

การพัฒนาเทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ
ไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
สิงหาคม 2559

การพัฒนาเทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ
ไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ



ปริญญานิพนธ์
ของ
ปรางค์ทิพย์ นาคทอง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
สิงหาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาเทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ
ไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ



บทคัดย่อ
ของ
ปรางค์ทิพย์ นาคทอง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
สิงหาคม 2559

ปรารักษ์ทิพย์ นาคทอง. (2559). การพัฒนาเทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษา ปรินญาณิพนธ์: รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย.

สารไทรามีน หรือ 4-(2-อะมิโนเอทิล ฟีนอล) เป็นสารสำคัญในกลุ่มไบโอเจนิคเอมีน ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนไทโรซีนพบในพืชและสัตว์ โดยปกติไทรามีนปริมาณน้อยจะไม่มีผลต่อสุขภาพมนุษย์ แต่ถ้าปริมาณไทรามีนสูงจะก่อให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูง (hypertensive crisis หรือที่เรียกว่า “cheese reaction”) ในปัจจุบันพืชสมุนไพรกำลังเป็นที่นิยมของผู้บริโภคโดยเฉพาะกระชายดำ ในงานวิจัยนี้ได้ให้ความสนใจต่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในกระชายดำด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟีร่วมกับเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง โดยทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค ผลการศึกษาพบสภาวะที่เหมาะสมของชนิดและปริมาณของตัวดูดซับคือ ALU-TX 100 (ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์) ปริมาณ 1.0000 กรัม และตัวทำละลายที่เหมาะสมคือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และตรวจวัดด้วยตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยเทคนิคการเตรียมอนุพันธ์กับสารออกโทพทาลไดอัลดีไฮด์ พบว่าควรใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ เมทานอลต่อน้ำอัตราส่วน 70:30 โดยปริมาตร และควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งผลการทดสอบความใช้ได้ของระบบการทดลองพบว่าได้ค่าร้อยละการได้กลับคืนเฉลี่ยอยู่ที่ 98.89 ± 1.59 โดยมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของที่ตรวจวัดและค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้เท่ากับ 0.00045 และ 0.0015 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และค่าความเที่ยงภายในวัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) ของพื้นที่ใต้พีคอยู่ในช่วง 0.40%-1.18% และ 0.64%-1.18% ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าวิธีที่นำเสนอนี้มีประสิทธิภาพที่ดี และสามารถนำวิธีการไปประยุกต์ในการตรวจสอบหาปริมาณไทรามีนในกระชายดำ ผลการทดลองสามารถตรวจพบไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำมีปริมาณน้อยกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงว่าการบริโภคกระชายดำไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย วิธีนี้สามารถตรวจหาสารไทรามีนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และสามารถประยุกต์ในการตรวจวิเคราะห์กับตัวอย่างสมุนไพรชนิดอื่นได้

DEVELOPMENT OF SAMPLE PREPARATION TECHNIQUE BY MICELLAR
CHROMATOGRAPHY FOR TYRAMINE ANALYSIS IN BLACK GALINGALE SAMPLES



Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master of Science Degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
August 2016

Prangthip Nakthong. (2016). *Development of sample preparation technique by micellar chromatography for tyramine analysis in black galingale samples*. Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, SrinakharinwirotUniversity. Advisor Committee. Associate Professor Dr. Pornpimol Muangthai.

Tyramine (4-(2-aminoethyl) phenol) is commonly known as one type of biogenic amine. Tyramine is produced by the microbial decarboxylation of tyrosine in plants and animals. In general, low levels of tyramine in food does not have a negative effect on human health. However, high levels of tyramine may cause a “hypertensive reaction”, also known as “cheese reaction”. Nowadays, this herb is very popular among consumers, especially black galingale. This research focused on the development of a sample preparation technique using micellar chromatography combined with solid phase extraction to analyze the tyramine levels in black galingale. Under investigation, the type and amount of adsorbent is ALU-TX 100 (0.4 mM), 1.0000 grams and solvent for eluting tyramine is 5 ml of 0.5 M NaCl. Then, tyramine was detected using reverse phase high performance liquid chromatography-fluorescence detection after pre-column derivatization with o-phthaldialdehyde (OPA). The optimal composition of the mobile phase was methanol : water (70:30 v/v) as a mobile phase with isocratic elution and the flow rate was at 0.8 mL/min. The result of validate method showed that the recovery (%) was 98.89 ± 1.59 . The LOD and LOQ were 0.00045 µg/mL and 0.0015 µg/mL, respectively. The relative standard deviation (%RSD) of peak area on intra-day and inter-day were 0.40%-1.18% and 0.64%-1.18%, respectively. This indicated that the proposed method performed well. After the application of this method to analyze tyramine, it was revealed that black galingale samples had tyramine levels below 100 mg/kg. The consumption of black galingale has no ill effects on human health. This approach was successfully developed for the determination of tyramine in black galingale samples, and can be applied for the detection of tyramine in other medicinal plant samples.

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยส่วนหนึ่งจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2557



ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การพัฒนาเทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ
ไพรมีนในตัวอย่างกระชายดำ
ของ
ปรารักษ์ทิพย์ นาคทอง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

วันที่.....เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษา

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

(อาจารย์ ดร.วินัย อวงพิพัฒน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องต่าง ๆ ช่วยแก้ไขปัญห และให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย และการเขียนปริญญานิพนธ์นี้แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ ได้เรียนรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วินัย อวงพิพัฒน์ ประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ สงศรีโรจน์ กรรมการควบคุมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่อง เพื่อให้ปริญญานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ให้ความเมตตา ความเอาใจใส่ และให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนทุนการศึกษาจากทุนการศึกษาของโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ตลอดระยะเวลาในการศึกษาระดับปริญญาตรีและปริญญาโท ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่สนับสนุนทุนในการนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายที่ประเทศสิงคโปร์ และขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่คอยให้การสนับสนุนทางด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำแก่ผู้วิจัยตลอดการทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา และขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดาและญาติสนิททุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดู มอบความรัก ความเอาใจใส่ และสนับสนุนในทุกๆ ด้าน รวมทั้งผู้มีพระคุณท่านอื่นๆ ที่ไม่ได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในครั้งนี้

ปรางค์ทิพย์ นาคทอง

สารบัญ

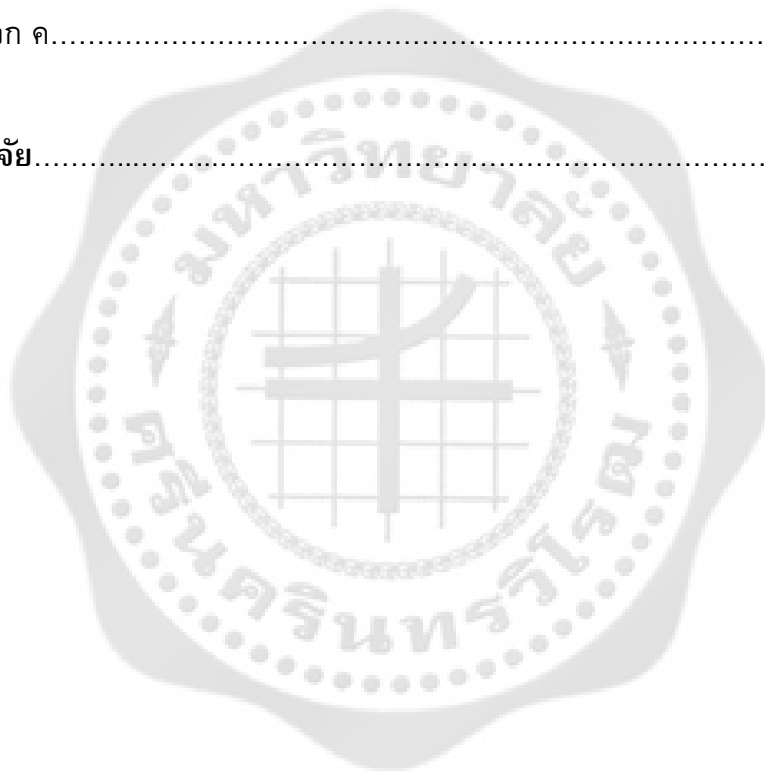
บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
การเกิดและแหล่งที่พบไทรามีน.....	4
ความเป็นพิษของไทรามีน.....	8
กระชายดำ.....	13
วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์.....	14
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	28
วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
ทำการสังเคราะห์ตัวดูดซับชนิดต่าง ๆ ด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี.....	30
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน โดยใช้เทคนิค รีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	30
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์ โครมาโทกราฟี.....	32
ศึกษาผลของสารรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนจากตัวอย่าง.....	34
ศึกษาความใช้ได้ของวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์.....	34
การประยุกต์วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี สำหรับ การวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ.....	36

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง	
ตอนที่ 1 ผลการสังเคราะห์ตัวดูดซับชนิดต่าง ๆ ด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี.....	37
ตอนที่ 2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบบรีเวสเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน.....	46
ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่างไทรามีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์.....	46
ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	47
ผลการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	49
ตอนที่ 3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี.....	51
ผลการศึกษาชนิดของตัวดูดซับที่เหมาะสม.....	51
ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิว.....	52
ศึกษาปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสม.....	53
ศึกษาชนิดตัวทำละลายที่ใช้ชะไทรามีน.....	54
ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ชะไทรามีน.....	54
ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ชะไทรามีน.....	55
ตอนที่ 4 ผลการศึกษาสารรบกวนที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน..	56
ตอนที่ 5 ผลการศึกษาความใช้ได้ของทั้งระบบวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์.....	57
ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์.....	57
การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของที่ตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้.....	58
ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์.....	58
ศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์.....	58
ตอนที่ 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ.....	60
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	62

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	66
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก.....	73
ภาคผนวก ข.....	76
ภาคผนวก ค.....	79
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	83



บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	งานวิจัยที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างอาหารบางชนิด.....	11
2	งานวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้วิธีการสกัดด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง.....	16
3	งานวิจัยที่เกี่ยวกับการเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี.....	21
4	ชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้.....	22
5	แหล่งที่มาของตัวอย่างกระชายดำและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากกระชายดำ.....	29
6	ลักษณะทางกายภาพของตัวดูดซับแต่ละชนิด.....	37
7	สรุปผลสเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับแต่ละชนิด.....	43
8	ผลการศึกษาการแปรผันของของวงภาคเคลื่อนที่.....	48
9	สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน.....	50
10	ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการวิเคราะห์.....	58
11	ผลการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ.....	60

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 การเกิดไบโอเจนิกเอมีนในอาหาร.....	5
2 การสังเคราะห์และการกำจัดของไตรามีนในระบบประสาท.....	9
3 กระบวนการกำจัดและการเกิดพิษของไตรามีน.....	10
4 ขั้นตอนของเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง.....	18
5 ประเภทของสารลดแรงตึงผิว.....	19
6 แบบจำลองการเกิดการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวบนสารดูดซับ.....	20
7 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ ALU.....	38
8 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ ALU-SDS.....	39
9 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ ALU-CTAB.....	39
10 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ ALU-TX 100.....	40
11 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ C18.....	40
12 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ C18-SDS.....	41
13 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ C18-CTAB.....	41
14 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ C18-TX 100.....	42
15 สเปกตรัมการวาวแสงของสารอนุพันธ์ไตรามีน.....	47
16 โครมาโทแกรมผลการศึกษาการแปรผันของของภูมิภาคเคลื่อนที่.....	48
17 ผลของอัตราการไหลของภูมิภาคเคลื่อนที่.....	49
18 โครมาโทแกรมของอนุพันธ์ของไตรามีน.....	50
19 ผลการศึกษาชนิดของตัวดูดซับที่เหมาะสม.....	51
20 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	52
21 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Triton X 100.....	53
22 ผลการศึกษาปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสม.....	53
23 ผลการศึกษาชนิดตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีน.....	54
24 ผลการศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีน.....	55
25 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีน.....	55
26 โครมาโทแกรมการแยกอนุพันธ์ของไตรามีนกับกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด.....	56

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
27 กราฟมาตรฐานของไทรมีน.....	57
28 โครมาโทแกรมของการเติมและไม่เติมสารมาตรฐานไทรมีนลงในตัวอย่าง....	59
29 แบบจำลองโครงสร้างของตัวดูดซับ ALU-TX 100 แบบไมเซลล์.....	63
30 การดูดซับไทรมีนบนตัวดูดซับ ALU-TX 100.....	64
31 โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างเมื่อผ่านการเตรียมตัวอย่าง.....	74
32 โครมาโทแกรมของการหาค่า LOD และ LOQ ตามลำดับ.....	75
33 กราฟผลการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง OPA กับไทรมีน.....	75
34 ตัวอย่างกระดาษดำที่ใช้ในการทดลอง.....	76
35 สารสกัดกระดาษดำก่อนและหลังผ่านวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์ โครมาโทกราฟี.....	77
36 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง.....	78
37 ชุด SPE vacuum manifolds.....	80
38 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	80
39 เครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์.....	81
40 เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์.....	81
41 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	82
42 เครื่องอัลตราโซนิก.....	82

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

สารไทรามิน (tyramine หรือ 4-(2-aminoethyl) phenol) จัดเป็นสารในกลุ่มไบโอเจนิค เอมีน (biogenic amine) ประเภทอะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) (Silla Santos, M.H. 1996: 213-214) เป็นผลที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ เมื่อกรดอะมิโน ไทโรซีนเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซีนดีคาร์บอกซิเลส (tyrosine decarboxylase) ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ (Komprda, T.; et al. 2008: 219) ในมนุษย์จะพบไทรามินได้ในบริเวณสมอง และเนื้อเยื่อประสาทส่วนปลาย โดยมีผลต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกายหลายประเภท ได้แก่ การหดตัวของหลอดเลือด การเพิ่มอัตรา การเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจ กระตุ้นการหลั่งน้ำตาและน้ำลาย เพิ่มระดับน้ำตาลในกระแส เลือด และการหลั่งนอร์อะดรีนาลีนจากระบบประสาทอัตโนมัติ เป็นต้น (Shalaby, A.R. 1996: 676)

ปริมาณของไทรามินที่พบในพืช สัตว์ และรวมถึงมนุษย์นั้นมีปริมาณน้อยมาก แต่จะพบ มากในอาหารประเภทหมักเช่น เนื้อสัตว์หมัก เนย ชีส ไข่กรอกแห้ง เบียร์ ไวน์แดง ซอสถั่วเหลือง กะหล่ำปลีดอง และซ็อกโกแลต เป็นต้น ถ้าหากรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนไทรามินสูงเข้าสู่ ร่างกาย สารนี้จะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase, MAO) หรือเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดส (diamine oxidase, DAO) โดย เอนไซม์ทั้งสองชนิดจะเร่งปฏิกิริยาดีอะมิเนชัน (deamination) ของสารประกอบเอมีน ทำให้ ไทรามินเปลี่ยนเป็นสารอื่นที่มีความเป็นพิษลดลง และถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ แต่ถ้าหากร่างกาย ได้รับปริมาณไทรามินในปริมาณมากจะทำให้ร่างกายไม่สามารถกำจัดออกได้หมด และทำให้เกิด การสะสมของไทรามินในร่างกาย จึงส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายทั้งต่อระบบประสาท และระบบไหลเวียนโลหิต ซึ่งก่อให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูง (hypertensive crisis หรือ cheese reaction) มีอาการอาเจียน เจ็บหน้าอก กล้ามเนื้อกระตุก ปวดศีรษะอย่างรุนแรง (ไมเกรน) เส้นเลือดในสมองแตก หรืออาจถึงขั้นเสียชีวิต (Shalaby, A.R. 1996: 677-678)

ในปัจจุบันมนุษย์นิยมบริโภคพืชสมุนไพรในหลากหลายรูปแบบเช่น ใช้ในการประกอบ อาหาร น้ำสมุนไพร ชาชง ผลิตภัณฑ์แคปซูล ไวน์ และลูกกลอน เป็นต้น และจากการค้นคว้า

งานวิจัยก่อนหน้านี้พบการวิเคราะห์หาปริมาณไทรามีนในตัวอย่างพืชสมุนไพรที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ แห้ว (แห้ว) กระชายดำ หัวข้าวเย็นเหิน นางพญาเสือโคร่ง ฝรั่งเสนา สะค้านแดง สะค้านหน้าผา เครื่องเห่า ดีปลากั้ง และฮ่อสะพายควาย โดยพบว่าตัวอย่างกระชายดำมีปริมาณไทรามีนมากที่สุดคือ 1.96 มิลลิกรัมต่อลิตร (Nakthong, P.; & Muangthai, P. 2015: 370) ถึงแม้ว่าปริมาณของไทรามีนที่พบจะมีปริมาณน้อย ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อร่างกาย แต่สมุนไพรก็ถือเป็นยาชนิดหนึ่ง หากรับประทานติดต่อกันเป็นเวลานานในลักษณะเป็นอาหารเสริมอาจให้โทษได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาและวิเคราะห์หาปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชาย โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แต่อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์ที่จะให้ผลสัมฤทธิ์ และมีประสิทธิภาพสูงนั้นขึ้นกับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยในงานนี้ผู้วิจัยได้นำเสนอการพัฒนาตัวดูดซับด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี (Micellar chromatography) ผสมผสานการด้วยตัวดูดซับของแข็ง (solid phase extraction; SPE) ซึ่งเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของไทรามีนจากสารตัวอย่าง ตลอดจนช่วยกำจัดสิ่งรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี
3. เพื่อศึกษาความใช้ได้ของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี
4. เพื่อประยุกต์วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทราบถึงวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟีที่เหมาะสม
2. ทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี
3. ทราบถึงความใช้ได้ของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี
4. ทราบถึงปริมาณไทรามีนที่พบในตัวอย่างกระชายดำ ที่อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี
 - 1.1 ศึกษาชนิดและปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสม
 - 1.1.1 ชนิดของตัวดูดซับที่ใช้ได้แก่ ออกตะเดคซิลไซเลน และอะลูมินา
 - 1.1.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เซทิลไตรเมทิล-แอมโมเนียมโบรไมด์ และไตรตัน เอกซ์ 100
 - 1.1.3 ปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสมในช่วง 0.2500 - 1.2500 กรัม
 - 1.1.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิวในช่วง 0.05 – 1.00 มิลลิโมลาร์
 - 1.2 ศึกษาชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ชะไทรามีนออกจากตัวดูดซับ
 - 1.2.1 ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ชะไทรามีนได้แก่ เมทานอล โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมคลอไรด์ และบอเรตบัฟเฟอร์
 - 1.2.2 ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสมในช่วง 0.01 - 4.00 โมลาร์
 - 1.2.3 ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ชะไทรามีนในช่วง 2.00 – 15.00 มิลลิลิตร
2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี
 - ศึกษาผลของกรดอะมิโน ได้แก่ ไทโรซีน ฮีสติดีน ไลซีน และอาร์นีน
3. ศึกษาความใช้ได้ของวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์
 - 3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
 - 3.1.1 ศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่
 - 3.1.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่
 - 3.2 ศึกษาความใช้ได้ของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี
 - 3.2.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์ (linearity)
 - 3.2.2 ศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์ (sensitivity) โดยหาค่า LOD และ LOQ
 - 3.2.3 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)
 - 3.2.4 ศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision)
4. การประยุกต์วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ ได้แก่ เหง้ากระชายดำสด กระชายดำอบแห้ง แคปซูลกระชายดำ ยาขงกระชายดำ และยาตองกระชายดำ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์ไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ โดยผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. การเกิดและแหล่งที่พบไทรามีน
2. ความเป็นพิษของไทรามีน
3. กระชายดำ
4. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

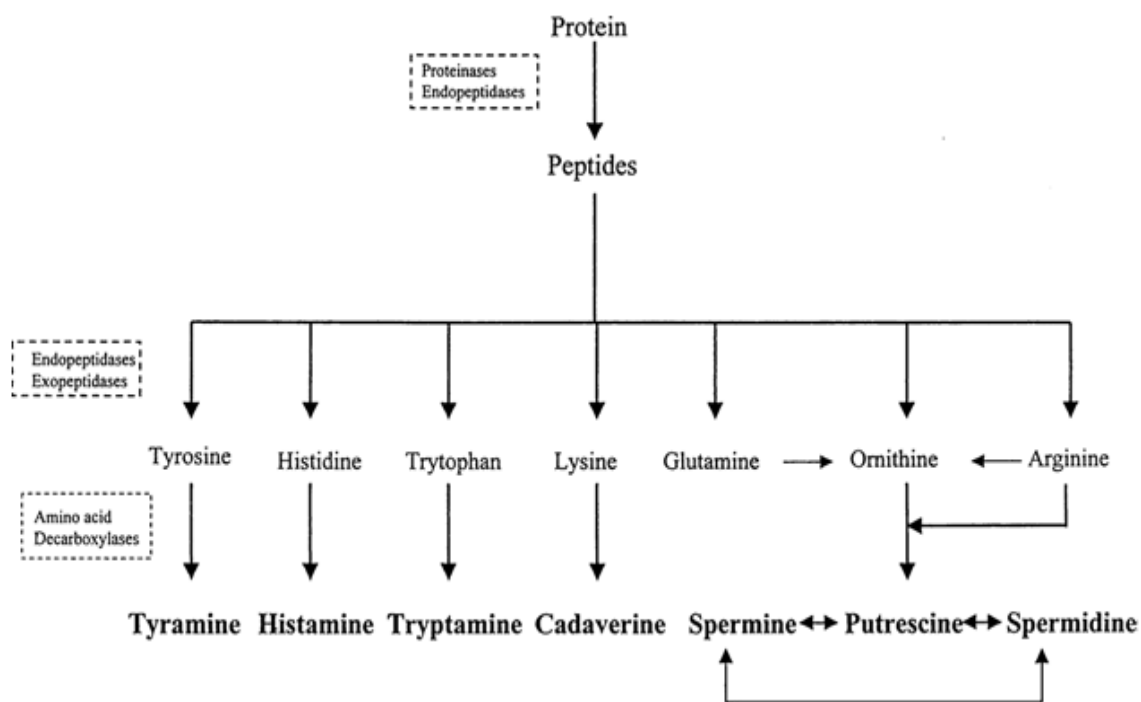
การเกิดและแหล่งที่พบไทรามีน

ไบโอเจนิกเอมีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่ฟังก์ชันหลัก มีคุณสมบัติเป็นเบส มีมวลโมเลกุลต่ำ และทนความร้อน พบในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโน หรือปฏิกิริยาอะมิเนชัน และทรานอะมิเนชันของอัลดีไฮด์และคีโตน ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี (Silla Santos, M.H. 1996: 213-214) คือ

1. อะลิฟาติกเอมีน (aliphatic amine) ได้แก่ พูทรีซีน (putrescine) คาดาเวอรีน (cadaverine) สเปอมีดีน (spermidine) และสเปอมีน (spermine)
2. อะโรมาติกเอมีน ได้แก่ ฟีนิลเอธิลลามีน (Phenylethylamine) ไทรามีน
3. เฮเทอโรไซคลิกเอมีน (heterocyclic amine) ได้แก่ ฮิสตามีน (histamine) ทริปตามีน (tryptamine)

โดยส่วนใหญ่จะพบปริมาณไบโอเจนิกเอมีนมากในอาหารหมักเช่น เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ไวน์ และเบียร์ เป็นต้น (González de Llano, D.; Cuesta, P.; & Rodríguez, A. 1998: 270) ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของโปรตีนโดยกระบวนการโปรติโอไลติก (proteolytic) โดยเอนไซม์โปรติเอส (proteinase) จนได้เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่สุดคือกรดอะมิโนแต่ละชนิด จากนั้นกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะถูกเปลี่ยนเป็นไบโอเจนิกเอมีนด้วยปฏิกิริยาดีคาร์บอก

ซีเลชัน โดยมีเอนไซม์กรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลส (amino acid decarboxylase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์เช่น *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* และ *Pseudomonas species* เป็นต้น (Shalaby, A.R. 1996: 676) แสดงดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 การเกิดไบโอเจนิคเอมีนในอาหาร

ที่มา: Ruiz-Capillas, C.; & Jiménez-Colmenero, F. (2004). *Biogenic Amines in Meat and Meat Products*. p. 493.

สารไทรามินจัดเป็นสารในกลุ่มไบโอเจนิคเอมีน ประเภทอะโรมาติกเอมีน โดยถูกสังเคราะห์ด้วยกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ พืชและสัตว์ โดยไทรามินเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนไทโรซีน ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนดีคาร์บอกซิเลส ที่มาจากจุลินทรีย์ (Komprda, T.; et al. 2008: 219) แสดงดังสมการที่ 1

2.2 อุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหาร

การเก็บรักษาอาหารสำคัญมาก เนื่องจากอุณหภูมิในการเก็บมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งนี้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและดีคาร์บอกซิเลส มีสัมพันธ์กับการสร้างไบโอเจนิคเอมีน (Diaz-Cinco, M.E.; et al. 1992: 355-365) ขึ้นในอาหาร การเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่ำจะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดไบโอเจนิคเอมีนอยู่ในช่วง 20-37 องศาเซลเซียส ดังนั้นปริมาณของไบโอเจนิคเอมีนจะลดลงเมื่อเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส นอกจากนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อ *Carnobacterium divergens* สามารถสร้างไทรามีนมากกว่าที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (Masson, F.; et al. 1997: 36)

2.3 ค่าความเป็นกรดเบส

ความเป็นกรดเบสของระบบจัดเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเกิดไบโอเจนิคเอมีน เนื่องจากเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส ทำงานได้ในช่วง pH 2.5-7 และทำงานได้ดีที่ความเป็นกรดอ่อน คือช่วง pH 4.0-5.5 (ศิริรัตน์ ต้นไสว. 2547: 23; อ้างอิงจาก ยาวลักษณ์. 2543) เช่น พบว่าในปลาแมคเคอเรล จะมีปริมาณไทรามีนสูงในช่วงกรดที่ pH 3.77 และในเนยแข็งมีการสร้างไทรามีนที่สภาพกรด pH 5.0 (Silla Santos, M.H. 1996: 219) เป็นต้น

2.4 ความเข้มข้นของเกลือ

โดยทั่วไปในการประกอบอาหารจะใช้เกลือ ซึ่งเกลือที่ใช้ทั่วไปคือ เกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส ทำให้เกิดการยับยั้งหรือการกระตุ้นการสร้างไบโอเจนิคเอมีน พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3 และ 10% เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มทนเค็ม (halotolerant bacteria) สามารถสร้างไทรามีนได้สูงถึง 1,000 ppm และในช่วงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5-10% มีผลกระตุ้นการสร้างไบโอเจนิคเอมีน แต่ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 20% กลับพบว่าไปยับยั้งการสร้างไบโอเจนิคเอมีน (Hernández-Herrero, M.M.; et al. 1999: 509)

2.5 น้ำตาลกลูโคส

จุลินทรีย์ต้องการกลูโคสหรือคาร์โบไฮเดรตจำนวนหนึ่งสำหรับใช้เป็นพลังงานในกระบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ เพื่อการเจริญและยังมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของดีคาร์บอกซิเลส โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 0.5-2 % แต่ถ้าความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่า

3 % มีผลไปยับยั้งการสร้างไบโอเจนิกเอมีน (ศิริรัตน์ ต้นไสว. 2547: 23; อ้างอิงจาก Halász, A.; et al. 1994)

2.6 ปริมาณออกซิเจน

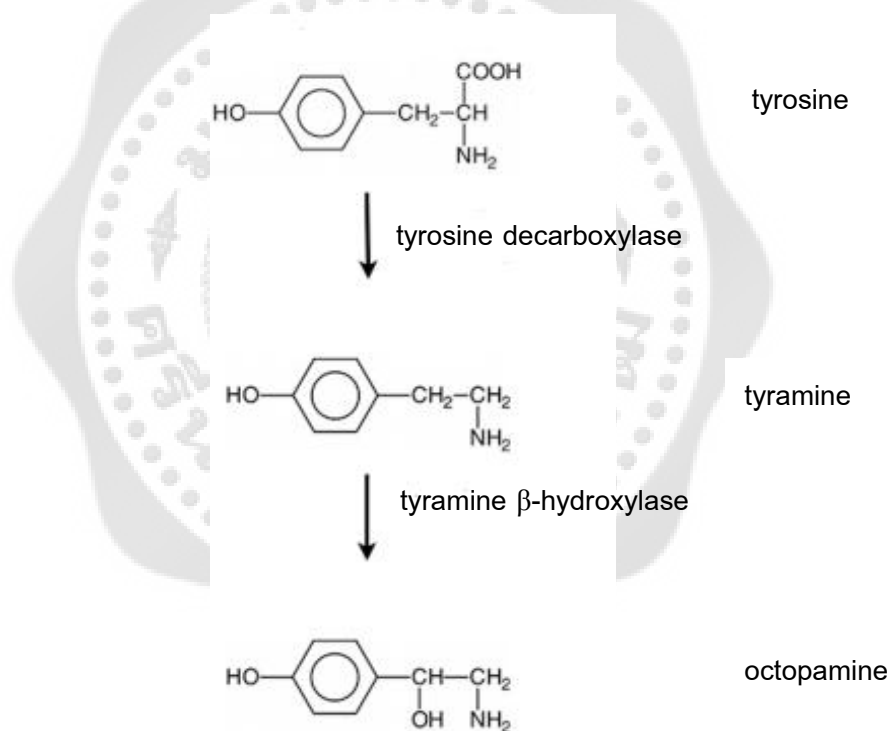
ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการสร้างไบโอเจนิกเอมีนเช่น *Enterobacter cloaceae* ในสภาวะไร้ออกซิเจนมีการสร้างพูทรีซินน้อยกว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน และ *Lactobacillus curvatus* ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะไม่มีการสร้างฮีสตามีนเนื่องจากออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส แต่ออกซิเจนจะส่งผลเล็กน้อยต่อการสร้างไทรามิน ฟีนิลเอทิลลามีนและพูทรีซิน (ศิริรัตน์ ต้นไสว. 2547: 26; อ้างอิงจาก Halász, A.; et al. 1994)

ดังนั้นชนิดและปริมาณของไบโอเจนิกเอมีนที่พบในอาหารมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น และยังขึ้นกับหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เพื่อสังเคราะห์เอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส และสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส ซึ่งได้แก่ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหาร ค่าความเป็นกรดเบส ความเข้มข้นของเกลือโซเดียม น้ำตาลกลูโคสและปริมาณออกซิเจน เป็นต้น

ความเป็นพิษของไทรามิน

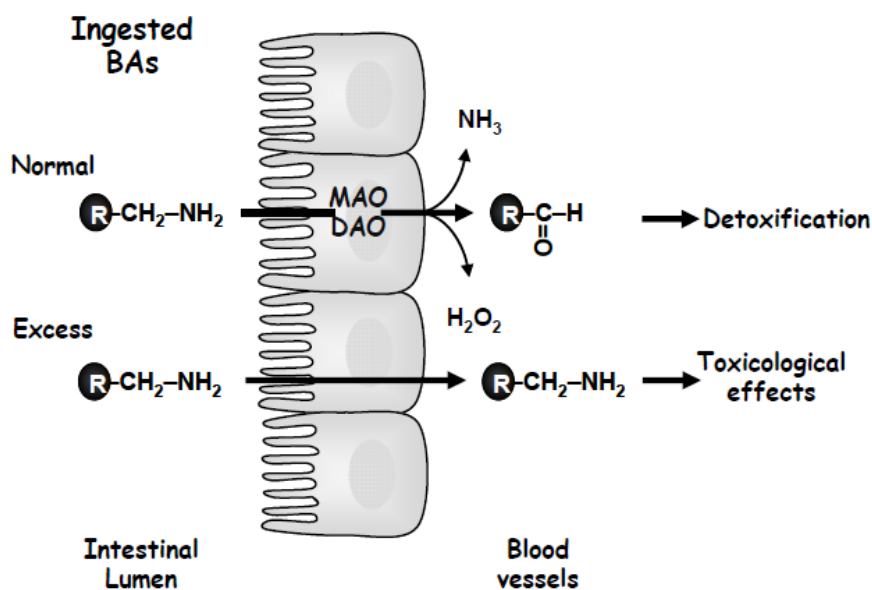
ไทรามินจัดเป็นสารที่มีความสำคัญในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยสังเคราะห์ขึ้นในบริเวณสมองและเนื้อเยื่อประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous tissues) ซึ่งปริมาณน้อยมากในระดับ 0.1–100 ng/g (Luliński, P.; et al. 2014: 155) โดยภายในระบบประสาทไทรามินสังเคราะห์จากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนไทโรซีน ซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ไทโรซีนดีคาร์บอกซิเลส และถูกกำจัดในกระบวนการกำจัดสารพิษ (detoxification) ด้วยเอนไซม์ไทรามินเบต้าไฮดรอกซิเลส (tyramine β -hydroxylase) เปลี่ยนเป็นออกโตพามีน (octopamine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ที่สำคัญ ดังภาพประกอบ 2 นอกจากนี้ยังพบไทรามินในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอีกด้วย (Lange, A.B. 2009: 19) โดยไทรามินมีผลต่อการทำงานของอวัยวะภายในร่างกายได้แก่ การหดตัวของหลอดเลือด เพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจ กระตุ้นการหลั่งของน้ำตาลและน้ำลาย เพิ่มระดับน้ำตาลในกระแสเลือด และการหลั่งนอร์อะดรีนาลีนจากระบบประสาทอัตโนมัติ เป็นต้น (Shalaby, A.R. 1996: 676)

โดยปกติไทรามีนไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย แต่ถ้าหากรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนไทรามีนสูงเข้าสู่ร่างกาย สารนี้จะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะอย่างรวดเร็ว โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส หรือเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดส โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะเร่งปฏิกิริยาดีอะมีเนชันของสารประกอบเอมีน (ประเภทโมโน ได และพอลิเอมีน) ทำให้ไทรามีนเปลี่ยนเป็นสารอื่นที่มีความเป็นพิษลดลง และถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ แต่ถ้าหากร่างกายได้รับปริมาณไทรามีนที่มากเกินไปจะส่งผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายทั้งต่อระบบประสาทและระบบไหลเวียนโลหิต เนื่องจากร่างกายไม่สามารถกำจัดออกได้หมด และทำให้เกิดการสะสมของไทรามีนในร่างกาย ซึ่งก่อให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูง มีอาการอาเจียน เจ็บหน้าอก กล้ามเนื้อกระตุก ปวดศีรษะอย่างรุนแรง (ไมเกรน) เส้นเลือดในสมองแตก หรืออาจถึงขั้นเสียชีวิต (Shalaby, A.R. 1996: 677-678) ดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 2 การสังเคราะห์และการกำจัดของไทรามีนในระบบประสาท

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Lange, A.B. (2009). *Tyramine: From octopamine precursor to neuroactive chemical in insects*. p. 19.



ภาพประกอบ 3 กระบวนการกำจัดและการเกิดพิษของไทรามีน

ที่มา: Ladero, V.; et al. (2010). *Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines*.

p. 11.

ความเป็นพิษของไทรามีนขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น ปริมาณไทรามีนที่ได้รับ ความต้านทานและกระบวนการกำจัดพิษของสารเอมีนของแต่ละบุคคล (ศิริรัตน์ ต้นไสว. 2547: 12) เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับผู้ป่วยที่มีอาการทางจิตแบบซึมเศร้าต้องได้รับการรักษาด้วยยาโมโนเอมีนออกซิเดสอินฮิบิเตอร์ (monoamine oxidase inhibitor, MAOI) ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส ทำให้ร่างกายไม่สามารถกำจัดไทรามีนออกได้ ส่งผลทำให้มีการสะสมของไทรามีนในปริมาณสูง ซึ่งก่อให้เกิดอาการปวดศีรษะรุนแรงและความดันโลหิตสูง ดังนั้นผู้ป่วยที่ได้รับยา MAOI ควรหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารที่มีปริมาณไทรามีนสูง (Ladero, V.; et al. 2010: 14-15)

ดังนั้นมนุษย์จึงได้ตระหนักถึงความเป็นพิษของไทรามีน จึงได้มีการกำหนดระดับความเป็นพิษของไทรามีนขึ้น แต่การกำหนดขนาดและปริมาณของไทรามีนที่ทำให้เกิดพิษหรืออันตรายต่อร่างกายเป็นสิ่งที่กำหนดได้ยาก เนื่องจากมีหลายๆ ปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องโดยเฉพาะความต้านทานต่อพิษของแต่ละบุคคลและชนิดของไบโอเจนิคเอมีน ตัวอย่างเช่น

1. ไทราซีนปริมาณ 100-800 ppm มีความเป็นพิษต่อร่างกาย และหากได้รับไทราซีนปริมาณ 6 มิลลิกรัมต่อมื้ออาหาร ทำให้เกิดความดันโลหิตสูง ปวดศีรษะ หน้าแดง ปวดท้องอย่างกะทันหัน และมีความเป็นพิษต่อผู้ที่รับประทานยา MAOI (Silla Santos, M.H. 1996: 224)
2. ไทราซีนปริมาณมากกว่า 100 ppm ทำให้เกิดอาการไมเกรน และที่ปริมาณ 1080 ppm ก่อให้เกิดความเป็นพิษคือทำให้เกิดอาการบวมตามผิวหนัง (Shalaby, A.R. 1996: 686)
3. ไทราซีนปริมาณ 25-40 ppm ในไวน์ทำให้เกิดอาการไมเกรนและความดันโลหิตสูง (Soufleros, E.; Barrios, M.L.; & Bertrand, A. 1998: 266)

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าไทราซีนสามารถพบทั่วไปในพืช สัตว์และมนุษย์ โดยเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม และเป็นสารที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งพบในปริมาณน้อยมาก แต่ส่วนใหญ่จะพบปริมาณไทราซีนสูงในอาหารประเภทหมัก เช่น เนื้อสัตว์หมัก เนย ชีส ไข่กรอบแห้ง เบียร์ ไวน์แดง ซอสถั่วเหลือง กะหล่ำปลีดองและซ็อกโกแลต เป็นต้น โดยตัวอย่างงานวิจัยการวิเคราะห์ปริมาณไทราซีนในอาหารประเภทต่างๆ แสดงในตาราง 1

ตาราง 1 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณไทราซีนในตัวอย่างอาหารบางชนิด

ประเภทอาหาร	ปริมาณไทราซีนที่พบ โดยเฉลี่ย (mg/kg)
ผัก	
ผักกาดหอม	1
ผักขม	8
มันฝรั่ง	7
หัวหอม	2
มะเขือเทศ (เข้มขึ้น)	10.4
ซอสมะเขือเทศ	33.6
กะหล่ำปลีดอง	174
ปลา	
ปลาสด	61.8
ปลาที่ผ่านการเก็บไว้ 2 วัน	198
น้ำปลา	-

ตาราง 1 (ต่อ)

ประเภทอาหาร	ปริมาณไตรามีนที่พบโดยเฉลี่ย (mg/kg)
เครื่องดื่มที่ผ่านกระบวนการหมัก	
ไวน์	19
ไวน์แดง	18.2
ไวน์ขาว	2.3
เบียร์	10.5
ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก	
ไส้กรอกหมัก (แห้ง)	273
แฮม (แห้ง)	104
เนื้อหมู (แห้ง)	295
เนื้อหมูสด	38
ผลิตภัณฑ์นม	
นมสด	-
โยเกิร์ต	-
ชีส (จากนมแพะดิบ)	324.6
ชีส (จากนมแพะที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์)	10.9

ที่มา: ดัดแปลงจาก : Ladero, V.; et al. (2010). *Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines*. pp. 7-8.

ถ้าหากมนุษย์ได้รับสารไตรามีนปริมาณสูงเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีปริมาณไตรามีนสูง จะทำให้เกิดการสะสมของไตรามีนในร่างกาย และส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายทั้งต่อระบบประสาทและระบบไหลเวียนโลหิต ดังนั้นมนุษย์ควรหลีกเลี่ยงการบริโภคอาหารอาทิเช่น เนื้อสัตว์หมัก เนย ชีส ไส้กรอกหมัก เบียร์ ไวน์ ซอสถั่วเหลือง และกะหล่ำปลีดอง

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาและวิเคราะห์หาปริมาณไตรามีน โดยตัวอย่างที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้คือกระชายดำ เนื่องจากในปัจจุบันมนุษย์นิยมบริโภคพืชสมุนไพรในหลากหลายรูปแบบ เช่น น้ำสมุนไพร ชาสมุนไพร ผลิตภัณฑ์แคปซูล ไวน์ และลูกกลอน เป็นต้น และจากการค้นคว้า

งานวิจัยก่อนหน้านี้ยังไม่พบการวิเคราะห์หาปริมาณไทรามีนในตัวอย่างพืชสมุนไพรและจากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างพืชสมุนไพร โดยเลือกกลุ่มพืชสมุนไพรที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ แห้ว (แอม) กระชายดำ หัวข้าวเย็นเหนือ นางพญาเสือโคร่ง ฝรั่งเสนา สะค้านแดง สะค้านหน้าผา เครืองูเห่า ดีปลากั้ง และฮ่อสะพายควาย พบว่าตัวอย่างกระชายดำมีปริมาณไทรามีนมากที่สุดคือ 1.96 ppm (Nakthong, P.; & Muangthai, P. 2015: 370) ถึงแม้ว่าปริมาณของไทรามีนที่พบจะมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อร่างกาย แต่สมุนไพรก็คือยาชนิดหนึ่ง หากรับประทานทานติดต่อกันเป็นเวลานานในลักษณะเป็นอาหารเสริมอาจให้โทษได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาและวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ

กระชายดำ (นุศรา ดาวโรจน์. 2550: 1-3)

ในปัจจุบันกระชายดำจัดเป็นพืชสมุนไพรไทยที่นิยมบริโภคอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีสรรพคุณทางยานานับประการ จนได้ชื่อว่าในวงการแพทย์แผนไทยว่าเป็น “โสมไทย” เนื่องจากกระชายดำกับโสมมีความคล้ายคลึงกันหลายอย่าง เช่น สรรพคุณในการบำรุงกำลังและเสริมสมรรถภาพทางเพศ ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของสมุนไพรทั้งสองชนิด นอกจากนี้ทั้งกระชายดำและโสมต่างก็เป็นพืชที่มีส่วนสะสมอาหารที่ใช้เป็นยาอยู่ใต้ดินเหมือนกัน โดยแหล่งที่พบจะพบในพื้นที่บริเวณป่าภูเขา ในประเทศไทยพบที่จังหวัดเลย เพชรบูรณ์ พิษณุโลก น่าน เชียงใหม่ เชียงราย กาญจนบุรี และตาก

ลักษณะทั่วไปของกระชายดำ

ชื่อภาษาอังกฤษ : Black Galingale หรือ Black ginger

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker

ชื่อสามัญ : *Belamcanda chimensis*

วงศ์ : Zingiberaceae

ส่วนที่ใช้ประโยชน์ คือ ส่วนเหง้า ที่นำมาแปรรูปหลากหลายรูปแบบเช่น ชาขง ลูกกลอน ยาแดงและไวน์ เป็นต้น โดยพบว่าการทำในรูปของไวน์กระชายดำได้รับความนิยมมากที่สุด

สารสำคัญ : น้ำมันหอมระเหย และสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของกระชายดำมีฤทธิ์รักษาโรคกระเพาะอาหาร โดยการเพิ่มการหลั่งสารเมือกในกระเพาะอาหาร (Rujjanawate, C.; et al. 2005) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัย

พบว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ในเหง้ากระชายดำ ได้แก่ 5,7,4'-ไตรเมทอกซีฟลาโวน (5,7,4'-trimethoxyflavone) และ 5,7,3',4'-เตตระเมทอกซีฟลาโวน (5,7,3',4'-tetramethoxy flavone) มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่เป็นสาเหตุของไข้มาลาเรียอีกด้วย (Yenjai, C.; et al. 2004)

สรรพคุณของกระชายดำ

เหง้ากระชายดำ ช่วยเพิ่มกำลังทางเพศและเป็นยาบำรุงกำลัง แก้อาการปากเปื่อย ปากเป็นแผล บำรุงเลือด บำรุงหัวใจ รักษาโรคความดันโลหิต แก้อาการท้องอืด แก้อาการท้องเฟ้อ แก้อาการท้องเดิน ช่วยขับปัสสาวะ ขับลม แก้อาการปวดเมื่อย แก้อาการโรคลำไส้ โรคระเคาะอาหาร และสตรีมาประจำเดือนไม่ปกติ นอกจากนี้เมื่อนำมาผสมน้ำผึ้งเป็นยาอายุวัฒนะอีกด้วย

วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาและวิเคราะห์หาปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งการเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากสารรบกวนในตัวอย่างสามารถทำให้คอลัมน์และระบบอุดตันได้ จึงต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่ดีและถูกต้อง โดยขั้นแรก คือการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรนั้นให้มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด สมบัติของสารที่มีความคงตัว ทนต่อความร้อนมากน้อยเพียงใด และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ทั้งนี้แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน โดยวิธีการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรที่นิยมใช้มี 3 วิธี ดังนี้

1. วิธีการสกัดแบบสกัดเย็น (cold extraction)

การสกัดแบบสกัดเย็น คือการหมัก (maceration extraction) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด โดยทำการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารในพืชสมุนไพรที่ต้องการ แล้วนำพืชสมุนไพรไปแช่ไว้ในตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด แช่ไว้เป็นเวลานาน 2-4 วัน หรือตามกำหนดในเอกสารตำรับหรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการออกมาหมด หลังจากนั้นจึงกรองแยกกากสมุนไพรออกจากตัวทำละลาย และปรับปริมาตรสารสกัดตามต้องการ วิธีนี้มีข้อดีคือสารสกัดจะไม่ถูกความร้อนทำให้โอกาสในการสลายตัวของสารสกัดลดลง ข้อเสียของวิธีนี้คือจะสิ้นเปลืองทั้งตัวทำละลายและเวลา

2. วิธีการสกัดแบบสกัดร้อน (hot extraction) ได้แก่

2.1 การต้ม

เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยสมบัติการละลายของสารในตัวทำละลาย หรือการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ต้องการออกจากของผสมด้วยการใช้ความร้อน โดยการนำไปต้มเพื่อให้สารที่เราต้องการละลายออกมาในตัวทำละลายซึ่งที่นิยมใช้คือน้ำ ข้อดีของวิธีนี้คือง่าย และใช้เวลาในการสกัดน้อย แต่ข้อเสียคือไม่เหมาะสำหรับสารที่ระเหยได้ง่าย

2.2 การกลั่น

เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร และเนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัด หลักการคือเป็นการแยกสารที่ระเหยได้ ไม่ละลายน้ำและไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำ ออกจากสารที่ระเหยยากหรือของผสม โดยอาศัยหลักการระเหยกลายเป็นไอและควบแน่นของน้ำ โดยไอน้ำจะเป็นตัวพาและแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช เพื่อเข้าไปแยก "น้ำมันหอมระเหย" ออกจากพืช โดยการให้ความร้อนจะทำให้สารละลายออกมากลายเป็นไอที่ผ่านไปตามท่อซึ่งจะถูกทำให้เย็นตัวลงเปลี่ยนสถานะเป็นของเหลว ซึ่งของเหลวที่ได้จะแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นหนึ่งเป็นน้ำ และอีกชั้นหนึ่งเป็นสารที่ต้องการ โดยสามารถแยกออกจากกันโดยใช้กรวยแยก ซึ่งวิธีการกลั่นมีหลายวิธีเช่น การกลั่นด้วยน้ำร้อน การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ และการกลั่นด้วยไอน้ำ เป็นต้น

2.3 การสกัดแบบซอล์กเลท (soxhlet extraction)

เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่นเข้าช่วย โดยตัวทำละลายจะต้องมีจุดเดือดต่ำเมื่อระเหยจะนำสารจากพืชสมุนไพรไปด้วย จากนั้นเมื่อถูกความเย็นก็จะกลั่นตัวลงในหลอดใส่ตัวอย่าง (extraction chamber) ที่บรรจุหลอดกระดาษกรองสำหรับการสกัด (thimble) ซึ่งใส่ตัวอย่างสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายในหลอดใส่ตัวอย่างสูงขึ้นถึงระดับกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับไปในขวดกักกลมด้วยวิธีกาลักน้ำ ตัวทำละลายก็จะระเหยขึ้นแล้วกลั่นตัวกลับมาเป็นตัวทำละลายสกัดสารใหม่วนเวียนไป ข้อเสียของวิธีนี้คือเวลาที่ใช้ในการสกัดนานและไม่เหมาะกับสารสกัดที่ระเหยง่าย ส่วนข้อดีของวิธีนี้คือเหมาะสำหรับการสกัดสารที่ทนความร้อน

3. วิธีการสกัดโดยอาศัยตัวเร่ง (accelerated extraction)

คือการสกัดด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic extraction) เป็นการวิธีการสกัดโดยใช้เครื่องที่มีคลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราโซนิก ร่วมกับตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยนำภาชนะที่บรรจุตัวอย่างและตัวทำละลายวางในเครื่องอัลตราโซนิก เครื่องมีดังก่อจะปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวพาซึ่งในที่นี้คือตัวทำละลาย โดยคลื่นเสียงความถี่สูงจะไปรบกวนและเขย่าตัวทำละลายทำให้เกิดการสั่นของโมเลกุลตัวทำละลาย ทำให้สารที่ต้องการละลายออกมาอยู่ในตัวทำละลาย ข้อดีของวิธีนี้คือง่ายและใช้เวลาในการสกัดน้อยมาก แต่มีข้อเสียคือต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง โดยประสิทธิภาพการสกัดขึ้นกับการกำหนดความถี่ของคลื่นเสียงที่ใช้ และเวลาที่ใช้ในการสกัดให้เหมาะสม รวมทั้งชนิดของทำละลายที่เหมาะสม

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีการสกัดด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารจากพืช ทำได้ง่ายและใช้เวลาในการสกัดน้อย โดยตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวกับการสกัดสารสำคัญจากแหล่งต่างๆ โดยใช้วิธีการสกัดด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงแสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้วิธีการสกัดด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง

ผู้วิเคราะห์	ตัวอย่าง	สารสำคัญ	ตัวทำละลาย	เวลา
Jianyong, W. et al.	รากโสม	saponins	บิวทานอล	1-2 ชั่วโมง
Rostagno, M.A. et al.	ถั่วเหลือง	isoflavones	เอทานอล (50% v/v)	20 นาที
Schinor, E.C. et al.	<i>Chresta</i> <i>scapigera</i>	triterpenoids	เมทานอล	30 นาที
Tabaraki, R. & Nateghi, A.	รำข้าว	polyphenols/ antioxidants	เอทานอล (65-67% v/v)	40-45 นาที

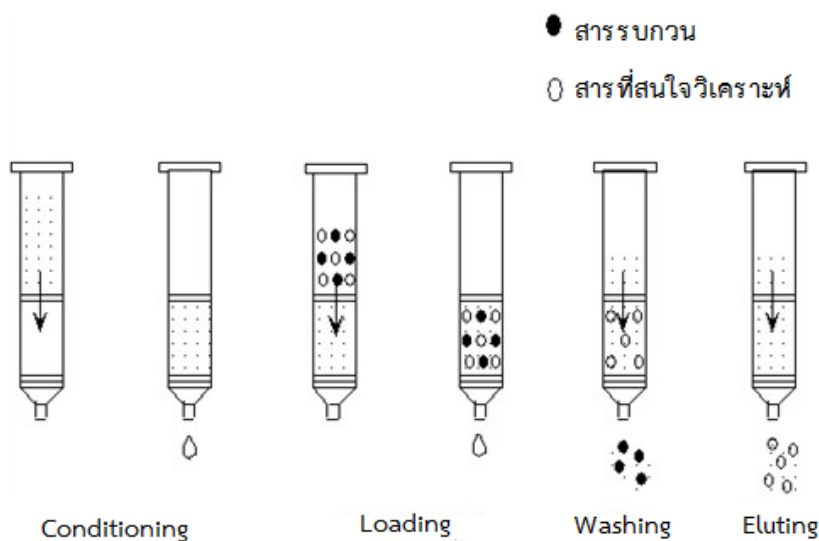
ที่มา: ดัดแปลงจาก : ดวงกมล เรือนงาม. (2557). การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ. หน้า 127.

ซึ่งพบว่าสารสกัดที่ได้จากวิธีดังกล่าวยังไม่บริสุทธิ์ จึงควรนำสารสกัดที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม โดยในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี เพื่อใช้เป็นตัวดูดซับแบบใหม่ในเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง ก่อนทำการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยขอกกล่าวถึงหลักการของเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งนี้พอสังเขป

เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง

หลักการของเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง มีหลักการคล้ายกับเทคนิคการสกัดด้วยของเหลว liquid-liquid extraction (LLE) ตรงที่ใช้หลักการสกัดแบบการกระจายตัว (partition) เหมือนกัน โดยที่เทคนิคการสกัดด้วยของเหลว เกิดแบ่งกระจายตัวระหว่างของเหลวกับของเหลว แต่เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง จะเกิดการกระจายตัวของสารระหว่างของแข็ง (ตัวดูดซับ) กับของเหลวหรือตัวทำละลาย และสามารถแยกสารที่สนใจออกจากสารละลายบนตัวดูดซับ โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการชะสารที่สนใจออกจากตัวดูดซับได้ (Baker, S. 1991) ซึ่งขั้นตอนของเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน (แสดงดังภาพประกอบ 4) ดังนี้

1. การเตรียมตัวดูดซับ (conditioning) คือ เป็นการนำตัวดูดซับบรรจุอยู่ในภาชนะและเติมตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อเตรียมตัวดูดซับให้พร้อมใช้งาน
2. การนำสารตัวอย่างลงในภาชนะ (loading) คือ เป็นการใส่สารตัวอย่างลงไปเพื่อให้สารที่สนใจหรือสารรบกวนบางชนิดจะเกิดการดูดซับบนพื้นผิวของตัวดูดซับ โดยอาศัยแรงช่วยจากระบบความดันสุญญากาศหรือใช้ปั๊ม
3. การล้าง (washing) คือ เป็นการล้างเพื่อกำจัดสิ่งรบกวนที่อาจเกิดการดูดซับบนพื้นผิวของตัวดูดซับออกมา โดยตัวทำละลายที่ใช้ต้องมีความแรงไอออนิกไม่มากจนทำให้สารที่เราสนใจถูกชะออกมาจากตัวดูดซับ
4. การชะสาร (eluting) คือ การชะสารที่สนใจออกจากตัวดูดซับ โดยเติมตัวทำละลายที่ใช้ในการชะจะต้องมีความแรงไอออนิกที่มากพอที่จะดึงเอาสารที่เราสนใจที่จับอยู่กับตัวดูดซับให้หลุดออกมา เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป



ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนของเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง

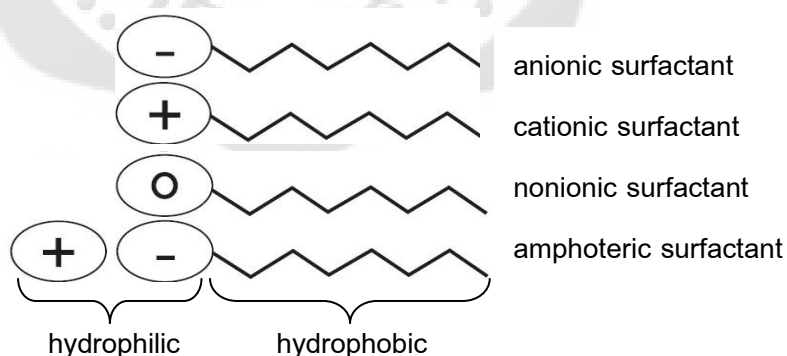
ที่มา : *Partitioning (Extractions): Solid-Phase Extraction sequence*. n.d.: online.

ข้อดีของการใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง

- ใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อย
- ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ (preconcentration)
- ช่วยกำจัดสารรบกวนออก เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์
- ประหยัดเวลาเพราะมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้อยและใช้ระบบแบบอัตโนมัติได้
- ให้ค่าร้อยละการกลับคืน และความแม่นยำสูง เพราะมีการถ่ายเทสารน้อยครั้ง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง โดยทำการพัฒนาให้ตัวดูดซับมีพื้นผิวชนิดใหม่เป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งการเตรียมสารที่ตัวดูดซับที่มีสารลดแรงตึงผิวเคลือบที่ผิวหน้า นั้นเป็นการประยุกต์ใช้ระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้การแยกสารไทรามีนออกจากสารรบกวน โดยสารลดแรงตึงผิว (surfactant) คือสารประกอบอินทรีย์ที่เมื่อละลายน้ำแล้วจะช่วยลดแรงตึงผิวของน้ำ โดยโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวนั้นจะประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic) และส่วนไม่มีขั้ว (hydrophobic) ในโมเลกุลเดียวกัน โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวสามารถแบ่งได้ออกเป็น 4 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี ซึ่งแสดงดังภาพประกอบ 5 ดังนี้ (Laurier, L.S. 2000: 5-6)

1. สารลดแรงตึงผิวชนิดไอออนลบ (anionic surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่เมื่อละลายน้ำแล้วส่วนหัวจะมีประจุลบ ส่วนมากแสดงอยู่ในรูป คาร์บอกซิเลต ซัลเฟต ซัลโฟเนตหรือฟอสเฟต ตัวอย่างเช่น โซเดียมสเตียเรท (sodium stearate) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate หรือ SDS) และโซเดียมโดเดซิลเบนซีนซัลโฟเนต (sodium dodecyl benzene sulfonate)
2. สารลดแรงตึงผิวชนิดไอออนบวก (cationic surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่เมื่อละลายน้ำแล้วส่วนหัวจะมีประจุบวกเช่น แอมโมเนียมประเภทจตุรภูมิ (quaternary ammonium) ตัวอย่างเช่น ไตรเมทิลโดเดซิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (trimethyl dodecylammonium chloride) และ เซทิลไตรเอทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyltriethylammonium bromide หรือ CTAB) เป็นต้น
3. สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (nonionic surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่เมื่อละลายน้ำ โมเลกุลจะไม่มีประจุ ส่วนมากเป็นพอลิอีเทอร์หรือพอลิไฮดรอกซิล ตัวอย่างเช่น พอลิเอทิลีนแอลกอฮอล์ (polyoxyethylene alcohol) และไตรตัน เอกซ์ 100 (triton X-100)
4. สารลดแรงตึงผิวชนิดแอมโฟเทอริก (amphoteric surfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและลบในโมเลกุลเดียวกัน โดยจะแสดงคุณสมบัติประเภทใดขึ้นอยู่กับสภาพความเป็นกรด-ด่างของสภาวะแวดล้อม ถ้าสภาวะแวดล้อมเป็นด่าง ($\text{pH} > 7$) ประจุไฟฟ้าของส่วนที่มีขั้วจะให้ประจุลบ ถ้าสภาวะแวดล้อมเป็นกรด ($\text{pH} < 7$) ประจุไฟฟ้าของส่วนที่มีขั้วจะให้ประจุบวก และในสภาวะที่เป็นกลางจะไม่เกิดการให้ประจุไฟฟ้าของส่วนที่มีขั้ว ตัวอย่างเช่น โดเดซิล เบทาอีน (dodecyl betaine) และลารามิโดโพรพิล เบทาอีน (lauramidopropyl betaine) เป็นต้น

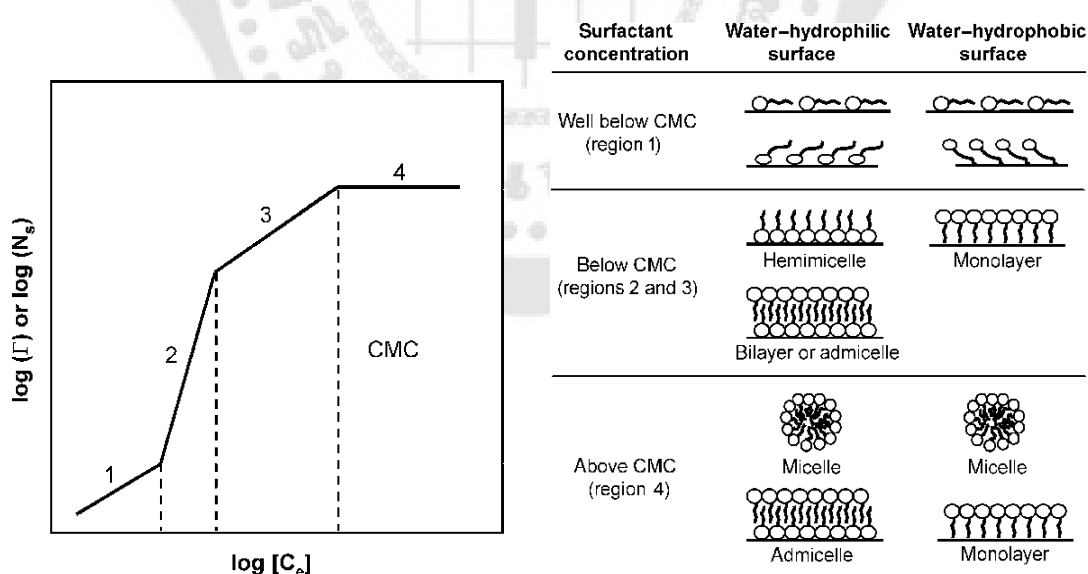


ภาพประกอบ 5 ประเภทของสารลดแรงตึงผิว

ที่มา: ดัดแปลงจาก Som, I.; Bhatia, K.; & Mohd, Y. (2012). *Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery*. p. 4.

กลไกการเกิดการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวบนตัวดูดซับ

การดูดซับของสารลดแรงตึงผิวบนตัวดูดซับสามารถเกิดขึ้นได้เอง (self-assembly) โดยอัตราการกระจายระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับตัวดูดซับนั้นมีหลายแบบได้แก่ แรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) แรงดึงดูดไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และแรงแผ่กระจาย (dispersion forces) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวและตัวดูดซับ โดยการรวมตัวกันของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวบนผิวตัวดูดซับนั้นเกิดได้หลายรูปแบบเช่น แบบชั้นเดียว (monolayer) แบบ 2 ชั้น (bilayer) และแบบไมเซลล์ (micelle) โดยทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งแสดงแบบจำลองการเกิดการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวบนตัวดูดซับในภาพประกอบ 6 ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ขอบเขต ดังนี้ ขอบเขตที่ 1 ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวน้อยกว่าค่า critical micelle concentration (CMC) มาก ซึ่งค่า CMC หมายถึงค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่ทำให้ก่อตัวในรูปแบบของไมเซลล์ จึงเกิดการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวบนตัวดูดซับน้อย ส่วนขอบเขตที่ 2 และ 3 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (น้อยกว่า CMC) จะเกิดได้ 2 แบบคือ แบบชั้นเดียว หรือเฮมิไมเซลล์ (hemimicelle) และแบบ 2 ชั้น หรือแอดไมเซลล์ (admicelle) ส่วนขอบเขตที่ 4 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวจนถึงจุด CMC หรือมากกว่า จะเกิดรูปแบบเป็นไมเซลล์ (Richard, J.F. 2006: 39-43)



ภาพประกอบ 6 แบบจำลองการเกิดการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวบนสารดูดซับ

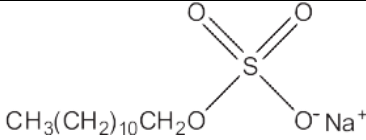
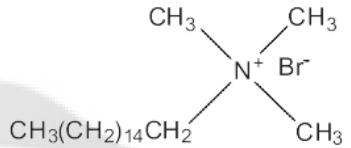
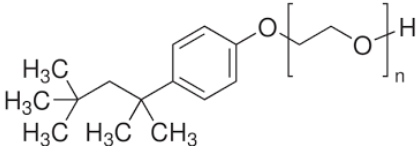
ที่มา: Richard, J.F. (2006). *Chemistry and Technology of Surfactants*. p. 41.

ตาราง 3 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี

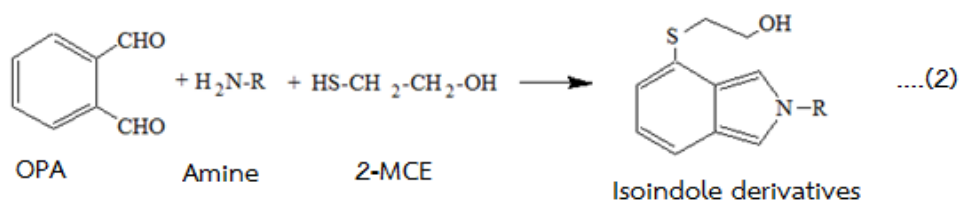
authors	sorbent	surfactant	analyte	sample
Hosseini, T. et al., 2013	alumina-coated magnetite NPs	triton X-114	Cr(III) and Cr(VI)	water and soil
Alireza, A. & Bahram, M., 2014	alumina	SDS	Ni, Pb, Cu and Zn ions	rice seed, apple juice, lettuce and tap water
Prapha, A. & Rodjana, B., 2014	- alumina - silica and zeolite	- SDS - CTAB	carbamate pesticides	water
Zhang, F. et al., 2015	barium sulfate- coated magnetite particles	SDS	trimethoprim	water

จากตาราง 3 และจากการค้นคว้างานวิจัยอื่นๆ พบว่ายังไม่มีมีการประยุกต์ใช้การเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟีกับสารไพราซีน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจนำเทคนิคดังกล่าวมาพัฒนาในเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง โดยทำการศึกษาชนิดของสารลดแรงตึงผิว 3 ชนิดได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ และไตรตัน เอ็กซ์ 100 ซึ่งแสดงดังตาราง 4 โดยทำการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดดูดซับบนผิวของตัวดูดซับต่างชนิด โดยตัวดูดซับที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้คือออกตะเดคซิลไซเลนและอะลูมินา แล้วนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง เพื่อหาตัวดูดซับที่มีความเหมาะสมที่สุดในการแยกไพราซีนออกจากสารรบกวนในตัวอย่างกระชายดำ

ตาราง 4 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้

สารลดแรงตึงผิว	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	CMC (mM) ที่ 25 °C
โซเดียมโดเดซิล ซัลเฟต	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$		8.2
เซทิลไตรเมทิล แอมโมเนียม	$\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr}$		0.9
โพลีเมต ไตรตัน เอกซ์ 100	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ (n = 9-10)		0.22-0.24

เมื่อผ่านการขั้นตอนการสกัดและการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมแล้ว จะนำสารละลายที่เตรียมได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไทรามีด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้นก่อนฉีดสารเข้าสู่เครื่องจะต้องผ่านขั้นตอนการทำอนุพันธ์ระหว่างไทรามีกับออร์โท-ฟทาลไดอัลดีไฮด์ (o-phthalaldehyde, OPA) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation reaction) ระหว่างหมู่เอมีนของไทรามีกับหมู่อัลดีไฮด์ของ OPA โดยใช้ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol, 2-MCE) ทำหน้าที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ โดยอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นคือไอโซอินโดล (isoindole derivatives) มีคุณสมบัติในการรวบรวม แสดงในสมการที่ 2 ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์และขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการเกิดอนุพันธ์น้อยมากเพียง 1 นาทีเท่านั้น (Amino Acid Analysis Overview. n.d.: online)



งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีน

ในปี ค.ศ. 1995 บัสโตและคณะ (Busto, O.; Guasch, J.; & Borrull, F. 1995: 309-317) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไบโอเจนิกเอมีนทั้งหมด 15 ชนิด ในตัวอย่างไวน์ ด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ระบบการเตรียมสารอนุพันธ์กับ OPA ก่อนทำการตรวจวัดแบบอัตโนมัติ ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง เพื่อกำจัดสารรบกวนและเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบชนิดของตัวดูดซับ 3 ชนิด คือ พีวีพี (PVP หรือ polyvinyl pyrrolidone), ไตรเมทิลแอมโมเนียม โพรพิล (trimethylammonium propyl) และออกตะเดคซิล-ไซเลน (C_{18}) นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ชะสารไบโอเจนิกเอมีนออกจากตัวดูดซับ ได้แก่ โซเดียมออกเทนซัลโฟเนต (sodium octanesulfonate) โซเดียมเดเคนซัลโฟเนต (sodium decanesulfonate) และโซเดียมโดเดเคนซัลโฟเนต (sodium dodecanesulfonate) จากผลการทดลองพบว่าตัวดูดซับที่เหมาะสมคือไตรเมทิลแอมโมเนียม โพรพิล และตัวทำละลายที่เหมาะสมคือโซเดียมเดเคนซัลโฟเนต โดยวิธีการที่นำเสนอสามารถแยกและให้ความไวในการตรวจวัดที่ดี (มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 20-90 ppm) โดยนำมาประยุกต์ใช้ตรวจวิเคราะห์ไบโอเจนิกเอมีนในตัวอย่างไวน์ได้ดี

ในปี ค.ศ. 1998 ลูร์ดและคณะ (Lourdes, A.; Angel, R.; & Miguel, V. 1998: 249-260) ได้พัฒนาการวิเคราะห์หาปริมาณไบโอเจนิกเอมีนทั้งหมด 10 ชนิด ในตัวอย่างไวน์ โดยใช้ระบบโพลินเจกชันร่วมกับแคปิลลารีเล็กโทรโฟเรซิส (flow injection-capillary electrophoresis, FI-CE) และทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบยูวี ทั้งนี้เพื่อให้การวิเคราะห์เกิดประสิทธิภาพในระบบโพลินเจกชัน จึงนำเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งมาใช้เป็นคอลัมน์ขนาดเล็ก (minicolumn) เพื่อทำการกำจัดสารรบกวนและเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบชนิดตัวดูดซับ 3 ชนิด ได้แก่ ออกตะเดคซิลไซเลน กรดเบนซีนซัลโฟนิก (benzenesulphonic acid) และกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) จากการทดลองพบว่าเลือกใช้ตัวดูดซับชนิดออกตะเดคซิลไซเลน ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับที่ดี และวิธีที่นำเสนอสามารถแยกและตรวจวัดสารไบโอเจนิกในตัวอย่างไวน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ พบค่าค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ในช่วง 0.05–0.1 ppm และใช้เวลาในการแยกสาร 15 นาที

ในปี ค.ศ. 2003 โซโตวและคณะ (Zotou, A.; et al. 2003: 429-439) ได้พัฒนาการวิเคราะห์หาปริมาณไบโอเจนิคเอมีนทั้งหมด 11 ชนิด ในตัวอย่างไวน์ โดยทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งเตรียมซึ่งเลือกใช้ออกตะเดคซิลไซเลนเป็นตัวดูดซับ และทำอนุพันธ์กับแดนซิลคลอไรด์ (dansyl chloride) เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สารมาตรฐานภายใน (internal standard) คือ 1,7-ไดอะมิโนเฮปแทน (1,7-diaminoheptane) คอลัมน์ชนิด C₁₈ (250 X 4 mm และ อนุภาคขนาด 5 µm) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยน้ำกับอะซิโตไนไตรล์ (ใช้โปรแกรมเกรเดียน) มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min ทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบยูวี (ที่ความยาวคลื่น 254 nm) ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 35 นาที ผลการทดลองพบว่าสามารถวิเคราะห์ไบโอเจนิคเอมีนในช่วง 0.025-3.0 ppm และร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) ของภายในวันเดียวกันและระหว่างวันพบในช่วง 0.4-5.7% และ 0.6-7.3% ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2004 พาสิโอโลโกสและคอนโตมินัส (Paleologos, E.K.; & Kontominas, M.G. 2004: 1289-1294) ได้เสนอการวิเคราะห์หาปริมาณไบโอเจนิคเอมีนทั้งหมด 10 ชนิด ในตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อปลาและไวน์ โดยเป็นครั้งแรกที่ใช้ระบบการวิเคราะห์แบบต่อเนื่อง (on-line) ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งเตรียมซึ่งเลือกใช้ออกตะเดคซิลไซเลน เป็นตัวดูดซับ และการทำอนุพันธ์กับแดนซิลคลอไรด์ รวมถึงการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบไมเซลล์ (micellar liquid chromatography) ทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบยูวี (ที่ความยาวคลื่น 254 nm) จากการทดลองพบว่าวิธีที่นำเสนอมีความไวสูงกว่า (มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.1 ppb) เมื่อเทียบกับการตรวจวัดทั้งแบบยูวีและฟลูออเรสเซนส์ในระบบการวิเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่อง (off-line) และมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9850-0.9998 และพบค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับในช่วง 94-106%.

ในปี ค.ศ. 2006 รูอิส จิเมเนสและลูเค ดี คลาโตร (Ruiz-Jiménez, J.; & Luque de Castro, M.D. 2006: 245-253) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิคเอมีนทั้งหมด 8 ชนิด ในตัวอย่างเนื้อปลาเนื้อไก่ เนื้อหมู และไส้กรอก โดยใช้ระบบโฟลอินเจกชันร่วมกับแคปิลลารีอิเล็กโตร-ฟอรีซิส ก่อนทำการวิเคราะห์จะต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเทคนิคเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งเตรียมซึ่งเลือกใช้ออกตะเดคซิลไซเลนเป็นตัวดูดซับ และการทำอนุพันธ์กับแดนซิลคลอไรด์ เพื่อนำไปฉีดเข้าระบบ FI-CE ทั้งนี้เพื่อให้ระบบมีความต่อเนื่องอย่างสมบูรณ์จึงใช้

เมมเบรนชนิดเพอเวพอเรชัน (pervaporation) เป็นตัวเชื่อมต่อระบบ (interface) โดยทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่านยอมให้สารที่สนใจวิเคราะห์ที่สามารถระเหยได้ผ่านไปยังระบบ CE ส่วนสารรบกวนจะถูกจับอยู่ในเมมเบรน และทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบยูวี (ที่ความยาวคลื่น 254 nm) จากการทดลองพบว่าวิธีที่นำเสนอมีความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่ดี (มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ในช่วง 0.2-0.6 ppm) และมีความแม่นยำที่ดี (ร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) ของภายในวันเดียวกันและระหว่างวันพบในช่วง 0.76-4.21% และ 1.12-4.78% ตามลำดับ)

ในปี ค.ศ. 2008 ชาราลามอสและคณะ (Charalampos, P.; et al. 2008: 1218–1224) ได้เสนอวิธีวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนทั้งหมด 9 ชนิด ในตัวอย่างไวน์ โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งเตรียมซึ่งเลือกใช้ออกตะเตดซิลไซเลนเป็นตัวดูดซับ และทำอนุพันธ์กับแดนซิลคลอไรด์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ (ค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้นและค่าความยาวคลื่นของการเปล่งแสงเท่ากับ 320 และ 523 nm ตามลำดับ) จากการทดลองพบว่าวิธีนี้มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่ดี (มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.18 ppm) และมีค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับมากกว่า 85 %

ในปี ค.ศ. 2009 เพนา แกลเลโกและคณะ (Peña-Gallego, A.; et al. 2009: 3398–3401) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนทั้งหมด 4 ชนิดคือฮีสตามีน พิวเทรสซีน ไทรามีนและคาตาเวอร์รีน ในตัวอย่างไวน์ โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง ซึ่งตัวดูดซับที่ใช้คือเรซินชนิด Oasis 96-well MCX มีคุณสมบัติ 2 แบบ คือแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange) และรีเวอร์สเฟส จากนั้นนำมาทำอนุพันธ์กับ 6-Aminoquinolyl-N-hydrosysuccinimidyl carbamate (AQC) เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ (ค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้นและค่าความยาวคลื่นของการเปล่งแสงเท่ากับ 250 และ 395 nm ตามลำดับ) จากการทดลองพบว่าวิธีนี้มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่ดี (มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.16 ppm)

ในปี ค.ศ. 2011 เทาและคณะ (Tao, T.; et al. 2011: 1203-1208) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไบโอเจนิกเอมีนทั้งหมด 7 ชนิด ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ (sufu) โดยทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติก (trichloroacetic acid) เข้มข้น 6% และทำอนุพันธ์กับ 4-คลอโร-3,5-ไดไนโตรเบนโซไตรฟลูออไรด์ (4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride) จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง ซึ่งตัวดูดซับที่ใช้คือเรซินชนิด Oasis MCX และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบยูวี (ที่ความยาวคลื่น 254 nm) จากการทดลองพบในช่วงความเป็นเส้นตรงมีค่า r^2 มากกว่า 0.9915 และมีค่าร้อยละการคืนกลับในช่วง 83.6-103.5% และวิธีที่นำเสนอมีความไวที่ดี (มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.016 ppm) และมีความแม่นยำที่ดี (ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) เท่ากับ 1.26-5.24%)

ในปี ค.ศ. 2012 ซากราทีนีและคณะ (Sagrati, G.; et al. 2012: 537-543) ได้เสนอวิธีใหม่สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไบโอเจนิกเอมีนทั้งหมด 8 ชนิด ในตัวอย่างปลา โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนทำอนุพันธ์ ซึ่งได้ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้น 5% และทำการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งซึ่งตัวดูดซับที่ใช้คือพอลิเมอร์ชนิด strata-X มีคุณสมบัติเป็นรีเวอร์สเฟส และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคแทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี (tandem mass spectrometry, MS/MS) โดยทำการเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ โดยการทำอนุพันธ์กับแดนซิลคลอไรด์ ซึ่งพบว่าวิธีที่นำเสนอมีความไวและความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ที่ดีกว่า

ในปี ค.ศ. 2013 ฮองหยางและคณะ (Hongyang, P.; et al. 2013: 115-118) ได้เสนอวิธีใหม่สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไบโอเจนิกเอมีนทั้งหมด 5 ชนิด ในตัวอย่างชีส โดยทำการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง ซึ่งตัวดูดซับที่ใช้คือ nanofiber (NF-SPE) และทำอนุพันธ์กับ OPA แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ (ค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้นและค่าความยาวคลื่นของการเปล่งแสงเท่ากับ 340 และ 450 nm ตามลำดับ) จากการทดลองพบว่าไบโอเจนิกเอมีนมีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.01—25.0 ppm ($r^2 = 0.9970-0.9997$), มีค่า

ร้อยละการคืนกลับในช่วง 92.6-107.4%, มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.005 ppm (ฮีสตามีนกับไทรามีน) และ 0.01 ppm (พิวเทรสซีน คาตาเวอร์รีนและทริปทามีน) และร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) เท่ากับ 0.58%-4.32% แสดงว่าวิธีนี้มีความถูกต้องและแม่นยำที่ยอมรับได้ นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 15 นาที

ในปี ค.ศ. 2014 ปีเตอร์และคณะ (Piotr, L.; et al. 2014: 155–164) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ไทรามีน โดยทำการสังเคราะห์ 2-(4-methoxyphenyl) ethylamine imprinted polymer (MIP) เพื่อใช้เป็นตัวดูดซับที่มีความจำเพาะกับไทรามีนในเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบยูวี จากการศึกษากว้างๆ ที่เหมาะสมของเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง พบว่าขั้นตอนการนำสารตัวอย่างลงในภาชนะ และการล้างใช้เมทานอลต่อน้ำ (85:15 v/v) ส่วนขั้นตอนการชะล้างสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต (ammonium acetate) เข้มข้น 0.04 M ต่อเมทานอล (30:70 v/v) โดยตัวดูดซับชนิดใหม่นี้ให้มียieldการคืนกลับที่ดีกว่าการใช้ตัวดูดซับชนิดออกตะเดคซิลไซเลน และเมื่อศึกษาผลของสารรบกวนได้แก่ ทริปทามีน เซโรโทนิน ออกโตพามีน ซินเนฟริน และไทโรซีน พบว่าไม่มีผลต่อการวิเคราะห์

เนื่องจากยังไม่พบงานวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้ตัวดูดซับที่มีการเคลือบพื้นผิวด้วยสารลดแรงตึงผิว ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง เพื่อวิเคราะห์ไทรามีน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการพัฒนาเทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี เพื่อใช้เป็นตัวดูดซับแบบใหม่ในเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้การแยกสารไทรามีนออกจากสารรบกวนในตัวอย่างกระชายดำ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ (รุ่น HP 1100) จากบริษัท Hewlett-Packard โดยใช้คอลัมน์ C18 (ขนาด 4.60 x 150 mm อนุภาคขนาด 5 ไมครอน) จากบริษัท Shodex
- เครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (รุ่น FP-8300) จากบริษัท JASCO
- เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (รุ่น Perkin Elmer FT-IR Spectrum BX)
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (รุ่น AB204s) จากบริษัท METTLER TOLEDO
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) รุ่น SU8020 จากบริษัท HITACHI
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน (รุ่น LaboStar) จากบริษัท SIEMENS
- เครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic) จากบริษัท Mettler electronic
- เครื่องเขย่า (vortex) (รุ่น Vortex-genie 2) จากบริษัท Scientific Industries
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Zentrifugen EBA 8S จากบริษัท Hettich
- ตู้อบลมร้อน (รุ่น Memmert)
- ไมโครปิเปตต์ขนาด 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร (รุ่น Thermo Scientific) จากบริษัท Provision Scientific

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- | | | |
|-------------------------|------------|-----------------|
| - ไทราซีนไดไฮโดรคลอไรด์ | (AR Grade) | จากบริษัท Fluka |
| - กรดอะมิโนไทโรซีน | (AR Grade) | จากบริษัท Fluka |
| - กรดอะมิโนฮิสติดีน | (AR Grade) | จากบริษัท Fluka |
| - กรดอะมิโนอาร์นิทีน | (AR Grade) | จากบริษัท Fluka |
| - กรดอะมิโนไลซีน | (AR Grade) | จากบริษัท Fluka |

- ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ (AR Grade) จากบริษัท ACROS
- 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (AR Grade) จากบริษัท MERCK
- กรดบอริก (AR Grade) จากบริษัท Fluka
- เมทานอล (HPLC Grade) จากบริษัท MERCK
- ออกตะเตดซิลไซเลน (AR Grade) จากบริษัท VERTICAL
- อะลูมินา (อะลูมิเนียมออกไซด์) (AR Grade) จากบริษัท MERCK
- โซเดียมโตะเตดซิลซัลเฟต (AR Grade) จากบริษัท Sigma Aldrich
- ไตรตัน เอกซ์ 100 (AR Grade) จากบริษัท Sigma Aldrich
- เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (AR Grade) จากบริษัท Sigma Aldrich
- กรดไฮโดรคลอริก (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA
- โซเดียมคาร์บอเนต (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA
- โซเดียมคลอไรด์ (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA

3. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างกระชายดำและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากกระชายดำที่ใช้ในการทดลองแสดงใน

ตาราง 5

ตาราง 5 แหล่งที่มาของตัวอย่างกระชายดำและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากกระชายดำ

ลำดับ	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา
S1	เหง้ากระชายดำสด	ร้านค้า ณ เขาทับเบิก จังหวัดเพชรบูรณ์
S2	เหง้ากระชายดำสด	ร้านค้า ณ งานเกษตรแฟร์ จังหวัดกรุงเทพฯ
S3	กระชายดำอบแห้ง	ร้านค้า ณ งานเกษตรแฟร์ จังหวัดกรุงเทพฯ
S4	แคปซูลกระชายดำ	ร้านค้าสมุนไพรท่าพระจันทร์ จังหวัดกรุงเทพฯ
S5	แคปซูลกระชายดำ	ร้านค้าสมุนไพรท่าพระจันทร์ จังหวัดกรุงเทพฯ
S6	ยาชงกระชายดำ	ห้างสรรพสินค้า จังหวัดกรุงเทพฯ
S7	ยาตองกระชายดำ	ตลาดสด จังหวัดกรุงเทพฯ

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 ทำการสังเคราะห์ตัวดูดซับชนิดต่าง ๆ ด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี

(Arnnok, P.; & Burakham, R. 2014: 1722)

1.1 ชั่งตัวดูดซับชนิดอะลูมินามา 0.500X กรัม ใส่ลงในขวดรูปกรวย และเติมสารละลายโซเดียมโอดีเตซิลซัลเฟตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร (ปรับค่าพีเอช = 2)

1.2 ทำการคนสารละลายจากข้อ 1.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง

1.3 ทำการกรองตะกอนสีขาวโดยใช้กรวยบุชเนอร์ และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น

1.4 นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.5 ชั่งน้ำหนักตะกอนที่ได้และบันทึกน้ำหนัก

1.6 นำตะกอนที่ได้ไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์

1.7 ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 1.1-1.6 แต่เปลี่ยนชนิดตัวดูดซับเป็นออกตะเดคซิล-ไซเลน (โดยไม่ต้องปรับค่าพีเอช) และบันทึกค่าพีเอช

1.8 ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 1.1-1.7 เปลี่ยนชนิดสารลดแรงตึงผิวเป็นเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ และไตรตัน เอกซ์ 100 ตามลำดับ (โดยไม่ต้องปรับค่าพีเอช) และบันทึกค่าพีเอช

ตอนที่ 2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ โดยทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่และศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนี้

การเตรียมสารละลาย

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานไทรามีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซึ่งสารมาตรฐานไทรามีน 0.0100 กรัม ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์

ชั่งออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ 0.054X กรัม ละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร และเติม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 40 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.4 โมลาร์ (พีเอช = 9.5) จนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1 การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่างไทรามีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์

2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานไทรามีนเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมไว้มา 3.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก

2.1.2 เติมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที

2.1.3 นำสารอนุพันธ์ที่เตรียมได้ไปสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อหาค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้น (excitation wavelength, λ_{ex}) และค่าความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (emission wavelength, λ_{em})

2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

เตรียมสารอนุพันธ์ของสารละลายมาตรฐานไทรามีนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำตามข้อ 2.1 แล้วฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่

- คอลัมน์ C18 (กว้าง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 150 มิลลิเมตร และขนาดอนุภาค 5 ไมครอน)

- ทำการศึกษาชนิดและองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนี้ โดยเลือกใช้เมทานอลและน้ำ ที่อัตราส่วนในช่วง 90:10 ถึง 60:40 ร้อยละโดยปริมาตร (V/V)

- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

- ทำการตรวจวัดสัญญาณโดยใช้ตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ ที่ค่าความยาวคลื่น λ_{ex} และ λ_{em} นาโนเมตร (จากข้อ 2.1.3)

ทำการบันทึกโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไทรามีน และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

เตรียมสารอนุพันธ์ของสารละลายมาตรฐานไทรามีนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำตามข้อ 2.1 แล้วฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ในสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 2.2 โดยศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ในช่วง 0.4 ถึง 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วบันทึกโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไทรามีน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตอนที่ 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลส์โครมาโทกราฟี

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง โดยทำการศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ ศึกษาชนิดและปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสม ศึกษาความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสม ศึกษาปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ใช้ ศึกษาชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ชะไทรามีน

3.1 ศึกษาชนิดของตัวดูดซับที่เหมาะสม

3.1.1 ชั่งน้ำหนักตัวดูดซับแต่ละชนิดที่สังเคราะห์จากตอนที่ 1 อย่างละ 0.500X กรัม บรรจุลงในหลอดฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.1.2 เติมเมทานอล 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออน 4 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในหลอดฉีดยาที่บรรจุตัวดูดซับแต่ละชนิด เพื่อเตรียมตัวดูดซับให้พร้อมใช้งาน

3.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานไทรามีนความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเติมลงในหลอดฉีดยาที่บรรจุตัวดูดซับแต่ละชนิดปริมาตร 3 มิลลิลิตร

3.1.4 เก็บส่วนสารละลายที่ได้ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไทรามีนโดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมตามตอนที่ 2

3.1.5 ทำการบันทึกโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไทรามีน ($n = 3$)

3.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิว

เมื่อได้ชนิดตัวดูดซับที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 แล้วทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิวในช่วง 0.05–1.00 มิลลิโมลาร์ โดยทำการสังเคราะห์ตัวดูดซับที่เหมาะสมตามข้อ 1.1-1.6 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวดังนี้ 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แล้วชั่งน้ำหนักตัวดูดซับที่สังเคราะห์ได้อย่างละ 0.500X กรัมบรรจุลงในหลอดฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการทดลองต่อตามข้อ 3.1.2 - 3.1.5

3.3 ศึกษาปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสม

ชั่งน้ำหนักตัวดูดซับชนิดที่เหมาะสม (จากข้อที่ 3.2) โดยศึกษาปริมาณของตัวดูดซับได้แก่ 0.250X, 0.500X, 0.750X, 1.000X และ 1.250X กรัม บรรจุลงในหลอดจีดียาขนาด 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการทดลองต่อตามข้อ 3.1.2 - 3.1.5

3.4 ศึกษาชนิดตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีน

ชั่งน้ำหนักตัวดูดซับชนิดที่เหมาะสม (จากข้อที่ 3.2) มา X กรัม (จากข้อที่ 3.3) บรรจุลงในหลอดจีดียาขนาด 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วทำการทดลองต่อตามข้อ 3.1.2 และ 3.1.3 จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการศึกษาชนิดตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีน ดังนี้ เมทานอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 โมลาร์) โซเดียมคาร์บอเนต (1 โมลาร์) โซเดียมคลอไรด์ (1 โมลาร์) และบอเรตบัฟเฟอร์ (0.4 โมลาร์, พีเอช 9.5) ตามลำดับ โดยตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีนเติมปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการทดลองต่อตามข้อ 3.1.4 และ 3.1.5 ตามลำดับ

3.5 ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีน

ชั่งน้ำหนักตัวดูดซับชนิดที่เหมาะสม (จากข้อที่ 3.2) มา X กรัม (จากข้อที่ 3.3) บรรจุลงในหลอดจีดียาขนาด 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วทำการทดลองต่อตามข้อ 3.1.2 และ 3.1.3 จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีนดังนี้ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00 และ 4.00 โมลาร์ ตามลำดับ โดยตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีนเติมปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการทดลองต่อตามข้อ 3.1.4 และ 3.1.5 ตามลำดับ

3.6 ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีน

ชั่งน้ำหนักตัวดูดซับชนิดที่เหมาะสม (จากข้อที่ 3.2) มา X กรัม (จากข้อที่ 3.3) บรรจุลงในหลอดจีดียาขนาด 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วทำการทดลองต่อตามข้อ 3.1.2 และ 3.1.3 จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติมตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีนที่เหมาะสม (จากข้อที่ 3.5) โดยทำการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสมดังนี้ 2, 3, 4, 5, 10 และ 15 มิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อชะไตรามีนออกจากตัวดูดซับ จากนั้นทำการทดลองต่อตามข้อ 3.1.4 และ 3.1.5 ตามลำดับ

ตอนที่ 4 ศึกษาผลของสารรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนจากตัวอย่าง

ศึกษาผลของกรดอะมิโน ได้แก่ ไทโรซีน ฮีสติดีน ออร์นิติน และไลซีน ทำการทดลอง โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของไทรามีนและสารรบกวนต่างๆ ได้แก่ กรดอะมิโนไทโรซีน กรดอะมิโนฮีสติดีน กรดอะมิโนออร์นิติน และกรดอะมิโนไลซีน ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (จากตอนที่ 3) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (จากตอนที่ 2) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตอนที่ 5 ศึกษาความใช้ได้ของวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์

ศึกษาความใช้ได้ของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี ดังนี้

5.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์

5.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานไทรามีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานไทรามีน 0.0100 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จนครบ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานไทรามีนที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อสร้างกราฟ มาตรฐานดังนี้ 0.0015, 0.005, 0.01, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 20.00 และ 30.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.1.3 นำสารละลายมาตรฐานไทรามีนแต่ละความเข้มข้น มาผ่านขั้นตอนการ เตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (จากตอนที่ 3) แล้วเก็บส่วนสารละลายใส ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (จากตอนที่ 2)

5.1.4 กรองสารละลายผ่านไซรินจ์ฟิลเตอร์แบบในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้ว ฉีดสารละลายอนุพันธ์ของไทรามีนเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

5.1.5 บันทึกโครมาโทแกรม (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) เพื่อนำไปสร้างกราฟ มาตรฐานของไทรามีน

5.2 การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของที่ตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถ วิเคราะห์ปริมาณได้

ทำโดยนำสารละลายมาตรฐานไทรามีนที่ความเข้มข้นต่ำๆ มาผ่านขั้นตอนการ เตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (จากตอนที่ 3) แล้วเก็บส่วนของ

สารละลายไฮโปโครมาตโดยใช้เทคนิครีเวิร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (จากตอนที่ 2) ซึ่งค่า LOD และ LOQ ได้จากค่าความเข้มข้นของไทรามินที่ให้อัตราส่วนของสัญญาณของไทรามิน (signal) ต่อสัญญาณรบกวน (noise) เท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ ดังแสดง

Limit of detection, LOD = $3S/N$ และ Limit of detection, LOD = $10S/N$

หมายเหตุ: S/N หมายถึงอัตราส่วนของสัญญาณที่สนใจต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio)

5.3 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์แสดงในเทอมของค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ทำโดยชั่งตัวอย่างเหง้ากระชายดำสดมา 1.000X กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตรและนำมาเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดโดยนำไปวางในเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนสารละลายไฮโปโครมาต จากนั้นนำสารสกัดปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนที่ 3 และอีกส่วนของสารสกัดปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำมาเติมสารละลายมาตรฐานไทรามินให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนที่ 3 เช่นกัน จากนั้นเก็บส่วนสารละลายไฮโปโครมาตและนำมาฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟี (ตามหัวข้อตอนที่ 2) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ ($n=5$) จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืนดังสมการที่ 3

$$\text{ร้อยละการคืนกลับ} = \frac{((C_{\text{in sample}} + C_{\text{added}}) - C_{\text{in sample}}) \times 100}{C_{\text{added}}} \quad \dots\dots 3)$$

เมื่อ	$C_{\text{in sample}}$	คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์
	C_{added}	คือ ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง

5.4 ศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แสดงในเทอมของค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation, %RSD) ทำการศึกษาความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และความแม่นยำระหว่างวัน (inter-day precision) ทำการทดลอง

โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานไทรามินที่ความเข้มข้น 2.00, 6.00 และ 10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนที่ 3 และฉีดสารละลายอนุพันธ์ของไทรามินเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟี (จากตอนที่ 2) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม แล้วนำข้อมูลของสัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากสมการที่ 4

$$\text{ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \times 100 \quad \dots\dots 4)$$

- Intra-day คือ การทำการทดลองซ้ำภายในวันเดียวกัน โดยทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง
- Inter-day คือ การทำการทดลองซ้ำกันระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน โดยทำการทดลองซ้ำ วันละ 3 ครั้ง

ตอนที่ 6 การประยุกต์วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลส์โครมาโทกราฟีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไทรามินในตัวอย่างกระชายดำ

นำตัวอย่างกระชายดำมาสับหรือบดให้ละเอียด จากนั้นทำการสกัดไทรามินออกจากตัวอย่างกระชายดำโดยใช้วิธีการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ดังนี้

- 6.1 ชั่งตัวอย่างมาอย่างละ 1.000X กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร
- 6.2 นำมาเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- 6.3 นำไปวางในเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนสารละลายใสในขวดสีชา
- 6.4 นำสารละลายที่สกัดได้มาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (จากตอนที่ 3) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไทรามินโดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (จากตอนที่ 2)
- 6.5 บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีคเพื่อนำไปเทียบกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาปริมาณไทรามินในตัวอย่างกระชายดำ โดยทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ (n=3)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอผลการวิจัยตามลำดับดังนี้

1. ผลการสังเคราะห์ตัวดูดซับชนิดต่าง ๆ ด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี
2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบบีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน
3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี
4. ผลการศึกษารอบกวนที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่าง
5. ผลการศึกษาความใช้ได้ของทั้งระบบวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์
6. ผลการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ

ตอนที่ 1 ผลการสังเคราะห์ตัวดูดซับชนิดต่าง ๆ ด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี

จากการสังเคราะห์ตัวดูดซับชนิดต่าง ๆ ด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี ทั้งหมด 6 ชนิด แสดงผลลักษณะทางกายภาพของตัวดูดซับแต่ละชนิดในตาราง 6 ดังนี้

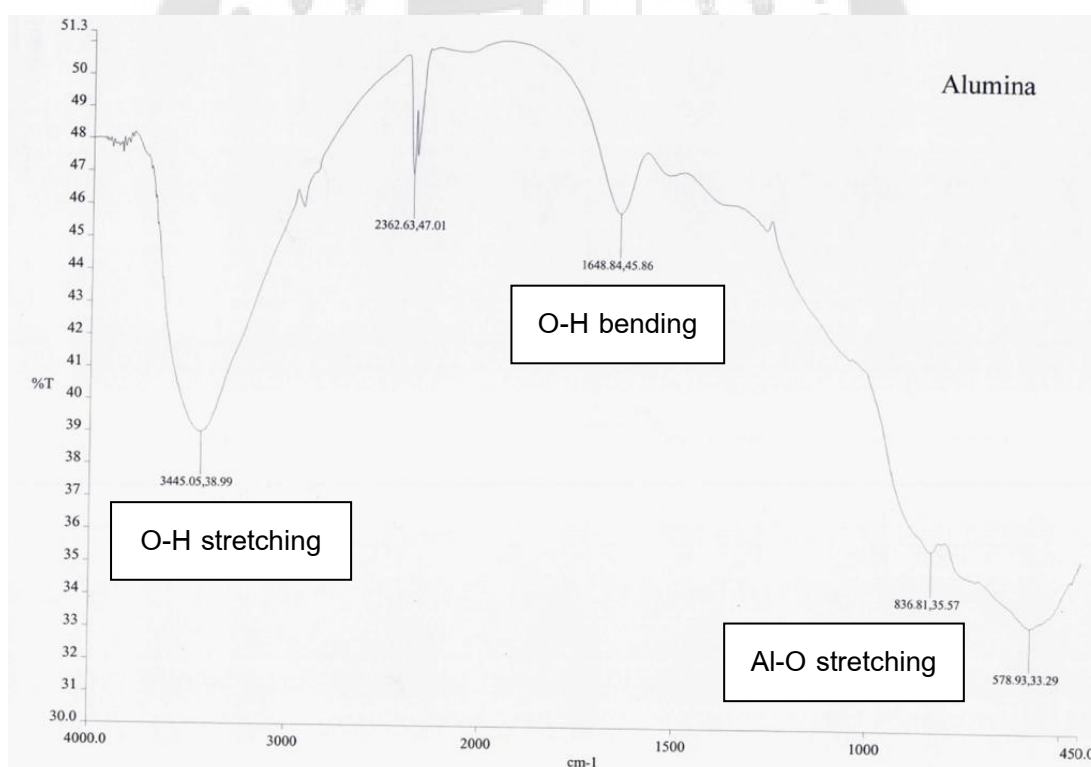
ตาราง 6 ลักษณะทางกายภาพของตัวดูดซับแต่ละชนิด

ชนิดของตัวดูดซับ	ลักษณะทางกายภาพ
ALU-SDS	ผงละเอียด, สีขาว
ALU-CTAB	ผงละเอียด, สีขาว
ALU-TX 100	ผงละเอียด, สีขาว
C18-SDS	ผงละเอียด, สีขาว
C18-CTAB	ผงละเอียด, สีขาว
C18-TX 100	ผงละเอียด, สีขาว

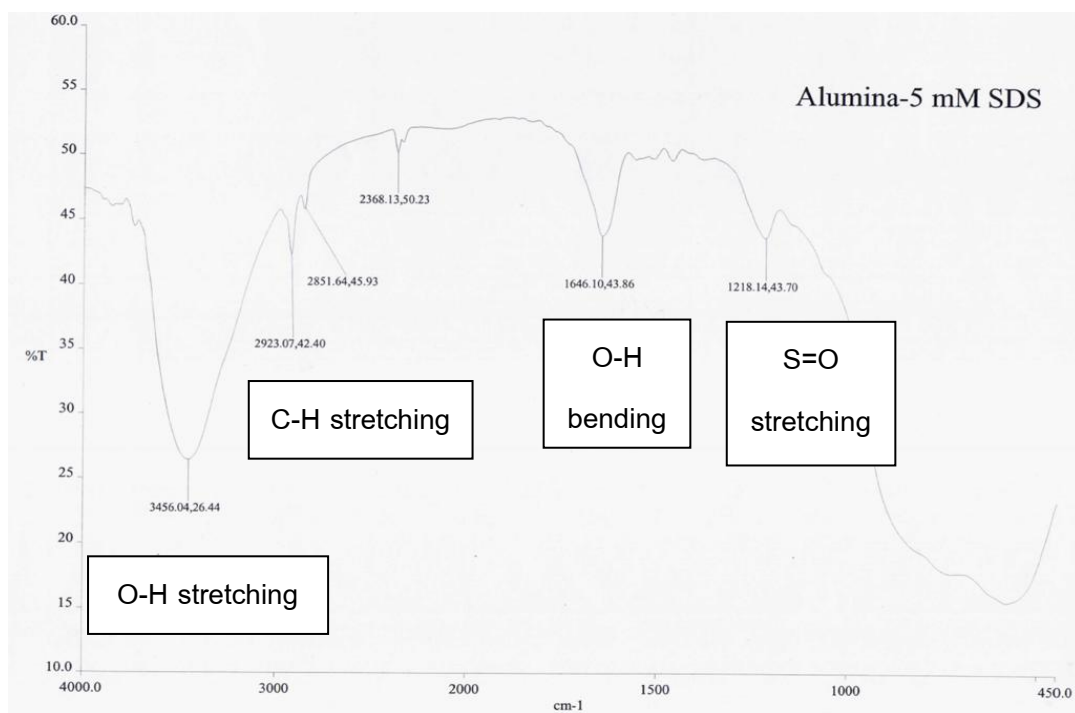
ในงานวิจัยนี้กำหนดสัญลักษณ์แทนตัวดูดซับแต่ละชนิดดังนี้

- ALU แทนอะลูมินา
- ALU-SDS แทนอะลูมินา-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
- ALU-CTAB แทนอะลูมินา-เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์
- ALU-TX 100 แทนอะลูมินา-ไตรตัน เอกซ์ 100
- C18 แทนออกตะเดซิลไซเลน
- C18-SDS แทนออกตะเดซิลไซเลน-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
- C18-CTAB แทนออกตะเดซิลไซเลน-เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์
- C18-TX 100 แทนออกตะเดซิลไซเลน-ไตรตัน เอกซ์ 100

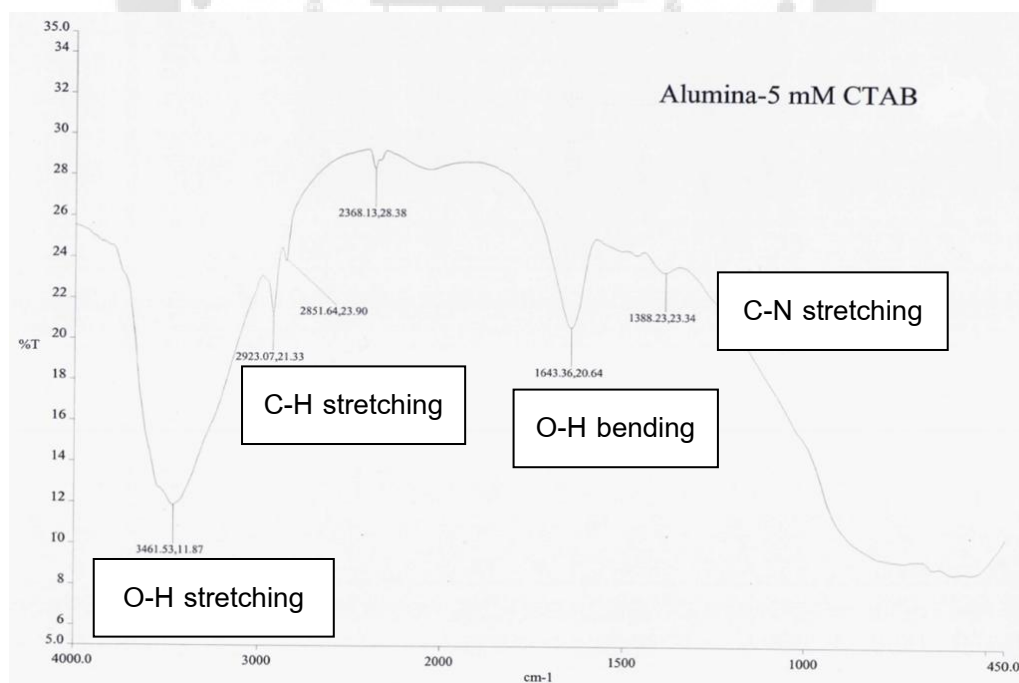
จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวดูดซับแต่ละชนิดด้วยเทคนิค FT-IR เพื่อวิเคราะห์ถึงการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวบนตัวดูดซับที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวดูดซับและสารลดแรงตึงผิว โดยผลสเปกตรัมของตัวดูดซับแต่ละชนิดแสดงดังต่อไปนี้



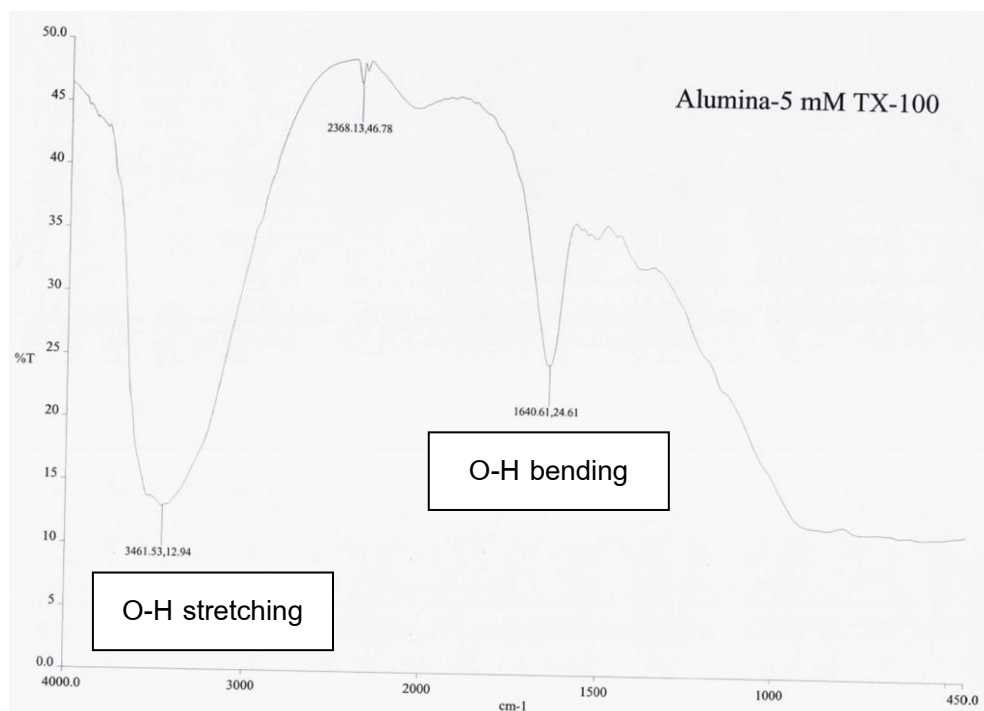
ภาพประกอบ 7 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ ALU



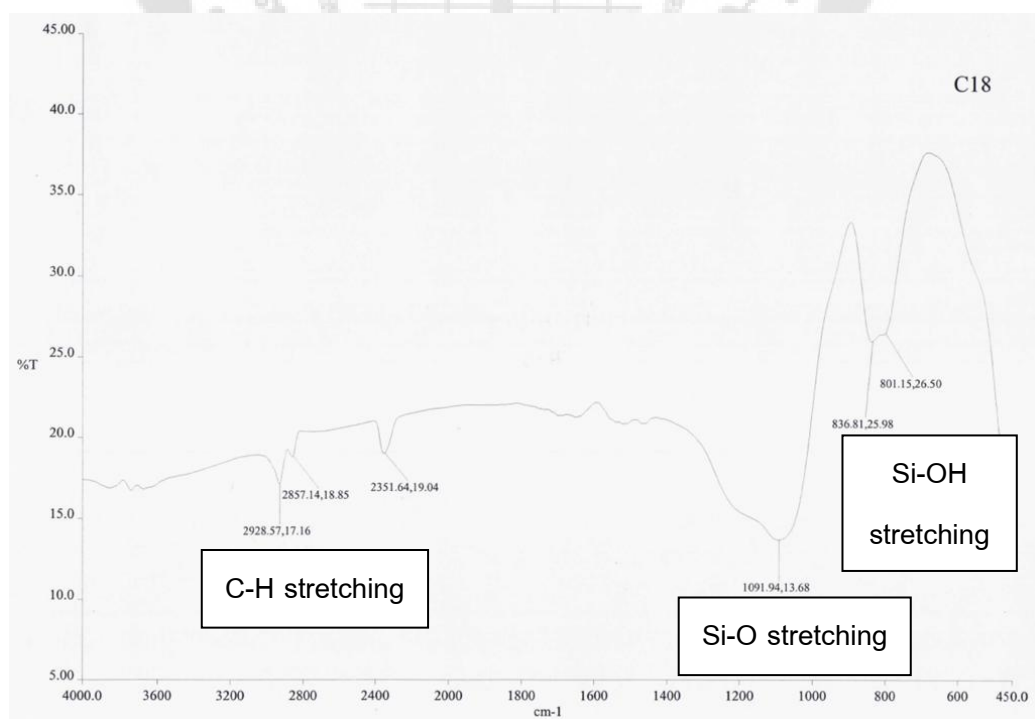
ภาพประกอบ 8 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ ALU-SDS



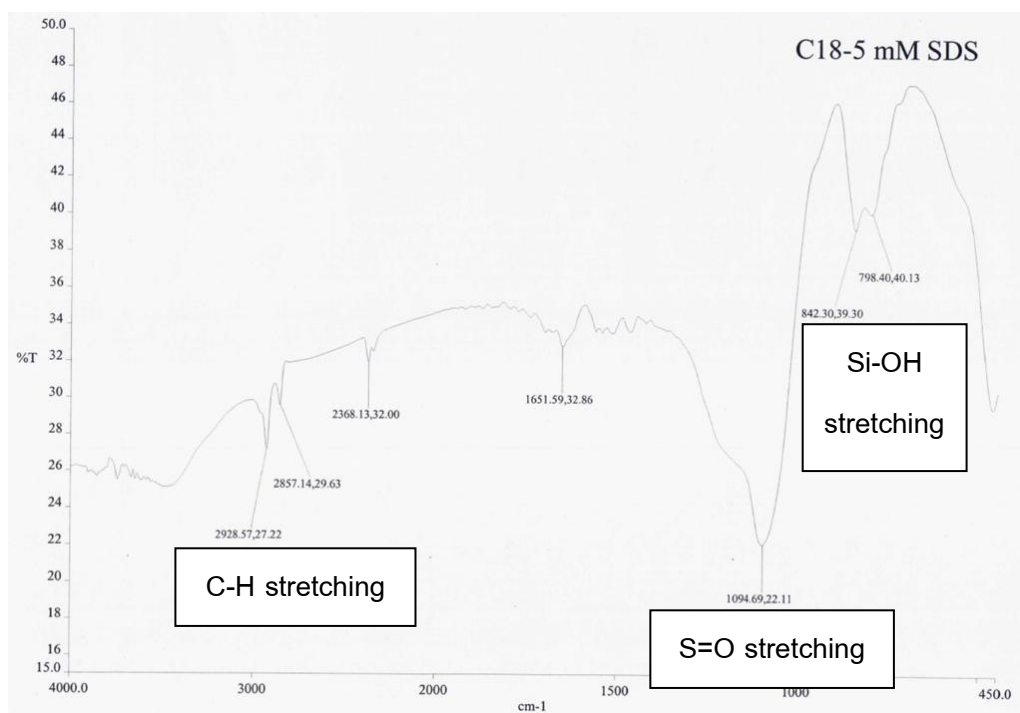
ภาพประกอบ 9 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ ALU-CTAB



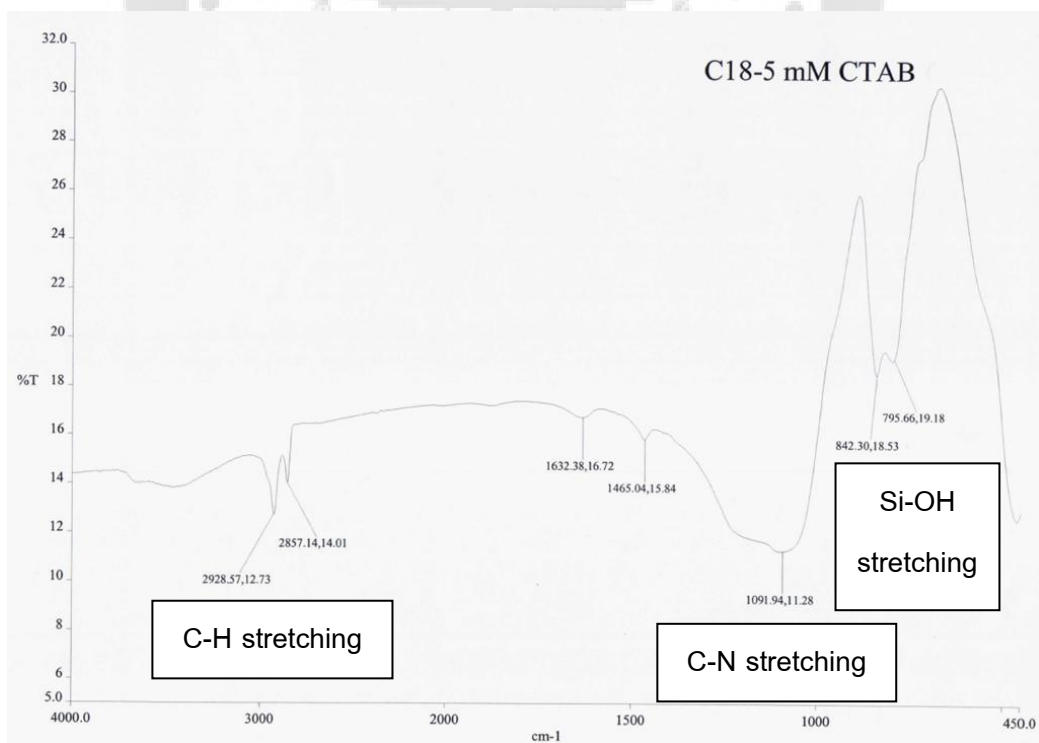
ภาพประกอบ 10 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ ALU-TX 100



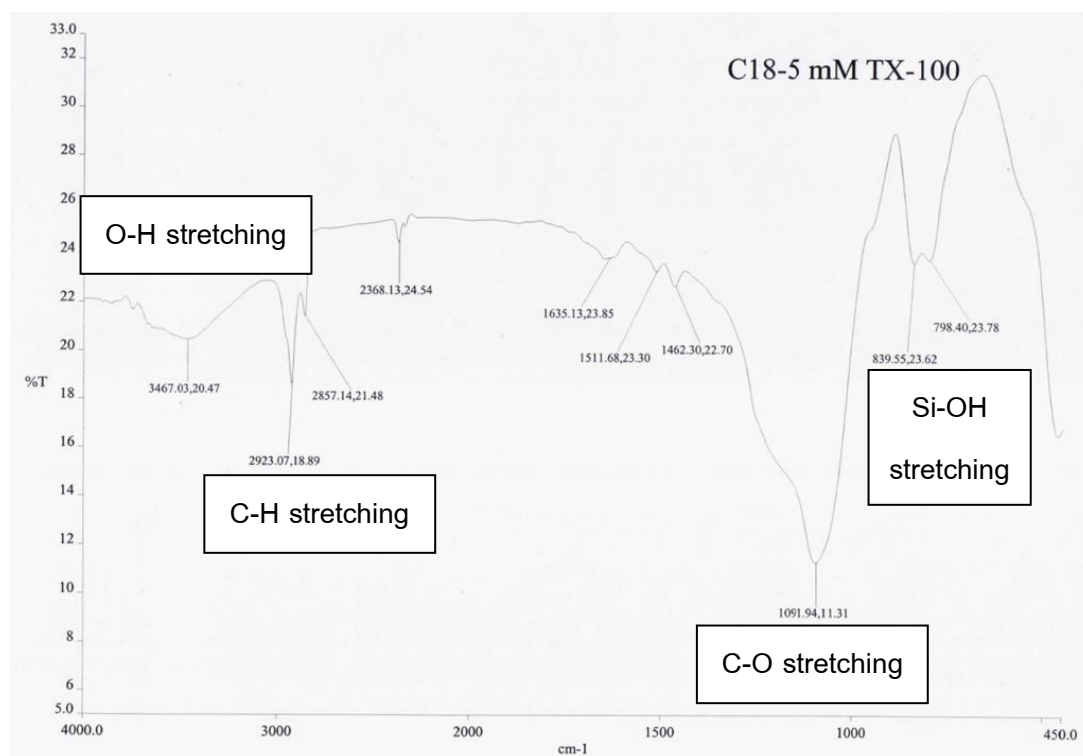
ภาพประกอบ 11 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ C18



ภาพประกอบ 12 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ C18-SDS



ภาพประกอบ 13 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ C18-CTAB



ภาพประกอบ 14 สเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับ C18-TX 100

จากผลสเปกตรัม FT-IR ข้างต้น ทำการศึกษาหมู่ฟังก์ชันของตัวดูดซับแต่ละชนิดโดยสรุปผลการทดลองในตาราง 7

ตาราง 7 สรุปผลสเปกตรัม FT-IR ของตัวดูดซับแต่ละชนิด

ชนิดของตัวดูดซับ	เลขคลื่น (cm ⁻¹)				
	3,450-3,350	2,950-2,800	1,750-1,650	1,200-1,000	880-650
ALU	3,445.05 (O-H stretching)	-	1,648.84 (O-H bending)	-	836.81, 578.93 (Al-O stretching)
ALU-SDS	3,456.04 (O-H stretching)	2,923.07, 2,851.64 (C-H stretching)	1,646.10 (O-H bending)	1,218.14 (S=O stretching)	-
ALU-CTAB	3,461.53 (O-H stretching)	2,923.07, 2,851.64 (C-H stretching)	1,643.36 (O-H bending)	1,388.23 (C-N stretching)	-
ALU-TX 100	3,461.53 (O-H stretching)	-	1,643.36 (O-H bending)	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

ชนิดของตัวดูดซับ	เลขคลื่น (cm^{-1})				
	3,450-3,350	2,950-2,800	1,750-1,650	1,200-1,000	880-650
C18	-	2,928.57, 2,857.14 (C-H stretching)	-	1,091.94 (Si-O stretching)	836.81, 801.15 (Si-OH stretching)
C18-SDS	-	2,928.57, 2,857.14 (C-H stretching)	-	1,094.69 (S=O stretching)	842.30, 798.40 (Si-OH stretching)
C18-CTAB	-	2,928.57, 2,857.14 (C-H stretching)	-	1,091.94 (C-N stretching)	842.30, 795.66 (Si-OH stretching)
C18-TX 100	3,467.03 (O-H stretching)	2,923.07, 2,857.14 (C-H stretching)	-	1,091.94 (C-O stretching)	839.55, 798.40 (Si-OH stretching)

โดยจากการพิจารณาสเปกตรัมของตัวดูดซับชนิด ALU พบแถบการสั่นชัดเจนที่สุดประมาณ $3,445.05\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นแถบการสั่นของหมู่ -OH ของโมเลกุล Al-OH ส่วนที่แถบการสั่นประมาณ $1,648.84\text{ cm}^{-1}$ เป็นแถบการสั่นของหมู่ -OH ที่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำที่เกิดจากความชื้นในอากาศ และที่แถบการสั่นประมาณ 836.81 cm^{-1} เป็นแถบการสั่นของ Al-O และเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ ALU-SDS พบว่ามีแถบการสั่นที่แตกต่าง 2 ที่คือ $2,923.07$, $2,851.64$ และ $1,218.14\text{ cm}^{-1}$ เป็นแถบการสั่นของหมู่แอลเคน (C-H stretching) และหมู่ซัลเฟต (S=O stretching) ของโมเลกุล SDS แสดงว่าเกิดการรวมตัวกันของ Alumina-SDS และเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ ALU-CTAB พบว่ามีแถบการสั่นที่แตกต่าง 2 ที่คือ $2,923.07$, $2,851.64$ และ $1,388.23\text{ cm}^{-1}$ เป็นแถบการสั่นของหมู่แอลเคน (C-H stretching) และหมู่เอมีน (C-N stretching) ของโมเลกุล CTAB แสดงว่าเกิดการรวมตัวกันของ ALU-CTAB แล้วเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ ALU-TX 100 พบแถบการสั่นชัดเจนที่สุดประมาณ $3,461.53\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นแถบการสั่นของหมู่ -OH ของโมเลกุล TX 100 แสดงว่าเกิดการรวมตัวกันของ ALU-TX 100

จากนั้นพิจารณาสเปกตรัมของตัวดูดซับชนิด C18 พบแถบการสั่นที่ $2,928.57$ และ $2,857.14\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นแถบการสั่นของหมู่แอลเคน (C-H stretching) ส่วนที่แถบการสั่นประมาณ $1,091.94$ และ 836.81 cm^{-1} เป็นแถบการสั่นของพันธะ Si-O และ Si-OH ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ C18-SDS พบว่ามีแถบการสั่นที่แตกต่างคือ $1,094.69\text{ cm}^{-1}$ เป็นแถบการสั่นของพันธะ S=O ของหมู่ซัลเฟต แสดงว่าเกิดการรวมตัวกันของ C18-SDS และเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ C18-CTAB พบว่ามีแถบการสั่นที่แตกต่างคือ $1,091.94\text{ cm}^{-1}$ หมู่เอมีน (C-N stretching) ของโมเลกุล CTAB แสดงว่าเกิดการรวมตัวกันของ C18-CTAB แล้วเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ C18-TX 100 พบแถบการสั่นประมาณ $3,467.03$ และ $1,091.94\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นแถบการสั่นของหมู่ -OH และหมู่อีเทอร์ (C-O stretching) ของโมเลกุล TX 100 แสดงว่าเกิดการรวมตัวกันของ C18-TX 100

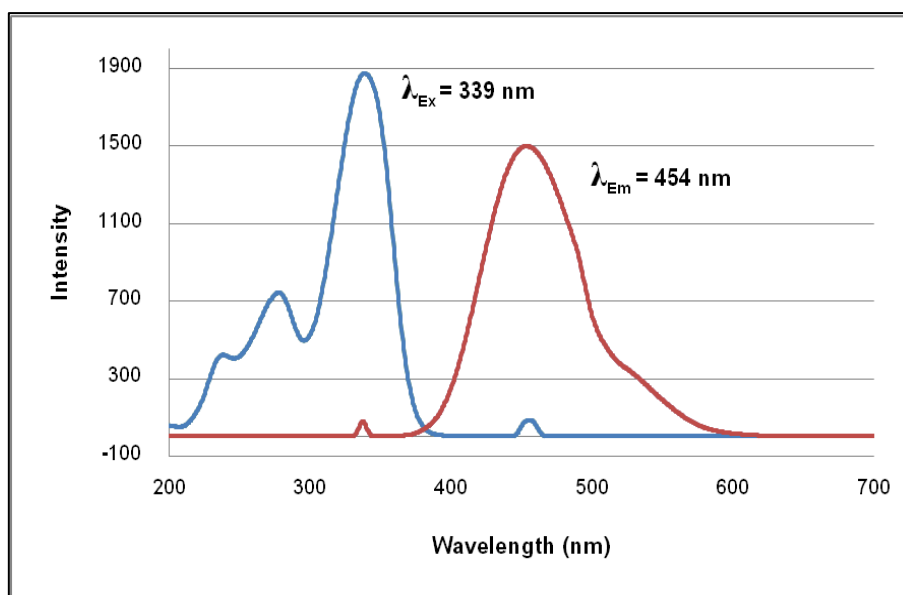
จากผลการศึกษาสเปกตรัม FT-IR เป็นการยืนยันได้ว่าการรวมตัวที่สามารถเกิดขึ้นได้เองระหว่างตัวดูดซับและสารลดแรงตึงผิวที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นในตอนที่ 1 ดังนั้นจึงนำตัวดูดซับแต่ละชนิดไปทำการศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับของสารไตรามีนในขั้นตอนที่ 3 ต่อไป

ตอนที่ 2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบรีเวสเฟส-โครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน

2.1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่างไทรามีนกับออร์โท-พทาลได- อัลดีไฮด์

ในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนซึ่งมีความสามารถในการดูดกลืนแสงต่ำเนื่องจากมีโครงสร้างขนาดเล็กและมีวงเบนซีนเพียง 1 วง ทำให้การตรวจวัดมีความไวที่ต่ำ จึงต้องมีการเตรียมอนุพันธ์ก่อนนำมาแยกด้วยคอลัมน์ เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัด โดยวิธีการเตรียมอนุพันธ์ที่นิยมได้แก่ แดนซิลคลอไรด์ ฟลูออเรสคามีน (fluorescamine) และ OPA ในงานวิจัยนี้เลือกทำการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่างไทรามีนกับ OPA ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการควบแน่นระหว่างหมู่เอมีนของไทรามีนกับหมู่อัลดีไฮด์ของ OPA โดยใช้ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลเป็นรีดิคิงเอเจนต์ โดยอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นคือไอโซอินโดล ซึ่งมีคุณสมบัติในการรวแสงสามารถตรวจวัดด้วยตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ โดยมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูงและมีขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยาก นอกจากนั้นเวลาที่ใช้ในการเกิดอนุพันธ์น้อยมากเพียง 1 นาทีเท่านั้น แต่วิธีนี้มีข้อเสียคืออนุพันธ์ที่เกิดขึ้นไม่มีความเสถียร โดยจากการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง OPA กับไทรามีน เพื่อติดตามความเสถียรของอนุพันธ์ไทรามีน โดยทำการวัดค่าความเข้มของแสงจากการรวแสงของอนุพันธ์ไทรามีนในช่วงเวลา 1-15 นาที แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของแสงจากการรวแสงกับเวลา ซึ่งแสดงผลการทดลองในภาพประกอบ 33 (ภาคผนวก ก) จากผลการทดลองพบว่าความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ของอนุพันธ์ไทรามีนสูงสุดที่เวลา 1 นาทีแรก และเมื่อเวลาผ่านไปค่าความเข้มของแสงจากการรวจะค่อยๆ ลดลง แสดงว่าอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นนั้นไม่มีความเสถียร

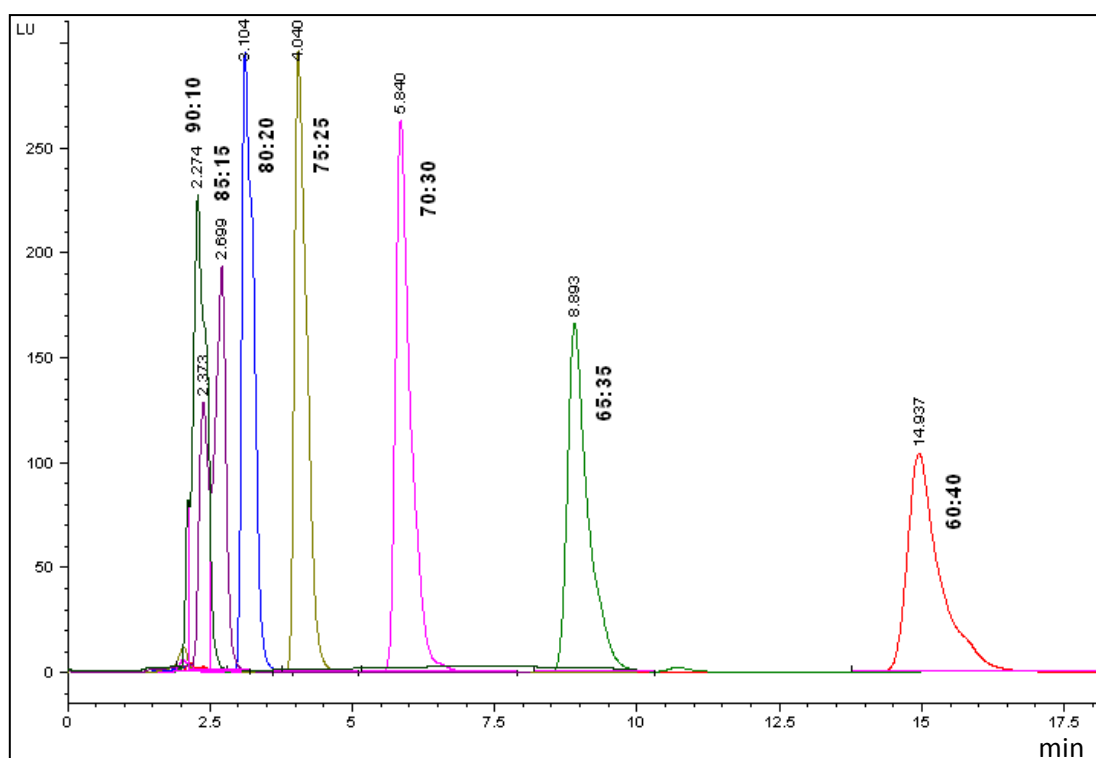
จากการทดลองเมื่อนำสารอนุพันธ์ไอโซอินโดลของไทรามีนที่ได้ไปสแกนสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ สามารถวัดค่าความเข้มของแสงจากการรวแสงได้ค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้นเท่ากับ 339 นาโนเมตร และค่าความยาวคลื่นของการเปล่งแสง เท่ากับ 454 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 สเปกตรัมการวาวแสงของสารอนุพันธ์ไทรามีน

2.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ของเมทานอลต่อน้ำที่สัดส่วน 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35 และ 60:40 ร้อยละโดยปริมาตร ตามลำดับ แสดงผลการทดลองในตาราง 8 พบว่าเมื่อลดความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่โดยการเพิ่มสัดส่วนของน้ำในช่วง 90:10 ถึง 70:30 ร้อยละโดยปริมาตร ทำให้ไทรามีนเกิดอัตรากิริยากับวัฏภาคนิ่งได้ดี จึงส่งผลต่อค่าระยะเวลารีเทชันและค่าพื้นที่ใต้พีคที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อยังเพิ่มสัดส่วนของน้ำมากกว่า 30 % (V/V) ทำให้ไทรามีนยังเกิดอัตรากิริยากับวัฏภาคนิ่งมากขึ้น และถูกชะออกจากคอลัมน์ช้าลง ซึ่งส่งผลต่อค่าระยะเวลารีเทชันที่เพิ่มมากขึ้น และมีค่าพื้นที่ใต้พีคและค่าความสูงของพีคที่ลดลงเนื่องจากการสลายตัวของอนุพันธ์ที่ไม่มีความเสถียรทำให้ความเข้มข้นของการวาวแสงของสารอนุพันธ์ไทรามีนลดลง โดยแสดงโครมาโทแกรมผลการศึกษาการแปรผันของของวัฏภาคเคลื่อนที่ในภาพประกอบ 16 ซึ่งจากการทดลองสภาวะที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่ของเมทานอลต่อน้ำคือ 70:30 ร้อยละโดยปริมาตร เนื่องจากมีระยะเวลารีเทชันที่เหมาะสมเท่ากับ 5.842 นาที และมีค่าพื้นที่ใต้พีคสูงสุด



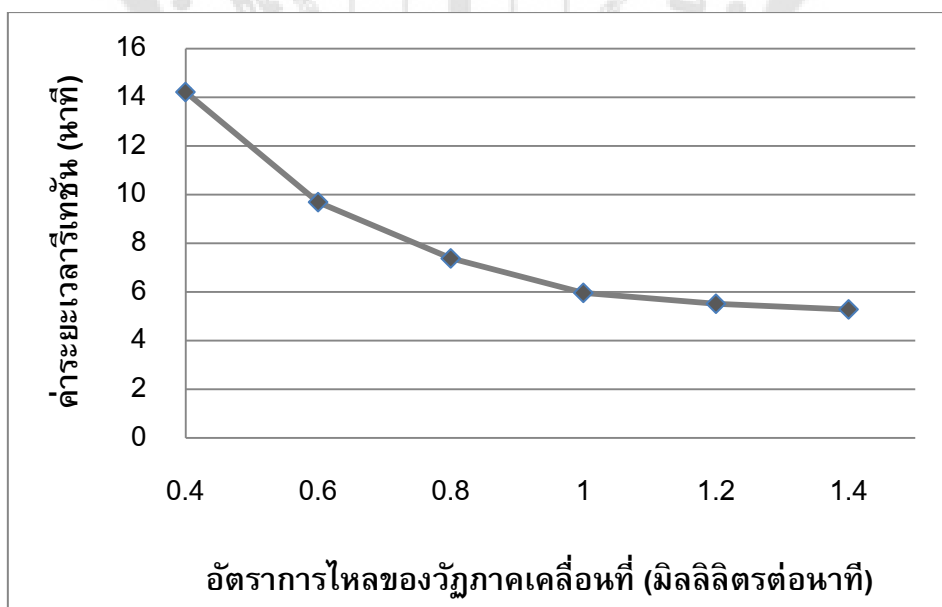
ภาพประกอบ 16 โครมาโทแกรมผลการศึกษการแปรผันของของภูมิภาคเคลื่อนที่

ตาราง 8 ผลการศึกษการแปรผันของของภูมิภาคเคลื่อนที่

สัดส่วนของเมทานอลต่อหน้า (ร้อยละโดยปริมาตร)	ค่าเฉลี่ยระยะเวลา รีเทนชัน (นาที)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค
90:10	2.273	3,999.70
95:15	2.699	4,008.02
80:20	3.098	4,239.72
75:25	4.040	4,457.82
70:30	5.842	4,905.06
65:35	8.827	4,581.86
60:40	14.936	4,143.37

2.3 ผลการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

การศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีองค์ประกอบคือเมทานอลต่อน้ำในสัดส่วน 70:30 ร้อยละโดยปริมาตร โดยทำการศึกษาอัตราการไหลในช่วง 0.4-1.4 มิลลิลิตรต่อนาที ทั้งนี้เมื่อพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าระยะเวลารีเทนชันกับวัฏภาคเคลื่อนที่ดังแสดงในภาพประกอบ 17 พบว่าการเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วง 0.8-1.4 มิลลิลิตรต่อนาทีทำให้ค่าระยะเวลารีเทนชันลดลง เนื่องจากเวลาในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารไตรามีนกับวัฏภาคคงที่ได้ลดลง ส่วนที่อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วง 0.4-0.6 มิลลิลิตรต่อนาทีจะส่งผลให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เนื่องจากเวลาในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารไตรามีนกับวัฏภาคคงที่นานขึ้น และส่งผลต่อรูปร่างของพีคที่มีหางและไม่สมมาตร จากการพิจารณาหากเลือกอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อวิเคราะห์ในตัวอย่างพบว่ามีพีคขึ้นก่อนพีคสารไตรามีนทำให้เกิดพีคซ้อนทับกัน (overlap) จึงส่งผลต่อการวิเคราะห์หาค่าพื้นที่ใต้พีค ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากให้พีคที่สมมาตรและมีระยะเวลารีเทนชันที่เหมาะสม ซึ่งสามารถการแยกไตรามีนออกจากสารรบกวนได้



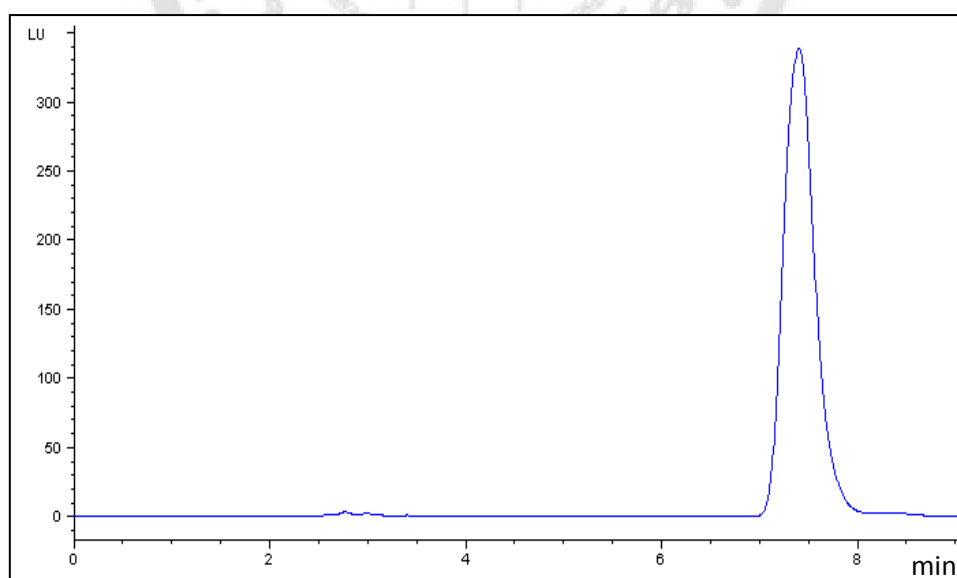
ภาพประกอบ 17 ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

ดังนั้นจากการทดลองข้างต้น สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สรุปได้ดังนี้

ตาราง 9 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีน

ตัวแปร	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง
ระบบการแยก	ไอโซเครติก
คอลัมน์	ขนาด 4.60 x 150 mm อนุภาคขนาด 5 ไมครอน
วัฏภาคนิ่ง	C18
วัฏภาคเคลื่อนที่	เมทานอล:น้ำ
อัตราส่วน	70:30 ร้อยละโดยปริมาตร
อัตราการไหล	0.8 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจจับ	ฟลูออเรสเซนซ์
ความยาวคลื่น	$\lambda_{\text{ex}} = 339$ นาโนเมตร และ $\lambda_{\text{em}} = 454$ นาโนเมตร

จากสภาวะที่เหมาะสมแสดงโครมาโทแกรมของอนุพันธ์ของไทรามีนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรในภาพประกอบ 18 มีระยะเวลารีเทนชันโดยเฉลี่ยคือ 7.510 นาที



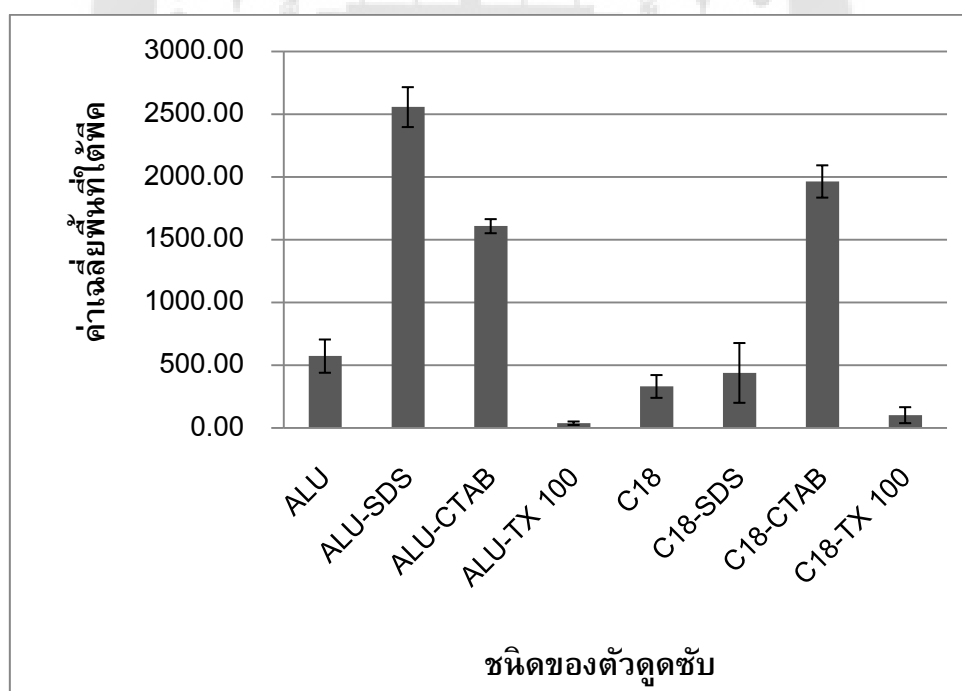
ภาพประกอบ 18 โครมาโทแกรมของอนุพันธ์ของไทรามีน

ตอนที่ 3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี

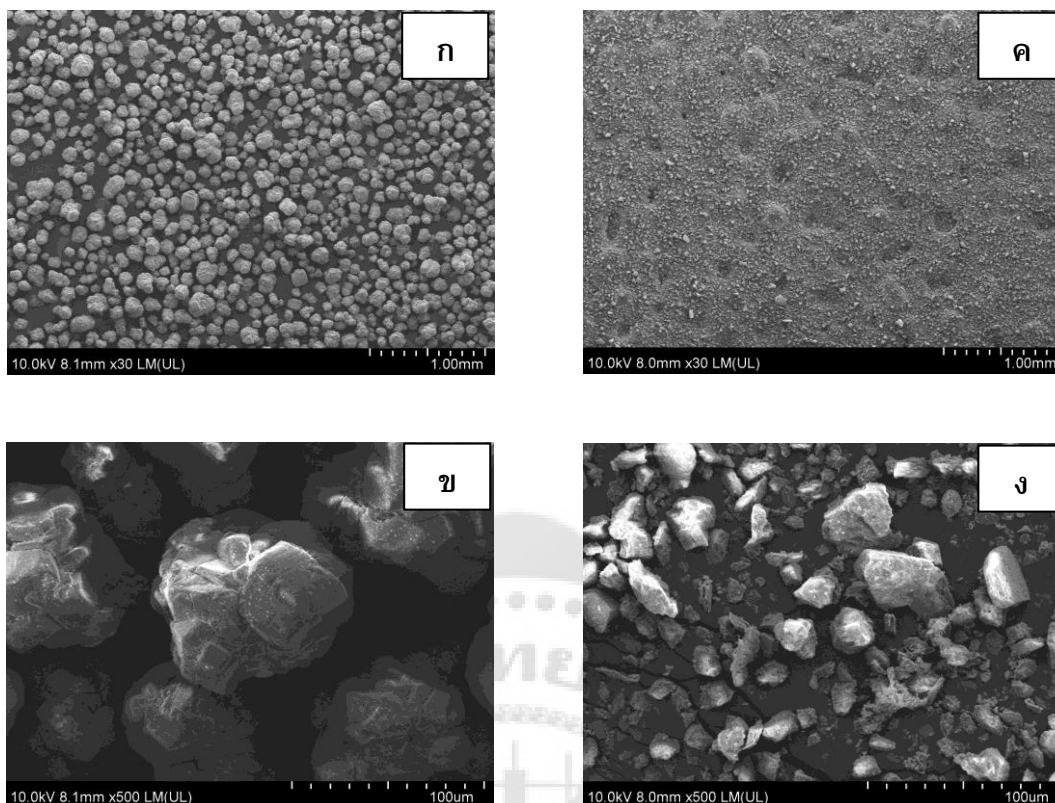
ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งร่วมกับเทคนิคไมเซลล์โครมาโทกราฟี มีดังนี้

3.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวดูดซับที่เหมาะสม

เมื่อทดสอบความสามารถในการดูดซับสารมาตรฐานไทรามินของตัวดูดซับที่สังเคราะห์ขึ้นจากตอนที่ 1 แสดงผลการทดลองในภาพประกอบ 19 พบว่าตัวดูดซับชนิดอะลูมินาที่จับกับสารลดแรงตึงผิวชนิดไตรตัน เอกซ์ 100 (ALU-TX 100) สามารถดูดซับไทรามินได้มากที่สุด เนื่องจากมีค่าพื้นที่ได้ฟิคน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวดูดซับชนิดอื่นๆ ดังนั้นชนิดของตัวดูดซับที่เหมาะสมคือ ALU-TX 100 จากนั้นศึกษาสัณฐานและลักษณะพื้นผิวของตัวดูดซับ ALU-TX 100 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงผลการทดลองในภาพประกอบ 20 พบว่าลักษณะพื้นผิวของตัวดูดซับ ALU-TX 100 มีความแตกต่างจากตัวดูดซับ ALU จึงยืนยันได้ว่าสามารถสังเคราะห์ตัวดูดซับ ALU-TX 100 ได้จริง โดยมีขนาดอนุภาคเล็กเฉลี่ย 10 ไมครอน



ภาพประกอบ 19 ผลการศึกษาชนิดของตัวดูดซับที่เหมาะสม

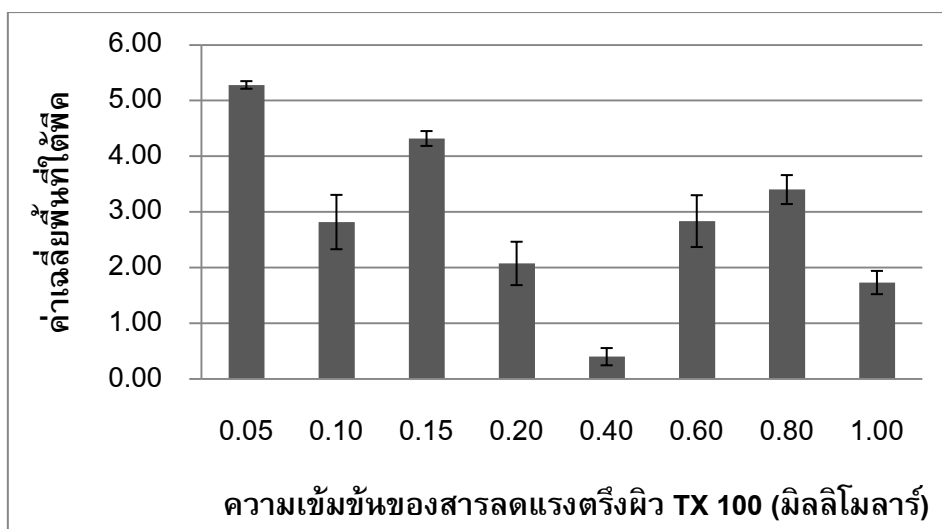


ภาพประกอบ 20 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

โดยจากภาพประกอบ 20 ภาพ ก และ ข แทนพื้นผิวตัวดูดซับ ALU ที่กำลังขยาย 30 และ 500 เท่า ตามลำดับ ส่วนภาพ ค และ ง แทนพื้นผิวของตัวดูดซับ ALU-TX 100 ที่กำลังขยาย 30 และ 500 เท่าตามลำดับ

3.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิว

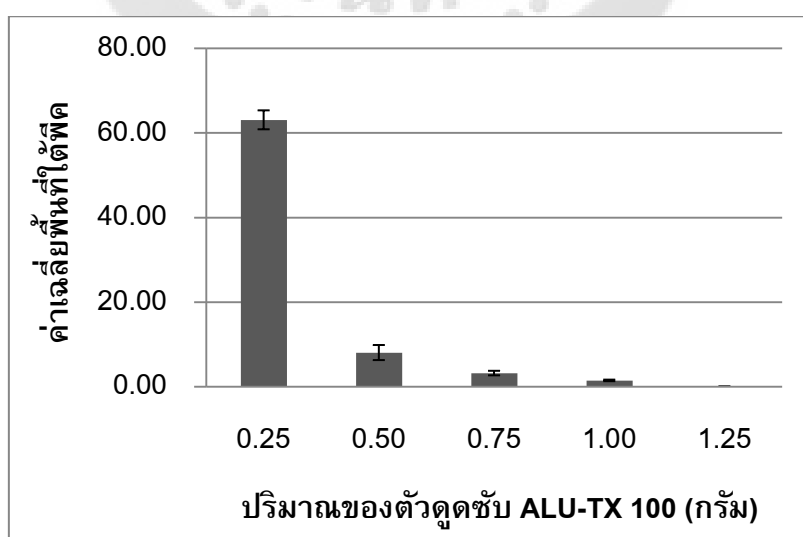
จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิวชนิดไตรตัน เอกซ์ 100 ในช่วง 0.05–1.00 มิลลิโมลาร์ แสดงผลการทดลองในภาพประกอบ 21 ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของไตรตัน เอกซ์ 100 มีผลต่อการดูดซับไทรามีน เนื่องจากการรวมตัวกันของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวบนผิวตัวดูดซับนั้นเกิดได้หลายรูปแบบขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว โดยที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการดูดซับไทรามีนที่สุดคือ 0.4 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากมีค่าพื้นที่ใต้พีคน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้นอื่นๆ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของไตรตัน เอกซ์ 100 ที่เหมาะสมมีค่ามากกว่าค่า CMC ดังนั้นจึงเกิดเป็นรูปแบบของไมเซลล์ (ค่า CMC ของไตรตัน เอกซ์ 100 คือ 0.22-0.24 มิลลิโมลาร์)



ภาพประกอบ 21 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TX 100

3.3 ศึกษาปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสม

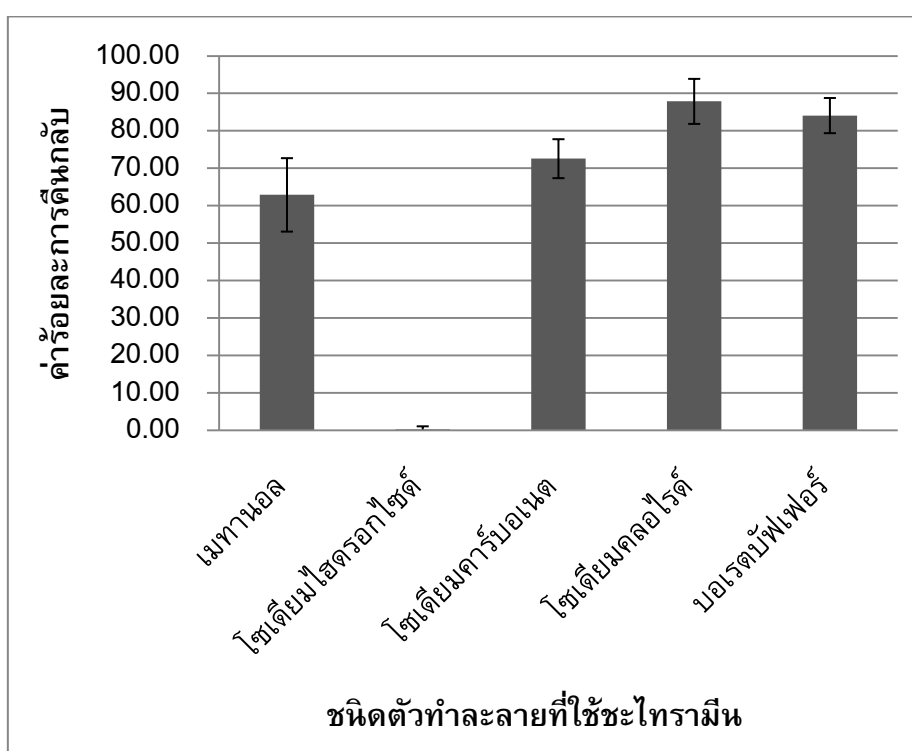
จากการศึกษาปริมาณของตัวดูดซับ ALU-TX 100 ในช่วง 0.2500-1.2500 กรัม แสดงผลการทดลองในภาพประกอบ 22 พบว่าเมื่อปริมาณของตัวดูดซับเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการดูดซับไทรามีนมากขึ้น โดยในงานวิจัยนี้เลือกปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสมคือ 1.000 กรัม เนื่องจากสามารถดูดซับไทรามีนได้ถึงร้อยละ 99.00 โดยไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญของความสามารถในการดูดซับที่ปริมาณ 1.2500 กรัม



ภาพประกอบ 22 ผลการศึกษาปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสม

3.4 ศึกษาชนิดตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีน

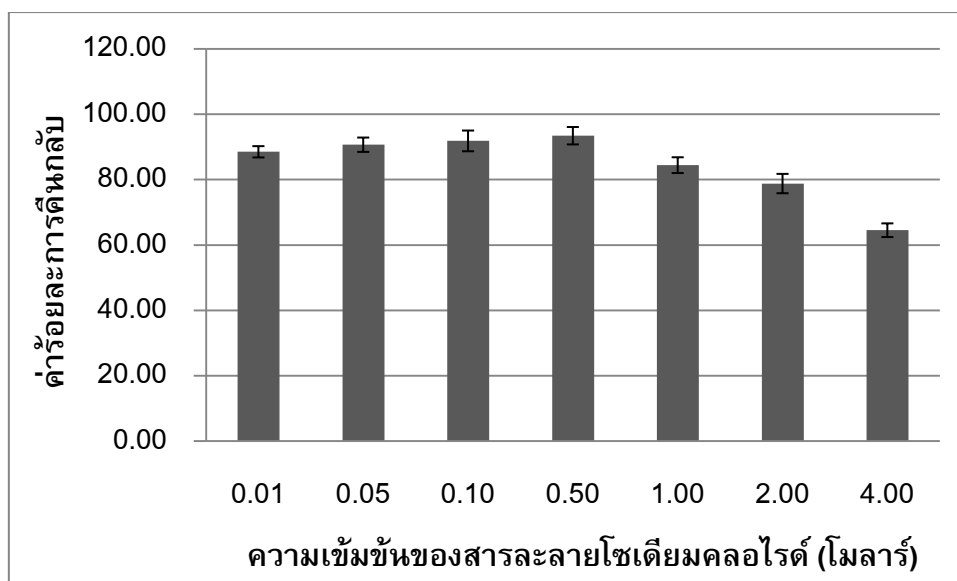
ทำการศึกษานิตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีนดังนี้ เมทานอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 โมลาร์) โซเดียมคาร์บอเนต (1 โมลาร์) โซเดียมคลอไรด์ (1 โมลาร์) และบอเรตบัฟเฟอร์ (0.4 โมลาร์, พีเอช 9.5) ตามลำดับ แสดงผลการทดลองในภาพประกอบ 23 พบว่าสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ และโซเดียมคลอไรด์ ให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ดีที่สุดคือ 84.08 ± 4.69 และ 87.87 ± 6.01 โดยในงานวิจัยนี้เลือกชนิดตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีนที่เหมาะสมคือโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ดีที่สุด มีวิธีการเตรียมที่ง่ายและเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม



ภาพประกอบ 23 ผลการศึกษานิตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีน

3.5 ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีน

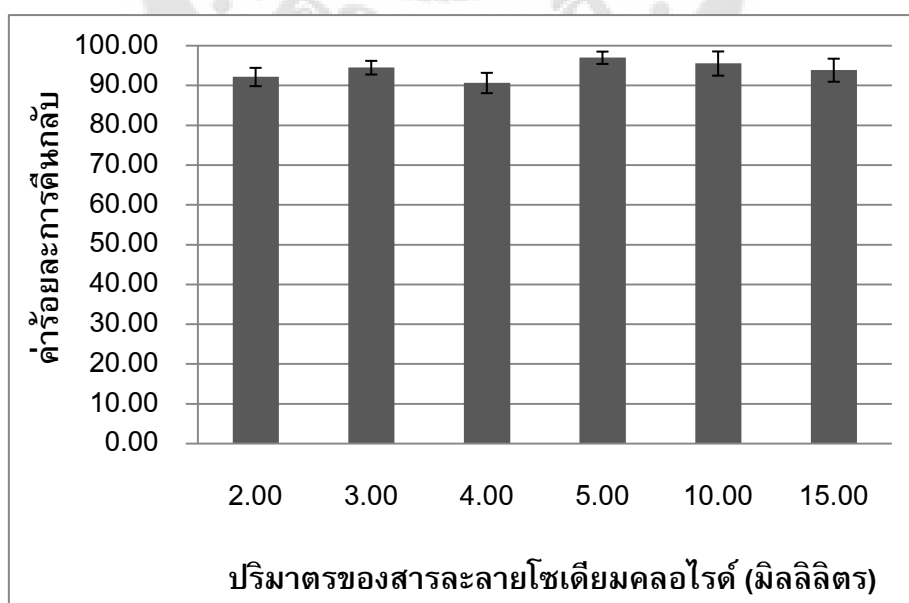
ทำการศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ชะไตรามีนคือโซเดียมคลอไรด์ ในช่วงความเข้มข้น 0.01- 4.00 โมลาร์ แสดงผลการทดลองในภาพประกอบ 24 พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมคลอไรด์คือ 0.50 โมลาร์ เนื่องจากให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ดีที่สุดคือ 93.41 ± 2.66 และที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.50 โมลาร์ พบว่าให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ลดลงตามลำดับ



ภาพประกอบ 24 ผลการศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ชะไทรามีน

3.6 ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ชะไทรามีน

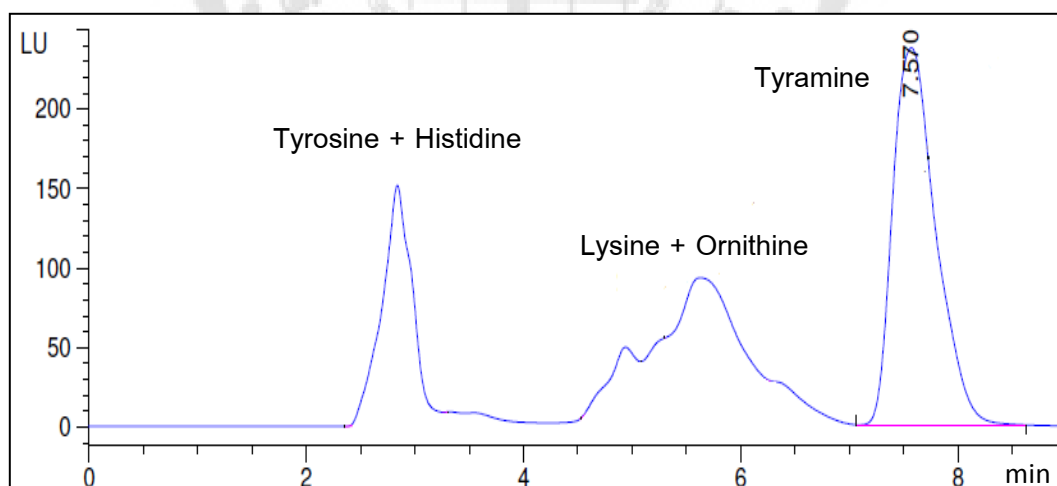
ทำการศึกษ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.50 โมลาร์ ในช่วง 2.00-15.00 มิลลิลิตร แสดงผลการทดลองในภาพประกอบ 25 พบว่าปริมาตรของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมคือ 5.00 มิลลิลิตร เนื่องจากให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ดีที่สุดคือ 97.00 ± 1.55



ภาพประกอบ 25 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ชะไทรามีน

ตอนที่ 4 ผลการศึกษาสารรบกวนที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไทรามินในตัวอย่าง

ในงานวิจัยนี้ศึกษาสารรบกวนที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไทรามินในตัวอย่างคือ กรดอะมิโน 4 ชนิด ได้แก่ ไทโรซีน ฮิสติดีน ออร์นิทีน และไลซีน เนื่องจากกระชายดำมีองค์ประกอบของโปรตีนที่ได้จากการบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยโปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารไบโอเจนิคที่พบทั่วไปในพืชคือ ไทรามิน ฮิสตามีน พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวอริน ตามลำดับ นอกจากนี้โครงสร้างของกรดอะมิโนมีหมู่อะมิโน ($-NH_2$) เป็นหมู่ฟังก์ชันหลักที่สามารถเกิดปฏิกิริยาควมแน่นกับ OPA และได้อนุพันธ์ไอโซอินโดล จึงมีความเป็นไปได้ที่สารรบกวนดังกล่าวอาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ไทรามิน จากผลการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์ไทรามินพร้อมกับกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด พบว่าในสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์สามารถแยกไทรามินออกจากกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์ โดยแสดงโครมาโทแกรมในภาพประกอบ 26 เนื่องจากมีระยะเวลาที่เทชันของกรดอะมิโนไทโรซีน ฮิสติดีน ออร์นิทีน ไลซีน และสารไทรามินที่ต่างกันดังนี้ 2.799, 2.859, 5.063, 5.027 และ 7.570 นาที ตามลำดับ ดังนั้นกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดจึงไม่ส่งผลรบกวนต่อการวิเคราะห์สารไทรามิน



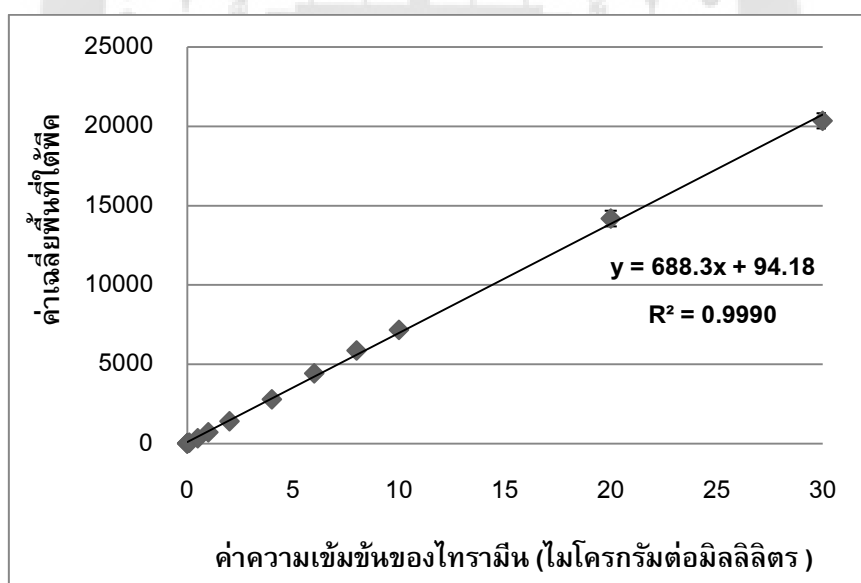
ภาพประกอบ 26 โครมาโทแกรมการแยกอนุพันธ์ของไทรามินกับกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด

ตอนที่ 5 ผลการศึกษาความใช้ได้ของทั้งระบบวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์

ผลการศึกษาความใช้ได้ของทั้งระบบการเตรียมตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี และการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แสดงดังต่อไปนี้

5.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมของทั้งระบบการทดลอง จึงได้ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้น 0.0015-30.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ ซึ่งหลังจากการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานของไทรามีนโดยกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของไทรามีนกับค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีค แสดงในภาพประกอบ 27 พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9990 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 อยู่ในระดับที่มีความถูกต้องและยอมรับได้ตามข้อกำหนด (EURACHEM Guide. 1998)



ภาพประกอบ 27 กราฟมาตรฐานของไทรามีน

5.2 การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของที่ตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานของไทรามินที่ความเข้มข้นต่ำๆ มาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี แล้ววิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากการวิเคราะห์หาค่า LOD และค่า LOQ ได้ค่าเท่ากับ 0.00045 และ 0.0015 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (แสดงโครมาโทแกรมในภาคผนวก ก)

5.3 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

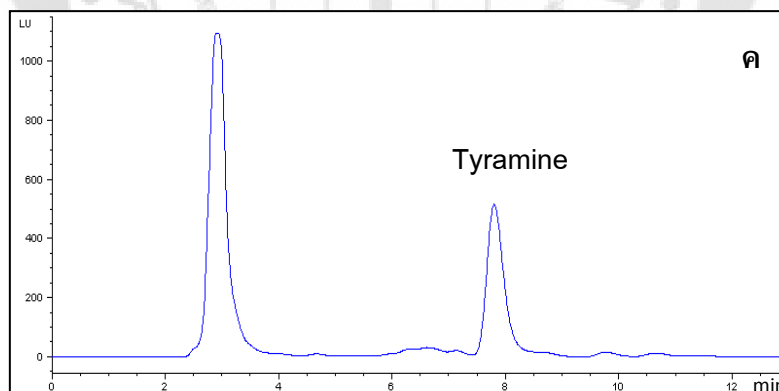
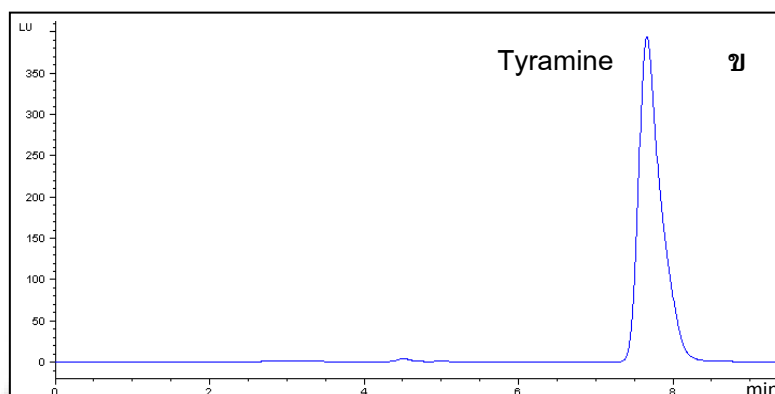
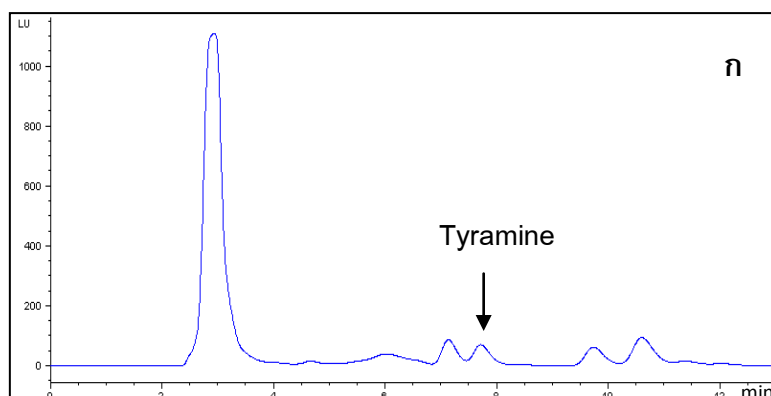
การคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืน ทำโดยการวัดสัญญาณของสารตัวอย่างที่มีการเติมและไม่เติมสารละลายมาตรฐานไทรามิน และวัดความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานไทรามินที่เติมลงไป โดยแสดงโครมาโทแกรมดังภาพประกอบ 28 จากผลการทดลองพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นให้ค่าร้อยละการได้กลับคืนเฉลี่ยอยู่ที่ 98.89 ± 1.59 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกรัมเท่ากับ 80-115% (EURACHEM Guide. 1998) ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

5.4 ศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แสดงในตาราง 10 พบค่าความเที่ยงภายในวันของระยะเวลารีเทชั่นและพื้นที่ใต้พีคอยู่ในช่วง 0.11%-0.23% และ 0.40%-1.18% ตามลำดับ และค่าความเที่ยงระหว่างวันของระยะเวลารีเทชั่นและพื้นที่ใต้พีคอยู่ในช่วง 0.15%-0.31% และ 0.64%-1.18% ตามลำดับ โดยค่า %RSD ที่พบมีค่าน้อยกว่า 2% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์ของ AOAC (EURACHEM Guide. 1998) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความเที่ยง

ตาราง 10 ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการวิเคราะห์

ความเข้มข้นของ ไทรามิน ($\mu\text{g/mL}$)	%RSD ภายในวันเดียวกัน		%RSD ระหว่างวัน	
	ระยะเวลารีเทชั่น	พื้นที่ใต้พีค	ระยะเวลารีเทชั่น	พื้นที่ใต้พีค
2.00	0.11	1.18	0.30	1.18
6.00	0.22	1.47	0.15	0.64
10.00	0.23	0.40	0.31	0.99



ภาพประกอบ 28 โครมาโทแกรมของการเติมและไม่เติมสารมาตรฐานไทราซีนลงในตัวอย่าง

โดย ก แทน โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างสารสกัดเหง้ากระชายดำสด

ข แทน โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไทราซีน

ค แทน โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างสารสกัดเหง้ากระชายดำสดที่มีการเติมสารมาตรฐานไทราซีน

ตอนที่ 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ

เมื่อทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมและความใช้ได้ของทั้งระบบวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนที่มีประสิทธิภาพ จึงนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ ในงานวิจัยนี้ได้จัดซื้อตัวอย่างกระชายดำหลายรูปแบบได้แก่ เหง้ากระชายดำสดและกระชายดำที่ผ่านกระบวนการแปรรูปเช่น กระชายดำอบแห้ง แคปซูล กระชายดำ ยาชงกระชายดำ และยาดองกระชายดำ (แสดงภาพประกอบตัวอย่างในภาคผนวก ข) โดยทำการสุ่มตัวอย่างและทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง แล้วนำสารสกัดมาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟีพบว่าสามารถลดสารรบกวนอื่นๆ (แสดงโครมาโทแกรมในภาคผนวก ก) และกำจัดสีของสารสกัดกระชายดำ (เปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นไม่มีสี) ที่จะส่งผลต่ออายุการใช้งานของคอลัมน์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไทรามีน ผลการวิเคราะห์จะแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำ

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปริมาณไทรามีน ค่าเฉลี่ย ($\mu\text{g/g}$) $\pm$ SD
S1	เหง้ากระชายดำสด	32.83 $\pm$ 0.01
S2	เหง้ากระชายดำสด	33.77 $\pm$ 0.04
S3	กระชายดำอบแห้ง	29.34 $\pm$ 0.12
S4	แคปซูลกระชายดำ	93.33 $\pm$ 0.12
S5	แคปซูลกระชายดำ	3.75 $\pm$ 0.03
S6	ยาชงกระชายดำ	11.06 $\pm$ 0.02
S7	ยาดองกระชายดำ	1.12 $\pm$ 0.01

จากการตรวจพบปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำพบว่าในตัวอย่างแคปซูลกระชายดำ (S4) พบปริมาณไทรามีนมากที่สุดคือ 93.33 ไมโครกรัมต่อกรัม ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายหากบริโภคติดต่อกันเป็นเวลานาน ส่วนตัวอย่างแคปซูลกระชายดำ (S5) พบปริมาณไทรามีนน้อยที่สุด (3.75 ไมโครกรัมต่อกรัม) เนื่องจากในส่วนประกอบของ 1 แคปซูล ยังมีสมุนไพรชนิดอื่นๆ ผสมอยู่ ซึ่งต่างจากในตัวอย่างแคปซูลกระชายดำ (S4) นั้นใน 1 แคปซูล ประกอบด้วยสมุนไพรกระชายดำ 100% ส่วนเหง้ากระชายดำสดและกระชายดำอบแห้งมีปริมาณไทรามีนไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญ (29.34-32.83 ไมโครกรัมต่อกรัม) พบปริมาณไทรามีนรองลงมาคือตัวอย่างยาชงกระชายดำเท่ากับ 11.06 ไมโครกรัมต่อกรัม และพบปริมาณไทรามีนน้อยที่สุดในตัวอย่างยาดองกระชายดำคือ 1.12 ไมโครกรัมต่อกรัม เนื่องจากวิธีการทำยาดองกระชายดำคือการต้มกระชายดำในเหล้าขาว ผู้ผลิตอาจใส่ตัวทำละลายในปริมาณมาก แต่ใส่ปริมาณกระชายดำน้อยเนื่องจากมีราคาแพง ดังนั้นจึงตรวจพบปริมาณไทรามีนน้อยมาก

จากงานวิจัยของ Shalaby, A.R. ในปี ค.ศ. 1996 ได้เสนอระดับความเป็นพิษของไทรามีนคือปริมาณไทรามีนมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้เกิดอาการไมเกรน และที่ปริมาณ 1080 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อให้เกิดความเป็นพิษคือทำให้เกิดอาการบวมตาม ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำน้อยกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงว่าการบริโภคกระชายดำไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย แต่ปริมาณไทรามีนที่ตรวจพบค่อนข้างสูงโดยเฉพาะในตัวอย่างแคปซูล ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงในการรับประทานเป็นประจำ

บทที่ 5

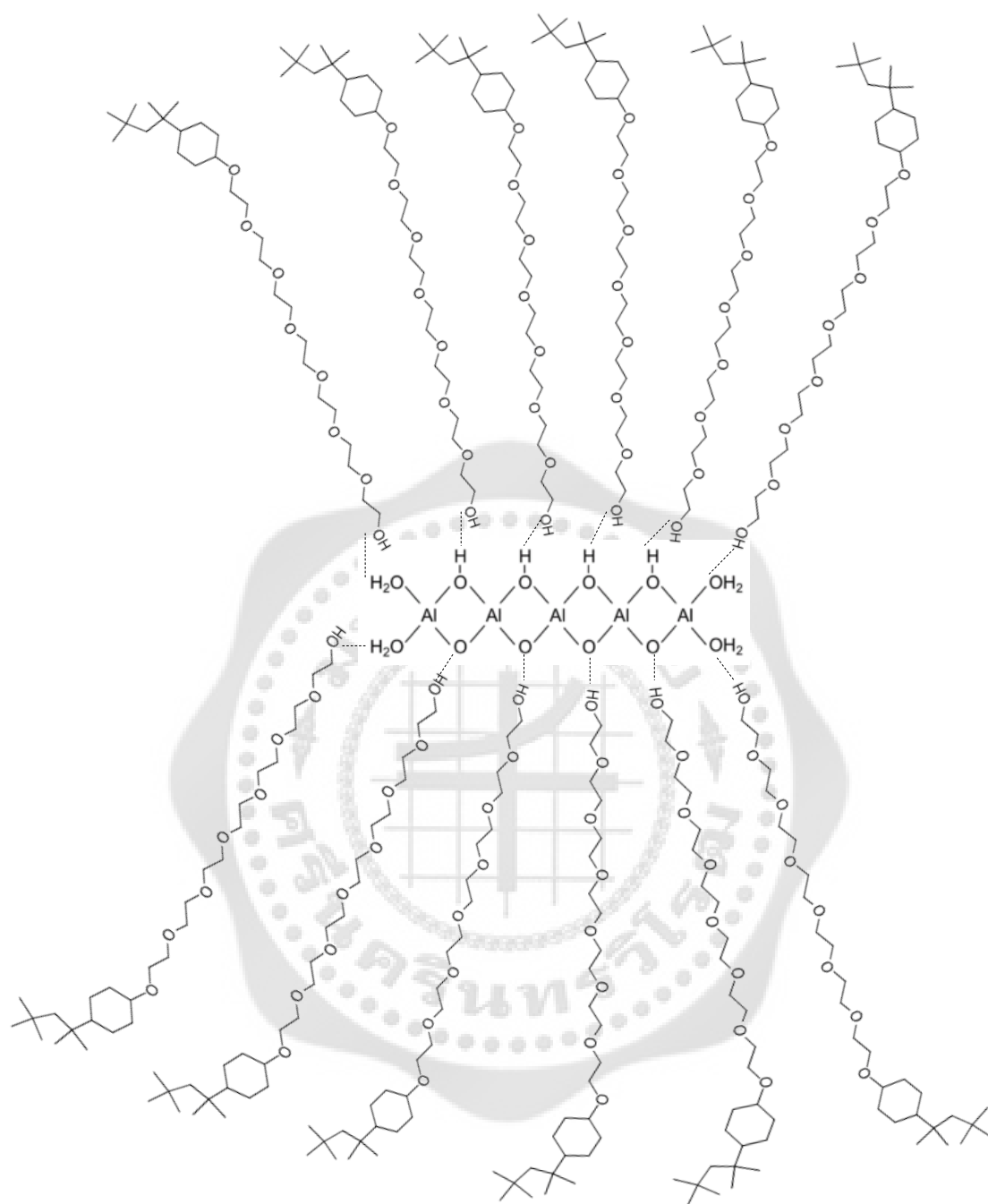
สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผล

ในงานวิจัยนี้ทำการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี เพื่อให้การวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำมีประสิทธิภาพ จากผลการสังเคราะห์ตัวดูดซับที่เหมาะสมคือ ALU-TX 100 มีลักษณะเป็นผงละเอียด สีขาว มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ย 10 ไมครอน และเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่างมีดังนี้ ชนิดและปริมาณของตัวดูดซับที่เหมาะสมคือ ALU-TX 100 (ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์) ปริมาณ 1.0000 กรัม และตัวทำละลายที่เหมาะสมในการชะไทรามีนคือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตรที่ใช้คือ 5 มิลลิลิตร นอกจากนี้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไทรามีนด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่คือเมทานอลต่อน้ำที่สัดส่วน 70:30 โดยปริมาตร และควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที โดยทำการตรวจวัดที่ค่า λ_{ex} และ λ_{em} เท่ากับ 339 และ 454 นาโนเมตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาความใช้ได้ของทั้งระบบวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์พบว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพที่ดี เมื่อประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ไทรามีนในกระชายดำพบว่าสามารถลดสารรบกวนอื่นๆ และกำจัดสีของสารสกัดกระชายดำได้ดี โดยตรวจพบไทรามีนในตัวอย่างกระชายดำมีปริมาณน้อยกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงว่าการบริโภคกระชายดำไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย แต่ปริมาณไทรามีนที่ตรวจพบค่อนข้างสูงโดยเฉพาะในตัวอย่างแคปซูล ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงในการรับประทานเป็นประจำ

อภิปรายผลการวิจัย

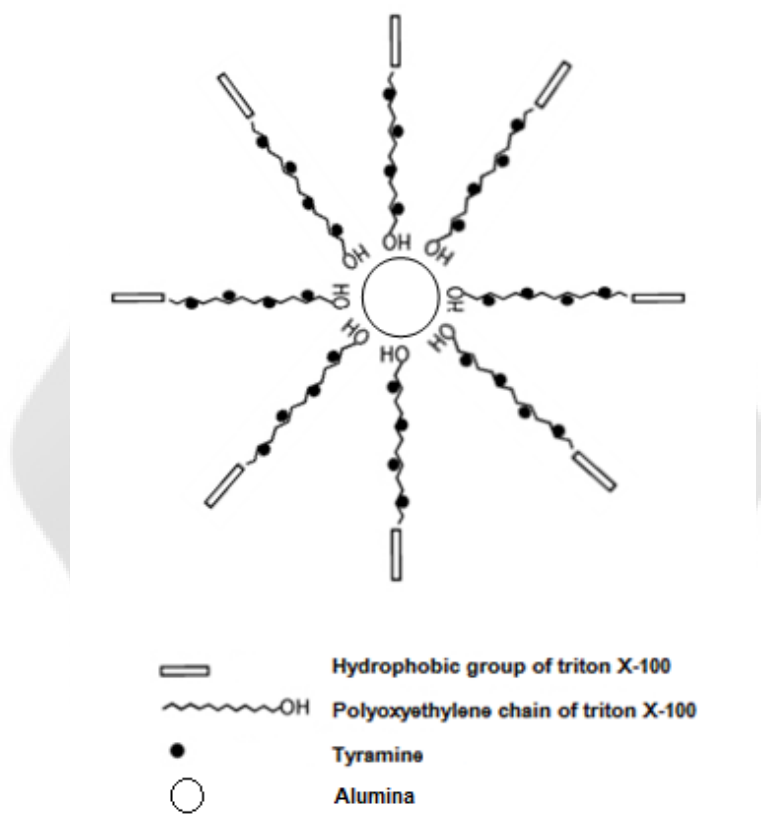
1. การสังเคราะห์ตัวดูดซับ ALU-TX 100 ซึ่งเกิดจากการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวชนิดไตรตัน เอกซ์ 100 บนตัวดูดซับอะลูมินาที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง โดยการดูดซับเกิดจากการสร้างพันธะไฮโดรเจน ระหว่างอะตอมของ O หรือ H ของตัวดูดซับอะลูมินากับส่วนของส่วนที่มีขั้วของไตรตัน เอกซ์ 100 เกิดเป็นไมเซลล์โดยแสดงแบบจำลองโครงสร้างในภาพประกอบ 29



..... แทน พันธะไฮโดรเจน

ภาพประกอบ 29 แบบจำลองโครงสร้างของตัวดูดซับ ALU-TX 100 แบบไมเซลล์

2. ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งเมื่อประยุกต์ใช้ตัวดูดซับที่เหมาะสมคือ ALU-TX 100 สามารถดูดซับสารไทรามินได้ดีมากกว่าตัวดูดซับชนิด C18 ที่นิยมใช้ โดยไทรามินเกิดอันตรกิริยาบนตัวดูดซับ ALU-TX 100 ด้วยแรงไฮโดรโฟบิก ระหว่างหมู่เอมีนของไทรามินกับหมู่อีเทอร์ของสายพอลิออกซีเอทิลีน (polyoxyethylene) ของไตรตันเอกซ์ 100 ดังแสดงในภาพประกอบ 30 และทำการชะไทรามินออกจากตัวดูดซับด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เนื่องจากมีความแรงไอออนิกที่มากพอที่จะดึงไทรามินที่จับอยู่กับตัวดูดซับให้หลุดออกมา



ภาพประกอบ 30 การดูดซับไทรามินบนตัวดูดซับ ALU-TX 100

3. สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไทรามินในตัวอย่างกระชายดำด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และตรวจวัดด้วยตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนซ์ โดยการเตรียมอนุพันธ์กับ OPA ก่อนนำมาแยกด้วยคอลัมน์ ช่วยเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์สูงและใช้เวลาในการทำอนุพันธ์น้อยมาก แต่มีข้อเสียคืออนุพันธ์ที่เกิดขึ้นไม่มีความเสถียร และจากการศึกษาสารรบกวนที่อาจส่งต่อการวิเคราะห์ปริมาณไทรามินพบว่ากรดอะมิโน 4 ชนิด ได้แก่ ไทโรซีน ฮิสติดีน ออร์นิทีน และไลซีน ไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไทรามิน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทราบปริมาณของไทรามีนที่พบในตัวอย่างกระชายดำก่อน เพื่อนำมาใช้ในการเลือกความเข้มข้นของไทรามีนที่เหมาะสม ในขั้นตอนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี
2. ในขั้นตอนการศึกษาชนิดของตัวดูดซับที่เหมาะสม ควรเพิ่มการศึกษาความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวของตัวดูดซับแต่ละชนิด เนื่องจากอาจมีผลต่อความสามารถในการดูดซับสารไทรามีนและเพิ่มขั้นตอนการล้างเพื่อใช้เปรียบเทียบก่อนและหลังการดูดซับของตัวดูดซับแต่ละชนิด เพื่อใช้ในการเลือกตัวดูดซับที่เหมาะสม
3. การเตรียมสารมาตรฐานไทรามีนและสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ ควรเตรียมใหม่ทุกๆ หนึ่งสัปดาห์ เนื่องจากสารดังกล่าวไม่มีความเสถียรและสลายตัวได้ง่าย





บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ดวงกมล เรืองงาม. (2557). *การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ*. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา).
กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
ถ่ายเอกสาร.
- นุศรา ดาวโรจน์. (2550). *ผลของสารสกัดจากกระชายดำและกระเจี๊ยบแดงต่อความต้านเลือดแดงและ
การทำงานของไตในหนูแร้ท*. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (สรีรวิทยา). สงขลา: บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ถ่ายเอกสาร.
- เยาวลักษณ์ จิตต์ภักดี. (2543). *แบคทีเรียที่ทำให้เกิดฮีตามีนในปลาอินทรีเค็ม*. ปรินูญานิพนธ์
วท.ม. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่าย
เอกสาร.
- วีรชัย สิงห์ทอง. (2556). *การวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอเจนิคเอมีนในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพื้น
เมืองไทย*. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- ศิริรัตน์ ต้นไสว. (2547). *การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกทนร้อนที่ผลิตสารไบโอเจนิค
เอมีนจากอาหารหมักไทย*. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิต
วิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- Alireza, A.; & Bahram, M. (2014). Nano-alumina coated with sodium dodecyl sulfate and
modified with 4-(2-Pyridylazo) resorcinol for extraction of heavy metals in different
matrixes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 20: 824–829.
Amino Acid Analysis Overview. (n.d.). Retrieved August 10, 2015, from
<http://www.biosyn.com/tew/amino-acid-analysis-overview.aspx>
- Arnnok, P.; & Burakham, R. (2014). Retention of Carbamate Pesticides by Different
Surfactant-Modified Sorbents: a Comparative Study *J. Braz. Chem. Soc.* 25: 1720-
1729.
- Baker, S. (1991). Solid Phase Extraction: A Viable Alternative. *Laboratory Equipment
Digest*.
- Busto, O.; Guasch, J.; & Borrull, F. (1995). Improvement of a solid-phase extraction method
for determining biogenic amines in wines. *J. of Chromatogr. A*. 718: 309-317.

- Charalampous, P.; et al. (2008). Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Food Chem.* 106: 1218– 1224.
- Diaz-Cinco, M.E.; et al. (1992). Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationships to histamine. *J. Food Sci.* 57: 355-365.
- González de Llano, D.; Cuesta, P.; & Rodríguez, A. (1998). Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 270-274.
- Halász, A.; et al. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Tech.* 5: 42–49.
- Hernández-Herrero, M.M.; et al. (1999). Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J. Food Protect.* 62: 509-514.
- Hongyang, P.; et al. (2013). Determination of biogenic amines in cheese by nanofiber solid phase extraction-reversed phase high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *Food, Agriculture & Environment.* 11: 115-118.
- Hossein, T.; Gohar, D.R.; & Pegah, P. (2013). Preconcentration and speciation of Cr (III) and Cr (VI) in water and soil samples by spectrometric detection via use of nanosized alumina-coated magnetite solid phase. *Environ Monit Assess.* 185: 7723–7738.
- Jianyong, W.; Lidong, L.; & Foo-tim, C. (2001). Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrason. Sonochem.* 8: 347–352.
- Komprda, T.; et al. (2008). Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiol.* 25: 219–227.
- Ladero, V.; et al. (2010). Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition & Food Science.* 1-27.
- Lange, A.B. (2009). Tyramine: From octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. *General and Comparative Endocrinology.* 162: 18–26.
- Laurier, L.S. (2000). Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry. *Cambridge university press.* 5-6.

- Lourdes, A.; Angel, R.; & Miguel, V. (1998). Direct determination of biogenic amines in wine by integrating continuous flow clean-up and capillary electrophoresis with indirect UV detection. *J. of Chromatogr. A.* 803: 249–260.
- Luliński, P.; et al. (2014). A separation of tyramine on a 2-(4-methoxyphenyl)ethylamine imprinted polymer: An answer from theoretical and experimental studies. *Talanta.* 129: 155-164.
- Marklinder, I.; & Lönner, C. (1992). Fermentation properties of intestinal strains of *Lactobacillus*, of a sour dough and of a yoghurt starter culture in an oat-based nutritive solution. *Food Microbiol.* 9: 197-205.
- Masson, F.; et al. (1997). Effect of physico-chemical factors influencing tyramine production by *Carnobacterium divergens*. *J. Appl. Microbiol.* 83:36-42.
- Nakthong, P.; & Muangthai, P. (2015). Tyramine and Histamine content in some Thai medicinal plants. *Proceedings of the Burapha University International Conference.* 370-376.
- Paleologos, E.K.; & Kontominas, M.G. (2004). On-Line Solid-Phase Extraction with Surfactant Accelerated On-Column Derivatization and Micellar Liquid Chromatographic Separation as a Tool for the Determination of Biogenic Amines in Various Food Substrates. *Anal. Chem.* 76: 1289-1294.
- Partitioning (Extractions): Solid-Phase Extraction sequence.* (n.d.). Retrieved August 7, 2015, from <https://ufl.instructure.com/courses/313181/pages/partitioning-extractions-solid-phase-extraction-sequence>.
- Pavel, K.; et al. (2000). Changes in biogenic amine concentrations during sauerkraut storage. *Food Chem.* 69: 309-314.
- Peña-Gallego, A.; et al. (2009). Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction: A comparative study. *J. of Chromatogr. A.* 1216: 3398–3401.
- Piotr, L.; et al. (2014). A separation of tyramine on a 2-(4-methoxyphenyl)ethylamine imprinted polymer: An answer from theoretical and experimental studies. *Talanta.* 129: 155–164.
- Richard, J.F. (2006). *Chemistry and Technology of Surfactants.* 39-41.

- Roseiro, L.B.; et al. (2013). Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Ind. Crop. Prod.* 47: 132–138.
- Rostagno, M.A.; Palma, M.; & Barroso, C.G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. of Chromatogr. A.* 1012: 119–128.
- Ruiz-Capillas, C.; & Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44:489–499.
- Ruiz-Jiménez, J.; & Luque de Castro, M.D. (2006). Pervaporation as interface between solid samples and capillary electrophoresis Determination of biogenic amines in food. *J. of Chromatogr. A.* 1110: 245–253.
- Rujjanawate, C.; et al. (2005). Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J. Ethnopharmacol.* 102: 120-122.
- Sagratini, G.; et al. (2012). Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 132: 537–543.
- Schinor, E.C.; et al. (2004). Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. *Ultrason. Sonochem.* 11: 415-421.
- Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29: 675-690.
- Silla Santos, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiology.* 29: 213-231.
- Som, I.; Bhatia, K.; & Mohd, Y. (2012). Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. *J. Pharm. Bioall. Sci.* 4: 2-9.
- Soufleros, E.; Barrios, M.L.; & Bertrand, A. (1998). Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 266-278.
- Tabaraki, R.; & Nateghi, A. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 18: 1279–1286.

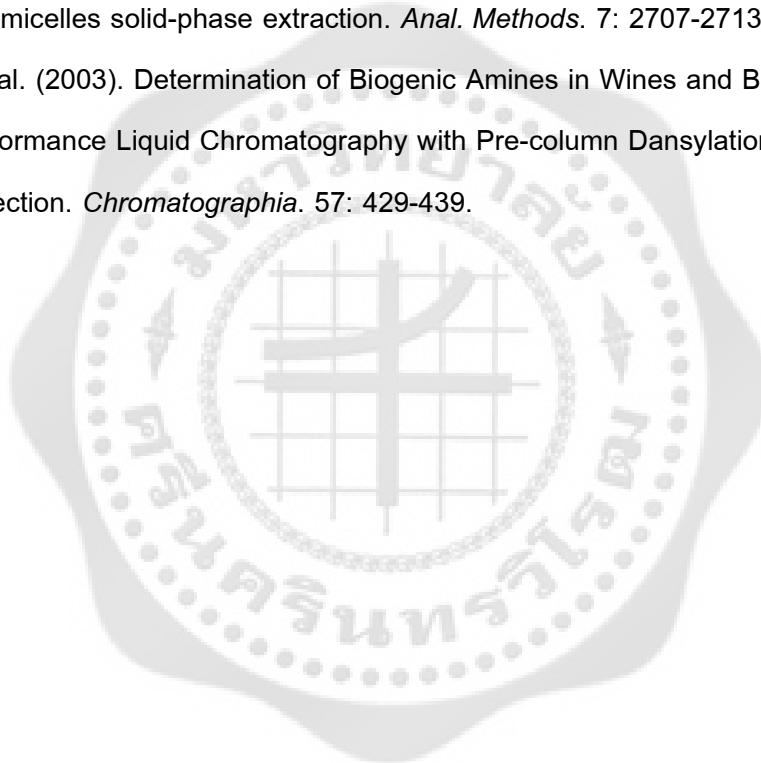
Tao, T.; et al. (2011). Monitoring the contents of biogenic amines in sufu by HPLC with SPE and pre-column derivatization. *Food Control*. 22: 1203-1208.

The Fitness for Purpose of Analytical Methods; A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topic. (1998). *EURACHEM Guide*. 1st.

Yenjai, C.; et al. (2004). Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitotherapia*. 75: 89-92.

Zhang, F.; et al. (2015). Preparation of barium sulfate-coated magnetite particles for the extraction of trimethoprim from environmental water samples based on mixed hemimicelles solid-phase extraction. *Anal. Methods*. 7: 2707-2713.

Zotou, A.; et al. (2003). Determination of Biogenic Amines in Wines and Beers by High Performance Liquid Chromatography with Pre-column Dansylation and Ultraviolet Detection. *Chromatographia*. 57: 429-439.



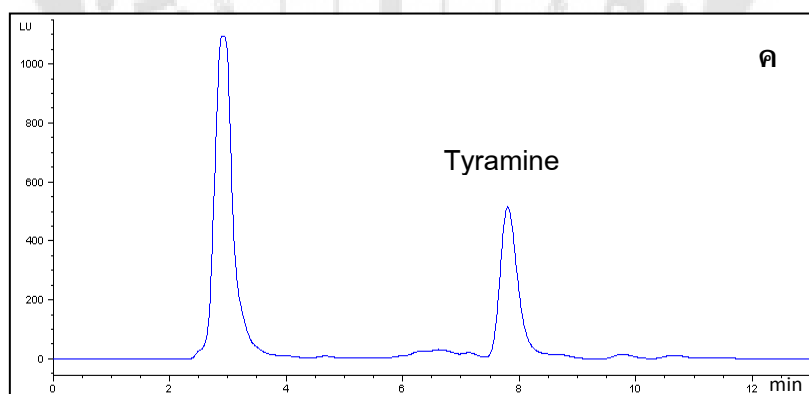
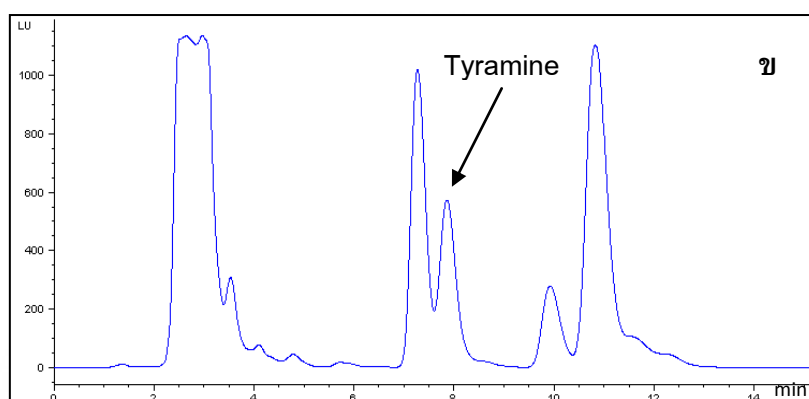
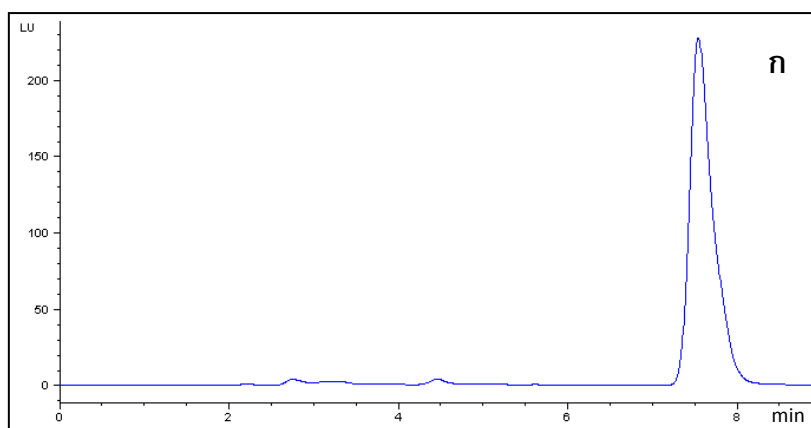
ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

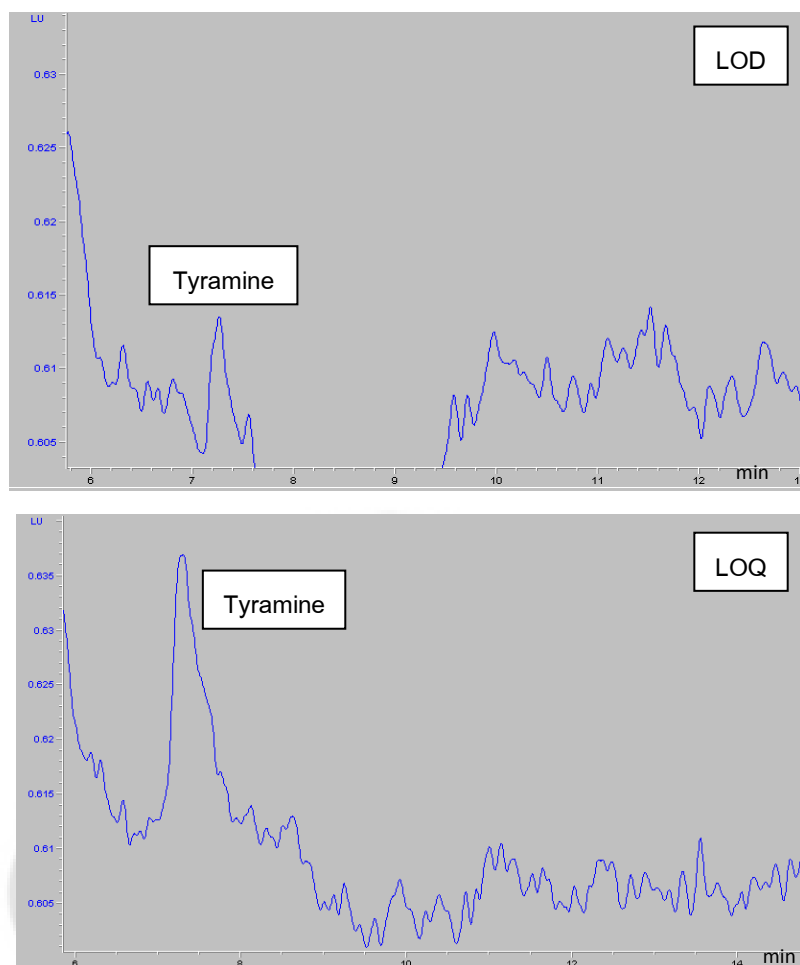
โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง



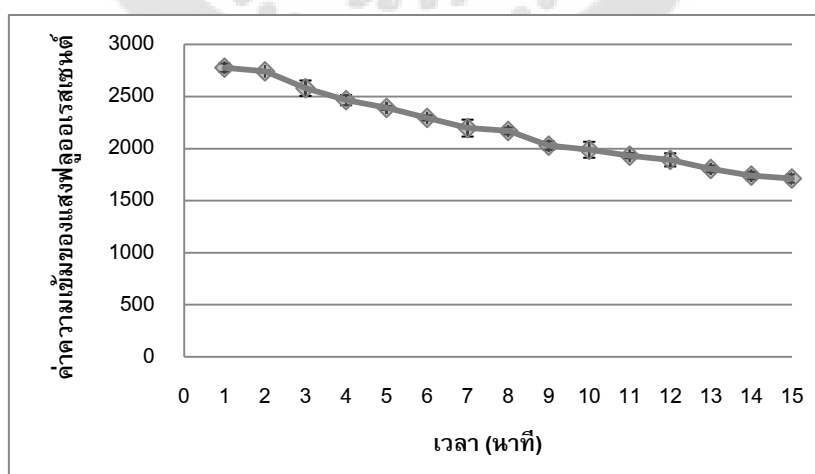


ภาพประกอบ 31 โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างเมื่อผ่านการเตรียมตัวอย่าง

โดย ก แทน โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไทรามินความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ข แทน โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างสารสกัดแคปซูลกระชายดำ และ ค แทน โครมาโทแกรมที่ได้จากสารสกัดแคปซูลกระชายดำหลังผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี



ภาพประกอบ 32 โครมาโทแกรมของการหาค่า LOD และ LOQ ตามลำดับ



ภาพประกอบ 33 กราฟผลการศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง OPA กับไทราซีน

ภาคผนวก ข

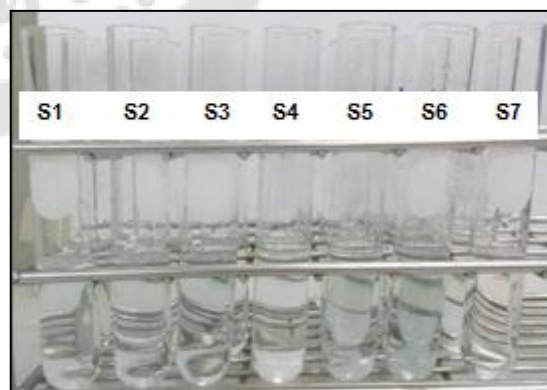
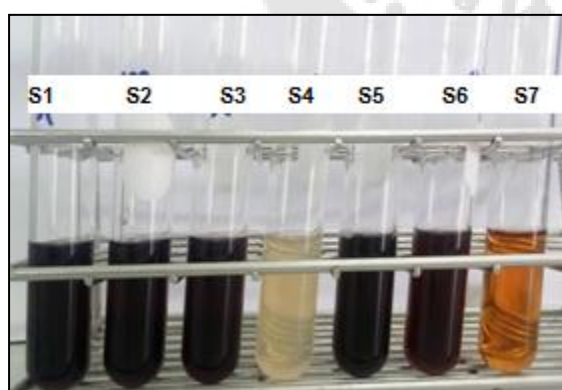
ภาพตัวอย่างกระดาษดำและขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง



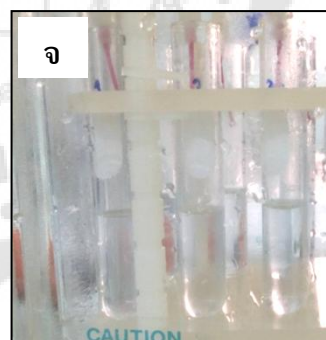
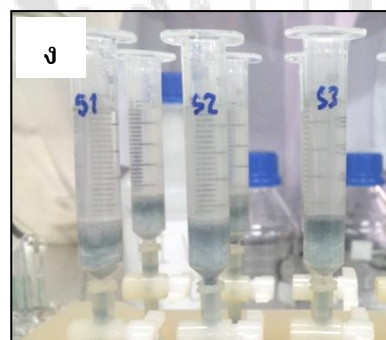
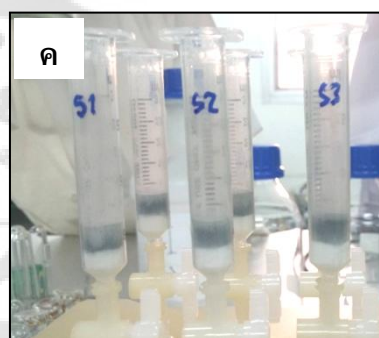
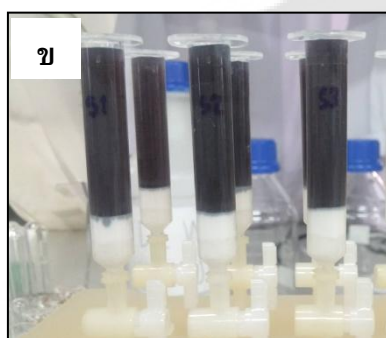


ภาพประกอบ 34 ตัวอย่างกระชายดำที่ใช้ในการทดลอง

ก แทน เหง้ากระชายดำสด (S1, S2) ข แทน กระชายดำอบแห้ง (S3)
 ค แทน แคปซูลกระชายดำ (S5) ง แทน แคปซูลกระชายดำ (S4)
 จ แทน ยาขงกระชายดำ (S6) ฉ แทน ยาตองกระชายดำ (S7)



ภาพประกอบ 35 สารสกัดกระชายดำก่อนและหลังผ่านวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยระบบไมเซลล์โครมาโทกราฟี



ภาพประกอบ 36 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง

- โดย ก แทน เตรียม SPE vacuum manifolds และทำการเตรียมตัวดูดซับ
 ข แทน ทำการเติมสารตัวอย่าง
 ค แทน ทำการล้างสารรบกวน
 ง แทน ทำการชะสารไทรามีน
 จ แทน เก็บส่วนสารละลายไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ภาคผนวก ค

ภาพเครื่องมือและอุปกรณ์





ภาพประกอบ 37 ชุด SPE vacuum manifolds



ภาพประกอบ 38 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



ภาพประกอบ 39 เครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์



ภาพประกอบ 40 เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์



ภาพประกอบ 41 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



ภาพประกอบ 42 เครื่องอัลตราโซนิก

ประวัติย่อผู้วิจัย



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล นางสาวปรารักษ์ทิพย์ นาคทอง
 วันเดือนปีเกิด 30 สิงหาคม 2533
 สถานที่เกิด บ้านเลขที่ 15 ถนนเสรีไทย เขตคันนายาว แขวงคันนายาว
 จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10230

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2552 จากโรงเรียนบางกะปิ จังหวัดกรุงเทพมหานคร
 พ.ศ. 2555 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี
 จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
 พ.ศ. 2559 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
 จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

ทุนการศึกษา

ได้รับทุนการศึกษาของโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์
 แห่งประเทศไทย) Science Achievement Scholarship of Thailand, SAST ประเภททุนการศึกษา
 ที่รับคือปริญญาตรี-โท-เอก โดยเริ่มรับทุนการศึกษาตั้งแต่ภาคเรียนที่ 2 ปี พ.ศ. 2552

การนำเสนอผลงาน

- Full Proceeding on Burapha University International Conference 2015,
 July2015, Thailand.
- Full Proceeding on 27th International conferences on Engineering and
 Natural Science 2016 (ICENS2016), February 2016, Singapore.
- บทความวิชาการบทเพิ่มเติม ในการประชุมวิชาการ “มศว วิจัย” ครั้งที่ 9 มหาวิทยาลัย
 ศรีนครินทรวิโรฒ, 28-29 กรกฎาคม 2559, กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย.