

การพัฒนาระบบตรวจสอบสารอาหารในอาหารไทย

โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

Development of Systems for Determination of Nutrients in Thai Foods by Thin Layer Chromatography

ยุทธนา วารุณ¹ กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ² วันชัย ดีเอกนามกุล³ และ ปรียานุช ดวงละออ^{4*}

^{1,4*}สาขาศึกษาทั่วไป (วิทยาศาสตร์) คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

^{2,3}ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*E-mail: preeyanut.dua@rmutr.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบตรวจสอบสารอาหารในตัวอย่างอาหารไทยโดยใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) และวิเคราะห์โดยเทคนิค TLC densitometry ซึ่งได้พัฒนาระบบวิเคราะห์สารอาหาร 3 ชนิดได้แก่ น้ำมันหอมระเหย, สารอาหารที่มีขี้ผึ้ง และกรดอะมิโน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหย ได้แก่ การใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย ใช้วัสดุภาคหนึ่ง คือ silica gel 60F และ วัสดุภาคเคลื่อนที่ คือ โทลูอีน : เอทิลอะซิเตท ในอัตราส่วน 85 : 15 จากนั้นทำการสร้างสารอนุพันธ์บนแผ่น TLC ที่ผ่านวัสดุภาคเคลื่อนที่แล้วด้วยการทำปฏิกิริยากับไอโอดีนและตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกสารอาหารด้วยการถ่ายภาพภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm ในการวิเคราะห์สารอาหารที่มีขี้ผึ้งพบ สภาวะที่เหมาะสมคือการใช้ น้ำกลั่นหรือกรดฟอร์มิกเป็นตัวทำละลาย โดยมีวัสดุภาคหนึ่งคือแผ่น TLC ชนิด silica gel 60F และวัสดุภาคเคลื่อนที่คือ เอทิล อะซิเตท : กรดฟอร์มิก : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 100 : 11 : 11 : 26 ทำการตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกด้วยการถ่ายภาพภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 366 nm การวิเคราะห์กรดอะมิโนมาตรฐานพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้แก่ วัสดุภาคหนึ่งคือแผ่น TLC ชนิด silica gel 60F และวัสดุภาคเคลื่อนที่คือ เอ็น-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น : เมทานอล ในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 : 1 ตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกด้วยการทำปฏิกิริยากับไอโอดีนและสารละลายนินไฮดริน จากนั้นวิเคราะห์โดยถ่ายภาพภายใต้แสงขาว นอกจากนี้ข้อมูลจาก TLC densitometry

* Corresponding author, e-mail: preeyanut.dua@rmutr.ac.th

พบว่า หากเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มที่มีสภาพขั้วแบบเดียวกันจะมีสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่คล้ายคลึงกันแต่จะมีค่า Rf ที่ต่างกัน ซึ่งแสดงว่าระบบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจสอบกรดอะมิโนแต่ละชนิดได้ค่อนข้างจำเพาะ

คำสำคัญ: สารอาหาร โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง กรดอะมิโน น้ำมันหอมระเหย

Abstract

Thin layer chromatography (TLC) was employed to detect nutrients in Thai foods. The TLC results were investigated by TLC densitometry techniques. Three optimized systems for analyzing three groups of nutrients, i.e. essential oils, polar compounds and amino acids, were developed. The optimized conditions for analyzing essential oils were as follows; the solvent for extraction was chloroform, the stationary phase was silica gel 60F TLC plate, the mobile phase system was toluene: ethyl acetate (85:15). The developed TLC plate was then subjected to derivatize by iodine, and the efficiency for essential oils separation was visualized by photo documentation under UV light at 254 nm. The optimized conditions for polar compounds were as follows; the solvent for extraction was formic acid or distilled water, the stationary phase was silica gel 60F TLC plate, the mobile phase system was ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100: 11: 11: 26). The efficiency of polar compounds separation was evaluated by visualization under UV light at 366 nm. The optimized conditions for standard amino acids were as follows; the stationary phase was silica gel 60F TLC plate, the mobile phase system was n-butanol: acetic acid: water: methanol (4: 1: 1: 1). The developed TLC plate was subsequently derivatized by iodine and Ninhydrin solution. The efficiency of amino acids separation was evaluated by visualization under visible light. Results from TLC densitometry indicated that there were similarities in absorption spectrum among amino acids with the same polarity. However, there were differences in their Rf values, suggesting that the developed system was specific for analyzing amino acids.

Keywords: Nutrients, Thin Layer Chromatography, Amino Acids, Essential Oils

1. ที่มาและความสำคัญ

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) สามารถใช้วิเคราะห์สารได้หลากหลายชนิด โดยการวิเคราะห์ด้วย TLC ต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ผลการวิเคราะห์ออกมาถูกต้องแม่นยำมากที่สุด ตัวอย่างงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ใช้เทคนิค TLC ในการวิเคราะห์สารอาหารได้แก่ การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารแต่งรสอาหาร (monosodium glutamate, MSG) ในอาหารชนิดต่าง ๆ [1] พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณ MSG ในอาหารคือ แผ่น TLC ชนิด normal phase silica gel 60F เป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

คือ methanol: chloroform: formic acid อัตราส่วน 5:5:1 (V/V) จากนั้นทำการสร้างสารอนุพันธ์ด้วยสารละลาย 1% Ninhydrin และตรวจวัดปริมาณด้วย densitometric scanning ที่ความยาวคลื่น 485 nm ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำและมีความไวสูง อีกทั้งมีราคาที่ถูกกว่าการวิเคราะห์ด้วย HPLC นอกจากนี้ได้มีการนำ TLC มาวิเคราะห์สารปนเปื้อนต่าง ๆ ในอาหาร เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสีผสมอาหารในเครื่องดื่ม น้ำผลไม้โดยใช้ TLC ควบคู่กับเทคนิค ion pair HPLC [2] การพัฒนาเทคนิค HPTLC เพื่อใช้หาปริมาณ Steviol glycoside ในอาหารชนิดต่าง ๆ จำนวน 6 ชนิด พบว่าการวิเคราะห์ด้วย HPTLC ให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำและเที่ยงตรงเมื่อทำการวิเคราะห์ซ้ำ [3] ในส่วนของงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ เช่น การวิเคราะห์สาร Plaunotol ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีที่มีฤทธิ์ทางยา สามารถสกัดได้จากใบของต้นเปล้าน้อยโดยมีสถานะในการวิเคราะห์คือใช้แผ่น TLC silica gel 60F วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ chloroform: n-propanol อัตราส่วน 96:4 (V/V) และหาปริมาณของสาร Plaunotol โดยการสแกนด้วย TLC densitometer ที่ความยาวคลื่น 220 nm. เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก GC พบว่าปริมาณสาร plaunotol ที่ได้จากเทคนิคทั้งสองไม่แตกต่างกัน [4]

อย่างไรก็ดียังไม่มียางานการนำเทคนิค TLC มาใช้ในการวิเคราะห์สารอาหารในอาหารไทย ซึ่งประกอบไปด้วยสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาและสารอาหารที่เป็นประโยชน์จำนวนมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาเทคนิค TLC เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารอาหารชนิดต่าง ๆ ในอาหารไทย ซึ่งสามารถต่อยอดและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ที่ไม่ซับซ้อน ราคาไม่แพงและให้ผลที่แม่นยำและช่วยให้สามารถลดต้นทุนในการวิเคราะห์และการควบคุมคุณภาพอาหารได้ต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การสกัดสารอาหารจากอาหารตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

นำอาหารตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze Dry) แล้วมาละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วคือ ethanol และน้ำเพื่อสกัดสารอาหารที่มีขั้ว ส่วนตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วคือ chloroform ใช้สกัดสารอาหารประเภทไขมัน โดยอัตราส่วนการละลายคือ อาหารตัวอย่าง 1 g ต่อตัวทำละลาย 1,000 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นแยกส่วนน้ำออกโดยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.2 การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารอาหาร

ใช้แผ่น TLC ชนิด precoated TLC plate เป็นวัฏภาคนิ่งซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิดได้แก่ Silica gel 60F (Merck, Darmstadt, Germany) สำหรับการแยกสารที่มีขั้ว และ Reverse phase RP C-18 (Merck, Darmstadt, Germany) สำหรับสารที่ไม่มีขั้ว ในการเลือกวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมเพื่อให้สารในอาหารแต่ละชนิดแยกออกจากกันจะทำการผสมและปรับอัตราส่วนของสารละลายต่าง ๆ ให้เหมาะสม สำหรับวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการแยกกรดอะมิโน ได้ใช้สารละลายผสมระหว่าง n-propanol: acetic acid: dH_2O และปรับอัตราส่วนจนกว่ากรดอะมิโนแต่ละชนิดจะแยกออกจากกันโดยพิจารณาจากค่า Retention Factor (Rf) ส่วนการแยกสารอาหารที่มีขั้วใช้สารละลายผสมระหว่าง ethyl acetate: formic acid: acetic acid: dH_2O และในการแยกสารอาหารที่ไม่มีขั้วใช้สารผสมระหว่าง Toluene: Ethyl acetate

2.3 การแยกสารอาหารโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

ทำการ spot สารตัวอย่างลงบนแผ่น TLC ด้วย TLC sample application system (Linomat V system (Camag, Muttentz, Switzerland)) ในปริมาณสารตัวอย่าง 2 μ l และ 5 μ l ต่อ 1 แถบ จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้เตรียมแล้วไปแยกสารผ่านวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้ทำให้เป็นระบบที่อิมตัวใน TLC developing chamber (Camag, Muttentz, Switzerland) จนกระทั่งแนวของวัฏภาคเคลื่อนที่ห่างจากขอบบนประมาณ 1 cm จึงนำแผ่น TLC ออกมาทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

2.4 การตรวจวิเคราะห์สารอาหารโดยวิธี TLC densitometry

นำแผ่น TLC ที่ผ่านวัฏภาคเคลื่อนที่แล้วไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกสารอาหารโดยเครื่อง TLC visualizer (Camag, Muttentz, Switzerland) โดยการถ่ายรูปผ่านแสงขาวและแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการสแกนแต่ละแถบของสารที่ได้ผ่านการแยกด้วยแสง UV ความยาวคลื่น 200-400 nm เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารจาก absorption spectrum และทำการสแกนโดยใช้แสงความยาวคลื่น 366 nm ซึ่งจะได้เป็น TLC chromatogram เพื่อวิเคราะห์หาค่า Retention factor (Rf) ของสารอาหารต่อไป

2.5 การสร้างอนุพันธ์ (derivatization) ของสารอาหารโดยวิธี Iodine staining

สารอาหารหลายชนิดเป็นสารที่ไม่มีสีและไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยแสง UV จึงต้องทำปฏิกิริยากับสารที่ทำให้เกิดสีโดยการนำแผ่น TLC ที่ผ่านวัฏภาคเคลื่อนที่แล้วมาย้อมใน TLC developing chamber ที่ได้ทำให้อิมตัวด้วยไอระเหยของกลีตไอโอดีนเป็นเวลา 5 นาที จนสังเกตเห็นแถบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาบนแผ่น TLC แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.6 การสร้างอนุพันธ์ของสารอาหารโดยวิธี Ninhydrin staining

สารอาหารประเภทกรดอะมิโนเป็นสารที่ไม่มีสีและบางชนิดไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธี TLC densitometry จึงต้องทำปฏิกิริยากับสาร Ninhydrin reagent ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนในกรดอะมิโน [5] แล้วเกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีสี โดยการนำแผ่น TLC ที่ผ่านวัฏภาคเคลื่อนที่แล้วมาจุ่มในสารละลาย Ninhydrin จากนั้นทำแห้งและนำไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 °C เป็นเวลา 5 นาทีจนสังเกตเห็นแถบสีของสารขึ้นบนแผ่น TLC จึงนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

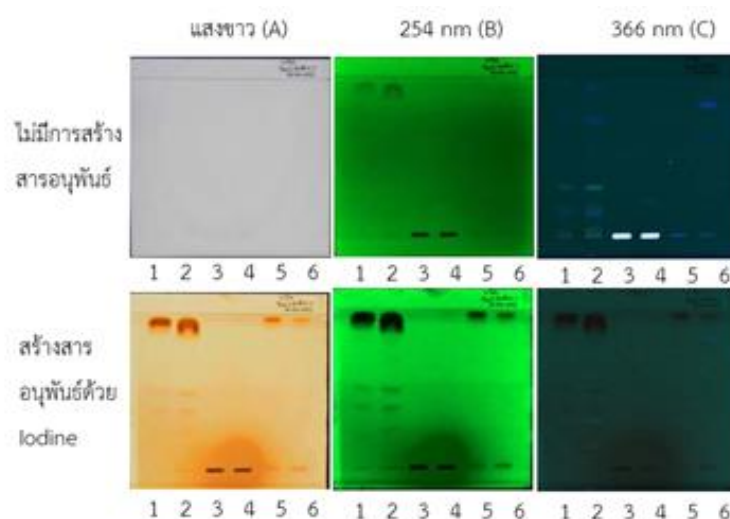
3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารอาหารประเภทไขมันจากอาหารตัวอย่าง

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารอาหารประเภทไขมันและน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ การใช้ chloroform เป็นตัวทำละลาย วัฏภาคหนึ่ง คือ silica gel 60F และวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ toluene: ethyl acetate ในอัตราส่วน 85:15 ทำการสร้างอนุพันธ์ที่มีสีด้วยการทำปฏิกิริยากับไอระเหยของไอโอดีนและตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพการแยกสารอาหารด้วยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 254 nm แสดงในรูปที่ 1 เนื่องจากสารตัวอย่างเป็นสารผสมระหว่างน้ำมันหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร บางชนิดมีขั้วน้อยหรือไม่มีขั้วจึงสามารถละลายได้ดีใน chloroform ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเช่นกัน เมื่อนำไปแยกบนแผ่น TLC ชนิด silicagel 60F ซึ่งเป็นวัฏภาคหนึ่งที่มีขั้ว จึงสามารถจับกับหมู่เคมีบางหมู่ที่มีขั้วภายในโมเลกุล

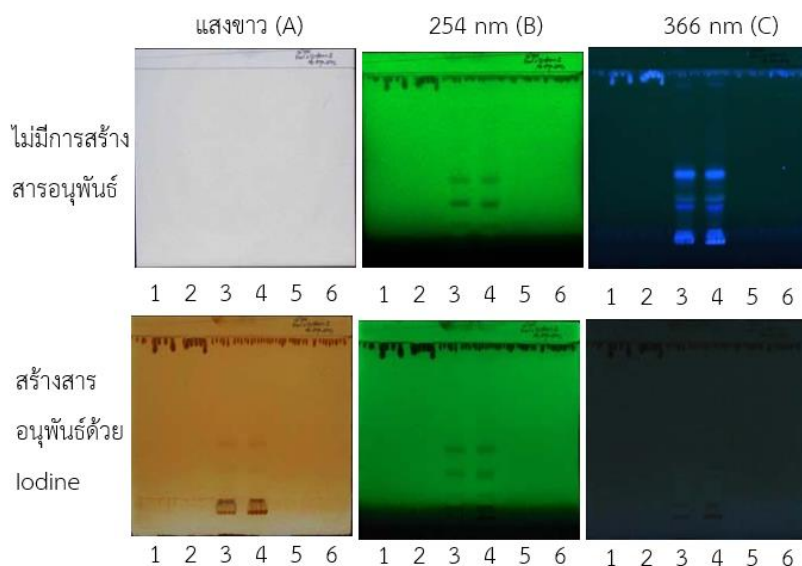
สารตัวอย่างบางชนิดไว้ได้ [6] และปรากฏเป็นแถบสีขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับไอระเหยของ Iodine ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 254 nm ในขณะที่การวิเคราะห์โดยใช้แผ่น TLC Reverse phase RP-C18 [7] ไม่สามารถแยกสารอาหารกลุ่มไขมันได้เนื่องจากไม่มีการยึดเกาะของโมเลกุลของสารสารกับวัฏภาคนี้ ทำให้เกิดการ smear ในระหว่างการผ่านวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นแผ่น TLC Reverse phase RP- C18 จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารอาหารกลุ่มไขมัน

3.2 การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารอาหารกลุ่มที่มีขั้ว (Polar compound) จากอาหารตัวอย่าง

สารอาหารกลุ่มที่มีขั้ว เช่น น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ภายในโมเลกุลประกอบด้วยหมู่ hydroxyl (OH) ซึ่งมีสภาพความเป็นขั้ว ดังนั้นจึงต้องใช้สถานะในการแยกสารที่เป็นขั้วเช่นเดียวกัน จากการทดลองพบว่าสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารอาหารกลุ่มที่มีขั้ว ได้แก่ การใช้ น้ำกลั่น หรือ formic acid เป็นตัวทำละลาย โดยมีวัฏภาคหนึ่งคือแผ่น TLC ชนิด silica gel 60F และวัฏภาคเคลื่อนที่คือ ethyl acetate: formic acid: acetic acid: dH₂O ในอัตราส่วน 100:11:11:26 ตรวจวิเคราะห์การแยกด้วยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 366 nm แสดงในรูปที่ 2 สารอาหารกลุ่มที่มีขั้วในอาหารตัวอย่างสามารถจับกับ silica gel บนแผ่นวัฏภาคหนึ่งได้ เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ hydroxyl โดยในการแยก สารที่มีขั้วมากจะเคลื่อนที่ได้น้อยบนวัฏภาคหนึ่งเนื่องจากพันธะไฮโดรเจนมีความแรง จึงสังเกตเห็นแถบลำดับอยู่ทางด้านล่างของแผ่น TLC ในขณะที่สารอาหารที่มีขั้วที่มีสภาพความเป็นขั้นน้อยกว่าจะสามารถเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ไปได้ไกลกว่า โดยจะสามารถสังเกตเห็นแถบที่มีการเรืองแสงเนื่องจากการกระตุ้นโดยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่การสร้างสารอนุพันธ์โดยไอระเหยของ Iodine จะให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่ชัดเจนเท่าที่ควร เนื่องจากอาจเกิดการดับ (Quenching) ของหมู่เคมีที่ทำให้เกิดการเรืองแสงโดย Iodine [8]



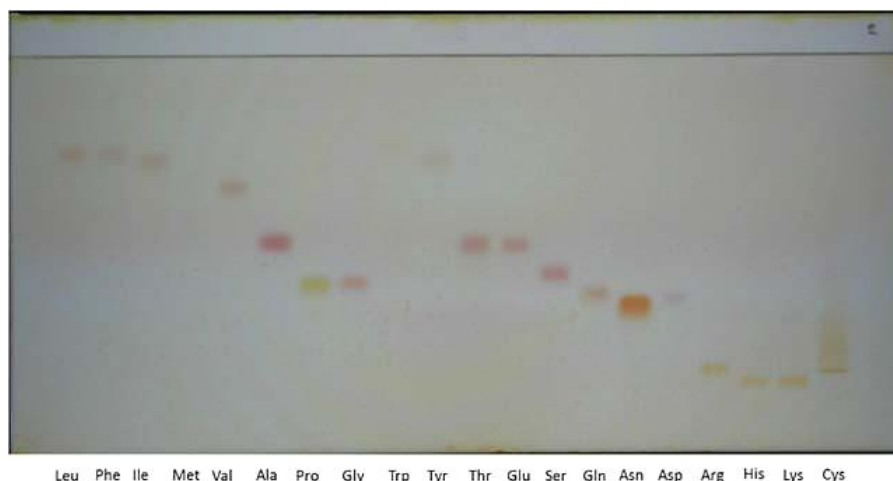
รูปที่ 1 การแยกสารอาหารประเภทไขมันและน้ำมันหอมระเหยในอาหารตัวอย่าง แสดงเปรียบเทียบระหว่างแผ่น TLC ที่ไม่ผ่านและผ่านการสร้างสารอนุพันธ์โดยไอโอไดน ตรวจวิเคราะห์โดยการถ่ายภาพจาก แสงขาว (A) แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (B) และแสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm (C) ตามลำดับ แถบ 1 และ 2 คือส่วนใสของตัวอย่างอาหารที่ละลายใน chloroform (ปริมาณ 2 และ 5 µl ตามลำดับ) แถบ 3 คือส่วนตะกอนของอาหารที่ละลายในน้ำกลั่น แถบ 4 คือส่วนตะกอนใน formic acid แถบ 5 คือส่วนตะกอนใน ethanol และ แถบ 6 คือส่วนตะกอนใน acetone



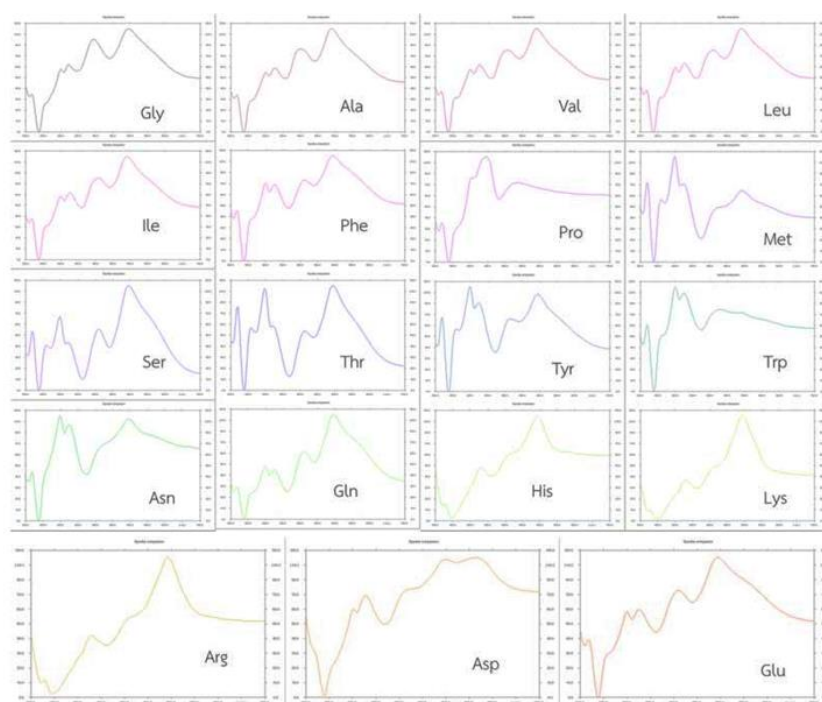
รูปที่ 2 การแยกสารอาหารกลุ่มที่มีไขมันในอาหารตัวอย่าง แสดงเปรียบเทียบระหว่างแผ่น TLC ที่ไม่ผ่านและผ่านการสร้างสารอนุพันธ์ด้วยไอโอดีน ตรวจวิเคราะห์โดยการถ่ายภาพจากแสงขาว (A) แสงที่ความยาวคลื่น 254 nm (B) และแสงที่ความยาวคลื่น 366 nm (C) ตามลำดับ แถบ 1 และ 2 คือส่วนใสของตัวอย่างอาหารที่ละลายใน chloroform (ปริมาณ 2 และ 5 μL ตามลำดับ) แถบ 3 คือส่วนตะกอนของอาหารที่ละลายในน้ำกลั่น แถบ 4 คือส่วนตะกอนใน formic acid แถบ 5 คือส่วนตะกอนใน ethanol และ แถบ 6 คือส่วนตะกอนใน acetone

3.3 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกกรดอะมิโน (amino acids)

การแยกของกรดอะมิโนบนแผ่น TLC มีหลักการเช่นเดียวกับสารที่มีไขมัน โดยกรดอะมิโนที่มีไขมันมาก เช่น Lysine และ Arginine จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่ากรดอะมิโนที่มีไขมันน้อย เช่น Phenylalanine และ Tryptophan จะเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ได้มากกว่า (รูปที่ 3) โดยสภาวะที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การแยกที่ชัดเจนที่สุดคือแผ่น TLC ที่ผ่านวัฏภาคเคลื่อนที่และสร้างสารอนุพันธ์กับสาร Ninhydrin ซึ่งเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ amine ในกรดอะมิโนเมื่อถูกทำให้ร้อน จะเกิดเป็นสารสีม่วงหรือสีฟ้า [5] และใช้เทคนิค TLC densitometry ในการวิเคราะห์ absorption spectrum ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดโดยการสแกนที่ความยาวคลื่นแสงตั้งแต่ 200-700 nm ซึ่งพบว่า absorption spectrum ของแต่ละกรดอะมิโนมีลักษณะแตกต่างกัน ไปในแต่ละชนิด แต่มีลักษณะที่คล้ายกันตามสภาพความมีไขมัน (รูปที่ 4) นอกจากนี้ การวิเคราะห์ค่า R_f โดยการสแกนที่ความยาวคลื่น 408 nm พบว่าสามารถแยกชนิดกรดอะมิโนออกจากกันได้ เนื่องจากมีค่า R_f ที่แตกต่างกัน แสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 3 การแยกกรดอะมิโนมาตรฐานทั้ง 20 ชนิด โดยใช้ TLC silica gel 60F เป็น วัสดุภาคนิ่ง และวัสดุภาคเคลื่อนที่ คือ n-butanol : acetic acid : water : methanol ในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 : 1 และทำปฏิกิริยากับ Ninhydrin Solution



รูปที่ 4 Absorption spectrum ของกรดอะมิโนมาตรฐาน (standard amino acids) จำนวน 19 ชนิด โดยการสแกนที่ความยาวคลื่น 200 – 700 nm

ตารางที่ 1 ค่า Retention Factor (Rf) ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดจากการสแกนที่ความยาว คลื่น 408 nm

Amino acids	G	A	V	L	I	F	P	M	S	T	Y	W	C	N	Q	H	K	R	D	E
Rf	0.37	0.47	0.62	0.72	0.7	0.72	0.36	0.66	0.39	0.46	0.7	0.74	0.1	0.3	0.33	0.08	0.07	0.12	0.31	0.46

4. สรุปผลการทดลอง

สารอาหารกลุ่มไขมันมีสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์คือการใช้ chloroform เป็นตัวทำละลาย วัฏภาคหนึ่ง คือ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60F และ วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ toluene: ethyl acetate ในอัตราส่วน 85:15 และสร้างสารอนุพันธ์ด้วยไอโอดีน วิเคราะห์ด้วยแสงความยาวคลื่น 254 nm สภาวะที่เหมาะสมของ สารอาหารที่มีขั้ว คือการใช้ น้ำกลั่นหรือ formic acid เป็นตัวทำละลายโดยมีวัฏภาคหนึ่งคือ silica gel 60F และวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ ethyl acetate: formic: acetic acid: dH₂O ในอัตราส่วน 100:11:11:26 วิเคราะห์ด้วยการถ่ายภาพที่แสงความยาวคลื่น 366 nm การวิเคราะห์กรดอะมิโนมาตรฐานพบว่าสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ วัฏภาคหนึ่งคือ silica gel 60F และวัฏภาคเคลื่อนที่คือ n-butanol : acetic acid : water : methanol ในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 : 1 ตรวจวิเคราะห์ด้วยการทำปฏิกิริยากับสาร Ninhydrin และถ่ายภาพโดยใช้แสงขาว นอกจากนี้ จาก TLC densitometry พบว่าหากเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มที่มีสภาพขั้วแบบเดียวกันจะมี absorption spectrum ที่คล้ายคลึงกันแต่จะมีค่า R_f ที่ไม่เท่ากัน ซึ่งแสดงว่าระบบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้แยกชนิดกรดอะมิโนได้ค่อนข้างจำเพาะ โดยหน่วยงานต่าง ๆ เช่น สถาบันอาหารหรือสถาบันวิจัย อาจนำระบบที่พัฒนาขึ้นนี้ไปประยุกต์เพื่อวิเคราะห์สารอาหารประเภทน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในสมุนไพรซึ่งเป็นส่วนประกอบในเครื่องแกงไทย หรือการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซึ่งเป็นสารที่มีขั้วในอาหารหวานทั้งไทยและฝรั่ง รวมถึงการตรวจวิเคราะห์กรดอะมิโนประเภทต่าง ๆ ในอาหารไทยเพื่อใช้เป็นข้อมูลทางโภชนาการสำหรับการควบคุมคุณภาพของอาหารต่อไปได้

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2558 เลขที่โครงการ Social 012/2558

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Krisha Veni, N., Kartika, D., Surya, Devi M., Rubini, MF., Vishalini, M., and Pradeepa, YJ. (2010). Analysis of monosodium l glutamate in food products by high performance thin layer chromatography. J Young Pharm, 2(3), 297-300. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.66795>
- [2] Melock, GE., Meyer, S., Zimmerman, BF. and Roussel, GM. (2014). High-performance thin-layer chromatography analysis of steviol glycosides in Stevia formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A, 1350, 102-111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.016>
- [3] Andradea, F., Guedesb, MIF., Vieirac, IGP., Francisca, Mendesc NP., Rodriguesd, PAS., Maiab, CSC., Ávilaa, MMM., Ribeiroe, LM. (2014). Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC. Food Chem, 157, 193-198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.100>

- [4] Vongchareonsathit, A. De-Eknamkul, W. (1998). Rapid TLC-densitometric analysis of Plaunotol from *Croton sublyratus* leaves. *Planta Med*, 64, 279-280. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957428>
- [5] Merck Millipore. (2016, January). Chemicals and reagents 2008–2010. http://www.merckmillipore.com/TH/en/20140402_111401
- [6] Huba, K. Mária, B. Klára L., V. (2020). Chapter 10 - Basis and pharmaceutical applications of thin-layer chromatography. *Handbook of Analytical Separations*. 8, 523-585.
- [7] Merck Millipore. (2016, January). RP-modified Silica Plates. <https://www.merckmillipore.com/AU/en/products/analytcs-sample-prep/chromatography-for-analysis/thin-layer-chromatography/tlc-plates-thin-layer-chromatography/rp-modified-silica-plates/rdmb.qB.ITwAAAFajvtkiQpx,nav>
- [8] Andriy, C. Tor, S. Jerker, W. (2010). Iodide as a Fluorescence Quencher and Promoter-Mechanisms and Possible Implications. *J. Phys. Chem. B.*, 114 (34), 11282-11291. <https://doi.org/10.1021/jp103837f>