

การหากรดามิโน (Amino Acids) ในผลไม้เปลือกแข็ง (Nuts)
และเมล็ด (Seeds) ของผลไม้ที่มีโปรตีนสูง

ปริญญานิพนธ์

ของ

ทนอมสิน แก้วสะอาด

THE LIBRARY
COLLEGE OF EDUCATION
BANGKOK, THAI AND

เสนอต่อวิทยาลัยวิชาการศึกษา

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

๑๔ สิงหาคม ๒๕๑๔

การหากรดามิโน (Amino Acids) ในผลไม้เปลือกแข็ง (Nuts)
และ เมล็ด (Seeds) ของผลไม้ที่มีโปรตีนสูง

บทคัดย่อปริญานิพนธ์

ของ

ณอมสิน แก้วสอาด

เสนอต่อวิทยาลัยวิชาการศึกษา
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

๑๕ สิงหาคม ๒๕๑๔

การหากรดามิโน (Amino Acids) ในผลไม้เปลือกแข็ง (Nuts)
และเมล็ด (Seeds) ของผลไม้ที่มีโปรตีนสูง

จุดมุ่งหมายของการศึกษาเรื่องนี้ก็เพื่อจะทราบถึงปริมาณของกรดามิโนต่าง ๆ ที่มีอยู่ในผลไม้เปลือกแข็ง และเมล็ดที่ใช้เป็นตัวอย่าง ได้แก่ เกาลัด ลูกกระ กระจับ เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ เมล็ดขนุน แปะก๊วย เมล็ดทานตะวัน ผลที่ได้จากการศึกษาจะนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ในทางโภชนาการต่อไป

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ เครื่อง Amino Acid Analyzer

และ Beckman Model B Spectro photometer

จากผลการวิจัยพบว่า สารตัวอย่างมีคุณค่าทางโภชนาการเรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้

เมล็ดขนุน เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ เกาลัด กระจับ ลูกกระ เมล็ดทานตะวัน เมล็ดแถมโหมแห่ง และแปะก๊วย เป็นที่น่าสังเกตว่า ถึงแม้เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ จะมีปริมาณกรดามิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดต่ำกว่าเมล็ดขนุนก็ตาม แต่มีปริมาณ Tryptophan และ methionine สูงกว่าผลไม้เปลือกแข็งและเมล็ดอื่น ๆ ที่นำมาศึกษา.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปรวิญญาการศึกษามหาบัณฑิต
ของวิทยาลัยวิชาการศึกษาได้.

ศาสตราจารย์พิเศษ/ศาสตราจารย์
ประธาน

พ.ศ. ศ. ๒๕๖๕ กรรมการ

ศาสตราจารย์ ดร. ๒๕๖๕ กรรมการ

๑๕ สิงหาคม ๒๕๖๕

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ เรื่องนี้สำเร็จลงด้วยดี เนื่องจากผู้เขียนได้รับความช่วยเหลือ และ
คำแนะนำจาก อาจารย์ ดร. เสาวนีย์ จักรพิทักษ์ และ อาจารย์ ดร. นิดา สะเพียรชัย
แห่งคณะวิทยาศาสตร์ และอาจารย์สุภาพ สอนปาน แห่งกองโภชนาการ กรมอนามัย
ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในกาน การทดลองศึกษาครั้งนี้ ตลอดจนการเขียน
ปริญญานิพนธ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณยิ่ง

ในการทดลอง ผู้เขียน ได้รับความสะดวกเป็นอย่างยิ่ง เพราะได้รับความอนุเคราะห์
ของกองโภชนาการ กรมอนามัย ให้ใช้สถานที่ และเครื่องมือในการทดลอง ผู้เขียน
ขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย.

ถนอมสิน แก้วสอาด

สารบัญ

บทที่	หน้า
๑ บทนำ	๑
ความมุ่งหมายในการศึกษาคนคว่ำ	๓
ความสำคัญของการศึกษาคนคว่ำ	๓
ขอบเขตในการศึกษาคนคว่ำ	๓
วิธีดำเนินการ	๔
หลักในการวิเคราะห์	๕
การวิเคราะห์ข้อมูล	๓
คำนิยามศัพท์เฉพาะ	๘
๒ เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการคนคว่ำเรื่องนี้	๑๐
๓ วิธีดำเนินการ	๑๕
กลุ่มตัวอย่าง	๑๕
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	๑๕
การดำเนินการทดลอง	๑๕
๔ ผลการทดลอง	๒๐
๕ สรุปผลการทดลอง	๒๓
บรรณานุกรม	๓๔
ภาคผนวก	๓๗

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
๑ ปริมาณของกรกอมิโนในสารตัวอย่าง ๑๖๖ กรัม	๒๑
๒ อัตราส่วนระหว่างกรกอมิโนที่ร่างกายสร้างขึ้นเองไม่ได้กับปริมาณไนโคโรเจนทั้งหมดในสารตัวอย่าง	๒๒
๓ ปริมาณ Tryptophan และ Methionine ในอาหารตัวอย่างเทียบกับข้าว	๒๕
๔ อัตราส่วนระหว่างกรกอมิโนที่ร่างกายสร้างขึ้นเองไม่ได้กับปริมาณไนโคโรเจนทั้งหมดจากการทดลองของ FAO.	๒๘

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
๑ ค่า E/T (กรัม/กรัม) ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง	๔๐
๒ เครื่อง Amino Acids Analyser	๔๑
๓ การวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนในสารตัวอย่าง ยกเว้น Cystine และ Tryptophan	๔๒
๔ การวิเคราะห์ ปริมาณของ Cystine ในสารตัวอย่าง	๕๐

กรดอะมิโนเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเติบโตของสิ่งมีชีวิต ผลการทดลองทางโภชนาการแสดงให้เห็นว่า ร่างกายของกุนและสัตว์สร้างกรดอะมิโนบางตัวขึ้นเองไม่ได้ จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร กรดอะมิโนเหล่านี้ช่วยส่งเสริมร่างกายให้เติบโต ช่วยซ่อมแซมส่วนสึกหรบ ควบคุมการทำงานของอวัยวะภายใน และช่วยป้องกันอันตรายโรค ถ้าร่างกายขาดกรดอะมิโนเหล่านี้ จะเติบโตไม่เต็มที่หรือหยุดเติบโต ส่วนกรดอะมิโนอีกพวกหนึ่ง ร่างกายสร้างขึ้นเองได้ ไม่จำเป็นต้องได้รับจากภายนอก^๑

คำว่า "กรดอะมิโน" นั้น ทางทฤษฎีหมายถึงสารประกอบต่าง ๆ ที่ประกอบด้วย amino group / และ carboxylic group ในทางปฏิบัติ ถ้าเรามักจะใช้เฉพาะกรดอะมิโนที่เป็น α - amino carboxylic acids ที่แยกจากแหล่งต่าง ๆ ทางธรรมชาติ กรดอะมิโนกว่า ๒๐๐ ชนิด ได้ถูกแยกและวิเคราะห์ แต่มีเพียง ๒๐ ชนิดเท่านั้นที่ได้รับจากการ hydrolysis ของโปรตีนชนิดต่าง ๆ

กรดอะมิโน ๒๐ ชนิดดังกล่าว จะประกอบด้วย primary amino group ทั้งสิ้น ภาค (residues) ทั้งหมดนี้จะปรากฏในโปรตีนทุกชนิด ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญของผิวหนัง กระดูก กล้ามเนื้อ และ connective tissue ต่าง ๆ^๒

เทคนิคของการวิเคราะห์กรดอะมิโน ได้กลายเป็นสิ่งสำคัญระหว่าง ๒๐ ปี ที่ผ่านมานี้ และปัจจุบันได้มีบทบาทสำคัญในงานวิจัยทางชีววิทยา (Biological Research) มาก

แต่เดิมผู้วิจัยได้อธิบายเกี่ยวกับโปรตีน โดยใช้องค์ประกอบอย่างง่าย ๆ ในเทอมของ คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และกำมะถันในลักษณะเดียวกับที่อธิบายหลักของ สารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ แต่ให้เรื่องราวเกี่ยวกับโปรตีนที่ซับซ้อนบางตัว เพียงเล็กน้อยเท่านั้น^๓

ขั้นที่สำคัญคือการแยกและการบอกลักษณะของกรดอะมิโนอย่างง่าย จากโปรตีนที่ hydrolyse แล้ว ซึ่งปรากฏในตอนแรกโดยการตกตะกอนและโดยการ ester - distillation method^๔ ในตอนหลัง กรดอะมิโนที่ง่ายที่สุดหลายที่พบคือ threonine

McCoy^{๒๐} พบครั้งแรกในปี ๑๙๓๕ จากผลการทดลองให้อาหารแก่หนู

วิธีการเก่า ๆ สำหรับการประมาณค่า กรดอะมิโน ในโปรตีนต่าง ๆ ไม่ใช่ของง่าย และต้องใช้เวลามาก การตกตะกอนและแยกเอาตะกอนออกมานั้นใช้เป็นที่สำหรับหากรดอะมิโน โดยทั่วไป วิธีการนี้ทำให้ arginine และ histidine ตกตะกอนเป็นเกลือเงิน (silver salts) ของมัน การแยกทำได้โดยอาศัยการละลายในน้ำและในสารละลาย alkaline ที่แก่ (strongly alkaline solution) ซึ่งมีความเข้มข้นแตกต่างกัน และใช้กรด phosphotungstic และกรด picric ทำให้ lysine ตกตะกอนจาก filtrate ทุกวันนี้ วิธีการดังกล่าวเสียเวลามาก เพราะต้องใช้โปรตีนในการทดลองประมาณ ๒๕ - ๕๐ กรัม และต้องใช้สารละลายเป็นจำนวนมากในการตกตะกอนซ้ำ ๆ หลายครั้ง ต้องกรองและล้าง barium sulfate จำนวนมากออก และยังมีขั้นตอนอื่น ๆ อีกซึ่งเป็นการไม่สะดวกอย่างยิ่ง

วิธีการอื่นที่ถูกนำมาใช้น้อยในการตรวจสอบตอนแรก คือ ester-distillation ของ Fischer^{๒๑} โปรตีนประมาณ ๑ กิโลกรัม จะถูก hydrolyzed ด้วย HCl แล้วทำให้ hydrolyzates เข้มข้นใน vacuo ต่อจากนั้นนำมาละลายใน ethanol กรดอะมิโนจะถูก esterified โดยการทำให้สารละลายอิ่มตัวด้วยก๊าซ HCl ที่อุณหภูมิของห้อง และอุ่นบน water bath ประมาณ ๓๐ นาที ขบวนการการทำให้แห้งเพื่อให้สมบูรณ์ใส่ NaOH เพื่อไล่ esters ออกจาก HCl แล้วแยกด้วย ether ในที่เป็น ether จะระเหยออกไป นำส่วนที่เหลือ (residue) ของ esters ไปกลั่นใน vacuo เมื่อผสมกับน้ำ ester ในแต่ละ fraction จะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโน วิธีการต่าง ๆ ได้รับการปรับปรุงให้เหมาะกับกรดอะมิโนแต่ละตัว ซึ่งกินเวลาหลายเดือนมาก แต่มักจะมีสิ่งที่ไม่แน่นอนไม่ได้เกิดขึ้นบ่อย ๆ และมีการสูญเสียระหว่างขบวนการมาก

วิธีการที่กล่าวมาข้างต้นขึ้นอยู่กับ การแยกกรดอะมิโนจากโปรตีน วิธีการเหล่านี้เป็นวิธี macro (macro methods) วิธีการหนึ่งในสมัยก่อน คือวิธีของ Folin และ Denis^{๒๒} ในปี ๑๙๑๒ สำหรับหา tyrosine และ tryptophan โดยใช้ phenol reagent และ Colorimetric method สำหรับกรดอะมิโนอื่น ๆ ทำดังต่อไปนี้คือ สำหรับ arginine หาโดย Sakaguchi reaction^{๒๓}, histidine หาโดย coupling กับ

diazotized sulfanilic acid^{๑๑,๑๘} หรือโดย Color reaction กับ bromine ฯลฯ การใช้ Chromatographic techniques ได้มีการพัฒนาขึ้นเรื่อย ๆ เพื่อให้ได้วิธีที่มีความเที่ยงตรงแน่นอน ทั้งนี้เพื่อจะได้นำมาประยุกต์ใช้กับกรกอมิโนทั้งหมดได้ดียิ่งที่สุด

ความมุ่งหมายในการศึกษากันคว่ำ

เพื่อทราบถึงปริมาณและชนิดต่าง ๆ ของกรกอมิโนในผลไม้เปลือกแข็ง (Nuts) และเมล็ด (Seeds) ของผลไม้ที่นิยมรับประทานและมีโปรตีนอยู่มาก

ความสำคัญของการศึกษากันคว่ำ

ผลจากการศึกษากันคว่ำเรื่องนี้จะทำให้ทราบถึงกรกอมิโนต่าง ๆ ที่มีอยู่ในผลไม้เปลือกแข็ง (Nuts) และเมล็ด (Seeds) ที่ทดสอบ ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงคุณค่าที่ร่างกายจะได้รับจากการรับประทานผลไม้เปลือกแข็งและเมล็ดนั้น ๆ อันจะนำไปใช้ประโยชน์ในทางโภชนาการได้ต่อไป

ขอบเขตในการศึกษากันคว่ำ

๑. ทำการทดลองหากรกอมิโนในผลไม้เปลือกแข็งและเมล็ดต่อไปนี้

<u>ชื่อไทย</u>	<u>อังกฤษ</u>	<u>ชื่อทางวิทยาศาสตร์</u>	<u>โปรตีน (กรัม)</u>
เกาลัด	Chestnut	Castanea vulgaris	4.6
ลูกกระ	-	Elatariospermum topos, Blum	15.6
กระเจี๊ยบ	Water chestnut	Trapa bispenosa	8.3
เมล็ดมะม่วงหิมพานต์	Cashew nuts	Anacardium Occidentale	16.9
เมล็ดขนุน	Jackfruit seed	Artocarpus heterophyllus	5.6

<u>ชื่อไทย</u>	<u>อังกฤษ</u>	<u>ชื่อทางวิทยาศาสตร์</u>	<u>โปรตีน (กรัม)</u>
แปะก๊วย	Ginkgo seed	Ginkgo biloba	12.2
เมล็ดทานตะวัน	Sunflower seed; kernels, dry	Helianthus annuus	24.0
เมล็ดแตงโมแห้ง	Salted water melon seed	Citrullus vulgaris	30.6

๒. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าแบ่งออกเป็น ๒ ประเภท คือ

๒.๑ เครื่องมือ Amino Acid Analyzer

๒.๒ เครื่องมือ Beckman Model B Spectrophotometer

๓. เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้า คือ Chromatographic Technique

วิธีดำเนินการ

๑. จัดหาของตัวอย่างต่าง ๆ คือผลไม้เปลือกแข็ง (nuts) และเมล็ด (seeds) ของผลไม้ที่จะใช้ในการทดลอง

๒. ทดลองแยกของตัวอย่างเพื่อหากรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ โดยใช้

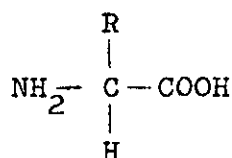
๒.๑ เครื่องมือ Amino Acid Analyzer

๒.๒ เครื่องมือ Beckman Model B Spectrophotometer

๓. จากการทดลองนำผลมาคำนวณหาปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนต่อไป

หลักในการวิเคราะห์

กรดอะมิโน ซึ่งถูกแยกจากโปรตีนที่ถูก hydrolyse แล้ว (Protein hydrolyzates) คือ primary α - amino acids ซึ่งมี Carboxyl group และ amino group จับที่ Carbon อะตอมเดียวกัน

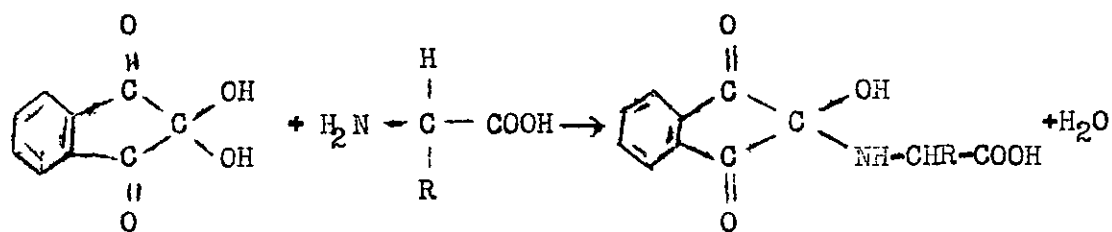


สำหรับ R นั้น อาจจะเป็นกลุ่มต่าง ๆ (groups) ได้มากมาย ซึ่งจะทำให้เกิดกรดอะมิโนต่าง ๆ กันไป

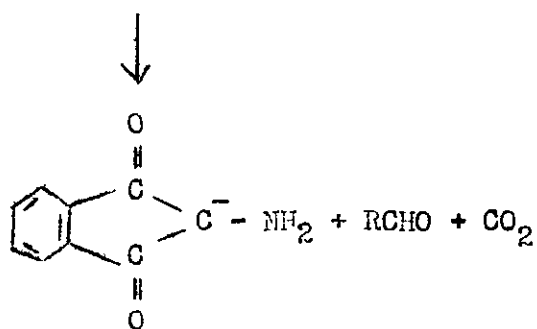
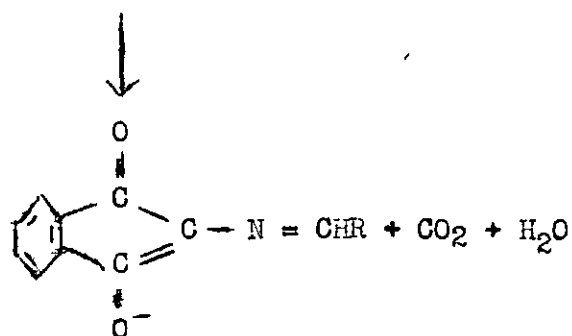
ในเครื่อง Hitachi Perkin - Elmer Amino Acid Analyzer นี้ กรดอะมิโนจะถูกแยกโดยการ adsorp บน Sulfonated polystyrene ion - exchange resin แล้วจะล้าง (elute) สารแต่ละตัว (individual substances) ออกมาด้วย eluent buffers ต่าง ๆ ซึ่งมีค่า pH และ Sodium ion concentration (ความเข้มข้นของโซเดียมไอออน) ต่าง ๆ กัน Ion exchange resins ที่ใช้ในระบบ (system) นี้ คือ Hitachi spherical resin No. 3105 และ Amberlite C.G. - 120, type III eluent คือสารละลาย 0.2 N - Na - Citrate buffer pH 3.25, 4.25 และสารละลาย 0.35 N - Na Citrate buffer pH 5.29 อุณหภูมิของ column ตั้งไว้ที่ 55°C.

ปฏิกิริยาของ Ninhydrin (Ninhydrin reaction)

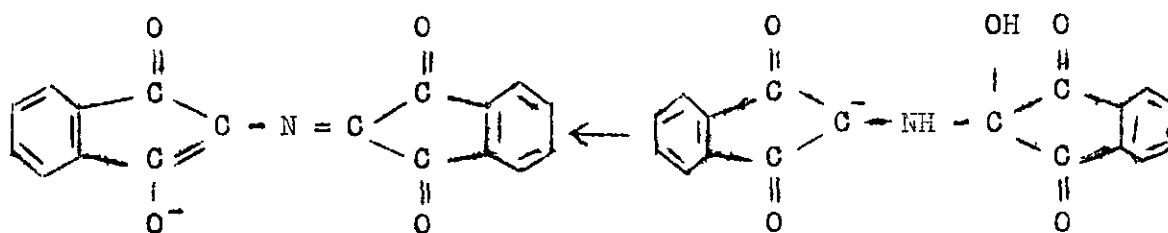
เมื่อใส่สารละลาย (aqueous solution) ของ α - amino acid เข้าไปจะเกิดปฏิกิริยากับ Ninhydrin ได้สารสีม่วงเกิดขึ้นทั้งผลการ



Ninhydrin

 α - amino acid

+ Ninhydrin



DYDA

Diketo hydyliden Diketo hydrindamin.

ผลของปฏิกิริยากังวลความมาแล้วนั้น จะรู้ได้โดยนำน้ำยาไปได้ในเครื่อง spectronic แล้ว
วัดการ absorb แสงที่มากที่สุด (maximum light absorbance) ที่ช่วงคลื่น
(wavelength) 440 และ 570 m μ

ในปฏิกิริยา ninhydrin ทั้ง ๆ ไปนั้น chart ที่ได้ออกมาจะมี curve
3 curves ที่มีสีแตกต่างกัน คือ สีเขียว แดง และน้ำเงิน แสดงว่ามาจากช่วงคลื่น
(wavelength) สูงสุดถึงต่ำสุด (ยกเว้นในกรณีของกรดอะมิโนบางตัว ที่เราไม่สามารถจะ
ตรวจสอบได้)

โดย 12 - dot recorder จะได้ data พิมพ์เป็น curve สีต่าง ๆ กัน
คือ สีเขียว สีน้ำเงิน และสีแดง ซึ่งแสดงถึงจุดที่มีการ absorb ที่ wavelength 570,
440 และ 640 m μ ตามลำดับ โดยแต่ละ curve จะได้ peak ต่าง ๆ ของ
กรดอะมิโนออกมา กรดอะมิโนส่วนใหญ่จะถูก absorb ที่ช่วงคลื่น 570 m μ ยกเว้น
proline จะถูก absorb ที่ช่วงคลื่น 440 m μ

ความเข้มข้นของสารที่ใช้เป็นสารตัวอย่างของกรดอะมิโนมีความเข้มข้นประมาณ 0.25
m μ moles ซึ่งจะให้ peaks บน chart สูงประมาณ 0.2 ของ absorbance
scale ถ้าความเข้มข้นต่ำกว่า ความผิดพลาดจะมีความเพี้ยน เนื่องจาก peak ที่ได้
จะน้อยมาก และถ้าที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ ความผิดพลาดก็จะมีเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากขอบเขต
อันจำกัดของ absorbance scale ซึ่งสูงเพียง ๑๑ นิ้ว (250 mm.)

ความสูงมาตรฐานสำหรับ spherical resin ที่ใช้คือ 9 x 500 mm.
อย่างไรก็ตาม ในเรื่องความสูงของ resin นี้จะเปลี่ยนแปลงได้ ทั้งนี้แล้วแต่ความถนัดที่ใช้
และจะ pack ได้สูงที่สุดประมาณ 590 mm.

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากการทดลองจะได้กราฟออกมาประกอบด้วย peak ต่าง ๆ ของกรดอะมิโนแต่ละชนิด
ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดหาปริมาณและชนิดของกรดอะมิโน โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้ curve
ที่ได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้ curve ของกรดอะมิโนที่เราใช้เป็นค่ามาตรฐานในการทดลอง

คำนิยามศัพท์เฉพาะ

๑. Amino Acid Analyzer เป็นเครื่องมืออัตโนมัติที่ออกแบบสร้างเพื่อการวิเคราะห์กรดอะมิโน และสารประกอบที่เกี่ยวข้อง (related compound) การแยกกรดอะมิโนใช้หลักของ ion-exchange chromatography โดยขั้นตอนการ develop สีของ ninhydrin ที่เกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโน และจากการทำงานของเครื่องจะทำให้ได้ข้อมูลออกมาเป็นกราฟโดยอัตโนมัติ

๒. Chromatography หมายถึงขั้นตอนการแยกสารเคมีที่ละลายได้ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เมื่อสารเคมีนั้นมีมากกว่าสองชนิดขึ้นไป และผสมกันอยู่ทั้งในอัตราส่วนที่แน่นอน และไม่แน่นอน โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ในสภาวะการที่ที่กำหนดให้ซึ่งมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ต่างกันตามชนิดของสารเคมีนั้น ๆ อันเป็นผลมาจากตัวกลางซึ่งหมายถึงสารที่กำหนดเป็นสภาวะการมีพลังยึดเกาะสารเคมีแต่ละชนิดไม่เท่ากัน และอาศัยหลักความสามารถในการละลายของตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่เท่ากัน

๓. Adsorbent หมายถึงสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการของ Chromatographic Technique ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเพื่อการดูดเกาะของสารเคมีชนิดอื่น ๆ ที่จะนำมาแยกออกจากของผสมและทำให้บริสุทธิ์

๔. Adsorption หมายถึงลักษณะทางกายภาพอันเกิดจากสารเคมีตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป มีการดูดเกาะซึ่งกันและกัน ลักษณะของการดูดเกาะของสารเคมีแต่ละชนิดย่อมมีความแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของโมเลกุลและอะตอมของสารเคมีนั้น ๆ อันจะก่อให้เกิดพลังยึดเหนี่ยวชนิดต่าง ๆ เช่น Hydrogen-bonding, Electrostatic force และ Van de Waal's force.

๕. Column Chromatography หมายถึงขั้นตอนการแยกสารประกอบที่มีอยู่ในของผสมโดยใช้เครื่องมือเป็นหลอดแก้วซึ่งบรรจุด้วย Adsorbent ชนิดที่เหมาะสมกับการแยกสารเคมีแต่ละชนิด

๖. Adsorption Chromatography หมายถึงขั้นตอนการแยกสารประกอบออกจาก

ของผสม โดยอาศัยหลักการที่สารเคมีต่างชนิดกันมีความสามารถในการดูดเกาะและมีพลังยึด
 ต่อตัวกลาง คือ Adsorbent ไม่เท่ากัน นอกจากนี้ยังต้องอาศัยเทคนิคในการเลือกตัวทำ
 ละลายเพื่อจัดการดูดเกาะ (Adsorp) หรือพลังยึดโดยอาศัยวิธีระล้าง (Develop)
 เพื่อให้สารเคมีทั้งหลายที่นำมาแยกเคลื่อนตัวผ่านตัวกลางด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน จนในที่สุด
 สารเคมีเหล่านี้จะเคลื่อนตัวไปบนตัวกลางในตำแหน่งที่ตัวมันเองอยู่อย่างบริสุทธิ์ และหลุดออก
 จากตัวกลางไปเป็นสารบริสุทธิ์

๓. Paper Chromatography หมายถึงขบวนการแยกสารประกอบออกจากของผสม
 โดยใช้กระดาษกรองเป็นทั้ง Adsorbent และเป็นตัวกลางรองรับสารเคมีในขบวนการแยก
 นั้น ๆ

๔. Ion - exchange เป็นขบวนการเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ (reversible
 process) ซึ่งไอออน (ion) จะถูกแลกเปลี่ยนกันระหว่างของเหลว (liquid) กับ
 ของแข็ง (solid) โดยของแข็งเป็น ion-exchanger complex inorganic
 substances ทำหน้าที่เป็น ion-exchange ได้

เมื่อแร่ธาตุ (mineral) และ resin ถูกกับสารละลายที่มากเกินพอ
 (aqueous solution) จะแสดงคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยน ไอออน (exchange ion)
 ในสารละลายชั้นนี้โดย ไอออน ชนิดหนึ่ง ในสารละลายจะถูกแทนที่ด้วย ไอออน อื่นที่เหมาะสม

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการค้นคว้า

Rodopulo^{๒๓} ได้ทำการทดลองเรื่อง Partition และตรวจสอบกรดอินทรีย์
ในองุ่นชนิดที่ใช้ทำเหล้า (grape wine) และ grape must โดยวิธี chromatography
ในปี ๑๙๕๓ โดยใช้ไวน์ (wine) หรือ must ๕๐ มิลลิลิตรมาทำปฏิกิริยากับ activated
charcoal เพื่อไล่ (remove) กรด tannic และสารที่มีสีต่าง ๆ ออก ส่วนพวก
น้ำมันที่ระเหยได้ (volatile oils) จะถูกไล่ออกโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam
distillation) ต่อจากนั้นนำสารตัวอย่างมาทำให้เป็นกรด (acidified) แล้วนำไป
ทดลองกับ ether ประมาณ ๕๐ ชั่วโมงแล้วเติมน้ำ ๑ มิลลิลิตร แยก ether ออก
กรองใส่ใน volumetric flask ขนาด ๒๕ มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำให้ครบ ๒๕ มิลลิลิตร

จากการทดลองใน must พบกรด tartaric, acetic และ oxalic
ในไวน์ จะพบกรด lactic และ succinic เพิ่มขึ้นอีกด้วย

Close, Adriaens, Moore และ Big wood^๔ ได้วิจัยเรื่องกรดอะมิโนที่มีอยู่ใน
hydrolysates ของแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้ตัวอย่างของแป้งมันสำปะหลังจาก Belgian
Congo ที่ประกอบด้วย ไนโตรเจน ทั้งหมดร้อยละ ๐.๗๓ ไฟเบอร์ดิบ (crude fibre)
ร้อยละ ๒.๒๓ ซีเถ้า (ash) ร้อยละ ๐.๘๗ และไขมัน (fat) ร้อยละ ๐.๓๐ โดยใช้
ตัวอย่างที่แห้งแล้ว การวิเคราะห์ hydrolysate พบว่ามี ornithine อยู่เป็น
จำนวนมาก ไนโตรเจนในกรด ๑๔ ตัว แสดงไว้ในรูปของกรด glutamic,
ornithine, alanine กรด aspartic, lysine และ arginine ที่มีอยู่ทั้งหมด
ประมาณร้อยละ ๕๐ นอกจากนั้นเป็นแอมโมเนียร้อยละ ๒๔.๗ cystine, methionine และ
tryptophan ร้อยละ ๑.๕ โปรตีนของแป้งมันสำปะหลังมีคุณค่าทางโภชนาการค่อนข้าง
เมื่อดูจากกรดอะมิโนที่มีอยู่

Holmes^{๑๓} ได้แยกกรดอะมิโนโดยใช้ Paper Chromatography จากการตรวจสอบ
พบว่า กรดอะมิโนในเมล็ด lupin (lupin seeds) คือ methionine ในเมล็ด

vetch (vetch seeds) มี methionine, isoleucine และ valine ในถั่ว
เมล็ดกลมต่าง ๆ (peas) มี isoleucine และ threonine ในเมล็ด
subteranean colver (subteranean colver seed) มี methionine และใน
linseed มี methionine โดยเปรียบเทียบโปรตีนของไข่ซึ่งใช้เป็นมาตรฐาน

Henry^{๑๒} ได้วิเคราะห์ผลไม้เปลือกแข็ง (nuts) และผลิตภัณฑ์ได้จากผลไม้เปลือกแข็ง
(nuts products) โดยตรวจสอบปริมาณความชื้น (moisture) ไขมัน (crude
fat) โปรตีน (Crude protein) ไฟเบอร์ (Crude fiber) และขี้เถ้า (ash)
ที่มีอยู่รวมทั้งคุณค่าของแป้งในถั่วลิสง (peanuts) ด้วย

Tinsley และ Bockian^{๑๒} ได้วิจัยเพื่อหากรดอะมิโนที่อยูอย่างอิสระ (free
amino acid) ที่มีในน้ำ strawberry (Strawberry juice) ซึ่งทำมาจาก
Marshall strawberries ที่ทำให้แข็งที่ 0° F. ประมาณ ๒ เดือน จากการ
ทดลองพบว่า น้ำสตรอเบอร์รี่ ๑๐๐ มิลลิลิตร มี asparagine, glutamine, alanine
กรด glutamic และกรด aspartic 59.4, 14.5, 12.1, 7.7 และ 2.8
มิลลิกรัมตามลำดับ และมี serine, threonine, valine, leucine และกรด
cysteic แต่ละตัวมีอยู่น้อยกว่า ๒ มิลลิกรัม

Kelley และ Baum^{๑๓} ได้หากรดอะมิโนในโปรตีนของใบพืช (vegetable
leaf proteins) พบว่ามี histidine, arginine, lysine, leucine,
isoleucine, valine, methionine, threonine, phenylalanine
และ tryptophan โดยเตรียมสารที่สกัดได้จากใบของ beet, broccoli,
แครอท (carrot), celery, kale, lima bean, maize, pea, rhubarb,
ผักขม (spinach) และ turnip

ในใบส่วนที่กินได้ (leaf meals) จะมีจำนวนกรดอะมิโน ๑๐ ตัว กลาย ๆ กัน และมี
คุณค่าทางโภชนาการพอ ๆ กัน ปริมาณของกรดอะมิโนทั้งหมดของใบที่กินได้แต่ละชนิดมีโปรตีนที่สกัด
ออกมาได้ประมาณร้อยละ ๙๕

สำหรับในประเทศไทยก็มีการวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้ด้วย ปรากฏในรายงานกิจกรรมของ
กรมวิทยาศาสตร์ ดังต่อไปนี้

การศึกษาวิจัยกรดอะมิโนในน้ำปลา

ได้ทำการศึกษา กรดอะมิโนในน้ำปลา ๕ ชนิด คือ

น้ำปลาไส้ตัน

น้ำปลาที่กองวิทยาศาสตร์ ชีวภาพทำจากน้ำที่บีบได้จากการทำปลาป่น

น้ำปลาผงจากองค์การผลิตอาหารสำเร็จรูป (อสร.)

น้ำปลาทูจากตลาด

น้ำซอสเมคกี (Mekee) ทำจากโปรตีนของพวกถั่ว

เพื่อว่ามีกรดอะมิโนอะไรบ้างในน้ำปลาต่าง ๆ ชนิด เพื่อใช้วิธี

๑.๑ Ion-Exchange chromatography แยกกรดอะมิโนออกจากน้ำปลา

๑.๒ 2-Dimension paper chromatography สำหรับ identify

ชนิดของกรดอะมิโน

๑.๓ โดยใช้ chromatoplate

กรดอะมิโนในน้ำปลามีอยู่หลายชนิดด้วยกัน แม้จะทำโดยวิธี 2-dimension แล้ว ก็ยังมีอีกหลายตัวที่ทับซ้อนกันอยู่เป็นจุดเดี่ยว จึงได้ใช้ solvent ต่างชนิดแยกตัวที่ทับซ้อนกัน ออกจากกัน จากการทดลองปรากฏว่า น้ำปลาไส้ตันมีกรดอะมิโน ๒๑ ชนิด น้ำปลาที่ได้จาก น้ำที่บีบได้จากการทำปลาป่น มีกรดอะมิโน ๒๐ ชนิด น้ำปลาผง อสร. มีกรดอะมิโน ๑๘ ชนิด น้ำปลาทูมีกรดอะมิโน ๒๐ ชนิด ดังนี้

น้ำปลาไส้ตันมี leucine, iso - leucine, phenylalanine

tryptophan, valine, methionine, proline, α - amino butyric acid,

tyrosine, alanine, sarcosine, glutamine, threonine, glycine,

glutamic acid, serine, asparagine, aspartic acid, histidine, arginine

และ lysine.

น้ำปลาที่ได้จากน้ำที่บีบได้จากการทำปลาป่น มีกรดอะมิโน ๒๐ ชนิดข้างต้น

ยกเว้น proline

น้ำปลาผงของ อสร. ที่ทำจากน้ำปลาชนิดปานกลาง มีกรดอะมิโน ๑๘ ชนิด คือ เหมือนข้างต้น ยกเว้น α - amino butyric acid, tyrosine และ proline

น้ำปลากุ้งมีกรดอะมิโน ๒๐ ชนิด เหมือนข้างต้น ยกเว้น tyrosine และปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดเหล่านั้นมีปริมาณต่างกัน

กองโภชนาการ กรมอนามัย ได้รวบรวมปริมาณของกรดอะมิโนในอาหารไทยต่าง ๆ ไว้หลายชนิดด้วยกัน ผลการทดลองของอาหารประเภทเมล็ดถั่ว (Legumes, dry seed) ผลไม้เปลือกแข็งทั่ว ๆ ไป (common nuts) และผลไม้เปลือกแข็ง และเมล็ดอื่น ๆ (other nuts and dry seeds) รวมทั้งผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางต่อไปนี้

ปริมาณของกรดอะมิโนในไข่ขาวส่วนที่กินได้ ๑๐๐ กรัม

ชื่อ	ไข่ไก่	ไข่เป็ด	ไข่ไก่สด	ไข่เป็ดสด	ไข่ไก่ต้ม	ไข่เป็ดต้ม	ไข่ไก่ต้มสุก	ไข่เป็ดต้มสุก
	กรัม	กรัม	กรัม	กรัม	กรัม	กรัม	กรัม	กรัม
Protein	๒๓.๖	๒๔.๔	๒๖.๕	๕๑.๒	๒๖.๑	๓๔.๕	๓.๐	๓.๔
Tryptophan	๐.๒๕๒	๐.๑๘๐	๐.๓๔๐	๐.๖๔๗	๐.๓๓๐	๐.๒๒๖	—	๐.๐๕๑
Iso-leucine	๑.๓๕๐	๑.๓๕๑	๑.๒๖๖	๒.๔๑๐	๑.๒๒๖	๒.๐๕๔	—	๐.๑๓๕
Threonine	๐.๘๐๑	๐.๗๖๕	๐.๘๒๖	๑.๕๗๕	๐.๘๐๑	๑.๕๕๔	—	๐.๑๗๖
Leucine	๒.๐๖๖	๒.๒๐๒	๑.๘๗๖	๒.๕๖๓	๑.๘๖๖	๒.๕๖๖	—	๐.๓๐๕
Lysine	๑.๘๑๐	๑.๖๖๗	๑.๐๕๕	๒.๐๕๑	๑.๐๖๖	๒.๔๑๔	—	๐.๒๖๕
Methionine	๐.๓๓๕	๐.๒๖๕	๐.๒๖๖	๐.๕๑๖	๐.๒๖๖	๐.๕๑๓	๐.๐๘๑	๐.๐๕๔
Cystine	๐.๒๘๗	๐.๑๕๒	๐.๒๖๖	๐.๘๖๖	๐.๒๘๕	๐.๖๗๖	๐.๐๘๑	๐.๐๗๑
Phenylalanine	๑.๒๕๒	๑.๑๖๗	๑.๕๕๗	๒.๕๖๓	๑.๕๑๐	๑.๘๘๕	—	๐.๑๕๕
Tyrosine	๐.๘๕๑	๐.๓๕๐	๑.๑๕๕	๒.๑๐๐	๑.๐๗๑	๑.๒๖๖	—	๐.๑๕๓
Valine	๑.๕๕๐	๑.๕๕๕	๑.๕๕๖	๒.๕๖๖	๑.๕๕๗	๒.๐๕๕	—	๐.๑๕๖
Arginine	๑.๘๕๖	๑.๓๕๐	๓.๒๖๖	๖.๒๖๖	๓.๑๕๕	๒.๑๖๖	—	๐.๓๐๖
Histidine	๐.๘๕๕	๐.๕๕๖	๐.๕๕๕	๑.๕๖๕	๐.๕๕๖	๐.๕๑๑	—	๐.๑๖๑
Alanine	๐.๘๕๕	๐.๕๕๖	๑.๐๕๕	๒.๐๕๖	๑.๐๖๖	๑.๕๕๖	—	๐.๑๖๖
Aspartic acid	๒.๒๐๑	๒.๐๕๖	๔.๒๖๖	๘.๒๖๖	๔.๑๕๗	๔.๖๖๖	—	๐.๕๖๕
Glutamic acid	๓.๓๐๕	๒.๘๑๑	๕.๕๖๖	๑๑.๒๖๖	๕.๕๕๕	๗.๐๐๐	—	๐.๕๕๐
Glycine	๐.๕๕๖	๐.๕๕๕	๑.๑๖๖	๓.๒๕๕	๑.๖๕๕	๑.๕๕๕	—	๐.๑๖๑
Proline	๐.๕๕๕	๑.๐๕๖	๑.๕๖๗	๒.๕๕๖	๑.๕๕๖	๒.๕๖๗	—	—
Serine	๕.๕๕๕	๐.๕๕๕	๒.๐๕๖	๓.๕๖๖	๑.๕๖๕	๒.๕๕๕	—	๐.๒๕๖

บทที่ ๓

วิธีดำเนินการ

กลุ่มตัวอย่าง

จัดหาตัวอย่างต่าง ๆ จากช่องตลาด คือเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ เมล็ดทานตะวัน
เมล็ดขนุน เมล็ดแตงโมแห้ง เกาลัด ลูกกระ แปะก๊วย กระจับ แต่ละอย่างนำมาค
ให้ละเอียดเตรียมไว้

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

๑. เครื่อง Amino Acid Analyzer

๒. Beckman Model B Spectrophotometer

การดำเนินการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น ๓ ตอน

๑. การหากรดอะมิโนต่าง ๆ ยกเว้น Cystine และ Tryptophan

๒. การหา Cystine

๓. การหา Tryptophan

๑. การหากรดอะมิโนต่าง ๆ ยกเว้น Cystine และ Tryptophan

๑.๑ การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างแต่ละอย่างให้หนักไม่เกิน ๑.๐๐๐ กรัม ใส่ลงใน

Bombelroll tube เติม ๒๐ % HCl (6N) ลงไป 50 ml. ปิดฝาให้แน่น

นำไป hydrolyse ใน autoclave ที่ ๑๒๐ °C ๔ ชั่วโมง ที่ความดัน ๑๕ ปอนด์

ต่อตารางนิ้ว ทั้งให้เย็น นำสารละลายนั้นมา 25 ml. ระบายบน Handy aspirator

จนกรดทั้งหมด นำส่วนที่เหลือมาละลายในน้ำกลั่น 25 ml. นำเข้าเครื่อง centrifuge

๑๕ นาที จากนั้นกรองผ่าน glass wool เก็บสารละลายที่ได้ไว้ทดลองต่อไป

๑.๒ การเตรียมสารละลาย Ninhydrin (Ninhydrin reagent)

ความเข้มข้นของสารละลาย Ninhydrin (Concentration of Ninhydrin reagent)	%	2
ปริมาตรทั้งหมด (Final Volume)	liters	3
๑. Methyl cellosolve	ml.	2250
๒. สารละลาย Acetic acid buffer	ml.	750
๓. Ninhydrin	gm.	60
๔. ผ่าน ก๊าซ N_2 หรือ ก๊าซอาร์กอน (Argon)	5-10 นาที	120
๕. Stannous chloride	mg.	1140
๖. ผ่าน ก๊าซ N_2 หรือ ก๊าซอาร์กอน	5-10 นาที	120
๗. นำเข้าติดตั้งในเครื่อง		
๘. ทิ้งไว้ ๒๔ ชั่วโมง จึงนำมาใช้		

สำหรับสารละลาย Ninhydrin (Ninhydrin reagent) นี้จะเป็นสารที่ไปทำให้เกิดสี (Color developing agent) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยากับสารที่จะทดสอบ (effluent components) อย่างไว (sensitive)

การวิเคราะห์ ใช้ 1 - Column method

๑.๓ การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

ใช้ pipet 0.5 ml. ทดสารละลาย ข้อ ๑.๑ ใส่ลงใน Column ของเครื่อง Amino Acid Analyzer ปล่อยให้ผ่าน Column ลงไปล่าง Column ด้วยสารละลาย โซเดียมซิเตรท pH 2.2 (Sodium citrate buffer pH 2.2) เล็กน้อย ไล่ให้แห้งด้วย ก๊าซ N_2 เติมสารละลาย โซเดียมซิเตรท pH 3.25 (Sodium citrate buffer pH 3.25) ลงไปให้เต็ม Column ปิด Column ด้วย pump 1 ซึ่งเป็น pump ของสารละลายโซเดียมซิเตรท

pH 3.25 (Sodium citrate buffer pH 3.25) และเปิด pump ของ Ninhydrin เครื่องจะทำงานวนครบ ๕ ชั่วโมง ๒๐ นาที ซึ่งจะได peak ต่าง ๆ ออกมา นำไปคำนวณหากรดอะมิโนตัวต่าง ๆ ต่อไป โดยเปรียบเทียบกับ peak มาตรฐาน (Standard peak) ของสารละลาย กรดอะมิโนที่บริสุทธิ์ (Pure amino acid solution)

๑.๔ การคำนวณ

จาก peak เรานำมาคำนวณหาพื้นที่ใต้ peak เพราะเครื่องจะให้ออกมา ในรูปของ peak ของกรดอะมิโน แต่ละตัวโดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้ peak ระหว่างสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน

๒. การหา Cystine

๒.๑ การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง ๐.๐๕๐ กรัม ใส่ใน flask 25 ml. เติมกรด performic ลงไป 2 ml. ปิดฝา นำไปแช่ในตู้เย็นจัด ก้างคืนไว้ จากนั้น นำออกมา ใส่ใน Bombelroll Tube เติม 20 % HCl 3 ml. ปิดฝาให้แน่น นำไป hydrolyze ใน auto clave ๔ ชั่วโมง ที่ ๑๒๑ °C. ความดัน ๑๕ ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว ทิ้งให้เป็น น้ำออกมาระเหยเอากรดออกจนหมดด้วย Handy aspirator ส่วนที่เหลือนำมา เติมสารละลาย โซเดียม ซิเตรท pH 2.2 (Sodium Citrate buffer pH 2.2) ให้มีปริมาตร เป็น 25 ml. แล้วนำเข้าเครื่อง centrifuge ๑๕ นาที กรองผ่าน glass wool เก็บสารละลายที่ได้ไว้ทั้งสองต่อไป

๒.๒ การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่ง ๐.๑๒๕ กรัม ของ L - cystine มาละลายใน NaOH 1 N. เล็กน้อย แล้วเติมน้ำให้ครบ 10 ml. จากนั้นดูดสารละลายนี้มา 0.1 ml. ใส่ใน Erlenmeyer flask เติมกรด performic ลงไป 2 ml. แล้วดำเนินการเหมือนข้อ ๒.๑ ทุกประการ

๒.๓ การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

ดูดสารละลายมาตรฐานมา 0.5 ml. ใส่ลงใน Column ของเครื่อง Amino Acid Analyzer ทำแบบเดียวกันกับการวิเคราะห์สารละลายในตอนที่ ๑ เพียงแต่

ตั้งเวลาเป็น ๑ ชั่วโมง แทน สารตัวอย่างก็ทำเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานนี้ทุกประการ
peak ที่ได้นำไปคำนวณต่อไป

๒.๔ การคำนวณ

จาก peak ที่ได้นำไปคำนวณ โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้ peak
ระหว่าง พื้นที่ใต้ peak ของสารละลายมาตรฐาน กับสารละลายตัวอย่าง

๓. การหา Tryptophan

๓.๑ การเตรียมสารละลายต่าง ๆ

๓.๑.๑ สารละลายสำหรับใช้กับสารตัวอย่าง

ตวงกรด H_2SO_4 เข้มข้น มา 350 ml. น้ำ 350 ml.
และกรด HNO_3 เข้มข้น 84 ml. นำมาผสมให้เข้ากัน

๓.๑.๒ สารละลายสำหรับใช้กับสารมาตรฐาน

ตวงกรด H_2SO_4 เข้มข้นมา 98 ml. น้ำ 63 ml.
และกรด HNO_3 เข้มข้น 84 ml. นำมาผสมให้เข้ากัน

๓.๒ การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างมา ๐.๕ กรัม เติมสารละลายข้อ ๓.๑.๑ ลงไป
40 ml. นำไปคั่นบน water bath ๑๖ - ๑๘ ชั่วโมง จากนั้น ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ
ของห้อง แล้วเติมสารละลายกรดจากข้อ ๓.๑.๑ ลงไปให้ได้สารละลายทั้งหมด 50 ml.
กรองผ่าน glass wool นำสารละลายที่ได้ ไปทำการทดลองต่อไป

๓.๓ การเตรียม blank

ตวงสารละลายกรดจากข้อ ๓.๑.๑ มา 40 ml. คั่นบน water
bath ดำเนินการแบบข้อ ๓.๒ ทุกประการ

๓.๔ การเตรียมสารมาตรฐาน

ชั่ง Tryptophan ที่ใช้เป็นมาตรฐานมา ๐.๑ กรัม ละลายในน้ำ
100 ml. ใช้ pipet ดูดมาใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 100 ml.
๕ ใบ โดยใส่ไป 1, 2, 3, 4, 5 ml. ตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำลงไป 4, 3, 2,

1, 0 ml. ตามลำดับ ถูจากนั้นในแต่ละ flask เติมสารละลาย ข้อ ๓.๑.๒ ลงไป 35 ml. จนครบทุกใบ นำไปแช่ใน water bath ๑๖ - ๑๘ ชั่วโมง แล้วทำให้เย็น ที่อุณหภูมิของห้อง เติมสารละลายกรดจากข้อ ๓.๑.๒ ลงไป ให้ flask ~~ทุกใบมีปริมาตร~~ สุดท้ายเป็น 50 ml. จากนั้นนำมารองผ่าน glass wool สารละลายที่ได้นี้เก็บไว้ ทดลองต่อไป

๓.๔ การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

นำสารละลายที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายที่เก็บไว้ไปวัด absorbancy โดยเครื่อง Beckman Model B Spectrophotometer ค่าที่ได้ให้นำมาคำนวณต่อไป

๓.๕ การคำนวณ

จากกราฟวัด absorption spectra นำมาคำนวณโดยเปรียบเทียบ กับสารละลายมาตรฐานเช่นเดียวกัน

บทที่ ๔

ผลการทดลอง

จากการทดลอง ได้ผลดังแสดงในตารางต่อไปนี้*

* ค่าที่แสดงในตาราง เป็นค่าที่ได้จากการเฉลี่ยผลการทดลอง ๒ ครั้ง

ตาราง ๑ ปริมาณของกรดอะมิโนในสารตัวอย่าง ๑๐๐ กรัม

ชื่อ	แอลู	ลิว	วาลีน	โปรลีน	เมไทโอนีน	เมไทโอนีน	เมไทโอนีน	เมไทโอนีน
กรัม	กรัม	กรัม	กรัม	กรัม	กรัม	กรัม	กรัม	กรัม
Protein ^๒	๔.๖	๑๔.๖	๘.๓	๑๒.๒	๓๐.๖	๒๔.๐	๕.๖	๑๖.๕
Tryptophan	๐.๑๓๕๐	๐.๒๒๒๒	๐.๑๕๕๕	๐.๓๓๓๓	๐.๖๕๕๕	๐.๘๘๘๘	๐.๑๓๓๓	๐.๔๔๔๔
Threonine	๐.๑๕๕๕	๐.๔๔๔๔	๐.๒๕๕๕	๐.๒๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๓๓๓๓	๐.๒๕๕๕	๐.๖๕๕๕
Isoleucine	๐.๑๕๕๕	๐.๓๓๓๓	๐.๓๓๓๓	๐.๑๓๓๓	๐.๕๕๕๕	๐.๓๓๓๓	๐.๒๕๕๕	๐.๖๕๕๕
Leucine	๐.๒๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๑.๐๕๕๕
Lysine	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๐.๕๕๕๕	๑.๐๕๕๕
Methionine	๐.๐๕๕๕	๐.๐๕๕๕	๐.๐๕๕๕	๐.๐๕๕๕	๐.๐๕๕๕	๐.๐๕๕๕	๐.๐๕๕๕	๐.๐๕๕๕
Cystine	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Phenylalanine	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Tyrosine	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Valine	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Arginine	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Histidine	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Alanine	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Aspartic acid	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Glutamic acid	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Glycine	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Proline	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕
Serine	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕	๐.๑๕๕๕

ตาราง ๒. อัตราส่วนระหว่างกรดอะมิโน ที่ร่างกายสร้างขึ้นเองไม่ได้

(Essential amino acid = E) กับปริมาณไนโตรเจน
ทั้งหมด (Total Nitrogen = T) ในสารตัวอย่างที่ทดสอบ

สารตัวอย่าง (Protein source)	E / T กรัม/กรัม
เมล็ดขนุน	๒.๑๓
เมล็ดมะม่วงหิมพานต์	๒.๑๒
เกาลัด	๒.๐๙
กระเจี๊ยบ	๑.๘๐
ลูกกระ	๑.๕๙
เมล็ดทานตะวัน	๑.๐๑
เมล็ดแตงโมแห้ง	๐.๘๓
แปะก๊วย	๐.๘๒

สรุปผลการทดลอง

กรรณมิโนนั้นนับได้ว่าเป็นมีความสำคัญมาก เพราะเป็นสารที่จำเป็นสำหรับขบวนการเจริญเติบโต และการป้องกันต้านทานโรค ถ้าเด็กขาดกรรณมิโน ที่จำเป็นแก่ร่างกาย ร่างกายจะหยุดเติบโตหรือเติบโตไม่เต็มที่ ความต้านทานโรคต่ำ ปัจจุบันนี้ พลโลกถึงสองในสามกำลังเผชิญกับปัญหาทุพโภชนาการ (Malnutrition) และการขาดอาหารขาดแคลนอาหาร โดยเฉพาะเด็กวัยก่อนเรียนเป็นโรคขาดโปรตีน (Kwashiorkor) กันมาก เนื่องจากอาหารโปรตีนจากสัตว์มีราคาแพง จึงได้มีผู้พยายามศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของอาหารพวกพืชว่า พืชใดบ้างที่มีโปรตีน คุณภาพดีหักเหี่ยมกับเนื้อสัตว์ ในบางประเทศ เช่นในแอฟริกา ได้มีการผสมพืชบางอย่าง ที่ทดลองแล้วว่า มีโปรตีนคุณภาพดี และไม่เป็นพิษลงไปในตัว เพื่อเสริมคุณภาพของโปรตีนในตัว ดังนั้นการศึกษาเรื่องกรรณมิโนในพืชที่มีโปรตีนสูงในประเทศไทย จึงมีความสำคัญมากทางโภชนาการ เพราะจะทำให้ทราบถึงคุณค่าทางโภชนาการที่ร่างกายจะได้รับจากอาหารนั้น ๆ ในแง่ของโปรตีน

ความมุ่งหมายของการศึกษากันกว่าเรื่องนี้ ก็เพื่อจะได้ทราบถึงกรรณมิโนต่าง ๆ ที่มีอยู่ในผลไม้เปลือกแข็ง (nuts) และเมล็ด (seeds) ของผลไม้ที่มีโปรตีนสูงบางอย่าง ที่ใช้เป็นตัวอย่าง ได้แก่ เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ เมล็ดขนุน เมล็ดแกงโมแห้ง เมล็ดทานตะวัน ถั่วลิสง ถั่วกระ และกระเจี๊ยบ เพื่อจะดูว่าคุณภาพของโปรตีนที่มากน้อยเพียงไร เพื่อเปรียบเทียบกับสัตว์หรือพืชอื่น ๆ

ในเรื่องของกรรณมิโนนี้ ได้มีผู้ค้นคว้ามาแล้วเป็นเวลานาน เช่น Rodopulo ค้นคว้าเรื่องกรรณมิโนที่ต่าง ๆ ใน grape wine และ grape must Holmes ได้แยกกรรณมิโนโดยใช้ paper chromatography Henry ได้วิเคราะห์ผลไม้เปลือกแข็ง และเมล็ดผลของมัน Kelley และ Baum ได้พบกรรณมิโนในโปรตีนของพวกพืชที่มีโปรตีนต่าง ๆ ในประเทศไทยก็มีการค้นคว้าในค่านี้อยู่มาก เช่น ที่กรมวิทยาศาสตร์

โคกนกกว่าเรื่องกรดอะมิโนในน้ำปลา และที่กองโภชนาการกรมอนามัย ก็ได้มีการค้นคว้าเรื่องกรดอะมิโนในพืชและผลไม้ที่เป็นอาหารในเมืองไทย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเรื่องของกรดอะมิโนกำลังเป็นที่สนใจกันอยู่อย่างกว้างขวาง

การอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดลองในตาราง ๑. สรุปได้ดังนี้

๑. ปริมาณของกรด glutamic ในสารตัวอย่างทุกชนิดที่ทดลองจะมีปริมาณสูง รองลงมาคือ Arginine และกรด Aspartic ทั้งนี้เพราะ ผลไม้เปลือกแข็งและเมล็ด มีกรดอะมิโนเหล่านี้อยู่มาก ส่วน Methionine ซึ่งเป็น limiting amino acid คือกรดอะมิโนที่มีปริมาณต่ำกว่าในผลไม้เปลือกแข็งนั้น มีปริมาณน้อย (ดูตาราง ๑.)

๒. กรดอะมิโนตัวอื่น มีปริมาณต่าง ๆ กันออกไป แล้วแต่สารตัวอย่างและปริมาณของโปรตีนในสารตัวอย่าง ซึ่งมีจำนวนแตกต่างกัน

๓. ปริมาณของ cystine ที่กำหนดออกมาได้จะเห็นว่าอยู่ในช่วงค่อนข้างต่ำ และ cystine จะถูกทำลายได้ง่ายมาก ยิ่งถ้ามีปริมาณน้อย การตรวจสอบยิ่งยากขึ้น ในการทดลอง การ hydrolyse cystine ในทางตรงทำเฉพาะ ไม่อาจปนกับการวิเคราะห์หากรดอะมิโนตัวอื่น ๆ ทั้งนี้เพราะ cystine จะถูกทำลายน้อยมากในทาง แต่ถา hydrolyse ด้วยกรด cystine จะถูกทำลายเกือบหมด ทำให้ไม่สามารถหาปริมาณ cystine ได้

๔. การหาปริมาณ Tryptophan ก็ต้องแยกทำเช่นเดียวกัน เพราะการย่อย (digest) หรือการ hydrolyse เพื่อให้ Tryptophan แยกออกมานั้นต้องใช้เวลานานประมาณ ๑๒ - ๑๔ ชั่วโมง และต้องใช้กรดเข้มข้นมาก ทำให้กรดอะมิโนตัวอื่น ๆ ถูกทำลายได้ง่าย

ส่วนผลการทดลองในตาราง ๒. ซึ่งแสดงอัตราส่วนระหว่างกรดอะมิโนที่ร่างกายสร้างขึ้นเองไม่ได้ (essential amino acid = E) กับปริมาณในโคเรเจนทั้งหมด

(Total Nitrogen = T) ในสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นั้น สรุปได้ว่า

เมล็ดขนุนเป็นสารตัวอย่างที่มีค่า E / T สูงที่สุด รองลงมาตามลำดับก็คือ เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ เกาลัด กระเจี๊ยบ ลูกกระ เมล็ดทานตะวัน เมล็ดแดงโมแฮง และแปะก๊วย

จากค่า E/T ทำให้ทราบได้ว่าในที่นี้จะกล่าวถึงคุณค่าทางโภชนาการแล้ว เมล็ดขนุนจะมีมากที่สุด รองลงมาคือ เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ เกาลัด กระเจี๊ยบ ลูกกระ เมล็ดทานตะวัน เมล็ดแดงโมแฮง และแปะก๊วย ตามลำดับ

ถ้าพิจารณาถึงประโยชน์ที่จะนำมาใช้ในประเทศไทย ซึ่งมีข้าวเป็นอาหารหลัก ก็ควรจะพิจารณาถึงค่า limiting amino acids ในอาหารตัวอย่างเปรียบเทียบกับข้าว ดังตาราง ๓.

ตาราง ๓. ปริมาณ Tryptophan และ Methionine ในอาหารตัวอย่างเปรียบกับข้าว

สารตัวอย่าง	Tryptophan Methionine	
	กรัมในอาหาร ๑๐๐ กรัม	
เกาลัด	๐.๑๓๕๐	๐.๐๓๔๔
ลูกกระ	๐.๒๓๖๒	๐.๐๖๑๔
กระเจี๊ยบ	๐.๑๕๗๕	๐.๐๒๑๔
แปะก๊วย	๐.๓๓๒๕	๐.๐๑๕๘
เมล็็ดแดงโมแฮง	๐.๖๓๔๐	๐.๐๓๕๕
เมล็็ดทานตะวัน	๐.๘๑๒๐	๐.๐๕๓๒
เมล็็ดขนุน	๐.๑๓๘๘	๐.๐๑๔๑
เมล็็ดมะม่วงหิมพานต์	๐.๔๑๘๐	๐.๑๒๓๖
ข้าวสีไม่ขาว ^๒	๐.๐๘๑๐	๐.๑๓๕๐
ข้าวสีจนขาว ^๒	๐.๐๘๒๐	๐.๑๓๓๐

จะเห็นได้ว่า เมื่อนำสารตัวอย่างเทียบกับข้าวแล้ว ปรากฏว่า สารตัวอย่างจะให้ปริมาณของ methionine น้อยกว่าในข้าว แต่จะให้ปริมาณของ Tryptophan มากกว่า ซึ่งความจริงอันนี้จะนำมาใช้ประโยชน์ได้ ก็ ถ้าเรทราบว่าการอาหารโคซาก Tryptophan เราอาจจะใช้สารตัวอย่างเหล่านี้ปนเข้าไปได้ เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณของ Tryptophan ทำให้คุณภาพของโปรตีนในอาหารนั้นสูงขึ้นได้ เช่น ในข้าวมี Tryptophan น้อย เราอาจจะใช้สารตัวอย่างของเรากับข้าว เพื่อให้ได้ Tryptophan มากขึ้น ในประเทศที่รับประทานขนมปังและข้าว เป็นหลัก สารอาหารโปรตีนส่วนใหญ่มาจากขนมปัง และ เมล็ดธัญพืช (Breads and cereals) โปรตีนในอาหารที่ยังไม่ได้ปรุงจะมีประมาณ ๗ - ๑๔ % โปรตีนที่มาจากเมล็ด เช่น ข้าว (grain) จะมีกรดอะมิโนที่ร่างกายสร้างเอง ไม่ได้ (essential amino acids) บางตัวค่า เช่น ในข้าวสาลีมี lysine ค่า ในข้าวโพดมี tryptophan ค่า ในข้าวมี tryptophan และพวกกรดอะมิโน ที่มีกำมะถัน เป็นองค์ประกอบค่า ซึ่งได้แก่ cystine และ methionine อย่างไรก็ตาม โปรตีน ในพืชอาจจะทดแทนกันได้ (Supplement) โดยอาศัยโปรตีนในโปรตีนชนิดอื่น โดยผ่านมารวม กันหรือผสมกัน ถ้าเรทราบว่าการพืชใดมีโปรตีนสูงและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เราก็อาจจะนำมา รับประทาน เพื่อให้ร่างกายได้รับโปรตีนเพียงพอได้ ซึ่งจะเป็นการขจัดปัญหาการขาดแคลน โปรตีนของประชากรได้ เป็นอย่างก็ ถึงโลกกลามาแล้ว

ในตาราง ๓. จะเห็นได้ว่า เมล็ดมะม่วงหิมพานต์มี Tryptophan สูงกว่าข้าว ประมาณ ๓ เท่า และมี methionine มากกว่าที่มีในผลไม้เปลือกแข็งอื่น ๆ ปริมาณ methionine ในเมล็ดมะม่วงหิมพานต์มีค่าใกล้เคียงกับที่มีในข้าว ดังนั้นในแง่ของ limiting amino acids เมล็ดมะม่วงหิมพานต์จึงมีคุณค่าทางโภชนาการดีกว่าผลไม้เปลือกแข็งอื่น ๆ ถ้านำมา supplement ข้าว

ในการหาค่ากรดอะมิโนต่าง ๆ และค่า E/T นี้มีข้อที่น่าจะนำมาพิจารณาคือ

๑. การเสื่อมสลายตัวของกรดอะมิโนอาจจะเกิดขึ้นได้ ถ้าใช้สารตัวอย่างที่เก็บไว้นานจนเกินไป ถ้าหากใช้สารตัวอย่างที่ใหม่ ไม่เก่าจนเกินไป จะทำให้ค่ากรดอะมิโนที่ได้สูง และค่า E/T สูงด้วย เช่น ในกรณีของ เมล็ดขนุน นับได้ว่าเป็นสารตัวอย่างที่หาได้ง่าย

ในการทดลองเมล็ดพันธุ์ซึ่งเป็นสารตัวอย่างที่หาได้ใหม่ที่สุด และนำมาทดลองทันที ไม่ไถ่ถึงหรือเก็บไว้นาน ทำให้การคอมิโนต่าง ๆ ที่หาได้สูง ดังนั้น E/T ที่หาออกมาได้จึงมากที่สุด หรือเราอาจจะกล่าวได้ว่าในเมล็ดพันธุ์มีการคอมิโนที่เป็น essential มาก ดังนั้น E/T จึงมาก

ส่วนสารตัวอย่างอื่น ๆ เช่น เกาลัด ลูกกระ กระจับ เมล็ดทานตะวัน เมล็ดแดงโมแฮง และโอยเฉพาะอย่างปึงแปะก๊วยนั้น เป็นตัวอย่างที่ผู้ทดลองได้เตรียมไว้ล่วงหน้า โดยจัดหาไว้ล่วงหน้าก่อนทดลอง เป็นเวลานานพอสมควร และไม่ทราบว่าผู้ขายได้เก็บไว้เป็นเวลานานเท่าใดแล้ว เพราะของพวกนี้ไม่เสียบง่าย สามารถเก็บได้นาน โดยเฉพาะอย่างปึง เมล็ดทานตะวัน เมล็ดแดงโมแฮง และแปะก๊วย เมื่อนำมาทำการคอมิโนต่าง ๆ จึงทำให้หาออกมาได้ในปริมาณไม่สูงนัก ก็อาจจะมีการคอมิโนบางส่วนที่เสื่อมคุณภาพไปแล้ว โปรตีนที่บริสุทธิ์ก็มักจะมีคุณภาพสูง แต่ถ้ามีความชื้นปนอยู่ ดังที่เรามักจะพบในอาหารทั่ว ๆ ไปแล้ว มันก็จะสลายไป ที่อุณหภูมิของห้อง การเสื่อมสลายเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของแบคทีเรีย และอาจจะสร้างสารที่เป็นพิษต่อร่างกายขึ้นมาด้วย โดยเฉพาะในอาหารที่มีไนโตรเจน จะไม่คงตัวมาก และจะเสื่อมสลายตัวได้เร็วกว่าอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต และไขมัน ดังนั้นอาหารพวกโปรตีน เช่น เนื้อสด ปลา นม ไข่ ควรจะเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายและทำให้การเสื่อมสลายของกรคอมิโนช้าลง ซึ่งในกรณีของพืชก็เช่นเดียวกัน

ดังนั้น ในการทดลอง การใช้สารตัวอย่างที่หามาใหม่ ๆ ไม่ควรจะซื้อเก็บไว้นาน ๆ เพราะจะทำให้คุณภาพของอาหารต่าง ๆ เสื่อมสลายไป ทำให้ไม่ได้รับคุณภาพทางโภชนาการจากอาหารนั้นมากเท่าที่ควร.

ตาราง ๔. อัตราส่วนระหว่าง กรดอะมิโนที่ร่างกายสร้างขึ้นเองไม่ได้ กับปริมาณ
ของไนโตรเจนทั้งหมดจากการทดลองของ FAO.^{๒๘}

สารตัวอย่าง (Protein source)	E / T กรัม / กรัม
Casein	๓.๒๕
ไข่ไก่ (Hen's egg)	๓.๒๒
นมวัว (Cow's milk)	๓.๒๐
นมคน (Human milk)	๓.๐๓
ตับวัว (Beef liver)	๒.๘๔
หัวใจวัว (Beef heart)	๒.๘๕
กล้ามเนื้อวัว (Beef muscle)	๒.๗๘
Navy bean	๒.๗๕
Corn meal	๒.๗๔
Millet (Eleusine coracana)	๒.๗๕
มันฝรั่งหวาน (Sweet potato)	๒.๗๐
Pork tenderloin	๒.๖๗
ปลา (Fish)	๒.๖๖
ข้าว (Rice)	๒.๖๑
ถั่ว (Peas)	๒.๕๘
Soya flour	๒.๕๘
ผักกวม (Spinach)	๒.๕๐
Sesame seed	๒.๔๗
Oats	๒.๓๐
Rye	๒.๑๗

ตาราง ๔. (ต่อ)

สารตัวอย่าง (Protein source)	E / T กรัม / กรัม
เมล็ดฝ้าย (Cotton seed)	๒.๑๕
เมล็ดทานตะวัน (Sun flower seed)	๒.๑๑
มันสำปะหลัง (Cassava)	๑.๓๑

๒. เมื่อเปรียบเทียบค่า E/T ของสารมาตรฐานจากการทดลองของ
ในตาราง ๔. กับสารตัวอย่างที่ทำการทดลอง จะได้ผลดังนี้

๒.๑ เมล็ดขนุน จะมีคุณภาพทางโภชนาการเท่า ๆ กับ Rye เพราะ
มีค่า E/T เท่ากัน

๒.๒ เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ จะมีคุณภาพทางโภชนาการน้อยกว่า Rye
แต่มากกว่าเมล็ดฝ้าย (Cotton seed) คือมีค่า $E/T = 2.12$ ซึ่งอยู่ระหว่างค่า
E/T ของ Rye และเมล็ดฝ้าย ทั้งมี Tryptophan สูงและ Methionine
ก็มากกว่าผลไม้เปลือกแข็งอื่น เพราะฉะนั้นคุณภาพโปรตีนก็ดีกว่าผลไม้เปลือกแข็งอื่น

๒.๓ เกาลัด จะมีคุณภาพทางโภชนาการมากกว่ามันสำปะหลัง รวมทั้ง
กระเจี๊ยบและลูกกระถิน ซึ่งต่างก็มีคุณภาพทางโภชนาการมากกว่ามันสำปะหลัง

๒.๔ เมล็ดทานตะวันที่ได้จากการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับค่า E/T
ที่มีในตาราง ๓. จะเห็นได้ว่าค่าต่างกันมาก ทั้งนี้เนื่องจาก

ก. เมล็ดทานตะวันที่ FAO. ใช้ในการทดลองเป็นเมล็ด-
ทานตะวันที่แก่แล้ว จึงได้เมล็ดทานตะวันที่ดีและสมบูรณ์

ข. เมล็ดทานตะวันที่ FAO. ใช้ในการทดลอง เป็นเมล็ด-
ทานตะวันที่ไม่แก่ เมื่อได้มาก็นำมาทดลองเลย ถ้ากรอกมิโนต่าง ๆ ที่ได้จึงสูง ทำให้ค่า

E / T สูง

ค. สำหรับเมล็ดทานตะวันที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นเมล็ดทานตะวันที่เก็บไว้นาน และการสุ่มตัวอย่างเมล็ดทางตะวันก็มีได้เป็นการกักเอาเฉพาะเมล็ดที่สมบูรณ์ แต่สุ่มเอาจากเมล็ดทานตะวันทั้งหมด นามาแกะเปลือกออก แล้วบดรวมกันให้ละเอียด จากนั้นก็นำมาทดลอง

๒.๕ เมล็ดทานตะวันเป็นเมล็ดทานตะวันที่มาจากถนนที่ ซึ่งอาจจะทำให้มีองค์ประกอบต่างกัน

จากเหตุดังกล่าวนี้ คือ การใช้ตัวอย่างที่เก่ากว่า และไม่จำกัดเลือก รวมทั้งเป็นเมล็ดทานตะวันที่มาจากถนนที่ ก็อาจจะทำให้ค่า กรดอะมิโนที่ได้น้อยกว่า ซึ่งจะทำให้ค่า essential amino acid น้อยไปเลย แต่ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการทดลองนี้ ถึงแม้จะเท่ากัน การหาไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen) เราก็หาได้จากสูตรที่ว่า

$$\text{ปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}}{6.25}$$

เพราะฉะนั้นค่าปริมาณไนโตรเจนที่ใช้เป็นตัวหารใน E/T จึงเท่ากัน แต่ค่า E ที่หาได้ต่างกัน จึงทำให้ค่าที่ได้ออกต่างกัน

๒.๖ สำหรับเมล็ดแดงโมแห่งและแปะก๊วยนั้นค่า E/T ก่อนข้างค่าทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากมีปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็น essential น้อย และมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมากหรือสารตัวอย่างที่ใส่ถูกเก็บไว้นาน ทำให้กรดอะมิโนต่าง ๆ เสื่อมสลายไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งแปะก๊วย สังเกตได้ชัดเพราะถ้าเป็นแปะก๊วยที่สดใหม่แล้ว จะมีลักษณะที่แข็งเมื่อแกะเปลือกนอกออกแล้ว แต่ที่ใช้ทดลองเมื่อแกะเปลือกออกแล้ว มีลักษณะเหี่ยวแสดงว่าเป็นแปะก๊วยที่เก็บไว้นาน ภัยเหตุนี้จึงทำให้หากากรดอะมิโนในแปะก๊วยใดก่อนข้างค่า เพราะกรดอะมิโนบางส่วนน่าจะเสื่อมสลายไปเหลืออยู่บางส่วน ซึ่งก็คือส่วนที่หาออกมาได้นั่นเอง

๒.๗ สำหรับกรดอะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกาย ในที่นี้เป็นกรดอะมิโนที่กินผู้ใหญ่ไม่อาจสังเคราะห์ขึ้นเองได้ หรือสังเคราะห์ได้ก็ไม่พอกับความต้องการของร่างกาย ซึ่งได้แก่ lysine, leucine, isoleucine, methionine, threonine, tryptophan, valine และ phenylalanine แต่ในเด็กหรือในสัตว์อื่น ๆ ชนิดของกรดอะมิโนที่จำเป็น

แก๊สร่างกายก็จะแตกต่างออกไป

๒.๔ จากผลการทดลองในครั้งนี้อาจเรียงสารตัวอย่างต่าง ๆ ตาม
คุณภาพทางโภชนาการ ตั้งแต่สูงไปหาล่างได้ดังนี้
เมลิคชนุน เมลิคมะม่วงหิมพานต์ เกาลัด กระจับ ลูกกระ
เมลิคทานตะวัน เมลิคแดงโมแห่ง แปะกวย

ขอควรระวังในการทดลอง

๑. การใช้สารลงใน Column ของเครื่อง Amino Acid Analyzer เพื่อ
วิเคราะห์กรดอะมิโนนั้น ต้องพิจารณาถึงปริมาณของโปรตีนในสารตัวอย่างนั้น ๆ ด้วย ถ้ามีโปรตีนสูง
ใช้สารละลาย 0.5 ml. ก็พอ เพราะในสารละลายปริมาณ 0.5 ml. นี้มีปริมาณของกรด
อะมิโนต่าง ๆ มากพอที่จะแยกได้ แต่ถ้ามีปริมาณโปรตีนน้อย ก็ต้องใช้ถึง 1 ml. การที่จะดูว่าจะ
มีปริมาณของโปรตีนหรือปริมาณของกรดอะมิโน เพียงพอหรือไม่นั้น ดูได้จากค่าของโปรตีนที่มีอยู่
หรือถ้าไม่แน่ใจก็สามารถตรวจสอบได้ โดยการเทียบสีกับสารละลายมาตรฐานของกรดอะมิโน
คือนำสารที่จะแยกใส่ในหลอดทดลองหลอดหนึ่ง อีกหลอดหนึ่งใส่สารละลายมาตรฐานปริมาณเท่า ๆ
กันลงไปโดยใช้ประมาณ 1 ml. แล้วหยด ninhydrin ปริมาณเท่า ๆ กันลงไป จะได้
สีม่วงเกิดขึ้น เปรียบสีม่วงที่เกิดขึ้นนี้มาเทียบกับ ถ้าสีเข้มเท่า ๆ กัน แสดงว่ามีปริมาณโปรตีน
เท่ากัน ใช้ 0.5 ml. ก็พอ ถ้าสีเข้มกว่า แสดงว่ามีปริมาณโปรตีนมากกว่า ถ้าสีจางกว่า
แสดงว่ามีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานมากกว่า 0.5 ml.

๒. การหา cystine จะต้องล้าง column ใหม่ทุกครั้ง เพราะ จะมีส่วนที่เหลือ
ตกค้างอยู่ใน column ซึ่งได้แก่กรดอะมิโนตัวอื่น ๆ ที่เราไม่ต้องการหาโดยวิธีนี้ กรดอะมิโน
เหล่านี้จะทำให้หลอดต่าง ๆ ในเครื่องเกิดอุกมันได้ ดังนั้นจึงต้องล้าง column ด้วย NaOH
0.2 N. ทุกครั้งก่อนใส่สารตัวอย่างอันใหม่

สำหรับการหากรดอะมิโนต่าง ๆ ยกเว้น cystine และ tryptophan
นั้นเราไม่ล้าง column ทุกครั้ง เพราะ cystine ส่วนมากจะถูกทำลายด้วยกรด
ส่วนที่เหลือ ซึ่งจะปรากฏออกมาเป็น peak นั้นมีน้อยมาก ส่วน Tryptophan ก็ยังไม่ถูกย่อย

ออกมาจึงไหลผ่านเลยไป ออกมาในส่วนที่เป็นของเหลือ

๓. ในการหา tryptophan มีข้อควรระวังในการทดลองอย่างมากมายังนี้

๓.๑ การเก็บมกรสำหรับสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง ควรเตรียมให้เพียงพอที่จะใช้ใน ๓ - ๔ วัน ไม่ควรเตรียมไว้ล่วงหน้านาน ๆ เพื่อป้องกัน กรดไนตริกที่จะสูญหายไปได้ ในรูปของไอสีน้ำตาล (brown fumes) ในขณะที่เตรียมเรา ทำได้ดังนี้

๓.๑.๑ เตรียมน้ำจำนวนที่ต้องการไว้ใน beaker ขนาดใหญ่ และ
แช่ beaker ไว้ในน้ำเป็น

๓.๑.๒ เติมน้ำกลั่นลงไปใน beaker และระมัดระวังที่สุด กันน้ำ ๆ และ
สม่ำเสมอ ต้องระวังอย่าให้ความร้อนเกิดขึ้นมาก

๓.๑.๓ เมื่อสารละลาย ข้อ ๓.๑.๒ เป็นแล้ว เติมน้ำกลั่นลงไปช้า ๆ
จนอย่างสม่ำเสมอ

๓.๑.๔ เก็บสารละลายที่ได้จากข้อ ๓.๑.๓ ไว้ในขวดสีน้ำตาลและเก็บ
ขวดนี้ไว้ในตู้เย็นจัด และต้องเก็บในที่มืดด้วย

๔. เหตุที่ต้องใช้ปริมาณของน้ำเหมือนกันทั้งในสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างนั้น
เพราะเมื่อใช้กรดที่มีความเข้มข้นคงที่แล้ว สีเหลืองที่เกิดขึ้นจาก tyrosine จะมองไม่เห็น
เมื่อทำให้สารตัวอย่างเจือจางสีเหลืองจะจาง ๆ เห็นชัด ตามจำนวนของ tyrosine ที่มี
อยู่ ซึ่งจะช่วยให้วัดค่า tryptophan ได้มากขึ้น

๕. การย่อยสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน ในการหา tryptophan จำเป็น
อย่างยิ่งที่ทุก flasks จะต้องได้รับปริมาณความร้อนเท่ากัน เมื่อใช้ steam bath ต้อง
แน่ใจว่า flask ที่ใส่สารตัวอย่างนั้น ได้รับความร้อนโดยตรงจากไอน้ำจริง ๆ สารตัวอย่าง
จะถูกย่อยโดยวางไว้ใน steam bath

๖. หลังจากย่อยสารตัวอย่างแล้วทำให้มีปริมาณ 50 ml. แล้วจึงปิดฝา เขย่า
ให้เข้ากัน หลังจากนั้นเปิดจุกและปิดจุกอย่างหลวม ๆ ถ้าจุกปิดแน่นเมื่อทำให้ flask เป็นลบ
จะเปิดฝาจุกได้ยาก เพราะความเข้มข้นของของเหลวใน flask อย่างไรก็ตาม การทำแบบนี้

อาจจะใช้ไม่ได้ในงานอื่นบางอย่าง

ข้อเสนอแนะ

๑. ในการทดลอง ผู้ทดลองควรจัดหาสารตัวอย่างที่ใหม่เพื่อให้ได้ค่าที่แท้จริงของปริมาณของกรคอมิโนต่าง ๆ จริง ๆ
๒. ในการทดลอง ผู้ทดลอง ควรจะได้คำนึงถึงว่า จะใช้สารตัวอย่างอะไรบ้าง เพื่อสะดวกแก่การรวบรวมตัวอย่าง โดยต้องดูว่าในฤดูนั้น ๆ ควรจะมีผลไม้ชนิดใดบ้าง ถ้าจะทดลองกับผลไม้ เพราะถ้าทำการทดลองไม่ตรงกับฤดูของมันแล้ว การหาตัวอย่างจะทำได้ยากมาก
๓. สำหรับการค้นคว้าในเรื่องนี้ ผู้ที่สนใจอยากจะทราบคุณค่าทางโภชนาการของสารอื่น หรือต้องการหาชนิดและปริมาณของกรคอมิโนในสารอื่น ๆ ก็อาจจะนำไปทดลองศึกษาได้
๔. จากการทดลองเรื่องนี้ ถ้าจะทดลองถึงการหากรคอมิโนในสารตัวอย่างที่เก็บไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ กันแล้ว ก็จะทำให้ทราบถึงการเสื่อมค่าของอาหารนั้นได้

๒. ๖ ๖๖๖๖๖๖

บรรณานุกรม

๑. กรมวิทยาศาสตร์ รายงานกิจกรรมของกรมวิทยาศาสตร์ ฉบับที่ ๒๖, ตุลาคม ๒๕๐๕ - กันยายน ๒๕๐๖ หน้า ๕๓ - ๕๔. ✓
๒. กองโภชนาการ กรมอนามัย ตารางแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในอาหารไทย อนุภาพันธ์ ๒๕๐๗ ✓ ๓๓๓
๓. Brewster, Ray Q., and McEwen, William E., Organic Chemistry, 3rd edition, Prentice-Hall, Inc., Maruzen Co., pp. 415 - 416, 1961. ✓
๔. Close, J., Adriaers, E.L., Moore, S., and Rig Wood, E.J., Full. Soc. Chem. Biol., 35, 935 - 992, (1953).
๕. Cooper, Lenna F., Nutrition in Health and Disease, 14th edition, Philadelphia and Montreal, Lippincott company, p. 42, 1963.
๖. Earland, C., and Knight., C.S., Biochem. Biophys. Acta 17, 457 (1955)
๗. Fairley, Jame L., and Kilgour, Gordon L., Essentials of Biological Chemistry, 2nd edition, Reinhold Publishing Corporation, New York, p. 314, 1966.
๘. Fischer, E., Ber., 39, 530 (1906).
๙. Folin, O., and Denis, W., J. Biol. Chem., 12, 245 (1912).
๑๐. Hamilton, P.B., Anal. Chem., 30, 914 - 916 (1958).
๑๑. Hanke, M.T., and Kaessler, K.K., J. Biol. Chem., 43, 527 (1920).
๑๒. Henry, A.M., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists., 37, 845 - 848 (1954).
๑๓. Holmes, p., Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 31, 592 - 602 (1953).
๑๔. Instruction Manual for the Model KLA - 3 B Amino Acid Analyzer, Hitachi Perkin - Elmer, December, pp. 196, 1967.

- 9c. Kapeller - Adler., R., Biochem. Z., 264, 131, (1933).
- 9b. Kassel, A., and Kutscher, F., Z. Physiol. Chem., 31, 165 (1900).
- 9a. Kelley, E.G., and Baum, R.R., J. Agric. Food Chem., 1, 680-683 (1953).
- 9d. Koessler, K.K., and Hanke, M.T., J. Biol. Chem., 39, 497 (1919).
- 9e. Kopple, Kenneth D., Peptides and Amino acids, W.A. Benjamin Inc., New York, p. 4, 1966.
- 9f. McCoy, R.H., Meyer, C.E., and Pose, W.C., J. Biol. Chem., 112, 283 (1935).
- 9g. Moore, S., Speckman, D.H., and Stein., W.H., "Automatic Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids". Federation Proc., 17, 1107-1115 (1958).
- 9h. Moore, S., Speckman, D.H. and Stein., W.H., "Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins an Improved System" Anal. Chem., 30, 1185-1190 (1958).
- 9i. Rodopulo, A.K., Biokhimiya, 18, 544-547 (1953).
- 9j. Sakaguchi, S., J. Biochem. (Tokyo), 5, 13, 25, 133 (1925).
- 9k. Speckman, D.H., Stein, W.H., and Moore, S., "Automatic Recording Apparatus for use in the Chromatography of Amino Acids" Anal. Chem., 30, 1190-1206 (1958).
- 9l. Tinsley, I.J., and Bockian, A.H., Food Res., 24, 410-412 (1959).
- 9m. Vickery, H.B., and Schmidt, C.L.A., Chem. Rev., 9, 169 (1931).
- 9n. WHO and FAO, "Protein Requirements" FAO Nutrition Meeting Report Series No. 37, Report of a Joint FAO/WHO Expert Group, Published jointly by FAO and WHO, Rome, p. 71, 1965.

ภาคผนวก

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

การคำนวณปริมาณของกรดอะมิโน ยกเว้น Cystine และ Tryptophan

$$\text{ปริมาณของกรดอะมิโน} = \frac{H \times W \times 0.25 \times M.W. \times 100}{H \times W \times 11 \times 1000 \times 100} \quad \text{กรัม} / 100 \text{ กรัม}$$

เมื่อ H = ความสูงของ peak ของกรดอะมิโน

W = ความกว้างของ peak

M.W. = น้ำหนักโมเลกุลของกรดอะมิโน

M = น้ำหนักของสารตัวอย่าง

การหา W

$$W = (n-1) \times 4 + \text{ส่วนที่เหลือให้ใช้จุดค่า}^*$$

การคำนวณปริมาณ Cystine

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน} &= \frac{0.25}{10} \times 0.1 \times 100 \\ &= 0.0025 \quad \text{กรัม} / \text{ml.} \end{aligned}$$

ปริมาณของ cystine ในสารตัวอย่าง -

$$= \frac{0.0025 \times \text{พื้นที่ของ peak ของสารตัวอย่าง} \times 100}{\text{พื้นที่ของสารมาตรฐาน} \times \text{น้ำหนักของสารตัวอย่าง}} \quad \text{กรัม} / 100 \text{ กรัม}$$

* กราฟจากเครื่องจะแสดงออกมาเป็นสี่ และเป็นจุด แต่ในที่นี้สี่เส้นกราฟเป็นเส้นทึบ เพื่อให้มองเห็นชัดเจนขึ้น.

การคำนวณปริมาณของ Tryptophan

สารละลายมาตรฐาน

อันดับที่	Tryptophan (mg.)	ค่า Blank	หน่วยของ O.D. (Unit of optical density)	mg/O.D.
๑	๑	๐.๐๑๕	๑๕	๐.๐๖๖๗
๒	๒	๐.๐๒๓	๒๓	๐.๐๘๖๙
๓	๓	๐.๐๓๔	๓๔	๐.๐๘๘๐
๔	๔	๐.๐๔๕	๔๕	๐.๐๘๘๙
๕	๕	๐.๐๕๘	๕๘	๐.๐๘๖๒
			เฉลี่ย	<u>๐.๐๘๓๕</u>

$$\frac{๐.๐๘๓๕ \times ๑๐๐}{๕๐๐} = \frac{๐.๐๑๓๕ \text{ mgs. T}}{\text{unit O.D.}}$$

สารตัวอย่าง

$$\text{เช่น ค่า O.D. ของสารตัวอย่าง} = ๐.๐๐๙$$

$$\text{หน่วยของ O.D. ของสารตัวอย่าง} = ๙$$

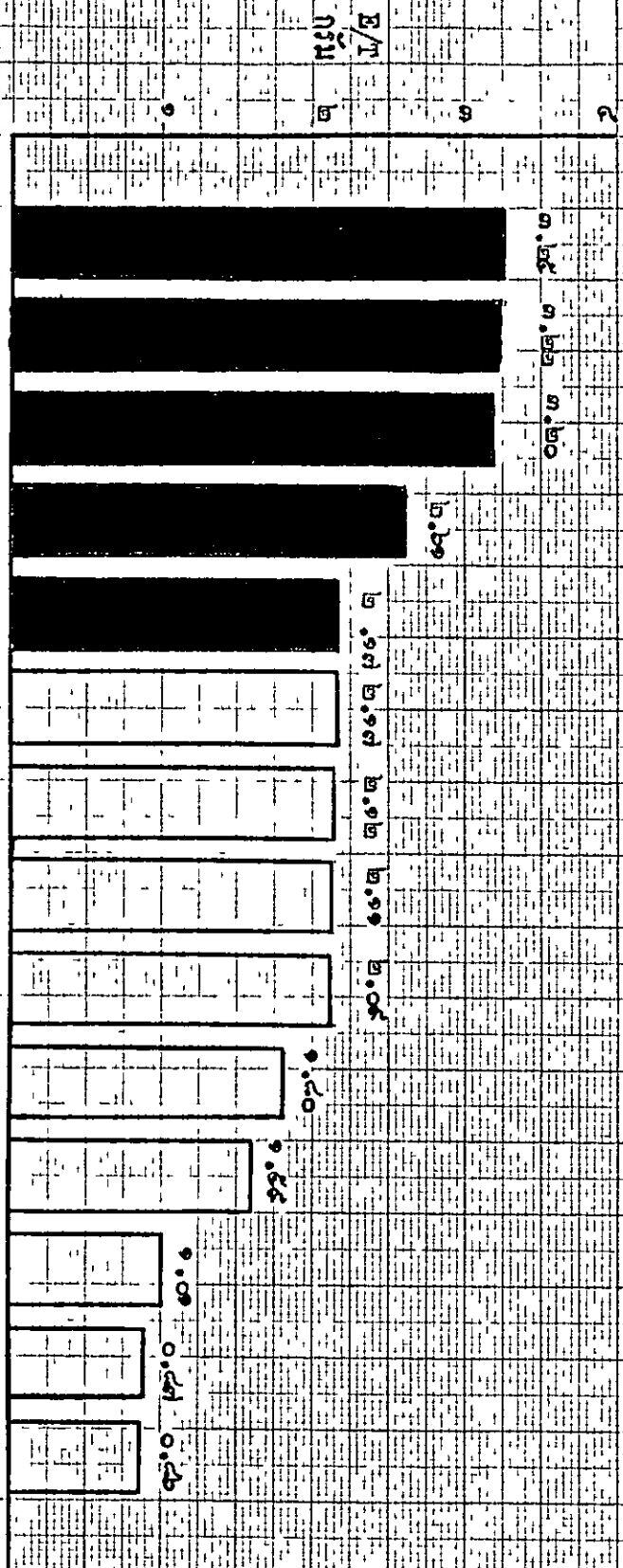
$$\therefore \text{หน่วยของ O.D.} \times \% \text{ T} = ๐.๐๑๓๕ \times ๙ = ๐.๑๕๓๕$$

$$\therefore \text{สารนี้คือ Tryptophan} = ๐.๑๕๓๕$$

การคำนวณปริมาณของไนโตรเจน

$$\text{ปริมาณของโปรตีนทั้งหมด} = \text{ปริมาณของไนโตรเจน} \times ๖.๒๕$$

รูป ๑. ค่า E/P (กรัม/กรัม) ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง



☐ สารตัวอย่าง
☒ สารมาตรฐาน

Casein

ไข่ไก่

นมคน

ข้าว

Rye

เมล็คขนุน

เมล็คมะม่วงหิมพานต์

เมล็คทานตะวัน

ถั่วลิสง

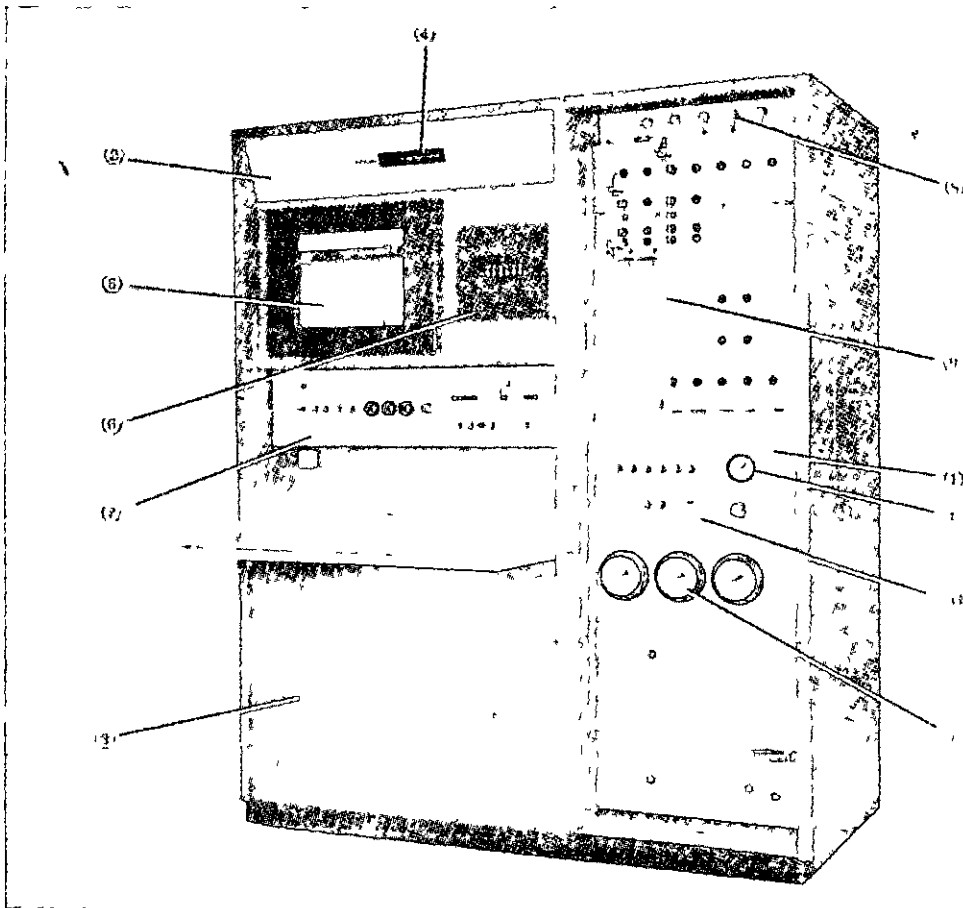
กระเทียม

ลูกกระพรวน

เมล็คทานตะวัน

เมล็คแตงโมแห้ง

แป้งข้าวเหนียว



- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. Column housing | 7 Electric control device |
| 2. Electric control housing | 8 Supply valves |
| 3. Pump housing | 9 Columns |
| 4. Name plate | 10 Pressure gauge for N ₂ gas |
| 5 Recorder | 11. Tubing manifold |
| 6 Programming device | 12 Pressure gauges |

Fig 1 Model KLA-3B Amino Acid Analyzer

ประวัติย่อของผู้เขียน

ชื่อ นางสาวณอมสิน แก้วสอาด
เกิด วันที่ ๑๕ เมษายน พ.ศ. ๒๔๘๐
สถานที่เกิด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
การศึกษา ได้รับประกาศนียบัตร ประถมศึกษา จากโรงเรียนประถมสาธิต
วิทยาลัยครูสวนสุนันทา ได้รับประกาศนียบัตรมัธยมศึกษาตอนต้นจาก
โรงเรียนมัธยมสาธิต วิทยาลัยครูสวนสุนันทา ได้รับประกาศนียบัตร
มัธยมศึกษา ตอนปลาย สายวิทยาศาสตร์ จากโรงเรียนมัธยมสาธิต
วิทยาลัยวิชาการศึกษา ประสานมิตร
ได้รับประกาศนียบัตร วิชาการศึกษาชั้นสูง จากวิทยาลัยครูจันทร์เกษม
ได้รับปริญญาการศึกษาบัณฑิต จากวิทยาลัยวิชาการศึกษา ประสานมิตร
ได้รับปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต จากวิทยาลัยวิชาการศึกษา ประสานมิตร.