

วิเคราะห์ปริมาณทอรั้นในตัวอย่างน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปโดยเทคนิค
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2558

วิเคราะห์ปริมาณทอรั้นในตัวอย่างน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปโดยเทคนิค
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

กรกฎาคม 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

วิเคราะห์ปริมาณทอรั้นในตัวอย่างน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปโดยเทคนิค
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2558

รพีพัฒน์ บัวสุวรรณ. (2558) *วิเคราะห์ปริมาณทอรีนในน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมี) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์:
รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบสาร 2 ชนิดคือออร์โท-พทาเลออัลดีไฮด์และฟลูออเรสตามีนที่ใช้เตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับทอรีนแล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในรูปของสารอนุพันธ์ในตัวอย่งน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์ พบว่าออร์โท-พทาเลออัลดีไฮด์มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมากกว่าฟลูออเรสตามีน โดยมีความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสง 333 และ 451 นาโนเมตร ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 5.4 ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์) : อะซิโตนไไตรล์อัตราส่วน 70.30 (v/v) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที ที่สภาวะนี้สามารถแยกทอรีนออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ในน้ำมันได้คอลัมน์ที่ใช้เป็นระบบรีเวิร์สเฟสชนิด C18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวเท่ากับ 4.6 และ 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน กราฟมาตรฐานอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.005 - 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ให้สมการถดถอย $y = 2016.6x + 7.0782$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.999 ชัดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณคือ 0.001 และ 0.005 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ความแม่นยำของการวิเคราะห์โดยค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง $80.03 \pm 1.20 - 94.76 \pm 1.36$ ความเที่ยงของการวิเคราะห์ให้ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 1.26 - 4.71 นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลจากการดะมิโน ผลของอุณหภูมิและสภาวะความเป็นกรด-เบส ผลการทดลองพบว่ากรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง คือ ฮิสเทอีน เมไทโอนีนและไลซีน ทั้ง 3 ชนิดไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในน้ำมัน ผลจากการให้ความร้อนด้วยน้ำเดือดที่เวลา 0-60 นาที ไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณทอรีนและผลการศึกษาสภาวะกรด-เบส ในการเกิดปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์กับทอรีนจะเกิดได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง สุดท้ายเมื่อนำวิธีการตรวจสอบไปวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่งน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปจำนวน 15 ชนิด พบว่า ตัวอย่งน้ำมันทุกตัวอย่งมีปริมาณทอรีนในช่วง $1.87 \pm 0.07 - 294.68 \pm 2.24$ มิลลิกรัม/กิโลกรัม

Determination of taurine content in fresh cow milk and processed cow milk samples by
high performance liquid chromatography

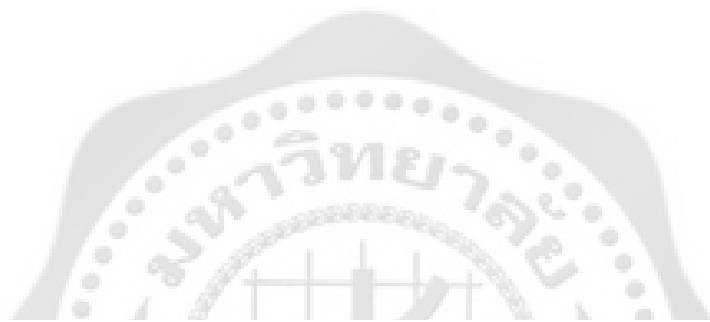


Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University

July 2015

Rapeepat Buasuwan. (2015). *Determination of taurine content in fresh cow milk and processed cow milk samples by high performance liquid chromatography*. Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Associate Professor Dr. Pornpimol Muangthai.

This objective of this research was to study the method to analyse taurine content using high-performance liquid chromatography by derivatization method. O-phthalaldehyde and fluorescamine were reagents that reacted with taurine to be fluorescence products and detected by fluorescence detector that measure The result presented that O-phthalaldehyde was the optimum reagent for derivatized with taurine. The excitation wavelength and emission wavelength was 333 and 451 nm respectively. The mobile phase system was 0.02 M phosphate buffer pH 5.4: acetonitrile as 70 : 30 and controlled flow rate at 1.0 ml / minutes. Taurine was separated in reversed-phase fortis C-18 5 μ m diameter 4.6 x 250 mm. The linearity range of standard taurine calibration curve was in the range of 0.005 to 1.0 mg/L. The regression equation of standard curve was $y = 2016.6x + 7.0782$ and the correlation coefficient (R^2) was 0.999; limit of detection, limit of quantitation, %recovery and %RSD was 0.001, 0.005 mg/L, 80.03% $\pm$ 1.20 - 94.76% $\pm$ 1.36 and 1.26 - 4.71 % respectively. The effect of other amino acids, heating effect and pH were also studied. The result revealed that cysteine, methionine and lysine not effect on the analysis, heating of taurine in boiling water 0-60 minutes does not affect on taurine content and the reactions between taurine and O-phthalaldehyde well performed in neutral condition. The method was applied to analyse taurine in 15 types of fresh cow milk and processed cow milk samples. The results showed that all milk samples contained taurine in the range of 1.87 ± 0.07 to 294.68 ± 2.24 mg/kg.



งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาจากงบประมาณ
เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2557



ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
วิเคราะห์ปริมาณทอรั้นในตัวอย่างน้ำมันโศสดและน้ำมันแปรรูปโดยเทคนิค
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
ของ
รพีพัฒน์ บัวสุวรรณ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย ตัณตวิวัฒน์กุล)
วันที่ เดือน พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์
.....ที่ปรึกษาประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย) (อาจารย์ ดร.วินัย อวงพิพัฒน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะยุไชะ ภูโน)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ ความอนุเคราะห์ อย่างยิ่งจากคณาจารย์ในภาควิชาเคมีหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ

รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และชี้แนะ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการแก้ปัญหาทุกขั้นตอนอันเกิดจากการวิจัยและการ เขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.วินัย อวงพิพัฒน์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการใน การสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะยุไซะ ภูโน ที่ให้ความกรุณาในการ เป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ ประธานกรรมการบริหารหลักสูตร และคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเมตตาเอาใจใส่แก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี ที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกๆ ท่านเป็นอย่างยิ่ง ผู้วิจัย ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และญาติสนิททุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดู ให้กำลังใจและให้การ สนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัย ขอขอบคุณอาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทุกๆ ท่านที่มีได้กล่าว รายนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

รพีพัฒน์ บัวสุวรรณ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ทอรีนและกรดอะมิโน.....	4
ความสำคัญและบทบาทของทอรีนต่อมนุษย์.....	8
วิธีวิเคราะห์ปริมาณทอรีน.....	10
สารที่ใช้เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน.....	11
แหล่งที่พบทอรีน.....	13
นมและองค์ประกอบของนม.....	15
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน.....	20
3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	23
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	23
วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนเมื่อใช้สารอนุพันธ์ต่างกัน.....	24
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเทคนิค	
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	27
ศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ทอรีนในนม.....	28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
การทวนสอบวิธีวิเคราะห์.....	30
วิเคราะห์ปริมาณทอรีนในผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแตกต่างกัน.....	32
4 ผลการทดลอง	34
ตอนที่ 1 ผลการเปรียบเทียบสารที่ใช้ทำสารอนุพันธ์ของทอรีน	
การวิเคราะห์ทอรีนโดยใช้สารอนุพันธ์เป็นออร์โท-ฟทาลัลดีไฮด์.....	34
การวิเคราะห์ทอรีนโดยใช้สารอนุพันธ์เป็นฟลูออเรสคามีน.....	36
ตอนที่ 2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน ด้วยเทคนิค	
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	
ผลการศึกษาหาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม.....	41
ผลการศึกษาหาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม.....	44
ผลการศึกษาหา pH ที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	47
ผลการศึกษาผลกระทบของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา.....	49
ตอนที่ 3 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ทอรีนในนม	
ศึกษาผลกระทบของกรดอะมิโนซิสเทอีน เมธไทโอนีน และไลซีน.....	51
ผลกระทบของระยะเวลาในการให้ความร้อนต่อทอรีน.....	52
ผลกระทบของความเป็นกรด-ด่าง ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา.....	53
ตอนที่ 4 การทวนสอบวิธีวิเคราะห์	
การสร้างกราฟมาตรฐานของสารอนุพันธ์ของทอรีน.....	54
ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัด	
ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ).....	54
ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Accuracy).....	55

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์ (Precision).....	55
ตอนที่ 5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านกระบวนการ แปรรูปแตกต่างกัน.....	56
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	58
บรรณานุกรม.....	61
ภาคผนวก.....	65
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	77

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตัวอย่างหน้าที่ของกรดอะมิโนบางชนิด ที่ไม่ใช่ส่วนประกอบโครงสร้างของโปรตีน....	6
2 ปริมาณทอรีนในอวัยวะต่างๆ ในคนและสัตว์.....	9
3 ปริมาณทอรีนในอาหารประเภทต่างๆ.....	14
4 ปริมาณขององค์ประกอบหลักในนมที่มีการเก็บน้ำนมในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน.....	18
5 ปริมาณองค์ประกอบหลักในน้ำนมแพะและน้ำนมแกะ.....	19
6 เปรียบเทียบผลการทดลองภายใต้สภาวะที่ต่างกันและสารอนุพันธ์ที่ต่างกัน	40
7 ค่าระยะเวลารีเทนชันและค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานทอรีน.....	42
8 ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมโคสดและน้ำนมแปรรูปที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	57

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างหลักของกรดอะมิโนที่เป็นหน่วยย่อยของโปรตีน.....	5
2 กระบวนการเมตาบอลิซึมของซิสเทอีน.....	7
3 การเกิดสารอนุพันธ์ของทอรีนกับ OPA, fluorescamine และ 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan.....	12
4 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 0.1 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้อร์โท-พทาเลอดีไฮด์ เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีน.....	34
5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่อพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานทอรีน เมื่อใช้อร์โท-พทาเลอดีไฮด์เตรียมเป็นสารอนุพันธ์.....	36
6 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 – 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ฟลูออเรสคามีน เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีน.....	37
7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่อพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานทอรีน เมื่อใช้ฟลูออเรสคามีนเตรียมเป็นสารอนุพันธ์.....	38
8 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร.....	39
9 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน.....	42
10 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากน้ำมันแปรรูปเมื่อใช้อัตราส่วน ของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน.....	43
11 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน.....	45
12 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดตัวอย่างน้ำมันแปรรูปโดยใช้อัตราการไหล ของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน.....	46
13 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานทอรีนเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีค่า pH แตกต่างกัน	48
14 โครมาโทแกรมของสารสกัดน้ำมันเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีค่า pH แตกต่างกัน.....	48

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
15 ปฏิริยาาระหว่างออโท-พทาลอัลดีไฮด์กับกรดอะมิโน.....	49
16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคของสารอนุพันธ์ของทอรีนกับ ออโท-พทาลอัลดีไฮด์เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน.....	50
17 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีน เมธไทโอนีน ซิสเทอีนและไลซีน ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร.....	51
18 ค่าของพื้นที่ใต้พีคของสัญญาณทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อผ่านการ ให้ความร้อนที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	52
19 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีน เมื่อเตรียมในสารละลาย ที่มีสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน.....	54
20 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานทอรีน และพื้นที่ใต้พีค.....	55
21 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร...	67
22 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนในสารสกัดจากตัวอย่างน้ำนมที่มีการเติมสาร มาตรฐานทอรีนเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร.....	67
23 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนในสารสกัดจากตัวอย่างน้ำนม.....	68
24 โครมาโทแกรมของสารละลายแบลนด์ (blank).....	68
25 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของทอรีนความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัม/ลิตร..	69
26 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของทอรีนความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัม/ลิตร..	69
27 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	74
28 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน.....	74
29 อ่างน้ำร้อนที่ใช้ศึกษาผลของระยะเวลาในการเวลาให้ความร้อนด้วยน้ำเดือด.....	75
30 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge).....	75
31 เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ (Fluorescence Spectrometer).....	76

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ทอรีน (Taurine หรือ 2-Aminoethane Sulfonic Acid) เป็นกรดอะมิโนอิสระที่มีคุณสมบัติเป็นกลางและไม่ใช้หน่วยย่อยของโปรตีน ภายในโครงสร้างของทอรีนมีกำมะถันหรือซัลเฟอร์ (Sulfur) เป็นองค์ประกอบ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นสามารถสร้างทอรีนได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยมีซิสเทอีน (Cysteine) เป็นสารตั้งต้นและทอรีนจะถูกขับออกทางปัสสาวะ (Shifen, M.; et al. 2002: 251-267) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นมักจะพบทอรีนอยู่บริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ อีกทั้งยังพบได้ในน้ำนมของมนุษย์ในระยะให้นมบุตรและในน้ำนมวัวอีกด้วย ทอรีนนั้นมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์ พบว่าเด็กที่มีภาวะขาดทอรีนในระดับปานกลางจะทำให้เด็กคนนั้นเจริญเติบโตช้า ยิ่งไปกว่านั้นถ้ามีอาการขาดทอรีนอย่างรุนแรงอาจทำให้เกิดอาการเซื่องซึม ผอมเปลี่ยนสี ตับถูกทำลาย สูญเสียกล้ามเนื้อและไขมัน ผอม ผิวหนังอักเสบหรือแห้ง เหงาหงอยและอ่อนเพลียได้ อีกทั้งถ้าร่างกายได้รับวิตามินบี 6 น้อยเกินไปหรือผู้ที่มีพฤติกรรมบริโภคอาหารประเภทมังสวิรัตินั้นไม่รับประทานไขมันก็สามารถทำให้ร่างกายเกิดภาวะขาดทอรีนได้เช่นกัน เนื่องจากวิตามินบี 6 ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในการสร้างทอรีนของร่างกาย (ประสงค์ เทียนบุญ. 2004: 15) นอกจากนี้ทอรีนยังมีความสามารถในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจได้ ซึ่งโรคที่เกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจนั้นเป็นสาเหตุสำคัญอันดับต้นๆ ที่ทำให้เกิดการสูญเสียของประชากรในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยกลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจนั้นมักเป็นกลุ่มบุคคลที่มีพฤติกรรมการสูบบุหรี่ ผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง ผู้มีภาวะของไขมันในร่างกายผิดปกติและบุคคลที่เป็นโรคเบาหวาน สำหรับในมนุษย์สามารถพบทอรีนได้ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น สมอง หัวใจ ตับ กล้ามเนื้อลาย เเรตินาและในเลือด จากโรคที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจดังที่กล่าวไว้ข้างต้นนั้นล้วนเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของอวัยวะดังกล่าวซึ่งทอรีนมีความจำเป็นต่อระบบการทำงานของอวัยวะต่างๆ เหล่านี้อย่างยิ่ง ดังนั้นเมื่อทอรีนส่งผลให้อวัยวะเหล่านี้ทำงานได้ดีจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้ด้วย (Oktawia, P.; et al. 2010: 19-25)

แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่ทราบบทบาททั้งหมดของทอรีนในร่างกายแต่เนื่องจากทอรีนมีคุณสมบัติเป็นสารสื่อประสาททำให้เมื่อร่างกายได้รับแล้วมีผลทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของมนุษย์ด้วย (Glance, E.; et al. 2012: 569-577) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการนำทอรีนไปใช้ในทาง

อุตสาหกรรมอาหารเพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ โดยการนำทอรีนไปใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องดื่ม ชูกำลังต่างๆ ในปริมาณถึง 1000 – 3000 มิลลิกรัม (Oktawia, P.; et al. 2010: 19-25)

นอกจากเครื่องดื่มประเภทชูกำลังแล้วในชีวิตประจำวันของคนเรานั้นมีโอกาสได้รับทอรีนเข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคอาหารได้อีกมากมายหลายประเภท เช่น เนื้อหมู เนื้อไก่ (บริเวณหน้าอกและ สะโพก) เนื้อวัว (บริเวณหน้าอกและสะโพก) หน่อไม้ฝรั่ง หอยนางรม นมวัว โยเกิร์ต นมพาสเจอร์ไรส์ หรือ แม้แต่ในไอศกรีมวานิลลาล้วนมีทอรีนอยู่เช่นกัน โดยในอาหารแต่ละประเภทแต่ละชนิดจะมีปริมาณ ทอรีนอยู่มากน้อยแตกต่างกัน (Laidlaw, S.; et al. 1990: 183-188) และปริมาณทอรีนจะไม่มีการ เปลี่ยนแปลงแม้ว่าอาหารนั้นจะผ่านกระบวนการกรรมวิธีปรุงสุกแล้วก็ตาม ซึ่งถ้าบริโภคอาหารแบบปกติ ในชีวิตประจำวันแล้วปริมาณทอรีนที่มนุษย์ได้รับจากอาหารใน 1 วัน (ไม่รวมที่ได้รับจากผัก) จะมี ปริมาณถึง 40 – 400 มิลลิกรัม (Stapleton, P.P.; et al. 1997: 103-108) (Finnegan, D.; et al. 2003: 147-55)

ในปัจจุบันวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณทอรีนนั้นสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การเตรียมเป็น สารอนุพันธ์และตรวจวัดด้วยเครื่องฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ หรือใช้ ตัวตรวจวัดเชิงเคมีไฟฟ้า วิธีที่ใช้ในการแยกทอรีนนั้นก็สามารถทำได้หลายวิธีเช่นกัน เช่น เทคนิครีเวิร์ส เฟสโครมาโทกราฟี (Reverse Phase Chromatography) หรือแยกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบ แลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion Exchange Chromatography) ทั้งนี้พบว่าสารที่ใช้ทำอนุพันธ์กับทอรีน สามารถเลือกใช้ได้หลายชนิด เช่น ออร์โท-ฟทาลัลดีไฮด์ (O-Phthalaldehyde, OPA) 2,4-ไดไนโตร ฟลูออโรเบนซีน (2,4-Dinitrofluorobenzene) 1-ไดเมทิลอะมิโนแนพทาลีน-5-ซัลโฟนิลคลอไรด์ (1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl Chloride) ฟลูออเรสคามีน (Fluorescamine) (Shifen, M.; et al. 2002: 251-267) (Tommaso, R.I.; et al. 2004: 626-630) (Feng, Q.; et al. 1999: 161-166)

เป็นที่ทราบกันดีว่านมมีคุณค่าทางโภชนาการต่อมนุษย์มากมาย ในปัจจุบันผู้คนมีการบริโภค นมมากขึ้น อีกทั้งยังมีผลิตภัณฑ์จากนมหลากหลายชนิดโดยผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีการปรุงแต่งเพิ่ม รสชาติให้ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคและเป็นการเพิ่มทางเลือกให้ผู้บริโภคอีกด้วย นอกจากนี้ใน ปัจจุบันก็มีรายงานเกี่ยวกับปริมาณทอรีนในนมเช่นกัน (Laidlaw, S.; et al. 1990: 183-188) โดย งานวิจัยนี้ทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ที่ต่างกัน ระหว่างสารอนุพันธ์ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้และสารที่ยังไม่มีรายงานการทำอนุพันธ์กับทอรีนเพื่อ นำไปใช้ในการศึกษาปริมาณทอรีนในตัวอย่างนมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปและการปรุงแต่งรสชาติ

2. ความมุ่งหมายของงานวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.2 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างนํ้านมโคสดและนํ้านมแปรรูปแต่ละประเภท

3. ความสำคัญของงานวิจัย

3.1 ได้สภาวะที่เหมาะสมตลอดจนปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณทอรีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.2 ได้ข้อมูลปริมาณทอรีนที่มีในนํ้านมโคสดและนํ้านมแปรรูปแต่ละประเภท

4. ขอบเขตของงานวิจัย

4.1 สภาวะที่ศึกษาในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงได้แก่

4.1.1 ค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นส่วนผสมในวัฏภาคเคลื่อนที่

4.1.2 อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์และสารละลายบัฟเฟอร์ของวัฏภาคเคลื่อนที่

4.1.3 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

4.1.4 ระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างทอรีนและสารอนุพันธ์

4.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่

4.2.1 กรดอะมิโน 3 ชนิด ได้แก่ ฮิสเตอีน เมไทโอนีนและไลซีน

4.2.2 ผลของระยะเวลาในการให้ความร้อนที่มีต่อปริมาณทอรีน

4.2.3 สภาวะความเป็นกรด-ด่างในการเตรียมสารอนุพันธ์ของทอรีน

4.3 สารอนุพันธ์ที่ใช้ 2 ชนิดได้แก่ ฟลูออเรสคามีนและออร์โทพทาเลอดีไฮด์

4.4 ตัวอย่างนํ้านมที่ใช้ในการศึกษาปริมาณทอรีน

4.4.1 นํ้านมโคสดพร้อมดื่ม ได้แก่ นํ้านมโคสดพาสเจอร์ไรส์ ยูเอชที และสเตอริไลส์

4.4.2 นํ้านมแปรรูปพาสเจอร์ไรส์รสต่างๆ ได้แก่ รสช็อคโกแลต และรสสตอเบอรี่

4.4.3 นํ้านมแปรรูปสเตอริไลส์ปรุงแต่งผสมมอลต์และชาขาว

4.4.4 นํ้านมแปรรูปยูเอชทีรสต่างๆ ได้แก่ รสหวาน รสช็อคโกแลต และรสสตอเบอรี่

4.4.5 นมเปรี้ยวปรุงแต่งรสชาติ ได้แก่ รสผลไม้รวม และรสสตอเบอรี่

4.4.6 นมผง

4.4.7 นมข้นหวาน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้เป็นการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณทอรีนโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์และตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอยางนม ซึ่งทอรีนเป็นสารในกลุ่มของกรดอะมิโนอิสระ ดังนั้นผู้วิจัยจะทำการเสนอหัวข้อต่างๆ ดังนี้

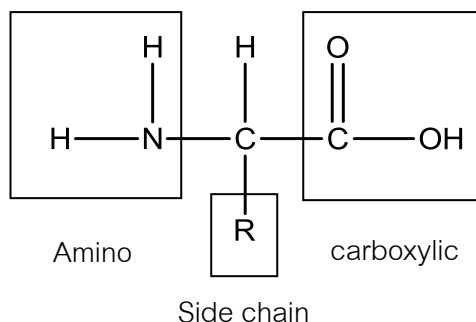
1. ทอรีนและกรดอะมิโน
2. ความสำคัญและบทบาทของทอรีนต่อมนุษย์
3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณทอรีน
4. สารที่ใช้ในการทำอนุพันธ์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณทอรีน
5. นมและองค์ประกอบของนม

ทอรีนและกรดอะมิโน

ทอรีน (Taurine หรือ 2-aminoethane sulfonic acid) เป็นกรดอะมิโนอิสระชนิดเบตา (β -amino acid) ที่มีกำมะถันหรือซัลเฟอร์ (Sulphur) อยู่ภายในโมเลกุลเช่นเดียวกับกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมธไทโอนีน โดยทอรีนนั่นเป็นกรดอะมิโนตัวหนึ่งที่มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ ซึ่งโมเลกุลของทอรีนนั้มีลักษณะคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนตัวหนึ่งชื่อว่าอะลานีน (Alanine) ที่มีหมู่ซัลโฟเนต (Sulphonate) เข้าไปแทนที่หมู่อะมิโนคาร์บอกซิลิก (Carboxylic group) ของโมเลกุลอะลานีน (Stapleton, P.P.; et al. 1997: 103-108)

โดยทั่วไปแล้วกรดอะมิโนเป็นหน่วยย่อยของสารชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งคือโปรตีน เมื่อกรดอะมิโนหลายๆ หน่วยเรียงตัวต่อกันขึ้นเป็นสายยาวๆ ที่เรียกว่าสายพอลิเปปไทด์จะทำให้เกิดเป็นโปรตีน ซึ่งสิ่งนี้ทำให้เกิดความแตกต่างของโปรตีนแต่ละชนิดนั้นคือลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนแต่ละหน่วยภายในสายโปรตีนนั้นๆ นั่นเอง กรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบหน่วยย่อยของโปรตีนนั้นมีอยู่ด้วยกัน 20 ชนิดโดยมีส่วนที่เป็นโครงสร้างหลักที่เหมือนกันคือมีไฮโดรเจน (-H) หมู่อะมิโน ($-\text{NH}_2$) หมู่อะมิโนคาร์บอกซิลิก ($-\text{COOH}$) และหมู่ที่เป็นโซ่ข้าง (side chain) ดัง ภาพประกอบ 1

กรดอะมิโนที่เป็นหน่วยย่อยของโปรตีนทั้ง 20 ชนิดนั้นจะมีความแตกต่างกันที่บริเวณโซ่ข้าง ซึ่งถ้าจำแนกกรดอะมิโนออกตามคุณสมบัติของโซ่ข้างแล้วจะสามารถจำแนกกรดอะมิโนได้เป็น 4 ประเภทได้แก่



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างหลักของกรดอะมิโนที่เป็นหน่วยย่อยของโปรตีน

1. กรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างไม่มีขั้ว ซึ่งกรดอะมิโนกลุ่มนี้มีโซ่ข้างเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำหรือมีลักษณะเป็นไฮโดรคาร์บอน
2. กรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างมีขั้ว ซึ่งกรดอะมิโนกลุ่มนี้มีโซ่ข้างละลายน้ำได้และที่ pH 7 นั้นจะไม่มี การแตกตัวเกิดเป็นประจุจากส่วนของโซ่ข้างเลย
3. กรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างมีสมบัติเป็นกรด กรดอะมิโนกลุ่มนี้ที่ pH 7 นั้นส่วนของโซ่ข้างจะแสดง สมบัติเป็นประจุลบ
4. กรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างมีสมบัติเป็นเบส กรดอะมิโนกลุ่มนี้ที่ pH 7 นั้นส่วนของโซ่ข้างจะแสดง สมบัติเป็นประจุบวก (เรื่องลักษณะ จากิกรณ์. 2547)

นอกจากการแบ่งกรดอะมิโนตามคุณสมบัติของโซ่ข้างในโมเลกุลแล้วยังสามารถแบ่งกรด อะมิโนตามลักษณะโครงสร้างของโซ่ข้างได้อีกด้วย เช่น ลักษณะโครงสร้างของโซ่ข้างเป็นอะลิฟาติก อะโรมาติก มีหมู่ไฮดรอกซีในโครงสร้าง มีกำมะถันหรือซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบของโซ่ข้าง เป็นต้น

กรดอะมิโนนั้นไม่เพียงเป็นหน่วยย่อยในโครงสร้างของโปรตีนเท่านั้น นอกเหนือจากกรด อะมิโนที่เป็นโครงสร้างของโปรตีนแล้วยังมีกรดอะมิโนอิสระอีกกว่า 200 ชนิดที่สามารถพบได้ใน ธรรมชาติ โดยกรดอะมิโนบางตัวอาจจะไม่ได้เป็นส่วนประกอบของโปรตีนเลยแต่มีหน้าที่สำคัญทาง ชีววิทยาหลายอย่าง เช่น เป็นตัวกลางในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ หรือเป็นส่วนประกอบของ ชีวโมเลกุลชนิดอื่นได้ด้วย ตัวอย่างกรดอะมิโนเหล่านี้แสดงดังตาราง 1

โดยปกติแล้วร่างกายของคนเราจะได้รับกรดอะมิโนจาก 2 แหล่งใหญ่ๆ คือจากอาหารโปรตีนที่ รับประทานเข้าไปแล้วถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนที่ลำไส้ และจากโปรตีนที่มีอยู่เดิมในร่างกายซึ่งสามารถ ถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนได้เช่นกัน กรดอะมิโนจากทั้ง 2 แหล่งนี้จะรวมกันอยู่ในรูปของอะมิโนแอซิดพูล

(Amino Acid Pool) ซึ่งอยู่บริเวณของเหลวภายนอกเซลล์เมื่อเนื้อเยื่อส่วนใดมีความจำเป็นในการใช้กรดอะมิโน ก็จะมาดึงกรดอะมิโนออกไปจากพูลนี้ตัวอย่างเช่น นำกรดอะมิโนจากพูลนี้ไปใช้ในการซ่อมแซมโปรตีนของเนื้อเยื่อหรือถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ประกอบไนโตรเจนต่างในร่างกาย เช่น ยูเรีย (Urea) เพียวรีน (Purine) ไพริมิดีน (Pyrimidine) เป็นต้น (เรื่องลักษณะ จามิกรณ์. 2547) นอกจากนี้ร่างกายยังนำกรดอะมิโนที่สะสมในพูลนี้ไปใช้เพื่อสังเคราะห์เป็นสารอื่นที่ใช้ควบคุมกระบวนการทำงานต่างๆ ในเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น นำไปสังเคราะห์กรดอะมิโนไทโรซีนเป็นฮอร์โมนอะดรีนาลีนซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการสลายและสังเคราะห์สารอาหารคาร์โบไฮเดรต (ดาร์ลีย์ จิมกู. 2555)

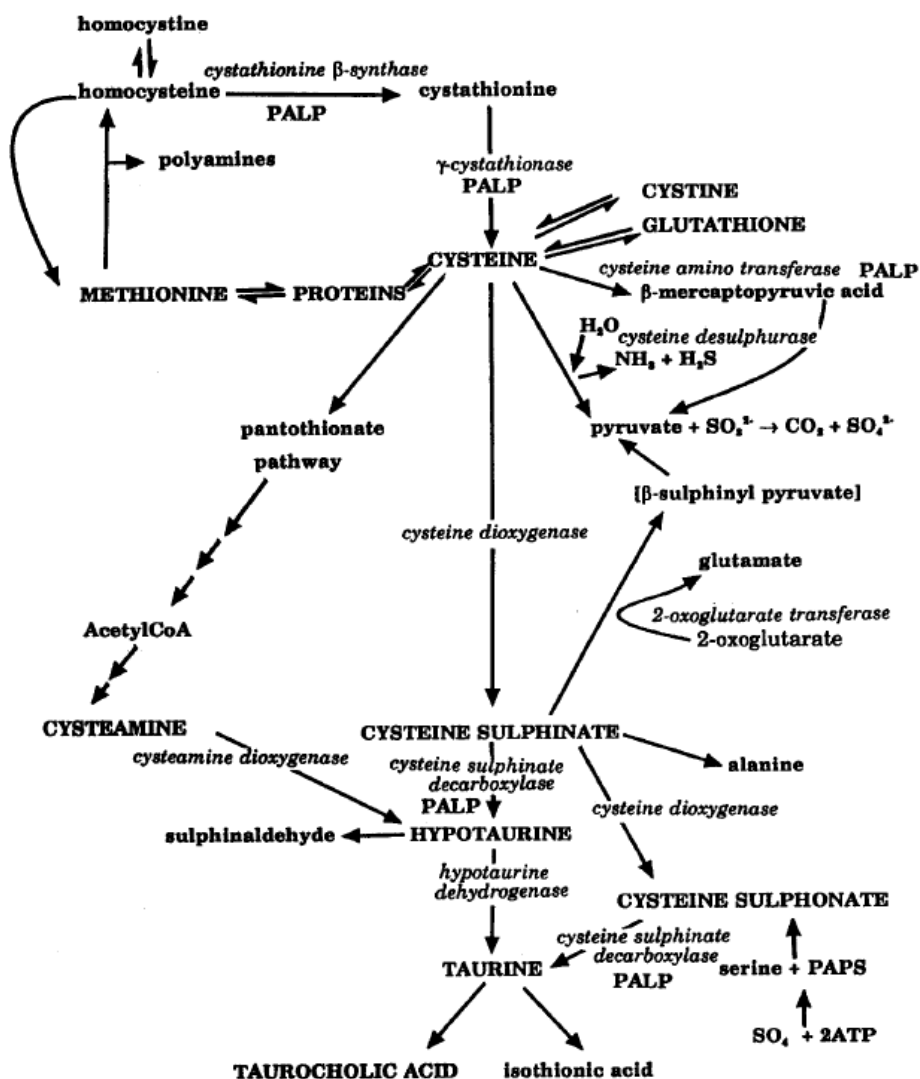
ตาราง 1 ตัวอย่างหน้าที่ของกรดอะมิโนบางชนิด ที่ไม่ใช่ส่วนประกอบโครงสร้างของโปรตีน

กรดอะมิโน	หน้าที่/สถานที่พบ
4-hydroxyproline	พบในโปรตีนคอลลาเจน
Demosine	พบในโปรตีนอีลาสติน ทำให้โปรตีนยืดตัวได้
3,5-diiodotyrosine	เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไอโอดีนในต่อมไทรอยด์
Canaline	เป็นกรดอะมิโนมีพิษที่สกัดได้จากถั่วแฉะคีน
β – alanine	เป็นส่วนในโครงสร้างของวิตามินตัวหนึ่งคือ กรดแพนโทเทนิก
Ornithine	เป็นสารตัวกลางที่พบในกระบวนการสังเคราะห์ยูเรีย
Citrulline	เป็นสารตัวกลางที่พบในกระบวนการสังเคราะห์ยูเรีย
Dihydroxyphenylalanine	เป็นสารตัวกลางที่พบในกระบวนการสังเคราะห์อะดรีนาลีน
Homocysteine	เป็นสารตัวกลางที่พบในกระบวนการสังเคราะห์โฮโมไธโอนีน
Homoserine	เป็นสารตัวกลางที่พบในกระบวนการสังเคราะห์รีโอโนน

ที่มา : ดัดแปลงจาก เรื่องลักษณะ จามิกรณ์ 2547

ทอรีนเป็นกรดอะมิโนอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ใช่หน่วยย่อยของโครงสร้างโปรตีนแต่ทำหน้าที่อย่างอื่นภายในร่างกาย ทอรีนมีคุณสมบัติเป็นกลาง มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 125 มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 300 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้ดีจนถึงความเข้มข้น 0.84 โมลาร์ (M) (ประสงค์ เทียนบุญ. 2004: 15)

ทอรีนมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนโดยมีค่าคงที่การแตกตัวหรือ pK_a เท่ากับ 4.96 และสามารถคงอยู่ในอาหารได้แม้จะผ่านกระบวนการปรุงสุกโดยการให้ความร้อนก็ตาม คุณสมบัติของทอรีนนี้นั้นไม่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงยูวีได้เนื่องจากไม่มีหมู่โครโมฟอร์ (Chromophore) อยู่ภายในโมเลกุลแต่สามารถอาศัยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์เพื่อทำให้ดูดกลืนคลื่นแสงยูวีหรือสามารถเกิดฟลูออเรสเซนส์ได้ (Shifen, M.; et al. 2002: 251-267)



ภาพประกอบ 2 กระบวนการเมตาบอลิซึมของซิสเทอีน

ทีมา (John, A.T.; et al. 1994: 453-462)

ทอรีนนั้นเป็นกรดอะมิโนที่ถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของซิสเทอีนภายในร่างกายโดยเกิดจากการที่กรดอะมิโนซิสเทอีนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) เกิดเป็นซิสเทอีนซัลฟินิกแอซิด (Cysteinesulfinic acid) จากนั้นซัลฟินิกแอซิดจะเกิดกระบวนการขจัดหมู่คาร์บอกซีหรือดีคาร์บอกซีเลชัน (Decarboxylation) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโปทอรีน (Hypotaurine) ซึ่งเมื่อไฮโปทอรีนนั้นเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้วจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นทอรีนเกิดขึ้น (Paul, H.; et al. 1998: 599-604) นอกจากนี้ทอรีนยังสามารถเกิดขึ้นได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของซิสเทอีนทางอื่นหรือหมายถึงเกิดขึ้นทางอ้อมได้อีก เช่น ซิสเทอีนถูกเปลี่ยนไปเป็นซิสเทอีนซัลฟิเนตแล้วจะถูกเปลี่ยนไปเป็นซิสเทอีนซัลโฟเนตก่อนจึงจะเกิดกระบวนการดีคาร์บอกซีเลชันทำให้เปลี่ยนเป็นทอรีน (John, A.T.; et al. 1994: 453-462) ซึ่งกระบวนการเมตาบอลิซึมของซิสเทอีนในร่างกายนั้นแสดงดังภาพประกอบ 2

จากภาพประกอบ 2 นั้นจะเห็นได้ว่ามีกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่งที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดทอรีนในกระบวนการเมตาบอลิซึมของซิสเทอีนซึ่งนั่นก็คือเมธไทโอนีน โดยเมธไทโอนีนสามารถถูกเปลี่ยนเป็นโฮโมซิสเทอีนและถูกเอนไซม์ซิสทาไทโอนีนเบตาซินเทส (Cystathionine β -synthase) เปลี่ยนให้เป็นซิสทาไทโอนีน (Cystathionine) ซึ่งซิสทาไทโอนีนนี้จะถูกเปลี่ยนให้กลับไปเป็นซิสเทอีน

ซิสเทอีนเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่มีกำมะถันหรือซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุล ซึ่งคุณสมบัติที่เด่นชัดของซิสเทอีนนั้นคือ ซิสเทอีน 2 โมเลกุลสามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลเกิดเป็นโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นไดเมอร์เรียกว่าซิสทีน (Cystine) การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ของซิสเทอีน 2 โมเลกุลนั้นพบอยู่ในโปรตีนหลายชนิดทำให้โปรตีนมีโครงสร้างแข็งแรง นอกจากนี้หมู่ซัลฟ์ไฮดริลที่อยู่ในกรดอะมิโนซิสเทอีนยังสามารถทำปฏิกิริยากับธาตุโลหะ เช่น ปรอท (Hg^{2+}) และเงิน (Ag^{2+}) ได้สารพวกเมอร์แคปไทด์หรือเอลแมนรีเอเจนต์เกิดเป็นสารที่มีสีได้ทำให้สามารถใช้วัดหาปริมาณของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปีได้ (ดาวัลย์ ฉิมภู. 2555) นอกจากนี้ซิสเทอีนยังเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญตัวหนึ่งในกระบวนการสังเคราะห์ทอรีนภายในร่างกายอีกด้วย (John, A.T.; et al. 1994: 453-462) ซึ่งทอรีนนั้นมีบทบาทสำคัญหลายอย่างต่อกระบวนการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์ของร่างกายอีกมากมาย

ความสำคัญและบทบาทของทอรีนต่อมนุษย์

ในปัจจุบันนั้นแม้จะยังไม่ทราบบทบาทและอิทธิพลทั้งหมดของทอรีนต่อมนุษย์แต่การทดสอบในสัตว์บางชนิดนั้นทอรีนมีบทบาทสำคัญหลายอย่าง เช่น ในปีค.ศ.1986 Gordon และคณะ

(Gordon; et al. 1986: 585-600) ทำการทดลองโดยการให้หนูแฮมสเตอร์ได้รับน้ำที่มีปริมาณทอรีนร้อยละ 0.5 ปรากฏว่าช่วยลดอาการชักเสบของแผลได้ต่อมาในปี 1992 Gordon และคณะ (Gordon; et al. 319-328) ทำการทดลองต่อมาโดยให้หนูได้รับน้ำที่มีปริมาณทอรีนร้อยละ 1 ปรากฏว่าช่วยลดพยาธิในเนื้อเยื่อปอดของหนูแฮมสเตอร์ได้

ตาราง 2 ปริมาณทอรีนในอวัยวะต่างๆ ในคนและสัตว์

อวัยวะ	คน	สัตว์ (หนู)
สมอง (ไมโครโมล/กรัม)	4-20	3
หัวใจ (ไมโครโมล/กรัม)	6	20
ตับ (ไมโครโมล/กรัม)	2	3
กล้ามเนื้อ (ไมโครโมล/กรัม)	5	7
เรตินา (ไมโครโมล/กรัม)	30-40	27
เลือด (ไมโครโมล/กรัม)	50-80	360

ที่มา : ดัดแปลงจาก Oktawia, P.; et al. 2010: 19-25

ในมนุษย์เองทอรีนก็มีหน้าที่สำคัญหลายประการเช่นกัน โดยทอรีนในกล้ามเนื้อหัวใจนั้นช่วยให้หัวใจใช้แคลเซียมได้อย่างสมดุลในขณะที่มีการหดตัวของหัวใจโดยไม่ทำให้เกิดการใช้แคลเซียมมากเกินไปของหัวใจ (calcium overload) แม้ว่าร่างกายจะอยู่ในสภาวะที่มีระดับแคลเซียมสูง (ประสงค์ เทียนบุญ. 2004: 15) ข้อดีที่มีการศึกษากันและเด่นชัดของประโยชน์ของทอรีนนั้นคือความสามารถในการต่อต้านโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดหัวใจ ในบางประเทศเช่นสหรัฐอเมริกาที่มีผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจจำนวนมาก ซึ่งมีการพยายามลดปริมาณผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจโดยการรณรงค์งดสูบบุหรี่ บำบัดรักษาผู้ป่วยโรคหวน ผู้ป่วยโรคภาวะไขมันผิดปกติ และผู้ป่วยที่เป็นโรคอ้วนนอกจากนั้นยังมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นที่คาดว่าจะช่วยลดปริมาณผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจได้ ซึ่งในปี 2010 Oktawia และคณะ (Oktawia, P.; et al. 2010: 19-25) ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาความสามารถในการต่อต้านโรคหลอดเลือดหัวใจทั้งในคนและในสัตว์ไว้และปรากฏว่าทอรีนนั้นสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจได้เนื่องจากผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ป่วยโรค

ภาวะไขมันผิดปกติ และผู้ป่วยที่เป็นโรคอ้วนนั้น ล้วนเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของอวัยวะที่มีฮอร์โมน ช่วยควบคุมการทำงานอยู่ทั้งสิ้นซึ่งถ้าอวัยวะเหล่านี้ทำงานได้เป็นปกติก็สามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเป็นโรคที่เป็นสาเหตุนำไปสู่การเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจได้ อวัยวะต่างๆ ในร่างกายที่สำคัญทั้งในคนและในสัตว์ที่มีฮอร์โมนเป็นองค์ประกอบนั้นมีหลายอย่างด้วยกัน ซึ่งอวัยวะแต่ละส่วนก็มีปริมาณฮอร์โมนที่แตกต่างกันดังตาราง 2

วิธีวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน

เทคนิคในปัจจุบันนั้นการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนฮอร์โมนสามารถทำได้หลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีนั้นจะมีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกันไปโดยการวิเคราะห์กรดอะมิโนฮอร์โมนนั้นจะแบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ ส่วนที่ใช้ในการแยก (Separation) และส่วนที่ใช้ในการตรวจวัด (Detection)

ส่วนที่ใช้ในการแยกนั้นในปัจจุบันมักนิยมใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีเป็นหลักได้แก่ โครมาโทกราฟีแบบของเหลว (Liquid Chromatography) โครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin-layer Chromatography) และแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)

เดิมในช่วงก่อนปี 1990 การวิเคราะห์กรดอะมิโนฮอร์โมนนั้นจะทำการแยกฮอร์โมนออกจากสารอื่นโดยใช้คอลัมน์แก้วและมีวัฏภาคคงที่ (Stationary Phase) ที่มีคุณสมบัติการแยกด้วยกลไกแบบแลกเปลี่ยนไอออน หลังจากสารออกจากคอลัมน์แล้วจึงทำการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์แล้วตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดกรดอะมิโน แต่ปัญหาคือมีสารอื่นออกมารบกวนการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนด้วย (Coelution) อีกทั้งถ้ามีการวิเคราะห์กรดอะมิโนหลายตัวจะต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนทั้งฮอร์โมนและกรดอะมิโนอื่นโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์แล้วค่อยนำสารเข้าสู่คอลัมน์เพื่อทำการแยกโดยอาศัยกลไกการแยกแบบรีเวิร์สเฟส (Reverse-phase) หรือไม่ต้องเตรียมเป็นสารอนุพันธ์แล้วทำการแยกโดยอาศัยกลไกการแยกแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Chromatography) ซึ่งต่อมาเทคนิคนี้ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนฮอร์โมน

การแยกสารด้วยกลไกการแยกแบบแลกเปลี่ยนไอออนนั้นเป็นกลไกการแยกที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารอนินทรีย์ สารที่มีประจุบวกและสารที่มีประจุลบได้เป็นอย่างดี สำหรับสารอินทรีย์ที่มีสมบัติในการแตกตัวให้ประจุลบหรือประจุบวกจำพวกกรดอ่อนหรือเบสอ่อนก็สามารถแยกได้ด้วย

เทคนิคนี้เช่นกัน ทำนองเดียวกันกับทอริ่งที่มีสมบัติในการแตกตัวให้ประจุได้โดยค่าคงที่การแตกตัวของทอริ่งหรือ pK_a เท่ากับ 4.96 สำหรับการแยกทอริ่งด้วยการแลกเปลี่ยนไอออนนี้มีข้อได้เปรียบในด้านการแยกแบบรีเวิร์สเฟสข้อใหญ่คือ ไม่จำเป็นต้องมีการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์จึงลดขั้นตอนในการวิเคราะห์ไป 1 ขั้นตอน แต่ในขณะเดียวกันสิ่งที่ทำให้การแยกทอริ่งด้วยกลไกการแยกแบบแลกเปลี่ยนไอออนเสียเปรียบการแยกแบบรีเวิร์สเฟสก็คือ เมื่อไม่มีขั้นตอนการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์แล้วนั้นจะทำให้ไม่สามารถตรวจวัดทอริ่งและกรดอะมิโนบางตัวได้ด้วยเครื่องตรวจที่พบได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป อย่างเช่น ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-vis Detector)

เทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบางเป็นเทคนิคที่ทุกคนรู้จักกันดีและเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องมีเครื่องมือจำเพาะมากมายนักแต่ข้อเสียใหญ่ข้อเทคนิคนี้คือให้ความไวในการตรวจวัด (Sensitivity) ที่ต่ำอีกทั้งการทำการวิเคราะห์ซ้ำนั้นทำได้ยากอีกด้วย

อีกเทคนิคหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการแยกทอริ่งก็คือแก๊สโครมาโทกราฟีซึ่งเทคนิคนี้อาจจะเป็นเทคนิคที่ค่อนข้างยากสำหรับการวิเคราะห์ทอริ่งเนื่องจากต้องเตรียมสารอนุพันธ์ให้อยู่ในรูปที่สามารถระเหยได้ (Shifen, M.; et al. 2002: 251-267)

ตัวตรวจวัดที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณทอริ่งนั้นที่นิยมใช้มีหลายชนิดได้แก่

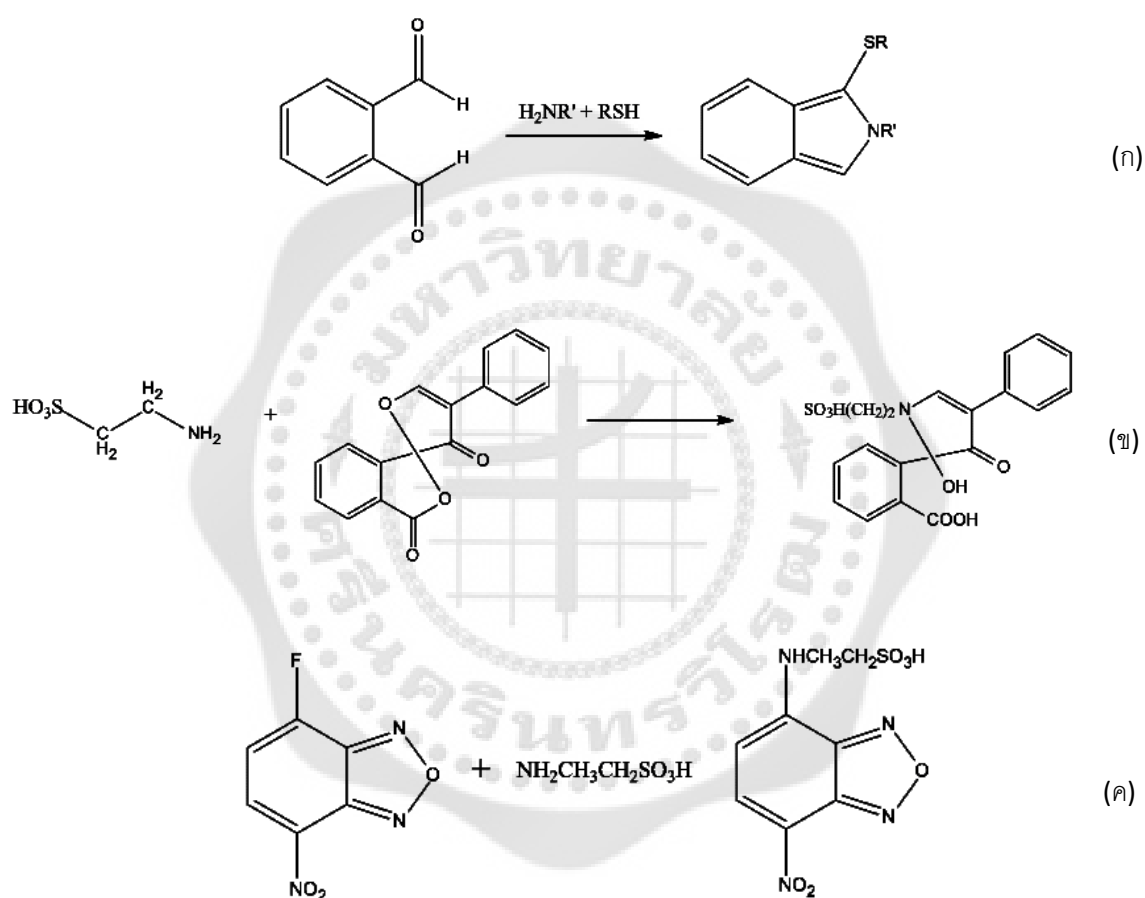
1. ตัวตรวจวัดยูวี-วิสิเบิล (UV-visible Detector)
2. ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence)
3. ตัวตรวจวัดแอมเพอโรมิเตอร์ (Amperometer) (Ying, Q.; et al.1998: 19-26)
4. ตรวจวัดทางเคมีเชิงไฟฟ้า (Electrochemical detector) (Feng, Q.; et al. 1999: 147-55)
5. อิเล็กตรอนอิมแพ็คแมสสเปกโตรเมตรี (Electron Impact Mass Spectrometry)

เครื่องตรวจวัดที่เป็นยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรมิเตอร์ และสเปกโตรฟลูออโรโฟโตมิเตอร์เป็นที่ทราบกันดีว่าไม่สามารถตรวจวัดทอริ่งและกรดอะมิโนได้ทุกตัวโดยตรงแต่สามารถเตรียมเป็นสารอนุพันธ์และทำการตรวจวัดได้แต่ก็ยังเป็นตัวตรวจวัดที่สามารถหาได้ง่ายตามห้องปฏิบัติการทั่วไปมากกว่าเทคนิคอื่น

สารที่ใช้เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ในการวิเคราะห์ปริมาณทอริ่ง

เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่าทอริ่งนั้นเป็นกรดอะมิโนอิสระตัวหนึ่งแม้ว่าจะไม่ใช่กรดอะมิโนที่เป็นโครงสร้างของโปรตีนแต่คุณสมบัติในการเกิดอนุพันธ์กับสารอื่นยังคงคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนทั่วไป

ซึ่งสารที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณนั้นมีหลายตัวด้วยกัน เช่น ออร์โท-ฟทาลัลดีไฮด์ (O-phthalaldehyde, OPA) 2,4-ไดไนโตรฟลูออโรเบนซีน (2,4-dinitrofluorobenzene) ฟลูออเรนิลเมทิลออกซีคาร์บอนิล คลอไรด์ (Fluorenylmethyloxycarbonyl Chloride) หรือ 4-ฟลูออโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน (4-Fluoro-7-Nitrobenzofurazan) ซึ่งอนุพันธ์แต่ละตัวนั้นก็จะมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ตัวอย่างลักษณะการเกิดสารอนุพันธ์ของทอรีนนั้นแสดงดังภาพประกอบที่ 3



ภาพประกอบที่ 3 การเกิดสารอนุพันธ์ของทอรีนกับ (ก) ออโท-ฟทาลัลดีไฮด์ (ข) ฟลูออเรสคามีน และ (ค) 4-ฟลูออโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน

จากภาพประกอบที่ 3 ได้แสดงลักษณะของการเกิดสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแล้ว โดยออโท-ฟทาลัลดีไฮด์ (ก) เป็นสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์กับกรดอะมิโนได้ง่ายและรวดเร็ว ซึ่งสารอนุพันธ์ที่ได้ นั้นให้สภาพไวในการตรวจวัดสูงแต่สารอนุพันธ์ที่ได้นี้ยังขาดความเสถียรอยู่บ้าง

สำหรับฟลูออเรสคามีน (ข) นั้นเป็นสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์กับกรดอะมิโนได้รวดเร็วเช่นเดียวกับ ออโท-พทาลอัลดีไฮด์และสารอนุพันธ์ที่ได้มีความเสถียรมากกว่าออโท-พทาลอัลดีไฮด์ แต่เมื่อเปรียบเทียบความไวในการตรวจวัดแล้วออโท-พทาลอัลดีไฮด์นั้นให้ความไวในการตรวจวัดในระดับของความเข้มข้นที่ต่ำกว่า ในส่วนของ 4-ฟลูออโร-7-ไนโตรเบนโซฟิวราเซนนั้นสารอนุพันธ์ที่มีความเสถียรเช่นเดียวกับฟลูออเรสคามีนแต่ก็มีขั้นตอนในการเตรียมสารอนุพันธ์ที่ยุ่งยากและซับซ้อนกว่าออโท-พทาลอัลดีไฮด์และฟลูออเรสคามีน (Shifen, M.; et al. 2002: 251-267) (Wang, X.; et al. 2011: 537-542)

แหล่งที่พบทอรีน

ทอรีนนับถูกค้นพบในปีค.ศ. 1827 โดยสกัดได้จากน้ำดีของวัว (ประสงค์ เพียนบุญ. 2004: 15) โดยมีการศึกษาเกี่ยวกับทอรีนเรื่อยมา แม้ว่าในปัจจุบันนั้นทอรีนจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มของกรดอะมิโนไม่จำเป็นแต่สามารถพบทอรีนได้ในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายมนุษย์ อีกทั้งพบว่าทอรีนนับมีอิทธิพลและเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการทำงานของอวัยวะต่างๆ เหล่านั้นด้วย ตัวอย่างอวัยวะในร่างกายของคน ที่พบทอรีนได้แก่ สมองซึ่งสามารถพบทอรีนได้ในสมองทั้งเด็กและผู้ใหญ่ หัวใจ ตับ กล้ามเนื้อต่างๆ เเรตินา หรือแม้แต่ในเลือดก็พบว่ามีทอรีนอยู่เช่นกัน (Oktawia, P.; et al. 2010: 19-25)

สำหรับคนแล้วนั้นนอกจากการสังเคราะห์ทอรีนจากภายในร่างกายแล้วยังสามารถรับทอรีนจากแหล่งอาหารภายนอกได้มากมายซึ่งถ้าคนมีการบริโภคอาหารแบบปกติใน 1 วัน จะทำให้ร่างกายได้รับทอรีนในปริมาณ 40-400 มิลลิกรัมต่อวัน (ไม่นับรวมที่ได้รับจากผัก) (Stapleton, P.P.; et al. 1997: 103-108) (Finnegan, D.; et al. 2003: 147-55) เนื่องจากทอรีนนับมีอยู่ในอาหารมากมายหลายชนิดซึ่งอาหารในชีวิตประจำวันพบทอรีนนับแสดงดังตาราง 3

ทอรีนนับนอกจากจะพบในอาหารที่ได้จากธรรมชาติแล้วนั้นสิ่งที่น่าสนใจในปัจจุบันนั้นก็คือนำอาหารบางชนิดนั้นมีการเติมทอรีนเข้าเพื่อให้ร่างกายของผู้บริโภคได้รับทอรีนมากขึ้นโดยบางครั้งอาจมีวัตถุประสงค์ทางการค้าหรือบางครั้งอาจมีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยทางด้านสุขภาพของผู้บริโภคด้วย ตัวอย่างเช่น ในเครื่องดื่มชูกำลังนั้นพบว่ามีทอรีนลงไปเพื่อหวังให้ผู้บริโภคนั้นมีการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจที่สมบูรณ์ ซึ่งเป็นผลประโยชน์ทางการค้าของผลิตภัณฑ์ประเภทชูกำลังแบบนี้ โดยพบว่าเครื่องดื่มชูกำลังแต่ละยี่ห้อนั้นมีทอรีนในปริมาณถึง 1000-3000 มิลลิกรัม (Oktawia, P.; et al. 2010: 19-25) ผลิตภัณฑ์อีกประเภทหนึ่งที่มีการเติมทอรีนลงไปในนั้นคือ นมผง

สำหรับทารก เพราะว่าทารกแรกเกิดนั้นถ้าเกิดภาวะขาดทอรีนจะส่งผลทำให้มีการเจริญเติบโตช้า อีกทั้งยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสมองอีกด้วย สำหรับเด็กทารกที่คลอดก่อนกำหนดนั้นตัวยังทำงานได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้ร่างกายสังเคราะห์ทอรีนได้ในปริมาณที่ไม่เพียงพอ จึงควรให้ทารกที่คลอดก่อนกำหนดนั้นรับประทานนมผงที่มีการเติมทอรีนเข้าไปเพื่อให้ร่างกายได้รับทอรีนในปริมาณที่เพียงพอ (ประสงค์ เทียนบุญ. 2004: 15)

ตาราง 3 ปริมาณทอรีนในอาหารประเภทต่างๆ

อาหาร	ปริมาณทอรีน (มิลลิกรัม/100กรัม)
เนื้อวัว	43
เนื้อไก่	169
ไข่แดง	306
เนื้อหมู	61
แฮม	50
ทูน่ากระป๋อง	42
หอยแมลงภู่	655
นม (มิลลิกรัม/ลิตร)	
Colostrum (1-3 วัน)	70
Early lactation (15-40 วัน)	12
Mid lactation (มากกว่า 100 วัน)	4
Pasteurized milk	6
นมคน (มิลลิกรัม/ลิตร)	54

ที่มา : ดัดแปลงจาก (Stapleton, P.P.; et al. 1997: 103-108) และ (ประสงค์ เทียนบุญ. 2004: 15)

นอกจากประเภทอาหารที่กล่าวมาข้างต้นแล้วนั้น นมเป็นอาหารอีกประเภทหนึ่งที่สามารถพบ
 ทอรีนได้เช่นกัน ซึ่งทอรีนในน้ำนมมีความน่าสนใจแตกต่างจากอาหารที่ได้กล่าวมาข้างต้น เนื่องจาก
 เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่านมมีกระบวนการแปรรูปที่หลากหลายไม่ว่าจะเป็นพาสเจอร์ไรส์
 (Pasteurize) สเตอริไลส์ (Sterilize) ยูเอชที (UHT) นมผง โยเกิร์ต ชีส หรือแม้แต่ไอศกรีมก็ตาม
 (Oktawia, P.; et al. 2010: 19-25) ซึ่งปริมาณทอรีนในน้ำนมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแต่ละชนิดจะมี
 ปริมาณทอรีนที่แตกต่างกันไป

นมและองค์ประกอบของนม

ในทางอุตสาหกรรมนั้นได้ให้คำจำกัดความของคำว่านมดังนี้ นมคือสิ่งที่ถูกรีดออกมาจนหมด
 จากเต้านมของโค กระบือ แพะ และแกะที่มีสุขภาพดี ซึ่งโดยปกติแล้วน้ำนมต้องมีลักษณะปกติ
 สะอาด และสด โดยการรีดนมในช่วงเวลาอย่างน้อย 72 ชม. ภายหลังการคลอดลูกหรือจนกว่า
 จะปราศจากน้ำนมเหลือง ไม่ว่าสิ่งที่ถูกขับออกมานี้จะผ่านกระบวนการแปรรูปอย่างไรหรือไม่ก็ตาม

คำว่าปกติ สะอาดในคำจำกัดความของนมนั้นหมายถึง ถ้าการรีดนมนั้นได้น้ำนมที่ไม่สะอาด
 หรือรีดนมนั้นทำให้ได้นมที่ไม่สด จะถือว่าสิ่งที่ได้นั้นเป็นนม ซึ่งการรีดนมนั้นจะต้องเป็นการรีดให้หมด
 จากเต้านมจริงๆ จึงจะได้นมที่มีองค์ประกอบครบถ้วนตามที่ธรรมชาติสร้างมา เพราะในบางครั้งน้ำนม
 ที่รีดออกมาในช่วงแรกๆ จะมีลักษณะที่ใสเนื่องจากมีมันเนยต่ำทำให้ได้องค์ประกอบไม่ครบถ้วน
 โดยทั่วไปสัตว์ให้นมที่จัดว่ามีความสำคัญทางเศรษฐกิจนั้นมี 4 ชนิด ได้แก่ โค กระบือ แพะ และแกะ

ภายในนมนั้นจะประกอบด้วยสภาวะ 3 สภาวะรวมกันอยู่ได้แก่ สารละลายแท้ สารละลาย
 แขวนลอย และสารละลายอิมัลชัน สารละลายแท้ที่อยู่ในนมคือ สารที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ
 เช่น คลอไรด์ โซเดียม โพแทสเซียม แลคโตส และบางส่วนของอัลบูมิน สารละลายแขวนลอยที่อยู่ในนม
 ได้แก่ เคซีนและฟอสเฟต ส่วนของสารละลายอิมัลชันคือ ส่วนที่มีสถานะไม่ละลายน้ำแต่จะแทรกอยู่ใน
 น้ำเท่านั้น เช่น มันเนย เมื่อตั้งภาชนะใส่นมทิ้งไว้สักกระยะหนึ่งมันเนยจะแยกออกมาลอยบนผิวหน้าเป็น
 ชั้นครีม (บวรศักดิ์ ลีนานนท์. 2535)

โดยทั่วไปน้ำนมดิบจะมีจุลินทรีย์อยู่ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าจุลินทรีย์นั้นเป็นเซลล์ของสิ่งมีชีวิต
 ขั้นต่ำที่มีขนาดเล็กมากจนมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น แม้ว่าอันที่จริงแล้วจุลินทรีย์ในนมส่วนมากจะไม่ได้
 เป็นสาเหตุของโรคทั้งกับคนและสัตว์ แต่จุลินทรีย์เหล่านี้ก็ไม่เป็นที่ถึงประสงค์ของผู้บริโภคนมหรือผู้ที่
 ทำธุรกิจเกี่ยวกับนม เพราะจุลินทรีย์เหล่านี้มีส่วนที่จะทำให้นมเสียหรือหมดอายุได้ อย่างไรก็ตาม
 จุลินทรีย์บางชนิดในนมก็ถือว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เช่นกัน (บวรศักดิ์ ลีนานนท์. 2535)

กระบวนการแปรรูปอาหารนั้นโดยทั่วไปสามารถทำได้หลายวิธี การแปรรูปอาหารโดยการใช้ความร้อนนั้นเป็นหนึ่งในวิธีที่มีบทบาทและมีความสำคัญในกระบวนการแปรรูปอาหาร นอกจากนี้การแปรรูปอาหารโดยการใช้ความร้อนยังเป็นวิธีในการถนอมรักษาอาหารได้อีกด้วยเนื่องจากความร้อนสามารถยับยั้งการเน่าเสียของอาหารอันสืบเนื่องมาจากการสร้างสารพิษจากจุลินทรีย์ในอาหาร อีกทั้งความยังสามารถฆ่าพยาธิและแมลงต่างๆ ที่อยู่ในอาหารได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนสูงเป็นระยะเวลานานเพื่อทำลายจุลินทรีย์ พยาธิ หรือสิ่งที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าให้หมดจากอาหารไปนั้นก็ไม่ใช่วิธีที่ดีที่สุดในการถนอมอาหารเนื่องจากบางครั้งความร้อนอาจทำลายองค์ประกอบในอาหารและทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลงไปได้ด้วย (วิไล รังสาดทอง. 2552)

การพาสเจอร์ไรซ์เป็นวิธีหนึ่งในการแปรรูปอาหารประเภทนมและเป็นการยืดระยะเวลาในการเน่าเสียของนมได้ โดยกระบวนการนี้เป็นการให้ความร้อนที่ไม่รุนแรงนักที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียสทำให้นมอยู่ได้นานหลายวันโดยไม่เน่าเสีย การให้ความร้อนในลักษณะนี้เป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความทนทานต่อความร้อนต่ำ เช่น แบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ ยีสต์และรา วิธีนี้เป็นการให้ความร้อนที่มีผลกระทบต่อคุณค่าทางโภชนาการของนมน้อยที่สุด อย่างไรก็ตามความร้อนปริมาณเท่านี้ไม่เพียงพอสำหรับการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมเพราะฉะนั้นการเก็บรักษานมที่ผ่านกระบวนการนี้จะต้องเก็บในสภาวะที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้เช่น การเก็บนมพาสเจอร์ไรส์นั้นต้องทำการเก็บที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส (วิไล รังสาดทอง. 2552)

การสเตอริไลซ์เป็นกระบวนการให้ความร้อนแก่อาหารที่อุณหภูมิสูงในระยะเวลาที่นานเพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์และเอนไซม์ได้โดยจุดมุ่งหมายหลักของวิธีการนี้คือ การทำให้อาหารปราศจากเชื้อโรคที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคที่จะเจริญเติบโตในอาหารได้ที่อุณหภูมิการเก็บรักษาตามปกติเป็นผลทำให้อาหารที่ผ่านกระบวนการนี้มีอายุในการเก็บรักษาได้นานอย่างน้อย 6 เดือนที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ต้องแช่เย็น อย่างไรก็ตามกระบวนการนี้จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณค่าทางโภชนาการในนมได้เช่นกัน (วิไล รังสาดทอง. 2552)

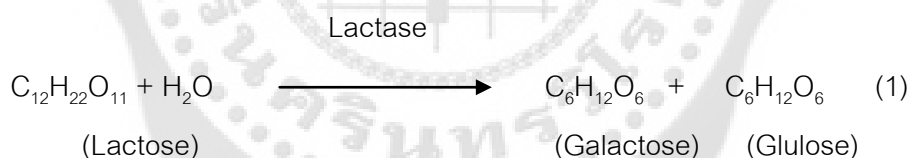
กระบวนการยูเอชที (UHT) ย่อมาจาก Ultra High Temperature ซึ่งหมายถึงการให้ความสูงที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 133 องศาเซลเซียสไม่น้อยกว่า 1 วินาทีและบรรจุในภาชนะที่ปราศจากเชื้อกระบวนการให้ความร้อนลักษณะนี้มีอยู่ 2 ระบบคือ ระบบการให้ความร้อนโดยตรง และระบบการให้ความร้อนทางอ้อม การให้ความร้อนโดยตรงนั้นเป็นวิธีที่มีการพ่นไอน้ำลงไปในส่วนนมทำให้น้ำนมผสม

กับไอน้ำอิมตัวภายใต้ความดันทำให้น้ำนมได้รับความร้อนอย่างรวดเร็ว ส่วนการให้ความทางอ้อมนั้น เป็นวิธีที่อาศัยการถ่ายเทความร้อนจากตัวนำความร้อน (บวรศักดิ์ ลีนานนท์. 2535)

องค์ประกอบทางกายภาพของน้ำมนั้นประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ น้ำ และส่วนที่เป็นของแข็งหรือธาตุน้ำนมทั้งหมด โดยในน้ำนม 1000 กรัมจะประกอบด้วยน้ำอยู่ประมาณ 820-890 กรัม หรือประมาณร้อยละ 87.2 สำหรับส่วนที่เป็นของแข็งหรือธาตุน้ำนมทั้งหมดนั้นก็สามารแบ่งได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ ไขมันหรือมันเนย และธาตุน้ำนมที่นอกเหนือจากมันเนย

ไขมันหรือมันเนยมีเป็นองค์ประกอบในนมอยู่ประมาณร้อยละ 3.7 ซึ่งมันเนยที่มีในน้ำนี้มีความสำคัญหลายประการ เช่น เป็นส่วนขององค์ประกอบในนมที่มีราคาแพงที่สุดอีกทั้งยังเป็นแหล่งอาหารที่ให้พลังงานสูงที่สุด นอกจากนี้มันเนยในนมยังมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพกับผลิตภัณฑ์นมประเภทต่างๆ อีกด้วย

องค์ประกอบอื่นในน้ำนมที่นอกเหนือจากมันเนยนั้นมี 2 ส่วนหลักๆ ด้วยกันได้ คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน โดยสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญที่สุดที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นมคือ แลคโตส (Lactose) เมื่อแลคโตสถูกย่อยด้วยเอนไซม์แลคเตส (Lactase) จะได้น้ำตาล 2 ชนิดคือกลูโคส (Glucose) และกาแลคโตส (Galactose) ดังสมการ (1)



สำหรับคนไทยที่ไม่มีการดื่มนมเป็นประจำและนานๆ เมื่อดื่มนม 1-2 แก้วหรือบางครั้งดื่มนมในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้ ซึ่งสาเหตุเกิดเนื่องมาจากการย่อยน้ำตาลแลคโตสที่มีอยู่ในน้ำนมไม่ได้ ซึ่งแลคโตสที่ไม่ถูกย่อยโดยแลคเตสจะไม่สามารถถูกดูดซึมเข้าในกระเพาะเลือดได้ส่งผลให้แลคโตสจะผ่านไปยังลำไส้ใหญ่และถูกจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ย่อยให้เป็นกรดแลคติก (Lactic acid) และได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) โดยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้รู้สึกอึดอัด ท้องอืด จุกเสียด ส่วนกรดแลคติกจะทำให้เกิดความระคายเคืองแก่ผนังลำไส้ ทำให้ท้องร่วง (บวรศักดิ์ ลีนานนท์. 2535)

โปรตีนในน้ำนมที่สำคัญแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ เคซีน (Casein) และโปรตีนเวย์ (Whey Protein) ซึ่งเคซีนสามารถแยกออกจากน้ำนมได้โดยการตกตะกอนที่ pH 4.6 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นยังสามารถแยกได้โดยการตกตะกอนด้วยเกลือ (salting out) โดยการเติม แอมโมเนียมซัลเฟตประมาณ 26.4 กรัม ในน้ำนม 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสแต่วิธีนี้อาจทำให้โปรตีนเวย์ปนออกมาด้วย (บวรศักดิ์ สีนานนท์. 2535)

แม้ว่าในนมจะมีองค์ประกอบหลักๆ ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วในบางครั้งก็มีปัจจัยอื่นที่อาจทำให้องค์ประกอบของนมมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้เช่น ช่วงระยะเวลาในการให้น้ำนมตัวอย่างเช่น วัวที่มีการตกูกในช่วงเดือนธันวาคม ถ้ามีการเก็บน้ำนมช่วงเดือนมกราคม เมษายน และมีถุนายนนั้น มีอิทธิพลทำให้องค์ประกอบต่างๆ ในน้ำนมมีความแตกต่างกันออกไปได้เช่นกัน (Mapekula, M.; et al. 2011: 529-536) ซึ่งความแตกต่างกันขององค์ประกอบในน้ำนมเมื่อเก็บน้ำนมที่ช่วงเวลาต่างกันนั้น แสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 ปริมาณขององค์ประกอบหลักในนมที่มีการเก็บน้ำนมในช่วงเวลาที่แตกต่าง

องค์ประกอบ (กรัม/กิโลกรัม)	ช่วงเวลาที่เก็บน้ำนม		
	มกราคม	เมษายน	มิถุนายน
โปรตีน	32.2	35.1	37.8
มันเนย	29.8	31.1	32.5
แลคโตส	47.7	48.8	35.1

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mapekula, M.; et al. 2011: 529-536

นอกจากนี้ในปัจจุบันน้ำนมที่ได้รับความนิยมมากขึ้นอีกประเภทหนึ่งคือน้ำนมแพะและน้ำนม แกะซึ่งทั้งแพะและแกะนั้นให้นมที่มีคุณค่าทางโภชนาการและองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับน้ำนมที่ได้จากโค เช่นกันอีกทั้งในนมแพะและแกะนั้นยังมีแร่ธาตุต่างๆ และวิตามินอีกมากมายอาทิเช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เหล็ก เรตินอล ไนอะซิน เป็นต้น ซึ่งแร่ธาตุและวิตามินเหล่านี้ล้วนมีคุณค่าทางโภชนาการและมีประโยชน์ต่อร่างกายทั้งสิ้น ซึ่งองค์ประกอบหลักของน้ำนมแพะและน้ำนมแกะนั้นแสดงดังตาราง 5 (Raynal-Ljutovac, K.; et al. 2008: 57-72)

ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าองค์ประกอบหลักของน้ำนมประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และแลคโตส เป็นองค์ประกอบหลักแต่ก็ยังมีองค์ประกอบอื่นๆ อีกมากมายเช่นแร่ธาตุต่างๆ (Mapekula, M.; et al. 2011: 529-536) และกรดอะมิโนอิสระทั้งกรดอะมิโนที่เป็นโครงสร้างของโปรตีนและกรดอะมิโนที่ไม่ใช่หน่วยย่อยของโครงสร้างโปรตีน (Tripaldi, C.; et al. 1998: 127-136) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ไม่เพียงแต่พบในน้ำนมเท่านั้นแต่ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ใช้นมเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตเช่นชีสก็พบว่ามีองค์ประกอบของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนที่พบในน้ำนมเช่นกัน โดยองค์ประกอบของชีสก็พบว่ามีกรดอะมิโนที่เป็นหน่วยโครงสร้างของโปรตีนและกรดอะมิโนอิสระเช่น แกมมา-อะมิโนบิวทีริกแอซิด (γ -aminobutyric acid) ทอรีน ซิทูลีน (Citrulline) อีกด้วย (Izco, J.M.; et al. 2000: 7-11)

ตาราง 5 แสดงปริมาณองค์ประกอบหลักในน้ำนมแพะและน้ำนมแกะ

องค์ประกอบ	แหล่งน้ำนม	
	แพะ	แกะ
ไขมัน (ร้อยละ)	3.48	6.82
โปรตีน (ร้อยละ)	2.61	5.59
เคซีน (ร้อยละ)	2.30	4.23
แลคโตส (ร้อยละ)	4.30	4.88
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	1260	1950-2000
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	970	1240-1580
โพแทสเซียม (มิลลิกรัม)	1900	1360-1400
แมกนีเซียม (มิลลิกรัม)	130	180-210
เหล็ก (มิลลิกรัม)	550	720-1222
เรตินอล (มิลลิกรัม)	0.04	0.08
ไนอะซิน (มิลลิกรัม)	0.20	0.42
ไบโอติน (มิลลิกรัม)	2.00	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก Raynal-Ljutovac, K.; et al. 2008: 57-72

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน

ในปีค.ศ. 1995 Helen L. Rowley และคณะ (Helen, L.; et al. 1995: 93-99) ทำการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน 7 ชนิดได้แก่ ซีรีน (Serine) ไกลซีน (Glycine) ทอรีน กลูตาเมต (Glutamate) อาร์จินีน (Arginine) อะลานีน (Alanine) และกาบา (γ-aminobutyric acid, GABA) โดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับอโท-พทาลอัลดีไฮด์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้กลไกการแยกแบบรีเวิร์สเฟสและใช้ตัวตรวจวัดด้วยเคมีเชิงไฟฟ้า (Electrochemical) โดยมีขั้วไฟฟ้าใช้งานของตัวตรวจคือ แกสซีคาร์บอน (glassy carbon) และใช้ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงเป็นขั้วซิลเวอร์-ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 1 M มอนอโซเดียมฟอสเฟต และ 0.5 M EDTA ใน 25% เอทานอล ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.5 ปรากฏว่าสามารถวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง 7 ได้ในเวลา 25 นาทีและสารอนุพันธ์คงความเสถียรอยู่เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ในปีค.ศ. 1996 Dorresteiijn R.C. และคณะ (Dorresteiijn, R.C.; et al. 1996: 159-167) ได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อการศึกษาสารอนุพันธ์ระหว่างอโท-พทาลอัลดีไฮด์กับกรดอะมิโน 4 ชนิด ได้แก่ แอสพาราจีน (Asparagines) ซีรีน (Serine) ไกลซีน (Glycine) และอะลานีน (Alanine) ตัวอย่างปัจจัยที่มีผลกระทบต่อสัญญาณของสารอนุพันธ์เช่น ความเข้มข้นของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-Mercaptoethanol) ซึ่งถ้ามีความเข้มข้นมากเกินไปจะทำให้สัญญาณของสารอนุพันธ์ลดลง และค่า pH และความเป็นบัฟเฟอร์ของสารละลายนั้นส่งผลต่อความเสถียรของสารอนุพันธ์อีกด้วย

ในปีค.ศ. 1996 Rizzo V. และคณะ (Rizzo, V.; et al. 1996: 181-188) ได้นำเสนอวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่มีบทบาทต่อระบบประสาทส่วนกลาง 4 ชนิด ได้แก่ แอสพาเตต (Aspartate) กลูตาเมต (Glutamate) กาบา และทอรีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ตัวตรวจวัดทางเคมีเชิงไฟฟ้าโดยการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ขั้วหนึ่ง + 0.15 โวลต์ และอีกขั้วหนึ่ง + 0.45 โวลต์ปรากฏว่าสามารถวิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระทั้ง 4 ชนิดได้ในเวลา 55 นาที

ในปีค.ศ. 1996 Gillian P. และคณะ (Gillian, P.; et al. 1996: 1287-1294) นำเสนอวิธีวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างเลือดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับฟลูออเรสคามีน (Fluorescamine) และใช้ตัวตรวจวัดยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ซึ่งวิธีที่เสนอนี้ให้ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปีค.ศ. 1998 Ying Q. และคณะ (Ying, Q.; et al. 1998: 19-26) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนแอสพาเตต (Aspartate) กลูตาเมต (Glutamate) ไกลซีน (Glycine) กาบา และทอรีนโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงขนาดไมโคร (Microbore-HPLC) และใช้ตัวตรวจวัดทางเคมีเชิงไฟฟ้า ในตัวอย่างสมองส่วนควบคุมการมองเห็นของแมว โดยคอลัมน์ที่ใช้มีความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 และ 1 มิลลิเมตร ขนาดของอนุภาค 3 ไมโครเมตร ชนิด C₈ ซึ่งจากการทำแกรเดียนโปรแกรม (Gradient) ทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดได้ในเวลา 25 นาที

ในปีค.ศ. 1998 Tripaldi C. และคณะ (Tripaldi, C.; et al 1998: 127-136) ได้รายงานเกี่ยวกับปริมาณทอรีนและกรดอะมิโนชนิดอื่นอีก 26 ชนิดในน้ำนมแพะและแกะที่ทำการรีดนมหลังจากแพะและแกะคลอดลูกในช่วงเวลาที่ต่างกัน 3 ช่วง ปรากฏว่าเมื่อมีการรีดนมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ นั้นให้ ความแตกต่างของปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิด ในน้ำนมแพะและแกะนั้นมีปริมาณทอรีนสูงที่สุดในบรรดากรดอะมิโนอิสระที่วิเคราะห์ทั้งหมด 27 ชนิด

ในปีค.ศ. 1999 Feng Q. และคณะ (Feng, Q.; et al 1999: 161-166) นำเสนอการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในยาเม็ด ยาบรรจุแคปซูล และในปัสสาวะโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบและใช้ตัวตรวจวัดเป็นแอมเพอโรมิเตอร์ในโหมดพัลส์แอมเพอโรเมตริก ซึ่งการวิเคราะห์ทอรีนด้วยวิธีนี้มีความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนได้ในช่วงความเข้มข้น 0.1-20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOD) เท่ากับ 0.034 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปีค.ศ. 2000 Izco J.M. และคณะ (Izco, J.M.; et al 2000: 7-11) ได้นำเสนอสารอนุพันธ์ที่ใช้เตรียมกับกรดอะมิโนทั้งหมด 26 ชนิดคือ ไตรไนโตรเบนซีนซัลโฟนิคแอซิด (Trinitrobenzenesulfonic Acid) ซึ่งเมื่อเตรียมเป็นสารอนุพันธ์แล้วสามารถตรวจวัดได้โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

ในปีค.ศ. 2003 Hirofumi I. และคณะ (Hirofumi, I.; et al 2003: 138-142) ได้ศึกษาและทำการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างพลาสมา (plasma) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับ 4-(5,6-ไดเมทอกซี-2-ฟทาลิมิดินิล)-2-เมทอกซีฟีนิลซัลโฟนิล คลอไรด์ (4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonylchloride) และตรวจวัดด้วยเครื่องฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่นของดูดกลืน 318 นาโนเมตร และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง 392 นาโนเมตร

ในปีค.ศ. 2004 Tommaso R.I. Cataldi และคณะ (Tommaso, R.I.; et al. 2004: 626-630) ทำการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในไข่ขาว ไข่แดง น้ำเหลือง ปัสสาวะและในเครื่องดื่มชูกำลังด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบและตรวจวัดด้วยแอมเพอโรมิเตอร์ จากการศึกษาพบว่าในปัสสาวะและไข่แดงมีปริมาณทอรีน 1200 และ 750 ไมโครกรัม/100 กรัม ตามลำดับ

ในปีค.ศ. 2008 Raynal-Ljutovac K. และคณะ (Raynal-Ljutovac, K.; et al. 2008: 57-72) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำมันพะและกะเซ็น ไชมัน โปรตีน แลคโตส และเคซีน อีกทั้งแร่ธาตุต่างๆ ในพะและกะที่ต่างถิ่นต่างสายพันธุ์พบว่าพะและกะที่ให้น้ำมันนั้นเมื่อมีความแตกต่างทางด้านถิ่นที่อยู่อาศัยและสายพันธุ์นั้นส่งผลทำให้องค์ประกอบของน้ำมันที่ได้มีความแตกต่างกันด้วยเช่นกัน

ในปีค.ศ. 2011 Wang X. และคณะ (Wang, X.; et al. 2011 537-542) ทำการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ฟลูออโรโฟโตมิเตอร์เป็นตัวตรวจวัด โดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับ 4-ฟลูออโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน (4-Fluoro-7-Nitrobenzofurazan) พบว่าเมื่อวิเคราะห์โดยการเตรียมอนุพันธ์ของทอรีนกับสารนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณทอรีนได้ในช่วงความเข้มข้น 0.1-30 ไมโครโมลาร์ (μM)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้ตัวตรวจวัดแบบเปล่งแสง (Fluorescence รุ่น HP 1100) จากบริษัท Hewlett-Packard โดยใช้คอลัมน์ C18 (5 ไมครอน, 4.6x250 mm) จากบริษัท Fortis

- เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น JASCO FP-6200
- ปิเปตต์ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตต์ขนาด 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (รุ่น AB204s) จากบริษัท METTLER TOLEDO
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน (รุ่น LaboStar) จากบริษัท SIEMENS
- เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter รุ่น Cyberscan 500)
- เครื่องเขย่า (รุ่น Vortex-genie 2) จากบริษัท Scientific
- เครื่องหมุนเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge, รุ่น Zentrifugen EBA 8S)
- ไซริงค์กรอง ชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- อะซิโตนไทรล์ (HPLC Grade) จากบริษัท CARLO ERBA
- เมทานอล (HPLC Grade) จากบริษัท MERCK
- ออร์โท-ฟทาลอัลดีไฮด์ (AR Grade) จากบริษัท ACROS
- 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (AR Grade) จากบริษัท MERCK
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA
- กรดอะมิโนทอรีน (AR Grade) จากบริษัท SIGMA
- กรดอะมิโนซิสเทอีน (AR Grade) จากบริษัท SIGMA
- กรดอะมิโนเมธไทโอนีน (AR Grade) จากบริษัท SIGMA

- กรดอะมิโนไลซีน (AR Grade) จากบริษัท ACROSS
- กรดไทรโคลอโรแอซิดิก (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA
- บอแรก (AR Grade) จากบริษัท APS Finechem
- ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (AR Grade) จากบริษัท QREC
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (AR Grade) จากบริษัท QREC

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนเมื่อใช้สารอนุพันธ์ต่างกัน

1.1 การวิเคราะห์ทอรีนโดยใช้สารอนุพันธ์เป็นออร์โท-พทาเลตไดไฮไดรด์

1.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- เตรียมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาเลตไดไฮไดรด์

ชั่งสารมาตรฐานออร์โท-พทาเลตไดไฮไดรด์มา 0.25 กรัมละลายด้วยเมทานอล 1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำ 200 ไมโครลิตรของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล และปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วย สารละลายบอแรกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.4 M (pH 9.5 ปรับ pH ด้วย 1.0 M โซเดียมไฮดรอกไซด์)

- เตรียมสารละลายมาตรฐานทอรีน

ชั่งสารมาตรฐานทอรีน 0.10 กรัมละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บไว้ในขวดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1.2 การหาความยาวคลื่นของการกระตุ้น (Excitation Wavelength) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (Emission Wavelength)

- บีเบตต์สารละลายมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ใส่หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนออร์โท-พทาเลตไดไฮไดรด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 3 นาทีจากนั้นนำไปสแกนหาความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสงด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ และเก็บค่าที่ได้เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.1.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของทอรีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

- ปิเปตสารละลายมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดพลาสติกแล้วเติมสารละลายออร์โท-พทาเลไดอัลดีไฮด์ 20 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าและเก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 นาทีและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

- ทำซ้ำการทดลองข้างต้นโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารมาตรฐานทอรีนจาก 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร จนครบ

สภาวะที่ทดลองในระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมีดังนี้

- ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : เมทานอล ในอัตราส่วน 60 : 40 (v/v) (Ferreira; et al. 1997: 1269-1278)

- คอลัมน์เป็น C18 เส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวเท่ากับ 4.6 x 250 มิลลิเมตรขนาดอนุภาคเท่ากับ 5 ไมครอน

- ควบคุมอัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

- ใช้ฟลูออเรสเซนต์ดีเทคเตอร์เป็นตัวตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสง ที่ได้จากขั้นตอน 1.1.2

- ปริมาตรต่อหนึ่งตัวอย่างวิเคราะห์ คือ 20 ไมโครลิตร

1.2 การวิเคราะห์ทอรีนโดยใช้สารอนุพันธ์เป็นฟลูออเรสคาบิน

1.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- เตรียมสารละลายมาตรฐานทอรีน

เตรียมสารละลายมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นปิเปต 10 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 25 mM บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 จำได้สารละลายทอรีนมาตรฐานเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- เตรียมสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2

เตรียมสารละลาย A 25 mM โซเดียมเตตระโบเรต โดยชั่ง 0.95 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย B 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยชั่ง 0.1 กรัม ละลายในน้ำ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย B ลงในสารละลาย A 1.8 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 9.2

- เตรียมสารละลายฟลูออเรสคาซีน 5 mM

ชั่งฟลูออเรสคาซีน 0.07 กรัม ละลายในอะซิโตนไตรล์ และปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2.2 หาความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสง

- ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานทอรีน 5 มิลลิกรัม/ลิตร ใน borate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วเติมสารละลายฟลูออเรสคาซีน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 3 นาที จากนั้นนำไปสแกนหาความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสงด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ และเก็บค่าที่ได้เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.2.3 สร้างกราฟมาตรฐานของทอรีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

- ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกแล้วเติมสารละลายฟลูออเรสคาซีน 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 3 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

- ทำซ้ำการทดลองข้างต้นโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารมาตรฐานทอรีนจาก 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็น 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร จนครบ

ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมีดังนี้

- ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.6 ความเข้มข้น 0.025 M : อะซิโตนไตรล์อัตราส่วน 65 : 35 (V/V)

- คอลัมน์เป็น C18 เส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวเท่ากับ 4.6 x 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคเท่ากับ 5 ไมครอน

- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

- ใช้ฟลูออเรสเซนส์ดีเทคเตอร์เป็นตัวตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่ได้จากขั้นตอน 1.2.2

- ปริมาตรต่อหนึ่งตัวอย่างวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร

ตอนที่ 2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างนมด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.1 การศึกษาหาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

2.1.1 เลือกใช้สารอนุพันธ์ที่ได้จากตอนที่ 1 ตามความเหมาะสมจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในสารละลายตัวอย่างนมควบคู่กับสารละลายมาตรฐานทอรีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะต่างๆ ดังนี้

- คอลัมน์เป็น C18 เส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวเท่ากับ 4.6×250 มิลลิเมตรขนาดอนุภาคเท่ากับ 5 ไมครอน

- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- ใช้ฟลูออเรสเซนส์ดีเทคเตอร์เป็นตัวตรวจวัด
- ปริมาตรต่อหนึ่งตัวอย่างวิเคราะห์อยู่ที่ 20 ไมโครลิตร
- ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 M : อะซิโตนไนไตรล์
- ใช้ pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับที่ใช้ในหัวข้อ 1.1.3

หรือ 1.2.3 ตามแต่สารอนุพันธ์ที่เลือกใช้

2.1.2 ปรับอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่โดยการเพิ่มปริมาณของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ครั้งละ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยเริ่มตั้งแต่วัตถุละ 65 โดยปริมาตร จนกระทั่งถึงร้อยละ 80 โดยปริมาตร

2.1.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่และค่า pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่สุดโดยดูผลจากสัญญาณการวิเคราะห์และระยะเวลาที่เหนี่ยวนำ (Retention Time)

2.2 การศึกษาหาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

2.2.1 ทำการทดลองซ้ำและใช้สภาวะตามข้อ 2.1.1 โดยใช้อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ตามที่ได้จากหัวข้อ 2.1

2.2.2 ปรับอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นครั้งละ 0.2 มิลลิลิตร/นาที โดยให้อัตราการไหลเริ่มต้นที่ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที จนกระทั่งถึงอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

2.2.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอัตราการไหลวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่สุดโดยดูผลจากสัญญาณการวิเคราะห์และระยะเวลาที่เหนี่ยวนำ

2.3 การศึกษาหา pH ที่เหมาะสมของภูมิภาคเคลื่อนที่

2.3.1 ทำการทดลองซ้ำและใช้สภาวะตามข้อ 2.1.1 โดยใช้อัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ตามที่ได้จากหัวข้อ 2.1 และใช้อัตราการไหลของภูมิภาคเคลื่อนที่ตามที่ได้จากหัวข้อ 2.2

2.3.2 เปลี่ยนค่า pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีความแตกต่างอยู่ในช่วง ± 1 โดยให้มีระยะห่างของความแตกต่างเท่ากับหน่วยละ 0.2

2.3.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้และรวบรวมข้อมูลเพื่อนำสภาวะที่เหมาะสมไปใช้ในการทำกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์ปริมาณทอรีนต่อไป

2.4 ศึกษาผลกระทบของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

2.4.1 เตรียมสารมาตรฐานทอรีน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ตามที่ได้เลือกใช้จากตอนที่ 1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงทันที โดยใช้ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสง ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1

2.4.2 ทำการลองซ้ำข้อ 2.4.1 โดยทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาแล้ววิเคราะห์ปริมาณทอรีนทุกๆ 1 นาทีเป็นเวลา 8 นาทีด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับพื้นที่ใต้พีค เพื่อหาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ตอนที่ 3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ทอรีนในนม

3.1 ศึกษาผลกระทบของกรดอะมิโนซิสเทอีน เมธไทโอนีน และไลซีน

3.1.1 ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานทอรีนและกรดอะมิโนซิสเทอีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ใส่หลอดพลาสติกผสมให้เข้ากัน จากนั้นเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ตามที่ได้จากตอนที่ 1 และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะที่ได้จากตอนที่ 2

3.1.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 แต่เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนจากกรดอะมิโนซิสเทอีน เป็นกรดอะมิโนเมธไทโอนีน กรดอะมิโนไลซีน

3.1.3 ในขณะเดียวกันทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 แต่ทำทดลองโดยใช้สารผสมของสารละลายมาตรฐานทอรีน กรดอะมิโนซิสเทอีนและเมธไทโอนีน 1 ชุด สารผสมของสารละลายมาตรฐานทอรีน กรดอะมิโนซิสเทอีนและไลซีน 1 ชุด และสารละลายมาตรฐานทอรีน กรดอะมิโนเมธไทโอนีนและไลซีนอีก 1 ชุด

3.1.4 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 โดยเตรียมสารผสมของสารละลายมาตรฐาน ทอรีน กรดอะมิโนซิสเทอีน เมธไทโอนีนและไลซีน

3.2 ผลกระทบของระยะเวลาในการให้ความร้อนต่อทอรีน

3.2.1 ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำนม 2 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง และเติมสารละลายมาตรฐาน ทอรีนให้ได้ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส

3.2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรใส่หลอดทดลอง จากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส

3.2.3 นำสารละลายในข้อ 3.2.1 เติมสารละลาย 5% กรดไตรคลอโรอะซิติกและนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ความเร็ว 4500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วน สารละลายใสมาปรับ pH ให้ได้ 7 และปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.2.4 ทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 3.2.1 - 3.2.3 โดยให้ระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่สาร มาตรฐานทอรีน 0 5 10 20 30 40 50 และ 60 นาที จากนั้นนำออกจากอ่างน้ำร้อนทิ้งไว้ให้เย็นที่ อุณหภูมิห้อง

3.2.5 นำสารละลายทั้งหมดเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนด้วยอโอโท-พทาลอัลดีไฮด์ กรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปวัดสัญญาณที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเมื่อใช้ระยะเวลาในการให้ความร้อนที่แตกต่างกัน

3.3 ผลกระทบของความเป็นกรด-ด่าง ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

3.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ใส่หลอดทดลองโดย ขั้นแรกเตรียมในสถานะที่เป็นกลางโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

3.3.2 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3.3.1 แต่ทำการเติมกรดไฮโดรคลอริกเพื่อปรับสถานะของ สารละลายให้เป็นกรดก่อนทำการปรับปริมาตร

3.3.3 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3.3.1 แต่ทำการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อปรับสถานะ ของสารละลายให้เป็นด่างก่อนทำการปรับปริมาตร

3.3.4 นำสารละลายข้างต้นทั้ง 3 สถานะไปทดสอบสัญญาณที่ได้ด้วยเครื่อง โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับอโอโท-พทาลอัลดีไฮด์

ตอนที่ 4 การทวนสอบวิธีวิเคราะห์

4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารอนุพันธ์ของทอรีน

สารละลายมาตรฐานทอรีนที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานนั้นเตรียมทั้งหมด 9 ความเข้มข้นได้แก่ 0.005 0.01 0.05 0.10 0.20 0.40 0.60 0.80 และ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานทอรีนเป็นสารละลายตั้งต้นให้มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร

4.1.2 ทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานทอรีนตั้งต้น ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการปิเปตต์สารละลายตั้งต้นมา 100 ไมโครลิตร/ลิตร และทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.1.3 เตรียมสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 0.005 0.01 0.05 0.10 0.20 0.40 0.60 และ 0.80 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการปิเปตต์สารละลายในข้อ 4.1.2 มา 0.05 0.1 0.5 1.0 2.0 4.0 6.0 และ 8.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4.1.4 นำสารละลายที่ได้ดังข้อ 4.1.3 มาเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับอโท-พทาลอัลดีไฮด์ จากนั้นนำมากรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน

4.1.5 นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วดังข้อที่ 4.1.4 ไปวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของทอรีนและพื้นที่ใต้พีค

4.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit Of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit Of Quantitation, LOQ)

4.2.1 นำสารละลายมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัม/ลิตรเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับอโท-พทาลอัลดีไฮด์ จากนั้นกรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปวัดสัญญาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

4.2.2 ทำการทดลองซ้ำข้อ 4.2.1 แต่เปลี่ยนจากสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัม/ลิตร เจือจางลงจนกระทั่งสัญญาณที่วัดได้มีความสูงเหลือ 3 เท่าและ 10 เท่าของสัญญาณของสารละลายแบลงค์ (blank) เป็นความเข้มข้นของค่า LOD และ LOQ ตามลำดับ

4.3 ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Accuracy)

การศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนนั้นทำการหาค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) โดยทำการทดลองดังนี้

4.3.1 ชั่งตัวอย่างน้ำหนักโคสดและน้ำหนักแปรรูปมาตัวอย่างละ 2.xxxx กรัมทำการบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก เหยี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 4500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเก็บส่วนสารละลายมาปรับค่า pH ด้วยสารละลายไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจนได้ pH 7 จึงนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

4.3.2 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4.3.1 ไปวัดหาปริมาณทอรีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำตัวอย่างละ 5 ขั้ว (n=5) จากนั้นคำนวณร้อยละของการคืนกลับ ดังสมการ 2

$$\text{ร้อยละการคืนกลับ} = \frac{(C_{\text{in sample}} + C_{\text{added}}) - C_{\text{in sample}}}{C_{\text{added}}} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

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

4.4 ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์ (Precision)

ในการศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์ทำการหาค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยทำการทดลองดังนี้

4.4.1 ชั่งตัวอย่างน้ำหนักโคสดและน้ำหนักแปรรูปมาตัวอย่างละ 2.xxxx กรัมทำการบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก นำไปเหยี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4500 รอบ/นาที และทำการเก็บส่วนสารละลายไปปรับค่า pH ด้วยสารละลายไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจนได้ pH 7 จึงนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

4.4.2 ทำการทดลองซ้ำข้อ 4.4.1 ในทุกตัวอย่างน้ำนมโคสดและน้ำนมแปรรูปโดยทำซ้ำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ (n=5) จากนั้นนำไปวัดปริมาณทอรีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ตอนที่ 5 วิเคราะห์ปริมาณทอรีนในผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแตกต่างกัน

วิเคราะห์ปริมาณทอรีนนมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปที่แตกต่างด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับสารอนุพันธ์ที่ได้จากตอนที่ 1 ใช้สภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตามที่ได้จากตอนที่ 2 โดยเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนดังนี้

5.1 ชั่งตัวอย่างน้ำนมโคสดและตัวอย่างน้ำนมแปรรูปตัวอย่างละ 2.0000 กรัม ทำการบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน เติม 5% สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า และนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 4500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

5.2 เก็บส่วนสารละลายใสมาทำการปรับค่า pH ด้วยสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจนกระทั่งได้ pH 7 และทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 10 มิลลิลิตร

5.3 ปิเปตต์สารละลายข้อ 5.2 มา 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองและเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนโดยการเติมสารละลายอโท-พทาลอัลดีไฮด์ 20 ไมโครลิตรและกรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ในลอนขนาดอนุภาค 0.45 ไมครอน

5.4 วิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
ตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำนมโคสดพร้อมดื่มและน้ำนมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปทั้งหมด 15 ชนิด
ได้แก่

- นมโคสดพาสเจอร์ไรส์พร้อมดื่ม
- นมพาสเจอร์ไรส์รสช็อคโกแลต
- นมพาสเจอร์ไรส์รสตรอเบอร์รี่
- นมโคสดสเตอริไลส์
- นมสเตอริไลส์ผสมชาขาว
- นมสเตอริไลส์ผสมมอลต์
- นมโคสด UHT พร้อมดื่ม
- นมยูเอชทีรสหวาน

- นมยูเอชทีรสช็อคโกแลต
- นมยูเอชทีรสสตรอเบอร์รี่
- นมเปรี้ยวรสผลไม้รวม
- นมเปรี้ยวรสสตรอเบอร์รี่
- นมข้นหวาน
- นมผงยี่ห้อ A ซึ่งไม่มีการระบุปริมาณทอรีนบนฉลาก
- นมผงยี่ห้อ B ซึ่งมีการระบุปริมาณทอรีนบนฉลาก

หมายเหตุ ทำการทดลองตัวอย่างละ 5 ซ้ำ



บทที่ 4

ผลการทดลอง

สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอเสนอลำดับของผลการทดลองดังนี้

1. ผลการเปรียบเทียบสารที่ใช้ทำสารอนุพันธ์ของทอรีน 2 ชนิดได้แก่ ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ และฟลูออเรสคามีน
2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
3. ผลการศึกษปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในนม
4. การทวนสอบวิธีวิเคราะห์
5. ผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในนมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปที่แตกต่างกัน

ตอนที่ 1 ผลการเปรียบเทียบสารที่ใช้ทำสารอนุพันธ์ของทอรีน

จากผลการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโนรวมถึงทอรีนด้วยสารอนุพันธ์ชนิดต่างๆ เช่น ใช้ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ในการทำเป็นสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโน 4 ชนิด (Dorresteyn, R.C.; et al. 1996: 159-167) หรือ ใช้ฟลูออเรสคามีนในการทำเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนและตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบยูวี-วิสิเบิล (Gillian, P.; et al. 1996: 1287-1294) ซึ่งสังเกตได้ว่าทอรีนเป็นกรดอะมิโนอิสระชนิดหนึ่งซึ่งคาดว่าจะสามารถเกิดเป็นสารอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ได้และจากโครงสร้างของฟลูคาเมีนนั้นมีหมู่ฟลูออโรฟลอร์ซึ่งคาดว่าจะสามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนส์

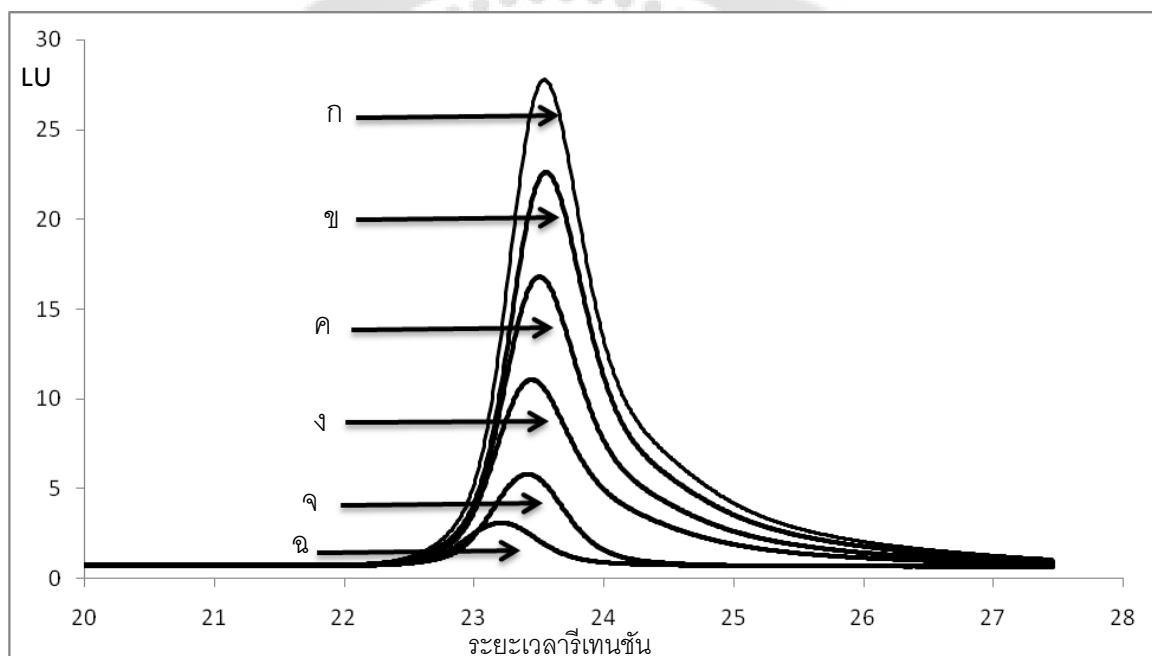
จากเหตุผลข้างต้นที่ได้กล่าวมาดั่งนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบสารที่ใช้ทำสารอนุพันธ์ของทอรีนที่แตกต่างกัน 2 ชนิดได้แก่ ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์และฟลูออเรสคามีน

1.1 การวิเคราะห์ทอรีนโดยใช้สารอนุพันธ์เป็นออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์

จากการหาความยาวคลื่นของการเปล่งแสงโดยใช้ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ในตอนแรกตั้งค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้นที่ 350 นาโนเมตรตามรายงานจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Shifen, M; et al. 2002: 251-267) พบว่าให้ความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่ 451 นาโนเมตร ต่อมาทำการหาค่าความยาวคลื่นของการ

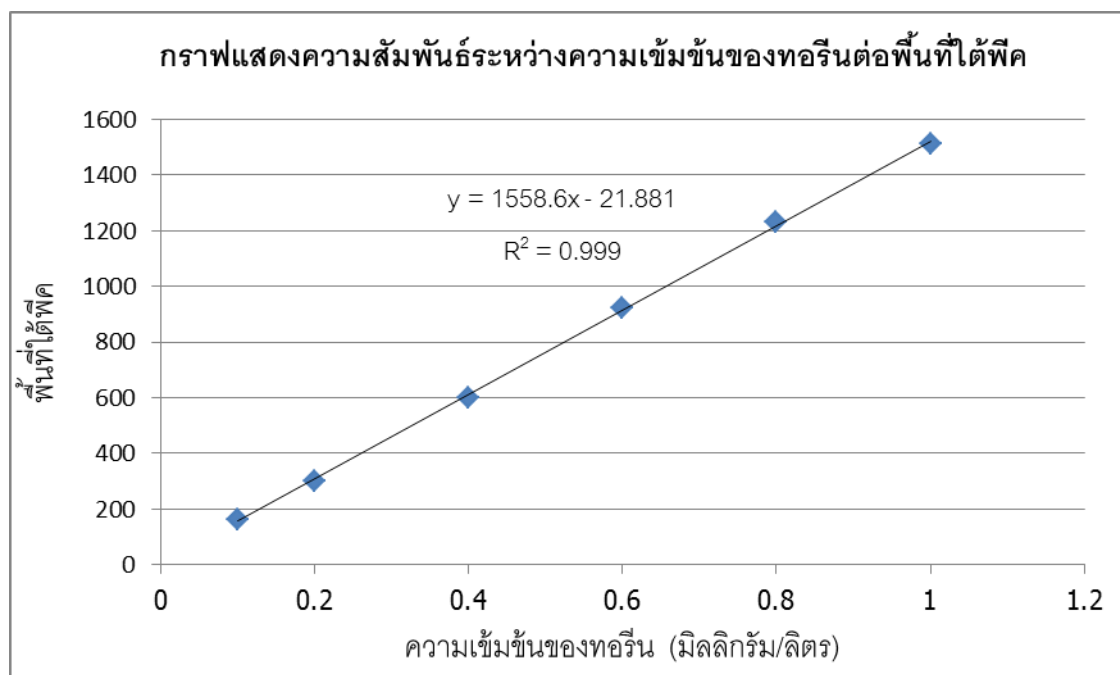
กระตุ้นโดยตั้งค่าความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่ 451 นาโนเมตรพบว่าให้ความยาวคลื่นของการกระตุ้นที่ 333 นาโนเมตร

เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารอนุพันธ์ทอรีนกับออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งในขั้นตอนนี้ใช้อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ตามที่เคยมีรายงานที่พบ (Ferreira; et al. 1997: 1269-1278) พบสัญญาณของสารมาตรฐานเกิดขึ้นที่เวลา 23.5 นาที ซึ่งแสดงภาพของโครมาโทแกรมที่ได้ดังประกอบ 4 และเมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้พีคต่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานทอรีนจะได้กราฟที่ให้สมการถดถอย $y = 1558.6x - 21.881$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.999 ดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 4 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 0.1 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีน

- ก แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร
- ข แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัม/ลิตร
- ค แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม/ลิตร
- ง แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร
- จ แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร
- ฉ แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร

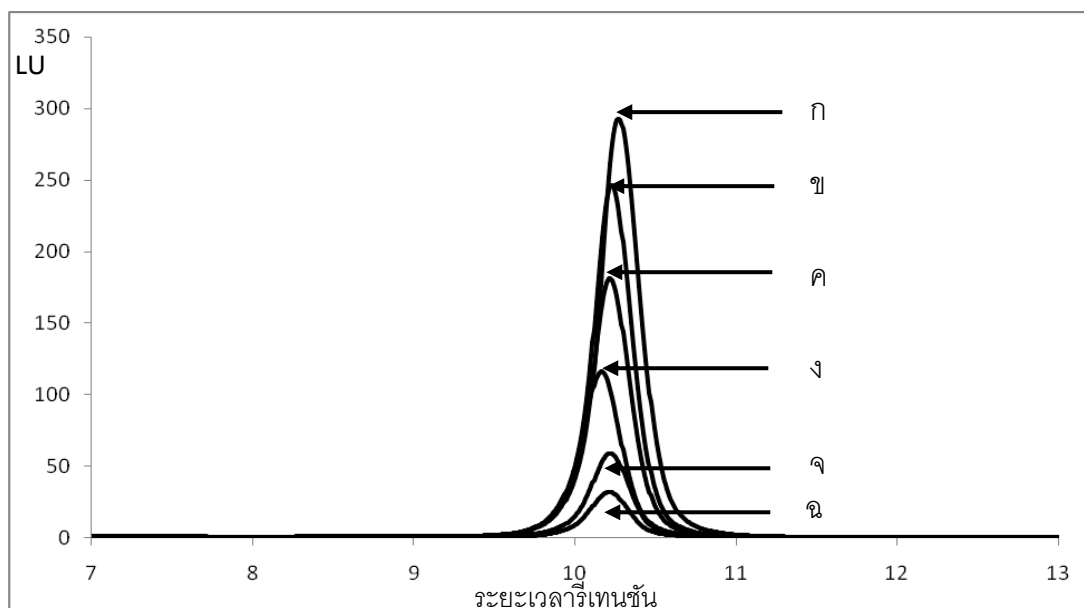


ภาพประกอบ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่อพื้นที่ได้ฟีดของสารมาตรฐานทอรีนเมื่อใช้ออร์โท-พทาเลตดีไฮด์เตรียมเป็นสารอนุพันธ์

1.2 การวิเคราะห์ทอรีนโดยใช้สารอนุพันธ์เป็นฟลูออเรสคามิน

จากการหาความยาวคลื่นของการเปล่งแสงโดยใช้ฟลูออเรสคามินเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยในตอนแรกใช้ความยาวคลื่นของการกระตุ้นที่ 385 นาโนเมตรและสแกนหาความยาวคลื่นของการเปล่งแสงนั้นพบความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่ 487 นาโนเมตร จากนั้นเมื่อตั้งค่าความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่ได้เพื่อหาความยาวคลื่นของการกระตุ้นปรากฏว่าพบค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้นที่ 393 นาโนเมตร

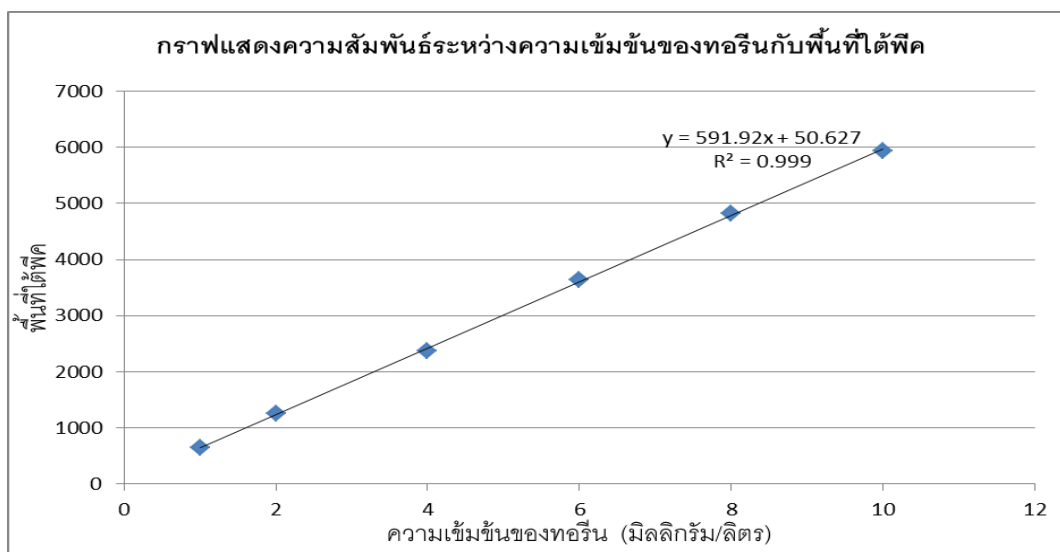
เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารอนุพันธ์ทอรีนกับฟลูออเรสคามินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ความเข้มข้น 1 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ตามรายงานของ Gillian P. และคณะ ในปี 1996 (Gillian, P.; et al. 1996: 1287-1294) พบสัญญาณของสารมาตรฐานที่เวลา 10.2 นาที ซึ่งแสดงภาพของโครมาโทแกรมที่ได้ดังภาพประกอบ 6 และเมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานของพื้นที่ได้ฟีดต่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานทอรีนจะได้กราฟที่ให้สมการถดถอย $y = 591.9x + 50.62$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.999 ดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 6 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 – 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ฟลูออเรสคามีน เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีน

- ก แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร
- ข แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 8.0 มิลลิกรัม/ลิตร
- ค แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัม/ลิตร
- ง แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร
- จ แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร
- ฉ แทน สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

จากการเปรียบเทียบสาร 2 ชนิดที่เตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับทอรีนนั่นในเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าสามารถสร้างกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงได้ใกล้เคียงกันและดังสภาวะข้างต้นดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้นสารอนุพันธ์ของทอรีนกับฟลูออเรสคามีนมีความระยะเวลาที่เทนชันที่น้อยกว่าสารอนุพันธ์ของทอรีนกับอโท-พทาลอัลดีไฮด์ทำให้เกิดอันตรกิริยากับวัฏภาคคงที่น้อยกว่าอีกทั้งยังทำให้เกิดการเคลื่อนที่แบบลามินาร์ (Laminar flow) น้อยกว่าทำให้สัญญาณที่ได้มีลักษณะผอมและสูงกว่าสารอนุพันธ์ของทอรีนกับอโท-พทาลอัลดีไฮด์ซึ่งสัญญาณที่ได้มีลักษณะอ้วนและเตี้ย แต่ถึงอย่างไรมันสารอนุพันธ์ของทอรีนกับอโท-พทาลอัลดีไฮด์นั้นให้ค่าพื้นที่ใต้พีคมากกว่าสารอนุพันธ์ของทอรีนกับฟลูออเรสคามีนเมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากันที่ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยพื้นที่ใต้พีคของสารอนุพันธ์ทอรีนกับอโท-พทาลอัลดีไฮด์และสารอนุพันธ์ของทอรีนกับฟลูออเรสคามีนที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีค่าเท่ากับ 1513.50 และ 637.58 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่อพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานทอรีนเมื่อใช้ฟลูออเรสคาซีนเตรียมเป็นสารอนุพันธ์

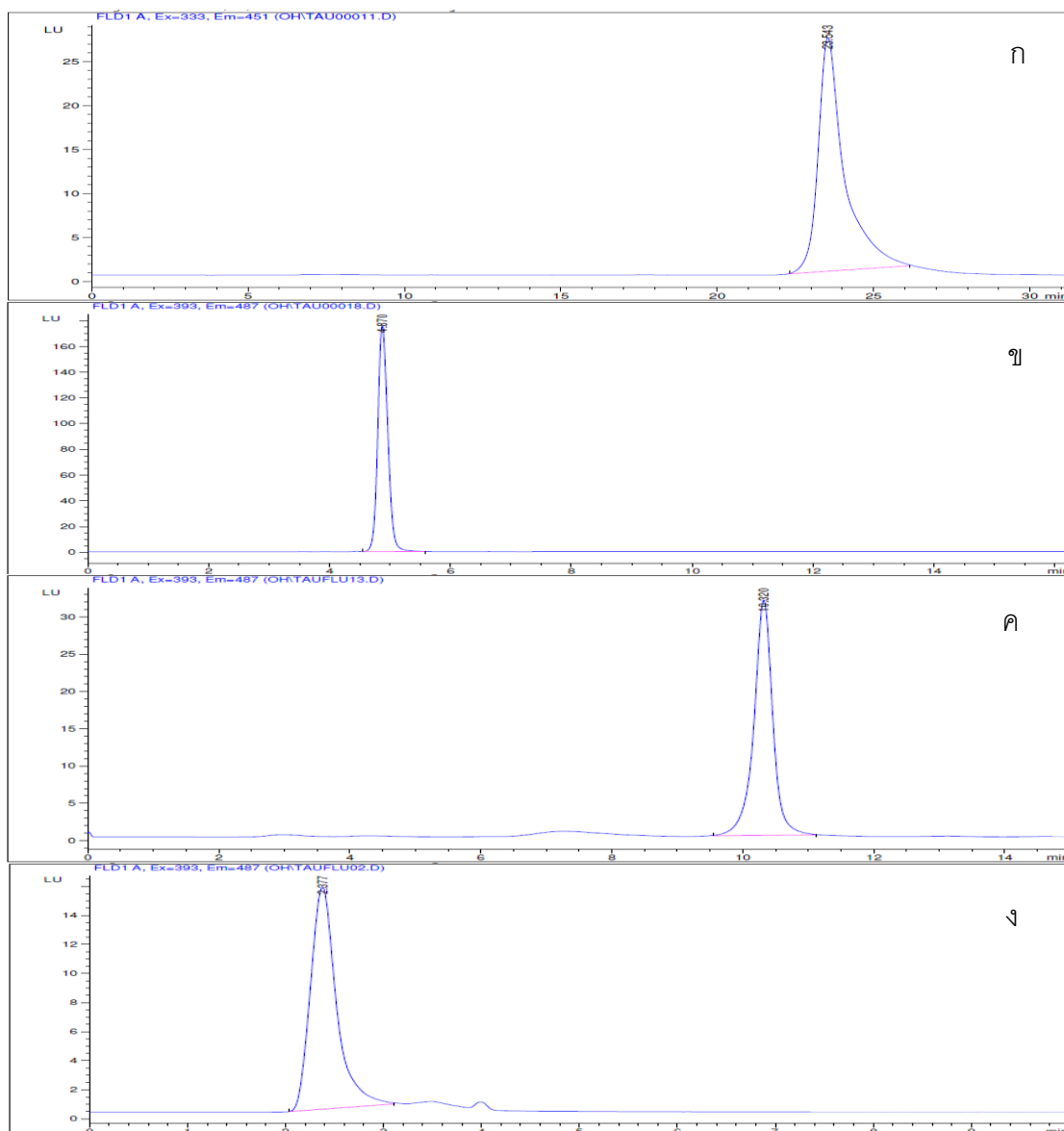
ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดลองปรับระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่ในอีก 2 ระบบ เพื่อทำการเปรียบเทียบในเบื้องต้น รวมเป็น 4 ระบบ ได้แก่

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : เมทานอลอัตราส่วน 60 : 40 (v/v) โดยใช้ortho-พทาลอัลดีไฮด์เตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับทอรีน ให้เป็นระบบที่ 1
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : อะซิโตไนโตรลอัตราส่วน 65 : 35 (v/v) โดยใช้ortho-พทาลอัลดีไฮด์เตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับทอรีน ให้เป็นระบบที่ 2
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.6 เข้มข้น 0.015 M : อะซิโตไนโตรลอัตราส่วน 65 : 35 (V/V) โดยใช้ฟลูออเรสคาซีนเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับทอรีน ให้เป็นระบบที่ 3
4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : อะซิโตไนโตรลอัตราส่วน 65 : 35 (V/V) โดยใช้ฟลูออเรสคาซีนเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับทอรีน ให้เป็นระบบที่ 4

จากการทดลองสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารที่ทำอนุพันธ์คือortho-พทาลอัลดีไฮด์ โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามดังที่แสดงในระบบที่ 1 และระบบที่ 2 ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ให้สมการถดถอยคือ $y = 1558.6x - 21.881$ ($R^2 = 0.999$) และ $y = 816.4x + 17.49$ ($R^2 = 0.998$) ตามลำดับ โคจรมาโทแกรมของสารมาตรฐานทอรีนที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงดัง ภาพประกอบ 8 ก และ ภาพประกอบ 8 ข

เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐานทอรีนโดยใช้สารที่ทำอนุพันธ์คือฟลูออเรสคาซีนโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามดังแสดงไว้ในระบบที่ 3 และระบบที่ 4 ในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 10.0

มิลลิกรัม/ลิตร ให้สมการถดถอยคือ $y = 591.9x + 50.62$ ($R^2 = 0.999$) และ $y = 245.7x - 33.22$ ($R^2 = 0.986$) ตามลำดับ โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงดัง ภาพประกอบ 8 ค และ ภาพประกอบ 8 ง



ภาพประกอบ 8 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร

- ก วัฏภาคเคลื่อนที่ดังที่แสดงในระบบที่ 1
- ข วัฏภาคเคลื่อนที่ดังที่แสดงในระบบที่ 2
- ค วัฏภาคเคลื่อนที่ดังที่แสดงในระบบที่ 3
- ง วัฏภาคเคลื่อนที่ดังที่แสดงในระบบที่ 4

จากภาพประกอบ 8 นั้นจะสังเกตความแตกต่างได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น โดยสัญญาณของสารอนุพันธ์ของทอรีนกับออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์นั้นดีกว่าในแง่ของสภาพไวในการตรวจวัด (Sensitivity) และในแง่ของประสิทธิภาพในการแยกซึ่งดูได้จากความกว้างของพีคที่มีค่าค่อนข้างน้อย อีกทั้งเมื่อพิจารณาปัจจัยอื่นประกอบด้วย เช่น ราคา ปริมาณสารที่ใช้แล้วนั้นออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์เหมาะสมสำหรับใช้ในการเตรียมสารอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมากกว่าฟลูออเรสคาซีน ข้อมูลในแง่ของปัจจัยอื่นที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์ของทอรีน 2 ชนิดที่สภาวะแตกต่างกันแสดงดังตาราง 6

ตาราง 6 เปรียบเทียบผลการทดลองภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันและสารอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน

ค่าที่เปรียบเทียบ	ระบบที่ 1	ระบบที่ 2	ระบบที่ 3	ระบบที่ 4
1. ระยะเวลาอีเทนชัน	23.5 min	4.9 min	10.3 min	2.4 min
2. ปริมาตรของสาร	20 μL	20 μL	100 μL	100 μL
3. linearity range	0.1 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร	0.1 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร	1.0 – 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร	1.0 – 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร
4. พื้นที่ใต้พีค 1 มิลลิกรัม/ลิตร	1513.50	2021.72	637.58	282.30
5. ความสูงของพีคที่ 1 มิลลิกรัม/ลิตร	26.6	175.6	31.6	15.3
6. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	0.999	0.998	0.999	0.986
7. ความกว้างของพีค	0.83	0.18	0.30	0.28

จากตาราง 6 แสดงให้เห็นได้ว่าในระบบที่ 2 ซึ่งใช้ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์เป็นสารที่ใช้ทำอนุพันธ์กับทอรีนและใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : อะซิโตนไตรลอัตราส่วน 65 : 35 (v/v) สามารถวิเคราะห์ทอรีนได้ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และให้ค่าของพื้นที่ใต้พีคและความสูงของพีคที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร สูงที่สุดเมื่อเทียบกับระบบอื่นๆ แสดงถึงสภาพไวในการตรวจวัดที่ดี ในแง่ของความเป็นเส้นตรงของสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานนั้นระบบที่ 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ต่ำกว่าระบบอื่น และในแง่ของประสิทธิภาพในการแยกนั้นในระบบที่ 2 มีค่าความกว้างของพีคต่ำที่สุด ส่งผลให้เมื่อใช้ในการ

วิเคราะห์ในตัวอย่างที่มีสารอื่นรบกวนนั้นจะทำให้มองเห็นการแยกของสัญญาณของทอรีนได้ชัดเจนกว่าอีก 3 ระบบที่เหลือ ดังนั้นออร์โท-พทาเลตดีไฮด์เหมาะสมสำหรับใช้ในการเตรียมสารอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมากกว่าฟลูออเรสคาซีน

ตอนที่ 2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การแยกสารผสมโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีนั้นอาศัยความสามารถของการเกิดอันตรกิริยาของสารกับวัฏภาคคงที่และความสามารถในการละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิดเป็นหลัก และเนื่องด้วยทอรีนเป็นกรดอะมิโนอิสระซึ่งคุณสมบัตินั้นสามารถแตกตัวได้ในค่า pH ต่างๆ เพื่อป้องกันการเกิดการแตกตัวของทอรีนในระหว่างการวิเคราะห์ในระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นจะต้องควบคุมค่า pH ได้ด้วยระบบของสารละลายบัฟเฟอร์ด้วย ดังนั้นในการวิเคราะห์ทอรีนด้วยเทคนิคนี้จึงต้องอาศัยอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม อีกทั้งปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น อัตราการไหลและค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่

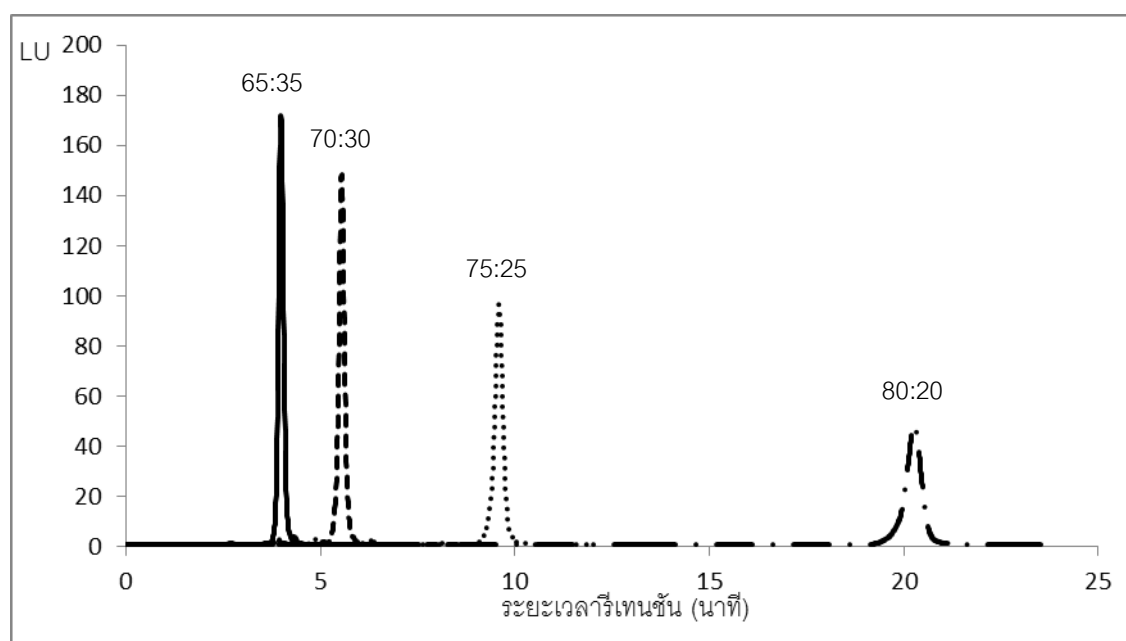
ดังนั้นหลังจากเลือกสารที่ใช้ทำอนุพันธ์กับทอรีนที่เหมาะสมได้แล้วผู้วิจัยได้ทำการปรับอัตราส่วน อัตราการไหล และค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงซึ่งให้ผลการทดลองดังนี้

2.1 การศึกษาหาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

จากการศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ใช้อัตราส่วนของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เข้มข้น 0.02 M : อะซิโตนไตรล 80:20 75:25 70:30 และ 65:35 โดยใช้สารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และตัวอย่างสารสกัดทอรีนจากนมผงเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับออร์โท-พทาเลตดีไฮด์ ซึ่งโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และตัวอย่างสารสกัดทอรีนจากนมผงนั้นให้ผลดังแสดงในภาพประกอบ 9 และภาพประกอบ 10 ตามลำดับ

จากภาพประกอบ 9 นั้นแสดงให้เห็นได้ว่าเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีอัตราส่วนของอะซิโตนไตรลในปริมาณที่มากขึ้นนั้นส่งผลให้สารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น เนื่องจากหลักการทางโครมาโทกราฟีในระบบปริเวอร์สเฟสนั้นวัฏภาคคงที่นั้นแสดงคุณสมบัติที่ไม่มีขั้วจึงทำให้เกิดอันตรกิริยากับทอรีนและวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สารที่แสดงคุณสมบัติที่มีขั้วสูงกว่าวัฏภาคคงที่ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณอัตราส่วนของอะซิโตนไตรลในวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นส่งผลทำ

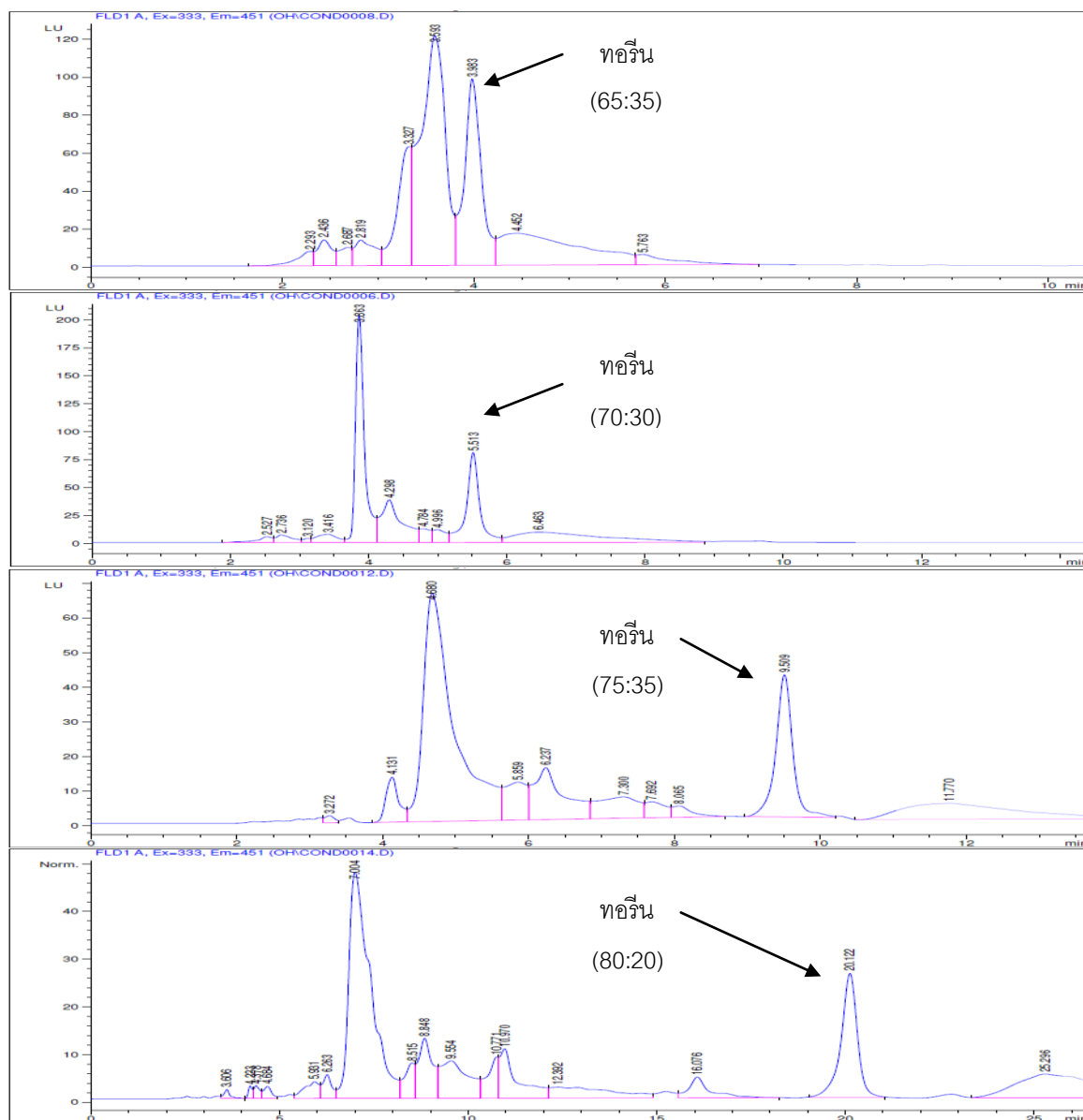
ให้สภาพความเข้มข้นของวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลง จึงทำให้ทอรีนละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ดีขึ้นและถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น โดยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ต่ออะซิโตไนโตรล์ อัตราส่วน 65:35 นั้นเป็นอัตราส่วนที่สามารถชะสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนออกจากคอลัมน์ได้เร็วที่สุดและให้สัญญาณที่มีลักษณะดีและสูงที่สุด แต่ในการกลับกันสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์อย่างรวดเร็วนั้นแสดงถึงการเกิดอันตรกิริยากับวัฏภาคคงที่น้อยลงเช่นกัน ระยะเวลารีเทนชันของสัญญาณที่เกิดขึ้นจากสารมาตรฐานทอรีนโดยใช้อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันนั้นแสดงดังตาราง 7



ภาพประกอบ 9 โคโรมาโทแกรมของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรโดยใช้อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน

ตาราง 7 ค่าระยะเวลารีเทนชันและค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานทอรีน

อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ (ฟอสเฟตบัพเฟอร์ : อะซิโตไนโตรล์)	ระยะเวลา รีเทนชัน (นาที)	พื้นที่ใต้พีคของ สารมาตรฐาน (LU)	พื้นที่ใต้พีคของ สารตัวอย่างนามวง (LU)
80 : 20	20.3	1437.16	667.23
75 : 25	9.6	1554.37	785.30
70 : 30	5.5	1613.15	1072.62
65 : 35	3.9	1633.13	1199.80



ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากน้ำมันแปรรูปเมื่อใช้อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน

จากตาราง 7 และภาพประกอบ 10 จะเห็นได้ว่าแม้ว่าการเพิ่มปริมาณของอะซิโตนไตรล์ในอัตราส่วนที่มากขึ้นนั้น จะส่งผลให้การชะทอริโนออกจากคอลัมน์ทำได้รวดเร็วและให้สัญญาณที่มีความสูงของพีคและพื้นที่ใต้พีคที่สูงขึ้นจริง แต่อย่างนั้นมิได้หมายความว่า จะเกิดการแยกของสารที่ดีขึ้น เนื่องจากสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วแสดงถึงการเกิดอันตรกิริยาของสารกับวัฏภาคคงที่เกิดขึ้นได้น้อยเช่นกัน ซึ่งจากภาพประกอบ 10 นั้นจะเห็นได้ว่าการแยกของสารจะเกิดขึ้นได้ดีก็ต่อเมื่อสารอยู่ในคอลัมน์ได้นานพอให้เกิดอันตรกิริยากับวัฏภาคคงที่ได้มากขึ้น แต่เมื่อสารเกิดอันตรกิริยากับ

วัฏภาคคงที่ได้มากก็ยิ่งส่งผลให้สัญญาณที่ได้มีลักษณะที่กว้างและไม่สูงเกิดขึ้นด้วย จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เกิดการแยกได้ดีและให้สัญญาณที่เหมาะสมที่สุดคืออัตราส่วนของ สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ : อะซิโตนไทรล์ อัตราส่วน 70 : 30 โดยปริมาตร

2.2 การศึกษาหาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

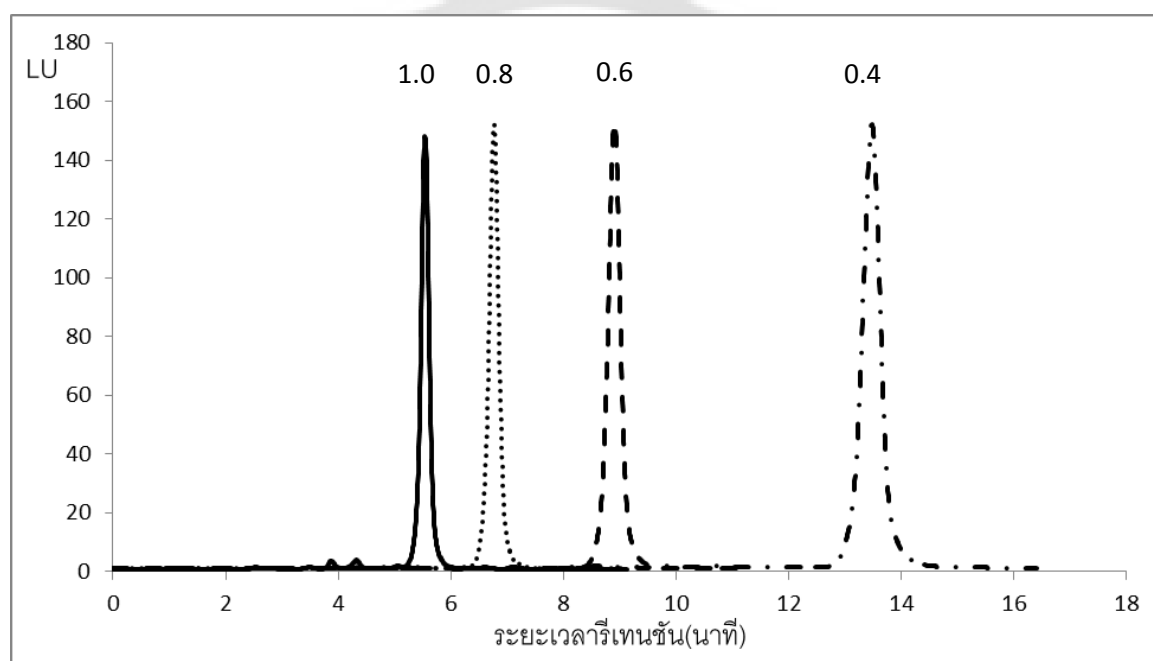
เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนหรือสารใดๆ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูงแต่ละครั้งนั้นต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ เนื่องจากต้องใช้เวลาให้สารที่เข้าสู่คอลัมน์ถูกชะออกจากคอลัมน์เข้าสู่ตัวตรวจวัดโดยวัฏภาคเคลื่อนที่ อีกทั้งต้องใช้เวลาในการให้วัฏภาคเคลื่อนที่ชะสารอื่นที่ยังคงค้างอยู่ในคอลัมน์ออกเพื่อให้ระบบพร้อมสำหรับการวิเคราะห์ในครั้งต่อไป ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งนั้นจะมากน้อยเพียงใดจึงขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ด้วย แต่ถ้าใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่มากเกินไปจะทำให้เกิดความดันผันกลับ (back pressure) ในปริมาณที่สูงตามมาจากภายในคอลัมน์ที่ใช้ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูงนั้นมีลักษณะเป็นอนุภาคนาโนขนาดเล็กอัดอยู่ภายในแน่นมาก (packed column) ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเทคนิคนี้จึงต้องหาอัตราการไหลที่เหมาะสม เพื่อให้ได้การวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และไม่เป็นอันตรายต่อคอลัมน์จากความดันผันกลับที่สูงเกินไปด้วย

นอกจากส่วนของความดันผันกลับที่จะเกิดขึ้นแล้วนั้น อัตราการไหลยังส่งผลโดยตรงต่อ ลักษณะของสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วย เพราะการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ของสาร ภายในคอลัมน์ของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนั้นมีลักษณะของการไหลแบบ ลามินาร์โฟล (Laminar flow) ซึ่งเมื่อสารใดใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานจะเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารใดใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานจะเกิดอันตรกิริยากับวัฏภาคคงที่มากขึ้นและส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่แบบ ลามินาร์โฟลเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย ส่งผลให้เกิดสัญญาณที่ได้มีลักษณะกว้างขึ้น (band broadening)

จากเหตุผลข้างต้นดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร/นาที โดยทดสอบโดยการวัดด้วยสารมาตรฐานทอรีนและสารสกัดตัวอย่างนมผง ซึ่งให้ผลดังนี้

จากภาพประกอบ 11 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้อัตราการไหลที่เร็วขึ้นนั้นส่งผลให้สารถูกชะออกจากคอลัมน์ได้รวดเร็วขึ้น โดยเมื่อใช้อัตราการไหลที่ช้าจะส่งผลให้สัญญาณที่ได้มีลักษณะกว้างกว่าการใช้ อัตราการไหลที่เร็วกว่า เนื่องจากในเทคนิคโครมาโทกราฟีนี้มีค่าที่ใช้อธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์ คือค่า Height equivalent to a theoretical plates (HETP, H) ซึ่งเมื่อค่า H ต่ำนั้นแสดงถึง

ประสิทธิภาพที่ดีกว่าค่า H ที่สูง (แม่น อมรสิทธิ์. 2555) โดยมีความสัมพันธ์ดังแสดงสมการ (3) ซึ่งปัจจัยหนึ่งส่งผลต่อค่า H คือการแพร่ตามแนวยาว (longitudinal diffusion) และการเกิดการแพร่ตามแนวยาวนี้เป็นผลโดยตรงจากอัตราการไหล ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลโดยตรงต่อการทำให้สัญญาณที่ได้มีลักษณะกว้างขึ้น การเปรียบเทียบโดยทำการวัดด้วยสารมาตรฐานทอรีนนั้นจะเห็นภาพในแง่ของเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์แต่ละครั้งจากค่าระยะเวลารีเทนชันและลักษณะของพีคที่มีความคมและความกว้างที่แตกต่างกัน สำหรับการทดสอบโดยใช้สารสกัดตัวอย่างนมแปรรูปนั้นแสดงให้เห็นดังภาพประกอบ 12

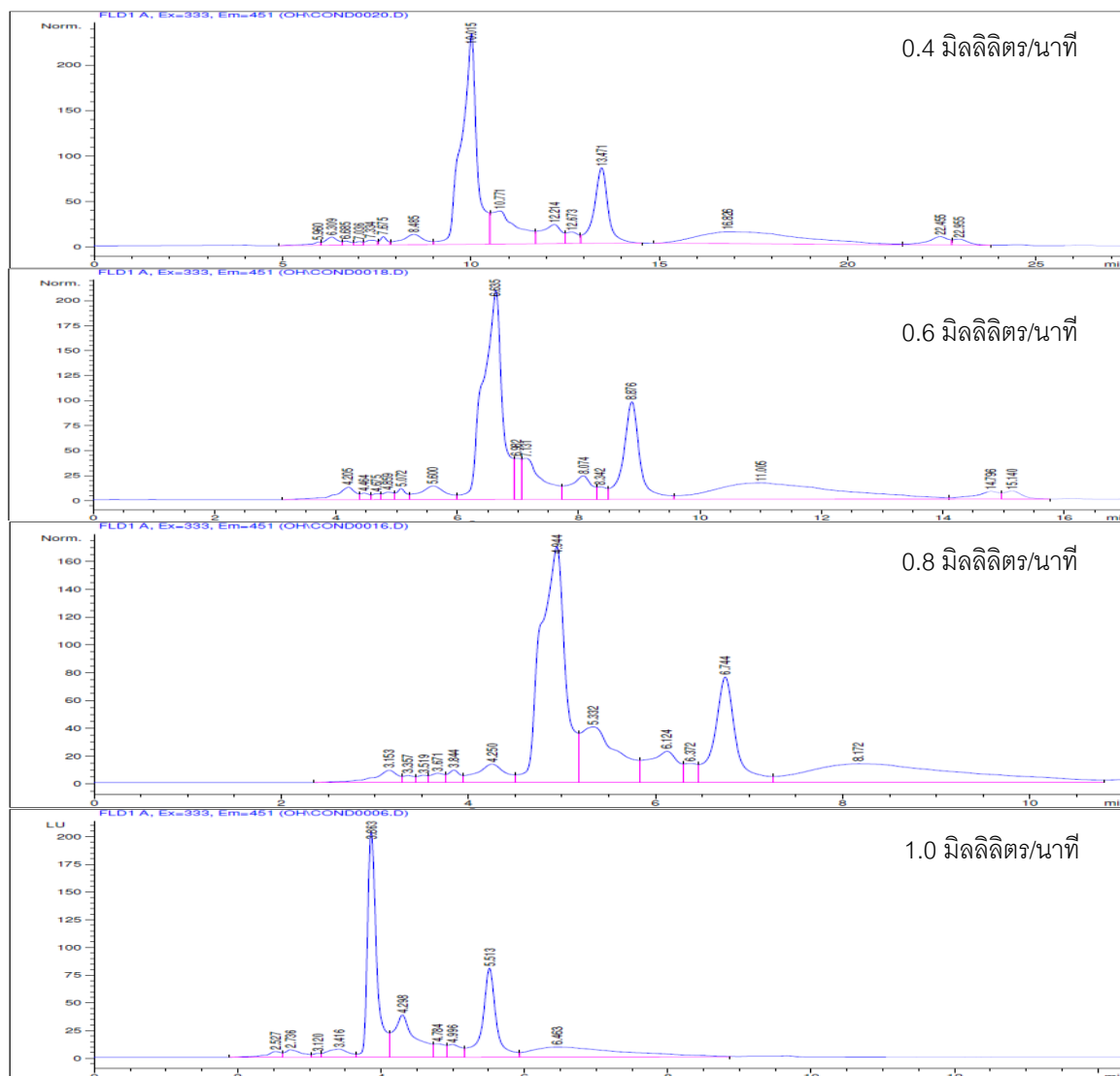


ภาพประกอบ 11 โคโรมาโทแกรมของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรโดยใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน

$$H = L/N \quad \dots\dots\dots(3)$$

เมื่อ L คือ ความยาวของคอลัมน์

N คือ จำนวน Theoretical plates



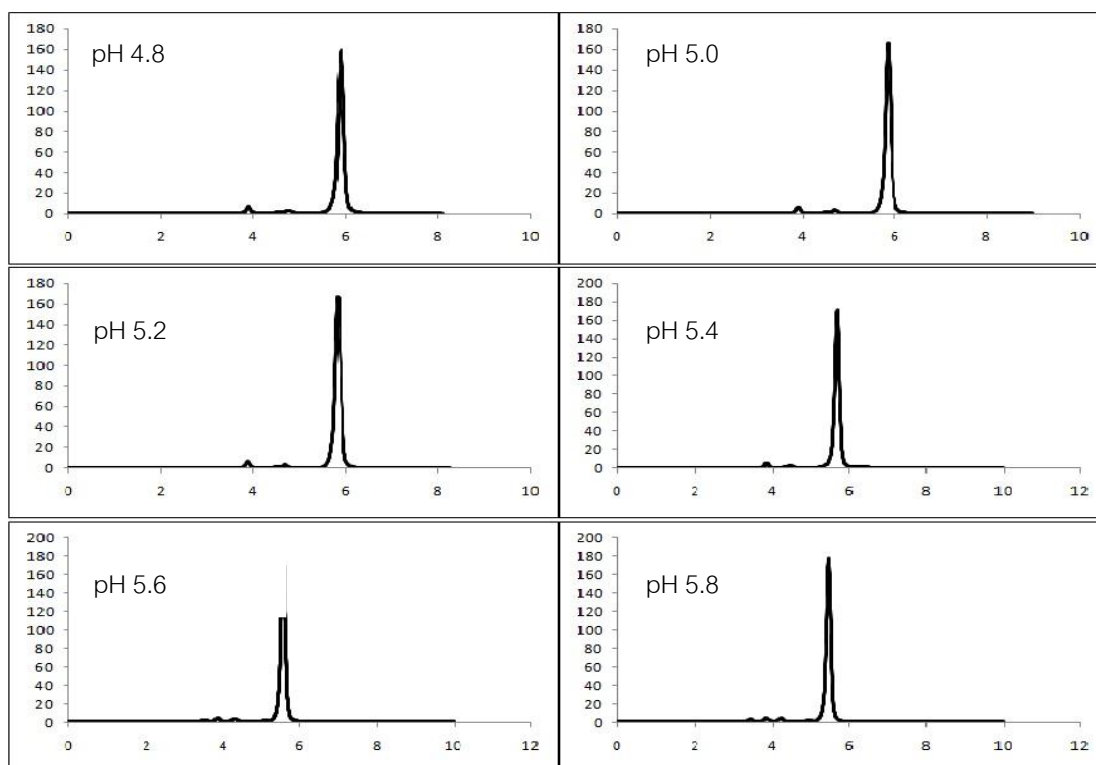
ภาพประกอบ 12 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยน้ำนมแปรรูปโดยใช้อัตราการใช้ของ วัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน

จากภาพประกอบ 12 แล้วจะเห็นได้ว่าการปรับอัตราการใช้ที่แตกต่างกันนั้นไม่ได้ส่งผลต่อการแยกของสารแต่จะส่งผลโดยตรงการเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ความดันของคอลัมน์และความกว้างของพีคซึ่งถ้าใช้อัตราการใช้ 0.4 มิลลิลิตร/นาที จะต้องใช้เวลาจนทอรีนออกจากคอลัมน์ 13.5 นาที ต่อหนึ่งรอบการวิเคราะห์ อีกทั้งต้องใช้เวลาเพื่อรอให้ระบบพร้อมเพื่อทำการวิเคราะห์สารในครั้งต่อไปทำให้เสียเวลามาก แต่หากใช้อัตราการใช้ 1.0 มิลลิลิตร/นาที นั้นใช้เวลาที่ทอรีน ออกจากคอลัมน์เพียง 5.5 นาที ต่อหนึ่งรอบการวิเคราะห์และยังสามารถชะสารรบกวนออกจากคอลัมน์ได้ในเวลาอันรวดเร็วด้วย นอกจากนี้เมื่อใช้อัตราการใช้ 1.0 มิลลิลิตร/นาที นั้นส่งผลให้ความกว้างของพีคมีค่า 0.16 นาที ในขณะที่หากให้อัตราการใช้ 0.4 0.6 และ 0.8 มิลลิลิตร/นาที นั้นพีคที่ได้จะมี

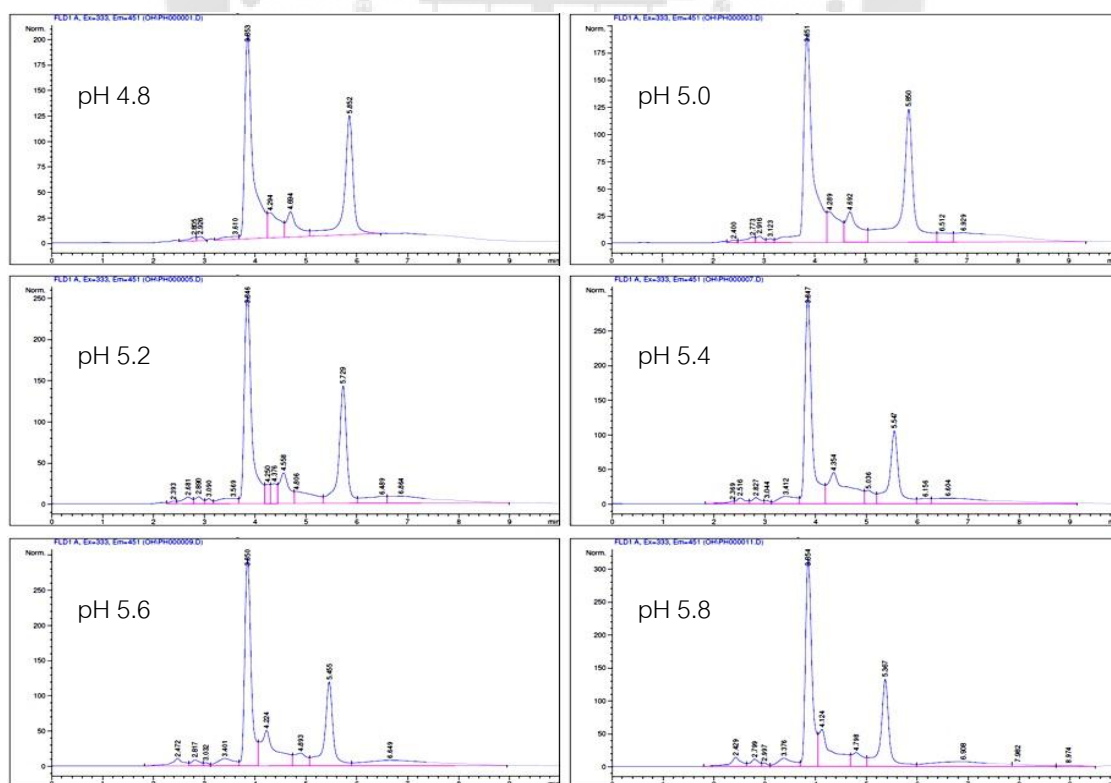
ความกว้าง 0.39 0.26 และ 0.20 นาที ตามลำดับ และเมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณค่า H ด้วยสมการ 3 แล้วนั้นพบว่าอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที ให้ค่า H ต่ำที่สุด แสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีที่สุด จึงเลือกใช้อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที

2.3 การศึกษาหา pH ที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

เนื่องด้วยทอรีนนั้นเป็นกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งโดยคุณสมบัติทางโครงสร้างของกรดอะมิโนนั้นสามารถแตกตัวได้สารละลายได้เนื่องจากภายในโครงสร้างมีหมู่แทนที่ที่แสดงสมบัติเป็นกรดและหมู่แทนที่ที่แสดงสมบัติเป็นเบสอยู่ในโครงสร้าง ดังนั้นค่า pH ในระบบจึงมีอิทธิพลโดยตรงต่อการแตกตัวของทอรีน ซึ่งหากมีการแตกตัวของทอรีนในระหว่างการวิเคราะห์แล้วนั้นจะทำให้คุณสมบัติในการละลายในตัวทำละลายหรือวัฏภาคเคลื่อนที่และคุณสมบัติในการเกิดอันตรกิริยากับวัฏภาคคงที่เปลี่ยนไปด้วย ซึ่งอาจเป็นเหตุให้การวิเคราะห์เกิดความคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในระบบของการวิเคราะห์จึงต้องควบคุมค่า pH ด้วยการใส่สารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการทดสอบค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ที่แตกต่างกันตั้งแต่ 4.8 – 5.8 นั้น ค่าระยะเวลารีเทนชันของสารมาตรฐานทอรีนที่ได้จากโครมาโทแกรมนั้นมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย โดยค่าระยะเวลารีเทนชันของสารมาตรฐานทอรีนเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีค่า pH 4.8 5.0 5.2 5.4 5.6 และ 5.8 นั้นมีค่า 5.9 5.8 5.8 5.6 และ 5.5 นาที ตามลำดับ โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และสารสกัดตัวอย่างน้ำมันเมื่อใช้ค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันนั้นแสดงดังภาพประกอบ 13 และภาพประกอบ 14 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อสังเกตจากโครมาโทแกรมของสารสกัดนมแปรรูปแล้วนั้นจะเห็นได้ว่าค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ในวัฏภาคเคลื่อนที่ส่งผลต่อการแยกของทอรีนกับสารรบกวนเล็กน้อย โดยเมื่อค่า pH สูงขึ้นนั้นทำให้เกิดการแยกของทอรีนกับสารรบกวนได้น้อยลงโดยดูจากค่าระยะเวลารีเทนชัน แต่อย่างไรก็ตามทอรีนนั้นเป็นกรดอะมิโนที่มีค่าคงที่การแตกตัวหรือค่า pK_a อยู่ที่ 4.96 ดังนั้นหากสารละลายบัฟเฟอร์ในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีค่า pH ต่ำเกินไปจะส่งผลให้กรดอะมิโนเกิดการแตกตัวและมีความคลาดเคลื่อนต่อการวิเคราะห์ได้ และหากใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH สูงเกินไปก็จะส่งผลให้ประสิทธิภาพของการแยกทอรีนกับสารรบกวนต่ำลงดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 5.4 เป็นส่วนผสมในวัฏภาคเคลื่อนที่



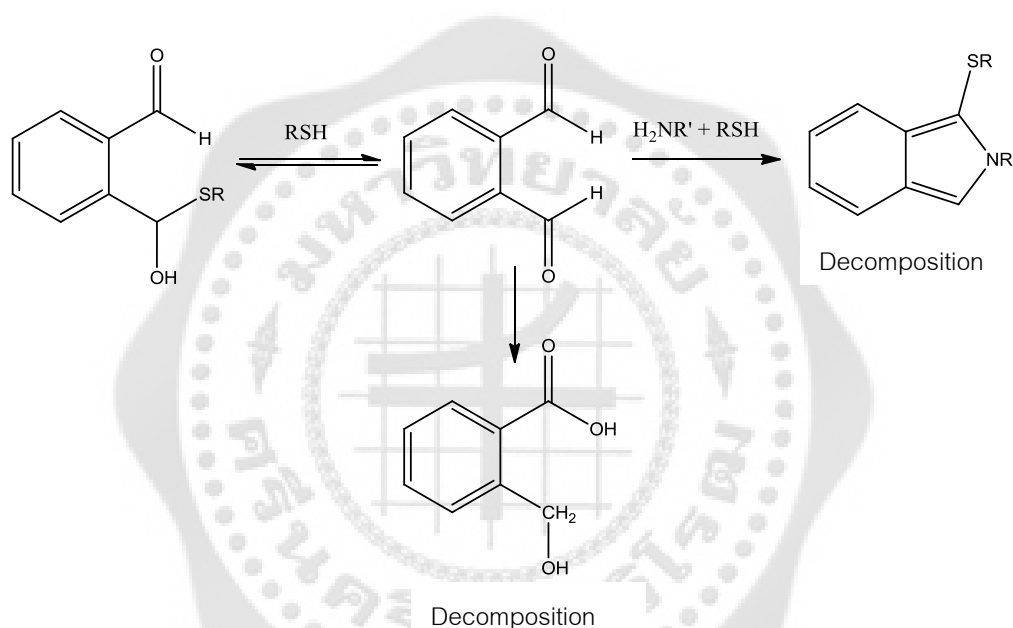
ภาพประกอบ 13 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานทอรินเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีค่า pH แตกต่างกัน



ภาพประกอบ 14 โครมาโทแกรมของสารสกัดตัวอย่างนมเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีค่า pH แตกต่างกัน

2.4 ศึกษาผลกระทบของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

จากภาพประกอบ 15 (Dorresteyn R.C.; et al. 1996: 159-167) อธิบายการเกิดปฏิกิริยาระหว่างออโท-พทาลอัลดีไฮด์กับกรดอะมิโน ซึ่งจะเห็นได้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่จะเกิดการสลายตัวได้ ซึ่งการสลายตัวของผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นจะช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับเวลาโดยตรง ดังนั้นจึงต้องหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา เพื่อให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณมากที่สุด และในขณะเดียวกันก็ต้องไม่ให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นสลายตัวเสียก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

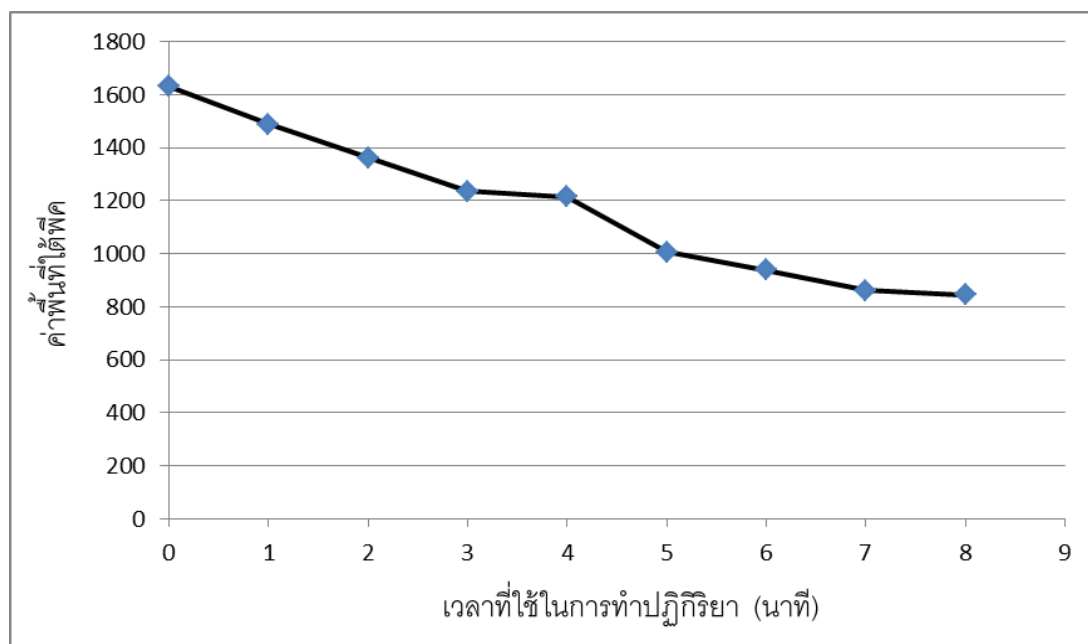


ภาพประกอบ 15 ปฏิกิริยาระหว่างออโท-พทาลอัลดีไฮด์กับกรดอะมิโน

จากการทดลองเปรียบเทียบการใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างออโท-พทาลอัลดีไฮด์กับทอรีนเพื่อให้เกิดเป็นสารอนุพันธ์นั้นผู้วิจัยได้ทำการทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดตั้งแต่ 0-10 นาที เมื่อเปรียบเทียบค่าของพื้นที่ใต้พีคจากโครมาโทแกรมที่ได้จากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแล้วนั้นให้ผลการทดลองดังภาพประกอบ 16

จากภาพประกอบ 16 นั้นจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาโดยการทิ้งไว้ในที่มืดนานขึ้นนั้นส่งผลให้ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารอนุพันธ์ของทอรีนมีค่าลดลง เนื่องจากสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นนั้นเกิดการสลายตัวดังปฏิกิริยาที่แสดงดังภาพประกอบ 14 ซึ่งการลดลงของค่าพื้นที่ใต้พีคนั้นส่งผลโดยตรงกับสภาพไวในการตรวจวัดดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนโดยการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ด้วย

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนั้นจึงทำการเตรียมสารอนุพันธ์ของทอรีนแล้วตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในทันที ซึ่งการลดลงของสัญญาณของสารอนุพันธ์ของทอรีนกับอโท-พทาลอัลดีไฮด์นั้นสอดคล้องกับบทความที่เคยมีการกล่าวถึงก่อนหน้านี้ว่าเมื่อใช้ออโท-พทาลอัลดีไฮด์กับทอรีนแล้วนั้นข้อเสียคือสารอนุพันธ์ที่ได้มีความเสถียรต่ำ แต่เตรียมได้ง่ายและสามารถเตรียมซ้ำได้ดี (Shifen M.; et al. 2002: 251-267)



ภาพประกอบ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคของสารอนุพันธ์ของทอรีนกับอโท-พทาลอัลดีไฮด์เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน

ตอนที่ 3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ทอรีนในนม

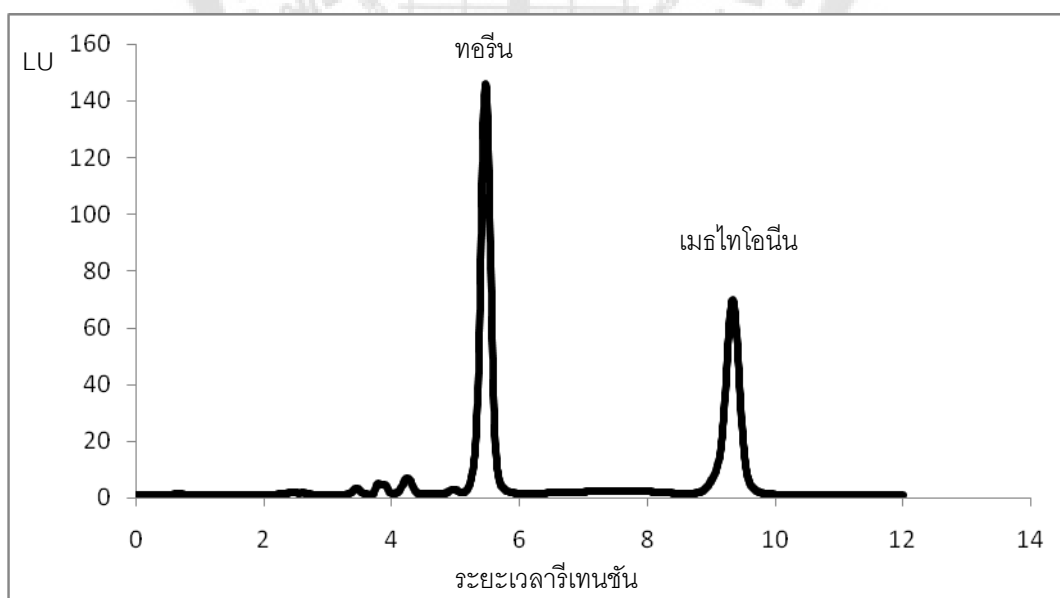
ในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนั้นนอกจากสถานะที่ใช้ในระบบของการวิเคราะห์แล้วนั้นยังมีปัจจัยอื่นที่อาจจะส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนได้ เนื่องจากในตัวอย่างน้ำนมที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นมีองค์ประกอบอื่นปะปนอยู่มากมายเช่นกรดอะมิโนอื่นที่มีความสัมพันธ์กับทอรีน สถานะความเป็นกรด-ด่างในการทำปฏิกิริยา หรือระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของทอรีนกับอโท-พทาลอัลดีไฮด์ อีกทั้งในการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากน้ำนมในแต่ละประเภทนั้นยังมีการใช้ความร้อนในการแปรรูปที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละปัจจัยเหล่านี้ล้วนอาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในนมได้ทั้งสิ้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมแปรรูปดังนี้

3.1 ศึกษาผลกระทบของกรดอะมิโนซิสเทอีน เมธไทโอนีน และไลซีน

ดังที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 เรื่องของกระบวนการเกิดทอรีนภายในร่างกาย ซึ่งมีกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการนี้คือกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมธไทโอนีนเป็นกรดอะมิโนหลักในการสังเคราะห์ทอรีนในร่างกาย อีกทั้งไลซีนนั้นยังเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญในนมอีกด้วย ดังนั้นในการศึกษาผลกระทบของกรดอะมิโนที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนนั่นจึงเลือกใช้กรดอะมิโนซิสเทอีน เมธไทโอนีนและไลซีนในการทดลอง ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนั้นให้ผลดังนี้

จากผลการทดลองนั้นกรดอะมิโนไลซีนและซิสเทอีนที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร นั้นไม่ให้สัญญาณบนโครมาโทแกรม มีเพียงสารอนุพันธ์ของทอรีนกับเมธไทโอนีนเท่านั้น โดยจากโครมาโทแกรมนั้นมีพีคของสารอนุพันธ์ของทอรีนและเมธไทโอนีนที่เวลา 5.5 และ 9.3 นาที ตามลำดับ ซึ่งสำหรับกรดอะมิโนไลซีนไม่ให้สัญญาณเกิดขึ้นบนโครมาโทแกรม สำหรับกรดอะมิโนซิสเทอีนนั้นต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 200 มิลลิกรัม/ลิตรจึงจะเกิดสัญญาณที่มีความสูงพีคประมาณครึ่งหนึ่งของสัญญาณของทอรีนที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งความเข้มของสัญญาณที่เกิดจากสารอนุพันธ์ของทอรีนที่ความเข้มข้นเท่ากันนั้นสูงกว่าอย่างเห็นได้ชัด โครมาโทแกรมของสารผสมของกรดอะมิโนทอรีน เมธไทโอนีน ซิสเทอีน และไลซีนที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร นั้นแสดงดังภาพประกอบ 17

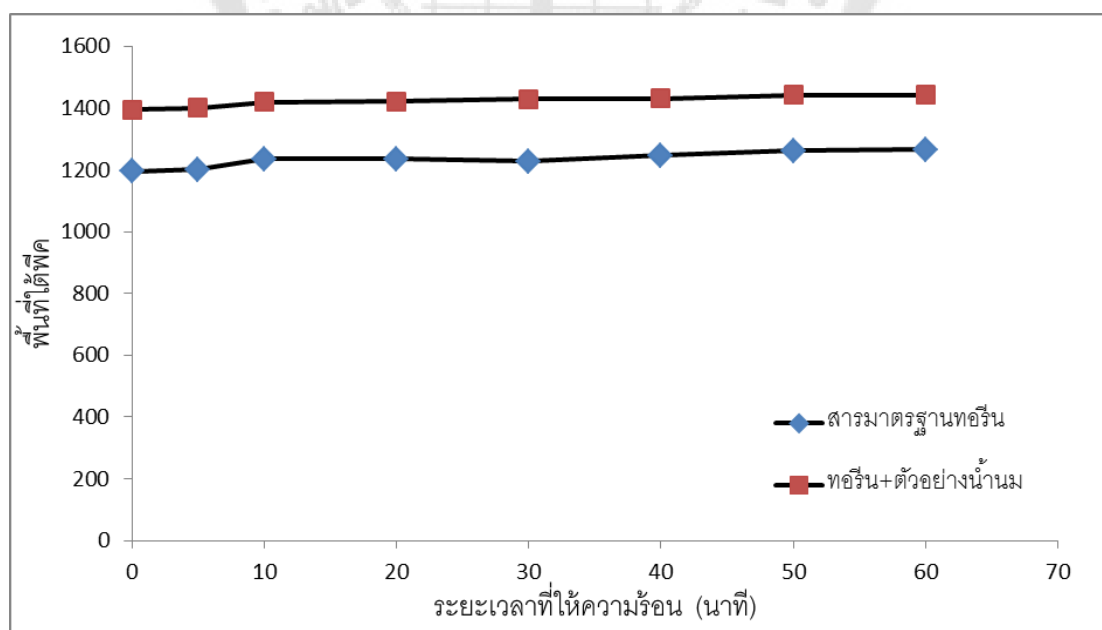


ภาพประกอบ 17 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีน เมธไทโอนีน ซิสเทอีน และไลซีน ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

จากลักษณะการแยกของสารมาตรฐานทอรีนและเมธไทโอนีนดังภาพประกอบ 17 นั้นแสดงให้เห็นได้ว่าเมธไทโอนีนไม่มีส่วนรบกวนในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ส่วนกรดอะมิโนซิสเทอีนและไลซีนนั้นไม่ทำให้สัญญาณในช่วงที่ใช้ในการวิเคราะห์ทอรีน นอกจากกรดอะมิโนซิสเทอีน เมธไทโอนีน และไลซีน จะไม่ส่งผลกระทบในการแยกของทอรีนบนโครมาโทแกรมแล้ว ยังไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณของทอรีนอีกด้วยจากพื้นที่ใต้พีคของทอรีนในสารละลายที่มีกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดผสมอยู่นั้นไม่มีความแตกต่างจากพื้นที่ใต้พีคของสารละลายที่มีกรดอะมิโนทอรีนเพียงชนิดเดียว

3.2 ผลกระทบของระยะเวลาในการให้ความร้อนต่อทอรีน

ในกระบวนการถนอมอาหารประเภทนมและกระบวนการแปรรูปน้ำนมดิบแต่ละกระบวนการนั้น มีปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือการให้ความร้อน ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ ยูเอชที หรือสเตอริไลส์ก็ตาม ซึ่งแต่ละกระบวนการแปรรูปนั้นมีอุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนที่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบระยะเวลาที่ให้ความร้อนเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณทอรีนที่ผ่านการให้ความร้อนในระยะเวลาที่แตกต่างกัน และผลจากการทดสอบแสดงดังภาพประกอบ 18



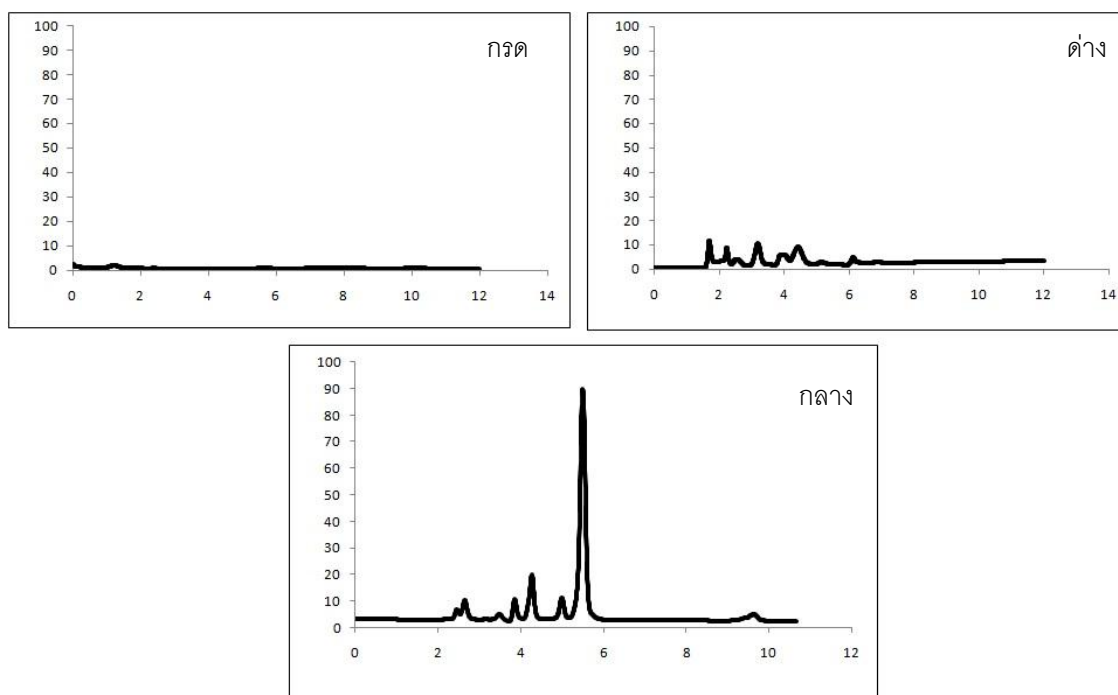
ภาพประกอบ 18 ค่าของพื้นที่ใต้พีคของสัญญาณทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน

จะเห็นได้ว่าเมื่อทอรีนผ่านการให้ความร้อนที่ระยะเวลาแตกต่างกันแล้วนั้นค่าพื้นที่ใต้พีคแตกต่างกันเล็กน้อย แต่จากการคำนวณค่าทางสถิติแล้วนั้นค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานทอรีนและตัวอย่างน้ำมันที่เติมสารมาตรฐานทอรีนลงไป เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่ระยะเวลาแตกต่างกันแล้วนั้นค่าของข้อมูลในแต่ละชุดนั้นสามารถอธิบายได้ด้วยค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของข้อมูลในชุดของสารมาตรฐานทอรีนและข้อมูลในชุดของตัวอย่างน้ำมันที่เติมสารมาตรฐานทอรีน มีค่าเท่ากับ 0.02 และ 0.01 ตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกได้ว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นในข้อมูลแต่ละชุดนั้นถือว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับบทความที่มีการกล่าวถึงก่อนหน้านี้ว่าทอรีนนั้นสามารถอยู่ในอาหารได้แม้อาหารนั้นจะผ่านกระบวนการปรุงสุกด้วยความร้อนก็ตาม ดังเช่นเดียวกับกระบวนการถนอมอาหารประเภทนมด้วยความร้อนเช่นกัน (Shifen, M.; et al. 2002: 251-267)

3.3 ผลกระทบของความเป็นกรด-ด่าง ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

เนื่องจากคุณสมบัติของกรดอะมิโนนั้นสามารถแตกตัวได้เมื่ออยู่ในสารละลาย สำหรับทอรีนก็เช่นกันเมื่ออยู่ในการละลายที่เป็นกลางนั้นหมู่ซัลโฟนิคจะแสดงสมบัติเป็นกรดอ่อนโดยแตกตัวให้โปรตอน (H^+) และหมู่อะมิโนจะรับโปรตอนเกิดแอมโมเนียมไอออน (NH_3^+) ทำให้ในสารละลายที่เป็นกลางนั้นกรดอะมิโนแสดงสมบัติเป็นสวิตเทอร์ไอออน (Switer-ion) เมื่อทดสอบสภาวะของตัวทำละลายที่ใช้ให้มีสภาวะเป็นกรด เป็นกลาง หรือเป็นด่างนั้น ปรากฏว่าเมื่อสภาวะของสารละลายเป็นกรดและเป็นด่างที่ค่า pH ต่ำกว่า 3.0 และสูงกว่า 9.0 นั้นไม่พบสัญญาณของสารอนุพันธ์ของทอรีนบนโครมาโทแกรม แต่เมื่อใช้สารละลายที่มีค่า pH เป็นกลางนั้นพบสัญญาณของสารอนุพันธ์ของทอรีนได้ชัดเจนดังภาพประกอบ 19

จะเห็นได้ว่ามีเพียงสารละลายที่มีสภาวะเป็นกลางเท่านั้นที่ให้สัญญาณของสารอนุพันธ์ของทอรีนบนโครมาโทแกรม เนื่องจากเมื่อกรดอะมิโนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจะทำให้โมเลกุลเกิดการแตกตัว และเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่างกรดอะมิโนจะมีการรับโปรตอน (H^+) จึงทำให้โมเลกุลของทอรีนสูญเสียหมู่ฟังก์ชันที่จะเข้าจับหรือหมู่ที่จะเกิดปฏิกิริยากับออร์โท-พทาเลตไดไฮดรด์ ทำให้ไม่สามารถเกิดเป็นสารอนุพันธ์ที่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้



ภาพประกอบ 19 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีน เมื่อเตรียมในสารละลายที่มีสถานะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน

ตอนที่ 4 การทวนสอบวิธีวิเคราะห์

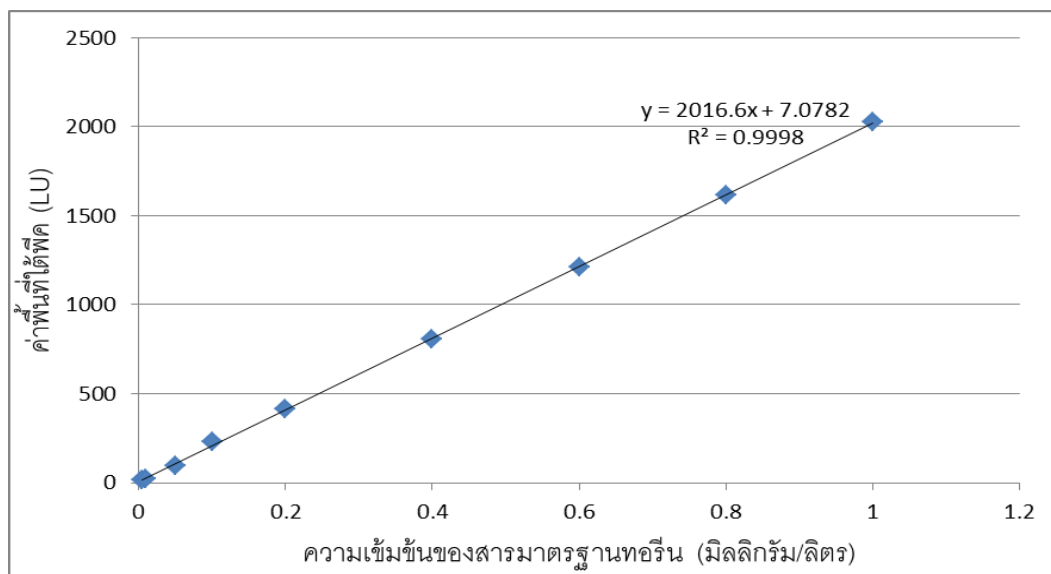
4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารอนุพันธ์ของทอรีน

จากการทดลองตอนที่ 2 และตอนที่ 3 นั้นเมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนมาสร้างกราฟมาตรฐานของทอรีนในช่วงความเข้มข้น 0.005 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยให้แกน x แทนความเข้มข้นของสารมาตรฐานทอรีน (มิลลิกรัม/ลิตร) และแกน y แทนค่าพื้นที่ใต้พีค (Peak Area) แล้วนั้นให้สมการถดถอยคือ $y = 2016.6x + 7.0782$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.999 ดังภาพประกอบ 20

4.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit Of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit Of Quantitation, LOQ)

สำหรับการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณนั้นในงานวิจัยนี้ทำการทดสอบโดยการวัดสารมาตรฐานทอรีนที่ต่ำมากๆ โดยการเจือจางสารละลายมาตรฐานจนกระทั่งสัญญาณที่เกิดขึ้นมีความสูงเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (3 S/N) เป็นความเข้มข้นของค่า LOD และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวน (10 S/N) เป็นความเข้มข้นของค่า

LOQ ซึ่งจากการทดลองนั้นค่า LOD และ LOQ นั้นมีค่าเท่ากับ 0.001 และ 0.005 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ



ภาพประกอบ 20 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานทอรีนและพื้นที่ใต้พีค

4.3 ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Accuracy)

การตรวจสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้นั้นแสดงผลโดยการใช้ค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) จากการเติมสารมาตรฐานทอรีนลงในสารตัวอย่างจนได้ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งค่าร้อยละของการคืนกลับจากการทดสอบในสารตัวอย่างนั้นพบว่าอยู่ในช่วง 80.03 ± 1.20 ถึง 94.76 ± 1.36 แสดงดังตาราง 8 สำหรับตัวอย่างนมผงทั้ง 2 ชนิดนั้นพบว่ามีทอรีนอยู่ในปริมาณที่สูงซึ่งในการหาละเอียดการคืนกลับนั้นเกิดความคลาดเคลื่อนได้สูงอย่างมาก อย่างไรก็ตามตัวอย่างนมผง B นั้นมีการระบุปริมาณทอรีนอยู่ในฉลากจึงใช้ปริมาณที่ระบุฉลากเป็นตัวแทนเพื่อหาละเอียดการคืนกลับแทนการเติมสารมาตรฐานทอรีนลงในตัวอย่างนมผง B

4.4 ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์ (Precision)

การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้สามารถอธิบายได้โดยการทำซ้ำเพื่อดูความแม่นยำของค่าที่วัดได้ของข้อมูลในแต่ละครั้งว่ามีความใกล้เคียงกันเพียงใด โดยในงานวิจัยนี้รายงานในรูปของร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ซึ่งจากการทดลองเป็นการวัด

ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันตัวอย่างละ 5 ข้ำ ซึ่งตัวอย่างนมที่มีปริมาณทอรีนสูงที่สุดคือนมผง B นั้นมีปริมาณทอรีนสูงถึง 294.68 ± 2.24 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีค่า %RSD เท่ากับ 0.76 ส่วนตัวอย่างนมที่มีปริมาณทอรีนไม่ถึง 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม นั้นให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.26 – 4.71 เมื่อ $n = 5$ ดังค่าที่แสดงในตาราง 8

ตอนที่ 5 วิเคราะห์ปริมาณทอรีนในน้ำมันโคสดและผลิตภัณฑ์นมแปรรูป

จากการทดลองในตอนต้นที่ 2 และตอนที่ 3 นั้นเป็นการปรับสภาวะและศึกษาผลกระทบต่างๆ ที่จะส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในนม ซึ่งหลังจากการปรับสภาวะต่างๆ แล้วนั้นทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารอนุพันธ์ของทอรีนโดยใช้ความเข้มข้น 0.005 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ได้สมการเส้นตรงคือ $y = 2016.6x + 7.0782$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.999 ซึ่งในขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปนั้นจะใช้สภาวะข้างต้นดังที่ได้ทำจากตอนที่ 2 และตอนที่ 3

เนื่องจากในน้ำมันเต็มไปด้วยองค์ประกอบต่างๆ มากมาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุและวิตามินต่างๆ แต่ในองค์ประกอบเหล่านั้น มีอีกสิ่งหนึ่งที่สำคัญคือ จุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์แตกต่างกันไปซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นส่งผลต่อการเน่าเสียของนม ทำให้ค่า pH เปลี่ยนแปลงไป เป็นต้น ดังนั้นน้ำมันโคสดที่เก็บได้จากแม่วัวนั้นจึงต้องทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ก่อนในระดับหนึ่งเพื่อไม่ให้เกิดการเน่าเสียที่เร็วเกินไปกว่าจะนำมาบริโภคได้โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำมันโคสดที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยกระบวนการที่แตกต่างกัน 3 กระบวนการได้แก่ กระบวนการพาสเจอร์ไรส์ ยูเอชที และสเตอริไลส์ และน้ำมันโคที่ผ่านกระบวนการแปรรูปได้แก่ นมข้นหวาน นมผง น้ำมันผสมและน้ำมันแต่งกลิ่นและรสชาติต่างๆ ซึ่งปริมาณทอรีนในน้ำมันประเภทต่างๆ แสดงดังตาราง 8

จากตาราง 8 นั้นจะเห็นได้ว่าน้ำมันโคสดที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อน ยูเอชที และสเตอริไลส์นั้นพบปริมาณทอรีนมากกว่าน้ำมันโคสดพาสเจอร์ไรส์ โดยจากการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการพาสเจอร์ไรส์นั้นเป็นการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคแต่ไม่ได้ทำให้จุลินทรีย์ตายทั้งหมด ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ยังคงมีกระบวนการเจริญเติบโตอยู่ ซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาณทอรีนในน้ำมันได้ โดยจะเห็นว่าน้ำมันโคสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยกระบวนการสเตอริไลส์นั้นพบปริมาณทอรีนสูงกว่าน้ำมันโคสด ยูเอชที และพาสเจอร์ไรส์ อีกทั้งเมื่อเทียบกับน้ำมันที่ผ่านการปรุงแต่งกลิ่นและรสชาตินั้นจะเห็นได้ว่าน้ำมันปรุงแต่งรสมอลต์ที่ผ่านกระบวนการสเตอริไลส์นั้นพบปริมาณทอรีนสูงที่สุดเช่นกัน ในส่วนของน้ำมันแปรรูปนั้นที่น่าสนใจคือนมผงสำหรับเด็กอายุ 3 – 6 เดือน (นมผง B) นั้นพบปริมาณทอรีนที่สูงมาก เนื่องจากทารกในวัยนี้ทอรีนมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต ดังนั้น

ผู้ประกอบการต่างๆ จึงมีการเติมทอรีนลงในผลิตภัณฑ์นมผงสำหรับเด็กทารกด้วยเช่นกัน ซึ่งบนฉลากของผลิตภัณฑ์ที่มีการระบุปริมาณทอรีนในปริมาณ 350 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ตาราง 8 ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำนมโคสดและน้ำนมแปรรูป

ตัวอย่าง	ปริมาณทอรีน (มิลลิกรัม/กิโลกรัม±SD)	ร้อยละการคืนกลับ (% ± SD) n =5	%RSD n=5
พาสเจอร์ไรส์			
น้ำนมโคสด	2.34 ± 0.07	82.42 ± 4.35	3.08
น้ำนมปรุงแต่งรสสตอเบอรี่	1.87 ± 0.07	83.91 ± 1.59	3.68
น้ำนมปรุงแต่งรสช็อคโกแลต	2.60 ± 0.10	80.03 ± 1.20	3.77
ยูเอชที			
น้ำนมโคสด	3.09 ± 0.08	89.06 ± 2.58	2.74
น้ำนมปรุงแต่งรสหวาน	3.14 ± 0.11	84.59 ± 2.60	3.46
น้ำนมปรุงแต่งรสสตอเบอรี่	3.00 ± 0.06	82.87 ± 1.26	1.98
น้ำนมปรุงแต่งรสช็อคโกแลต	4.12 ± 0.19	82.74 ± 1.05	4.71
สเตอริไลส์			
น้ำนมโคสด	5.93 ± 0.11	92.52 ± 2.41	1.86
น้ำนมปรุงแต่งผสมชาขาว	5.86 ± 0.23	93.12 ± 2.01	3.95
น้ำนมปรุงแต่งผสมมอลต์	9.03 ± 0.27	92.14 ± 1.62	3.02
น้ำนมแปรรูป			
นมเปรี้ยวรสผลไม้รวม	4.58 ± 0.10	85.19 ± 0.65	2.17
นมเปรี้ยวรสสตอเบอรี่	3.58 ± 0.07	94.76 ± 1.36	1.85
นมข้นหวาน	9.01 ± 0.28	93.29 ± 1.68	3.06
นมผง A	35.33 ± 0.45	-	1.26
นมผง B	294.68 ± 2.24	84.19*	0.76

หมายเหตุ * คำนวณเทียบจากปริมาณทอรีนที่ระบุไว้ในฉลากของตัวอย่างนมผง

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากตัวอย่างน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปได้แก่ น้ำมันโคสด พาสเจอร์ไรส์ น้ำมันโคสดยูเอชที น้ำมันโคสดสเตอริไลส์ น้ำมันแปรรูปรสหวาน รสช็อคโกแลต รสสตรอเบอร์รี่ นมข้นหวาน และนมผงสำหรับเด็กทารก โดยทำการศึกษาสารที่ใช้เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อตรวจวัดเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ฟลูออโรโฟโตมิเตอร์เป็นตัวตรวจวัด และศึกษาผลกระทบของตัวแปรต่างๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณทอรีนในนมตลอดจนศึกษาสภาวะต่างๆ ในการตรวจวัดปริมาณทอรีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดปริมาณทอรีนเพื่อทราบถึงความแตกต่างของปริมาณทอรีนในน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปแต่ละชนิด

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาและการทดลองในงานวิจัยนี้ สรุปผลได้ดังนี้

1. สารที่เหมาะสมในการใช้เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 ทดสอบการใช้ฟลูออเรสคามีนเป็นสารที่ใช้เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีน

1.2 ทดสอบการใช้ฮอโท-พทาลอัลดีไฮด์เป็นสารที่ใช้เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีน

จากการเปรียบเทียบสารที่ใช้เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนแล้วทำการวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนั้นปรากฏว่าสารทั้ง 2 ชนิดนั้นสามารถเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนและสร้างกราฟมาตรฐานได้ แม้ว่าสารอนุพันธ์ของทอรีนกับฟลูออเรสคามีนนั้นจะมีความเสถียรกว่าสารอนุพันธ์ของทอรีนกับฮอโท-พทาลอัลดีไฮด์ แต่สารอนุพันธ์ของทอรีนกับฮอโท-พทาลอัลดีไฮด์นั้นให้สภาพไวในการตรวจวัดที่ดีกว่า ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยกว่า ใช้ปริมาณของสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์น้อยกว่า อีกทั้งยังมีราคาถูกกว่าจึงเหมาะที่จะนำมาใช้เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของทอรีนเพื่อวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดปริมาณทอรีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงซึ่งสภาวะที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้

2.1 อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ (สารละลายบัฟเฟอร์ : อะซิโตนไตรรล์)

2.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.3 ค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.4 เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างอโท-พทาลอัลดีไฮด์กับทอรีน

จากสภาวะข้างต้นนั้นพบว่าอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรล์ที่เหมาะสมในการแยกสารรบกวนในตัวอย่งนํ้ามนได้ดีคือ สารละลายบัฟเฟอร์ : อะซิโตไนไตรล์ 70.30 (v/v) โดยมีค่าระยะเวลารีเทนชันคือ 5.5 นาที โดยมีอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ 1.0 มิลลิลิตร/นาที ในแง่ของค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นส่งผลต่อการแยกเล็กน้อยจะเห็นได้เมื่อค่า pH สูงขึ้นจะทำให้สารอนุพันธ์ของทอรีนมีค่าระยะเวลารีเทนชันมากขึ้นทำให้การแยกทอรีนออกจากสารรบกวนได้ดีขึ้นเพียงเล็กน้อยแต่อย่างไรก็ตามเมื่อค่าระยะเวลารีเทนชันมากขึ้นนั้นจะส่งผลต่อสภาพโวลในการตรวจวัดลดลงจากค่าพื้นที่ใต้พีคที่ลดลงด้วยเช่นกัน ดังนั้นค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมจึงเลือกใช้ pH เท่ากับ 5.4 และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์นั้นหลังจากเติมอโท-พทาลอัลดีไฮด์เพื่อทำปฏิกิริยาแล้วทำการกรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ในลอนแล้วทำการวัดปริมาณทันที

3. การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่งนํ้ามน

3.1 กรดอะมิโนซิสเทอีน เมธไทโอนีน และไลซีน

3.2 ระยะเวลาของการให้ความร้อนต่อปริมาณทอรีน

3.3 สภาวะความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย

จากการศึกษาพบว่ากรดอะมิโนซิสเทอีนนั้นไม่ให้สัญญาณบนโครมาโทแกรมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งจากการทดสอบพบว่ากรดอะมิโนซิสเทอีนต้องมีความเข้มข้นอย่างน้อย 100 มิลลิกรัม/ลิตร จึงสามารถเห็นสัญญาณของซิสเทอีนที่ความยาวคลื่นของการกระตุ้น 333 และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง 451 นาโนเมตร แต่อย่างไรก็ตามสัญญาณที่ได้จากซิสเทอีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ก็ยังมีค่าไม่มากไปกว่าสัญญาณของทอรีนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ระยะเวลารีเทนชันของซิสเทอีน ทอรีนและเมธไทโอนีนนั้นมีค่าเท่ากับ 2.4 5.5 และ 9.3 นาที ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนั้นไม่รบกวนต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน สำหรับกรดอะมิโนไลซีนนั้นไม่ให้สัญญาณบนโครมาโทแกรม การให้ความร้อนด้วยน้ำเดือดในระยะเวลา 60 นาทีไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณทอรีน และการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนโดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับอโท-พทาลอัลดีไฮด์นั้นเกิดเป็นสารอนุพันธ์กับทอรีนได้ในสภาวะของสารละลายที่เป็นกลาง (pH = 7) และไม่สามารถเกิดเป็นสารอนุพันธ์ได้เมื่อสภาวะของสารละลายเป็นกรดและเป็นด่าง

4. การศึกษาคุณภาพของการวิเคราะห์ ดังนี้

4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารอนุพันธ์ของทอรีน

4.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

4.3 ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์

4.4 ศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์

จากการศึกษาคุณภาพของการวิเคราะห์ พบว่ากราฟมาตรฐานของสารอนุพันธ์ของทอรีนนั้น อยู่ของความเข้มข้น 0.005 – 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร ได้สมการถดถอยคือ $y = 2016.6x + 7.0782$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.999 ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 0.001 และ 0.005 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และให้ค่าร้อยละของการกลับคืนของตัวอย่างน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูป อยู่ในช่วง 80.03 ± 1.20 ถึง 94.76 ± 1.36 มีความเที่ยงของการวิเคราะห์โดยให้ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อยู่ในช่วง 1.26 – 4.71

5. การวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูป ดังนี้

จากการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันโคสดพร้อมดื่มพาสเจอร์ไรส์ ยูเอชที สเตอริไลส์และตัวอย่างน้ำมันแปรรูปแต่งกลิ่นรสช็อคโกแลต รสสตรอปเบอร์รี่ นมเปรี้ยวรสผลไม้รวม นมเปรี้ยวรสสตรอปเบอร์รี่ นมข้นหวาน และนมผงนั้น น้ำมันโคสดสเตอริไลส์มีปริมาณทอรีนโดยเฉลี่ยสูงที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำมันโคสดพาสเจอร์ไรส์และ ยูเอชที เมื่อเปรียบเทียบน้ำมันโคสดและน้ำมันแปรรูปแต่งกลิ่นนั้นปรากฏว่าน้ำมันแปรรูปแต่งกลิ่นช็อคโกแลตพบว่ามีปริมาณทอรีนสูงที่สุด สุดท้ายเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณทอรีนในน้ำมันแปรรูปทั้งหมดแล้วนั้นพบว่า นมผงสำหรับเด็กทารกมีปริมาณทอรีนสูงมากตามที่เราพบไว้ในฉลากของผลิตภัณฑ์โดยตัวอย่างน้ำมันที่มีปริมาณทอรีนต่ำที่สุดคือน้ำมันพาสเจอร์ไรส์แต่งกลิ่นรสสตรอปเบอร์รี่พบทอรีน 1.87 ± 0.07 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และตัวอย่างนมที่มีปริมาณทอรีนสูงที่สุดคือนมผงสำหรับเด็กทารกมีปริมาณทอรีน 294.68 ± 2.24 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ข้อเสนอแนะ

1. จากสภาวะที่ใช้ในการหาปริมาณทอรีนในตัวอย่างน้ำมันโคสดและนมแปรรูปในงานนี้สามารถนำไปประยุกต์วิเคราะห์ปริมาณทอรีนและเมทไทโอนีนพร้อมกันได้
2. การวิเคราะห์ปริมาณทอรีนดังที่กล่าวมานั้นสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณทอรีนในนมแปรรูปและตัวอย่างอาหารประเภทอื่นได้



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ดาวัลย์ นิมภู. (2555). *ชีวเคมี*. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บวรศักดิ์ ลีนานนท์. (2535). *เอกสารประกอบการสอน ผลิตภัณท์นม*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ประสงค์ เพียนบุญ. (2547). ทอริณ. *วารสารโภชนาบำบัด*. ปีที่ 15. ฉบับที่ 1. 23-32.
- แม่น อมรสิทธิ์. (2555). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตนา สัมพันธิต. (2548). *ชีวเคมี โครงสร้างและหน้าที่ของชีวโมเลกุล*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- เรืองลักษณ์ จามิกรณ์. (2547). *ชีวเคมีเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- วิไล รังสาดทอง. (2552). *เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- Dorreteijnl, R.C.; et al. (1996). Determination of amino acids using O-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization effect of reaction conditions. *Journal of Chromatography A*. 724: 159-167.
- Feng, Qu.; et al. (1999) Ion chromatographic determination of taurine in medicine, nutrient capsule and human urine with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 730: 161 – 166.
- Finnegan, D. (2003). The health effect of stimulant drink. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*. 28: 147-55.
- Gillian, P. McMahon; Richard, O'Kennedy; & Mary, T. Kelly (1996). High-performance liquid chromatographic determination of taurine in human plasma using pre-column

- extraction and derivatization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 14: 1287-1294
- Glance, E.G.; et al. (2012). Differential cognitive effects of energy drink ingredients: Caffeine, taurine, and glucose. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 102: 569-577.
- Gordon, R.E.; Shacked, A.A.; & Solano, D.F. (1986). Taurine protects hamster bronchioles from acute NO₂-induced alterations a histologic, ultrastructural and freeze-fracture study. *American Journal of pathology*. 125: 585-600.
- Hirofumi, I.; Keiko, F.; & Yasuto, T. (2003). Determination of taurine in plasma by high-performance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent. *Analytical Biochemistry*. 391: 138-142.
- Helen, L.R.; Keith, F.M.; & Charles, A.M. (1995). Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with O-phthalaldehyde-sulphite derivatisation. *Journal of Neuroscience Methods*. 57: 93-99.
- Izco, J.M.; Torre, P.; & Barcina, Y. (2000). Ripening of Ossau-Iraty cheese: determination of free amino acids by RP-HPLC and of total free amino acids by the TNBS method. *Food Control*. 11:7-11.
- John, A.T.; Vitor, S.; & Catherine, J. W. (1995). The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *General Pharmaceutical*. 26: 453-462.
- Laidlaw, S.; Grosvenor, M.; & Kopple, J.D. (1990). The taurine content of common foodstuffs. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 14: 183-188.
- Leo, M.; & Nollet, L. (1992). *Food Analysis by HPLC*. USA: Marcel Dekker, Inc.
- Mapekula, M.; et al. (2011). Fatty acid, amino acid and mineral composition of milk from Nguni and local crossbred cows in South Africa. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24: 529-536.

- Oktawia, P.; et al. (2010). The potential protective effect of taurine on coronary heart disease. *Artherosclerosis*. 208: 19-25.
- Pual, H.R.; et al. (1998). Immunonutrition: The Role of Taurine. *Nutrition*. 14: 500-604.
- Raynal-Ljutovac, K.; et al. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*. 79: 57-72.
- Rizzo, V.; et al. (1996). Reference values of neuroactive amino acids in the cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 729: 181-188.
- Shifen, M.; Xiaojing, D.; & Yongjian, L. (2002). Separation method for taurine analysis in biological samples. *Journal of Chromatography B*. 781: 251-267.
- Stpleton, P.P. (1997). Taurine and human nutrition. *Clinical Nutrition* 16: 103-108
- Tommaso, R.I.C.; et al. (2004). Quantitative determination of taurine in real samples by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Talanta*. 64: 626-630.
- Tripaldi, C.; Martillotti, F.; & Terramoccia, S. (1998). Content of taurine and other free amino acids in milk of goats bred in Italy. *Small Ruminant Research*. 30: 127-136.
- Wang, X.; et al. (2011). Determination of Taurine in Biological Samples by HighPerformance Liquid Chromatography Using 4-Fluoro-7-Nitrobenzofurazan as a Derivatizing Agent. *Biomedical And Environmental Sciences*. 24: 537-542
- Ying, Q.; et al. (1998). Simultaneous determination of total and extracellular concentrations of the amino acid neurotransmitters in cat visual cortex by microbore liquid chromatography and electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*. 798: 19-26.

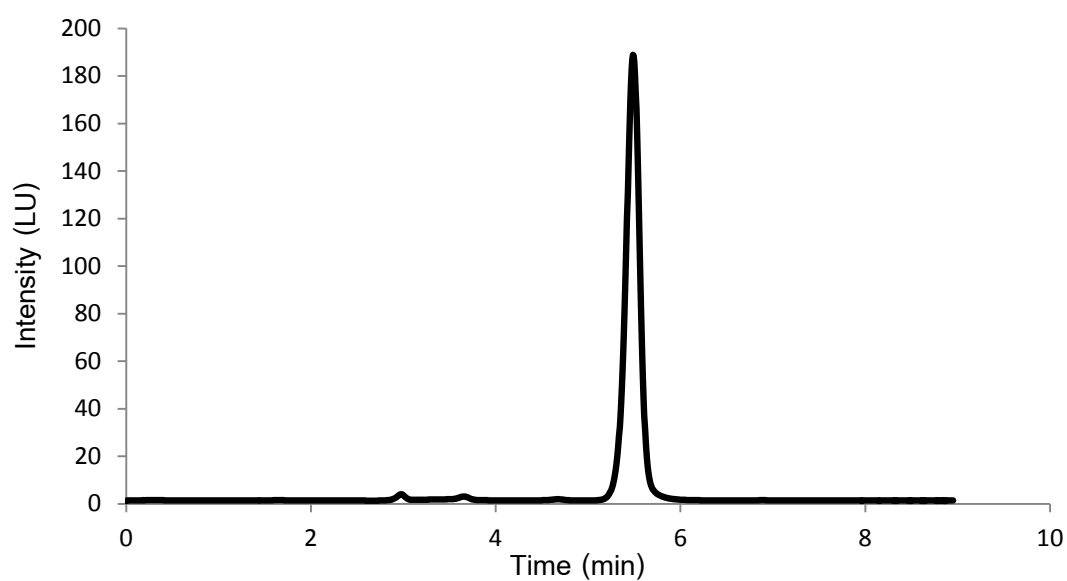


ภาคผนวก

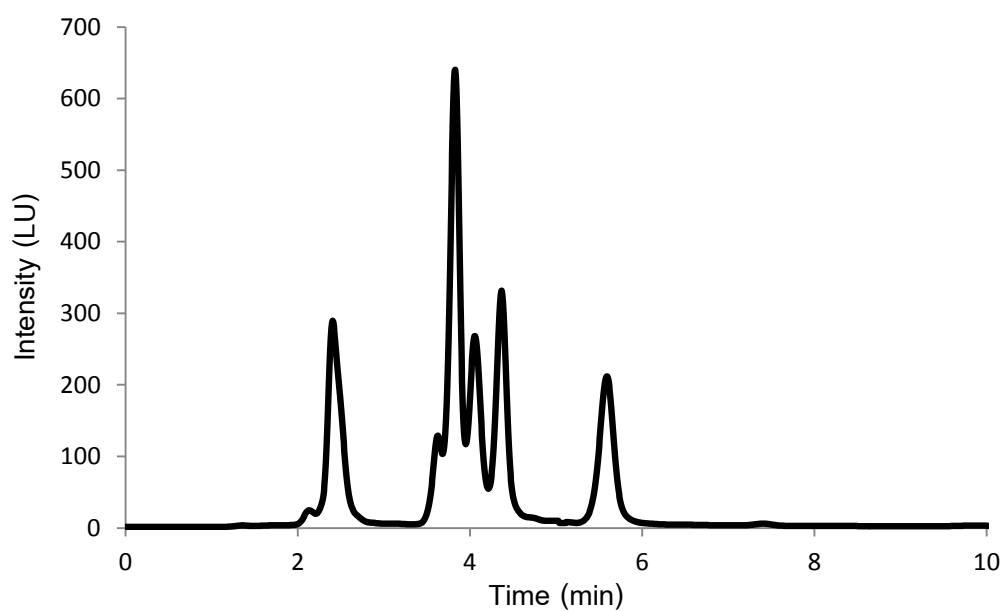


ภาคผนวก ก

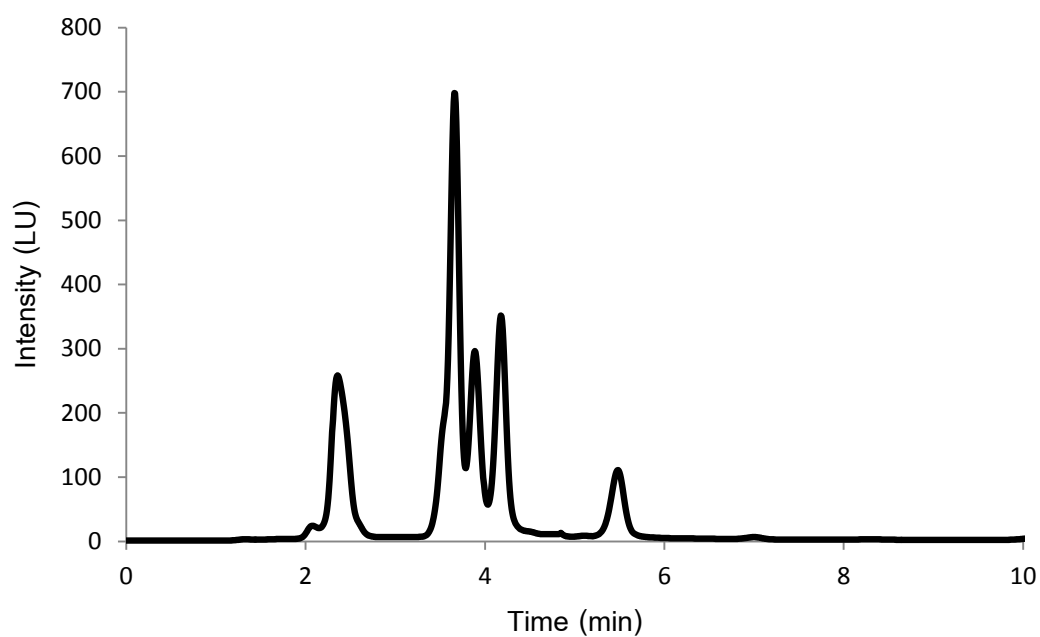
โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง



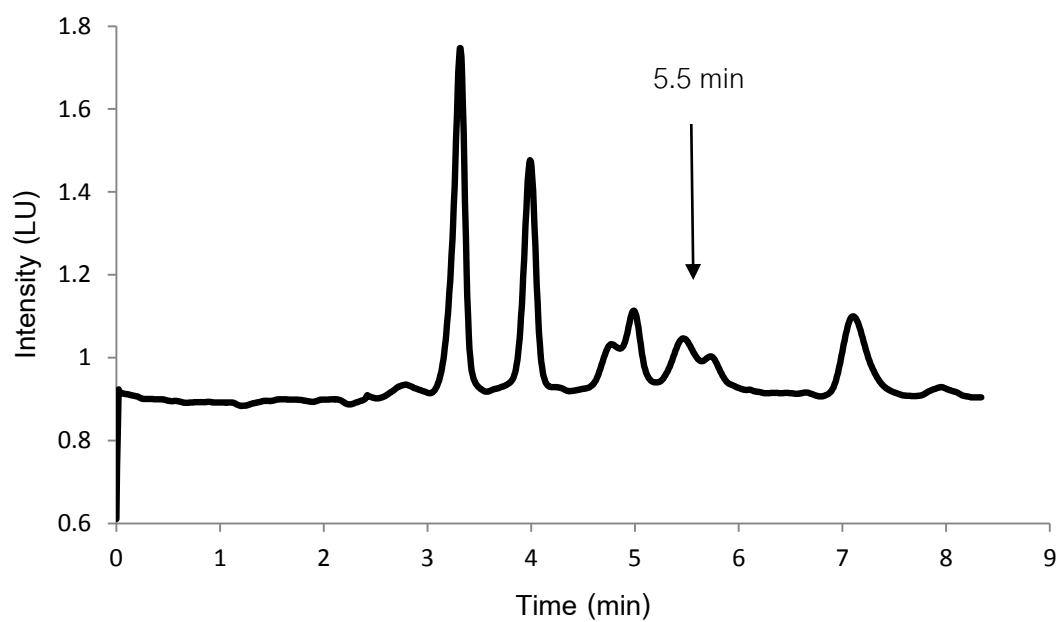
ภาพประกอบ 21 โครมาโทแกรมของสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร



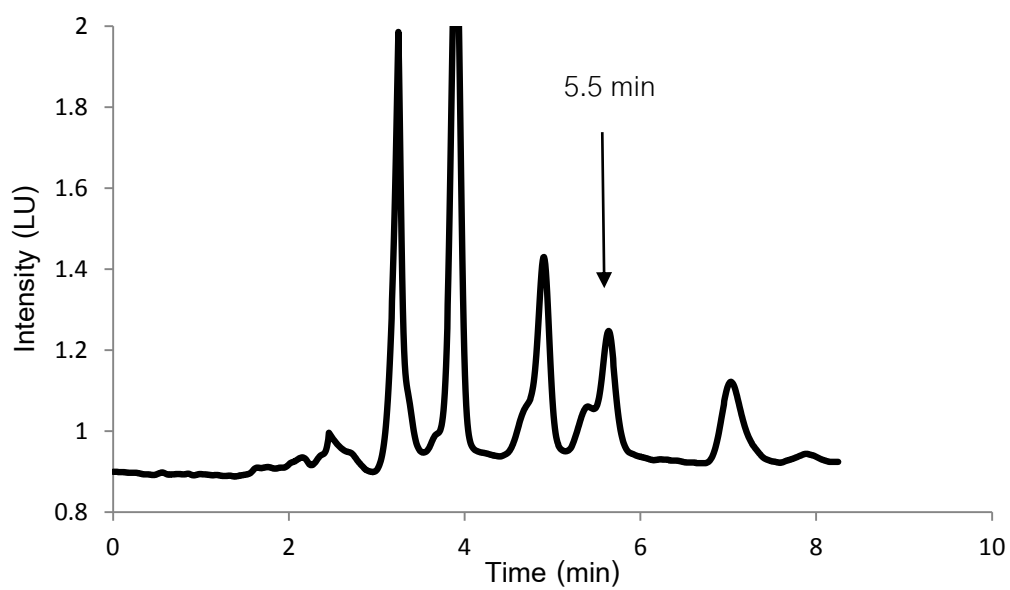
ภาพประกอบ 22 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนในสารสกัดจากตัวอย่างน้ำมันที่มีการเติมสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร



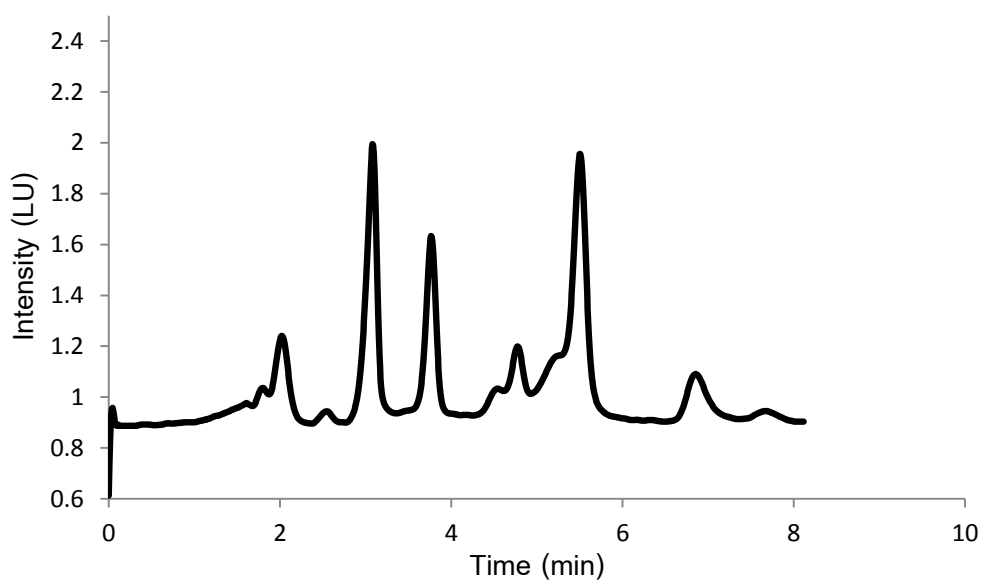
ภาพประกอบ 23 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนในสารสกัดจากตัวอย่างน้ำมัน



ภาพประกอบ 24 โครมาโทแกรมของสารละลายเบงค์ (blank)



ภาพประกอบ 25 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของทอรีนความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพประกอบ 26 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของทอรีนความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายต่างๆ

1. สารละลายมาตรฐานทอรีนความเข้มข้น 0.05 0.10 0.20 0.40 0.60 0.80 และ 1.00

มิลลิกรัม/ลิตร

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการชั่งสารทอรีน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจากนั้นปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.2 เจือจางสารละลายมาตรฐานทอรีนจากความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร ให้เหลือ 1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการปิเปตสารละลายในข้อ 1.1 มา 100 ไมโครลิตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.3 ปิเปตสารละลายในข้อ 1.2 มา 0.5 1.0 2.0 4.0 6.0 และ 8.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสารมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 0.05 0.10 0.20 0.40 0.60 และ 0.80 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

2. สารละลายออร์โท-ฟอสฟอริกแอซิด

ชั่งสารออร์โท-ฟอสฟอริกแอซิด 0.25 กรัมละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 200 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 5 มิลลิลิตรด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.04 M (pH 9.5 ปรับ pH ด้วย 1M โซเดียมไฮดรอกไซด์)

3. สารละลายโซเดียมเตตระบอเรตเข้มข้น 0.04 M

ชั่งโซเดียมเตตระบอเรต 0.75 กรัมละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 M

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 กรัมละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

5. สารละลายฟลูออเรสคามีน 5 มิลลิโมลาร์

ชั่งสารฟลูออเรสคามีน 0.07 กรัม ละลายในอะซิโตนไตรัล 5 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

6. สารละลาย 25 มิลลิโมลาร์ บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2

6.1 เตรียมสารละลาย A 25 มิลลิโมลาร์ โซเดียมเตตระบอเรต โดยการชั่งสารมา 0.95 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

6.2 เตรียมสารละลาย B 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์โดยการชั่งสารมา 0.1 กรัม ละลายในน้ำ 25 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย B ลงในสารละลาย A 1.8 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 9.2

7. สารละลาย 0.02 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.4 เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในวัฏภาคเคลื่อนที่

7.1 ชั่งไดโพรแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.07 กรัม ละลายในน้ำและเติมสารละลาย 0.02 โมลาร์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

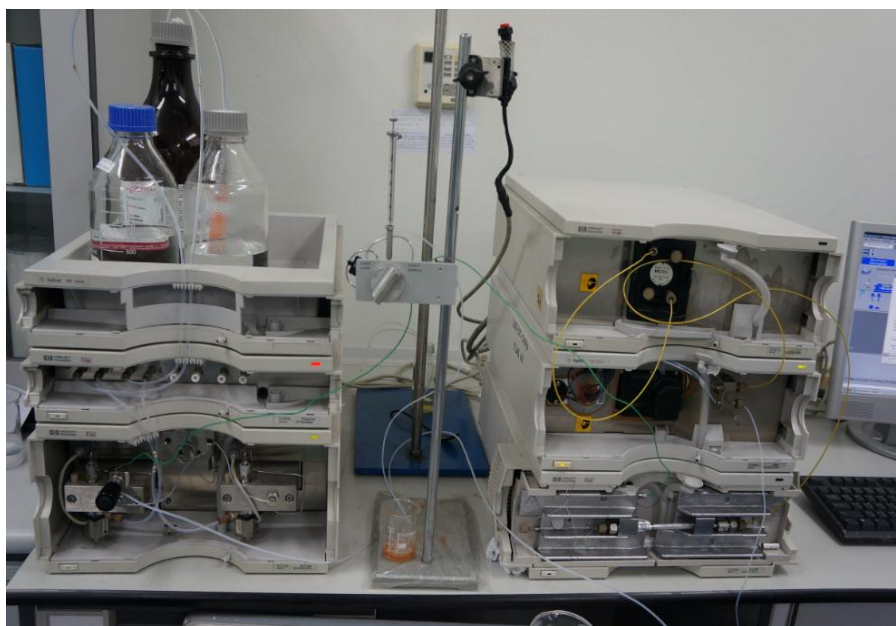
7.2 เตรียมสารละลาย 0.02 โมลาร์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยการชั่งมา 1.36 กรัม ละลายในน้ำผสมกับสารละลายในข้อ 7.1 และปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

8. สารละลาย 5% กรดไตรคลอโรอะซีติก

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซีติก 5 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นและทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร



ภาคผนวก ค
รูปเครื่องมือและอุปกรณ์



ภาพประกอบ 27 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



ภาพประกอบ 28 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน



ภาพประกอบ 29 อ่างน้ำร้อนที่ใช้ศึกษาผลของระยะเวลาในการเวลาให้ความร้อนด้วยน้ำเดือด



ภาพประกอบ 30 เครื่องหมุนเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge)



ภาพประกอบ 31 เครื่องฟลูออเรสเซนส์เปกโทรมิเตอร์ (Fluorescence Spectrometer)



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายรพีพัฒน์ บัวสุวรรณ
วันเดือนปีเกิด	25 ตุลาคม 2530
สถานที่เกิด	203/51 หมู่ 2 ซอยประชาราษฎร์ 26 ถนนประชาราษฎร์ ตำบลสวนใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	จากโรงเรียนวัดเขมาภิรตาราม จังหวัดนนทบุรี
พ.ศ. 2552	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
พ.ศ. 2558	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

