8 เป็น pH9,pH10 ตามลำดับ

3.3.4 ศึกษาอัตราส่วนของ ACN:H_2O ในการปรับปริมาตรผลิตภัณฑ์ระหว่าง GABA กับ Reagent

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน GABA 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 10,20,30,40 ppm ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายBorate buffer pH8จำนวน 0.6 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายรีเอเจนต์ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (6% w/v Acetronitrile) จำนวน2 มิลลิลิตร
4. ปรับปริมาตรด้วย ACN:H_2O ด้วยอัตราส่วน 30:70,40:60,50:50,60:40,70:30,80:20 ตามลำดับจนครบ10 มิลลิลิตร
5. วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในที่มืด
6. นำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV- Visible spectrometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร
7. ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 1 ถึงข้อ 5 เปลี่ยนอัตราส่วนของ ACN:H_2O เป็น 40:60,50:50,60:40,70:30 และ 80:20 ตามลำดับ

3.3.5 ศึกษาอิทธิพลของการให้อุณหภูมิ

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน GABA 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 10,20,30,40 ppm ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Borate buffer pH8 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายรีเอเจนต์ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (6% w/v Acetronitrile) จำนวน 2 มิลลิลิตร
4. ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไทท์ จนครบ 10 มิลลิลิตร
5. นำขวดวัดปริมาตรไปชั่งน้ำหนัก ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จดบันทึก
6. เปิดฝาขวดวัดปริมาตรแล้วนำไปให้อุณหภูมิที่ 50°C เป็นเวลา 10 นาที ที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ
7. นำกลับไปชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับที่จดบันทึกด้วยอะซิโตไนไทท์
8. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

9. นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV- Visible spectrometer
10. ทำการทดลองซ้ำ ตั้งแต่ข้อ 1 ถึงข้อ 9 เพิ่มอุณหภูมิเป็น 60,70,80 °C ตามลำดับ

3.3.6 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้น Reagent ในการทำปฏิกิริยากับ GABA

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน GABA 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 10,20,30,40 ppm ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Borate buffer pH8 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายรีเอเจนต์ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (3% w/v Acetronitrile) จำนวน 2 มิลลิลิตร
4. ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไทท์ จนครบ10 มิลลิลิตร
5. วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
6. นำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV- Visible spectrometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร
7. ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 1 ถึงข้อ 5 เปลี่ยนสารละลายรีเอเจนต์ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde เป็น 4.5%,6%,7.5% w/v Acetronitrile ตามลำดับ

3.3.7 การหาปริมาณ GABA ในตัวอย่าง

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงการเตรียมสารละลายสำหรับการทำ Recovery

ชนิดของสารละลาย	สารละลายตัวอย่าง (ml)	สารละลายมาตรฐาน GABA 100 ppm	70%เอทานอล (ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ml)
Spiked sample	1	1	-	10
Sample	1	-	1	10
Standard	-	1	1	10

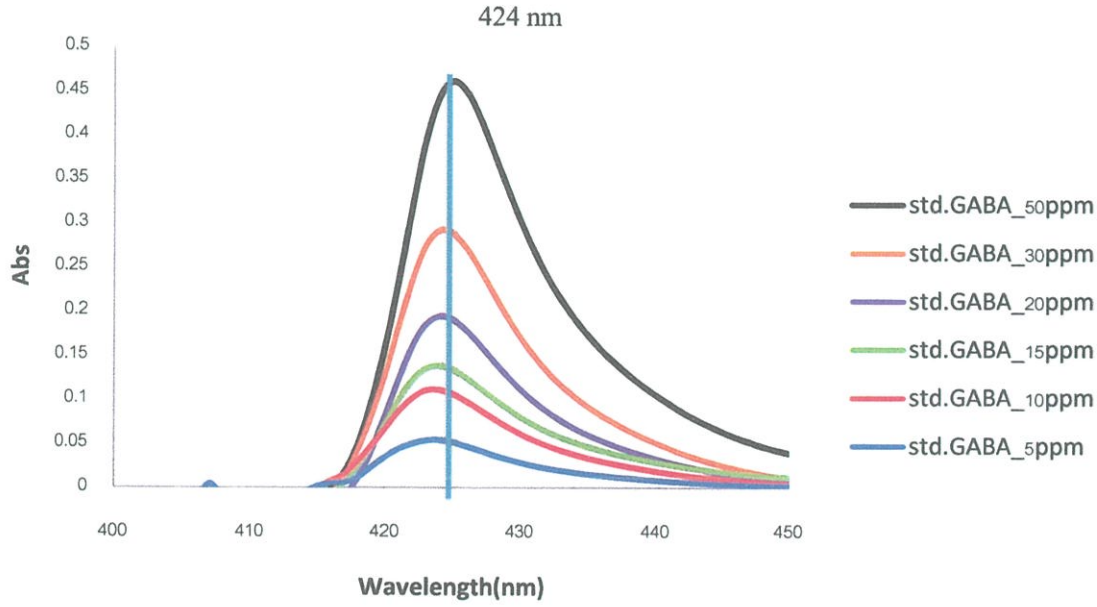
1. ปิเปตสารละลาย Spiked sample ที่เตรียมได้จากตารางข้างบน ใส่ในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Borate buffer pH8 จำนวน 0.6 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายรีเอเจนต์ 2-hydroxy-1-naphthaldehyde (6% w/v Acetronitrile) จำนวน 2 มิลลิลิตร
4. ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไทท์ จนครบ 10 มิลลิลิตร
5. วางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในที่มืด
6. นำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV- Visible spectrometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร

หมายเหตุ Reagent blank ใส่70% เอทานอลแทนน้ำกลั่น 1 ml ทำการ Derivertization (วัด 3 ซ้ำ) Sample และ Standard เตรียมเช่นเดียวกับ Spiked sample

บทที่ 4

ผลการวิจัย และอภิปรายผล

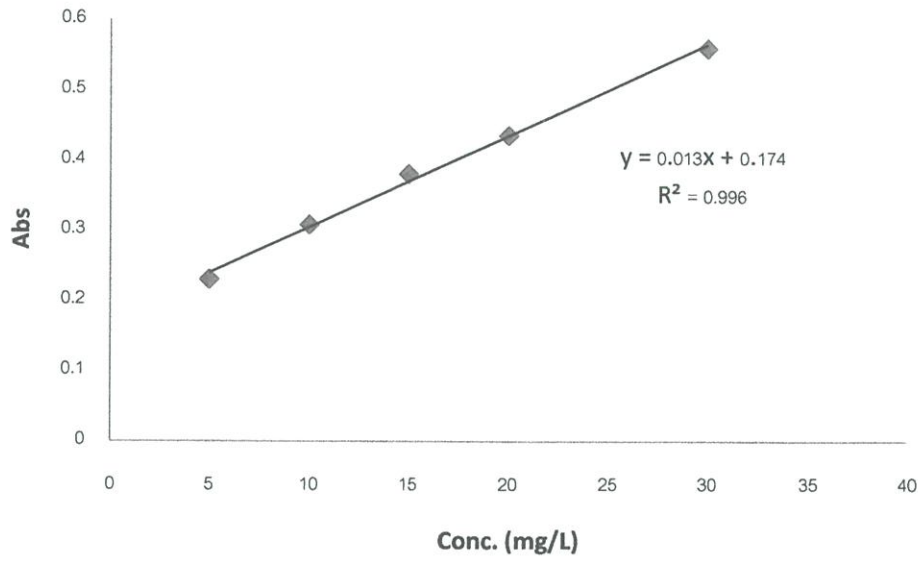
4.1 การศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการติดตามผลิตภัณฑ์



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูดกลืนแสง

จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำอนุพันธ์ของสารละลายมาตรฐาน GABA กับ 2-Hydroxynaphthaldehyde ที่ความเข้มข้น 5,10,15,20,30 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 400-800 นาโนเมตร พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มมากขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน จากสเปกตรัมก็จะพบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดพบความยาวคลื่น 424 นาโนเมตร จึงได้ทำการติดตามผลิตภัณฑ์ที่ความยาวคลื่นนี้

4.2 การศึกษาความเป็นเส้นตรงของค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์



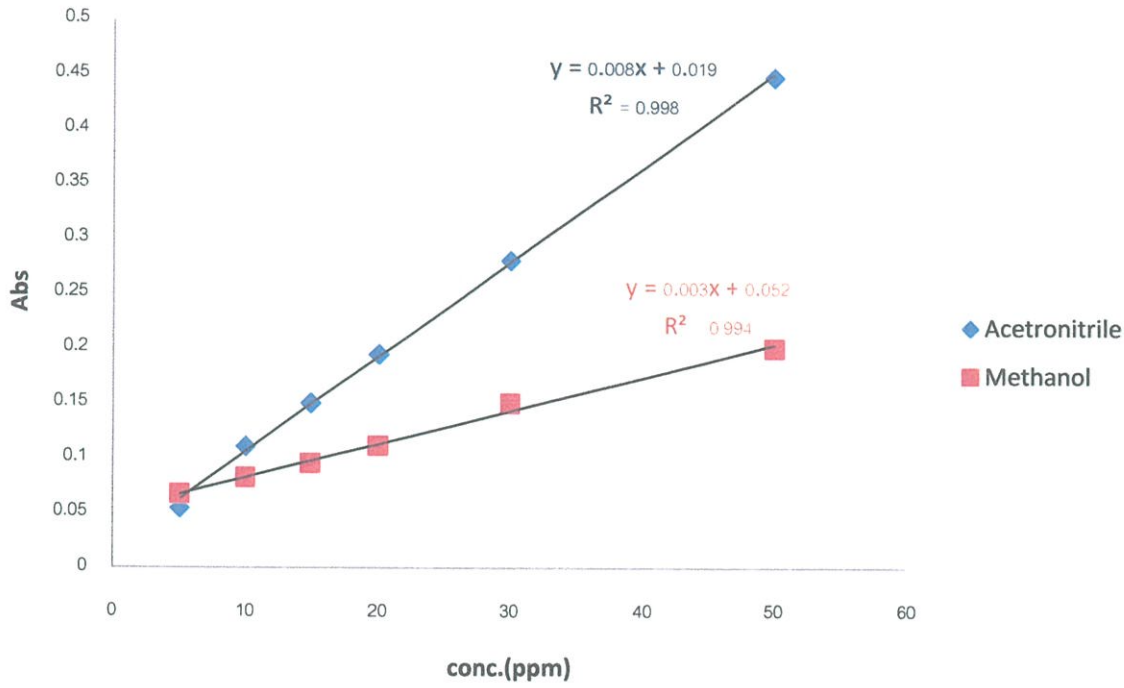
รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 424 นาโนเมตร

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้เป็นการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลาย จากผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์จากสารละลายมาตรฐาน GABA ที่ความเข้มข้น 5,10,15,20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 424 นาโนเมตร พบว่าได้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี มีค่า R^2=0.996

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

4.3.1 อิทธิพลของตัวทำละลาย

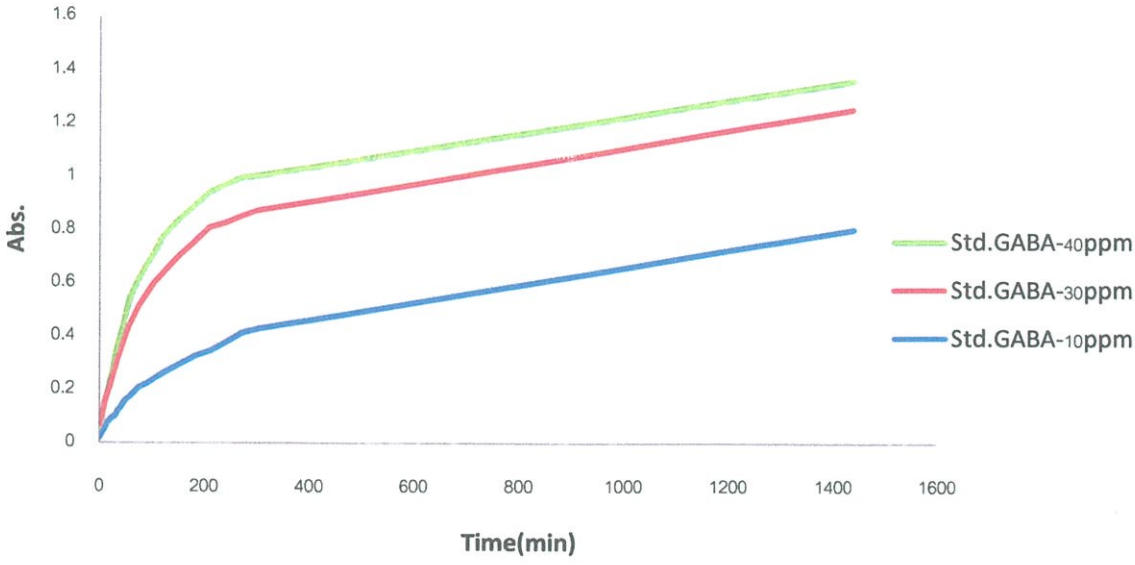
ทำการศึกษาตัวทำละลายทั้งสองชนิด ได้แก่ Methanol และ Acetronitrile ได้ผลดังรูป



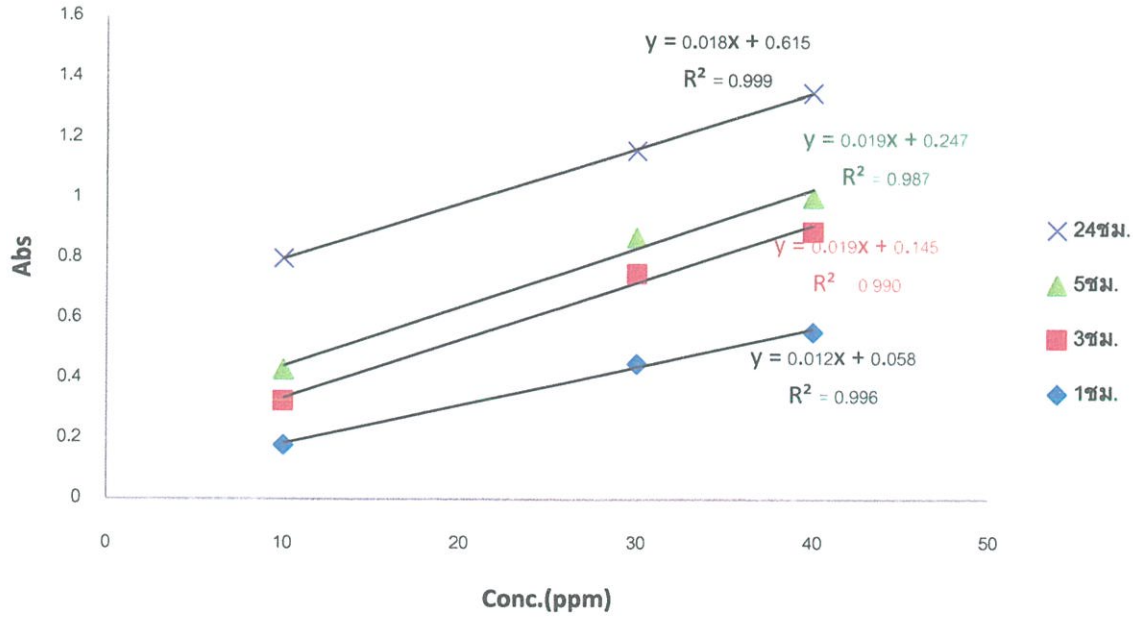
รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสง ของตัวทำละลาย Methanol และ Acetronitrile

การศึกษาสภาวะของตัวทำละลายระหว่าง Methanol และ Acetronitrile เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ ที่ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน GABA ความเข้มข้น 5,10,15,20,30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 424 นาโนเมตร ซึ่งจากกราฟจะเห็นได้ว่าตัวทำละลาย Acetronitrile ให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดีกว่าตัวทำละลาย Methanol เพราะในการทดลองเมื่อใช้ Methanol เป็นตัวทำลายพบว่าสารมาตรฐานเกิดตะกอน ต้องทำการเขย่าเพื่อกำจัดตะกอนก่อนทำการตรวจวัด จึงเป็นการเพิ่มขั้นตอนให้วิธีการวิเคราะห์นี้ จึงได้เลือก Acetronitrile มาเป็นตัวทำละลาย เพราะ เมื่อผสมกับสารละลายมาตรฐานแล้วไม่เกิดตะกอน

4.3.2 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (นาที) กับค่าการดูดกลืนแสง

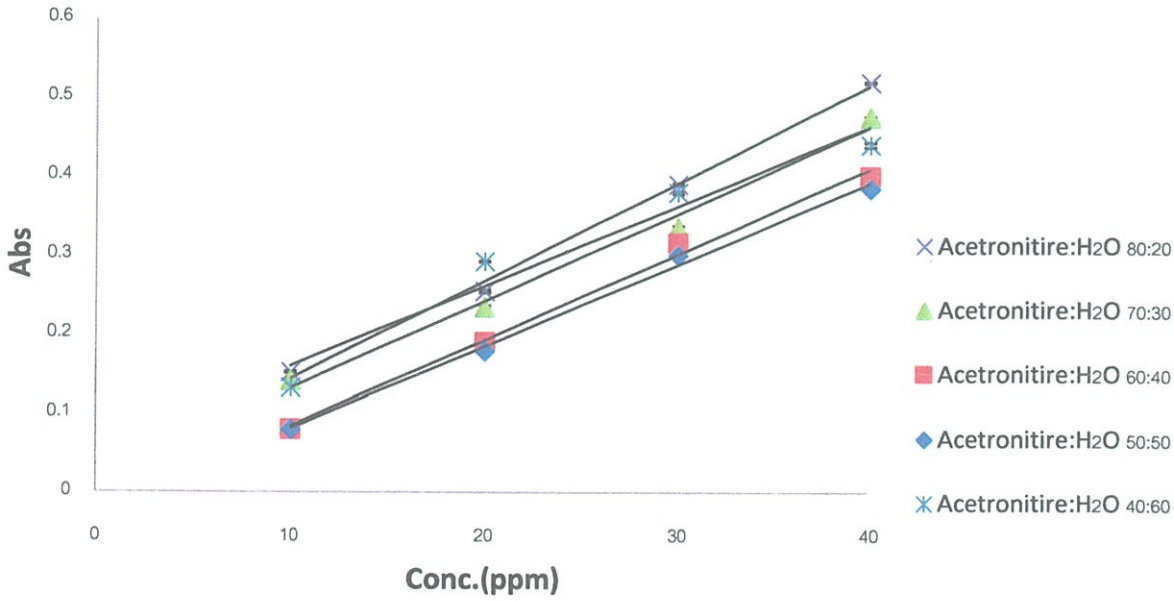


รูปที่ 4.5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่แต่ละช่วงเวลา

ศึกษาเวลาของการเกิดปฏิกิริยา เพื่อหาช่วงเวลาที่ดีที่สุดในการเกิดปฏิกริยาของสารละลายมาตรฐาน GABA ที่ใช้ Acetronitrile เป็นตัวทำลาย กับสารอนุพันธ์ 2-Hydroxynaphthaldehyde ที่ช่วงความเข้มข้น 10,30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเริ่มศึกษาตั้งแต่ที่ 0 นาทีแรก จนถึง 24 ชั่วโมง

จากกราฟจะพบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาตั้งแต่นาทีแรก โดยกราฟมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปฏิกิริยาจะแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อเวลาผ่านไปนานมากขึ้น และเมื่อนำมาเปรียบเทียบในกราฟมาตรฐานก็พบว่าที่เวลาสุดท้าย คือที่ 24 ชั่วโมง ให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดีที่สุด จึงเป็นเวลาที่ดีที่สุดที่ใช้เพื่อติดตามค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์

4.3.3 ศึกษาอัตราส่วนของ Acetronitrile:H_2O ในการปรับปริมาตรผลิตภัณฑ์ระหว่าง GABA กับ Reagent

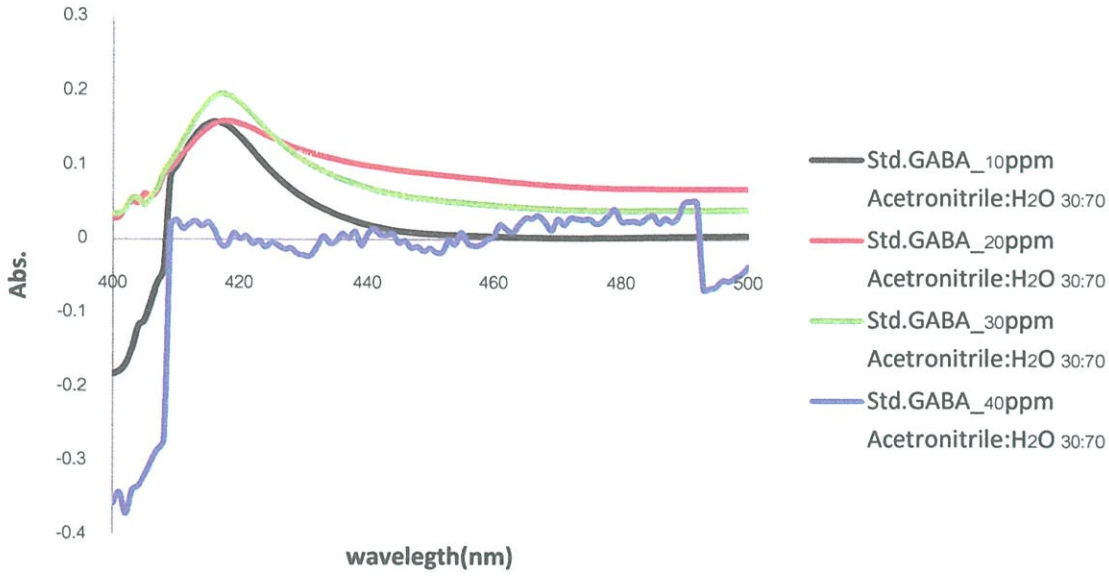


รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของอัตราส่วน Acetronitrile:H_2O 80:20,70:30,60:40,50:50 และ 40:60

ตาราง 4.1 แสดงสมการเส้นตรงของอัตราส่วน **Acetronitrile:H_2O**

Acetronitrile:H_2O	สมการเส้นตรง	ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2)
80:20	y = 0.012x + 0.019	0.996
70:30	y = 0.011x + 0.020	0.990
60:40	y = 0.010x - 0.025	0.994
50:50	y = 0.010x - 0.023	0.995
40:60	y = 0.010x + 0.058	0.952

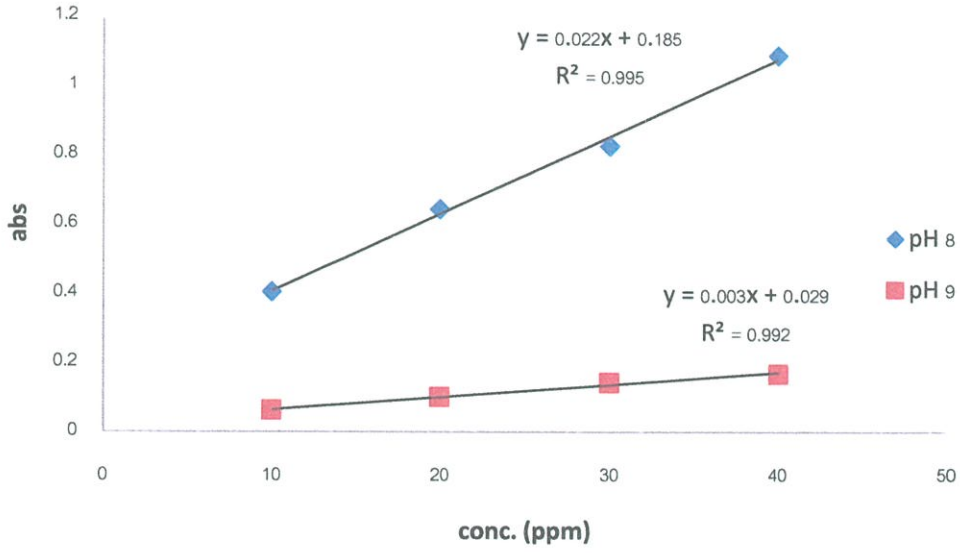
หมายเหตุ ที่อัตราส่วน Acetronitrile:H_2O 30:70 ไม่เกิดปฏิกิริยาดังแสดงจาก spectrum ต่อไปนี้



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของอัตราส่วน Acetronitrile:H_2O 30:70

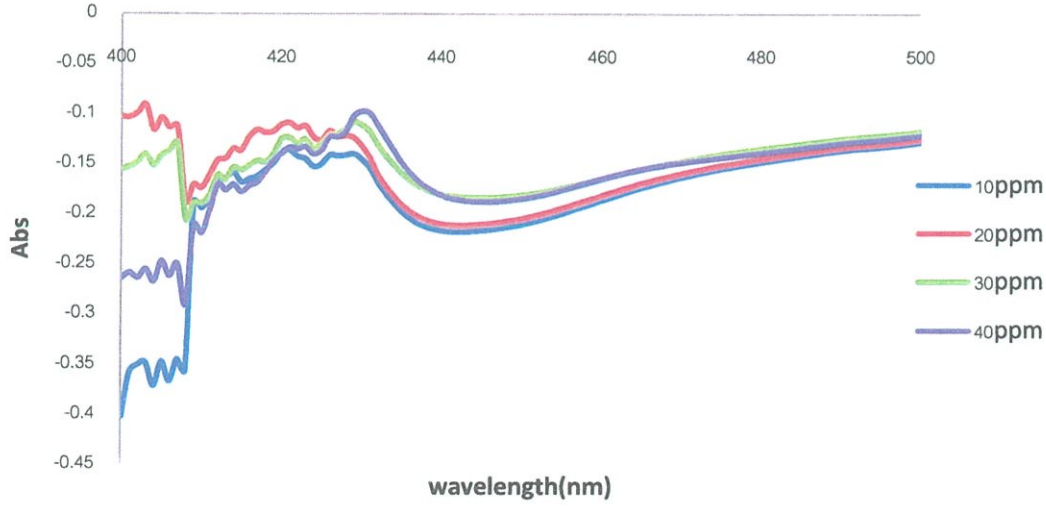
การศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายทำเพื่อลดปริมาณการใช้สารละลาย จากกราฟจะแสดงอัตราส่วน Acetronitrile:H_2O ที่อัตราส่วนต่างๆดังนี้ 80:20,70:30,60:40,50:50 และ 40:60 และที่อัตราส่วน 70:30 ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นและค่าการดูดกลืนแสง โดยจะพบว่าอัตราส่วนระหว่าง Acetronitrile:H_2O ที่ 80:20,70:30 และ 50:50 ให้ sensitivity ที่ดี แต่เลือกใช้อัตราส่วนที่ 50:50 เพราะใช้ปริมาณ Acetronitrile น้อยก็ให้ sensitivity ที่ดีได้แล้ว ซึ่งเป็นการประหยัดต้นทุนของสารละลาย

4.3.4 ศึกษาpHที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของ pH8 และ pH9

หมายเหตุ ที่ pH 10 ไม่เกิดปฏิกิริยาดังแสดงจาก spectrum ต่อไปนี้

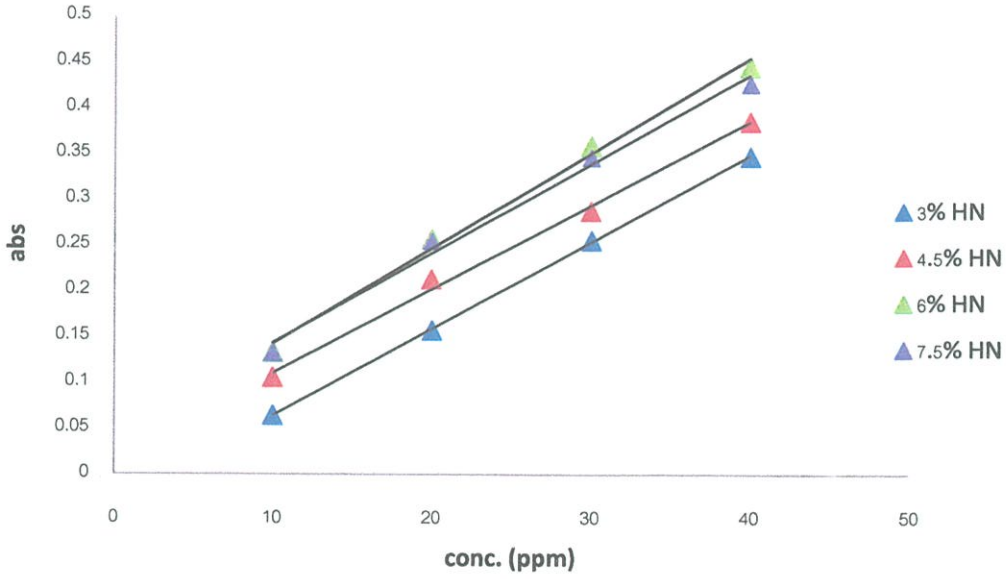


รูปที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของ pH10

ศึกษา pH เพื่อดูว่าบัฟเฟอร์จะมีผลต่อวิธีวิเคราะห์หรือไม่ ซึ่งจากกราฟความสัมพันธ์จะเห็นได้ว่าที่ pH 8 และ pH 9 ให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืน

แสงและความเข้มข้น ที่ pH 10 ดังนั้นจึงเลือก borate buffer pH 8 เนื่องด้วยให้ sensitivity ดีที่สุดในการทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐาน GABA

4.3.5 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของ Reagent ในการทำปฏิกิริยากับ GABA



รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงความเข้มข้นของ Reagent 3%,4.5%,6% และ 7.5%

ศึกษาความเข้มข้นของ Reagent เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดปฏิกิริยาของผลิตภัณฑ์ ได้ทำการศึกษาที่ 3%,4.5%,6% และ 7.5% ซึ่งจากกราฟจะพบว่า ความเข้มข้นที่ 6% ให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดีที่สุด จึงได้เลือกใช้ Reagent ความเข้มข้น 6% w/v ในการติดตามผลิตภัณฑ์

ตาราง 4.2 แสดงสมการเส้นตรงความเข้มข้นของ Reagent

ความเข้มข้น Reagent	สมการเส้นตรง	ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2)
3 %	y = 0.009x - 0.030	0.999
4.5 %	y = 0.009x + 0.019	0.995
6 %	y = 0.010x + 0.038	0.993
7.5 %	y = 0.009x + 0.046	0.990

4.4 การศึกษาความถูกต้องของวิธีการทดลองในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและผลิตภัณฑ์เสริมกาบา

4.4.1 การหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (%Recovery) ในอาหารเสริมกาบา

ตาราง 4.3 ตารางแสดงค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (%Recovery) ในอาหารเสริมกาบา

Sample	Concentrations of GABA (mg/tablet)	Recovery (%)
1	0.070 ± 0.0002	95.1-98.9
2	0.071 ± 0.0036	
3	0.069 ± 0.0019	
4	0.067 ± 0.0011	
5	0.071 ± 0.0048	
6	0.071 ± 0.0050	

จากการทดลองเพื่อศึกษาความถูกต้องของวิธีในตัวอย่างอาหาเสริมกาบา โดยค่าความเข้มข้นที่หาได้จากการทดลอง มีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่ระบุบนฉลากของผลิตภัณฑ์และได้ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (Recovery) ในช่วง 95.1-98.9 ซึ่งเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ และตามที่ผลิตภัณฑ์ระบุปริมาณกาบาคือ 200 mg/5 เม็ด เมื่อคำนวณปริมาณใน 1 เม็ด จะได้ 0.067 mg/1 เม็ด ซึ่งผลการทดลองที่ได้ตามตาราง จะพบว่าค่าที่คำนวณย้อนกลับนั้นมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ฉลากผลิตภัณฑ์กำหนด

4.4.2 การหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (%Recovery) ในข้าวกล้องงอก

ตาราง 4.4 ตารางแสดงค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ (%Recovery) ในข้าวกล้องงอก

Sample number	GABA concentration (mg/l)			% Recovery
	Original	Spiked sample	Found	
1	7.93	17.53	24.61	95.15
2	7.86	17.57	24.69	95.79
3	7.78	17.53	24.55	95.66

จากการทดลองเพื่อศึกษาความถูกต้องของวิธีในตัวอย่างข้าวกล้องงอก พบว่าได้ค่าการวิเคราะห์คืนกลับ (Recovery) เท่ากับ 95.15, 95.79 และ 95.66 ซึ่งเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ เพราะในการเตรียมตัวอย่างข้าวนั้นมีเมทริกซ์รบกวนการวิเคราะห์น้อย จึงทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความแม่นและความเที่ยงที่ดี ตามที่ผลิตภัณฑ์ระบุข้าวกล้องงอกมีปริมาณกาบา 30.5 mg/100 g และเมื่อทำการคำนวณจากการทดลองได้ค่าปริมาณกาบาเท่ากับ 35.36 mg/100 g ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับที่ฉลากระบุ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการเกิดอนุพันธ์ของสารละลายมาตรฐาน GABA กับ 2-Hydroxynaphthaldehyde พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของปริมาณสารละลายมาตรฐาน GABA และค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมในการใช้ติดตามผลิตภัณฑ์ จะใช้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 424 นาโนเมตร และได้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดีที่สุดจากการสร้างกราฟมาตรฐานมีค่าความเป็นเส้นตรง 0.996

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยา ได้ศึกษาตัวทำละลายระหว่าง Methanol กับ Acetronitrile เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเกิดปฏิกิริยา และได้เลือกใช้ Acetronitrile เป็นตัวทำละลายเพราะให้ค่า Sensitivity ที่ดี ได้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมง คือการผสมสารละลายแล้วตั้งทิ้งไว้จนครบ 24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจวัดด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมททรี

การศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายได้เลือกใช้อัตราส่วน Acetronitrile:H_2O 50:50 เพื่อเป็นการลดปริมาณของ Acetronitrile ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา เลือกใช้สารละลาย Borate Buffer pH8 และใช้ความเข้มข้นของสารละลายรีเอเจนต์ 2-Hydroxynaphthaldehyde 6% w/v

5.2 ข้อเสนอแนะ

1.ควรปิดฝาเซลล์ที่ใช้ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-Vis Spectroscopy ทุกครั้ง เพราะตัวทำละลายที่ใช้เป็นสารที่ระเหยได้ง่าย

2.ควรล้างเซลล์ที่ทำการตรวจวัดด้วยสารที่จะใช้วัดในครั้งต่อไป

3.เปิดหลอดไฟที่ใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสงของเครื่อง UV-Vis Spectroscopy เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการตรวจวัดเสมอ

4.ในการทำการทดลองจะต้องจับเวลาให้ครบ 24 ชั่วโมงให้ถูกต้องทุกครั้ง

5. เตรียมสารละลายรีเอเจนท์ 2-Hydroxynaphthaldehyde 6% w/v ใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

6.ปรับสารละลาย Borate Buffer ให้ได้ pH8 ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

อ้างอิง

[1] http://en.wikipedia.org/wiki/Gamma-Aminobutyric_acid

[2] http://www.teainstitutemfu.com/ducument/GABATea.pdf

[3] http://www.mwit.ac.th/~sarawoot/chem40235.htm

[4] http://www.cem.msu.du/~reusch/VirtualText/Spectropy/UV-Vis/spectm.html

[5] http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4_3.html

[6] http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4_2.html

[7] วราภรณ์ โพธิ์อ่อน, สุวรรณทิพย์ จางวางศิลป์ (2012). Spectrophotometric determination of GABA in supplemented GABA milk. Industrial Chemistry-Analytical Instrument Faculty of Science King Monkut's Institute of Technology Ladkrabang.

[8] M.Y. Khuhawar, A.D. Rajper (2003). L iquid chromatographic determination of g-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid using 2-hydroxynaphthaldehyde as derivatizing reagent. Journal of Chromatography B, Volume 788, Page 413-418

[9] สยาม ชนะมาตย์, วาทินี พันพรม, จารุวรรณ ธนวิรุฬห์ (2013). การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ทางสเปกโตรโฟโตเมตรี เพื่อหาปริมาณ γ-Amino butyric acid (GABA) ในผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องงอก. The 5th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2013 "Pharmacy Profession: Moving Forward to ASEAN Harmonization" Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand, P1-PS-13.

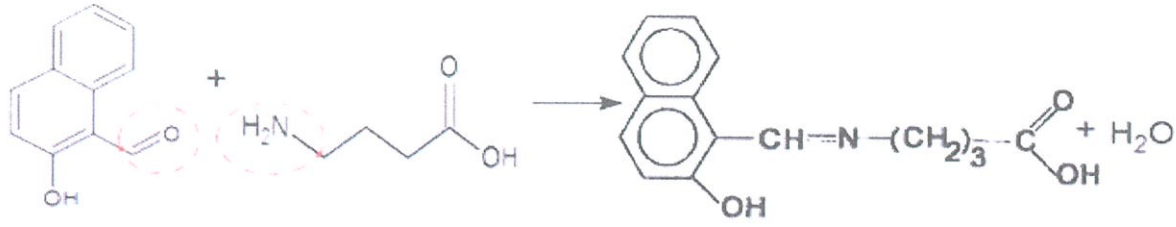
[10] Weerawat rodkum (2011). Determination of Gamma-Amino butyric Acid in GABA-rice by Capillary Electrophoresis. A Thesis submitted in partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science in Chemistry faculty of science and technology Thammasart University.

[12] Gerard Clarke, Siobhain O'Mahony, Gwen Malone, Timothy G. Dinan. (2007). An isocratic high performance liquid chromatography method for the determination of GABA and glutamate in discrete regions of the rodent brain. Journal of Neuroscience Methods, Volume 160, Page 223–230

[13] Takashi Iimure, Makoto Kihara, Naohiko Hirota, Tiansu Zhou, Katsuhiro Hayashi, Kazutoshi Ito. (2009). A method for production of γ-amino butyric acid (GABA) using barley bran supplemented with glutamate. Food Research International, Volume 42, Page 319–323

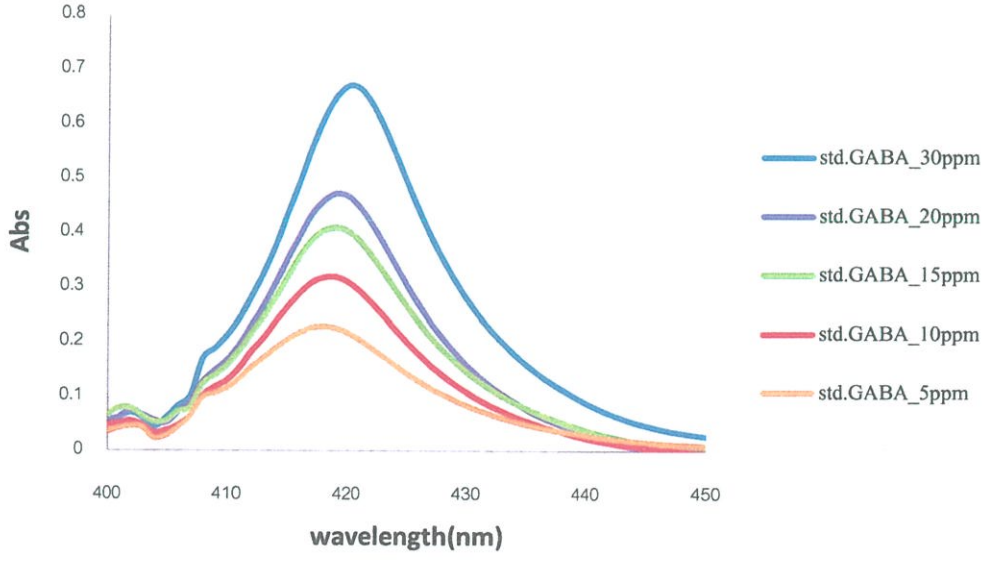
[14] Panatda Jannoey, Hataichanoke Niamsup, Saisamon Lumyong, Shigeyuki Tajima, Mika Nomura and Griangsak Chairote. (2010). γ-Aminobutyric Acid (GABA) Accumulations in Rice During Germination. Chiang Mai J. Sci., Volume 37(1), Page 124-133

ภาคผนวก

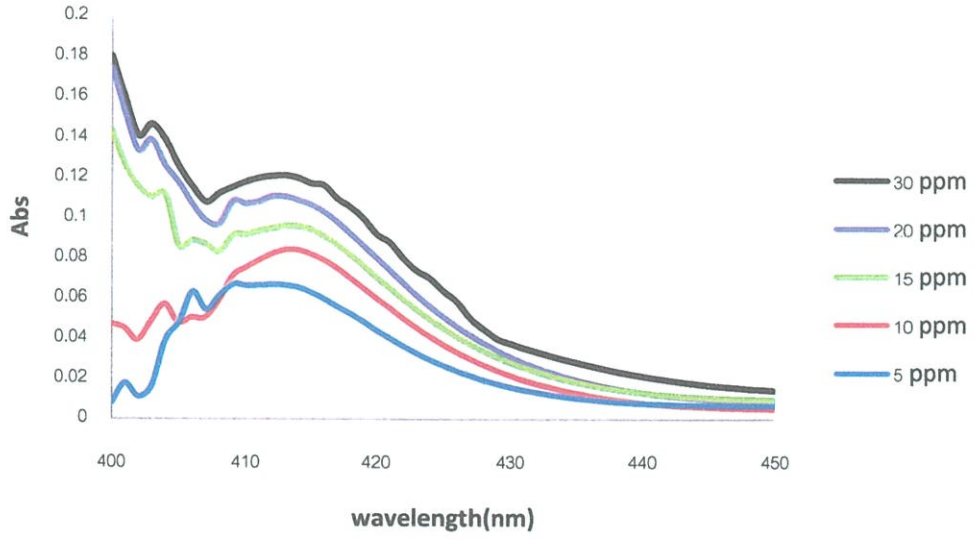


2-hydroxynaphtaldehyde (Yellow) GABA (colorless) Product (Yellow)

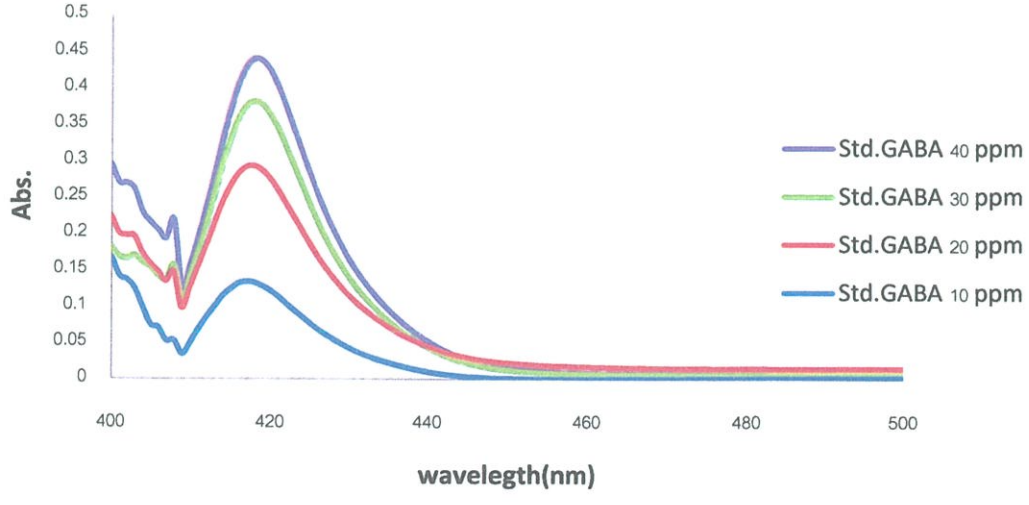
สมการแสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Reagent (2-hydroxynaphtaldehyde) กับ สาร ตัวอย่าง GABA และได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีเหลือง



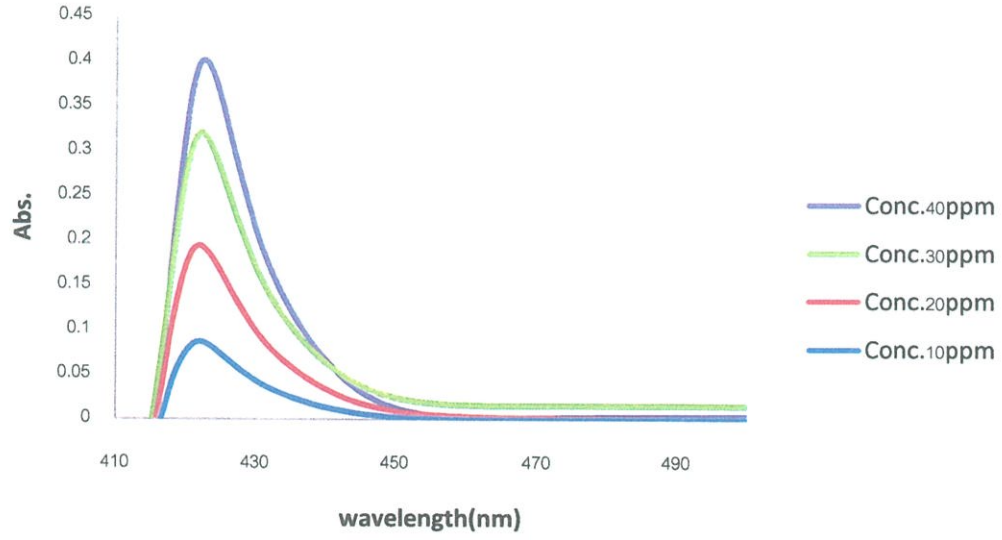
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูกลืนแสง เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดไปสร้างกราฟมาตรฐานจะได้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.996



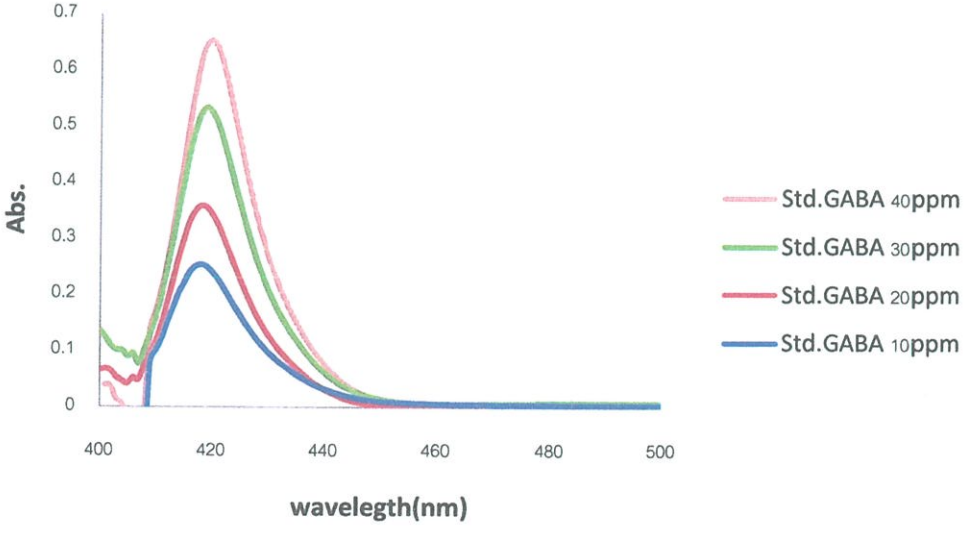
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูกลืนแสง เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดไปสร้างกราฟมาตรฐานจะได้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.995



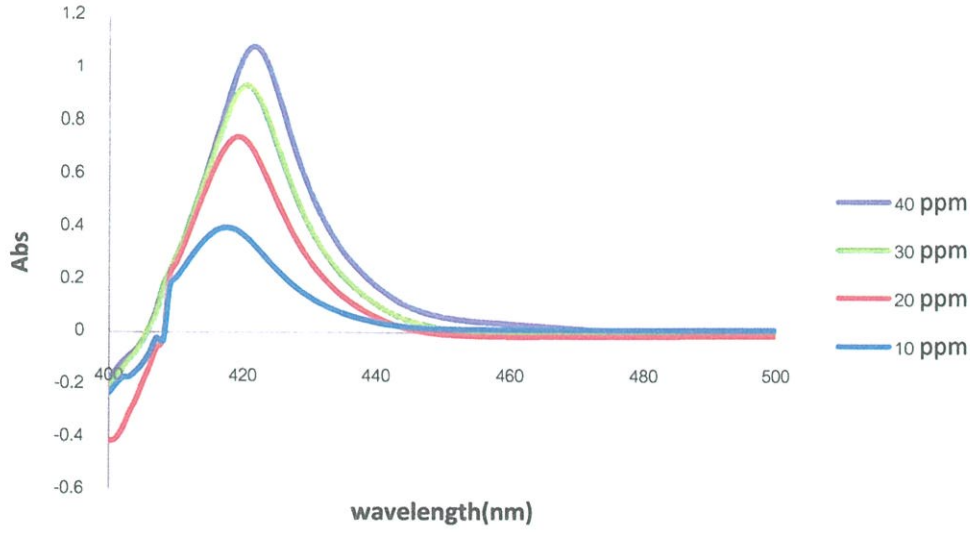
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูกลืนแสงของอัตราส่วน Acetronitrile:H_2O 40:60 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดไปสร้างกราฟมาตรฐานจะได้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.952



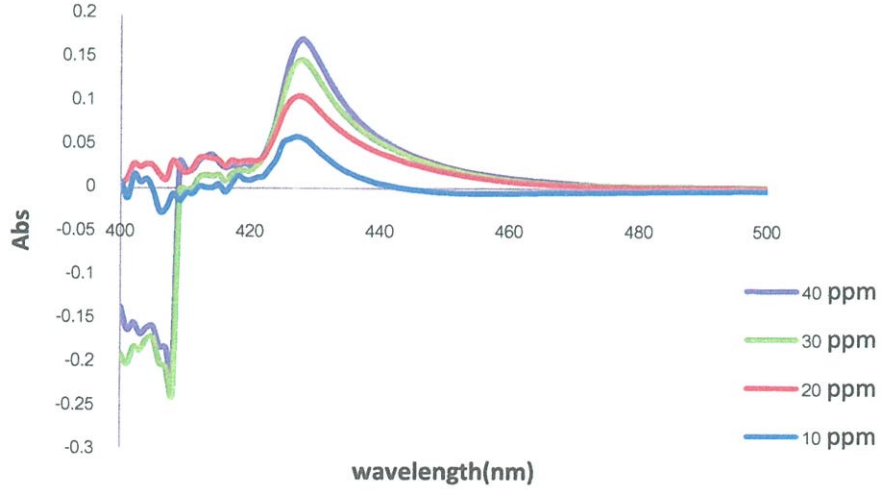
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูกลืนแสงของอัตราส่วน Acetronitrile:H_2O 50:50 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดไปสร้างกราฟมาตรฐานจะได้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.995



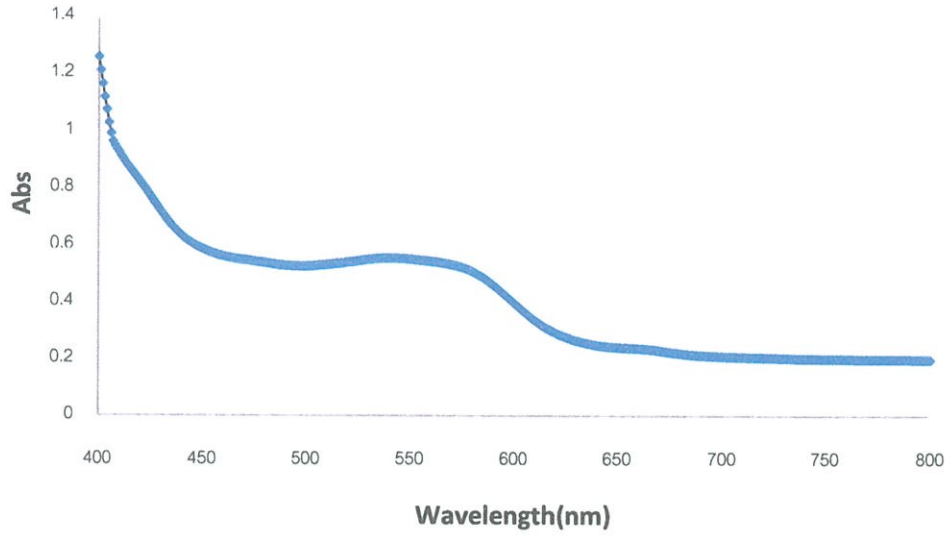
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูกลืนแสงของอัตราส่วน Acetronitrile:H_2O 60:40 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดไปสร้างกราฟมาตรฐานจะได้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.994



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของ Borate Buffer pH8 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดไปสร้างกราฟมาตรฐานจะได้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.995



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของ Borate Buffer pH9 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดไปสร้างกราฟมาตรฐานจะได้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.992



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่าการดูดกลืนแสงของ Pure GABA