

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชุดโครงการวิจัยเรื่อง

การวิเคราะห์และการตัดแปรทางเคมีเพื่อการเพิ่มมูลค่าผลผลิต
ทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตร
ของจังหวัดน่าน

ภายใต้

โครงการจัดการทรัพยากรเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืนของจังหวัดน่าน

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2548 – 2550

กรกฎาคม 2551

คณะผู้วิจัย

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ. ดร. พาสวดี ประทีปะเสน	หัวหน้าชุดโครงการและโครงการย่อยที่ 3
รศ. ดร. พันธิพา จันทวัฒน์	ผู้วิจัยโครงการย่อยที่ 2
อ. ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช	ผู้วิจัยโครงการย่อยที่ 2

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ. พรพรรณ อุดมกาญจนนันท์	หัวหน้าโครงการย่อยที่ 4
ผศ. ดร. สุชาดา อุอนุวัฒน์กุล	ผู้วิจัยโครงการย่อยที่ 4
ผศ. ดร. วรินทร์ ชวศิริ	หัวหน้าโครงการย่อยที่ 2
ผศ. น.ล.ศิริพัศตร์ ไชยันต์	หัวหน้าโครงการย่อยที่ 1 และผู้วิจัยโครงการย่อยที่ 3
ผศ. ดร. วัลภา เอื้องไมตรีภิมรณย์	ผู้วิจัยโครงการย่อยที่ 4
ผศ. ดร. เพ็ญฟ้า อุ่นอบ	ผู้วิจัยโครงการย่อยที่ 4
ผศ. ดร. อภิชาติ อิมยิ้ม	ผู้วิจัยโครงการย่อยที่ 4
อ. ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล	ผู้วิจัยโครงการย่อยที่ 1
อ. ดร. ลักษณา ตูบาส	ผู้วิจัยโครงการย่อยที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญโครงการย่อย

โครงการย่อยที่	เรื่อง	หน้า
1	การวิเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนในพืชเกษตรกรรมของจังหวัดน่าน	I
2	การศึกษาสมบัติเป็นสารกันเหี่ยวจากพืชท้องถิ่นของจังหวัดน่าน	II
3	การสกัดและการตัดแปรโปรตีนจากพืชเกษตรกรรมของจังหวัดน่านเพื่อการใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรม	III
4	การพัฒนาผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มจากวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่าน	IV



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการย่อยที่ 1

การวิเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนในพืชเกษตรกรรมของจังหวัดน่าน

Determination of Amino Acids and Protein Crop Plant from Nan Province



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การวิเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนในพืชเกษตรกรรมของจังหวัดน่าน” เป็นโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การวิเคราะห์และการตัดแปรทางเคมีเพื่อการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่าน” ซึ่งได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2548 และ 2550 เพื่อดำเนินการศึกษาวิจัยโครงการจัดการทรัพยากรเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืนของจังหวัดน่าน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ข
สารบัญ.....	ก
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญรูป.....	ฉ
1. บทที่ 1 การวิเคราะห์หากรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของจังหวัดน่าน	1
บทคัดย่อภาษาไทย.....	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	1
1.1 บทนำ.....	2
1.2 วิธีทดลอง.....	3
1.2.1 สารเคมี.....	3
1.2.2 การทำอนุพันธ์ของกรดอะมิโน.....	3
1.2.3 การศึกษาภาวะ HPLC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอะมิโน.....	3
1.3 ผลการทดลอง.....	4
1.3.1 การสำรวจผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่านเพื่อเลือกผลิตภัณฑ์เกษตรที่เป็นแหล่ง โปรตีน คุณภาพเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบ.....	4
1.3.2 การวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยเทคนิค Pre-column derivatization RPLC.....	6
1.3.3 การสกัดและเตรียมตัวอย่างโปรตีนเป็นกรดอะมิโนอิสระที่เหมาะสม.....	8
1.4 เอกสารอ้างอิง.....	9
2. บทที่ 2 การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเทคนิคการทำอนุพันธ์ก่อนเข้าคอลัมน์ HPLC ด้วย 6- aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)	10
บทคัดย่อภาษาไทย.....	10
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	10
2.1 บทนำ.....	11
2.2 วิธีทดลอง.....	11
2.2.1 สารเคมี.....	11
2.2.2 การทำอนุพันธ์ของกรดอะมิโน.....	12
2.2.3 การทดลอง.....	12
2.3 ผลการทดลอง.....	14

สารบัญ (ต่อ)

2.3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอะมิโน โดยเทคนิค pre-column derivatization RPLC ด้วย 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC).....	14
2.3.2 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (MDL) และขีดจำกัดต่ำสุด ในการหาปริมาณ (MQL) ของวิธีวิเคราะห์.....	16
2.3.3 กราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิด.....	17
2.3.4 การศึกษาความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์.....	17
2.3.5 การศึกษาวิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่างประเภทโปรตีนโดยการทำให้โครไลซิสด้วยกรด.....	18
2.4 สรุปผลการทดลอง.....	20
2.5 เอกสารอ้างอิง.....	20
3. บทที่ 3 การย่อยสลายโปรตีนโดยการไฮโดรไลซิสด้วยกรดแบบไมโครเวฟ	21
บทคัดย่อภาษาไทย.....	21
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	21
3.1 บทนำ.....	22
3.2 วิธีทดลอง.....	23
3.2.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีนเพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโน ด้วยการไฮโดรไลซิสแบบสุญญากาศ.....	23
3.2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีนเพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโน ด้วยการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ.....	23
3.3 ผลการทดลอง.....	24
3.3.1 การศึกษาความเข้มข้นของกรดในการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ.....	24
3.3.2 การศึกษาความแรงของคลื่นไมโครเวฟในการไฮโดรไลซิส.....	25
3.3.3 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนเพื่อการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยการไฮโดรไลซิส แบบสุญญากาศกับแบบไมโครเวฟ.....	30
3.4 สรุปผลการทดลอง.....	31
3.5 เอกสารอ้างอิง.....	31
ประวัติผู้วิจัย	32

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	การเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC.....	7
1-2	องค์ประกอบทางเคมีของถั่วมะแฮะแบบแกะเปลือกและไม่แกะเปลือก.....	8
2-1	การเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ด้วย RPLC.....	14
2-2	ผลการแยกของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด.....	15
2-3	ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (MDL) และขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณ (MQL) กรดอะมิโน 17 ชนิด โดยเทคนิค pre-column derivatization RPLC.....	16
2-4	สมการและค่า R ² ของกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิด ในช่วงความเข้มข้น 10-150 pmol/μL.....	17
2-5	ปริมาณกรดอะมิโนและเปอร์เซ็นต์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด ที่ความเข้มข้น 20 pmol/μL และ 140 pmol/μL.....	18
3-1	ชนิดของสารละลายกรดและภาวะการย่อยที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนโดยการไฮโดรไลซิส.....	22
3-2	ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมินจากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีไฮโดรไลซิส ด้วยกรดแบบสุญญากาศและไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วยกรดไฮโดรคลอริก และกรดมีเทนซัลโฟนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	24
3-3	ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมินจากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีไฮโดรไลซิส แบบไฮโดรไลซิสกับแบบไมโครเวฟด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8 M ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700 W 10 นาที.....	30

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1-1	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด ความเข้มข้น 100 pmol/ μ L	8
2-1	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด ความเข้มข้น 100 pmol/ μ L	15
2-2	โครมาโทแกรมของกรดอะมิโนในโปรตีนที่สกัดจากถั่วมะแฮะ.....	19
3-1	ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน (mg/100 g) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ ด้วย 8M HCl (ก) 500 W (ข) 700 W และ (ค) 900 W ที่เวลา 4, 7 และ 10 นาที.....	26
3-2	ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน (mg/100 g) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ ด้วย 8M HCl ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 500W 10 นาที, 700W 10 นาที และ 900W 7 นาที...	27
3-3	3-3 ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน (mg/100 g) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ ด้วย 8M MSA ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ (ก) 500W (ข) 700W และ (ค) 900W ที่เวลา 4, 7 และ 10 นาที.....	28
3-4	ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน (mg/100 g) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ 8M MSA ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 500W 10 นาที, 700W 10 นาที และ 900W 4 นาที.....	29
3-5	ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน (mg/100 g) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ ด้วย 8M MSA ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700W 10 นาที และ 8M MSA ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W 4 นาที.....	29

บทที่ 1 การวิเคราะห์หากรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของจังหวัดน่าน

ผศ.ม.ล.ศิริพัทธ์ ไซยันต์ ดร.พุทธรักษา วรานุศฎากุล ดร.ลักษณา คูบาส
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของจังหวัดน่านที่จะนำไปสู่การพัฒนาคุณค่าทางโภชนาการอันส่งผลให้มีการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรม โดยพบว่าถั่วมะแฮะ (*Cajanus cajan* Millsp.) เป็นพืชที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีการปลูกกันมากในจังหวัดน่าน และมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 22.3% ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการนำมาผลิตมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนคุณภาพสูงและมีราคาถูก นอกจากนี้ในงานวิจัยได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในถั่วมะแฮะ ซึ่งวิธีการวิเคราะห์จะเริ่มจากการสกัดแยกโปรตีนจากถั่วมะแฮะ จากนั้นทำการย่อยสลายโปรตีนถั่วมะแฮะที่สกัดได้ให้อยู่ในรูปกรดอะมิโนอิสระ จากนั้นนำกรดอะมิโนที่ผ่านการย่อยสลายแล้วมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค pre-column derivatization high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ระบบเกรเดียนต์ของสารละลายผสมระหว่างอะซิเตต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์, อะซิโตนไครล์และน้ำ

Determination of Amino Acids in Agricultural Products from Nan Province

Siripastr Jayanta, Puttaruksa Varanusupakul, Luxsana Dubas

Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

In this study, the agricultural products from Nan province were evaluated as a potential nutrition source for food industry. The results of the survey was aimed to pigeon pea which was the native crops and widely grown in Nan province. The protein content was approximately 22.3% which shown a capability of pigeon peas for modification as a high quality and cheap protein product. Moreover, the qualitative and quantitative methods for determination of amino acids profile were studied. The pigeon peas, firstly, were extracted and then acid hydrolysis to liberate the amino acids of extracted protein. The hydrolyzed amino acids were then analyzed using pre-column derivatization HPLC with the gradient mode of acetate-phosphate buffer, acetonitrile and water as mobile phase.

1.1 บทนำ

น่านเป็นจังหวัดที่มีพืชผลทางการเกษตรหลากหลายชนิด โดยมีพืชเศรษฐกิจหลากหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง นอกจากพืชเศรษฐกิจแล้วจังหวัดน่านยังมีพืชไร่ไม้ผลและพืชผักอื่นๆ ที่เป็นเอกลักษณ์ของจังหวัด เช่น มะไฟจีน สาหร่ายโก เกาลัดน่าน เป็นต้น จากนโยบายเร่งด่วนของรัฐบาลที่จะเสริมสร้างความเข้มแข็งของชุมชนและเศรษฐกิจ ระดับรากหญ้า การเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรของจังหวัดน่านจึงเป็นแนวทางที่สำคัญในการเพิ่มรายได้ของประชากรในจังหวัดน่านซึ่งมีอาชีพทำเกษตรกรรมเป็นส่วนใหญ่

ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีโปรตีนเป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาและพัฒนาให้มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากขึ้น เนื่องจากโปรตีนเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์และสัตว์ คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน โดยเฉพาะสัดส่วนและปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการสำรวจผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของจังหวัดน่านที่มีปริมาณโปรตีนสูงและเหมาะสมในการแปรรูปเป็นอาหารเสริมของสัตว์นั้นเป็นสิ่งที่มีความจำเป็น

การวิเคราะห์กรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นขั้นตอนที่สำคัญสำหรับการทราบคุณภาพของโปรตีน และผลิตภัณฑ์นั้นๆ ซึ่งจะประกอบไปด้วยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหรือการย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ การแยก และการตรวจวัดที่เหมาะสมกับชนิดของกรดอะมิโน ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างซึ่งเป็นการสลายพันธะ เปปไทด์ในโปรตีนนั้น ภาวะที่ใช้ต้องสามารถย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ แต่ต้องไม่ทำลายกรดอะมิโน อิสระเหล่านี้ด้วย เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ ที่ถูกต้องที่สุด วิธีการย่อยโปรตีนที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบันคือ การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 M ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะสุญญากาศ โดยสามารถทำการทดลองได้ทั้งในสภาวะที่เป็นสารละลายหรือที่เป็นไอ ซึ่งกรดอะมิโนชนิด Tryptophan จะถูกทำลายทั้งหมดส่วนกรดอะมิโน Asparagine และ Glutamine จะเปลี่ยนเป็น Aspartic acid และ Glutamic acid ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำหรับวิธีการไฮโดรไลซิสด้วยวิธีนี้ นอกจากนั้นการเตรียมตัวอย่างอาจทำได้โดยใช้ เอนไซม์ สารละลายเบส การใช้กรดชนิดอื่นหรือการใช้กรดไฮโดรคลอริกควบคู่กับเทคนิคอื่น ๆ เช่น การย่อยด้วยไมโครเวฟ เป็นต้น

วิธีการวิเคราะห์และตรวจสอบคุณภาพเพื่อบ่งชี้ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนนั้นทำได้หลายวิธีโดยการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของกรดอะมิโนจำเป็นในโปรตีนนั้นๆ [1] เช่น วิธี Kjeldahl [2] วิธีทางสเปกโตรสโคปี [3] และวิธีทางโครมาโทกราฟี [4,5] ปัจจุบันเทคนิคทางโครมาโทกราฟีเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเนื่องจากเป็นวิธีการวิเคราะห์ขั้นสูงที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ รวดเร็ว มีความเที่ยงสูง และเหมาะต่อการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยในเมทริกซ์ที่ซับซ้อน เช่น อาหาร เป็นต้น [6,7]

การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเทคนิค RPLC ที่มี UV spectrophotometer เป็นตัวตรวจวัดเป็นวิธีที่ได้รับความนิยม แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญคือกรดอะมิโน ส่วนใหญ่สามารถดูดกลืนรังสีช่วงยูวีที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่มีการแทรกซ้อนจากสารหลายชนิด โดยเฉพาะตัวทำละลาย และไม่สามารถดูดกลืนช่วงวิซิเบิลได้ ดังนั้น ในการวิเคราะห์จึงนิยมเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นอนุพันธ์ใหม่ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยความยาวคลื่นอื่น ซึ่งมีความแม่นยำและความถูกต้องที่ดีกว่า โดยทั่วไปจะทำ อนุพันธ์ใหม่โดยเติมวงแหวนเบนซีนเข้าไปในกรดอะมิโนเดิม กลายเป็นอนุพันธ์ใหม่ที่สามารถตรวจวัดได้โดยเครื่อง ตรวจวัดแบบอูลตราไวโอเล็ต แบบเรืองแสงหรือแบบไฟฟ้า

ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ผู้วิจัยมุ่งที่จะคัดเลือกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของจังหวัดน่านที่มีโปรตีนสูง โดยในขั้นตอนการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนเพื่อให้ได้กรดอะมิโนอิสระ ผู้วิจัยจะเลือกใช้ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ในสภาวะสารละลายภายใต้สุญญากาศ และวิเคราะห์กรดอะมิโนเหล่านั้นด้วยเทคนิค pre-column derivatized RPLC

1.2 วิธีทดลอง

1.2.1 สารเคมี

1. สารก่ออนุพันธ์ 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)
2. สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน (Waters, Ireland)

ประกอบด้วยกรดอะมิโน 17 ชนิด ได้แก่ Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Tyrosine, Valine, Methionine, Lysine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine ที่มีความเข้มข้น 2.5 mM และ Cysteine ที่มีความเข้มข้น 1.25 mM

3. สารละลายเฟสเคลื่อนที่

ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ 3 ชนิด ในระบบ gradient elution คือ น้ำที่ผ่านระบบการ ทำน้ำให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ Milli-Q Gradient (Milli-Q water) อะซิโตนไฮล HPLC grade (Merk KgaA, Darmstadt, Germany) และ สารละลายบัฟเฟอร์ของอะซิเตต-ฟอสเฟต เตรียมโดยนำ Waters AccQ Eluent A concentrated (อะซิเตต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์, Waters) มาเจือจางด้วยน้ำ Milli-Q 10 เท่า)

หมายเหตุ ก่อนนำสารละลายเฟสเคลื่อนที่ทั้ง 3 ชนิดไปใช้ ต้องนำไปกรองด้วยชุดเครื่องกรองเฟสเคลื่อนที่ ผ่าน filter membrane ขนาด 0.45 μm

1.2.2 การทำอนุพันธ์ของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนทุกชนิดจะผ่านการทำอนุพันธ์ก่อนฉีดเข้าสู่คอลัมน์ โดยเปิดสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 10 μL และ Borate Buffer 70 μL ใส่ใน sample tube นำไปเขย่า เติมสารก่ออนุพันธ์ 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) 20 μL แล้วนำไปเขย่าอีกครั้ง นำสารละลายที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 55°C นาน 10 นาที กรองสารละลายอนุพันธ์ของกรดอะมิโน ที่ได้ผ่าน Syringe Filter Nylon ขนาด 0.45 μm ก่อนนำไปวิเคราะห์ ด้วย HPLC

1.2.3 การศึกษาภาวะ HPLC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอะมิโน

ทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนจำนวน 17 ชนิด ได้แก่ Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Tyrosine, Valine, Methionine, Lysine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine และ Cysteine ในสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน

ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนทำการพัฒนาจากภาวะ HPLC ที่ได้พัฒนามาสำหรับสารก่ออนุพันธ์ AQC จาก Waters ซึ่งจะทำการศึกษาในสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน (Waters, Ireland) ความเข้มข้น 100 pmol/ μL (ยกเว้น Cysteine มีความเข้มข้น 50 pmol/ μL)

ภาวะในการวิเคราะห์อนุพันธ์ของกรดอะมิโนด้วย HPLC

- Analytical column : Reversed phase C18, 4 μm , 3.9 x 150 mm
- Temperature : อุณหภูมิห้อง
- Detector : UV-VIS, Photo Diode Array (PDA) ที่ความยาวคลื่น 254 nm
- Injection volume : 5 μL
- Mobile phase : Acetate-Phosphate Buffer pH 5.02
: Acetonitrile
: H₂O
- Flow rate : 1 mL/min

โดยจะทำการปรับอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์และลักษณะ gradient curve เพื่อให้ได้การแยกที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ทั้งในแง่ของเวลาที่ใช้ ความจำเพาะเจาะจง และ resolution

1.3 ผลการทดลอง

1.3.1 การสำรวจผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่านเพื่อเลือกผลิตภัณฑ์เกษตรที่เป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบ

จากการสำรวจพื้นที่เกษตรกรรมและผลิตภัณฑ์การเกษตรของของจังหวัดน่านในพื้นที่อำเภอเมือง อำเภอเวียงสา อำเภอนาน้อย อำเภอนาหมื่น อำเภอท่าวังผา อำเภอบัว อำเภอบ่อเกลือ อำเภอแม่จริม อำเภอเฉลิมพระเกียรติ และอำเภอสันติสุข พบว่าน่านมีพื้นที่เขียวจี มีภูเขาขนาดเล็กใหญ่โดยทั่วไป ประชากรส่วนใหญ่ของจังหวัดทำ การเกษตรโดยมีจำนวนครัวเรือนเกษตรทั้งหมด 103,299 ครัวเรือน หรือคิดเป็นร้อยละ 79.4 ของครัวเรือนทั้งหมด (ข้อมูลจากสำนักงานเกษตรจังหวัดน่าน มกราคม 2546) น่านมีปัญหาความอุดมสมบูรณ์ของดินค่อนข้างต่ำและมีน้ำแช่ขังในฤดูฝนสำหรับพื้นที่เกษตรในที่ลุ่ม ขณะที่ที่ดอนมีความลาดชันสูงจะมีปัญหาการสูญเสียน้ำดิน ดินตื้นและมีหินปะปน พืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันโดยทั่วไปคือ ข้าว ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง ข้าวสาลีข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง อ้อย ฝ้าย ละหุ่ง ยาสูบ งาม กาแฟอาราบิก้า ลิ้นจี่ ลำไย มะม่วง มะขาม นุ่น หน่อไม้ไผ่ตง มันฝรั่ง กระเทียม และหญ้า เลี้ยงสัตว์ นอกจากนี้พืชเศรษฐกิจเหล่านี้แล้วยังพบ พืชไร่ ไม้ผล และพืชผักอื่นๆ ที่เป็นเอกลักษณ์ของจังหวัด เช่น มะเดื่อภูเขา มะไฟจีน สาหร่ายไถ เกาลัดน่าน มะแข่น มะเกี้ยง เห็ดเผาะ ตำว หวายฝาด หวายขมเป็นต้น และยังมีผลผลิตจากการปลูกพืชปุ๋ยสดที่รัฐบาลส่งเสริมให้ปลูกคลุมหน้าดินและช่วยเพิ่มความสมบูรณ์ให้แก่ดินระหว่างฤดูการเพาะปลูกเช่น โสนอัฟริกัน ถั่วพุ่ม ถั่วพรี ถั่วมะฮะ ถั่วนิ้วนางแดง ปอเทือง เป็นต้น จะเห็นได้ว่าน่านเป็นแหล่งเกษตรกรรมที่สำคัญ มีความหลากหลายของผลิตผลเกษตรสูง โดยพืชผลที่มีขายทั่วไปในตลาดสดและเป็นที่ยอมรับของประชาชน ได้แก่

I. เกาลัดน่าน (*Sterculia nobilis* Smith วงศ์ Sterculiaceae)

เกาลัดน่านหรือที่ชาวจีนเรียกว่า เท็งท้อ นั้นต่างจากเกาลัดจีน (*Castanea mollissime* BL. วงศ์ Fagaceae) โดยสันนิษฐานว่ามีผู้นำเข้ามาปลูกที่จังหวัดน่านเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 80 ปีมาแล้ว เกาลัดน่านเป็นไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบ สูงประมาณ 5-10 เมตร ผลมีลักษณะเป็นฝักหนาแน่น รูปร่างยาวรีมีเปลือกสีเขียว ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อสุกและแตกออก ภายในมีเมล็ดสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ซึ่งคือเมล็ดเกาลัดที่จำหน่ายกันทั่วไปในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน ชาวน่านจะนำเมล็ดไปต้มในน้ำเกลือหรือหนึ่งจนสุก ลอกเปลือกสีน้ำตาลเข้มออกและรับประทานเนื้อสีเหลืองคล้ายไข่แดงต้มสุกและมีรสชาติหวานมัน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการทดลองนำเกาลัดน่านมาแปรรูปเป็น เกาลัดในน้ำเชื่อม เกาลัดในน้ำขิง อีกด้วย เกาลัดน่านเป็นไม้ผลปลูกง่าย แข็งแรง และไม่มีแมลงรบกวน ขยายพันธุ์ได้ง่ายโดยการตอนกิ่งหรือเพาะจากเมล็ด ทำให้มีความน่าสนใจที่จะส่งเสริมให้เป็นพืชเศรษฐกิจของจังหวัดต่อไป

II. สาหร่ายไถ (*Cladophora glomerata* Kützting)

สาหร่ายไถ (*Cladophora algae*) เป็นสาหร่ายที่พบมากในลำน้ำน่าน ตั้งแต่ต้นน้ำ ณ อำเภอทุ่งช้าง จนถึงปลายน้ำที่อำเภอเวียงสา ในฤดูน้ำหลากประมาณปลายเดือนตุลาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ สาหร่ายไถเป็นอาหารพื้นบ้านที่สืบทอดกันมากกว่า 800 ปี ใช้ปรุงอาหารพื้นบ้านหลายชนิดเช่น ถั่วไก แอปไก ยาไก ไกยี่ ชาวบ้านเชื่อว่าการบริโภคไกทำให้ผอมคดดำ จากผลการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่า สาหร่ายไถมีโปรตีนคุณภาพสูงมากถึงร้อยละ 19.44 ซึ่งใกล้เคียงกับโปรตีนจากเนื้อสัตว์ สาหร่ายไถยังให้แคโรทีนสูงกว่าแครอทถึง 4 เท่าโดยน้ำหนัก และยังประกอบด้วยเส้นใยอาหาร แคโรทีน เหล็ก แมกนีเซียม วิตามินอี และแซนโทฟิล ในปริมาณสูง จะเห็นได้ว่าสาหร่ายไถเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นที่มีศักยภาพในการพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารต้นแบบที่มีคุณค่าทางอาหารสูงได้ดี

III. มะไฟจีน (*Clausena laniym* Skeel)

มะไฟจีน (wampee) เป็นพืชในตระกูลส้ม (*Rutaceae*) มีถิ่นกำเนิดทางตอนใต้ของจีนและอินโดจีน สันนิษฐานว่าชาวจีนได้นำเมล็ดมะไฟจีนมาปลูกที่น่านเมื่อประมาณ 80 ปีมาแล้วและในปัจจุบันพบอยู่ทั่วไปในจังหวัด

น่านโดยเฉพาะบริเวณริมฝั่งแม่น้ำน่าน มะไฟจีนเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ ดอกมีกลิ่นหอมอ่อนๆคล้ายกลิ่นดอกส้ม ผลมีลักษณะกลมหรือรี เมื่อสุกจะมีสีเหลือง ลักษณะผลสุกและเนื้อภายในคล้ายกลางสาต เปลือกกรอบและเนื้อมีรสหวานและมีสรรพคุณทางยา ชาวบ้านใช้รักษาโรคกระเพาะ แก้อืด ท้องอืด หลอดลมอักเสบ ช่วยให้เจริญอาหาร ใบมีฤทธิ์แก้รังแค ชาวบ้านจะบริโภคลูกมะไฟสุกทั้งเปลือก และมีการแปรรูปมะไฟจีนเป็นผลิตภัณฑ์เช่น มะไฟจีนเชื่อมแห้ง แยมมะไฟจีน มะไฟจีนสามรส น้ำมะไฟจีน เป็นต้น

IV. มะเดื่อภูเขา (*Ficus auriculata* Lour.)

มะเดื่อภูเขาหรือมะเดื่อหว่านเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ พบชุกชุมในป่าเบญจพรรณที่ระดับความสูง 350-1500 เมตร ผลขึ้นอยู่ตามลำต้น มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมรี คล้ายหยดน้ำกันแป้น ผลที่โตเต็มที่มิขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-12 เซนติเมตร ผลดิบมีสีเขียวซึ่งจะกลายเป็นสีแดงเมื่อสุก พบได้ตลอดปีแต่ให้ผลตกเป็นพิเศษในช่วงเดือนเมษายนถึงกรกฎาคม และ พฤษจิกายนถึงมีนาคม ผลผลิตต่อต้น 50-200 กิโลกรัมต่อปี ชาวบ้านนิยมรับประทานผลดิบโดยนำไปต้มหรือแกง คณะวิชาเทคโนโลยีทางอาหารสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตน่าน ได้ทดลองนำผลดิบของเค็ม และผลสุกแช่อิ่มอบแห้ง ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการเบื้องต้นพบว่ามะเดื่อภูเขามีปริมาณแคลเซียมสูงเท่าเทียม น้ำมันโคสดและผักโขม นอกจากนั้นยังมีเหล็กในปริมาณสูงด้วย ธาตุอาหารอื่น ๆ ที่พบอย่างมีนัยสำคัญคือ โปรตีน เส้นใยอาหาร โปแตสเซียม ฟอสฟอรัส และเบต้าแคโรทีน ผลการสำรวจเบื้องต้นพบว่ามะเดื่อภูเขาเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และเนื่องจากเป็นไม้ยืนต้นที่เกิดขึ้นเองในป่าเบญจพรรณทำให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีและมีปริมาณมากต่อต้น จึงสมควรดำเนินการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าจากมะเดื่อภูเขาต่อไป

V. ถั่วมะแฮะ (*Cajanus canja* (L) Millsp. วงศ์ Leguminosae)

ถั่วมะแฮะ (*Pigeonpea*, *Kadios*) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก กำเนิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ มีปลูกมากในประเทศอินเดีย แอฟริกาตะวันออก แคริบเบียน สถานีพัฒนาที่ดินน่านได้นำถั่วมะแฮะมาทดลองใช้ในการปรับปรุงผิวดิน โดยเฉพาะในเขตอำเภอเอราวัณและอำเภอเฉลิมพระเกียรติซึ่งมีสภาพพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นภูเขา ประชากรในเขตนี้เดิมใช้วิธีทำไร่แบบเลื่อนลอย โดยจะปล่อยผิวดินหลังการเก็บเกี่ยวไว้นาน 4-5 ปี ก่อนที่จะวกกลับมาทำไร่ใหม่ โดยแต่ละคร้วเรือนจะใช้พื้นที่ในการทำไร่เป็นจำนวนมากเพราะใช้วิธีหมุนเวียนแปลงเพาะปลูกหลังจากผิวดินเสื่อมสภาพ เนื่องจากถั่วมะแฮะเป็นพืชตระกูลถั่วบำรุงดิน มีระบบรากลึก จึงช่วยหมุนเวียนธาตุอาหารจากดินชั้นล่างขึ้นมาใช้ประโยชน์ได้ดี นอกจากนั้นยังปลูกง่าย เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนกึ่งแห้งแล้งพร้อมเก็บเกี่ยวได้ใน 180-270 วัน เมล็ดมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 21-26 สามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำคัญที่มีราคาถูกให้แก่ครอบครัวเกษตรกรได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังช่วยคลุมผิวดินเพื่อช่วยดักตะกอนดินไม่ให้ไหลลงสู่ที่ลุ่มอีกด้วย ปริมาณโปรตีนในถั่วมะแฮะบ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการนำเมล็ดมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนคุณภาพสูงและมีราคาถูก

VI. ถั่วพริ้ว (*Canavalia* spp. วงศ์ Leguminosae)

ถั่วพริ้วมี 2 ชนิดคือ ถั่วพริ้วเมล็ดขาว (*Jack bean*, *Canavalia ensiformis*) และ ถั่วพริ้วเมล็ดแดง (*sword bean*, *Canavalia gladiata*) เป็นพืชล้มลุกลำต้นเป็นพุ่มที่สถานีพัฒนาที่ดินน่านได้นำมาทดลองใช้เป็นพืชปุ๋ยสดแก่เกษตรกรเนื่องจากเจริญเติบโตง่าย ทนความแห้งแล้งได้ดี เหมาะที่จะใช้ปลูกเป็นพืชหมุนเวียน ผักสดและเมล็ดสดสามารถรับประทานได้ แต่มีปริมาณ *Canavalin* ซึ่งเป็นโปรตีนชนิด *Globular* ที่มีพิษสูงในเมล็ดแห้ง ต้องต้มน้ำทิ้งหลายน้ำก่อนรับประทาน ถั่วพริ้วเป็นพืชคลุมดินตระกูลถั่วที่มีคุณภาพดี

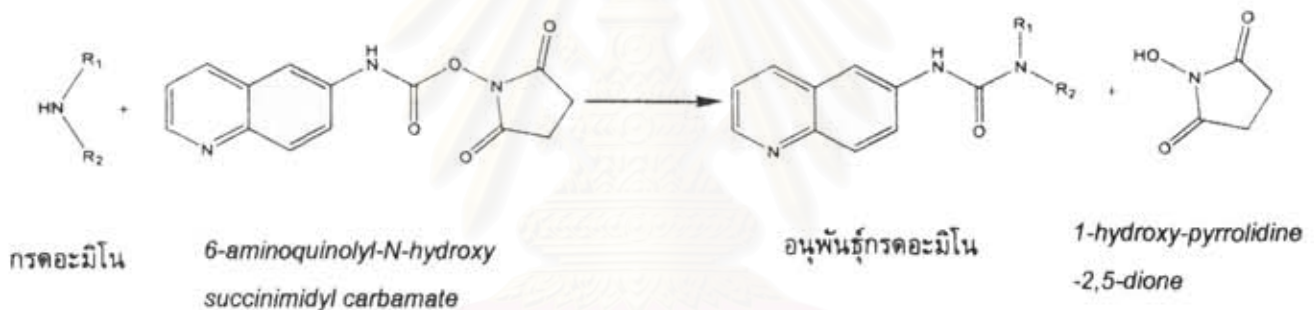
จากการสำรวจผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของจังหวัดน่าน ทางคณะผู้วิจัยสนใจศึกษา ถั่วมะแฮะ (*Cajanus cajan* Millsp.) เนื่องจากเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีการปลูกกันมากในจังหวัดน่านเพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพดิน และจากการค้นคว้าพบว่าถั่วมะแฮะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 22.3 ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการนำเมล็ด

มาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนคุณภาพสูงและมีราคาถูก โดยโปรตีนหลักที่พบในถั่วมะแฮะคือ Globulin, Glutelin, Albumin และ Prolamin

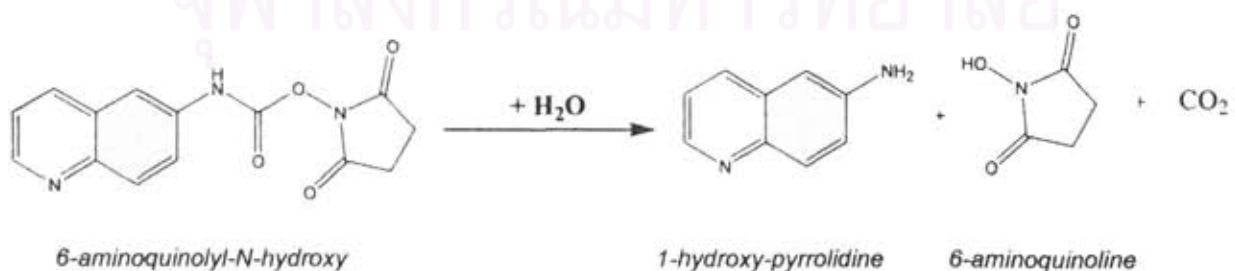
1.3.2 การวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยเทคนิค Pre-column derivatization RPLC

ปัจจุบันเทคนิคการทำอนุพันธ์มีการพัฒนาให้มีความสะดวก รวดเร็วและให้ความถูกต้องในการวิเคราะห์มากขึ้น ทั้งในแง่ของวิธีการทำอนุพันธ์และสารก่ออนุพันธ์ที่มีมากมายหลายชนิด ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้เลือกวิธีการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยการทำอนุพันธ์แบบก่อนเข้าคอลัมน์ (pre-column derivatization) ด้วยสารก่ออนุพันธ์ 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) ที่มีชื่อทางการค้าว่า AccQ-Fluor Reagent, Waters[®], สหรัฐอเมริกา วิธีการนี้เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีวิธีการไม่ยุ่งยากและสามารถใช้ได้กับครุภัณฑ์ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ คือเครื่อง HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบอูลตราไวโอเลต อีกทั้งการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดย RPLC นั้น สะดวกและรวดเร็วกว่าการวิเคราะห์โดยเครื่อง Amino Acid Analyzer และใช้สารในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย จึงช่วยประหยัดครีเอเจนต์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์และลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วย

6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate ทำอนุพันธ์ได้กับกรดอะมิโนทั้งปฐมภูมิและทุติยภูมิ กลายเป็นอนุพันธ์ที่เสถียรดังแสดงในสมการ



ซึ่งอนุพันธ์ของกรดอะมิโนนี้สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องนานถึง 7 วัน โดยมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงคือ 1-hydroxy-pyrrolidine-2,5-dione ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างจากอนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นมากทำให้ไม่มีปัญหาในการแยกและตรวจวัดโดยเทคนิค HPLC นอกจากนี้ 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยากับน้ำกลายเป็น 6-aminoquinoline และ 1-hydroxy-pyrrolidine-2,5-dione ดังแสดงในสมการ



ซึ่งทั้ง 6-aminoquinoline และ 1-hydroxy-pyrrolidine-2,5-dione มีโครงสร้างที่แตกต่างจากอนุพันธ์ของกรดอะมิโน ดังนั้นจึงไม่รบกวนการวิเคราะห์แต่อย่างใด โดยสารทั้งสองชนิดนี้จะออกจากคอลัมน์รีเวอร์สเฟสเป็นตัวแรกๆ เนื่องจากโครงสร้างมีความเป็นขั้วสูงกว่าอนุพันธ์อื่น ๆ ของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนที่ทำการวิเคราะห์มี 17 ชนิด ได้แก่ Aspartic acid (Asp), Serine (Ser), Glutamic acid (Glu), Glycine (Gly), Histidine (His), Arginine (Arg), Threonine (Thr), Alanine (Ala), Proline (Pro), Tyrosine (Try), Valine (Val), Methionine (Met), Lysine (Lys), Isoleucine (Ile), Leucine (Leu), Phenylalanine (Phe) และ Cysteine (Cys) โดยภาวะการทดลองที่ใช้ในการหาปริมาณ คือ

เฟสคงที่ : Nova-Pack C₁₈, 4 μ m, 150x3.9 mm i.d.

เฟสเคลื่อนที่ : Acetate-phosphate buffer pH 5.02, Acetonitrile และ น้ำ ในระบบ gradient โดยการเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC เป็นดังตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 ตารางการเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC

เวลา	%A	%B	%C	Curve*
0.0	100	0	0	-
0.5	98	2	0	11
11.5	95	5	0	6
15.0	93	7	0	6
18.0	92	8	0	6
18.5	83	17	0	6
29.5	83	17	0	6
33.0	0	60	40	11
35.0	100	0	0	11
44.0	100	0	0	11
A = Acetate-phosphate buffer B = Acetonitrile C = น้ำ				

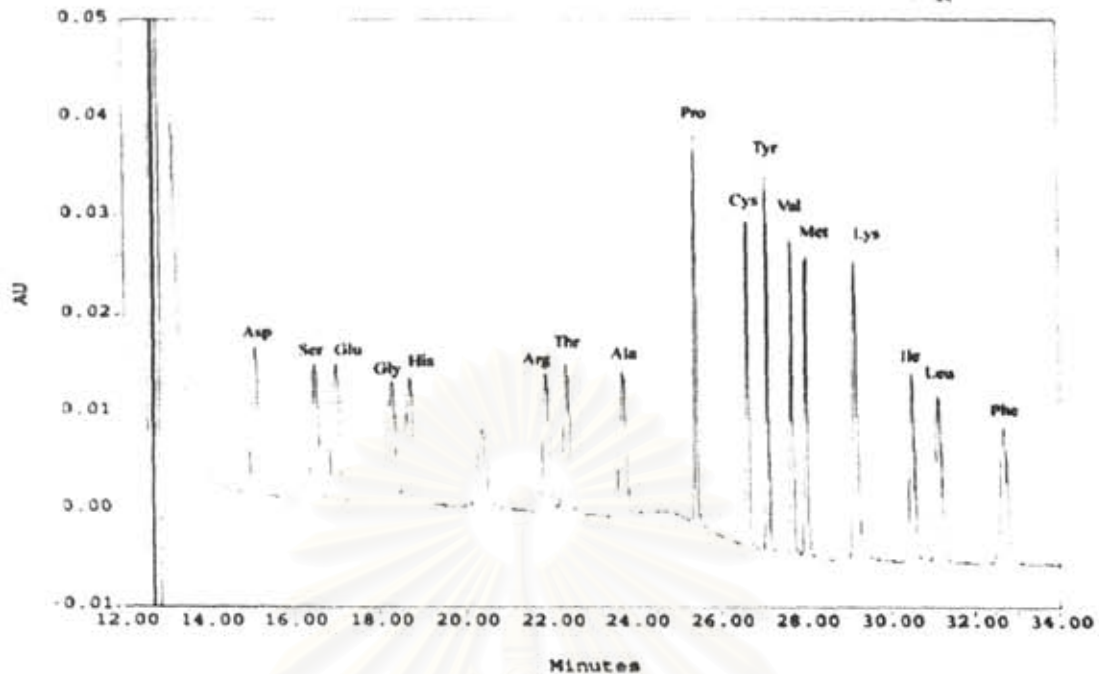
*รูปแบบการเปลี่ยนอัตราส่วน

ความเร็วของเฟสเคลื่อนที่ : 1 mL/min

เครื่องตรวจวัด : UV-detector ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm

อุณหภูมิที่ทำการทดลอง : 37°C

จากภาวะการทดลองดังกล่าวได้ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด ดังโครมาโทแกรมในรูปที่ 1-1



รูปที่ 1-1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด ความเข้มข้น 100 pmol/ μ L

1.3.3 การสกัดและเตรียมตัวอย่างโปรตีนเป็นกรดอะมิโนอิสระที่เหมาะสม

งานวิจัยส่วนนี้ได้ทำงานร่วมกับคณะวิชาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตน่าน ในการสกัดโปรตีนจากถั่วมะแฮะ ในขั้นตอนทางคณะวิจัยได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วมะแฮะ ได้ผลดังตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1-2 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วมะแฮะแบบแกะเปลือกและไม่แกะเปลือก

	ชนิดของถั่วมะแฮะ	
	ไม่แกะเปลือก	แกะเปลือก
ปริมาณความชื้น (%)	12.5929	12.1949
ปริมาณแฉะทั้งหมด (%)	3.4707	3.3713
ปริมาณไขมัน (%)	0.0015	0.0012
ปริมาณของเกลือแกง (%)	1.5194	2.0280
ปริมาณโปรตีน (%)	9.9096	10.6995
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (%)	72.5074	71.7063

สำหรับการเตรียมตัวอย่างโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ จะใช้การทำไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 M แบบสูญญากาศ (vacuum hydrolysis) อย่างไรก็ตามวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยการทำให้กรดไฮโดรคลอริกนี้ กรดอะมิโนชนิด Tryptophan จะถูกทำลายทั้งหมด ส่วนกรดอะมิโน Asparagine และ Glutamine จะกลายเป็นอนุพันธ์กรดบางส่วน คือ Aspartic acid และ Glutamic acid แต่สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิดที่ใช้ในงานวิเคราะห์นี้ไม่มี Tryptophan เป็นองค์ประกอบ จึงไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ ส่วน Asparagine และ Glutamine ที่เป็นองค์ประกอบในสารมาตรฐานของกรดอะมิโนผสมนี้จะอยู่ในรูปของ Aspartic acid และ Glutamic acid ซึ่งสามารถตรวจวัดได้เช่นกัน

วิธีการไฮโครไลซิสแบบสุญญากาศที่คณะวิจัยได้ศึกษา

ซึ่งสารตัวอย่างโปรตีนน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 10 mg ใส่ใน vacuum hydrolysis tube เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 M 1 mL ทำให้เป็นสุญญากาศภายใต้ในโครเจนบรยากาศ นำไปอบที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไประเหยแห้ง ละลายสารตัวอย่างที่แห้งด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 20 mM นำไปทำปฏิกิริยากับสารก่อนนุพันธ์ แล้ววิเคราะห์ด้วย LC

1.4 เอกสารอ้างอิง

- [1] Pellett, P.L. and Young, V.R., Eds., *Nutritional Evaluation of Protein* The United Nations University, 1980; WHTR-3/UNUP-129 ISBN 92-808-0129-5.
- [2] Ensminger and Ensminger, Eds., *The Concise Encyclopaedia of Foods and Nutrition*, CRC, 1995.
- [3] Pomeranz, Y. and Meloan, C.E., Eds., *Food Analysis-Theory and Practice*, 3rd Ed., Chapman & Hall, 1994.
- [4] Zumwalt, R. D., Kuo, K. C. T., Gehrke, C. W., Eds., *Amino Acid Analysis by Gas Chromatography*, vols. I-III, CRC Press, 1987.
- [5] Nollet, L. M., Ed., *Food Analysis by HPLC*, Marcel Dekker, 1992.
- [6] Macrae, R., Ed., *HPLC in Food Analysis*, Academic Press, 1982.
- [7] Khalil, I. A. and Khan, S., *Food Chem.*, 52, 1995, 327-330.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2 การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเทคนิคการทำอนุพันธ์ก่อนเข้าคอลัมน์ HPLC ด้วย 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)

ผศ.ม.ล.ศิริพัสตร์ ไชยันต์ ดร.พุทธรักษา วรานุสุภากุล ดร.ลักษณา คูบาส
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของกรดอะมิโน 17 ชนิดในโปรตีนถั่วมะและ โดยใช้เทคนิคการทำอนุพันธ์ก่อนเข้าคอลัมน์ HPLC ด้วย 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบอัลตราโอเลต-วิสิเบิล พบว่า ภาวะที่ให้ผลการแยกที่ดีคือ การใช้ระบบเกรเดียนต์ ของสารละลายผสมระหว่างอะซิเตต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ อะซิโตนไทรล์และน้ำ ที่อัตราการไหล 1.0 mL/min โดยใช้คอลัมน์ Nova-Pak C₁₈ และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิด ได้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (MDL) อยู่ในช่วง 0.5-1.2 pmol/μL และให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณ (MQL) อยู่ในช่วง 1.6-3.0 pmol/μL สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิคกราฟมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น 10-150 pmol/μL มีความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ดี (ได้ค่า R² มากกว่า 0.994) มีความเที่ยงของการวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ (ค่า %RSD ที่ความเข้มข้น 20 pmol/μL อยู่ในช่วง 8.4-14.4 และที่ความเข้มข้น 140 pmol/μL อยู่ในช่วง 1.6-7.3) และมีความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่ดี (ค่า %Recovery ของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 20 pmol/μL และ 140 pmol/μL มีค่าอยู่ในช่วง 80-110%)

Determination of Amino Acids by Pre-column Derivatization HPLC with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)

Siripastr Jayanta, Puttaruksa Varanusupakul, Luxsana Dubas

Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

In this study, a quantitative analysis method for 17 amino acids in pigeon pea's protein using pre-column derivatization HPLC-UV-Vis detector using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) was developed. The gradient mode of acetate-phosphate buffer, acetonitrile and water at 1.0 mL/min with Nova-Pak C₁₈ column and detect at 254 nm can separate 17 amino acids. The limit of method detection (MDL) and limit of method quantitation (MQL) were in the range of 0.5-1.2 pmol/μL and 1.6-3.0 pmol/μL, respectively. The calibration was satisfactory linear with R² of 0.994 and above. The method was good precision with %RSD of 8.4-14.4 at concentration of 20 pmol/μL and 1.6-7.3 at concentration of 140 pmol/μL. The recovery was 80-110% at 20 and 140 pmol/μL indicated a good accuracy of this method.

2.1 บทนำ

เนื่องจากคุณภาพ ลักษณะภายนอก กลิ่น และรสชาติของอาหารที่ผลิตจากผลิตภัณฑ์เกษตรนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ฤดูกาล ภูมิอากาศ ภูมิประเทศ วิธีการเก็บเกี่ยว วิธีการเก็บรักษา กระบวนการแปรรูปและผลิตอาหาร [1] ดังนั้นการตรวจวัดและประเมินคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์เพื่อประโยชน์และความปลอดภัยของผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการพัฒนาและส่งเสริมเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมอาหารให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

ถั่วมะแฮะ (*Cajanus cajan Millsp.*) เป็นผลิตภัณฑ์การเกษตรของจังหวัดน่านที่ทางคณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษา ถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากถั่วมะแฮะเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีการปลูกกันมาก ในจังหวัดน่านเพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพดิน และมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 22.3 ซึ่งส่งผลให้ถั่วมะแฮะอาจสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนคุณภาพสูงและมีราคาถูก โดยโปรตีนหลักที่พบในถั่วมะแฮะคือ Globulin, Glutelin, Albumin และ Prolamin

โปรตีนเป็นอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์และสัตว์ คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน โดยเฉพาะสัดส่วนและปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น ดังนั้นการวิเคราะห์กรดอะมิโนจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับกระบวนการคุณภาพของโปรตีน ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนนั้นต้องคำนึงถึงการเตรียมตัวอย่างการแยกและการตรวจวัดที่เหมาะสม ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างซึ่งเป็นการสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนนั้น ภาวะที่ใช้ต้องสามารถย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ แต่ต้องไม่ทำลายกรดอะมิโนอิสระเหล่านั้นด้วยเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องที่สุด วิธีการย่อยโปรตีนที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบันคือ การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 6 M ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะสุญญากาศ หลังจากนั้นจะทำการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค RPLC

การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเทคนิค RPLC มีความจำเป็นในการทำอนุพันธ์ของกรดอะมิโนให้อยู่ในรูปที่สามารถตรวจวัดได้ โดยเทคนิคที่นิยมคือการเปลี่ยนกรดอะมิโนให้เป็นอนุพันธ์ก่อนผ่านเข้าคอลัมน์ (pre-column derivatization) โดยในงานวิจัยนี้มุ่งในการเลือกใช้ พัฒนาและ validate วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนเพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณของ กรดอะมิโนในถั่วมะแฮะที่แม่นยำ ถูกต้องโดยการทำ pre-column derivatization RPLC โดยกรด อะมิโนทำ (pre-column derivatization) ด้วยสารก่ออนุพันธ์ 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)

ในงานวิจัยนี้มุ่งที่จะ validate วิธีการวิเคราะห์และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว เพื่อใช้ในการหาปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนซึ่งสกัดได้จากถั่วมะแฮะ

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 สารเคมี

1. สารก่ออนุพันธ์ 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)
2. สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน (Waters, Ireland)

ประกอบด้วยกรดอะมิโน 17 ชนิด ได้แก่ Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Tyrosine, Valine, Methionine, Lysine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine ที่มีความเข้มข้น 2.5 mM และ Cysteine ที่มีความเข้มข้น 1.25 mM

3. สารละลายเฟสเคลื่อนที่

ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ 3 ชนิด ในระบบ gradient elution คือ น้ำที่ผ่านระบบการทำน้ำให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ Milli-Q Gradient (Milli-Q water) อะซิโตไนท์ HPLC grade (Merk KgaA, Darmstadt, Germany) และ สารละลายบัฟเฟอร์ของอะซิเตต-ฟอสเฟต เตรียมโดยนำ Waters AccQ Eluent A concentrated (อะซิเตต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์, Waters) มาเจือจางด้วยน้ำ Milli-Q 10 เท่า

หมายเหตุ ก่อนนำสารละลายเฟสเคลื่อนที่ 3 ชนิดไปใช้ ต้องนำไปกรองด้วยชุดเครื่องกรองเฟสเคลื่อนที่ ผ่าน filter membrane ขนาด 0.45 μm

4. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น Analytical Reagent (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

2.2.2 การทำอนุพันธ์ของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนทุกชนิดจะผ่านการทำอนุพันธ์ก่อนฉีดเข้าสู่คอลัมน์ โดยเปิดสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 10 μL และ Borate Buffer 70 μL ใส่ใน sample tube นำไปเขย่า เติมสารก่ออนุพันธ์ 6-aminoquinoly-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) 20 μL แล้วนำไปเขย่าอีกครั้ง นำสารละลายที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 55°C นาน 10 นาที กรองสารละลายอนุพันธ์ของกรดอะมิโน ที่ได้ผ่าน Syringe Filter Nylon ขนาด 0.45 μm ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

2.2.3 การทดลอง

ทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนจำนวน 17 ชนิด ได้แก่ Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Tyrosine, Valine, Methionine, Lysine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine และ Cysteine ในสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ เป็นสารละลายผสมระหว่างอะซิเตด-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์, อะซิโตไนโทล และน้ำ การทดลองแบ่งออกเป็นทั้งหมด 5 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 การศึกษาภาวะ HPLC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอะมิโน

ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนทำการพัฒนาจากภาวะ HPLC ที่ได้พัฒนามาสำหรับสารก่ออนุพันธ์ AQC จาก Waters [20] ซึ่งจะทำการศึกษาในสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน (Waters, Ireland) ความเข้มข้น 100 pmol/ μL (ยกเว้น Cysteine มีความเข้มข้น 50 pmol/ μL)

ภาวะในการวิเคราะห์อนุพันธ์ของกรดอะมิโนด้วย HPLC

- Analytical column : Reversed phase C18, 4 μm , 3.9 x 150 mm
- Temperature : อุณหภูมิห้อง
- Dectector : UV-VIS, Photo Diode Array (PDA) ที่ความยาวคลื่น 254 nm
- Injection volume : 5 μL
- Mobile phase : A = Acetate-Phosphate Buffer pH 5.02
: B = Acetonitrile
: C = H₂O
- Flow rate : 1 mL/min

โดยจะทำการปรับอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์และลักษณะ gradient curve เพื่อให้ได้การแยกที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ทั้งในแง่ของเวลาที่ใช้ ความจำเพาะเจาะจง และ resolution

ตอนที่ 2 การศึกษาหา MDL และ MQL ของเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์กรดอะมิโน 17 ชนิด

ขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์กรดอะมิโน ทำโดยการใช้สารละลายมาตรฐานของกรด อะมิโน 17 ชนิด เริ่มจากความเข้มข้น 10 pmol/ μL (ยกเว้น Cysteine มีความเข้มข้น 5 pmol/ μL) แล้วลดระดับความเข้มข้นลง จนได้ค่าความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่ทำให้สัญญาณการตรวจวัดประมาณ 3-10 เท่าของสัญญาณรบกวน ทำการตรวจวัดสัญญาณความเข้มข้นและ 2 ครั้ง ณ ความเข้มข้นที่ให้ค่าสัญญาณการตรวจวัดของกรดอะมิโนแต่ละชนิดเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน จัดเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

ของเครื่องมือ (method detection limit, MDL) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของวิธีวิเคราะห์ (method quantitation limit, MQL) คือค่าความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่ให้สัญญาณการตรวจวัดเป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน

ตอนที่ 3 การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโน 17 ชนิด

กราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนแต่ละชนิด เพื่อใช้ในการหาปริมาณ ทำการศึกษาโดยเตรียมความเข้มข้นของกรดอะมิโนมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10, 40, 70, 100, 130, และ 150 โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 หลอด และฉีดหลอดละ 1 ครั้ง

ตอนที่ 4 การหาค่าความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

เตรียมสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20 และ 140 pmol/uL โดยในแต่ละความเข้มข้นจะเตรียมทั้งสิ้น 10 หลอด และทำการฉีดหลอดละ 1 ครั้ง จากค่าสัญญาณที่ได้นำไปหาค่าความเข้มข้นของแต่ละ หลอดที่เตรียมไว้ และคำนวณหาค่าความแม่นยำโดยพิจารณาจากค่า %RSD จากการทำการฉีดสารทั้ง 10 ครั้ง สำหรับการคำนวณค่าความถูกต้อง โดยคำนวณจากค่าเฉลี่ย % error

ตอนที่ 5 การวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างที่สกัดจากถั่วมะแฮะ

โปรตีนตัวอย่างที่ทำการสกัดได้จากถั่วมะแฮะซึ่งดำเนินการโดยโครงการย่อยที่ 3 โดยชั่งสารตัวอย่างน้ำหนักที่แน่นอน 10 mg ใส่ใน vacuum hydrolysis tube เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 M ปริมาตร 1 mL เป่าไล่อากาศด้วยแก๊ส ไนโตรเจน และทำให้เป็นสุญญากาศ นำไปอบที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเจือจางสารตัวอย่างด้วยกรด ไฮโดรคลอริก 20 mM นำไปประเหยแห้งด้วยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน ของแข็งที่ได้ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 20 mM และปรับปริมาตรเป็น 5 mL ด้วยขวดวัดปริมาตร

สารละลายตัวอย่างที่ได้นำไปทำปฏิกิริยากับสารก่ออนุพันธ์และวิเคราะห์ด้วย LC ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 ผลการทดลอง

2.3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอะมิโน โดยเทคนิค pre-column derivatization RPLC ด้วย 6-aminoquinolyli-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนในโปรตีนตัวอย่างโดยเปลี่ยนกรดอะมิโนให้เป็นอนุพันธ์ด้วย AQC ก่อน ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟสลิควิดโครมาโทกราฟี (pre-column derivatization RPLC) โดยทำการเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ด้วย RPLC ดังตารางที่ 2-1

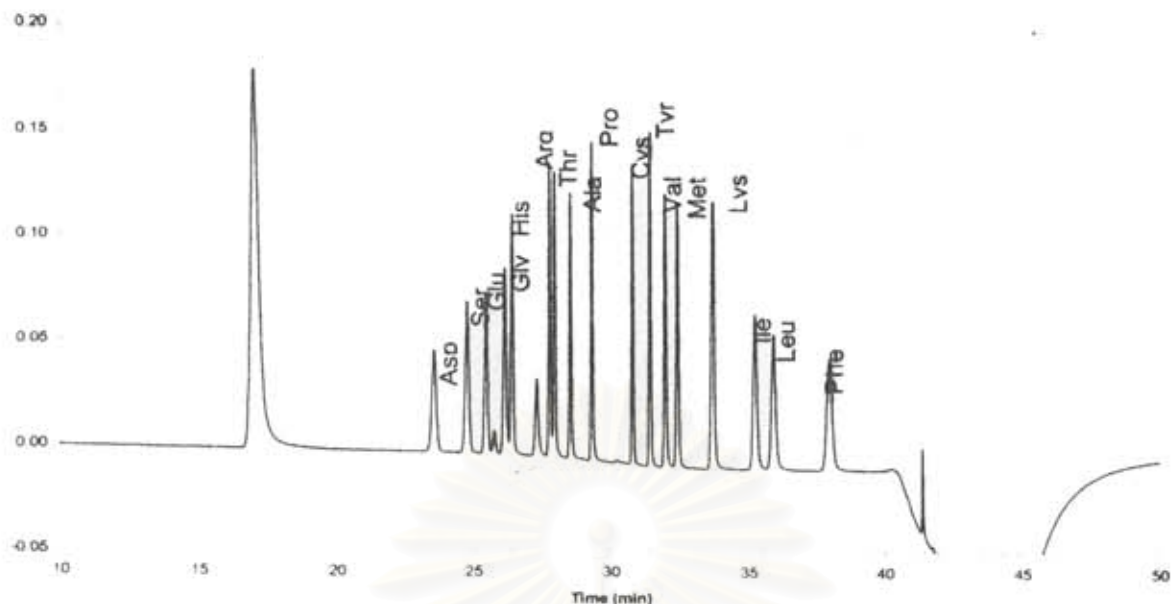
ตารางที่ 2-1 ตารางการเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ด้วย RPLC

เวลา	% ACN	% Buffer	% H ₂ O	Curve*
Initial	0	100	0	-
0.5	1	99	0	11
15.0	3	97	0	6
19.0	7	93	0	6
25.0	17	83	0	6
35.0	60	0	40	11
40.0	0	100	0	11

*รูปแบบการเปลี่ยนอัตราส่วน

จากภาวะการทดลองดังกล่าวได้ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด ดังโครมาโทแกรมในรูปที่ 2-1 ซึ่งมีลำดับการแยกของกรดอะมิโนดังนี้ Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Cystine, Tyrosine, Valine, Methionine, Lysine, Isoleucine, Leucine และ Phenylalanine ตามลำดับ โดยมีค่าการแยก (Resolution, R_s) ดังตารางที่ 2-2 ซึ่งค่าการแยกที่สามารถนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพได้นั้น ควรมีอย่างน้อย 1 ดังนั้น ภาวะการทดลองนี้สามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิดได้ ยกเว้น Glycine กับ Histidine และ Arginine กับ Threonine ที่มีค่าการแยกน้อยกว่า 1 ทำให้การวิเคราะห์ของกรดอะมิโน 4 ชนิดนี้ได้เป็นปริมาณรวมของ Glycine กับ Histidine และ Arginine กับ Threonine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2-1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด ความเข้มข้น 100 pmol/μL

ตารางที่ 2-2 ผลการแยกของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด

กรดอะมิโน	Retention time, t_r (min)	คู่กรดอะมิโน	Resolution, R_s
Aspartic acid, Asp	23.7	Asp, Ser	1.65
Serine, Ser	24.9	Ser, Glu	1.17
Glutamic acid, Glu	25.6	Glu, Gly	1.65
Glycine, Gly	26.2	Gly, His	0.70
Histidine, His	26.5	His, Arg	3.97
Arginine, Arg	27.8	Arg, Thr	0.48
Threonine, Thr	28.0	Thr, Ala	1.19
Alanine, Ala	28.6	Ala, Pro	1.61
Proline, Pro	29.3	Pro, Cys	3.75
Cysteine, Cys	30.8	Cys, Tyr	1.44
Tyrosine, Tyr	31.4	Tyr, Val	1.14
Valine, Val	32.0	Val, Met	0.99
Methionine, Met	32.4	Met, Lys	2.67
Lysine, Lys	33.8	Lys, Ile	2.48
Isoleucine, Ile	35.3	Ile, Leu	1.04
Leucine, Leu	36.0	Leu, Phe	2.83
Phenylalanine, Phe	38.1		

2.3.2 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (MDL) และขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณ (MQL) ของวิธีวิเคราะห์

ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ที่กำหนดให้เท่ากับค่าความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่ให้สัญญาณการตรวจวัด (signal) มีความสูงเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise) และขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณกำหนดจากระดับความเข้มข้นที่ให้สัญญาณการตรวจวัดมีความสูงเป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน ซึ่งค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์และขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณของกรดอะมิโน 17 ชนิด แสดงในตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (MDL) และขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณ (MQL) กรดอะมิโน 17 ชนิด โดยเทคนิค pre-column derivatization RPLC

กรดอะมิโน	MDL		MQL	
	pmol/ μ L	mg/L	pmol/ μ L	mg/L
Asp	1.0	0.11	3.2	0.36
Ser	0.8	0.09	2.7	0.29
Glu	0.8	0.11	2.5	0.37
Gly	0.6	0.05	2.1	0.16
His	0.8	0.12	2.6	0.40
Arg	0.8	0.14	2.7	0.47
Thr	0.8	0.09	2.5	0.30
Ala	0.6	0.05	2.1	0.18
Pro	0.8	0.09	2.7	0.31
Cys	0.9	0.11	3.1	0.38
Tyr	0.5	0.10	1.8	0.33
Val	0.7	0.08	2.3	0.27
Met	0.7	0.10	2.3	0.34
Lys	0.7	0.10	2.3	0.34
Ile	0.5	0.06	1.6	0.21
Leu	0.5	0.06	1.6	0.21
Phe	1.2	0.19	3.9	0.64

ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิด อยู่ในช่วง 0.5–1.2 pmol/ μ L (ความเข้มข้น 0.05–0.19 mg/L) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณกรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิด อยู่ในช่วง 1.6–3.9 pmol/ μ L (ความเข้มข้น 0.16–0.64 mg/L) จะเห็นว่ากรวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเทคนิค pre-column derivatization RPLC โดยทำการอนุพันธ์ กรดอะมิโนด้วยสารก่ออนุพันธ์ AQC สามารถวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิดได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ โดยใช้สารตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์หากรดอะมิโนในโปรตีนได้

2.3.3 กราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิด

การหาปริมาณกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโปรตีนตัวอย่างโดยการไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกแบบสุญญากาศ ใช้เทคนิคกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 10-150 pmol/ μ L โดยสมการแสดงความสัมพันธ์ของพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นและค่า R^2 ของกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 สมการและค่า R^2 ของกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิดในช่วงความเข้มข้น 10-150 pmol/ μ L

ลำดับ	กรดอะมิโน	สมการกราฟมาตรฐาน	R^2
1	Asp	$y = 875.1x - 203.9$	0.9967
2	Ser	$y = 912.3x - 514.9$	0.9966
3	Glu	$y = 847.7x + 1252.5$	0.9975
4,5	Gly + His	$y = 1677.3x + 1400.4$	0.9967
6,7	Arg + Thr	$y = 1751.7x - 500.2$	0.9964
8	Ala	$y = 886.8x + 1499.7$	0.9953
9	Pro	$y = 908.8x + 373.9$	0.9950
10	Cys	$y = 740.5x + 769.1$	0.9952
11	Tyr	$y = 935.4x + 748.8$	0.9953
12	Val	$y = 896.5x + 2011.4$	0.9964
13	Met	$y = 868.6x + 641.1$	0.9970
14	Lys	$y = 1345.3x - 1222.4$	0.9969
15	Ile	$y = 889.5x + 1000.2$	0.9979
16	Leu	$y = 866.6x - 2539.4$	0.9942
17	Phe	$y = 878.6x - 1062.7$	0.9973

จากตารางที่ 3 ค่า R^2 ของกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีค่ามากกว่า 0.99 แสดงว่ากราฟมีความเป็นเส้นตรง ดังนั้น สามารถหาปริมาณกรดอะมิโนในสารตัวอย่างในช่วงความเข้มข้น 10-150 pmol/ μ L ด้วยเทคนิคกราฟมาตรฐานได้

2.3.4 การศึกษาความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงในการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเทคนิค pre-column derivatization RPLC โดยใช้ AQC เป็นสารก่อนอนุพันธ์ ทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 20 pmol/ μ L และ 140 pmol/ μ L เพื่อให้ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน (ความเข้มข้น 10-150 pmol/ μ L) โดยทำอนุพันธ์ความเข้มข้นละ 6 ครั้ง แสดงผลดังตารางที่ 2-5

จากตารางที่ 2-5 ค่า %RSD ของการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ความเข้มข้น 20 pmol/ μ L (เท่ากับความเข้มข้น 1.5-3.6 mg/L ของกรดอะมิโน) อยู่ในช่วง 8.4-14.4 และที่ความเข้มข้น 140 pmol/ μ L (เท่ากับความเข้มข้น 10-25 mg/L ของกรดอะมิโน) อยู่ในช่วง 1.6-7.3 ซึ่งการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/L ควรมีค่า %RSD น้อยกว่าหรือ

เท่ากับ 11% และที่ 10 mg/L น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.3% [2] นั่นคือ การวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยเทคนิค pre-column derivatization RPLC ด้วย AQC มีความเที่ยงของการวิเคราะห์ที่ยอมรับได้

สำหรับค่า %Recovery ของการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 10 mg/L ควรมีค่าในช่วง 80-110% [2] จากตารางที่ 2-5 พบว่าการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ความเข้มข้น 20 pmol/μL ได้ค่า %Recovery อยู่ในช่วงที่กำหนด ยกเว้น Arginine+Threonine (113%) และ Cysteine (116%) ที่มีค่า %Recovery เกินช่วงที่ยอมรับเล็กน้อย ส่วนที่ความเข้มข้น 140 pmol/μL ได้ค่า %Recovery อยู่ในช่วงที่กำหนดทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยเทคนิค pre-column derivatization RPLC ด้วย AQC มีความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่ดี

ตารางที่ 2-5 ปริมาณกรดอะมิโนและเปอร์เซ็นต์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 17 ชนิด ที่ความเข้มข้น 20 pmol/μL และ 140 pmol/μL

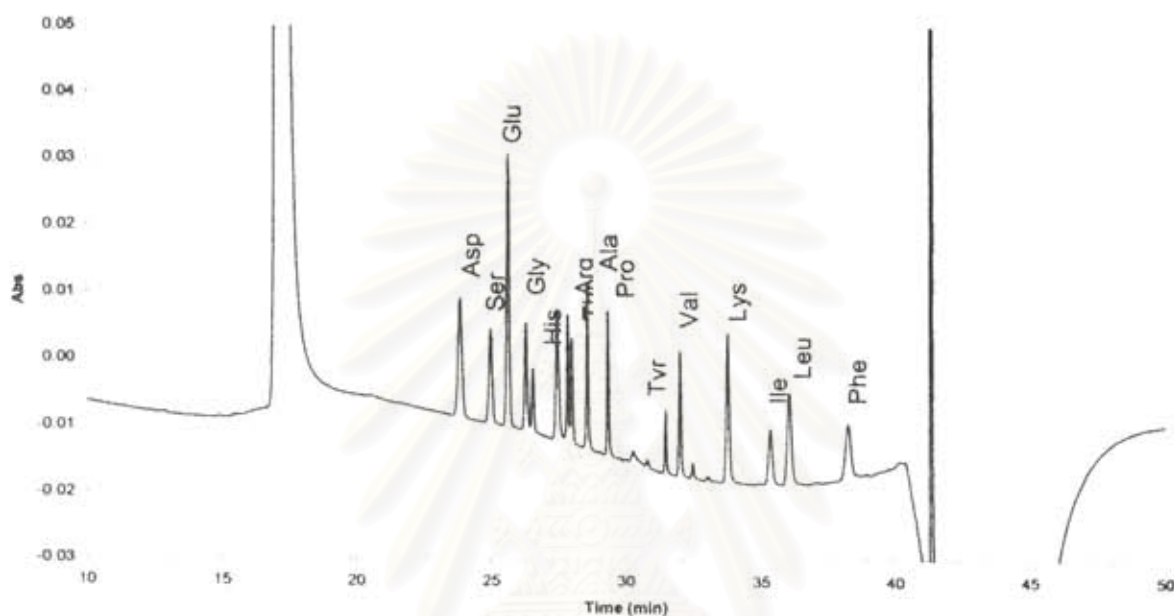
กรดอะมิโน	ความเข้มข้น 20.0 pmol/μL			ความเข้มข้น 140.0 pmol/μL		
	ปริมาณกรดอะมิโน (pmol/μL) (n=6)	%RSD	%Recovery	ปริมาณกรดอะมิโน (pmol/μL) (n=6)	%RSD	%Recovery
Asp	20.9	10.9	105	143.5	5.5	103
Ser	22.2	9.3	111	142.5	3.9	102
Glu	21.1	13.4	106	146.5	3.7	105
Gly + His	22.1	9.2	110	146.9	5.0	105
Arg + Thr	22.6	13.0	113	145.5	3.1	104
Ala	20.8	8.4	104	140.0	2.9	100
Pro	20.7	12.2	103	143.6	3.5	103
Cys	23.3	11.6	116	153.5	5.0	110
Tyr	21.1	11.8	106	121.5	5.0	87
Val	22.1	13.2	111	150.5	5.3	108
Met	20.4	11.1	102	151.3	4.4	108
Lys	20.0	12.0	100	142.9	5.8	102
Ile	20.7	12.4	103	148.6	1.6	106
Leu	22.1	11.3	110	141.9	1.8	101
Phe	20.2	14.4	101	145.0	3.0	104

2.3.5 การศึกษาวิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่างประเภทโปรตีนโดยการทำให้โครไลซิสด้วยกรด

จากงานวิจัยในปีที่แล้ว ทางคณะผู้วิจัยได้เลือกศึกษาการเตรียมตัวอย่างโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระโดยวิธีโครไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกแบบสุญญากาศ (vacuum hydrolysis) เนื่องจากช่วยป้องกันการสลายตัวของกรดอะมิโนบางชนิดที่อาจเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศได้ และทำให้การย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโนเกิดขึ้นได้สมบูรณ์มากขึ้น ในเบื้องต้นทางโครงการย่อยที่ 3 ได้ส่งโปรตีนที่สกัดจากถั่วมะแฮะที่ภาวะต่างกัน 2 ภาวะ คือ สารตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำในอัตราส่วนถั่วต่อน้ำเท่ากับ 1:7 และทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนให้สัญลักษณ์เป็น

A₁ และที่สกัดด้วยสารละลาย 0.1 % Na₂CO₃ ในอัตราส่วนตัวต่อสารละลายเท่ากับ 1:7 และทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนให้สัญลักษณ์เป็น B₁

ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนในตัวอย่างโปรตีนจากถั่วมะแฮะ A₁ และ B₁ ที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีไฮโดรไลซิสแบบสุญญากาศ (vacuum hydrolysis) ได้ผลการแยกที่ดี ไม่พบพีกของสารอื่นมารบกวนพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังตัวอย่างโครมาโทแกรมรูปที่ 2-2



รูปที่ 2-2 โครมาโทแกรมของกรดอะมิโนในโปรตีนที่สกัดจากถั่วมะแฮะ

โดยโปรตีนที่สกัดจากถั่วมะแฮะทั้ง 2 ภาวะ ได้กรดอะมิโน 15 ชนิดเหมือนกัน คือ Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Tyrosine, Valine, Lysine, Isoleucine, Leucine และ Phenylalanine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์กรดอะมิโน 17 ชนิด ในโปรตีนถั่วมะแฮะ โดยอาศัยเทคนิค Pre-Column Derivatization HPLC พบว่า กรดอะมิโนที่วิเคราะห์มีลำดับการแยกดังนี้ Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Cysteine, Tyrosine, Valine, Methionine, Lysine, Isoleucine, Leucine และ Phenylalanine โดยใช้ภาวะสำหรับการวิเคราะห์ ดังนี้

เฟสคงที่: Nova-Pack C18, 4 μm , 150x3.9 mm i.d.

เฟสเคลื่อนที่: Acetate-phosphate buffer pH 5.02, Acetonitrile (ACN) และน้ำ โดยทำการเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ดังตาราง

เวลา	% ACN	% Buffer	% H ₂ O	Curve*
Initial	0	100	0	-
0.5	1	99	0	11
15.0	3	97	0	6
19.0	7	93	0	6
25.0	17	83	0	6
35.0	60	0	40	11
40.0	0	100	0	11

*รูปแบบการเปลี่ยนอัตราส่วน

ความเร็วของเฟสเคลื่อนที่ : 1 mL/min

เครื่องตรวจวัด : UV-detector ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm

อุณหภูมิที่ทำการทดลอง : อุณหภูมิห้อง และมีฉนวนหุ้มคอลัมน์เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการวิเคราะห์

การวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิด โดยการทำอนุพันธ์ของกรดอะมิโนด้วย 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxy succinimidyl carbamate (AQC) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย RPLC มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (MDL) อยู่ในช่วง 0.5-1.2 pmol/ μL และให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณ (MQL) อยู่ในช่วง 1.6-3.0 pmol/ μL

สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิคกราฟมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น 10-150 pmol/ μL มีความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ดี (ได้ค่า R^2 มากกว่า 0.99) มีความเที่ยงของการวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ (ค่า %RSD ที่ความเข้มข้น 20 pmol/ μL อยู่ในช่วง 8.4-14.4 และที่ความเข้มข้น 140 pmol/ μL อยู่ในช่วง 1.6-7.3) และมีความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่ดี (ค่า %Recovery ของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 20 pmol/ μL และ 140 pmol/ μL มีค่าอยู่ในช่วง 80-110%)

2.5 เอกสารอ้างอิง

- [1] Sikorski, Z. E., Ed., Chemical and Functional Properties of Food Components, Technomic Publishing, 1997.
- [2] Huber, L., Validation and qualification in analytical laboratories, Illinois, Interpharm Press, Inc., 1999.

บทที่ 3 การย่อยสลายโปรตีนโดยการไฮโดรไลซิสด้วยกรดแบบ ไมโครเวฟ

ผศ.ม.ล.ศิริพัศตร์ ไชยันต์ ดร.พุทธรักษา วรานุสุภากุล ดร.ลักษณา คูบาล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการย่อยสลายโปรตีนให้อยู่ในรูปกรดอะมิโนอิสระโดยการไฮโดรไลซิสด้วยกรดแบบ ไมโครเวฟ เปรียบเทียบกับการย่อยสลายโปรตีนโดยการไฮโดรไลซิสด้วยกรดแบบสุญญากาศซึ่งใช้สารละลายกรด ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 M ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟใช้ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายกรดมีเทนซัลโฟนิกที่ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 M โดยใช้คลื่นไมโครเวฟที่ 500, 700 และ 900 วัตต์ เป็นเวลา 4, 7 และ 10 นาที พบว่า การทำไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่เหมาะสมคือ การใช้ความเข้มข้น 8 M ความแรงคลื่นไมโครเวฟ 700 วัตต์ เป็นเวลา 10 นาที และการทำไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ โดยใช้กรดมีเทนซัลโฟนิกที่เหมาะสมคือ การใช้ความเข้มข้น 8 M ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900 วัตต์ เป็นเวลา 4 นาที โดยการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วยกรดไฮโดรคลอริกได้ปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้โดยรวมสูงกว่าการใช้กรดมีเทนซัลโฟนิก และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการไฮโดรไลซิสด้วยกรดแบบสุญญากาศ พบว่าการไฮโดรไลซิสแบบ ไมโครเวฟที่ทำการศึกษามีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโนอิสระดีกว่าและให้ปริมาณกรดอะมิโนที่ย่อย ได้จากโปรตีนใกล้เคียงค่าอ้างอิงมากกว่า

Preparation of Protein Hydrolysates by Microwave Acid Hydrolysis

Siripastr Jayanta, Puttaruksa Varanusupakul, Luxsana Dubas

Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

In this study, the hydrolysis of protein to liberate amino acids was developed using microwave acid hydrolysis and compared to a vacuum acid hydrolysis using 6 M hydrochloric acid at 110°C for 24 hours. The microwave hydrolysis was compared using hydrochloric acid and methanesulfonic acid at concentration of 2, 4, 6 and 8 M and the microwave power of 500, 700 and 900 watts for 4, 7 and 10 minutes. As the result, the optimum condition for hydrochloric acid was using the concentration of 8 M, the microwave power of 700 watts for 10 min. For methanesulfonic acid, the optimum condition was using the concentration of 8 M, the microwave power of 900 watts for 4 min. However, the overall amino acids hydrolysates by microwave hydrolysis of protein using hydrochloric acid was efficient than using methanesulfonic acid. Comparing to vacuum hydrolysis, the quantities of amino acid hydrolysates resulted from microwave hydrolysis at optimum conditions were higher and comparable to the reference value.

3.1 บทนำ

โปรตีนเป็นอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์และสัตว์ คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน โดยเฉพาะสัดส่วนและปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น ดังนั้นการวิเคราะห์กรดอะมิโนจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการระบุคุณภาพของโปรตีน ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนนั้นต้องคำนึงถึงการเตรียมตัวอย่างการแยกและการตรวจวัดที่เหมาะสม ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างซึ่งเป็นการสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนนั้น ภาวะที่ใช้ต้องสามารถย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ แต่ต้องไม่ทำลายกรดอะมิโนอิสระเหล่านี้ด้วย เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องที่สุด ในปัจจุบันมีวิธีการย่อยสลายโปรตีนอยู่หลายวิธีและมีการพัฒนาเพื่อให้สามารถวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณกรดอะมิโนได้ดีที่สุด การย่อยสลายโปรตีนด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส สามารถทำได้โดยใช้กรด เบส หรือเอนไซม์ [1]

การย่อยสลายโปรตีนด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในภาวะที่เป็นกรด เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง โดยสารละลายกรดและภาวะต่างๆ ที่นำมาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนแสดงดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 ชนิดของสารละลายกรดและภาวะการย่อยที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนโดยการไฮโดรไลซิส [1]

Hydrolysis Agent	Hydrolysis Condition	Additive	Method Specific for Determination of
6 M HCl	110°C, 24 hours	0.02% Phenol	All residues except of Cys, Trp
6 M HCl or 4 M MSA	110°C, 24 hours	0.2% Sodium azide	Cys
6 M HCl	110°C, 18 hours	5% Thioglycolic acid, 0.1% Phenol, 3,3-dithiodipropionic acid	Cys
6 M HCl	110°C, 18 hours	3-Bromopropylamine	Cys
6 M HCl	145°C, 4 hours	Samples previously oxidized with performic acid	Cys, Met, Lys
4 M MSA	115°C, 22 hours	3-(2-Aminoethyl) indole	Trp, Methionine Sulfoxide
4 M MSA	160°C, 45 min.	-	All residues
4 M MSA or 5.7 M HCl	150°C, 90 min.	Oxidation with Performic acid 50°C, 10 min.	All residues
12 M HCl-Propionic acid (1:1)	150°C, 90 min.	3% Phenol	Resin-Bound Peptide

การย่อยสลายโปรตีนด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในภาวะที่เป็นกรดแบบไมโครเวฟ (Microwave acid hydrolysis) เป็นอีกวิธีในการเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่มีการพัฒนา โดยสามารถทำการย่อยสลายโปรตีนได้ในเวลาเพียง 5-30 นาที [2,3] ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าวิธีการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบเดิม การย่อยสลายโปรตีนแบบไมโครเวฟแตกต่างจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในภาวะที่เป็นกรดโดยวิธีทั่วไป คือการให้ความร้อนด้วยพลังงานไมโครเวฟ ซึ่งการใช้พลังงานไมโครเวฟจะทำให้โมเลกุลของสารในสารละลายเกิดการเคลื่อนที่จากการโพลาไรซ์ (polarization) แทนจากการชน (collision) ทำให้โมเลกุลของสารได้รับพลังงานโดยตรงและต่อเนื่อง ส่งผลให้เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

ไฮโดรไลซิสลดลง การย่อยสลายโปรตีนแบบไมโครเวฟนี้สามารถทำได้ทั้งระบบเปิดและระบบปิด แต่ระบบปิดจะเป็นวิธีที่นิยมมากกว่า เนื่องจากภาวะที่ได้จะมีความดันและอุณหภูมิสูงกว่าและง่ายต่อการควบคุม โดยการย่อยสลายโปรตีนด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในภาวะที่เป็นกรดแบบไมโครเวฟมีการใช้ hydrolysis agents หลายชนิด [3,4] ซึ่งให้ผลการย่อยสลายโปรตีนและภาวะที่ใช้แตกต่างกันไป

ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาวิธีการย่อยสลายโปรตีนด้วยไมโครเวฟมาประยุกต์ใช้ โดยการไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายกรดมีเทนซัลโฟนิกเปรียบเทียบกับกรไฮโดรไลซิสแบบสุญญากาศ และทำการวิเคราะห์ทางด้านคุณภาพและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบด้วยเทคนิค Pre-column derivatization HPLC

3.2 วิธีการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้โปรตีนอัลบูมิน (albumin) ชนิดที่เป็น ovalbumin ที่สกัดได้จากไข่ขาว มาศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนโดยการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ โดยทำการศึกษากรด 2 ชนิด คือ กรดไฮโดรคลอริกและกรดมีเทนซัลโฟนิก เปรียบเทียบกับการไฮโดรไลซิสแบบสุญญากาศ และทำการหาปริมาณกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโดยเทคนิครีเวอร์สเฟสลิควิดโครมาโทกราฟี โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนให้เป็นอนุพันธ์ด้วย 6-Aminoquinolyt-N-Hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) ก่อนผ่านเข้าคอลัมน์ (pre-column derivatization HPLC)

3.2.1. การเตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีนเพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยการไฮโดรไลซิสแบบสุญญากาศ

นำโปรตีนอัลบูมิน 10 mg ใส่ในหลอด vacuum hydrolysis เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 M ที่มี 0.1% phenol ปริมาตร 1 mL แล้วทำให้ภายในหลอดเป็นสุญญากาศ นำไปอบที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับ pH ของสารละลายที่ได้ให้อยู่ในช่วง 2-3 แล้วปรับปริมาตรสารละลายเป็น 5 mL ด้วยน้ำ กรองสารละลายที่ได้ด้วย syringe filter ชนิด Nylon ขนาด 0.45 μm หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำอนุพันธ์ด้วย AQC และทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.2.2. การเตรียมสารละลายตัวอย่างโปรตีนเพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ

นำโปรตีนอัลบูมิน 10 mg ใส่ใน quartz vessel เติมกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดมีเทนซัลโฟนิก (MSA) ที่ความเข้มข้นที่ต้องการ 2 mL ปิดฝาแล้วทำการให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Perkin Elmer Paar Physica, USA) ปรับ pH ของสารละลายที่ได้ให้อยู่ในช่วง 2-3 แล้วปรับปริมาตรสารละลายเป็น 5 mL ด้วยน้ำ กรองสารละลายที่ได้ด้วย syringe filter ชนิด Nylon ขนาด 0.45 μm หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำอนุพันธ์ด้วย AQC และทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC

ทำการศึกษาความเข้มข้นของกรดทั้ง 2 ชนิดในการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ ศึกษาที่ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 M โดยใช้ความแรงของไมโครเวฟคงที่ที่ 900W เป็นเวลา 4 นาที

ทำการศึกษาความแรงของคลื่นไมโครเวฟที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส โดยใช้ความแรงของไมโครเวฟคงที่ที่ 500W 700W และ 900W เป็นเวลา 4, 7 และ 10 นาที

3.3 ผลการทดลอง

3.3.1 การศึกษาความเข้มข้นของกรดในการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ

ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมินจากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีไฮโดรไลซิสด้วยกรดแบบสุญญากาศ เปรียบเทียบกับการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดมีเทนซัลโฟนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังตารางที่ 3-2 จากตารางพบว่าปริมาณกรดอะมิโนที่ได้มีแนวโน้มมากขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดมากขึ้น ทั้งการใช้กรดไฮโดรคลอริกและกรดมีเทนซัลโฟนิก แต่ปริมาณกรดอะมิโนที่ได้ยังน้อยกว่าค่าจากเอกสารอ้างอิง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้ภาวะที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W เป็นเวลา 4 นาที อาจไม่ใช่ภาวะที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายที่ดีที่สุด โดยการใช้สารละลายกรดมีเทนซัลโฟนิกในการไฮโดรไลซิสให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก และปริมาณกรดอะมิโนที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการไฮโดรไลซิสแบบสุญญากาศ

ตารางที่ 3-2 ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมินจากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีไฮโดรไลซิสด้วยกรดแบบสุญญากาศและไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดมีเทนซัลโฟนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน ^a (g/100g)	ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมินจากการย่อยด้วยวิธีต่างๆ (g/100g)								
		ไฮโดรไลซิสแบบสุญญากาศ	ไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ							
			กรดไฮโดรคลอริก (HCl)				กรดมีเทนซัลโฟนิก (MSA)			
			2 M	4 M	6 M	8 M	2 M	4 M	6 M	8 M
Aspartic acid ^b	9.30	6.54	0.64	2.82	2.19	4.66	1.96	5.42	5.36	7.81
Serine	8.15	4.80	0.43	1.96	1.91	4.63	1.08	5.47	5.47	4.32
Glutamic acid ^c	16.50	10.12	0.51	3.41	2.62	7.58	1.88	6.39	8.45	11.47
Glycine + Histidine	5.40	4.38	1.31	3.08	2.61	4.89	2.12	7.18	4.77	6.86
Arginine + Throline	9.75	8.02	0.91	3.17	1.77	5.74	1.86	5.71	7.03	9.19
Alanine	6.72	4.32	0.66	2.71	2.02	4.41	1.43	5.08	4.64	5.67
Proline	3.60	2.56	0.27	1.09	0.87	2.25	0.59	2.19	2.31	3.17
Cystine	1.35	0.76	0.18	0.63	0.58	0.99	0.22	0.86	1.12	2.02
Tyrosine	3.68	2.70	0.19	1.65	0.66	1.94	0.59	2.78	2.37	3.35
Valine	7.05	4.89	0.36	1.48	0.98	2.92	0.70	3.06	3.60	2.12
Methionine	5.20	2.69	0.19	1.60	1.04	2.26	0.61	2.08	2.46	2.70
Lysine	6.30	4.79	0.29	1.40	1.20	3.29	0.72	2.97	3.73	5.81
Isoleusine	7.00	3.87	0.19	0.59	0.48	1.63	0.23	1.31	2.04	5.08
Leusine	9.20	6.50	0.55	0.55	0.94	2.39	0.66	2.74	3.96	7.66
Phenylalanine	7.66	4.29	1.81	1.24	1.48	3.01	0.84	2.50	3.45	5.72

^a จากเอกสารอ้างอิง

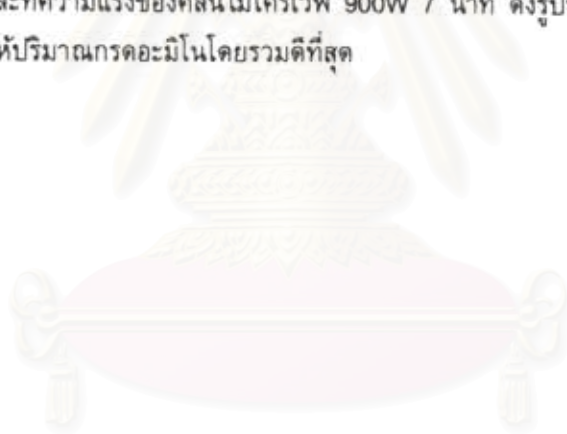
^b เป็นปริมาณรวมของ Asparagine และ Aspartic acid

^c เป็นปริมาณรวมของ Glutamine และ Glutamic acid

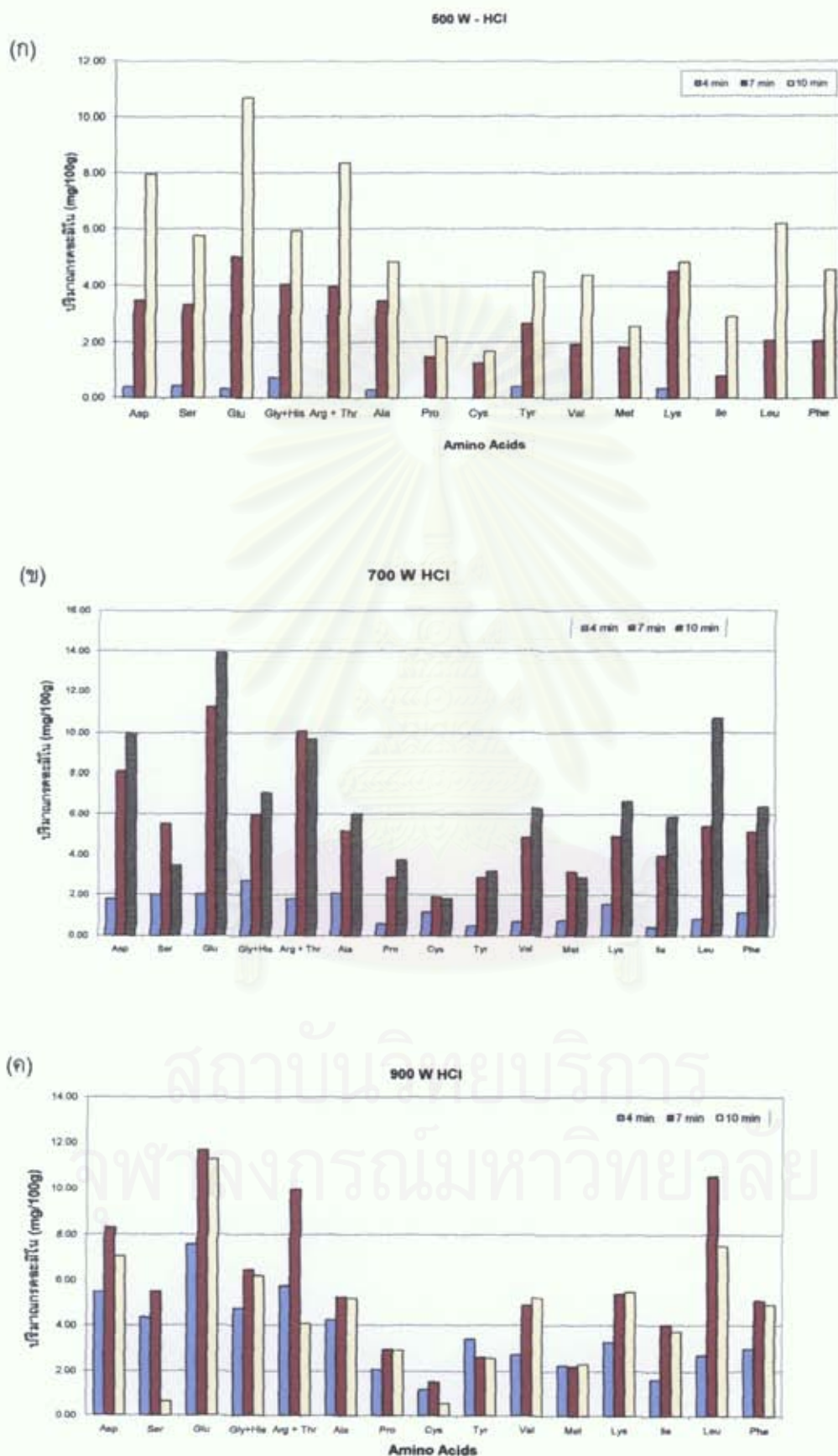
3.3.2 การศึกษาความแรงของคลื่นไมโครเวฟในการไฮโดรไลซิส

จากการศึกษาความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟ พบว่าที่ความเข้มข้น 8 M HCl และ 8 M MSA ทำให้การย่อยสลายโปรตีนดีที่สุด ดังนั้นในการศึกษาความแรงของคลื่นไมโครเวฟและระยะเวลาในการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจะใช้ความเข้มข้นของสารละลายกรดที่ 8 M HCl และ 8 M MSA ทั้งนี้ การใช้ความแรงของคลื่นไมโครเวฟที่ต่ำอาจต้องใช้เวลาในการย่อยนานขึ้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาความแรงของคลื่นไมโครเวฟควบคู่ไปกับเวลาที่ใช้

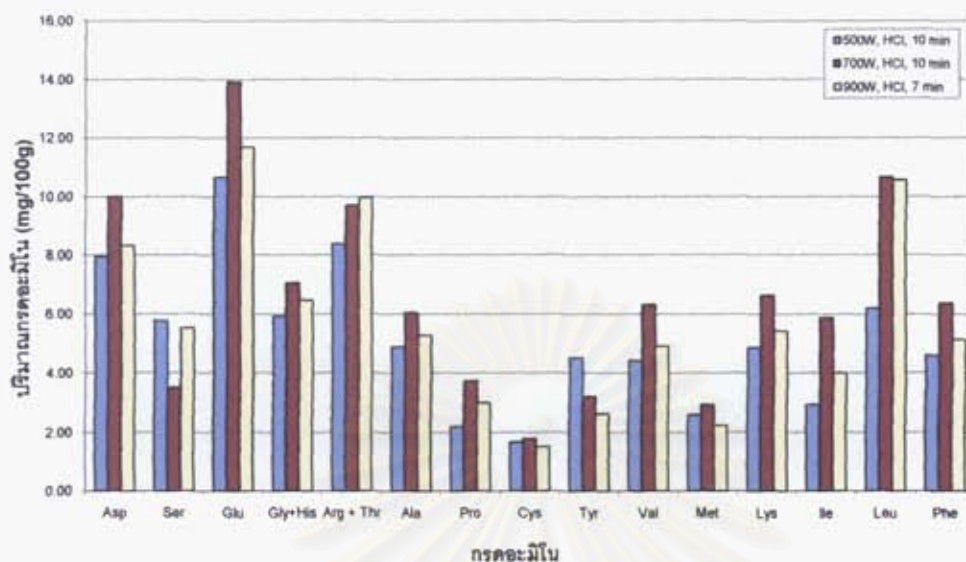
รูปที่ 3-1 แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วย 8 M HCl ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 500W, 700W และ 900W โดยแต่ละความแรงของคลื่นไมโครเวฟใช้เวลาในการให้คลื่นไมโครเวฟ 4, 7 และ 10 นาที พบว่าที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 500W สามารถย่อยโปรตีนได้ดีขึ้นเมื่อใช้เวลาในการให้คลื่นไมโครเวฟนานขึ้น โดยระยะเวลา 10 นาทีจะให้ผลของการย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโนอิสระได้ดีที่สุด และที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700W ที่เวลา 10 นาทีก็ให้ผลการย่อยโปรตีนดีที่สุด ส่วนที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W ที่เวลา 10 นาทีให้ผลการย่อยที่ต่ำกว่าที่ 7 นาที ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแรงของคลื่นที่สูงทำให้โปรตีนที่ย่อยเป็นกรดอะมิโนอิสระแล้ว ถูกทำลายไปทำให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนจากการย่อยโปรตีนที่ลดลง ดังนั้น ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W ที่เวลา 7 นาที จึงให้ผลการย่อยสลายดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโปรตีนแบบไมโครเวฟด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 500W 10 นาที ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700W 10 นาที และที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W 7 นาที ดังรูปที่ 3-2 พบว่าความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700W 10 นาที จะให้ปริมาณกรดอะมิโนโดยรวมดีที่สุด



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

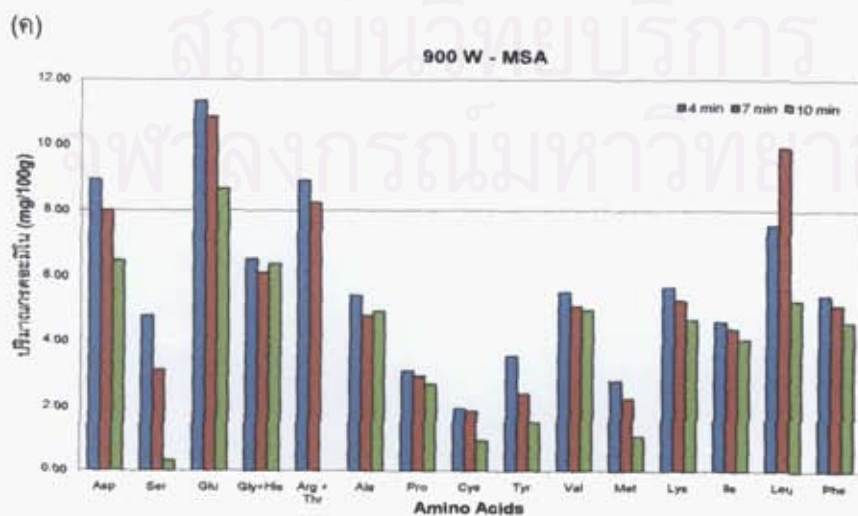
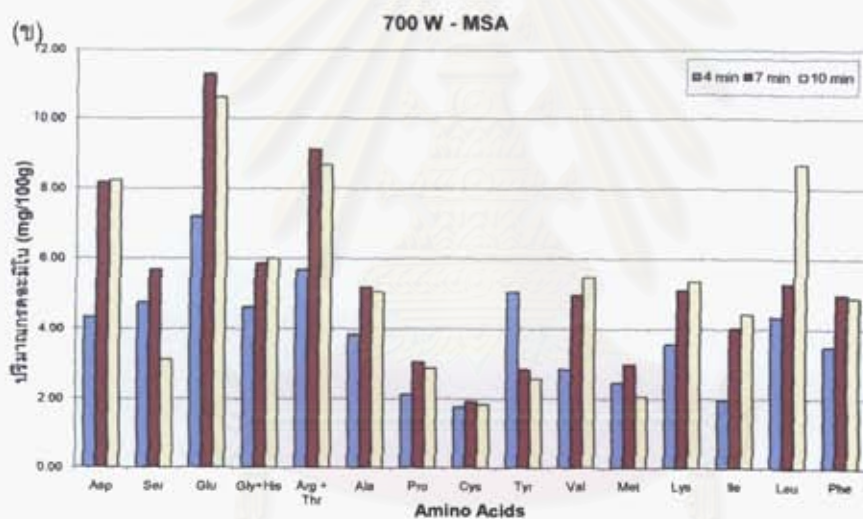
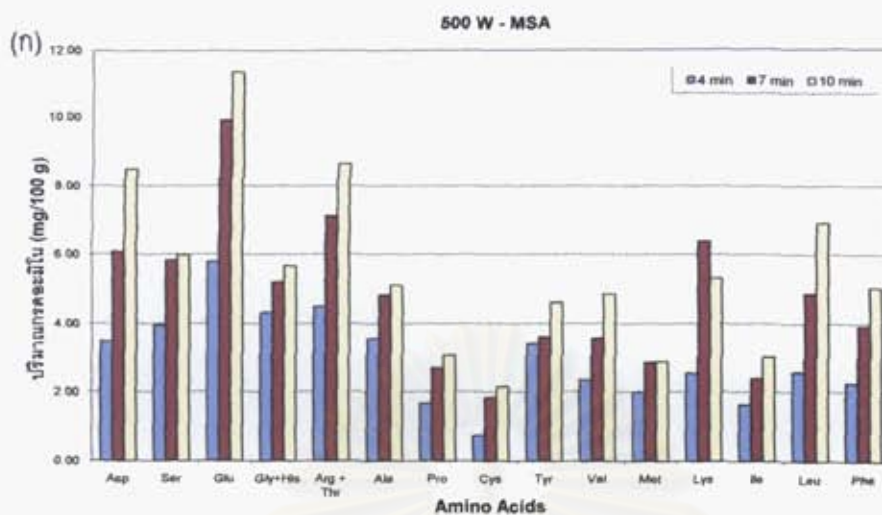


รูปที่ 3-1 ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน (mg/100 g) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วย 8M HCl ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ (ก) 500 W (ข) 700 W และ (ค) 900 W ที่เวลา 4, 7 และ 10 นาที

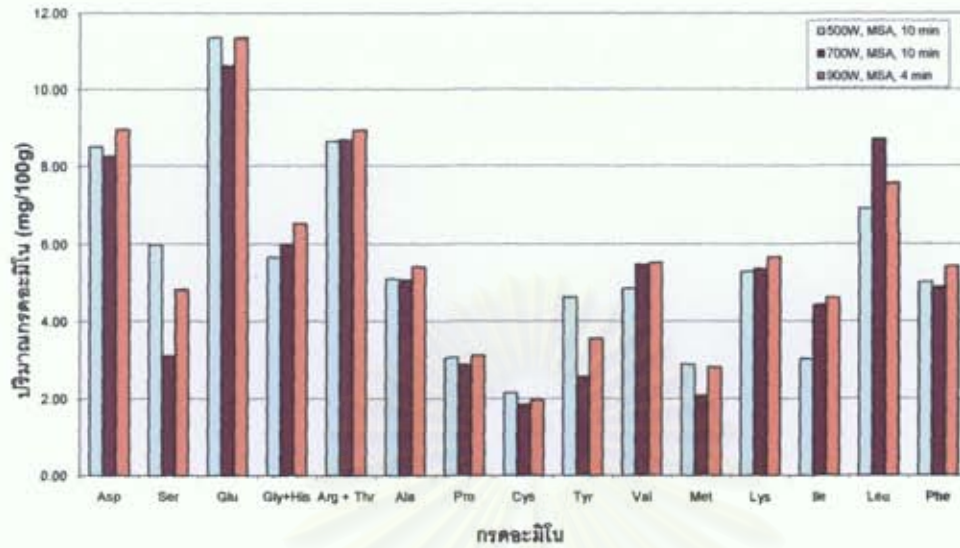


รูปที่ 3-2 ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน (mg/100 g) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วย 8M HCl ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 500W 10 นาที, 700W 10 นาที และ 900W 7 นาที

การไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วย 8 M MSA ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 500W, 700W และ 900W โดยแต่ละความแรงของคลื่นไมโครเวฟใช้เวลาในการให้คลื่นไมโครเวฟ 4, 7 และ 10 นาที ได้ปริมาณกรดอะมิโนจากการย่อยโปรตีนอัลบูมินดังรูปที่ 3-3 โดยพบว่าที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 500W สามารถย่อยโปรตีนได้ดีขึ้นเมื่อใช้เวลาในการให้คลื่นไมโครเวฟนานขึ้น โดยระยะเวลา 10 นาทีจะให้ผลของการย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโนอิสระได้ดีที่สุด และที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700W ที่เวลา 10 นาทีก็ให้ผลการย่อยโปรตีนดีที่สุด ส่วนที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W มีแนวโน้มของปริมาณกรดอะมิโนที่ลดลงเมื่อใช้เวลานานขึ้น ดังนั้น ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W ที่เวลา 4 นาที จึงให้ผลการย่อยสลายดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโปรตีนแบบไมโครเวฟด้วยกรดมีเทนซัลโฟนิกที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 500W 10 นาที ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700W 10 นาที และที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W 4 นาที ดังรูปที่ 3-4 พบว่าความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W 4 นาที จะให้ปริมาณกรดอะมิโนโดยรวมดีที่สุด

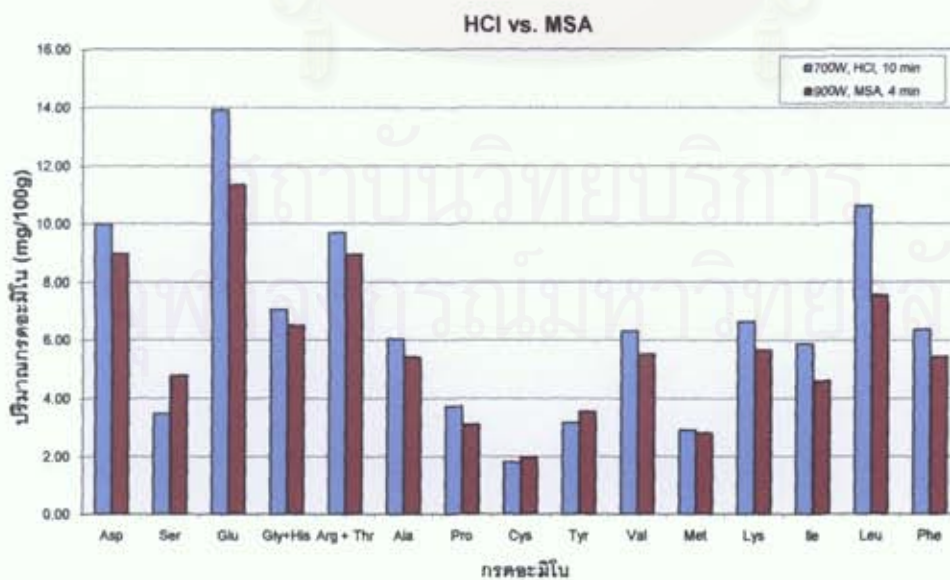


รูปที่ 3-3 ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน (mg/100 g) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วย 8M MSA ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ (ก) 500W (ข) 700W และ (ค) 900W ที่เวลา 4, 7 และ 10 นาที



รูปที่ 3-4 ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน (mg/100 g) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วย 8M MSA ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 500W 10 นาที, 700W 10 นาที และ 900W 4 นาที

เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วยภาวะที่ดัดที่สุดของกรดไฮโดรคลอริกกับกรดมีเทนซัลโฟนิก ดังรูปที่ 3-5 พบว่า การใช้กรดไฮโดรคลอริกในการทำไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟจะให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนที่ดีกว่ากรดมีเทนซัลโฟนิก



รูปที่ 3-5 ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมิน (mg/100 g) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วย 8M HCl ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700W 10 นาที และ 8M MSA ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W 4 นาที

3.3.3 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนเพื่อการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยการไฮโครไลซิสแบบสุญญากาศกับแบบไมโครเวฟ

จากการศึกษาภาวะที่ใช้ในการไฮโครไลซิสแบบไมโครเวฟพบว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8 M ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700 W นาน 10 นาที จะให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโนอิสระได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้จากการเตรียมตัวอย่างโปรตีนด้วยการไฮโครไลซิสแบบไมโครเวฟนี้ เปรียบเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างโปรตีนด้วยการไฮโครไลซิสแบบสุญญากาศ แสดงในตารางที่ 3-3

จากตารางที่ 3-3 ปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้จากการไฮโครไลซิสแบบไมโครเวฟมีค่าใกล้เคียงกับค่าอ้างอิงมากกว่าการไฮโครไลซิสแบบสุญญากาศ แสดงว่าสายโปรตีนมีการถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนอิสระได้ดีและกรดอะมิโนที่ถูกย่อยแล้วนี้ก็ไม่ถูกทำลายไป นอกจากนี้ การไฮโครไลซิสแบบสุญญากาศใช้เวลาในการย่อยสลายโปรตีนนาน 24 ชั่วโมง ส่วนการไฮโครไลซิสแบบไมโครเวฟใช้เวลาเพียง 10 นาที ซึ่งน้อยกว่ามาก ดังนั้นการไฮโครไลซิสโปรตีนแบบไมโครเวฟนอกจากจะทำลายกรดอะมิโนน้อยลงแล้ว เวลาที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างน้อยกว่าการไฮโครไลซิสแบบสุญญากาศที่ใช้เดิมมาก

ตารางที่ 3-3 ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมินจากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีไฮโครไลซิสแบบไฮโครไลซิสกับแบบไมโครเวฟด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8 M ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700 W 10 นาที

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมินจากเอกสารอ้างอิง ^a (g/100g)	ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนอัลบูมินจากการเตรียมตัวอย่างด้วยการไฮโครไลซิส (g/100g)	
		แบบสุญญากาศ	แบบไมโครเวฟ
Aspartic acid ^b	9.30	6.54	9.99
Serine	8.15	4.80	3.48
Glutamic acid ^c	16.50	10.12	13.91
Glycine + Histidine	5.40	4.38	7.06
Arginine + Throline	9.75	8.02	9.71
Alanine	6.72	4.32	6.04
Proline	3.60	2.56	3.74
Cystine	1.35	0.76	1.81
Tyrosine	3.68	2.70	3.19
Valine	7.05	4.89	6.32
Methionine	5.20	2.69	2.92
Lysine	6.30	4.79	6.65
Isoleusine	7.00	3.87	5.88
Leusine	9.20	6.50	10.65
Phenylalanine	7.66	4.29	6.39

^a จากเอกสารอ้างอิง

^b เป็นปริมาณรวมของ Asparagine และ Aspartic acid

^c เป็นปริมาณรวมของ Glutamine และ Glutamic acid

3.4 สรุปผลการทดลอง

การย่อยโปรตีนโดยการทำไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่เหมาะสมคือ การใช้ความเข้มข้น 8 M ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 700W เป็นเวลา 10 นาที และการทำไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟโดยใช้กรดมีเทนซัลโฟนิกที่เหมาะสมคือ การใช้ความเข้มข้น 8 M ที่ความแรงของคลื่นไมโครเวฟ 900W เป็นเวลา 4 นาที โดยการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟด้วยกรดไฮโดรคลอริกได้ปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้โดยรวมสูงกว่าการใช้กรดมีเทนซัลโฟนิก และเมื่อเปรียบเทียบกับกรไฮโดรไลซิสด้วยกรดแบบสุญญากาศ พบว่าการไฮโดรไลซิสแบบไมโครเวฟที่ทำการศึกษามีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโนอิสระดีกว่า

3.5 เอกสารอ้างอิง

- [1] Fountoulakis, M.; and Lahm, H.W., "Review: Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins", *J. Chromatogr. A*, **1998**, 826, 109-134.
- [2] Shyh-Hong, C.; and Kung-Tsung, W., "Peptide and protein hydrolysis by microwave irradiation", *J. Chromatogr.*, **1989**, 491, 424-431.
- [3] Weiss, M.; Manneberg, M.; Juranville, J.F.; Lahm, H.W.; and Fountoulakis, M., "Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins", *J. Chromatogr. A*, **1998**, 795, 263-275.
- [4] Joergensen, L.; and Thestrup, H.N., "Determination of amino acids in biomass and protein samples by microwave hydrolysis and ion-exchange chromatography", *J. Chromatogr. A*, **1995**, 706, 421-428.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล มล.ศิริพัสตร์ ไชยันต์
M.L.Siripastr Jayanta
2. ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ Email
 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
 โทรศัพท์ 02-218-7610 โทรสาร 02-254-1309
 Email: pjayanta@truemail.co.th

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขา	สถาบัน	ปีที่จบ (พ.ศ.)
วท.บ.	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2526
M.Sc.	Analytical Chemistry	California Polytechnic State University at San Obispo, USA	2529
M.Sc.	Physical Chemistry	State University of New York at Stony Brook, USA	2534
วท.ด.	Environmental Chemistry	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	กำลังศึกษา ต่อ

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
 การวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟี

6. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

6.1 ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติและในประเทศ

- 1) U. Koesukwiwat, S. Jayanta and N. Leepipatpiboon "Solid-phase extraction for multi-residue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk" *Journal of Chromatography A*, 1149 (2007) 102-111.
- 2) U. Koesukwiwat, S. Jayanta and N. Leepipatpiboon "Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk." *Journal of Chromatography A*, 1140 (2007) 147-156.
- 3) P. Sirikulchayanont, S. Jayanta, P. Pradipasena, and O. Miyawaki, "Characteristics of microparticulated particles from Mung Bean protein." *International Journal of Food Properties*, 10:3 (2007) 621-630.
- 4) N. Leepipatpiboon, O. Sae-Khow, and S. Jayanta "Simultaneous determination of bisphenol-A-diglycidyl ether, bisphenol-F-diglycidyl ether, and their derivatives in oil-in-water and aqueous-based canned foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection" *Journal of Chromatography A*, 1073 (2005) 331-339.

- 5) A. Klaikherd, S. Jayanta, J. Boonjawat, S. Aiba, and M. Sukwattanasinitt "Depolymerization of b-chitin to mono- and disaccharides by the serum fraction from the *para* rubber tree *Hevea brasiliensis*" *Carbohydrate Research*, 339 (2004) 2799-2804.

6.2 ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

- 1) N. Leepipatpiboon, M. Piriyaipittaya, S. Jayanta, "Hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid" Poster Presentation in 31st International Symposium on High Performance Liquid Phase separations and Related Techniques, HPLC2007, June 17-21, 2007 Ghent, Belgium.
- 2) M. Piriyaipittaya, S. Jayanta, and N. Leepipatpiboon "Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by hollow fiber supported liquid membrane microextraction followed by high performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detection" Poster Presentation in 32nd Congress on Science and Technology of Thailand, October 10-12, 2006, Bangkok, Thailand.
- 3) W. Nitayarek, S. Jayanta, S. Mitra, and N. Leepipatpiboon "Hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) with liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) for the determination of quaternary ammonium herbicides in water" Poster Presentation in 26th International Symposium on Chromatography, August 21-25, 2006, Copenhagen, Denmark.

6.3 โครงการวิจัยที่กำลังดำเนินการ

ลำดับที่	ผู้วิจัยหลัก	หัวข้อเรื่อง	แหล่งทุน	ปีที่ได้รับ
1	ผศ.มล.ศิริพัศตร์	การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อประเมินการปนเปื้อนจากบรรจุภัณฑ์อาหาร	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	2549-2550

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8.3 โครงการวิจัยที่กำลังดำเนินการ

ลำดับ ที่	ผู้วิจัยหลัก	หัวข้อเรื่อง	แหล่งทุน	ปีที่ได้รับ
1	ศิริพัสตร์ ไชยันต์	การวิเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนในพืชเกษตรกรรมของจังหวัดน่าน	งบประมาณแผ่นดิน	2547-2550
2	พุทธรักษา วรานุศุภากุล	การตรวจวัดแก๊สแอมโมเนียด้วยพอลิอะนิลีนผสมพอลิไวนิลแอลกอฮอล์	สกว. ร่วมกับ สกอ.	2549-2551
3	พุทธรักษา วรานุศุภากุล	การใช้พอลิเมอร์เป็นสารตกตะกอนกาวเสียในน้ำทิ้ง	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ	2550-2551

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาสมบัติเป็นสารกันหื้อจากพืชท้องถิ่นของจังหวัดน่าน

Antiradical activity of plant grown in *Nan*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาสมบัติเป็นสารกัมมันตภาพรังสีของดินของจังหวัดน่าน” เป็นโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การวิเคราะห์และการคัดแปรทางเคมีเพื่อการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่าน” ซึ่งได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2549 และ 2550 เพื่อดำเนินการ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ท
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	1
บทนำ	2
มะแขว่น	2
การทดลอง	4
การเก็บพืชตัวอย่าง	4
การเตรียมสกัดสารจากพืช	4
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสิ่งสกัดต่างๆ โดยวิธี bioautographic	4
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	4
ผลการศึกษา	5
การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดจากผลมะแขว่นเพิ่มเติม	13
วิธีการทดลอง	13
การเตรียมตัวอย่างและสกัดสารจากพืช	13
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันระเหย	13
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคพืช	13
ผลการศึกษา	14
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันระเหย	14
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคพืช	15
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
เอกสารอ้างอิง	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ข้าวเหนียวดำ	20
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
วิธีการทดลอง	21
การเก็บพืชตัวอย่าง	21
การเตรียมสกัดสารจากพืช	21
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสิ่งสกัดต่างๆ โดยวิธี bioautographic	21
การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดจากข้าวเหนียวดำเพิ่มเติม	23
สรุปผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	25
ประวัติผู้วิจัย	26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ผลการสกัดส่วนต่างๆของมะแขว่น	5
2	ผลจากการกลั่น ไขมันจากผลมะแขว่น	6
3	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสิ่งสกัดต่างๆ โดยวิธี bioautographic	6
4	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณวิเคราะห์จากสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะแขว่น	7
5	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1 mM	10
6	IC50 ของน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นและ terpinen-4-ol	18
7	ผลการสกัดข้าวเหนียวดำ	22
8	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นจากส่วนต่างๆของข้าวเหนียวดำด้วยวิธี bioautographic	22
9	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสิ่งสกัด ไคคลอย โรมีเทนและเมทานอล จากผลมะแขว่นด้วยวิธี disc diffusion assay	24
10	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสิ่งสกัด ไคคลอย โรมีเทนและเมทานอล จากข้าวเหนียวดำด้วยวิธี disc diffusion assay	24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

ปีที่		หน้า
1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BHT	7
2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะเขว่น	8
3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นมะเขว่นด้วยไดคลอโรมีเทน	8
4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นมะเขว่นด้วยเมทานอล	9
5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากผลมะเขว่นด้วยไดคลอโรมีเทน	9
6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากผลมะเขว่นด้วยเมทานอล	10
7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox	11
8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นมะเขว่นด้วยไดคลอโรมีเทน	11
9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นมะเขว่นด้วยเมทานอล	12
10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดจากผลมะเขว่นด้วยไดคลอโรมีเทน	12
11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition อนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดจากผลมะเขว่นด้วยเมทานอล	13
12	GC chromatogram of the essential oil from <i>Zanthoxylum limonella</i> fruit	15
13	Percentage inhibition of phytopathogenic fungi in the presence of <i>Z. limonella</i> crude essential oil and major components at 5000 rpm	16

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
14	Percentage inhibition of phytopathogenic fungi in the presence of <i>Z. limonella</i> crude essential oil (a) and terpinen-4-ol (b) at 1000, 25000 and 5000 rpm	17
15	A แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น โดยใช้นุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากไคคลอยโรมีเทน (solvent system: 60% Dichloromethane/40% Hexane) A แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น โดยใช้นุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากเมทานอล (solvent system: 70% Dichloromethane/30% acetate)	23



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาสมบัติเป็นสารกันเหี่ยวจากพืชท้องถิ่นของจังหวัดน่าน

วรินทร์ ชาศิริ¹, พันธิพา จันทวัฒน์², ธนจันทร์ มหาวณิช²

¹ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*ผู้ติดต่อประสานงาน

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะแขว่น (*Zanthoxylum limonella* Alston) พบว่าสารสกัดจากเปลือก ลำต้น และผลมะแขว่นมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในขณะที่สารสกัดจากใบและน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาเชิงปริมาณวิเคราะห์พบว่าสารสกัดจากลำต้นมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด น้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นที่กลั่นด้วยไอน้ำประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด ได้แก่ sabinene, limonene และ terpinen-4-ol น้ำมันหอมระเหยและสารที่เป็นองค์ประกอบหลักทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชโดย terpinen-4-ol เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ ผลมะแขว่น ข้าวเหนียวดำ การต้านอนุมูลอิสระ

Antiradical activity of plant grown in Nan

Warintorn Chavasiri¹, Pantipa Jantawat², Thanachan Mahawanich²

¹Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

²Food Technology Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

*Corresponding author

Abstract

This study aimed to investigate the antiradical action of crude extracts from *Ma Khwaen* or Indian prickly ash (*Zanthoxylum limonella* Alston) and black glutinous rice. The extracts from bark, stem and fruit of *Ma Khwaen* were shown to possess DPPH antiradical activity while the leaf extract and crude essential oil from the fruit showed no antiradical activity. Quantitative evaluation revealed that the stem extract possessed highest antiradical activity. Crude essential oil from the fruit consisted of 3 major constituents: sabinene, limonene and terpinen-4-ol. Both essential oil and the three major constituents were shown to have antifungal activity against phytopathogenic fungi with the highest activity demonstrated by terpinen-4-ol. The extracts of black glutinous rice shown antiradical action.

Key word: *Ma Khwaen*, Indian prickly ash, *Zanthoxylum limonella* Alston, Black glutinous rice, *Oryza sativa* Poaceae, Antiradical

บทนำ

มะแขว่น *Zanthoxylum limonella* Alston จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae และข้าวเหนียวดำ *Oryza sativa* จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae เป็นพืชที่พบได้ในจังหวัดน่าน

มะแขว่น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มะเข็ญ (Zanthoxylum limonella Alston) เป็นพืชวงศ์ Rutaceae พบมากทางภาคเหนือของประเทศไทย มีชื่อท้องถิ่นหลายชื่อ ได้แก่ ลูกระมาต หมากมาต (กรุงเทพฯ) กำจัด พริกหอม (ภาคกลาง) มะเข็ญ หมักข่วง (แม่ฮ่องสอน) กำจัดตัน เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่มีหนามตามลำต้นและกิ่งก้าน ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับกัน มีใบย่อยประมาณ 6-8 คู่ ใบมีลักษณะยาวรีหรือรูปขอบขนาน ฐานใบไม่เสมอกัน ปลายใบเรียวแหลม ดอกออกเป็นช่อและก้านดอกยาว ดอกมีขนาดเล็กสีขาวอมเขียว เป็นดอกไม้สมบูรณ์เพศ คือดอกเพศเมียและเพศผู้อยู่บนละต้น โดยจะออกดอกประมาณเดือนมีนาคม - เมษายน ผลมีลักษณะแห้งกลม ผิวขรุขระสีน้ำตาล เมื่อแก่ผลจะแตกจนเห็นเมล็ดสีดำกลม ผิวเรียบเป็นมัน มีกลิ่นหอมฉุนคล้ายผักชี มีรสเผ็ดเล็กน้อย มีสรรพคุณทางแพทย์แผนโบราณใช้ผลเป็นยาบำรุงหัวใจ บำรุงโลหิต ขับลม ช่วยให้เจริญอาหาร แก้วเวียนศรีษะ ขับระดู แต่ไม่ใช้กับหญิงมีครรภ์ นอกจากนี้ยังใช้ในการประกอบอาหารโดยจะใช้ส่วนของใบอ่อนและผล โดยใบและยอดอ่อนรับประทานเป็นผักสดจิ้ม น้ำพริก ลาบ ยำ ผลเป็นเครื่องเทศที่นิยมในภาคใต้และภาคเหนือ โดยเฉพาะทางภาคใต้นิยมให้ผสมในเครื่องแกง เช่น แกงผักทอง แกงปลาไหล เป็นต้น ช่วยให้แกงมีรสเผ็ดร้อนและมีกลิ่นหอม ส่วนของผลมะเข็ญนำมาใช้เป็นเครื่องเทศประกอบอาหาร

จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงพบว่ามียางานการการพบวิตามินอีในส่วนเมล็ดของมะเข็ญ (Fish *et al.*, 1975) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากผลมะเข็ญที่ได้จากการกลั่นไอน้ำด้วย GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบ 33 ชนิด และน้ำมันระเหยมะเข็ญมีผลช่วยเพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว ลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา โดยมีกลไกการออกฤทธิ์แบบไม่เฉพาะเจาะจง (Ittipanichpong *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นข้อมูลที่สนับสนุนได้ว่าน้ำมันหอมระเหยมะเข็ญน่าจะส่งผลดีต่อการหมุนเวียนโลหิตและระบบทางเดินอาหารได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยมะเข็ญมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายซึ่งเป็นพาหะในการเกิดโรคไข้เลือดออกได้ (Pitasawat *et al.*, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Trongtokit และคณะ, 2005 ที่ได้ทดสอบน้ำมันหอมระเหยกับอาสาสมัครโดยทาน้ำมันหอมระเหยที่ไม่เจือจาง 0.1 mL ที่ผิวหนังพื้นที่ 30 cm² พบว่าสามารถกันยุงได้นานมากกว่า 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ Murakami และคณะ, 1995 ได้ศึกษาพืชสมุนไพร 112 สปีชีส์ของประเทศไทยโดยทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดเมทานอลจากผลแห้งของมะเข็ญ พบว่าสามารถต้านการเกิดเซลล์มะเร็งได้สูง เมื่อทดสอบการยับยั้งการทำงานของ Epstein-Barr virus ใน Raji cell ในปี 1989 Kalyani และคณะ รายงานผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากผลแห้งของมะเข็ญ พบว่ามีฤทธิ์ฆ่าพยาธิ (Anthelmintic activity) ทั้งพยาธิตัวกลม, พยาธิตัวแบนและพยาธิปากขอได้ และให้ผลดีกว่าการใช้สาร piperazine phosphate

รายงานการวิจัยจากใบของมะเข็ญ พบว่า Setzer และคณะ, 2004 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบของ Zanthoxylum (Rutaceae) 5 สปีชีส์ โดยใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำและวิเคราะห์โดยใช้ GC-MS ได้แก่ Z. fagara, Z. acuminatum, Z. melanostictum, Z. monophyllum และอีกสายพันธุ์ที่ยังไม่ทราบแน่ชัด องค์ประกอบของสารส่วนใหญ่ของน้ำมันหอมระเหยจากใบ ได้แก่ acyclic และ menthane monoterpenoids, aldehydes และ ketones โดยที่monoterpene เป็นสารหลักที่พบมาก

ที่สุดในน้ำมันระเหยจากใบ *Z. monophyllum*, *Z. acuminatum*, *Z. fagara* และ *Zanthoxylum* sp. ส่วน linalool, 4-terpineol, α -terpineol และ *trans*-2-hexanol พบใน *Zanthoxylum* ทุกปีชีส์ที่ทำการศึกษ

งานวิจัยในส่วนของเปลือก จากงานวิจัยของ Samy และคณะ, 1998 พบว่าได้ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกของ *Zanthoxylum limonella* Dennst. Alston ประเทศอินเดียต่อฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ได้แก่ *E. coli*, *K. aerogenes*, *P. vulgaris*, *P. aerogenes* ที่ความเข้มข้น 1,000-5,000 ppm พบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้น 4,000 และ 5,000 ppm

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ยังไม่มีผู้ใดศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะเข็ญ รวมทั้งองค์ประกอบทางเคมีของมะเข็ญอย่างเป็นระบบ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของมะเข็ญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการทดลอง

ส่วนมะเข็ญ

1. การเก็บตัวอย่างพืช

รวบรวมส่วนเปลือกและลำต้นมะเข็ญจากจังหวัดเชียงใหม่ และผลมะเข็ญจากจังหวัดแพร่

2. การเตรียมสกัดสารจากพืช

นำเปลือก, ลำต้นและผลมะเข็ญมาล้างให้แห้งและนำไปบดละเอียด ซึ่งน้ำหนักเริ่มต้นและแช่ในไดคลอโรมีเทนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน กรองสิ่งสกปรกที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนกากที่เหลือมาแช่ด้วยเมทานอลเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ Rotary vacuum evaporator แล้วชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้

สำหรับผลมะเข็ญที่เก็บมาล้างให้แห้ง นำมาบดละเอียดและศึกษาน้ำมันระเหยโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ น้ำมันระเหยที่กลั่นแล้วเก็บที่ 4°C เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสิ่งสกัดต่างๆ โดยวิธี bioautographic

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบของสารสกัดที่ได้ด้วย TLC เพื่อหาวิฤภาคตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสม นำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสง UV ทำสัญลักษณ์ไว้ แล้วทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นโดยการสเปรย์ (spray) ด้วย 0.2% DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) ในเมทานอล ตรวจสอบผลภายใน 5 นาทีหลังจากสเปรย์อนุมูลอิสระ DPPH ถ้าสารใน spot โคนบน TLC แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะปรากฏเป็นจุดสีเหลืองบนพื้นหลังสีม่วง

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

นำสารสกัดตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้ทดสอบเบื้องต้นมาศึกษาปริมาณวิเคราะห์ โดยทดสอบกับอนุมูลอิสระ 2 ชนิด ได้แก่ อนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

4.1 DPPH method

เตรียมสารละลาย DPPH 0.6 mM ในเอทานอล นำตัวอย่างสิ่งสกัด 500 μ L เติมลงในสารละลาย DPPH 500 μ L เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 20 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ในการทดลองนี้ใช้ butylate hydroxytoluene (BHT) เป็นสารมาตรฐาน คำนวณผล

โดยการหาค่า % inhibition ดังสมการ และคำนวณความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (EC_{50})

$$\%inhibition = \left[\frac{A_{blank} - A_{extract}}{A_{blank}} \right] \times 100$$

4.2 Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) assay

เตรียมสารละลาย 2,2'-azinodi-3-ethylbenzthiazoline sulphonate (ABTS) โดยชั่ง ABTS 0.04 g ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน 5 mL เติมสารละลาย potassium persulfate (0.014 g ในน้ำที่ปราศจากไอออน 10 mL) 5 mL ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดข้ามคืน ก่อนนำมาใช้ทดสอบ นำสารละลาย ABTS มาเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรเท่ากับ 0.8 ± 0.05 จากนั้นนำสารตัวอย่าง 50 μ L เติมลงในสารละลาย ABTS ที่เตรียมไว้ 450 μ L วัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นจะได้ค่า A_1 ทิ้งไว้ 1 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงจะได้ค่า A_2 จดบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ในการวิเคราะห์นี้จะใช้ Trolox ความเข้มข้น 1mM เป็นสารมาตรฐาน โดยค่าที่รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารตัวอย่างจะเป็นค่าเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1 mM

ผลการศึกษา

ผลการสกัดส่วนต่างๆ ของมะแขว่น ได้แก่ เปลือก, ลำต้นและผลมะแขว่น ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ไดคลอโรมีเทนและเมทานอลแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการสกัดส่วนต่างๆ ของมะแขว่น

ส่วนที่ศึกษา	น้ำหนัก (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)		%ผลผลิต	
		สกัดด้วย CH_2Cl_2	สกัดด้วย MeOH	สกัดด้วย CH_2Cl_2	สกัดด้วย MeOH
เปลือก	500	10.42	ไม่ได้ศึกษา	2.08	ไม่ได้ศึกษา
ลำต้น	6,000	65.78	46.2	1.10	0.77
ใบ	361.78	19.90	ไม่ได้ศึกษา	5.49	ไม่ได้ศึกษา
ผล	69.28	10.53	5.94	15.20	8.57

จากตารางที่ 1 พบว่าผลมะแขว่นเป็นส่วนที่ให้ %ผลผลิตสูงสุด

ผลมะแขว่นมีกลิ่นฉุนคล้ายพริกไทย ได้สกัดผลมะแขว่นด้วยวิธีการ hydrodistillation เพื่อแยกน้ำมันระเหย ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลจากการกลั่นไอน้ำจากผลมะเข็ญ

ส่วนที่ศึกษา	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักน้ำมันหอมระเหย (กรัม)	%ผลผลิต
ผล	1,000	116.32	11.63

เมื่อนำสารสกัดจากส่วนต่างๆ มาทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยทำการศึกษาเบื้องต้นโดยวิธี bioautographic โดยการสเปรย์อนุมูลอิสระ DPPH ลงบนแผ่น TLC ที่มีการแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของมะเข็ญอย่างหยาบ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นจากส่วนต่างๆ ของมะเข็ญด้วยวิธี bioautographic

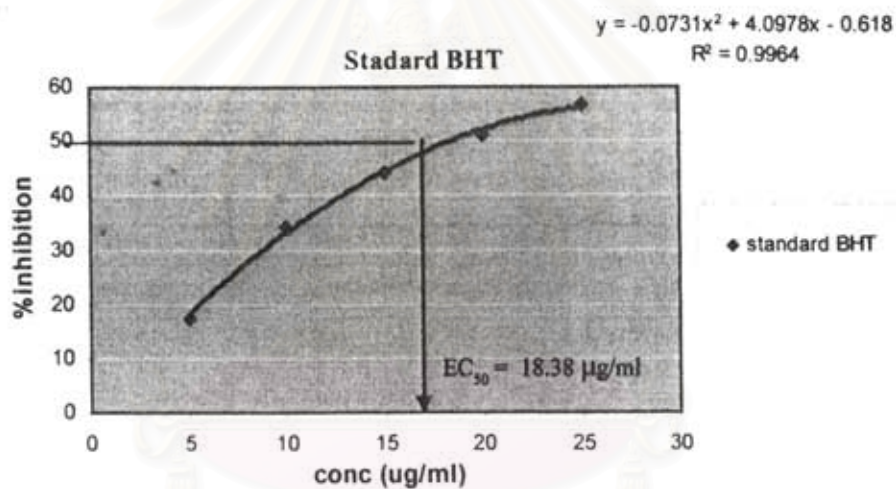
ส่วน	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น
เปลือก (สกัดด้วย CH_2Cl_2)	มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ลำต้น (สกัดด้วย CH_2Cl_2)	มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ลำต้น (สกัดด้วย MeOH)	มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ใบ (สกัดด้วย CH_2Cl_2)	ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ผล (สกัดด้วย CH_2Cl_2)	มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ผล (สกัดด้วย MeOH)	มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
น้ำมันระเหย	ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากตารางที่ 3 พบว่าสารสกัดโคคลอโรมีเทนและเมทานอลของเปลือก, ลำต้นและผลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เนื่องจาก spot สารบนแผ่น TLC สามารถฟอกจางสีม่วงของอนุมูลอิสระ DPPH ได้ โดยฟอกจางเป็นจุดสีเหลืองบนพื้นที่ม่วง ส่วนสารสกัดในส่วนของใบและน้ำมันหอมระเหยไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ได้นำสารสกัดในส่วนเปลือก, ลำต้น และผลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบเบื้องต้น มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อเชิงปริมาณวิเคราะห์ โดยใช้อนุมูลอิสระ DPPH ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4 และรูปที่ 1-6

ตารางที่ 4ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณวิเคราะห์จากสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของมะเขັน

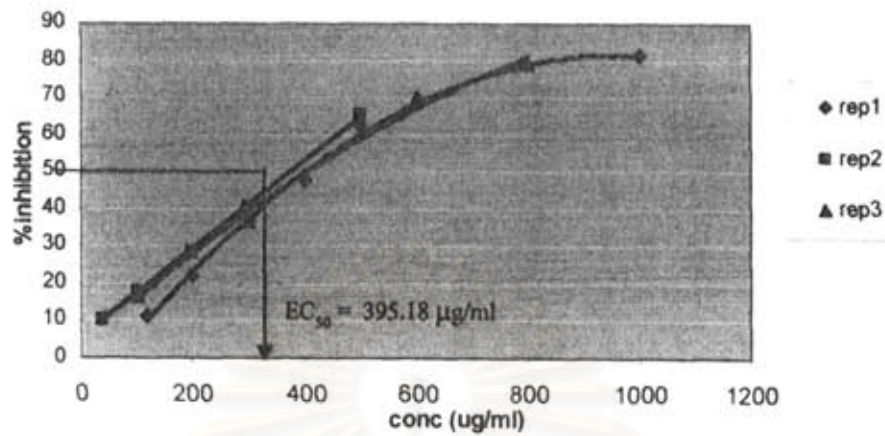
สารสกัด	EC ₅₀ (µg/mL)
เปลือก (สกัดด้วย CH ₂ Cl ₂)	395.18
ลำต้น (สกัดด้วย CH ₂ Cl ₂)	117.47
ลำต้น (สกัดด้วย MeOH)	57.55
ผล (สกัดด้วย CH ₂ Cl ₂)	1,379.79
ผล (สกัดด้วย MeOH)	144.26
สารมาตรฐาน BHT	18.38



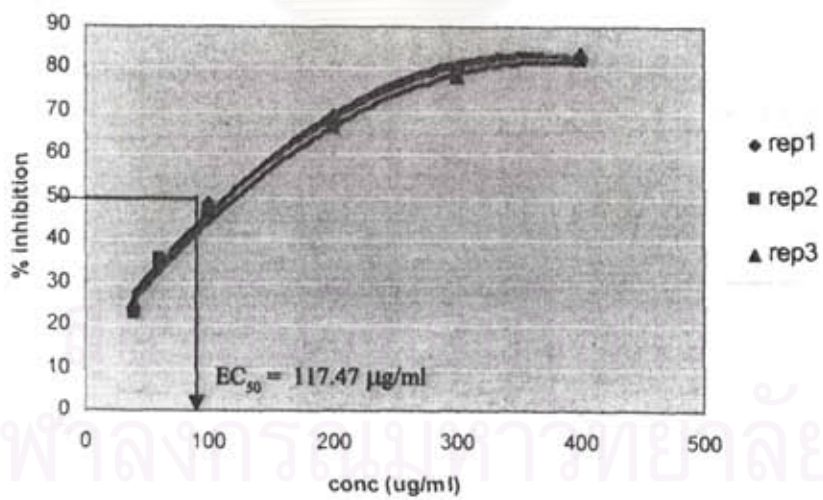
รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BHT

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

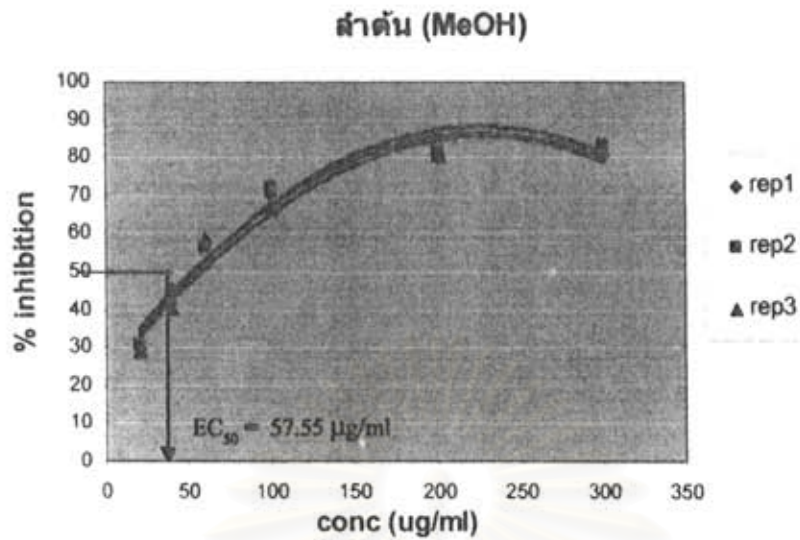
เปลือก



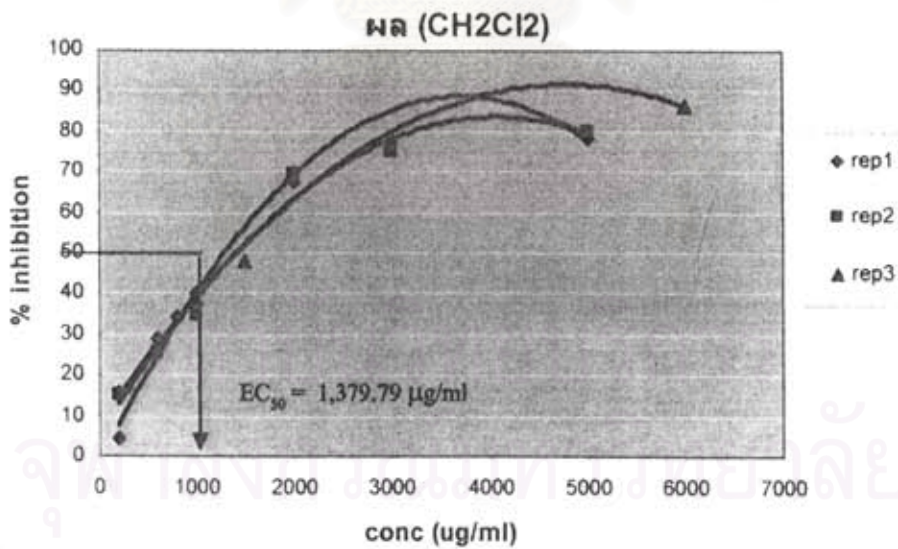
รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะเขว่น

ลำต้น (CH₂Cl₂)

รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากลำต้นมะเขว่นด้วยไดคลอโรมีเทน

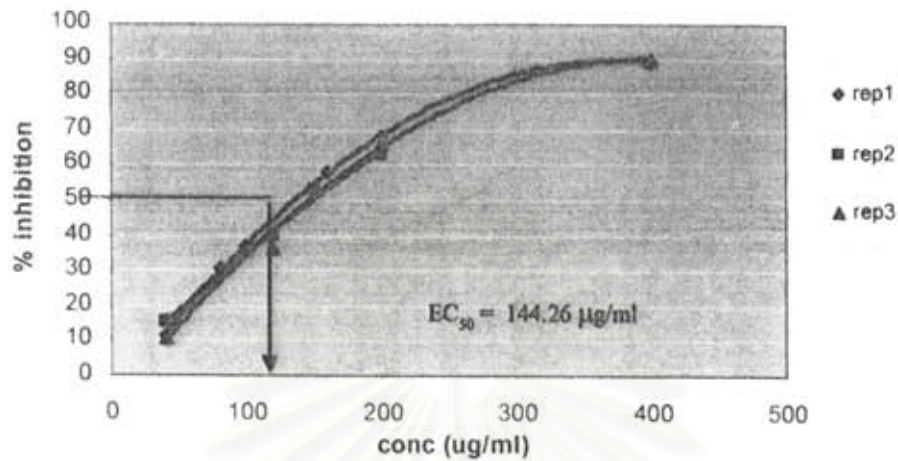


รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากลำตันมะเขว่นด้วยเมทานอล



รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากผลมะเขว่นด้วยไดคลอโรมีเทน

ผล (MeOH)

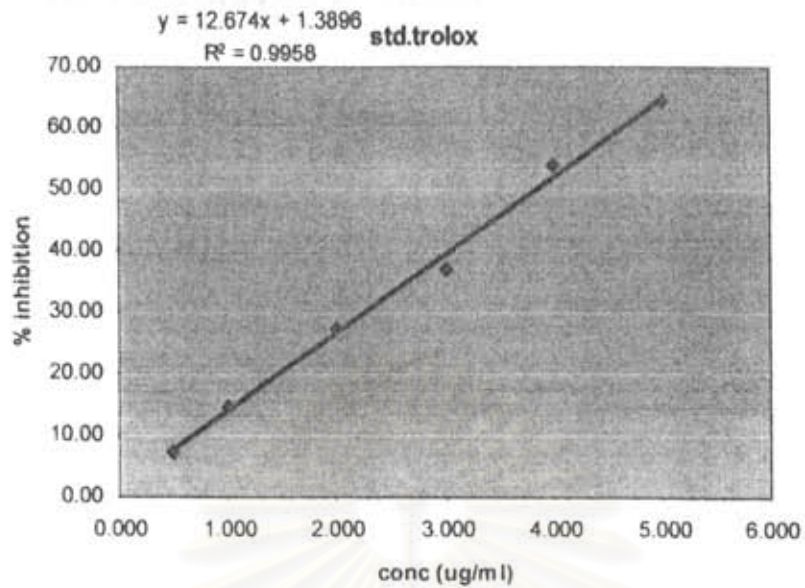


รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition อนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารสกัดจากผลมะเขว่นด้วยเมทานอล

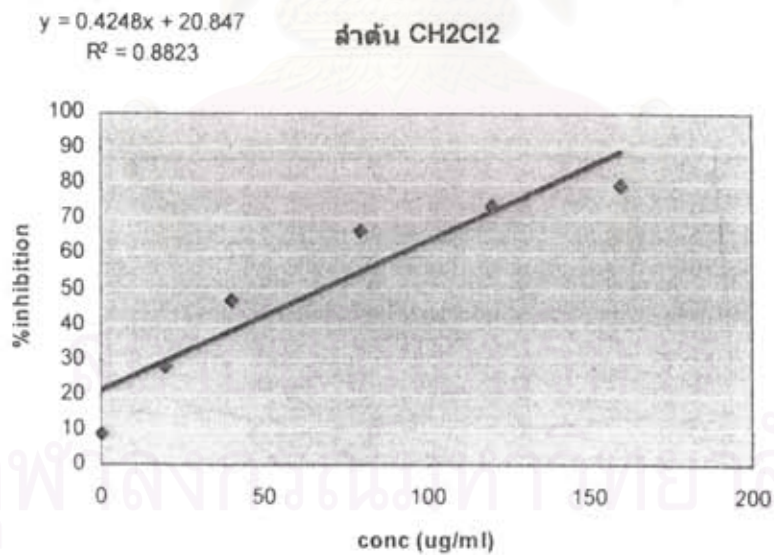
จากตารางที่ 4 และรูปที่ 1-6 พบว่าค่า EC_{50} ของสารสกัดในส่วนของลำต้นทั้งที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล มีค่า EC_{50} ต่ำกว่าสารสกัดในส่วนของผลและเปลือก แสดงว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% และได้ศึกษายืนยันผลอีกครั้งโดยการทดสอบปริมาณวิเคราะห์จากอนุมูลอิสระอีกชนิดหนึ่ง คือ ABTS โดยทำการศึกษาในส่วนของลำต้นและผลมะเขว่น ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 5 และรูปที่ 7-11

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1 mM

สารสกัด	$A_{\text{sample}}/A_{\text{Trolox}}$
ลำต้น (สกัดด้วย CH_2Cl_2)	0.0318
ลำต้น (สกัดด้วย MeOH)	0.0642
ผล (สกัดด้วย CH_2Cl_2)	0.0028
ผล (สกัดด้วย MeOH)	0.0239
สารมาตรฐาน trolox	1.0000



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition ของอนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดจากสารมาตรฐาน trolox

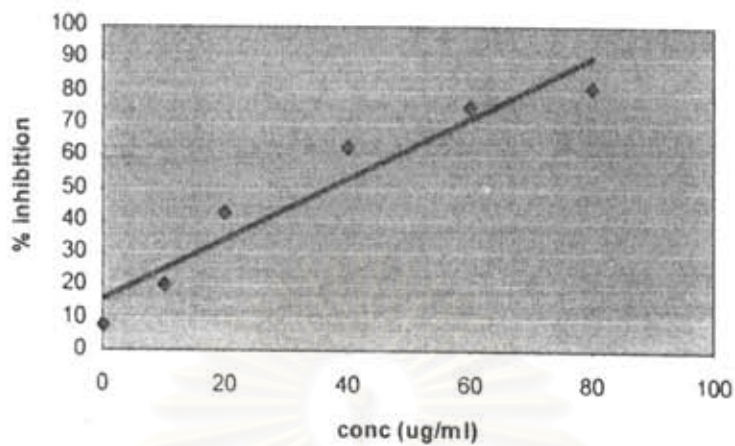


รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition ของอนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดจากสารสกัดลำต้นด้วยไดคลอโรมีเทน

$$y = 0.9328x + 15.471$$

$$R^2 = 0.9228$$

สกัด MeOH

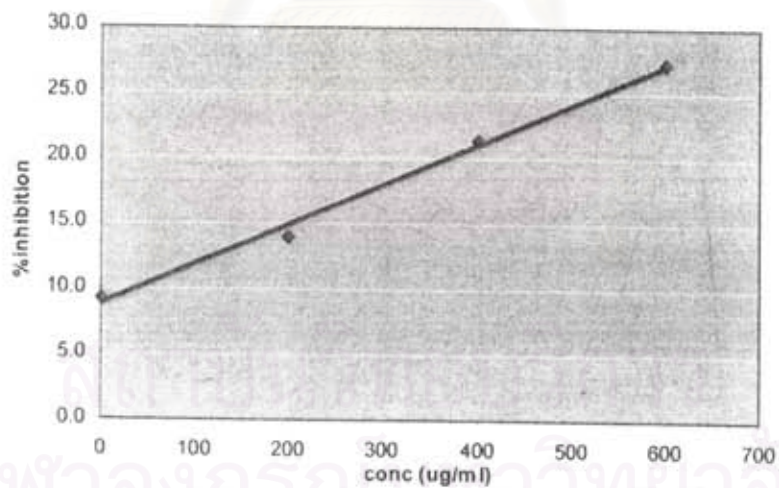


รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition ของอนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดจากสารสกัดลำต้นด้วยเมทานอล

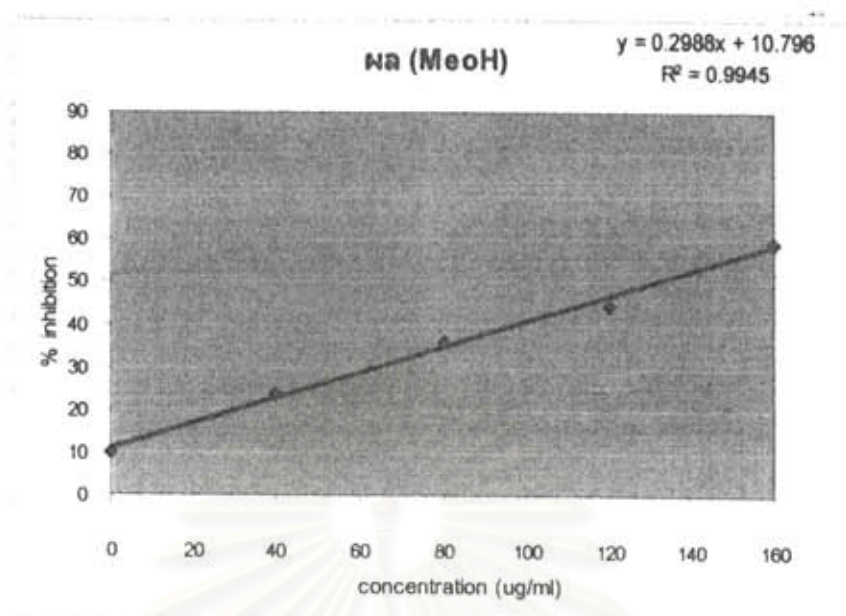
สกัด CH₂Cl₂

$$y = 0.0305x + 8.7644$$

$$R^2 = 0.9937$$



รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition ของอนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดจากสารสกัดผลด้วยไดคลอโรมีเทน



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition ของอนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดจากสารสกัดผลด้วยเมทานอล

จากตารางที่ 5 และรูปที่ 7-11 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ให้ผลสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยพิจารณาจากค่าการคำนวณเปรียบเทียบความชันของสารสกัดต่อความชันของสารมาตรฐาน Trolox สารใดที่มีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าสารนั้นมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดี จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากลำต้นที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากลำต้นที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดจากผลมะแขว่นเพิ่มเติม

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืชและพฤษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น
วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างและสกัดสารจากพืช

รวบรวมผลมะแขว่นจาก อ.หนองม่วงไข่ จ.แพร่ จากนั้นนำผลมะแขว่นที่เก็บมาล้างให้แห้ง นำมาบด และกลั่นด้วยไอน้ำ น้ำมันระเหยที่กลั่นแล้วเก็บที่ 4°C เพื่อนำมาวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืช

2. การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบเคมีของน้ำมันระเหย

น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้จากข้อ 1 ทำการตรวจวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของสารด้วยเครื่อง GC โดยใช้ ether เป็นตัวทำละลายน้ำมันหอมระเหยในการวิเคราะห์

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืช

3.1 การเตรียมเชื้อรา

ทดสอบกับเชื้อราก่อโรคพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Corynespora cassiicola*, *Exserohilum turcicum*, *Fusarium* sp. (แยกจากใบสัปรดที่เป็นโรค) และ *Curvularia* sp. (แยกจากใบสัปรดที่เป็นโรค) การเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (29-30°C) เป็นเวลา 7 วัน

3.2 การทดสอบเชื้อรา

ทดสอบโดยดัดแปลงวิธี Agar incorporation method (การเจือจางสารทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ) ตามวิธีของ Dwivedy และ Dubery (1993) นำน้ำมันหอมระเหยและสารองค์ประกอบหลักมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วย 0.1% tween 80 จากนั้นตุ้บสารตัวอย่างที่เจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดอาหาร PDA ที่หลอมแล้วซึ่งมีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับชุดควบคุมใช้ 0.1% tween 80 แทนสารตัวอย่าง เมื่ออาหารวันแข็งก็ทำการย้ายเชื้อราที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1 โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยของเชื้อราพร้อมทั้งวันอาหารออกเป็นชิ้นกลม ใช้เข็มเย็บวันที่มีเชื้อราย้ายไปวางบนจุดกึ่งกลางของจานอาหาร PDA ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยและสารองค์ประกอบหลักแล้ว ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (29-30°C) เป็นเวลา 7 วัน ในการตรวจสอบผลจะวัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในแต่ละซ้ำ มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังนี้

$$\text{การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(d_c - d_e) \times 100}{d_c}$$

d_c คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานเลี้ยงเชื้อในชุดควบคุม

d_e คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

ผลการศึกษา

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

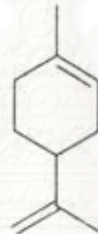
จากการกลั่นผลมะแข่นด้วยไอน้ำ ได้ผลิตผลของน้ำมันหอมระเหยมะแข่น 11.63% ของน้ำหนักแห้ง และนำน้ำมันที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันโดยใช้ GC พบว่ามีสารที่เป็นองค์ประกอบมากมาย โดยมีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ sabinene (55.76%), limonene (28.04%) และ terpinen-4-ol (4.92%) ตามลำดับ (ดังรูปที่ 12) ซึ่งจากผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ittipanichpong et.al., 2002 ซึ่งรายงานว่าพบสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแข่น 33 ชนิดและสารที่เป็นองค์ประกอบหลักเหมือนกัน แต่ต่างกันที่ความเข้มข้นของสาร ได้แก่ limonene (31.09%), terpinen-4-ol (13.94%) และ sabinene (9.13%)



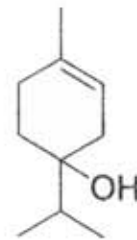
รูปที่ 12 GC chromatogram of the essential oil from *Zanthoxylum limonella* fruit



Sabinene



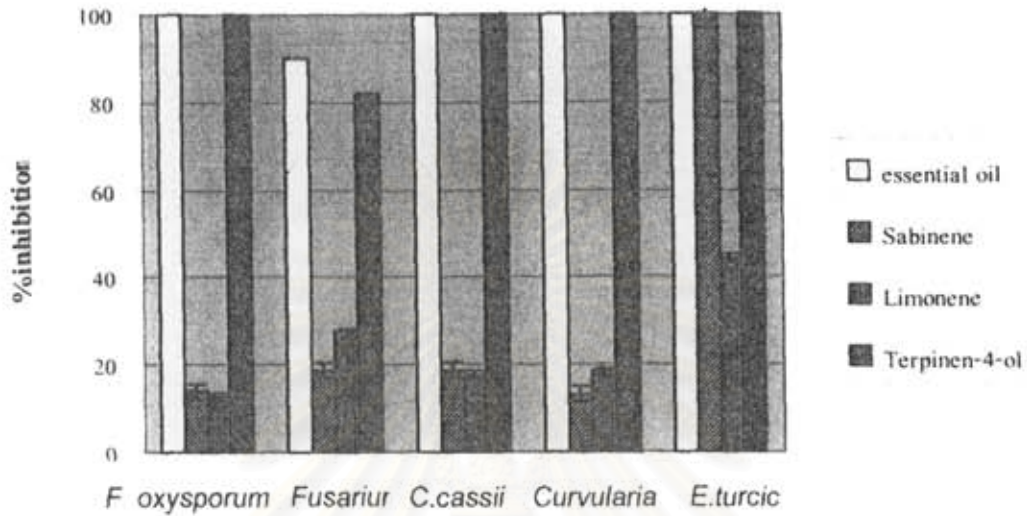
Limonene



Terpinen-4-ol

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืช

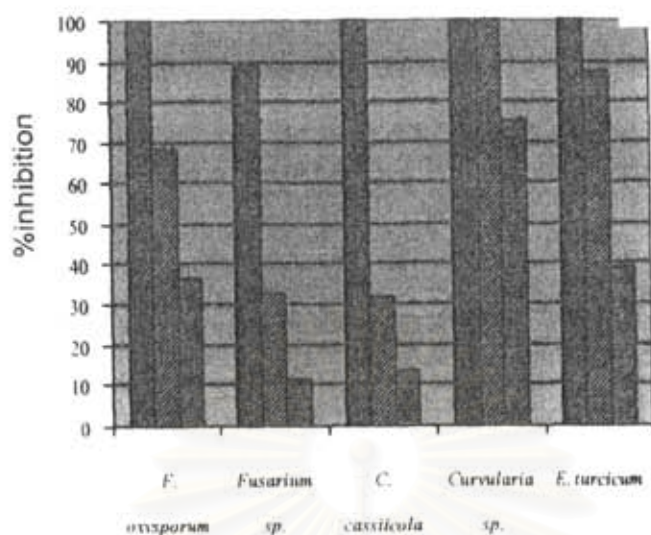
เมื่อทดสอบน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อราก่อโรคพืชทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในน้ำมันหอมระเหยกับสารองค์ประกอบหลักในน้ำมันโดยใช้ความเข้มข้นเดียว คือ 5,000 ppm (รูปที่ 13) พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้ดีมากโดยมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 100% เกือบทั้งหมด ยกเว้นเชื้อ *Fusarium* sp. ซึ่งจะมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 90% และเมื่อเปรียบเทียบกับสารองค์ประกอบหลัก พบว่า terpinen-4-ol มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้ดีที่สุดโดยให้ค่าที่ใกล้เคียงกับน้ำมันหอมระเหย ในขณะที่ sabinene และ limonene นั้นยับยั้งการเจริญของเชื้อราน้อยกว่า ถ้าพิจารณาในแง่ความไว (sensitivity) ของเชื้อราแต่ละชนิดต่อน้ำมันหอมระเหยและสารองค์ประกอบหลักพบว่าเชื้อรา *Exserohilum tericum* จะมีความไวมากที่สุดเนื่องจากถูกยับยั้งได้โดยน้ำมันหอมระเหย, terpinen-4-ol และ sabinene ได้ 100% ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ในขณะที่เชื้อราชนิดอื่นๆ นั้นไม่สามารถถูกยับยั้งได้ 100% ด้วย sabinene



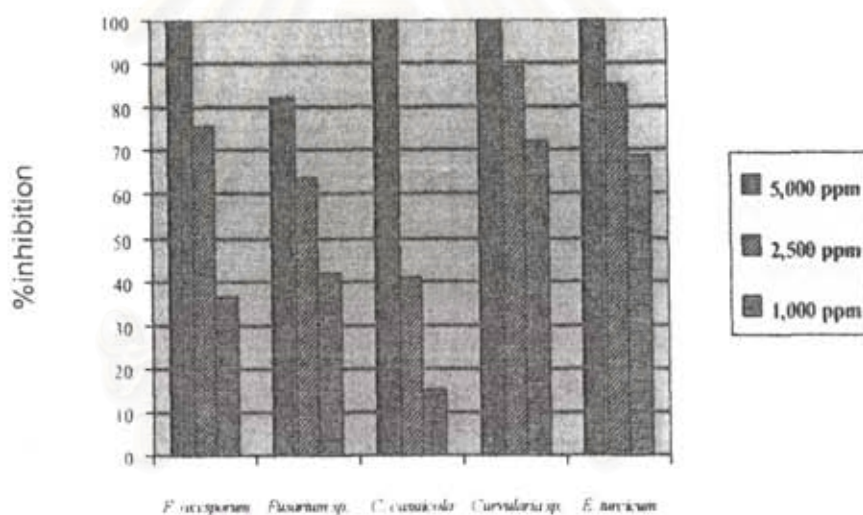
รูปที่ 13 Percentage inhibition of phytopathogenic fungi in the presence of *Z. limonella* crude essential oil and major components at 5,000 ppm.

จากผลการทดสอบข้างต้นพบว่า น้ำมันหอมระเหยและ terpinen-4-ol มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบโดยปรับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยและ terpinen-4-ol ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1,000, 2,500 และ 5,000 ppm ตามลำดับ ดังรูปที่ 14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(a)



(b)

รูปที่ 14 Percentage inhibition of phytopathogenic fungi in the presence of *Z. limonella* crude essential oil (a) and terpinen-4-ol (b) at 1,000 , 2,500 and 5,000 ppm.

จากผลการยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆ สามารถหาค่า IC_{50} ได้แสดงดังตารางที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} จะเห็นได้ว่า เมื่อทดสอบฤทธิ์ด้วย terpinen-4-ol ส่วนใหญ่จะมีค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่าของน้ำมันหอมระเหยแสดงว่าความเข้มข้นของ terpinen-4-ol ที่น้อยกว่าน้ำมันหอมระเหยก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสาร terpinen-4-ol ที่ใช้ในการทดสอบเป็นสารบริสุทธิ์จึงมีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยมีสารองค์ประกอบอื่นๆ ผสมอยู่ด้วยการออกฤทธิ์อาจไม่สูงเท่ากับสาร terpinen-4-ol บริสุทธิ์ แต่ค่า IC_{50} ที่ได้ในการยับยั้งเชื้อราบางชนิดใกล้เคียงกัน ได้แก่ *Corynespora cassicola* (IC_{50} = 2,905

จนกว่าจะนำมาใช้เป็นสมุนไพร โดยส่วนใหญ่แล้ว สีที่ปรากฏขึ้นบนส่วนต่างของต้นข้าวเหนียวดำ เกิดจากรังควัตถุแอนโทไซยานินและรงควัตถุที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sagano (1997) รายงานว่าการบริโภคข้าวสามารถลดระดับ cholesterol ในเลือด ซึ่งเป็นผลจากฤทธิ์ antioxidant สารหลักๆ ที่พบคือ γ -oryzanol และ tocotrienols ต่อมาได้มีการวิจัยของ Ling และคณะ (2001) พบว่าการให้กระต่ายกินข้าวดำ (Black rice) แทนข้าวขาวทำให้ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของ HDL (high-density lipoprotein) ในเลือดของกระต่ายที่มีระดับ cholesterol ในเลือดสูง (hypercholesteremia) ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการลดขนาดของผนังหลอดเลือดแดงที่หนาขึ้น ซึ่งช่วยลดการตีบตันของหลอดเลือดแดง นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Xin และคณะ (2003) พบว่าการให้หนูกิน Black rice จะช่วยลดการเกิดหลอดเลือดหัวใจตีบและยังช่วยลดการเกิดปฏิกิริยา oxidation อีกทั้งยังช่วยลดการอักเสบได้ จากผลนี้ทำให้สรุปได้ว่าใน Black rice จะต้องมีสารประกอบซึ่งพบในรงควัตถุ ซึ่งไม่พบในข้าวขาว ช่วยป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ เป็นสารที่ละลายได้ในไขมันและพบในส่วนของรำข้าว

Clifford (2000) รายงานว่า Anthocyanin เป็นกลุ่มสารสีธรรมชาติ ที่เป็นสารจำพวก flavonoids โดย Anthocyanin จะมีส่วน aglycone คือ cyaniding, peonidin, malvidin และ pelargonidin ต่อมา มีงานวิจัยของ Hu และคณะ (2003) พบว่าใน Black rice จะมีรงควัตถุอยู่ที่ผิวนอกของเมล็ดข้าว ซึ่งจะมีรงควัตถุสีม่วงดำจนถึงสีดำ ซึ่งทั้ง 2 สี จะผสมกันใน anthocyanin ที่สกัดจาก Black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) โดยทำการแยกและศึกษาองค์ประกอบของสารโดยใช้ gel filtration และ identify โดยการใช้ LC-MS พบสารพวก cyaniding-3-glucoside และ peonidin-3-glucoside

Han และ คณะ (2004) ได้วิจัยราชของ black rice สายพันธุ์ *Oryza sativa* cv. Hengjinjubyeeo พบสารใหม่ คือ 2-arylbenzofuran, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4,6-dihydroxybenzofuran-3-carboxylic acid methyl ester, oryzafuran

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างข้าวเหนียวดำ จังหวัดสกลนคร

2. การสกัดสาร

บดข้าวเหนียวดำ ซึ่งน้ำหนักเริ่มต้นและบรรจุใส่ถุงผ้าเพื่อสกัดโดยใช้ soxhlet ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ได้แก่ ไตคลอโรมีเทนและเมทานอล ระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ Rotary vacuum evaporator และซึ่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ เพื่อหา %ผลผลิต ที่ได้ในแต่ละส่วน

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสิ่งสกัดต่างๆ โดยวิธี bioautographic

นำสิ่งสกัดที่ได้ ไปทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบโดยใช้ TLC เพื่อหาวิฤภาคตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสม จากนั้นนำแผ่น TLC ไปส่งภายใต้ลำแสง UV แล้วทำสัญลักษณ์ไว้ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น โดยการ spray ด้วย 0.2% DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-

hydrazyl) ที่ละลายในเมทานอล ทำการตรวจสอบผลภายใน 5 นาทีหลังจาก spray อนุมูลอิสระ DPPH ถ้าสารใน spot โคนบน TLC มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะปรากฏเป็นจุดสีเหลืองบนพื้นหลังสีม่วง

ผลการศึกษา

เมื่อนำข้าวเหนียวดำมาสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ไคคลอโรฟอร์ม และเมทานอล โดยทำการสกัดโดยวิธี Soxhlet ซึ่งได้ % ผลผลิต แสดงดังตารางที่ 7

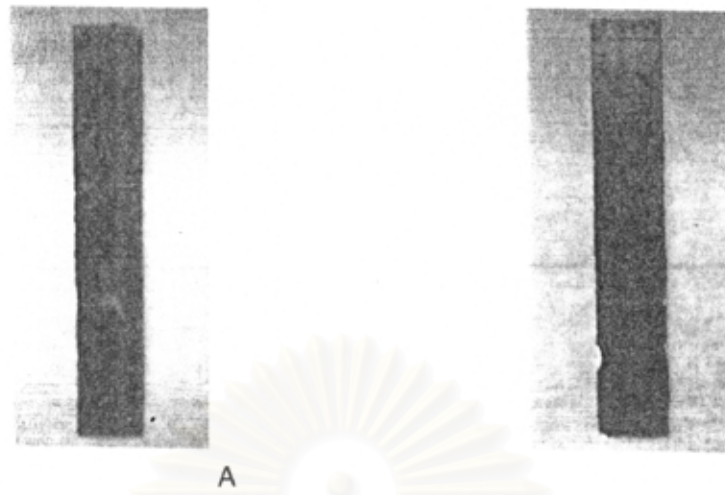
ตารางที่ 7 ผลการสกัดข้าวเหนียวดำ

ชนิดของพืช	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)		%ผลผลิต	
		สกัดด้วย CH_2Cl_2	สกัดด้วย MeOH	สกัดด้วย CH_2Cl_2	สกัดด้วย MeOH
ข้าวเหนียวดำ	454.7	20.28	57.86	4.46	12.72

สารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายไคคลอโรฟอร์ม ได้สารสกัดลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองใส คล้ายกับน้ำมัน และมี % ผลผลิตประมาณ 4% ในขณะที่สารสกัดข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยเมทานอลจะได้สารสกัดสีม่วงแดง และมี % ผลผลิตประมาณ 13% ซึ่งได้ผลผลิตมากกว่าสารสกัดที่ได้จากไคคลอโรฟอร์ม ประมาณ 3 เท่า โดยสารสกัดจากเมทานอลสีม่วงแดง ซึ่งน่าจะเป็นสารรงควัตถุ Anthocyanin จากนั้นนำสารสกัดทั้งสองชนิดที่ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นโดยวิธี bioautographic โดยการ spray อนุมูลอิสระ DPPH ลงบนแผ่น TLC ที่มีการแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของข้าวเหนียวดำอย่างหยาบแสดงดังตารางที่ 8 และรูปที่ 15

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นจากส่วนต่างๆ ของข้าวเหนียวดำด้วยวิธี bioautographic

สิ่งสกัด	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น
ไคคลอโรฟอร์ม	มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
เมทานอล	มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



- รูปที่ 15 A แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นโดยใช้อณุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจาก ไดคลอโรมีเทน (solvent system : 60%Dichloromethane /40%Hexane)
- B แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นโดยใช้อณุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจาก เมทานอล (solvent system : 70% Dichloromethane/30% Ethyl acetate)

ตารางที่ 8 และรูปที่ 15 พบว่า จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นโดยใช้อณุมูลอิสระ DPPH สารที่สกัดด้วยทั้งไดคลอโรมีเทนและเมทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากมี spot บน แผ่น TLC ที่สามารถพอกจางสีของอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสีเหลือง ซึ่งเกิดจากการที่สารสกัดสามารถที่จะให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH จึงทำให้สีของ อนุมูลอิสระจางลงได้

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดจากข้าวเหนียวดำเพิ่มเติม

ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนและเมทานอลจากข้าวเหนียวดำเพิ่มเติมเพื่อ จะสามารถนำข้าวเหนียวดำไปใช้ประโยชน์ในแง่มุมอื่น ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้ศึกษา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการ เจริญเติบโตของจุลชีพ ผลการศึกษาได้แสดงดังตารางที่ 9-10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดข้าวเหนียวดำจากเมทานอล มี %ผลผลิตที่มากกว่าสารที่สกัดจากไดคลอโรมีเทน และเมื่อนำสารสกัดทั้งสองมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นด้วยวิธี bioautographic พบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ ดังนั้นข้าวเหนียวดำเป็นพืชที่น่าสนใจในแง่การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งควรจะต้องมีการศึกษาในแง่ปริมาณวิเคราะห์ และ การแยกสารจากสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดเพื่อที่จะได้ทราบว่าสารใดที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในข้าวเหนียวดำ

เอกสารอ้างอิง

- วิไลลักษณ์ พลกลาง. 2541. ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย. ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี. สถาบันวิจัยข้าว. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 472 หน้า
- Sugano, M., Tsuji, E., 1997. Rice bran oil and cholesterol metabolism. J. Nutr. 127, 521-524.
- Xin, M., Ling, W.H., Ma, J., Kitts, D.D., Zawistowski, J., 2003. Supplementation of diets with black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice. J. Nutr. 2003, 133, 744-751.
- Clifford, M.N., 2000. Anthocyanin: Nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food Agric. 218, 147-155.
- Hu, C., Zawistowski J., LingW., Kitts D.D., 2003. Black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. J. Agric. Food Chem, 51, 5271-5277.
- Han, S.J., Su, N.R., Sam, S.K., 2004. A New 2-arylbenzofuran with antioxidant activity from the black colored rice (*Oryza sativa* L.) bran. 52, 1365-1366.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

ผศ. ดร. วรินทร์ ชวาสิริ

Assistant Professor Dr. Warinthorn Chavasiri

Education:

- 1993 Ph.D. (Chemistry), Texas A&M University, U.S.A.
- 1988 M.Sc. (Organic Chemistry), Chulalongkorn University, Thailand
- 1985 B.Sc. (Chemistry), Chulalongkorn University, Thailand

Work Experiences:

Academic positions

- 1993-1995 Lecturer, Division of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
- 1995-present Assistant Professor, Division of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Administrative Positions

- 1998-2002 Assistant Dean for Research Affairs, Faculty of Science, Chulalongkorn University
- 2002-2007 Assistant Dean for Academic Affairs, Faculty of Science, Chulalongkorn University
- 2007-present Vice Head of Chemistry Department for Academic Affairs

Publications:

1. Kokpol, U.; Chavasiri, W.; Chittawong, V.; Miles, D.H. "Taraxeryl *cis-p*-Hydroxy cinnamate, A Novel Taraxeryl from *Rhizophora apiculata*" *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 953-955.
2. Barton, D.H.R.; Beviere, S.D.; Chavasiri, W.; Csuha, E.; Doller, D.; Liu, W.-G. "The Functionalization of Saturated Hydrocarbons Part 20 Alkyl Hydroperoxide: Reaction Intermediates in the Oxidation of Saturated Hydrocarbons by Gif-type Reactions and Mechanistic Studies on Their Formation" *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2147-2156.
3. Barton, D.H.R.; Beviere, S.D.; Chavasiri, W.; Csuha, E.; Doller, D. "The Functionalization of Saturated Hydrocarbons Part XXI The Fe(III)-Catalyzed and the Cu(II)-Catalyzed Oxidation of Saturated Hydrocarbons by Hydrogen Peroxide: A Comparative Study" *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2895-2910.
4. Barton, D.H.R.; Beviere, S.D.; Chavasiri, W.; Doller, D.; Liu, W.-G.; Reibenspies, J.H. "The Functionalization of Saturated Hydrocarbons Part 22 Studies on the Iron Species Responsible for Hydrocarbon Activation by Gif Type Systems" *New J. Chem.* **1992**, *16*, 1019-1029.
5. Barton, D.H.R.; Beviere, S.D.; Chavasiri, W.; Doller, D.; Hu, B. "The Fe(III)-Catalyzed Functionalization of

- Saturated Hydrocarbons by *tert*-Butyl Hydroperoxide: Mechanistic Studies on the Role of Dioxygen" *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5473-5476.
6. Barton, D.H.R.; Beviere, S.D.; Chavasiri, W.; Doller, D.; Hu, B. "Metal Dependence in Gif-type Reactions The Cu(II)-catalyzed Olefination of Saturated Hydrocarbons by *tert*-Butyl Hydroperoxide" *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 567-570.
 7. Barton, D.H.R.; Beviere, S.D.; Chavasiri, W.; Doller, D.; Hu, B. "New Alkane Functionalization Reactions Based on Gif-type Chemistry in the Presence of Alkali Metal Salts" *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1871-1874.
 8. Kokpol, U.; Chavasiri, W.; Chittawong, V.; Bruce, W.; Cunningham, C.N.; Miles, D.H. "Long Chain Aliphatic Alcohols and Saturated Carboxylic Acids from Heartwood of *Rhizophora apiculata*" *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1129-1131.
 9. Barton, D.H.R.; Chavasiri, W. "The Functionalization of Saturated Hydrocarbons Part 24 The Use of *tert*-Butyl Hydroperoxide: GoAgg^{IV} and GoAgg^V" *Tetrahedron* **1994**, *50*, 19-30.
 10. Barton, D.H.R.; Chavasiri, W. "The Functionalization of Saturated Hydrocarbons Part 25 Ionic Substitution Reactions in GoAgg^{IV} Chemistry: The Formation of Carbon-Halogen Bonds" *Tetrahedron* **1994**, *50*, 31-46.
 11. Barton, D.H.R.; Chavasiri, W. "The Functionalization of Saturated Hydrocarbons Part 26 Ionic Substitution Reactions in GoAgg^{IV} Chemistry: The Formation of C-N, C-S and C-C Bonds" *Tetrahedron* **1994**, *50*, 47-60.
 12. Barton, D.H.R.; Chavasiri, W.; Hill, D.R.; Hu, B. "The Functionalization of Saturated Hydrocarbons Part 27 A New Michael-type Addition Reaction for Saturated Hydrocarbons not Involving Radical Chemistry" *New J. Chem.* **1994**, *18*, 611-620.
 13. Barton, D.H.R.; Beviere, S.D.; Chabot, B.M.; Chavasiri, W.; Taylor, D.K. "Studies on the Oxidation of Alcohols Employing *t*-Butyl Hydroperoxide (TBHP) and Fe(III)" *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4681-4684.
 14. Kokpol, U.; Chavasiri, W.; Tip-pyang, S.; Veerachato, G.; Zhao, F.; Simpson, J.; Weavers, R.T. "A Limonoid from *Xylocarpus granatum*" *Phytochemistry* **1996**, *41*, 903-905.
 15. Barton, D.H.R.; Chavasiri, W. "The Functionalization of Saturated Hydrocarbons Part 36 Stereoselectivity Studies of Gif-type Reactions" *Tetrahedron* **1997**, *53*, 2997-3004.
 16. Kokpol, U.; Wannachet-isara, N.; Tip-pyang, S.; Chavasiri, W.; Veerachato, G.; Simpson, J.; Weavers, R.T. "A C-Methylflavone from *Trianthema portulacastrum*" *Phytochemistry* **1997**, *44*, 719-722.
 17. Chavasiri, W.; Jang, D.O. "The Effects of 1,3-Dicarbonyl Compounds on Alkane Oxidation in Gif-type Reaction" *Bull. Korean Chem. Soc.* **1997**, *18*, 362-363.
 18. Chavasiri, W.; Jang, D.O. "Effect of Dicarboxylic Acids on the Rate of Oxidation and Bromination of Cyclododecane under GoAgg^{II} Conditions" *Bull. Korean Chem. Soc.* **2000**, *21*, 353-354.
 19. Chavasiri, W.; Deesamer, S.; Kokpol, U.; Thipnoisanga, C.; Wattanasereekul, S.; Zungsontiporn, S. "Searching for New Agrochemicals Part 1. Structure Activity Relationship Study of Dicoumarols as Weed Growth Inhibitors against *Mimosa pigra* Linn." *Thai J. Agric. Science.* **2001**, *34*, 81-89.
 20. Jona, H.; Mandai, H.; Chavasiri, W.; Takeuchi, K.; Mukaiyama, T. "Glycosylation with Glycosyl Fluorides: Protic Acid Catalyzed Stereoselective Glycosylation Using Glycosyl Fluorides" *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, *75*, 291-309

21. Tiew, P.; Puntumchai, A.; Kokpol, U.; Chavasiri, W. "Coumarins from *Mansonia gagei* Drumm." *Phytochemistry*, **2002**, *60*, 773-776.
22. Tiew, P.; Ioset, J.-R.; Kokpol, U.; Schenk, K.; Jaiboon, N.; Chaichit, N.; Chavasiri, W.; Hostettmann, K. "Four New Mansonone Derivatives from the Heartwood of *Mansonia gagei*" *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1332-1335.
23. Tiew, P.; Ioset, J.-R.; Kokpol, U.; Chavasiri, W.; Hostettmann, K. "Antifungal, Antioxidant and Larvicidal Activities of Compounds Isolated from the Heartwood of *Mansonia gagei*" *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 190-193.
24. Aree, T.; Singhana, B.; Pakawatchai, C.; Chavasiri, W.; Kokpol, U. "10-Hydroxy-9-methoxy-5,6,13,13a-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5g]isoquino[3,2-a]isoquinolin-8-one" *Acta Cryst. Sec. E* **2003**, *E59*, 919-921.
25. Tiew, P.; Takayama, H.; Kiyajima, M.; Aimi, N.; Kokpol, U.; Chavasiri, W. "A Novel Neolignan, Mansoxetane, and Two New Sesquiterpenes, Mansonones R and S, from *Mansonia gagei*" *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6759-6761.
26. Adisakwattana, S.; Sookkongwaree, K.; Roengsumran, S.; Petsom, A.; Ngamrojanavanich, N. Chavasiri, W.; Deesamer, S.; Yibchok-anun, S. "Structure-Activity Relationships of *trans*-Cinnamic Acid Derivatives on α -Glucosidase Inhibition" *Bioorg. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2893-2896.
27. Rungprom, W.; Chavasiri, W.; Kokpol, U.; Kotze, A.; Garson, M.J. "Bioactive Chromodorolide Diterpenes from an Aplysillid Sponge" *Mar. Drugs*, **2004**, *3*, 101-107.
28. Munbungjong, W.; Lee, E.H.; Chavasiri, W.; Jang, D.O. "Iridium-mediated Mild and Efficient One-pot Synthesis of Alkyl Phenyl Selenides" *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8769-8771.
29. Kang, D.H.; Joo, T.Y.; Hwa, E.; Chaysripongkul, S.; Chavasiri, W.; Jang, D.O. "A Mild and Efficient Reaction for Conversion of Carboxylic Acids into Acid Bromides with Ethyl Tribromoacetate/ triphenylphosphine under Acid-free Conditions" *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5693-5696.
30. Morimoto, M.; Ohta, Y.; Ihara, T.; Arima, K.; Fukumoto, H.; Chavasiri, W.; Komai, K. Insect Antifeedants in the Thailand Plant Extracts against the Common Cutworm, *Spodoptera litura*, and a Subterranean Termite, *Reticulitermes speratus* *Jpn J Environ Entomol Zool.*, **2006**, *17*, 1-7.
31. Pleumpanupat, W.; Chavasiri, W. "An Efficient Method for Chlorination of Alcohols Using $PPh_3Cl_3CCONH_2$ " *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6821-6823.
32. Morimoto, M.; Fukumoto, H.; Hiratani, M.; Chavasiri, W.; Komai, K. Insect Antifeedants, Pterocarpan and Pterocarpol, in Heartwood of *Pterocarpus macrocarpus* Kruz.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **2006**, *70*, 1864-1868.
33. Chantarasriwong, O.; Jang, D.O.; Chavasiri, W. "A Practical and Efficient Method for the Preparation of Sulfonamides Utilizing Cl_3CCN/PPh_3 " *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7489-7492.
34. Intaranongpai, J.; Chavasiri, W.; Gritsanapa, W. "Anti-head Lice Component of *Annona squamosa* Seed" *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **2006**, *37*, 532-535.
35. Pluempunupat, W.; Chantarasriwong, O.; Taboonpong, P.; Jang, D.O.; Chavasiri, W. "Reactivity of Chlorinating Agents for the Chlorination of Alcohols and Carboxylic Acids: A Comparative Study" *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 223-226.
36. Kang, D.H.; Joo, T.Y.; Chavasiri, W.; Jang, D.O. "Radical Mediated Direct Conversion of Aldehydes into Acid Bromides" *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 285-287.

37. Buranaprasertsuk, P.; Tangsakol, Y.; Chavasiri, W. "Epoxidation of Alkenes Catalyzed by Cobalt(II) Calix[4]pyrrole" *Catalytic Commun.* **2007**, *8*, 310-314.
38. Jarupinthusophon, S.; Thong-in, U.; Chavasiri, W. "Catalytic Oxidative Cleavage of Terminal Olefins by Chromium(III) Stearate" *J. Mol. Cat. A, Chem.* **2007**, *270*, 289-294.
39. Aungsupravate, O.; Kangwansupamonkon, W.; Chavasiri, W.; Kiatkamjornwong, S. "Synthesis and Properties of Solvent Absorptive Methyl Methacrylate-Divinylbenzene Copolymer Beads" *Polymer Engineering & Science*, **2007**, *47*, 447-459.
40. Deesamer, S.; Kokpol, U.; Chavasiri, W.; Douillard, S.; Barbier, P.; Vidal, N.; Combes, S.; Finet, J.-P. "Synthesis and Biological Evaluation of Isollavone Analogues from *Dalbergia oliveri* Gamble" *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 12986-12993.
41. Pleumpanupat, W.; Adasakwattana, S.; Yibchok-Anun, S.; Chavasiri, W. "Synthesis of *N*-Phenylphthalimides Derivatives as α -Glucosidase Inhibitor" *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*, 1501-1506. (Impact factor: 0.929) (December)
42. Tongkate, P., Pleumpanupat, W., Chavasiri, W. "Hexabromoacetone and ethyl tribromoacetate: a highly efficient reagent for bromination of alcohol" *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 1146-1148.
43. Chang, J.W.W.; Chee, S.; Mak, S.; Buranaprasertsuk, P.; Chan, P.W.H.; Chavasiri, W. "Copper-catalyzed Ullmann coupling under ligand and additive free conditions. Part I: *O*-arylation of phenols with aryl halides" *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 2018-2022.
44. Buranaprasertsuk, P.; Chang, J.W.W.; Chan, P.W.H.; Chavasiri, W. "Copper-catalyzed Ullmann coupling under ligand and additive free conditions. Part II: *S*-arylation of thiols with aryl iodides" *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 2023-2025.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อ. ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช
Dr. Thanachan Mahawanich

Educational Background :

B.Sc. (Honors) Food Science and Technology (Kasetsart University, Thailand)

M.S., Ph.D. Food Science (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA.)

Research Interest :

Molecular mobility and its effect on food properties

Water and its effects on food properties

Carbohydrate chemistry

Soybean products: Chemistry and processing

Publications:

ธนจันทร์ มหาวนิช และ Shelly J. Schmidt. 2546. การเคลื่อนที่ของโซเดียมไอออนในระบบของไอออนิกไฮโดรคอลลอยด์. โพสต์เตอร์เสนอ ณ การประชุมวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 5. ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทคบางนากรุงเทพฯ.

Mahawanich, T. and Schmidt, S.J. 2001. Molecular mobility and the perceived sweetness of sucrose, fructose, and glucose solution. Poster presented at the 1st National Conference on Starch Technology. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

Mahawanich, T. and Schmidt, S.J. 2004. Molecular mobility and the perceived sweetness of sucrose, fructose, and glucose solution. *Food Chemistry*. 84:169-179

Tulyathan, V., Boondee, K. and Mahawanich, T. Characteristics of starch from water chestnut. *J. Food Biochem.* (Accepted)

โครงการย่อยที่ 3

การสกัดและการดัดแปรโปรตีนจากพืชเกษตรกรรมของจังหวัดน่านเพื่อการใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรม

Extraction and Modification of Protein from Crop Plant of Nan Province for Industrial Applications



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การสกัดและการดัดแปร โปรตีนจากพืชเกษตรกรรมของจังหวัดน่านเพื่อการใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรม” เป็นโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การวิเคราะห์และการดัดแปรทางเคมีเพื่อการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางเกษตรและวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่าน” ซึ่งได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2549 และ 2550 เพื่อดำเนินการศึกษาวิจัยโครงการจัดการทรัพยากรเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืนของจังหวัดน่าน

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีอนุภาค คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง particle size analyzer



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 การสกัด องค์ประกอบและสมบัติบางประการของ โปรีตินถั่วมะเสะ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2
บทนำ	3
การทดลอง	4
การสกัด โปรีติน	4
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันถั่วมะเสะ	4
การผลิต โปรีตินแห้ง	4
การดูดซับน้ำและน้ำมัน (Water and Oil Adsorption)	4
การวิเคราะห์ค่า Emulsifying Activity Index (EAI)	5
การวิเคราะห์การละลายของ โปรีตินแห้ง...	6
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.	7
ผลของปัจจัยที่ใช้ในการสกัด โปรีตินจากถั่วมะเสะต่อองค์ประกอบในน้ำมันถั่วมะเสะ	7
ปริมาณ โปรีตินและสมบัติของ โปรีตินถั่วมะเสะแห้ง	7
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยขั้นต่อไป	11
เอกสารอ้างอิง	12
บทที่ 2 การผลิต โปรีตินถั่วมะเสะและจุลอนุภาคจาก โปรีตินถั่วมะเสะเพื่อเป็นสารทดแทนไขมัน	13
บทคัดย่อภาษาไทย	13
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	14
บทนำ	15

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การผลิตอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะจากน้ำสกัดโปรตีนถั่วมะแฮะ	36
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยขั้นต่อไป	40
เอกสารอ้างอิง	40
ประวัติผู้วิจัยหลัก	42



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 ผลของปัจจัยที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณโปรตีน น้ำ เถ้า ใยอาหาร ไขมันและคาร์โบไฮเดรทในน้ำสกัดโปรตีนถั่วมะแฮะและผลผลิต	9
1.2 ปริมาณโปรตีนและสมบัติของโปรตีนแห้งที่สกัดได้จากถั่วมะแฮะ	10
2.1 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วมะแฮะ	22
2.2 สมบัติของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งเมื่อเปรียบเทียบกับ Soy Protein Isolate	25
2.3 องค์ประกอบทางเคมีของอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ได้จากการตีปั่นสารแขวนลอยโปรตีนที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่าน 400 mesh	39
2.4 สมบัติของอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ได้จากการตีปั่นสารแขวนลอยโปรตีนที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่าน 400 mesh	39
2.5 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสปริงค์เล็ก เพื่อหาความแตกต่างระหว่างสูตรมาตรฐานกับสูตรทดแทนไขมันด้วยอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ระดับร้อยละ 10 30 และ 50 โดยน้ำหนัก ด้วยวิธี Duo-Trio โดยผู้ทดสอบ 20 คน	39

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับ Nitrogen solubility index (NSI) ของโปรตีนแห้ง	11
2.1	ภาพของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	23
2.2	ความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับ Nitrogen solubility index (NSI) ของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้ง	25
2.3	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-10, 10.1-100, และ >100 ไมครอน เมื่อตีปั่น โปรตีนถั่วมะแฮะ ที่ผ่านความร้อนด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 13,000 16,000 19,000 22,000 และ 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที	26
2.4	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-3 และ 0.1-10 ไมครอน เมื่อตีปั่น โปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่านความร้อนด้วย ไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็วรอบ 13,000 16,000 19,000 22,000 และ 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที	27
2.5	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-3 และ 0.1-10 ไมครอน เมื่อตีปั่น โปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่านความร้อนด้วย ไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที	28
2.6	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-10 10.1-100 และ >100 ไมครอน เมื่อตีปั่น โปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่าน ความร้อนด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที	28
2.7	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-10 10.1-100 และ >100 ไมครอน เมื่อลดขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะ (ที่ผ่านความร้อนและ ไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที นาน 60 นาที) ด้วยคลื่นเหนือเสียงเป็นเวลา 0 15 25 35 45 และ 55 นาที	29
2.8	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-3 และ 0.1-10 ไมครอน เมื่อลดขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะ (ที่ผ่านความร้อนและ ไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที นาน 60 นาที) ด้วยคลื่นเหนือเสียงเป็นเวลา 0 15 25 35 45 และ 55 นาที	30
2.9	อนุภาค (%) ขนาด 0.1-3 และ 0.1-10 ไมครอน เมื่อตีปั่น โปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อนด้วย ไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที	31
2.10	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-10 10.1-100 และ >100 ไมครอน เมื่อตีปั่น โปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่าน ความร้อนด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที	32
2.11	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-10 10.1-100 และ >100 ไมครอน เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 watt และ 0.9 Hz กับ โปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อน เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที	33

สารบัญรูป (ต่อ)

ปีที่		หน้า
2.12	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-3 และ 0.1-10 ไมครอน เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 watt และ 0.9 Hz กับโปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อน เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที	33
2.13	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-3 0.1-10 และ 10.1-100 ไมครอน ที่ได้จากวิธีการต่างๆ	35
2.14	ปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-3 0.1-10 และ 10.1-100 ไมครอน เมื่อตีป่นสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะแฮะด้วยโฮโมจิไนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 และ 10 นาที	36
2.15	ผลของการกรองสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะแฮะ(ที่ผ่านการตีป่นที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาทีผ่าน 400 mesh)ต่อปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-3 0.1-10 และ 10.1-100 ไมครอน	37
2.16	ผลของการปั่นเหวี่ยงสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะแฮะ(ที่ผ่านการตีป่นที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่าน 400 mesh) ที่ระดับต่างๆ นาน 10 นาทีต่อปริมาณอนุภาค (%) ขนาด 0.1-3 0.1-10 และ 10.1-100 ไมครอน	37
2.17	ภาพ SEM ของอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ได้จากการตีป่นสารแขวนลอยโปรตีนที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่าน 400 mesh	38

บทที่ 1 การสกัด องค์ประกอบและสมบัติบางประการของโปรตีนถั่วมะแฮะ

พาสวดี ประทีปะเสน¹ ศิริพัศตร์ ไซยันต์² ปิยะนุช รตเครือ³ พิชัย ด้อศิริพันธ์¹ ปิยะดา ทิมถ¹ วิไลวรรณ แจงหลัก¹

¹ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

บทคัดย่อ

วิธีการสกัดโปรตีนจากถั่วมะแฮะที่ให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุดและปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำที่สุด คือแช่ถั่วมะแฮะค้างคืนในน้ำ ใช้สัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำต่อถั่วเท่ากับ 5:1 แยกเปลือกถั่วและน้ำแช่ออก แล้วปั่นถั่วที่ได้กับน้ำให้ละเอียด ใช้สัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำต่อถั่ว (คิดจากน้ำหนักของถั่วแห้งเริ่มต้น) 3:1 แล้วกรองผ่านตะแกรง 200 mesh นำน้ำกรองที่ได้ไปกำจัดกากถั่วต่อโดยปั่นเหวี่ยงที่ 2000 rpm นาน 10 นาที นำน้ำนมถั่วมะแฮะที่ได้ต้มให้เดือดนาน 15 นาที นำนมถั่วมะแฮะที่ได้ประกอบด้วยน้ำร้อยละโดยน้ำหนักเปียก 96 และองค์ประกอบอื่น ๆ คิดเป็นร้อยละ โดยน้ำหนักแห้งดังนี้โปรตีน 57.59, คาร์โบไฮเดรต 23.82, ไขมัน 10.21, โยอาหาร 5.24 และไขมัน 3.14 โปรตีนถั่วมะแฮะแห้งที่ผลิตได้โดยการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมถั่วมะแฮะด้วยการเติม 1 N HCl ให้ pH ของน้ำนมถั่วมะแฮะเป็น 4.5 แล้วแยกตะกอนโปรตีนออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 2000xg นาน 20 นาที ที่ 20 °C ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น (ใช้สัดส่วนโดยน้ำหนักของตะกอนต่อน้ำกลั่น = 1:1) 1 ครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 2000xg นาน 20 นาที ที่ 20 °C ละลายตะกอนโปรตีนในน้ำกลั่น (สัดส่วนโดยน้ำหนักของตะกอนต่อน้ำกลั่น = 1:1) ปรับ pH ของสารละลายโปรตีนให้เป็น 7 ด้วย 1N NaOH นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500xg นาน 30 นาที ที่ 20 °C แล้วนำสารละลายโปรตีนส่วนบนไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง โปรตีนถั่วมะแฮะแห้งที่ได้มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าร้อยละ 65 โดยน้ำหนักแห้ง และมีสมบัติมีความสามารถในการดูดซับน้ำโดยเฉลี่ยประมาณ 2.92±0.59 กรัม น้ำต่อกรัม โปรตีนแห้ง) และการดูดซับน้ำมันโดยเฉลี่ยประมาณ 2.24±0.55 กรัม น้ำมันต่อกรัม โปรตีนแห้ง Emulsifying Activity Index (EAI) มีค่าต่ำ (5-19) การละลายของโปรตีนถั่วมะแฮะในน้ำซึ่งได้จากการวิเคราะห์ค่า Nitrogen Solubility Index (NSI) พบว่าโปรตีนถั่วมะแฮะละลายในน้ำได้สูงสุดเพียงร้อยละ 50 ที่ pH 10

คำสำคัญ ถั่วมะแฮะ น้ำนมถั่วมะแฮะ โปรตีนถั่วมะแฮะ สมบัติของโปรตีนถั่วมะแฮะ

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรณีย์อิเล็กทรอนิกส์ ppasawud@cs.corn.ac.th โทร 0-2218-5536

Extraction, Composition and Properties of Pigeonpea Protein

Pasawadee Pradipasena^{1*}, Siripastr Jayanta², Piyanuch Roskhrua^{1,3}, Pichai Losirinunt¹, Piyada Pimon³,

Vilaiwan Jaluk³

¹Food Technology Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

²Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

³Rajamangala University of Technology Lanna, Nan Campus

*Corresponding author

Abstract

To extract protein from pigeon pea (*Cajanus cajan* Millsp.), the pea was milled with water (the weight ratio of water to pea = 3:1). Prior to milling, the pea was soaked overnight in water (the weight ratio of water to pea = 5:1), then pea hull and water were removed. After milling, the slurry was filtered through 200 mesh filter. The filtrate was centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The supernatant, pigeon pea milk, was boiled for 15 minutes. The milk contained 96 % wt water. The dry basis composition of the milk was 57.59 % protein, 23.82 % carbohydrate, 10.21 % ash, 5.24 % fiber and 3.14 % fat. The pigeon pea flour (containing \approx 64 % protein) was produced by precipitation of protein in pigeon pea milk at pH 4.5 with 1 N NaCl. Then protein precipitate was separated by centrifugation at 2000xg and 20 °C for 20 min, and then was washed with water (the weight ratio of water to protein precipitate = 1:1). After washing, protein precipitate was centrifuged at 2000xg and 20 °C for 20 min and dissolved in water (the weight ratio of water to protein precipitate = 1:1). The pH of protein solution was adjusted to 7 with 1 N NaOH, then the protein solution was centrifuged at 1500xg and 20 °C for 30 min. The supernatant was freeze dried. The water and oil adsorption, Emulsifying Activity Index (EAI) and Nitrogen Solubility Index (NSI) of pigeon pea flour were determined to be 2.92 g water/g dry protein, 2.24 g oil/g dry protein, 5-19 and 50% at pH 10, respectively.

Key word: pigeon pea, pigeon pea milk, pigeon pea flour, properties of pigeon pea flour

Corresponding author e-mail address: ppsawad@hotmail.com

บทนำ

ถั่วมะแฮะเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีลักษณะทนความแห้งแล้งได้ยาวนานถึง 6 เดือน และทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าพืชอื่นๆ และสามารถเจริญเติบโตข้ามปีได้ 2-3 ปี นอกจากระบบการตรึงไนโตรเจนที่รากแล้ว ถั่วมะแฮะยังมีระบบรากแก้วและรากแขนงจำนวนมากซึ่งยังถือสามารถดูดธาตุฟอสฟอรัสได้ดี จึงทำให้เกิดการหมุนเวียนธาตุฟอสฟอรัสจากดินชั้นล่างสู่ผิวดิน ดังนั้น จึงใช้เป็นพืชที่ปลูกเพื่อปรับปรุงคุณภาพดิน และให้ผลผลิตทางเกษตรกรรมจึงนับว่าเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง⁽¹⁾ จังหวัดน่านมีการปลูกถั่วมะแฮะกันอย่างกว้างขวาง และนำถั่วมะแฮะทั้งฝักอ่อนและเมล็ดแห้ง มาเป็นอาหาร จากการวิเคราะห์เมล็ดถั่วมะแฮะแกะเปลือกจากจังหวัดน่านมีองค์ประกอบดังนี้ความชื้น โปรตีน ฝั้ว เกลือแคงและไขมัน ร้อยละ 12.19, 10.70, 3.37, 2.03 และ 0.0012 โดยน้ำหนัก และมีคาร์โบไฮเดรตและใยอาหารรวมกันร้อยละ 71.71 โดยน้ำหนัก Digestibility ของโปรตีนถั่วมะแฮะอยู่ในช่วงร้อยละ 60-88^(2, 3) เมล็ดถั่วมะแฮะเป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลเฟอร์คือเมธิโอนีนและซิสทีน มีกรดอะมิโนที่สำคัญถึงประมาณ 20% โดยเฉพาะ การสกัดและศึกษาสมบัติของโปรตีนและเมล็ดสตาร์ชจากถั่วมะแฮะสำคัญต่อการประเมินศักยภาพของโปรตีนและสตาร์ชจากถั่วมะแฮะมาใช้เชิงอุตสาหกรรม โดยเฉพาะโปรตีนสามารถนำมาใช้เพื่อเป็น functional ingredients ได้ ดังนั้น งานวิจัยย่อยนี้จึงศึกษากระบวนการและปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากถั่วมะแฮะ และวิเคราะห์องค์ประกอบและสมบัติเชิงหน้าที่บางประการ (ได้แก่ การละลาย การดูดซับน้ำ การดูดซับน้ำมันและความสามารถในการเป็นตัวทำอิมัลชัน) ของโปรตีนที่สกัดได้ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาได้จากงานวิจัยนี้ยังอาจนำไปใช้เป็นอาหาร โดยตรงเช่นน้ำนมถั่วมะแฮะที่มีไขมันต่ำเมื่อเทียบกับน้ำนมถั่วเหลือง ทั้งนี้เนื่องถั่วมะแฮะเป็นถั่วที่มีไขมันต่ำ และโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งสำหรับนำไปใส่เพื่อเพิ่มหรือเสริมปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลอง

การสกัดโปรตีน

ซังถั่วมะแฮะที่เพาะปลูกในจังหวัดน่าน แล้วล้างให้สะอาด แช่วัว 1 คืนในตัวทำละลายที่จะใช้สกัดโปรตีน(ได้แก่ น้ำหรือสารละลาย NaHCO_3 , ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 น้ำหนักโดยปริมาตร) โดยใช้สัดส่วนของน้ำแช่ถั่วเท่ากับ 5:1 โดยน้ำหนัก แยกเปลือกถั่วและน้ำแช่ออก นำถั่วที่ได้ไปสกัดโปรตีนโดยปั่นละเอียดกับตัวทำละลาย โดยแปรตัวทำละลาย 2 ชนิดคือน้ำกับสารละลาย NaHCO_3 , ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 น้ำหนักโดยปริมาตร และแปรสัดส่วนโดยน้ำหนักของตัวทำละลายต่อถั่ว(คือน้ำหนักของถั่วจากที่ซังได้เมื่อเริ่มการทดลอง) 5 ระดับคือ 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 และ 7:1 แยกโปรตีนที่ละลายน้ำออกจากกากถั่ว โดยกรองผ่านตะแกรง 200 mesh แล้วนำน้ำกรองที่ได้ไปกำจัดกากถั่วต่อโดยแปรวิธีการที่ใช้ 2 วิธีคือตกตะกอนโดยตั้งไว้ที่ 4°C นาน 12 ชั่วโมง กับปั่นเหวี่ยงที่ 2000 rpm (VSC N1020, Germany) นาน 10 นาที นำโปรตีนที่ละลายน้ำไปต้มให้เดือด นาน 15 นาที โดยคนตลอดเวลาที่ให้ความร้อน น้ำสกัดที่สกัดด้วยน้ำนี้เรียกว่า น้ำนมถั่วมะแฮะ ควน้ำสกัด/น้ำนมถั่วมะแฮะ ที่ได้เพื่อคำนวณหาปริมาณผลผลิตโปรตีน

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมถั่วมะแฮะ

วิเคราะห์ปริมาณ(ร้อยละโดยน้ำหนัก)ของน้ำ โปรตีน ไขมัน เถ้าและใยอาหารในน้ำนมถั่วมะแฮะตามวิธีของ AOAC (1995)⁽⁴⁾ แล้วคำนวณหาปริมาณของคาร์โบไฮเดรตจากสมการที่ 1

$$\text{ปริมาณคาร์โบไฮเดรต} = 100 - \sum \text{ปริมาณน้ำ โปรตีน ไขมัน เถ้าและใยอาหาร} \quad (1)$$

การผลิตโปรตีนแห้ง

ปรับ pH ของน้ำสกัดถั่วมะแฮะให้ได้ pH 4.5 (ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าเป็น pH ที่ทำให้โปรตีนในน้ำสกัด ถั่วมะแฮะตกตะกอนได้มากที่สุด) ด้วย 1 N HCl ปั่นเหวี่ยงที่ 2000xg นาน 20 นาที ที่ 20°C เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง (ใช้สัดส่วนตะกอนต่อน้ำกลั่น = 1:1 โดยน้ำหนัก) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 2000xg นาน 20 นาที ที่ 20°C นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่นในสัดส่วนตะกอนต่อน้ำกลั่น = 1:1 โดยน้ำหนัก ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 7 ด้วย 1N NaOH นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500xg นาน 30 นาที ที่ 20°C นำส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยทำให้ตัวอย่างแข็งก่อนด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วทำให้แห้งในเครื่องอบแห้งแบบเยือกแข็ง(Heto Drywinner FD 8, Heto-Holten, Holten, Denmark) ที่ความดัน 0.4 hPa อุณหภูมิชั้นวางตัวอย่าง 25°C และอุณหภูมิเครื่องควมแน่น -68°C ซังน้ำหนักโปรตีนแห้งที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณความชื้นและโปรตีนในโปรตีนแห้ง ตามวิธีของ AOAC (1995)⁽⁴⁾

การดูดซับน้ำและน้ำมัน (Water and Oil Adsorption)

ซังโปรตีนแห้งให้รู้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 5 กรัม ผสมกับน้ำหรือน้ำมัน (น้ำมันถั่วเหลืองตราอรุณ บริษัทน้ำมันพืชไทยจำกัด นครปฐม) ที่ซังให้รู้น้ำหนักที่แน่นอนสำหรับวิเคราะห์การดูดซับน้ำหรือน้ำมันตามลำดับ โดยสัดส่วนของโปรตีนแห้งต่อน้ำหรือน้ำมัน = 0.5:10 โดยน้ำหนัก ผสมโปรตีนแห้งให้เข้ากับน้ำหรือน้ำมันด้วย vortex mixer (MS1 Minishaker, IKA-Works, Inc., Wilmington, NC, USA) แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000xg นาน 30 นาที (Hettich zentrifugen

EBA21, Hettich, Tuttlingen, Germany) แยกส่วนของเหลวไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณน้ำหรือน้ำมันที่ถูกดูดซับโดยโปรตีนต่อ 1 กรัม โปรตีนแห้ง⁽⁵⁾

การวิเคราะห์ค่า Emulsifying Activity Index (EAI)

เตรียมสารละลายโปรตีนจากโปรตีนแห้งให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักโดยปริมาตร ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 (ชั่งน้ำหนักโปรตีนแห้งที่ใช้และสารละลายที่ได้เพื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นโดยน้ำหนักของสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้) ผสมสารละลายโปรตีนนี้กับน้ำมันถั่วเหลืองในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร แล้วปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer (Ystral X10/20, Ystral GmbH, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ความเร็ว 25,000 rpm นาน 2 นาที แยกของผสมที่ได้นี้เป็น 2 ส่วน

- o ส่วนที่ 1: ประมาณ 5 กรัม ซึ่งให้รู้น้ำหนักที่แน่นอน (W_1) นำไปอบแห้งที่ 50 °C จนได้น้ำหนักคงที่ชั่งน้ำหนักแห้ง (W_d)
- o ส่วนที่ 2: เจือจาง 1/1000 เท่าด้วยสารละลาย sodium dodecyl sulfate (Ajax, auburn, N.S.W., Australia) ในน้ำ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 น้ำหนักโดยปริมาตร นำของผสมที่เจือจางไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 nm ด้วย spectrophotometer (Jasco V-530, Japan Spectroscopic Co., Ltd., Tokyo, Japan) หาค่าความหนาแน่นของน้ำมันและของผสมโดยใช้ขวด ถพ คำนวณค่าความขุ่น (turbidity) ของของผสม และ ค่า EAI ของโปรตีนแห้ง จากสมการที่ 2 และ 3 ตามลำดับ⁽⁶⁾

$$T = 2.303(A/I) \quad (2)$$

เมื่อ

T = ค่าความขุ่น

A = ค่าดูดกลืนแสงที่ 500 nm

I = ความกว้างของ cuvette

$$EAI = 2(T/\phi C) \quad (3)$$

เมื่อ

ϕ = volume fraction ของน้ำมันในของผสม

$$= (W_d - EW_1) / [W_d + W_1(1 + E)D_o/D_m] - E!$$

W_1 = $W_1 - W_d$

E = ความเข้มข้นโดยน้ำหนักของโปรตีน

D_o = ความหนาแน่นของน้ำมัน

D_m = ความหนาแน่นของของผสม

C = ความเข้มข้นของโปรตีน น้ำหนักโดยปริมาตร

การวิเคราะห์การละลายของโปรตีนแห้ง

ละลายโปรตีนแห้งที่ได้ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักโดยปริมาตร แยกสารละลายออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งแบ่งออกเป็น 6 ส่วน เท่าๆกัน และชั่งน้ำหนักสารละลายแต่ละส่วน อีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาค่าร้อยละไนโตรเจนในโปรตีนแห้ง (% total nitrogen, %TN) ด้วยวิธี Kjeldahl ส่วนสารละลายอีก 5 ส่วนนำไปปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 5 ระดับในช่วง pH 2-10 ด้วย 1 N HCl (Merck, Darmstadt, Germany) หรือ 1 N NaOH (Merck, Darmstadt, Germany) กวนสารละลายด้วย magnetic stirrer นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500xg นาน 30 นาที (Kubota 5200, Kubota Corporation, Tokyo, Japan) นำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่ละลายในส่วนใส ด้วยวิธี Kjeldahl แล้วคำนวณค่า Nitrogen Solubility Index (NSI) จากสมการที่ 4 การละลายของโปรตีนประเมินได้จากค่า NSI⁽⁷⁾

$$NSI = 100(\%WSN/\%TN) \quad (4)$$

เมื่อ $\%WSN$ = ร้อยละไนโตรเจนที่ละลายในน้ำ (% water soluble nitrogen)
 $= 100(WN/WS)$
 WN = น้ำหนักของไนโตรเจนที่ละลายในน้ำ
 WS = น้ำหนักของโปรตีนแห้ง

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของปัจจัยที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากถั่วมะแฮะต่อองค์ประกอบในน้ำนมถั่วมะแฮะ

ตารางที่ 1.1 แสดงว่าน้ำสกัดถั่วมะแฮะประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนใหญ่ มีไขมันและใยอาหารในปริมาณที่พอๆกันประมาณ \leq ร้อยละ 6 และแสดงแนวโน้มว่าเมื่อสกัดด้วยน้ำ น้ำสกัดถั่วมะแฮะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าเมื่อสกัดด้วยสารละลาย NaHCO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 น้ำหนักโดยปริมาตร โดยเฉพาะเมื่อแยกกากถั่วออกจากน้ำสกัดถั่วมะแฮะด้วยการตกตะกอน ปริมาณโปรตีนในน้ำสกัดถั่วมะแฮะมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มสัดส่วนโดยน้ำหนักของตัวทำละลายต่อถั่ว การแยกกากถั่วออกจากน้ำสกัดถั่วมะแฮะด้วยการปั่นเหวี่ยงทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำสกัดถั่วมะแฮะสูงกว่าการแยกด้วยการตกตะกอน การสกัดด้วยสารละลาย NaHCO_3 ทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำสกัดถั่วมะแฮะมากกว่าการสกัดด้วยน้ำ ซึ่งอาจบ่งว่าโปรตีนที่อยู่ในถั่วมะแฮะสามารถละลายในสารละลาย NaHCO_3 (ซึ่งมีความเป็นด่างมากกว่าน้ำ) ได้ดีกว่าในน้ำ การสกัดด้วยสารละลาย NaHCO_3 แล้วแยกกากถั่วออกด้วยการตกตะกอนทำให้น้ำสกัดถั่วมะแฮะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าวิธีอื่น และมีคาร์โบไฮเดรตมากกว่าโปรตีนด้วย ปริมาณโปรตีนในน้ำสกัดถั่วมะแฮะลดลงเมื่อใช้น้ำในการสกัดและแยกกากถั่วด้วยการตกตะกอน การสกัดด้วยน้ำและแยกกากถั่วด้วยการปั่นเหวี่ยงทำให้มีปริมาณโปรตีนในน้ำสกัด (ซึ่งเรียกว่าน้ำนมถั่วมะแฮะ) สูงเมื่อใช้สัดส่วนโดยน้ำหนักของตัวทำละลายต่อถั่วเท่ากับ 3:1 ให้น้ำนมถั่วมะแฮะที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุด (ร้อยละ 57.59 โดยน้ำหนักแห้ง) และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำที่สุด (ร้อยละ 23.82 โดยน้ำหนักแห้ง) แต่ก็ให้ผลผลิตโปรตีนต่ำที่สุด ผลผลิตโปรตีนในน้ำนมถั่วมะแฮะได้ต่ำกว่าร้อยละ 6 และ 50 โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณจากถั่วมะแฮะที่นำมาสกัดและปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในถั่วมะแฮะ ตามลำดับ การปั่นเหวี่ยงช่วยทำให้คาร์โบไฮเดรต (ซึ่งส่วนหนึ่งคือเม็คสตราซ์) ตกตะกอนแยกออกจากน้ำสกัดได้ดีขึ้น น้ำนมถั่วมะแฮะที่ได้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณไขมันต่ำ

ปริมาณโปรตีนและสมบัติของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้ง

กระบวนการทำให้โปรตีนในน้ำสกัดโปรตีนแห้งประกอบด้วย การปรับ pH เพื่อตกตะกอนโปรตีน ทั้งนี้เพื่อเป็นการกำจัดน้ำและยังทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้ระดับหนึ่งอีกด้วย แล้วจึงนำไปทำให้แห้ง โดยให้ความร้อนเพื่อให้น้ำระเหยออก หรือโดยทำให้น้ำในตะกอนโปรตีนแข็งแล้วระเหิดออกไปที่อุณหภูมิและความดันต่ำกว่าจุด triple point ของน้ำในตะกอนโปรตีนนั้น (การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง) ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการทำแห้งตะกอนโปรตีนแบบแช่เยือกแข็งซึ่งทำให้โปรตีนเสียสภาพน้อยกว่าวิธีที่ใช้ความร้อน การทำให้โปรตีนแห้งทำให้สามารถเก็บรักษาได้ดีกว่าในรูปของน้ำสกัดหรือน้ำนมถั่วมะแฮะ โปรตีนแห้งที่ได้สามารถนำไปเป็นองค์ประกอบอาหารเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารต่างได้ อีกทั้งอาจนำไปใช้เป็น functional ingredient ได้^{10,11} ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนแห้งที่ได้^{10,11} และแสดงผลในตารางที่ 1.2 ซึ่งแสดงว่าปริมาณโปรตีนในโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งต่ำกว่าร้อยละ 65 โดยน้ำหนักแห้ง โดยปริมาณความชื้นของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งไม่เกินร้อยละ 7 โดยน้ำหนักเปียก ตามคำนิยามของ The Food and Nutrition Service, USDA¹² โปรตีนถั่วมะแฮะที่ผลิตได้นี้มีปริมาณโปรตีนไม่สูงพอที่จะเรียกว่าเป็น protein isolate หรือ protein concentrate ซึ่งต้องมีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 90 และ 65 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โปรตีนถั่วมะแฮะแห้งที่ได้จาก

การสกัดด้วยน้ำและแยกกากถั่วออกด้วยการปั่นเหวี่ยงมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 50 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งสามารถเรียกและปิดฉลากผลิตภัณฑ์เป็น Protein Flour ได้

โปรตีนถั่วมะแฮะแห้งมีความสามารถในการดูดซับน้ำ(โดยเฉลี่ยประมาณ 2.92 ± 0.59 กรัม น้ำต่อกรัม โปรตีนแห้ง)ดีกว่าน้ำมัน(โดยเฉลี่ยประมาณ 2.24 ± 0.55 กรัม น้ำมันต่อกรัม โปรตีนแห้ง)เล็กน้อย(1.30 เท่า) และ ค่า EAI ของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งมีค่าอยู่ในช่วง 5-19 (ตารางที่ 1.2) Mizubuti และคณะ (2000)⁽¹³⁾ พบว่าprotein flour จากถั่วมะแฮะ (pigeon pea concentrate) มีความสามารถในการดูดซับน้ำ(1.2 มล น้ำต่อกรัม โปรตีน)สูงกว่าความสามารถในการดูดซับน้ำมัน(1.07 มล น้ำมันต่อกรัม โปรตีน) แต่เมื่อปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเป็น protein concentrate ความสามารถในการดูดซับน้ำลดลงเป็น 0.87 มล น้ำต่อกรัม โปรตีน ขณะที่ความสามารถในการดูดซับน้ำมันเพิ่มขึ้นเป็น 1.73 มล น้ำมันต่อกรัม โปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับ Soy Protein Isolate (SPI) และ โปรตีนถั่วเขียวแห้ง⁽¹⁴⁾ พบว่าโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งดูดซับน้ำได้น้อยกว่า SPI (8.76 กรัม น้ำต่อกรัม โปรตีนแห้ง) แต่ได้มากกว่าโปรตีนถั่วเขียวแห้ง(2.41 กรัม น้ำต่อกรัม โปรตีนแห้ง) แต่โปรตีนถั่วมะแฮะแห้งดูดซับน้ำมันได้มากกว่า SPI (2.00 กรัม น้ำมันต่อกรัม โปรตีนแห้ง) แต่ได้น้อยกว่าโปรตีนถั่วเขียวแห้ง(5.76 กรัม น้ำมันต่อกรัม โปรตีนแห้ง) สัดส่วนของการดูดซับน้ำต่อการดูดซับน้ำมันของ SPI โปรตีนถั่วมะแฮะแห้งและโปรตีนถั่วเขียวแห้งเท่ากับ 4.38, 1.30 และ 0.42 ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการดูดซับน้ำได้พอๆกับการดูดซับน้ำมันอาจเป็นผลทำให้ความสามารถในการเป็นตัวทำอิมัลชันได้ไม่ดีเท่ากับ โปรตีนถั่วเขียวแห้งและ SPI ซึ่งมีค่า EAI เท่ากับ 83 และ 63 ตามลำดับ⁽¹⁴⁾

จากความสัมพันธ์ระหว่างการละลายของโปรตีนถั่วมะแฮะ (NSI) กับ pH (รูปที่ 1.1) แสดงว่าโปรตีนถั่วมะแฮะมี isoelectric point อยู่ระหว่าง pH 4.5-5.0 ซึ่งมีค่า NSI ต่ำสุด คือร้อยละ 8 และค่า NSI เพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงกว่าและต่ำกว่าช่วง pH นี้ และค่า NSI ของโปรตีนถั่วมะแฮะสูงสุดซึ่งเท่ากับร้อยละ 50 ที่ pH 10 pH ที่ให้ค่า NSI สูงสุดและต่ำสุดนี้เท่ากับของโปรตีนจากถั่วเขียว แต่การละลายหรือค่า NSI ของโปรตีนถั่วเขียวที่ pH 10 เท่ากับ ร้อยละ 85⁽¹⁵⁾ ซึ่งสูงกว่าของโปรตีนถั่วมะแฮะมาก

จากสมบัติที่วิเคราะห์ได้ โปรตีนถั่วมะแฮะเหมาะในการผลิตอาหารสำหรับผู้ที่ต้องการอาหารที่มีโปรตีนสูงแต่ไขมันต่ำ และควรใช้ผสมในอาหารแห้งมากกว่าเครื่องดื่ม เนื่องจากการละลายของโปรตีนต่ำ อาจนำโปรตีนถั่วมะแฮะไปเสริมโปรตีนในอาหารทอดได้โดยไม่ทำให้การร่อนน้ำมันเพิ่มขึ้น เนื่องจากโปรตีนนี้มีค่าการดูดซับน้ำมันต่ำ ไม่ควรใช้โปรตีนถั่วมะแฮะเป็นตัวตัวทำอิมัลชัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

างที่ 1.2 ปริมาณ โปรตีนและสมบัติของโปรตีนแห้งที่สกัดได้จากถั่วมะแฮะ

วัตถุดิบ	ปัจจัยที่ใช้ในการสกัด		ปริมาณ น้ำใน โปรตีน แห้ง ^a (ร้อยละ) Wet basis	ปริมาณ โปรตีน ใน โปรตีน แห้ง ^a (ร้อยละ) Dry basis	สมบัติของโปรตีนแห้ง		Emulsifying activity index (EAI) ^c	ผลผลิต โปรตีนแห้ง* (ร้อยละโดย น้ำหนัก)	กรัมโปรตีน ในโปรตีนแห้ง ต่อ 100 กรัมถั่วที่ ใช้
	กรัมตัวทำละลาย ต่อกรัมถั่ว/pH	วิธีแยก กากถั่ว			การดูดซับ น้ำ (g น้ำ/g ผงโปรตีน) ^b	การดูดซับ น้ำมัน (g น้ำมัน /g โปรตีน) ^b			
น้ำ	3:1/7.0	ตกตะกอน	na	na	na	na	na	na	na
	4:1/7.0	น	na	na	na	na	na	na	na
	5:1/7.0		na	na	na	na	na	na	na
	6:1/7.0		na	na	na	na	na	na	na
	7:1/7.0		na	na	na	na	na	na	na
	3:1/7.0	ปั่น	5.35	63.60	na	na	na	na	na
	4:1/7.0	เหวี่ยง	5.53	59.98	na	na	6.14	4.62	2.61
	5:1/7.0		6.68	58.88	na	na	na*	4.64	2.55
	6:1/7.0		4.10	61.00	3.061	na	12.17	5.13	3.00
	7:1/7.0		5.67	57.33	na	2.789	13.95	2.90	1.57
1% NaHCO ₃	3:1/7.7	ตกตะกอน	7.41	16.03	3.515	2.374	13.44	9.23	1.37
	4:1/8.1	น	6.12	19.53	3.387	2.289	4.99	14.65	2.69
	5:1/8.6		6.25	59.15	3.429	2.141	na*	12.94	7.18
	6:1/8.9		6.78	54.05	2.425	2.554	6.91	6.21	3.13
	7:1/9.0		7.92	12.95	1.976	1.871	na*	26.14	3.12
	3:1/87.7	ปั่น	7.45	62.78	na	na	na*	4.70	2.73
	4:1/8.1	เหวี่ยง	5.36	44.20	2.337	1.833	11.75	6.68	2.80
	5:1/8.6		6.16	22.15	3.149	na	19.27	5.20	1.08
	6:1/8.9		10.05	16.70	3.015	2.104	21.18	13.00	1.95
	7:1/9.0		8.29	53.32	na	na	14.25	2.27	1.11

na ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากสารหมด

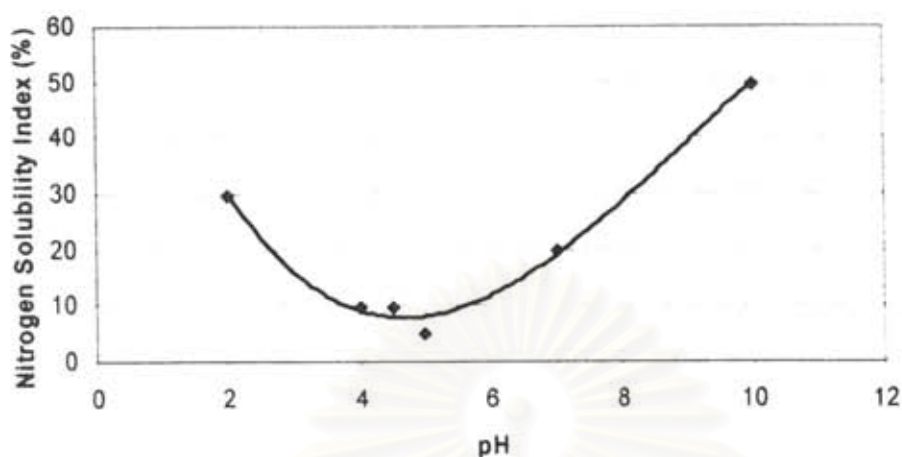
na* วิเคราะห์ไม่ได้ เนื่องจากมีตะกอนทำให้เครื่องปั่นติดขัด

• คำนวณจากถั่วที่ใช้

a % error ของค่าปริมาณความชื้นและปริมาณ โปรตีน ≤ 10

b % error ของค่าการดูดซับน้ำและการดูดซับน้ำมัน ≤ 5

c % error ของค่า EAI ≤ 5



รูปที่ 1.1 ความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับ Nitrogen solubility index (NSI) ของโปรตีนแห้ง

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป

น้ำ (pH \approx 7) เป็นตัวสกัดโปรตีนจากถั่วมะแฮะได้ดีกว่าสารละลาย NaHCO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 น้ำหนักโดยปริมาตร ในปริมาณที่ให้ pH \approx 8-9 สกัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำต่อถั่วมะแฮะเท่ากับ 3:1 และแยกการถั่วออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 2000 rpm นาน 10 นาที ให้ผลผลิตน้ำมันถั่วมะแฮะที่มีโปรตีนสูงสุดเท่ากับร้อยละ 57.59 โดยน้ำหนักแห้ง ขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำที่สุดเท่ากับร้อยละ 23.82 โดยน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณไขมันเท่ากับร้อยละ 3.14 โดยน้ำหนักแห้ง แต่ก็ได้ผลผลิตโปรตีนต่ำที่สุดคือต่ำกว่าร้อยละ 6 และ 50 โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณจากถั่วมะแฮะที่นำมาสกัดและปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในถั่วมะแฮะ ตามลำดับ เมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนในน้ำมันถั่วมะแฮะนี้ที่ pH 4.5 ได้ Protein Flour ที่มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 63.60 โดยน้ำหนักแห้ง

สมบัติของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งสรุปได้ดังนี้

- isoelectric point อยู่ระหว่าง pH 4.5-5.0
- ค่า NSI สูงสุดที่ pH 10 เท่ากับร้อยละ 50
- การดูดซับน้ำโดยเฉลี่ยประมาณ 2.92 ± 0.59 กรัม น้ำต่อกรัม โปรตีนแห้ง
- การดูดซับน้ำมันโดยเฉลี่ยประมาณ 2.24 ± 0.55 กรัม น้ำมันต่อกรัม โปรตีนแห้ง
- ค่า EAI อยู่ในช่วง 5-19

ดังนั้น โปรตีนถั่วมะแฮะจึงเหมาะในการผลิตอาหารสำหรับผู้ที่ต้องการอาหารที่มีโปรตีนสูงแต่ไขมันต่ำ และการใช้ผสมในอาหารแห้งมากกว่าเครื่องดื่ม การผสมโปรตีนถั่วมะแฮะเพื่อเสริมโปรตีนในอาหารที่จะนำไปทอดน่าจะไม่ทำให้การกวนน้ำมันเพิ่มขึ้น โปรตีนถั่วมะแฮะเป็นตัวตัวทำอิมัลชันที่ไม่ดี

เนื่องจากโปรตีนที่ได้ยังมีสารอื่นปนเปื้อนมากจึงควรรศึกษาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงขึ้น และศึกษาวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าจากโปรตีนสกัดนี้

เอกสารอ้างอิง

1. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตร www.kasetonline.net/newsite/index.php?id=44 31/12/2006.
2. Price, M.L. 1990. Pigeon Pea. ECHO Technical Note, ECHO, North Ft. Myers, Florida.
3. Valenzuela, H. and Smith, J. 2002. Pigeonpea. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
4. AOAC *Official Method of Analysis*; 16th Ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, 1995.
5. Sathe, S.K. and Salunkhe, D.K. 1981. Functional Properties of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Protein: Emulsion, Foaming, Viscosity and Gelation Properties. *J Food Sci.* 46: 71-74.
6. Pearce, K.N. and Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J. Agric. Food Chem.* 26: 716-723.
7. Vojdani, F. 1996. Solubility. In G. M. Hall (Ed.), *Method of Testing Protein Functionalty*, pp. 11-60. London: Blackie Acedemic & Professional.
8. Damodaran, S. 1996. Functional Properties. In: *Food Protein: Properties and Characterization*, S. Nakai and H.W. Modler (eds.), pp. 167-234. New York: VCH Publishers.
9. Franzen, K.L. and Kinsella, J.E. 1976. Functional Properties of Succinylated and Acetylated Soy Protein. *J. Agric. Food Chem.* 24: 788-795.
10. Hall, G.M. 1996. Basic Concepts. In: *Methodes of Testing Protein Functionality*, G.M. Hall (ed.), pp. 1-10. London: Blackie Academic & Professional.
11. Barbut, S. 1996. Determining Water and Fat Holding. In: *Methodes of Testing Protein Functionality*, G.M. Hall (ed.), pp. 186-225. London: Blackie Academic & Professional.
12. Kohnhorst, A.L., Smith, D.M., Uebersax, M.A. and Bennink, M.R. 1991. Production and Characterization of a Protein Concentrate from Navy Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry* 41: 33-42.
13. Mizubuti, I.Y., Biondo, O. Jr., Souza, L.W., da Silva, R.S. and ida, E.I. 2000. Functional Properties and Protein Concentrate of Pigeon Pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) Flour. *Arch Latinoam Nutr.* 50(3): 274-280.
14. ปฏิญญา สิริกุลชยานนท์. 2544. การผลิตสารทดแทนไขมันสำหรับอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจากโปรตีนถั่วเขียว วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
15. Sirikulchayanont, P., Jayanta, S., Pradipasena, P. and Miyawaki, O. 2007. Characteristics of Microparticulated Particles from Mung Bean Protein. *Int. J. Food Properties.* 10: 621-630.

บทที่ 2 การผลิตโปรตีนถั่วมะแฮะและอนุภาคจากโปรตีนถั่วมะแฮะเพื่อเป็นสารทดแทนไขมัน

พาสวดี ประทีปะเสน¹ ศิริพัศตร์ ไชยันต์² ปิยะนุช รัตเครือ¹ จิรัชย์ กันทะชู³ มติวรรณ กิจชัยเจริญ¹

¹ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา น่าน

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการเพื่อให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ขึ้นโดยนำถั่วมะแฮะไปสีเอาเปลือกออกก่อนนำไปสกัดโปรตีน โดยมีวิธีการดังนี้แช่ถั่วมะแฮะในสัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำต่อถั่วเท่ากับ 5:1 นาน 16 ชั่วโมง แล้วไม่ถั่วที่ได้กับน้ำให้ละเอียด สกัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำต่อถั่ว (คิดจากน้ำหนักของถั่วแห้งเริ่มต้น) 3:1 แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 200 mesh และแยก ถั่วออกจากน้ำสกัดถั่วมะแฮะด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำน้ำสกัดโปรตีนที่ได้มาผลิตเป็นโปรตีน ห้างและอนุภาคโปรตีน โปรตีนแห้งที่ได้จากการนำน้ำสกัดโปรตีนไปอบแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งประกอบด้วยน้ำ โปรตีน ไขมัน เกลือ และคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 2.56 64.33 3.00 2.97 และ 27.14 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โปรตีนถั่วมะแฮะแห้งนี้มีความสามารถในการดูดซับน้ำหรือน้ำมันเท่ากับ 3.25 หรือ 3.17 กรัม/น้ำหรือน้ำมันต่อกรัมโปรตีนแห้ง ตามลำดับ มี surface hydrophobicity เท่ากับ 28.71 และมีค่า emulsifying activity index เท่ากับ 30.49 ซึ่งบ่งว่าไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นตัวทำอิมัลชัน การนำไปใช้เสริมโปรตีนในอาหาร

สำหรับการผลิตอนุภาคโปรตีนจากน้ำสกัดโปรตีนสำหรับใช้เป็นสารทดแทนไขมันนั้น ทำได้โดย นำน้ำสกัดโปรตีนโปรตีนไปต้มให้เดือดนาน 15 นาที โดยคนตลอดเวลาที่ให้ความร้อน ปรับ pH ของน้ำสกัดถั่วมะแฮะให้ได้ pH 4.5 ด้วย 1 N HCl นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4000xg อุณหภูมิ 20°C นาน 20 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ใช้สัดส่วนตะกอนต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 4000xg อุณหภูมิ 20°C นาน 20 นาที นำส่วนตะกอนมาละลายในน้ำกลั่นในสัดส่วนตะกอนต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก แล้วนำไปลดขนาดอนุภาคโปรตีนด้วยการตีปั่นด้วยไฮโมจิในเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 400 mesh แล้วนำสารแขวนลอยอนุภาคโปรตีนที่ผ่านตะแกรงไปอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง อนุภาคโปรตีนที่ได้เป็นทรงกลมและมีขนาดอนุภาคที่อยู่ในช่วง 0.1-3 ไมครอน ร้อยละ 65 โดยปริมาตร อนุภาคโปรตีนนี้สามารถใช้ทดแทนไขมันในสปีนจ์เค้กได้ร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก

คำสำคัญ ถั่วมะแฮะ โปรตีนถั่วมะแฮะ การคิดแปร โปรตีนทางกายภาพ อนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะ สารทดแทนไขมัน

ผู้นิพนธ์ประสานงาน ปิรมณีย์อเล็กทรอนิกส์ ppasawud@scscoms.com โทร 0-2218-5536

Production of Pigeonpea Protein and Its Microparticulated Particle for Using as Fat replacer

Pasawadee Pradipasena^{1*}, Siripastr Jayanta², Piyanuch Roskhrua^{1,3}, Jirarat Kantakhoo¹,

Maliwan Kitchaicharoen³

¹Food Technology Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

²Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

³Rajamangala University of Technology Lanna, Nan Campus

*Corresponding author

Abstract

To get higher protein content, dehulling was introduced prior to protein extraction process. The extraction conditions included: soaking pea in water (weight ratio of water to pea = 5:1) for 16 hr, draining water, wet milling pea (weight ratio of water to dry pea = 3:1), filtering through 200 mesh sieve and centrifugation of filtrate at 2000 rpm for 10 min. The protein extract (supernatant) was used to produce dry protein by freeze drying and protein microparticle/microparticulated particle. The freeze dried pigeonpea protein contained 64.33% protein, 2.56% moisture, 3.00% fat, 9.97% ash and 27.14% carbohydrate. Properties of this protein were water absorption capacity, oil absorption capacity, surface hydrophobicity and emulsifying activity index of 3.25 g/g dry protein, 3.17 g/g dry protein, 28.71 and 30.49, respectively.

To produce microparticulated protein particle, the protein extract was boiled (while stirring all the time) for 15 min, adjusted to pH 4.5 with 1 N HCl centrifuged at 4000xg and 20 °C for 20 min. The precipitated protein was washed twice with distilled water (weight ratio of water to precipitate = 1:1), centrifuged at 4000xg and 20 °C for 20 min after each washing. The protein precipitate was resuspended in water (weight ratio of water to precipitate = 1:1), homogenized at 4000 rpm for 10 min, filtered through 400 mesh sieve, and then freeze dried the filtrate. These pigeonpea microparticles had spherical shape and 65% volume of them had particle size in the range of 0.1-3 micron. It could be used to replaced 30% of fat in sponge cake.

Keywords: Pigeonpea, protein, physically modification, microparticulated particle, fat replacer

Corresponding author e-mail address: ppasawad@hotmail.com

กษา

เนื่องจากผู้บริโภคนิยมบริโภคอาหารที่โปรตีนสูงไขมันต่ำ และจากการศึกษาในปิงบประมาณ 2549 พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากถั่วมะแฮะมีปริมาณไขมันต่ำ แต่เนื่องจากการลดปริมาณไขมันมีผลที่ไม่ดีถึงปลั๊กขณะเนื้อสัมผัสของอาหาร ทำให้มีรศึกษาวิจัยเพื่อผลิตสารทดแทนไขมันที่ให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารคล้ายไขมัน แต่มีปริมาณไขมันหรือให้พลังงานต่ำแก่ไขมัน สารทดแทนไขมันนี้สามารถผลิตได้จากโปรตีน โดยวิธีการทางกายภาพซึ่งประกอบไปด้วยการทำให้โปรตีนเสียสภาพและจับตัวกันเป็นก้อน แล้วทำให้โปรตีนที่เสียสภาพแตกออกเป็นอนุภาคโปรตีน ลักษณะทางกายภาพที่สำคัญของสารทดแทนไขมันคือรูปร่างและขนาดอนุภาคเป็นทรงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.1-3.0 μm ซึ่งให้เนื้อสัมผัสมีลักษณะคล้ายครีมในอาหารประเภทอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า microparticulation และอนุภาคโปรตีนที่ได้เรียกว่า microparticulated protein particle หรือ MP^(1,2) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกผลิตสารทดแทนไขมันจากโปรตีนถั่วมะแฮะด้วยกระบวนการ microparticulation และศึกษาสมบัติของสารทดแทนไขมันที่ได้

รทดลอง

รสกัดโปรตีน

นำถั่วมะแฮะแห้ง (จังหวัดน่าน) มาสีเพื่อเอาเปลือกออกที่โรงสี อำเภอนาน้อย จังหวัดน่าน ชั่งถั่ว มะแฮะที่สีแล้วให้สะอาดและแยกเอาเมล็ดที่ลอยน้ำทิ้ง แช่ถั่ว 16 ชั่วโมง โดยใช้สัดส่วนของน้ำแช่ต่อถั่วเท่ากับ 5:1 โดยน้ำหนัก แล้วเทน้ำทิ้ง นำถั่วที่ได้ไปสกัดโปรตีนโดยไม่ละเอียดกับน้ำ โดยน้ำหนักของน้ำต่อถั่ว (คิดน้ำหนักของถั่วจากที่ชั่งได้) เท่ากับ 3:1 แยกโปรตีนที่ละลายน้ำออกจากกากถั่วโดยกรองผ่านตะแกรง 200 mesh แล้วนำน้ำกรองมากำจัดกากถั่วโดยปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำโปรตีนที่ละลายน้ำไปต้มให้เดือดนาน 15 นาที โดยคนตลอดเวลาที่ให้ความร้อน ปรับ pH ของน้ำสกัดถั่วมะแฮะให้ได้ pH 4.5 ด้วย 1 N HCl นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4000xg อุณหภูมิ 20°C นาน 20 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ใช้สัดส่วนตะกอนต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 4000xg อุณหภูมิ 20°C นาน 20 นาที นำส่วนตะกอนมาละลายในน้ำกลั่นในสัดส่วนตะกอนต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น pH 7 ด้วย 1N NaOH นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500xg นาน 30 นาที อุณหภูมิ 20°C นำส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่ 4000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่ 15°C เพื่อแยกเอาส่วนใสออกไป นำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปทำให้แห้งในเครื่องอบแห้งแบบเยือกแข็ง (Duradry μP , FTS Systems Inc., New York, USA) ที่ความดันภายในที่ใส่ตัวอย่างต่ำกว่า 10 mT อุณหภูมิของเครื่องความเย็นต่ำกว่า -40°C

วิเคราะห์ปริมาณ(ร้อยละโดยน้ำหนัก)ของน้ำ โปรตีน ไขมัน และเถ้าและไซโนในน้ำมันถั่วมะแฮะตามวิธีของ AOAC 995)⁽¹⁾ แล้วคำนวณหาปริมาณของคาร์โบไฮเดรตจากสมการที่ 1

$$\text{ปริมาณคาร์โบไฮเดรต} = 100 - \Sigma(\text{ปริมาณน้ำ โปรตีน ไขมัน และเถ้า}) \quad (1)$$

ศึกษาลักษณะของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy,

4)

นำโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งที่เตรียมได้มาติดบน stub โดยใช้เทปกาวสองหน้า แล้วฉาบทองที่ผิวด้วยเครื่องฉาบทอง PI-Module Sputter Coater, Structure Probe, Inc., West Chester, PA, USA) บันทึกภาพของตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL รุ่น JSM-6480 LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) ความดันที่ 15 kV โดยใช้กำลังขยาย 50 400 4,000 และ 300 เท่า วิเคราะห์ลักษณะรูปร่างและพื้นผิวของโปรตีนจากภาพที่บันทึกได้

การศึกษาสมบัติของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้ง

การวิเคราะห์การดูดซับน้ำและน้ำมันของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้ง

ผสมโปรตีนถั่วมะแฮะกับน้ำหรือน้ำมัน (น้ำมันถั่วเหลืองตราอรุณ บริษัทน้ำมันพืชไทย จำกัด, นครปฐม) สำหรับวิเคราะห์การดูดซับน้ำหรือน้ำมัน ตามลำดับ โดยใช้สัดส่วนโปรตีนแห้งต่อน้ำ หรือน้ำมันเป็น 0.5:10 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer (MS1 Minishaker, IKA-Works, Inc., Wilmington, NC, USA) แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำของผสมไปหมุนเหวี่ยงที่ 4000xg นาน 30 นาที (Hettich zentrifugen EBA21, Hettich, Germany) แยกส่วนของเหลวไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณน้ำหรือน้ำมันที่ถูกดูดซับไปโดยคำนวณปริมาณน้ำหรือน้ำมันที่ถูกดูดซับไปโดยโปรตีนต่อ 1 กรัมโปรตีนแห้ง⁴⁴ เปรียบเทียบกับการดูดซับน้ำหรือน้ำมันของ soy protein isolate (Supro EX33, Protein Technologies International, St. Louis, MO, USA)

การวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity

เตรียมสารละลายโปรตีนเข้มข้นร้อยละ 0.005-0.025 น้ำหนักโดยปริมาตร ใน 0.01M phosphate buffer pH 7.0 Na_2HPO_4 (Scharlau, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) และ NaH_2PO_4 (Scharlau, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain)] เติม fluorescent probe [8mM ANS (1-anilinonaphthalene-8-sulfonate), Sigma, St. Louis, MO, USA] 20 μL ต่อสารละลายโปรตีน 4 ml นำสารละลายไปวัดค่า fluorescent intensity ที่ 390 nm (excitation wavelength) และ 470 nm (emission wavelength) โดยตั้งค่า excitation และ emission slit widths ที่ 5 และ 5 nm ตามลำดับ ด้วยเครื่อง spectofluorometer Jasco FP-6200, Japan Spectroscopic Co., Ltd., Tokyo, Japan) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (Sigma, St. Louis, MO, USA) และ Soy Protein Isolate เป็นสารอ้างอิง ค่า surface hydrophobicity สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2⁴⁵

$$\text{Surface hydrophobicity} = (S_p/S_{BSA})100 \quad (2)$$

เมื่อ S_p = ค่าความชันของกราฟระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับ fluorescent intensity สำหรับโปรตีนที่ศึกษา

S_{BSA} = ค่าความชันของกราฟระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับ fluorescent intensity สำหรับ BSA

การวิเคราะห์ค่า Emulsifying Activity Index (EAI) ของโปรตีนถั่วอะแฉะแห้ง

เตรียมสารละลายโปรตีนจากโปรตีนแห้งให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักโดยปริมาตร ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 (ซึ่งน้ำหนักโปรตีนแห้งที่ใช้และสารละลายที่ได้เพื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นโดยน้ำหนักของสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้) ผสมสารละลายโปรตีนนี้กับน้ำมันถั่วเหลืองในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร แล้วปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer (Ystral X10/20, Ystral GmbH, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที แยกของผสมที่ได้นี้เป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1: ประมาณ 5 กรัม ซึ่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (W_1) นำไปอบแห้งที่ $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ จนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งหนักแห้ง (W_2)

ส่วนที่ 2: เจือจาง 1/1000 เท่าด้วยสารละลาย sodium dodecyl sulfate (Ajax, auburn, N.S.W., Australia) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 น้ำหนักโดยปริมาตร นำของผสมที่เจือจางไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 nm ด้วย spectrophotometer (Jasco -530, Japan Spectroscopic Co., Ltd., Tokyo, Japan)

หาค่าความหนาแน่นของน้ำมันและของผสมโดยใช้ขวด ถพ คำนวณค่าความขุ่น (turbidity) ของของผสม และ ค่า EAI ของโปรตีนแห้ง จากสมการที่ 3 และ 4 ตามลำดับ⁽⁶⁻⁷⁾

$$T = 2.303(A/I) \quad (3)$$

เมื่อ

T = ค่าความขุ่น

A = ค่าดูดกลืนแสงที่ 500 nm

I = ความกว้างของ cuvette (0.01 m)

$$EAI = (2(T/\phi C) \times DF)/10000 \quad (4)$$

เมื่อ

ϕ = volume fraction ของน้ำมันในของผสม

$$= (W_d - EW_1)/(W_d + W_1[(1 + E)D_o/D_m] - E)$$

$W_1 = W_i - W_d$

E = ความเข้มข้นโดยน้ำหนักของโปรตีน

D_o = ความหนาแน่นของน้ำมัน

D_m = ความหนาแน่นของของผสม

C = ความเข้มข้นของโปรตีน น้ำหนักโดยปริมาตร

DF = dilution factor (1000)

การวิเคราะห์การละลายของโปรตีนแห้ง

ละลายโปรตีนแห้งที่ได้ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักโดยปริมาตร แบ่งสารละลายออกเป็น 2 เบน โดยส่วนแรกนำไปวิเคราะห์หาค่าร้อยละโปรตีนในโปรตีนแห้งด้วยวิธี Kjeldahl สารละลายอีกส่วนแบ่งออกเป็น 6 ส่วน ๆ กัน ซึ่งน้ำหนักสารละลายแต่ละส่วนก่อนนำไปปรับ pH ให้ได้ 6 ระดับในช่วง pH 2-10 ด้วย 1 N HCl (Merck, Darmstadt, Germany) หรือ 1 N NaOH (Merck, Darmstadt, Germany) กวนสารละลายด้วย magnetic stirrer นาน 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500×g เป็นเวลา 30 นาที (Thermo ICE, ICE Multi RF, USA) นำของเหลวส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ ด้วยวิธี Kjeldahl แล้วคำนวณค่าร้อยละการละลายของโปรตีน (% Protein Solubility) จากสูตรที่ 5^(6, 8)

$$\% \text{ Protein Solubility} = \frac{(\text{Protein content of sample}) \times 100}{(\text{Protein content of sample})} \quad (5)$$

การผลิตอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะเพื่อเป็นสารทดแทนไขมัน

การผลิตอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะจากโปรตีนถั่วมะแฮะแห้ง

การผลิตอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะจากโปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่านการทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน การทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน

เตรียมสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะแฮะเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักในน้ำกลั่น จากโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งที่เตรียมได้ นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ $83 \pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 15 นาที พร้อมตีปั่นตลอดเวลาด้วยไฮโมจิไนเซอร์ (Ystral X10/20, Ystral GmbH, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพ

การลดขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะหลังจากถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน

การศึกษาผลของแรงเฉือนจากการตีปั่นต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน

นำสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่านความร้อนตามวิธีข้างต้นมาตีปั่นด้วยไฮโมจิไนเซอร์ที่ความเร็ว 3,000 16,000 19,000 22,000 และ 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ระหว่างการตีปั่นใช้อ่างน้ำเย็นช่วยลดอุณหภูมิตัวอย่างขณะตีปั่น แล้ววิเคราะห์ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะด้วยเครื่อง Particle Size Analyzer (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK) เลือกความเร็วรอบในการตีปั่นที่ให้อนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอนมากที่สุดมาทำการลดขนาดอนุภาคคือ

การศึกษาผลของเวลาในการตีปั่นต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน

นำสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่านการทำให้เสียสภาพแล้วมาตีปั่นต่อด้วยไฮโมจิไนเซอร์ที่ระดับความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 20 40 60 และ 80 นาที และใช้อ่างน้ำเย็นช่วยลดอุณหภูมิตัวอย่างขณะตีปั่น แล้ววิเคราะห์ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะด้วยเครื่อง Particle Size Analyzer เลือกเวลาที่ใช้ตีปั่นที่ให้อนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอนมากที่สุดมาทำการลดขนาดอนุภาคต่อด้วยคลื่นเหนือเสียง

การศึกษาผลของเวลาในการลดขนาดด้วยคลื่นเหนือเสียงต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน
 นำสารแขวนลอยโปรตีนที่ทำให้เสียสภาพแล้วมาตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที และนำมาลดขนาดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic processor, Hielscher UP400S, Hielscher Ultrasonics mbH, Teltow, Germany) ที่ระดับ amplitude 100% (400 วัตต์) และความถี่ 0.5 Hz เป็นเวลา 0 15 25 35 45 และ 55 นาที แล้ววิเคราะห์ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคโปรตีนด้วยเครื่อง Particle Size Analyzer

การผลิตอนุภาคโปรตีนถั่วมะเดื่อจากโปรตีนถั่วมะเดื่อที่ไม่ถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน

การศึกษาผลของเวลาในการลดขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะเดื่อด้วยไฮโมจิโนเซอร์ต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน
 เตรียมสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะเดื่อเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักในน้ำกลั่น แล้วตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที ระหว่างการตีปั่นใช้อ่างน้ำเย็นช่วยลดอุณหภูมิตัวอย่างขณะตีปั่น วิเคราะห์ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะเดื่อด้วยเครื่อง Particle Size Analyzer เลือกเวลาที่ใช้ตีปั่นให้อนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอนมากที่สุดมาทำการลดขนาดอนุภาคต่อด้วยคลื่นเหนือเสียง

การศึกษาผลของเวลาในการลดขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะเดื่อด้วยคลื่นเหนือเสียงต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน
 เตรียมสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะเดื่อเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักในน้ำกลั่น แล้วลดขนาดด้วยคลื่นเหนือเสียงที่ระดับ amplitude 400 watt และ ความถี่ 1 Hz เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที ใช้อ่างน้ำเย็นช่วยลดอุณหภูมิตัวอย่างทำการลดขนาด วิเคราะห์ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะเดื่อด้วยเครื่อง Particle Size Analyzer ออกเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงที่ให้อนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอนมากที่สุดมาทำการลดขนาดอนุภาคหลังจากถูกลดขนาดด้วยการตีปั่น

การเพิ่มปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน โดยใช้ทั้งไฮโมจิโนเซอร์และคลื่นเหนือเสียง
 เตรียมสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะเดื่อเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักในน้ำกลั่น แล้วตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 60 นาที แล้วลดขนาดต่อด้วยคลื่นเหนือเสียงที่ระดับ amplitude 400 watt และ ความถี่ 1 Hz เป็นเวลา 60 นาที และตีปั่นต่อด้วย ไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองตัวอย่างด้วยตะแกรงขนาด 300 mesh 2 รอบ (ตัวอย่าง [S]) นำตัวอย่างที่ผ่านการกรองมาลดขนาดด้วยคลื่นเหนือเสียงที่ระดับ amplitude 400 watt และ ความถี่ 1 Hz เป็นเวลา 60 นาที กรองตัวอย่างด้วยตะแกรงขนาด 300 mesh 1 รอบ แล้วนำมาตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 นาที (ตัวอย่าง [SSH0]) และ 60 นาที และกรองตัวอย่างด้วยตะแกรงขนาด 300 mesh 1 รอบ (ตัวอย่าง [SSH60]) ในระหว่างการลดขนาดใช้อ่างน้ำเย็นช่วยลดอุณหภูมิตัวอย่าง วิเคราะห์ขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะเดื่อ ด้วยเครื่อง Particle Size Analyzer

การผลิตอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะจากน้ำสกัดโปรตีนถั่วมะแฮะ

นำถั่วมะแฮะแห้ง (จังหวัดน่าน) มาสีเพื่อเอาเปลือกออกที่โรงสี อำเภอเมือง จังหวัดน่าน ชั่งถั่ว มะแฮะที่สีแล้วล้างสะอาดและแยกเอาเมล็ดที่ลอยน้ำทิ้ง แช่ถั่ว 16 ชั่วโมง โดยใช้สัดส่วนของน้ำแช่ต่อถั่วเท่ากับ 5:1 โดยน้ำหนัก แล้วเทน้ำทิ้ง ถั่วที่ได้ไปสกัดโปรตีนโดยปั่นละเอียดกับน้ำ โดยน้ำหนักของน้ำต่อถั่ว (กีดน้ำหนักของถั่วจากที่ชั่งได้) เท่ากับ 3:1 แยกโปรตีนที่ละลายน้ำออกจากกากถั่วโดยกรองผ่านตะแกรง 200 mesh แล้วนำน้ำกรองมากำจัดกากถั่วโดยปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำโปรตีนที่ละลายน้ำไปต้มให้เดือดนาน 15 นาที โดยคนตลอดเวลาที่ให้ความร้อน ปรับ pH ของน้ำสกัดถั่วมะแฮะให้ได้ pH 4.5 ด้วย 1 N HCl นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4000xg อุณหภูมิ 20°C นาน 20 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไว้ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ใช้สัดส่วนตะกอนต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 4000xg อุณหภูมิ 20°C นาน 20 นาที นำส่วนตะกอนมาละลายในน้ำกลั่นในสัดส่วนตะกอนต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก แล้วนำไป

- ลดขนาดอนุภาคโปรตีนด้วยการตีปั่นด้วยโซโม่จิในเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 และ 10 นาที
- ลดขนาดอนุภาคโปรตีนด้วยการตีปั่นด้วยโซโม่จิในเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 400 mesh
- ลดขนาดอนุภาคโปรตีนด้วยการตีปั่นด้วยโซโม่จิในเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 400 mesh แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 1000 และ 2000 xg นาน 10 นาที แล้วเทตะกอนทิ้ง

นำตัวอย่างที่ได้ในแต่ละขั้นตอนไปวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Particle Size Analyzer คัดเลือกตัวอย่างที่มีอนุภาคโปรตีนที่อยู่ในช่วง 0.1-3 ไมครอน และ/หรือ 0.1-10 ไมครอน มากที่สุดมา

- วิเคราะห์รูปร่างด้วย SEM โดยนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:200 โดยปริมาตร หยดบน slide ทำให้แห้งแล้วผ่านกระบวนการฉาบทอง (SPI-Module Sputter Coater, Structure Probe, Inc., West Chester, PA, U.S.A.) ในสถานะสุญญากาศ แล้ววิเคราะห์รูปร่างของอนุภาคโปรตีนด้วย Scanning Electron Microscopy (JSM-5401 LV, JEOL, Akishima, Japan) ที่ 15 kv ด้วยกำลังขยาย 10,000 เท่า
- ทำแห้ง
 - ในเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Duradry μ P, FTS Systems Inc., New York, USA) ที่ความดันภายในที่ใส่ตัวอย่างต่ำกว่า 500 mT อุณหภูมิของเครื่องควมแน่นต่ำกว่า -40°C
 - ในเครื่องอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C และความดันสุญญากาศ 30 in Hg (model 273600, Hotpack Corporation, Philadelphia, USA)

แล้วนำอนุภาคโปรตีนแห้งไปบดด้วย Hammer mill (Cyclotec™ 1093, Foss, Foss Analytical, DK-3400 Hillerød, Denmark) แล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเช่นเดียวกับโปรตีนแห้ง วิเคราะห์การดูดซึมน้ำและน้ำมัน และ EAI เช่นเดียวกับ โปรตีนแห้ง และศึกษาการนำไปใช้เป็นสารทดแทนไขมัน

การศึกษาการทดแทนไขมันด้วยอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะ ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ผลิตภัณฑ์อาหารที่เลือกศึกษาคือสปีนจ์เค้ก โดยสูตรมาตรฐานของสปีนจ์เค้กที่ใช้ประกอบด้วยแป้ง [สปีนจ์เค้กมิกส์ คราอิมพีเรียล บริษัท ยูโนเค็ด แครีฟู๊ด จำกัด ประเทศไทย] น้ำ ไข่ไก่และเนยจืด (เนยจืด อลาวรี บริษัท ยูโนเค็ด แครีฟู๊ด จำกัด กรุงเทพฯ ประเทศไทย) 400 40 320 และ 40 กรัม ตามลำดับ นำ อนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะ ที่ผลิตได้มาทดแทนไขมัน(เนยจืด)ในสปีนจ์เค้ก ในปริมาณร้อยละ 30 และ 50 โดยน้ำหนักของเนยจืดที่ใช้ในสูตรสปีนจ์เค้กมาตรฐาน ชั่งแป้ง น้ำ ไข่ไก่ เนยจืด และ อนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะ ให้ได้น้ำหนักที่ต้องการตามสูตร ผสมแป้งกับอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะ ให้เข้ากันก่อนในกรณีมีอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะเป็นส่วนผสม แล้วจึงเติมน้ำและไข่ไก่ลงไป ปั่นส่วนผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน (Kenwood, KM230, Kenwood Ltd., Britain) ที่ความเร็วต่ำสุดของเครื่องปั่นนาน 1 นาที แล้วตัดต่อที่ความเร็วสูงสุดนาน 5 นาที ตามด้วยการตีที่ความเร็วต่ำสุดอีก 1 นาที แล้วค่อยๆ เติมนเนยจืดที่ละลายแล้วลงไป แล้วปั่นส่วนผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันที่ความเร็วต่ำสุด นาน 1 นาที แล้วเทใส่พิมพ์ ที่ทาเนยจืด แล้วนำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 180 °C นาน 22 นาที (โดยเปิดเตาอบให้ได้ อุณหภูมิเท่าที่ต้องการก่อน) เอาถาดเค้กออกจากเตาอบทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (28 °C) นาน 30 นาที แล้วแกะเค้กออกจากพิมพ์ นำเค้กที่ได้มาประเมินทางประสาทสัมผัส โดยทำการทดสอบความแตกต่างโดยรวมแบบ Duo-Trio ด้วยการเปรียบเทียบสูตรทดแทนไขมันด้วยอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะแต่ละสูตรกับสูตรมาตรฐาน (ไขมันเต็ม) ใช้กลุ่มผู้ทดสอบชนิดกึ่งฝึกฝน จำนวน 20 คน กำหนด Chi-square ที่ $df = 1$ เปรียบเทียบผลเพื่อหาความแตกต่างด้วย One-tailed binomial test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้ง

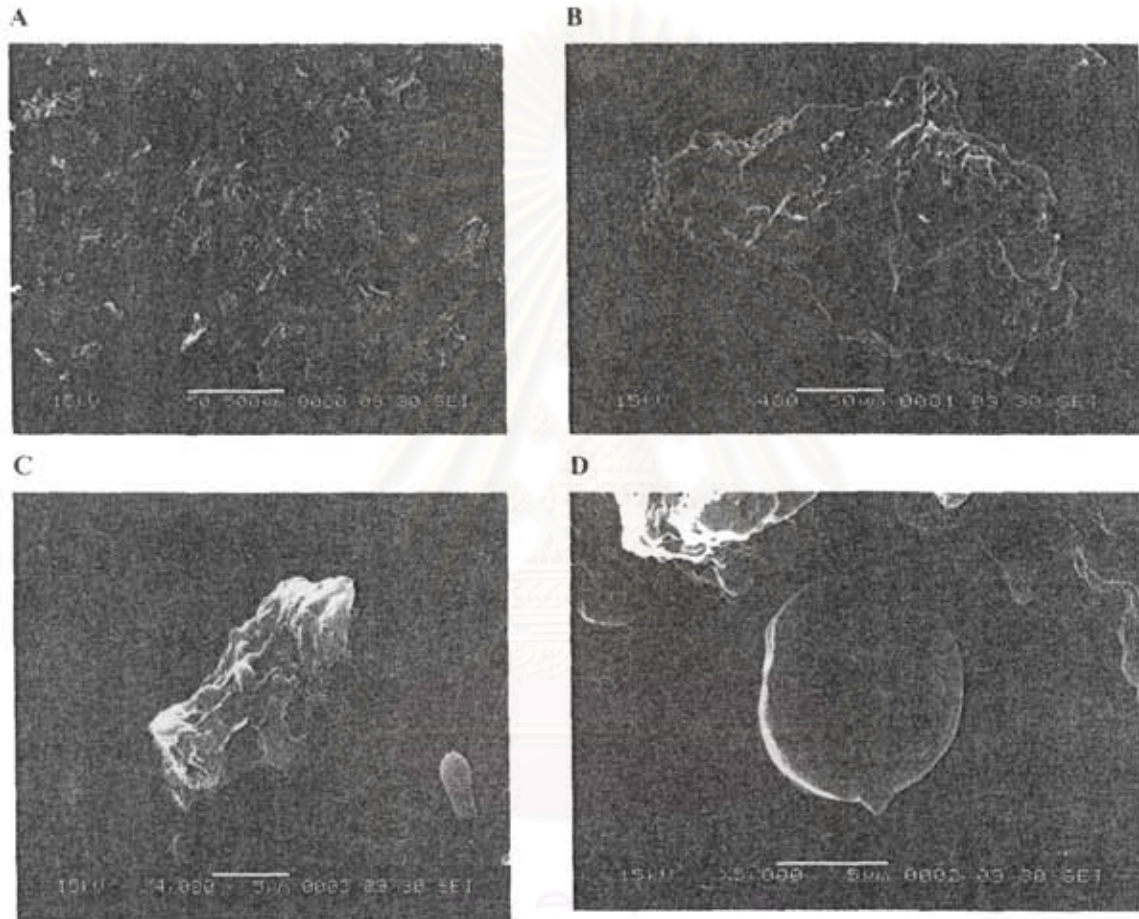
กระบวนการทำให้โปรตีนในน้ำสกัดโปรตีนแห้งประกอบด้วยการปรับ pH เพื่อตกตะกอนโปรตีน ทั้งนี้เพื่อเป็น รก้าจัดน้ำและยังทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้ระดับหนึ่งอีกด้วย แล้วจึงนำไปทำให้แห้งโดยให้ความร้อนเพื่อให้ น้ำระเหยออก อโดยทำให้น้ำในตะกอนโปรตีนแข็งแล้วระเหิดออกไปที่อุณหภูมิและความดันต่ำกว่าจุด triple point ของน้ำในตะกอน รตินนั้น(การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง) ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการทำแห้งตะกอนโปรตีนแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งทำให้ รตินเสียสภาพน้อยกว่าวิธีที่ใช้ความร้อน การทำให้โปรตีนแห้งทำให้สามารถเก็บรักษาได้ดีกว่าในรูปของน้ำสกัดหรือ นมถั่วมะแฮะ โปรตีนแห้งที่ได้สามารถนำไปเป็นองค์ประกอบอาหารเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารต่างได้ ทั้งอาจนำไปใช้เป็น functional ingredient ได้⁽⁹⁻¹⁰⁾ จากการทดลองพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้ง รางที่ 2.1) ประกอบด้วยน้ำเพียงร้อยละ 2.56 โดยน้ำหนัก มีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 64.33 โดยน้ำหนัก ตามกำนิยามของ The od and Nutrition Service, USDA⁽¹¹⁾ โปรตีนถั่วมะแฮะที่ผลิตได้นี้มีปริมาณโปรตีนไม่สูงพอที่จะเรียกว่าเป็น protein isolate ปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 90 โดยน้ำหนักแห้ง) แต่อาจเรียกเป็น protein concentrate (ปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 1 โดยน้ำหนักแห้ง) กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนถั่วมะแฮะมี cystine และ methionine อยู่ น้อย ร่างกายสามารถ กรดอะมิโนในโปรตีนของถั่วมะแฮะมาใช้ได้ (amino acid availability) ร้อยละ 82.32 โดยน้ำหนัก ซึ่งต่ำกว่าโปรตีนถั่ว ลีอง (> ร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก)⁽¹²⁾ โปรตีนถั่วมะแฮะมีองค์ประกอบที่เป็นไขมันอยู่ต่ำ (ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก) ไขมันที่พบใน มะแฮะส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (ร้อยละ 69.04 โดยน้ำหนัก) มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวร้อยละ 30.69 โดย หนัก⁽¹²⁾ นอกจากนี้พบปริมาณเถ้าในโปรตีนถั่วมะแฮะร้อยละ 2.97 โดยน้ำหนัก ซึ่งจากการศึกษาของ Nwokolo (1987)⁽¹²⁾ ษงานว่าถั่วมะแฮะมีโปแตสเซียมสูงมาก รองลงมาได้แก่ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมงกานีส ตามลำดับ แต่มีธาตุเหล็ก สังกะสี วงแดง และแมงกานีสต่ำ

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนถั่วมะแฮะ

องค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
ความชื้น	2.56 ± 0.13
โปรตีน	64.33 ± 0.44
ไขมัน	3.00 ± 0.04
เถ้า	2.97 ± 0.01
คาร์โบไฮเดรต	27.14

ลักษณะของโปรตีนถั่วมะแฮะ

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 2.1) พบว่าโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งมีลักษณะรูปร่างหลายแบบ มีทั้งที่เป็นและไม่เป็นรูปทรงเรขาคณิต มีขนาดไม่สม่ำเสมอ (ภาพ A) และสังเกตเห็นว่าบนพื้นผิวของโปรตีนยังมีอนุภาคของโปรตีนขนาดเล็กเกาะอยู่ (ภาพ B) ซึ่งมีทั้งอนุภาคที่ไม่เป็นรูปทรงเรขาคณิต (ภาพ C) และอนุภาคทรงกลม (ภาพ D)



รูปที่ 2.1 ภาพของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

สมบัติของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้ง

จากตารางที่ 2.2 โปรตีนถั่วมะแฮะแห้งมีความสามารถในการดูดซับน้ำ (3.25 กรัม น้ำต่อกรัม โปรตีน) ต่ำกว่า soy protein isolate (6.92 กรัม น้ำต่อกรัม โปรตีน) แต่สามารถดูดซับน้ำมันได้ดีกว่า ซึ่งคล้ายกับสมบัติของการดูดซับน้ำและน้ำมันของโปรตีนถั่วมะแฮะที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยสารละลาย NaHCO_3 โดยไม่ได้สีเอาเปลือกออกก่อนในบทที่ 1 (ตารางที่ 1.2) โปรตีนถั่วเขียว⁽¹⁾ Hemp protein isolate⁽²⁾ Buckwheat protein product⁽⁴⁾ ความสามารถในการจับน้ำของโปรตีนเกี่ยวข้องกับลักษณะโครงสร้างของโปรตีน เช่นจำนวนกรดอะมิโนที่มีหมู่ที่มีขั้วกับหมู่ที่ไม่มีขั้ว (hydrophilic-hydrophobic

ance) โมเลกุลของน้ำจับกับหมู่ที่มีขั้วต่างกัน โมเลกุลของโปรตีนได้แตกต่างกัน ทำให้โปรตีนมีความสามารถในการจับต่างกัน⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบยังมีผลต่อการจับน้ำด้วย จากรายงานของ Mizubuti และคณะ 2000⁽¹⁶⁾ พบว่าความสามารถจับน้ำของ protein flour ของถั่วมะเดื่อ (1.2 มล น้ำต่อกรัมโปรตีน) ลดลงเมื่อปริมาณโปรตีนขึ้นเป็น protein concentrate (0.87 มล น้ำต่อกรัมโปรตีน) การมีองค์ประกอบอื่นๆ เช่น ไขมัน แตนนิน คาร์โบไฮเดรต จับกับโปรตีนมีผลต่อความสามารถจับน้ำ⁽¹⁵⁾ เช่น soy protein concentrate ที่มีโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบอยู่ทำให้การน้ำเพิ่มขึ้น⁽¹⁷⁾ ความสามารถในการจับน้ำที่ดีของโปรตีนช่วยให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารดีขึ้น ช่วยรักษาสมบัติทางประสาทสัมผัสได้นานขึ้น และยังเป็นการเสริมโปรตีนให้แก่ผลิตภัณฑ์ด้วย⁽¹⁷⁾

ความสามารถในการจับน้ำมันของโปรตีนถั่วมะเดื่อ (3.17 กรัมไขมันต่อกรัมโปรตีน) สูงกว่า soy protein isolate 85 กรัมไขมันต่อกรัมโปรตีน) กลไกการจับน้ำมันของโปรตีนยังไม่เป็นที่แน่ชัดนัก มีหลายปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้อง เช่นการมีเชิงซ้อนของไขมันกับโปรตีน (lipid-protein complex) หรือการมีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่ในโปรตีน อาจทำให้สามารถในการจับน้ำมันเพิ่มขึ้นได้⁽¹⁴⁻¹⁵⁾ Tomotake และคณะ (2002)⁽¹⁴⁾ พบว่า Buckwheat protein product สามารถจับน้ำมันได้ดีกว่า soy protein isolate อาจเนื่องมาจาก Buckwheat protein product มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (ร้อยละ 22) สูงกว่า soy protein isolate (ร้อยละ 2.1) สายโซ่ของไขมันซึ่งไม่มีขั้วจับกับน้ำมันซึ่งเป็นไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้วเช่นเดียวกันได้ดีจึงให้จับน้ำมันได้มากกว่า นอกจากนี้สมบัติ hydrophobicity ของโปรตีนยังมีผลต่อการจับน้ำมัน⁽¹⁵⁾ โดย Tang และคณะ 2006⁽¹⁶⁾ พบว่าความสามารถในการจับน้ำมันของ Hemp protein isolate และ soy protein isolate มีค่าใกล้เคียงกัน อาจจากมีค่า surface hydrophobicity ใกล้เคียงกัน ซึ่งความสามารถของหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของโปรตีนที่เกิดอันตรกิริยากับไขมันนี้แสดงถึงความสามารถในการจับน้ำมันของโปรตีนนั่นเอง และสำหรับโปรตีนถั่วเขียว⁽¹⁸⁾ พบว่าความสามารถในการจับน้ำมันแปรผันตามค่า surface hydrophobicity โดยโปรตีนถั่วเขียวมีค่า surface hydrophobicity (83) สูง สามารถจับน้ำมัน (5.76 กรัมไขมันต่อกรัมโปรตีน) สูงกว่า soy protein isolate และโปรตีนถั่วมะเดื่อด้วย แต่ความสามารถจับน้ำมันของโปรตีนถั่วมะเดื่อไม่แปรผันตามค่า surface hydrophobicity คือมีค่า surface hydrophobicity (28.71) ต่ำกว่า soy protein isolate 1) แต่ดูดซับน้ำมัน (3.17 กรัมไขมันต่อกรัมโปรตีน) ได้มากกว่า soy protein isolate (1.85 กรัมไขมันต่อกรัมโปรตีน)

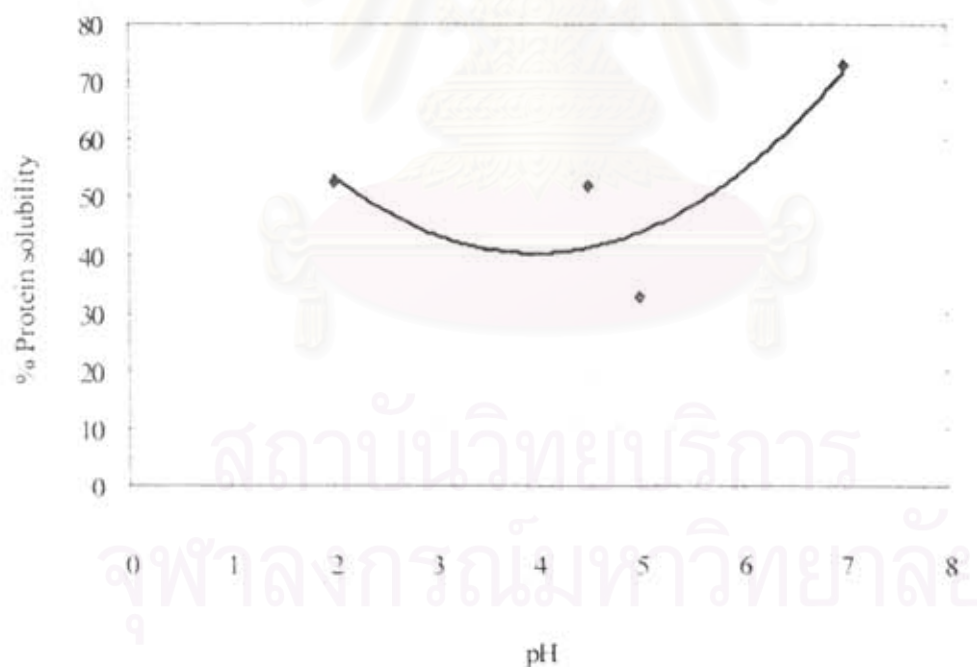
เมื่อเปรียบเทียบกับสมบัติการดูดซับน้ำ โปรตีนถั่วมะเดื่อสามารถจับน้ำได้น้อยกว่า จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางอย่างที่ไม่ต้องการให้อมน้ำมัน เช่น ผลิตภัณฑ์จากพืชตระกูลถั่วทอดในน้ำมันท่วม จะช่วยลดการดูดซับน้ำมันของผลิตภัณฑ์ได้⁽¹⁵⁾

ค่า EAI ของโปรตีนถั่วมะเดื่อแห้งมีค่าเท่ากับ 30.49 ใกล้เคียงกับโปรตีนถั่วเขียว ส่วนของการดูดซับน้ำต่อการจับน้ำมันของ soy protein isolate โปรตีนถั่วมะเดื่อแห้ง และโปรตีนถั่วเขียวแห้ง เท่ากับ 3.74, 1.02 และ 0.42⁽¹³⁾ ตามลำดับ ความสามารถในการดูดซับน้ำของโปรตีนถั่วมะเดื่อ ใกล้เคียงกับการดูดซับน้ำมันจึงอาจเป็นผลทำให้ความสามารถในการนำตัวทำอิมัลชันได้ไม่ดี

ตารางที่ 2.2 สมบัติของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้งเมื่อเปรียบเทียบกับ Soy Protein Isolate

สมบัติ	ชนิดของโปรตีน	
	โปรตีนถั่วมะแฮะ	Soy Protein Isolate
การดูดซับน้ำ (กรัมน้ำต่อกรัม โปรตีนแห้ง)	3.25±0.11	6.92±0.06
การดูดซับน้ำมัน (กรัมน้ำมันต่อกรัม โปรตีนแห้ง)	3.17±0.04	1.85±0.16
EAI	30.49±0.48	48.85±1.98
Surface Hydrophobicity	28.71	51.00

ความสัมพันธ์ระหว่างการละลายของโปรตีนถั่วมะแฮะกับ pH (รูปที่ 2.2) แสดงว่าโปรตีนถั่วมะแฮะมี isoelectric point อยู่ระหว่าง pH 5.0 ซึ่งมีค่าการละลายของโปรตีนต่ำสุด และค่าการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงกว่าและต่ำกว่าช่วง pH นี้ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าโปรตีนถั่วมะแฮะมี isoelectric point อยู่ระหว่าง pH 4.5-5.0 ซึ่งมีค่า NSI ต่ำสุด คือ 8 และมีค่า NSI สูงสุดร้อยละ 50 ที่ pH 10



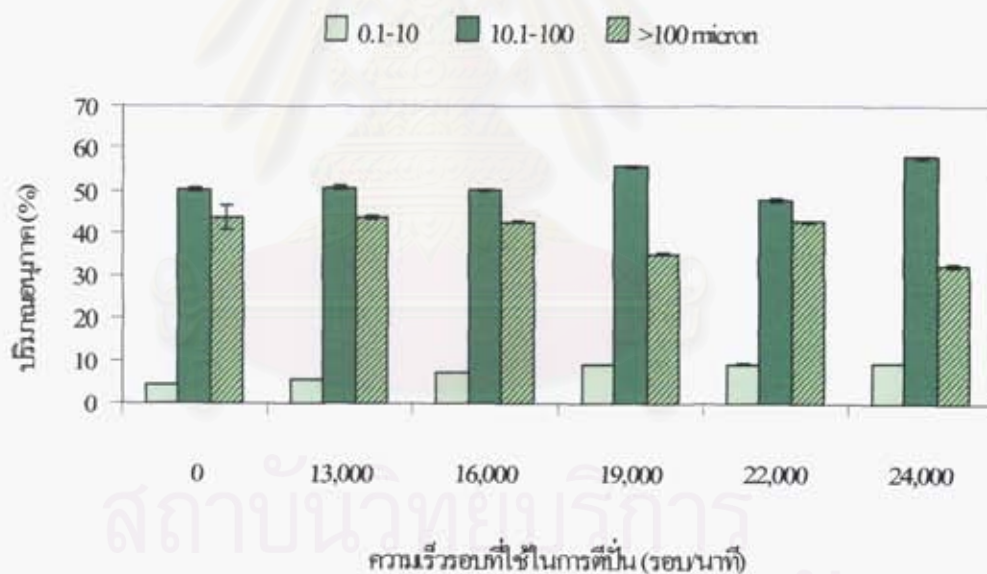
รูปที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับ Nitrogen solubility index (NSI) ของโปรตีนถั่วมะแฮะแห้ง

การผลิตอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะเพื่อเป็นสารทดแทนไขมัน

การลดขนาดโปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่านความร้อน

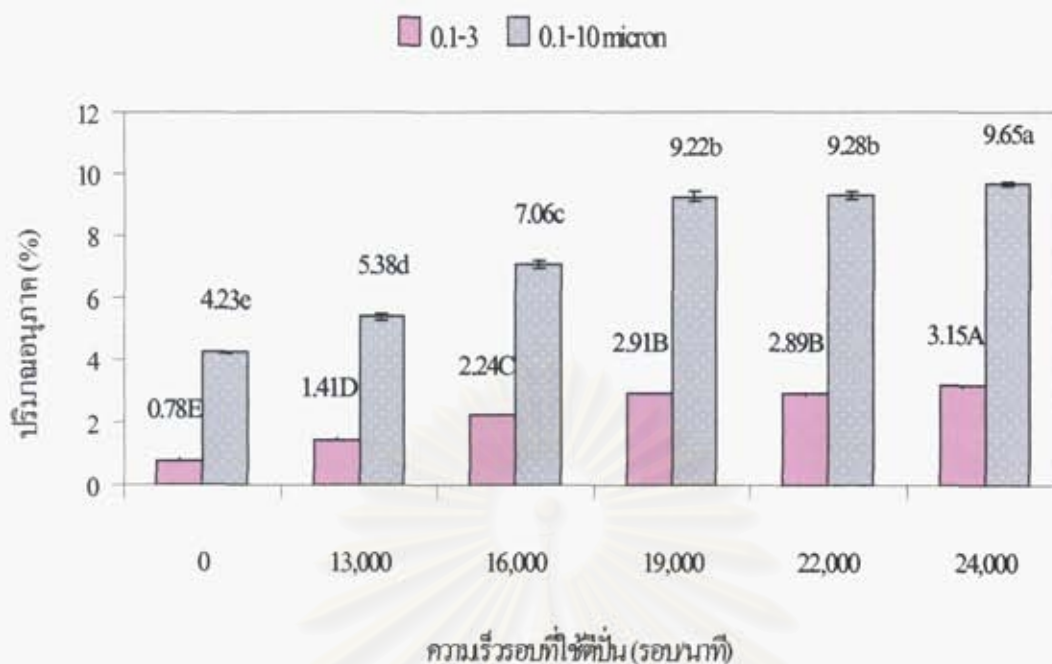
ผลของแรงเฉือนจากการตีปั่นต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน

การศึกษาผลของแรงเฉือนจากการตีปั่นได้แปรความเร็วในการตีปั่นตั้งแต่ 13,000-24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที พบว่าความเร็วในการตีปั่นมีอิทธิพลต่อขนาดอนุภาคโปรตีน ($p \leq 0.05$) โดยเมื่อเพิ่มความเร็วในการตีปั่นทำให้ได้ปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาด 0.1-10 ไมครอน เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับอนุภาคโปรตีนขนาด 10.1-100 ไมครอน ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในขณะที่อนุภาคขนาด >100 ไมครอน มีปริมาณลดลง (รูปที่ 2.3) แสดงว่าการเพิ่มความเร็วในการตีปั่นทำให้โปรตีนที่มีขนาดใหญ่ถูกทำลายกลายเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กลงเพิ่มขึ้น และจากรูปที่ 2.4 พบว่าปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน ซึ่งเป็นขนาดอนุภาคที่ให้ลักษณะเนื้อสัมผัสคล้ายไขมันมากที่สุด⁽¹⁻²⁾ เพิ่มขึ้น 4.04 เท่า (จากร้อยละ 0.78 เป็นร้อยละ 3.15 โดยปริมาตร) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (โปรตีนที่ทำให้เสียสภาพด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 83 ± 1 °C นาน 15 นาที พร้อมตีปั่นตลอดเวลา ที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที แต่ไม่ได้นำมาตีปั่นต่อ) ดังนั้น การตีปั่นที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดขนาดอนุภาคโปรตีนให้มีขนาด 0.1-3 ไมครอน



รูปที่ 2.3 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-10, 10.1-100, และ >100 ไมครอน เมื่อตีปั่นโปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่านความร้อนด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 13,000 16,000 19,000 22,000 และ 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

(control คือ โปรตีนที่ทำให้เสียสภาพด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 83 ± 1 °C นาน 15 นาที พร้อมตีปั่นตลอดเวลา ที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที แต่ไม่ได้นำมาตีปั่นต่อ)

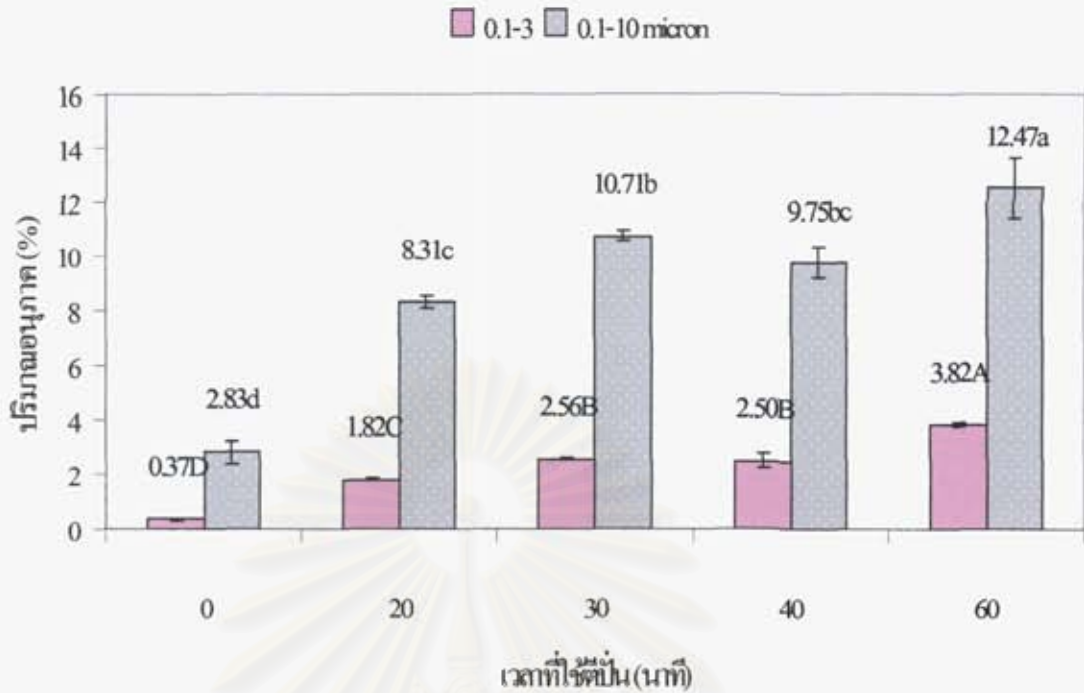


รูปที่ 2.4 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-3 และ 0.1-10 ไมครอน เมื่อตีปั่นโปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่านความร้อนด้วย โฮโมจิไนเซอร์ที่ความเร็วรอบ 13,000 16,000 19,000 22,000 และ 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

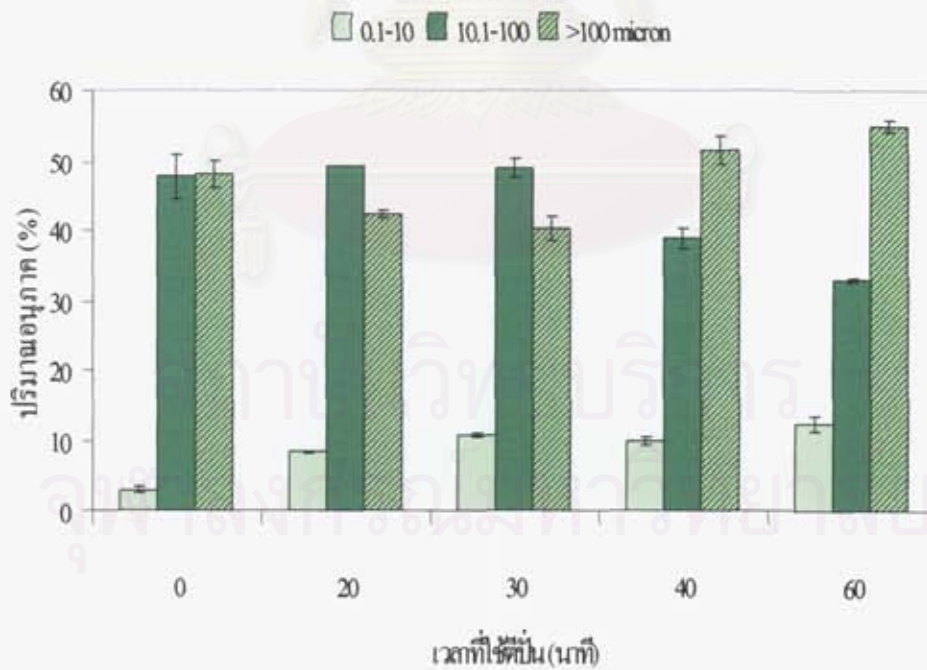
(control คือ โปรตีนที่ทำให้เสียสภาพด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ $83 \pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 15 นาที พร้อมตีปั่นตลอดเวลา ที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที แต่ไม่ให้นำมาตีปั่นต่อ)

ผลของเวลาในการตีปั่นต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน

จากผลการทดลองในรูปที่ 2.5 เห็นว่าปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-10 ไมครอน เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการตีปั่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การตีปั่นนาน 60 นาที สามารถเพิ่มปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-10 ไมครอน ประมาณร้อยละ 10 ของปริมาณเริ่มต้น โดยเป็นอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน เพิ่มขึ้นไม่มากนักเพียงร้อยละ 3.45 (จากร้อยละ 0.37 เป็น 3.82 โดยปริมาตร) ส่วนอนุภาคขนาด 10.1-100 ไมครอน มีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการตีปั่นเพิ่มขึ้น ในขณะที่อนุภาคขนาด >100 ไมครอน มีปริมาณสูงมาก ประมาณร้อยละ 40-50 โดยปริมาตร และมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณค่อนข้างน้อย (รูปที่ 2.6)



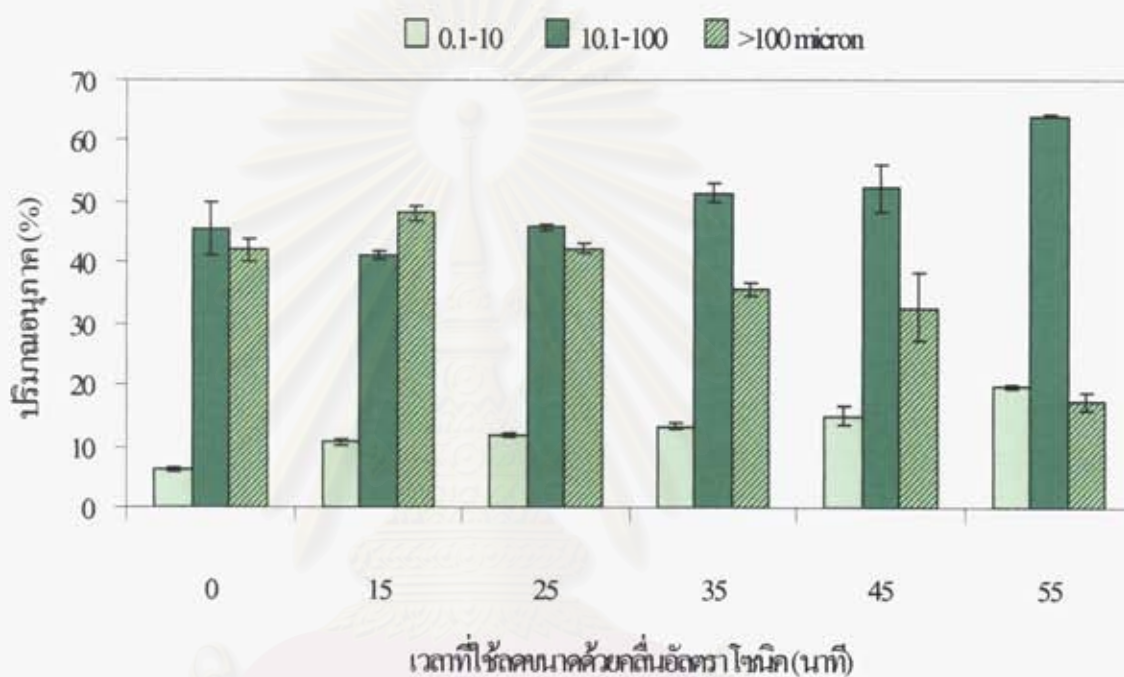
รูปที่ 2.5 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-3 และ 0.1-10 ไมครอน เมื่อตีปั่น โปรตีนถั่วมะสะะที่ผ่านความร้อนด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที



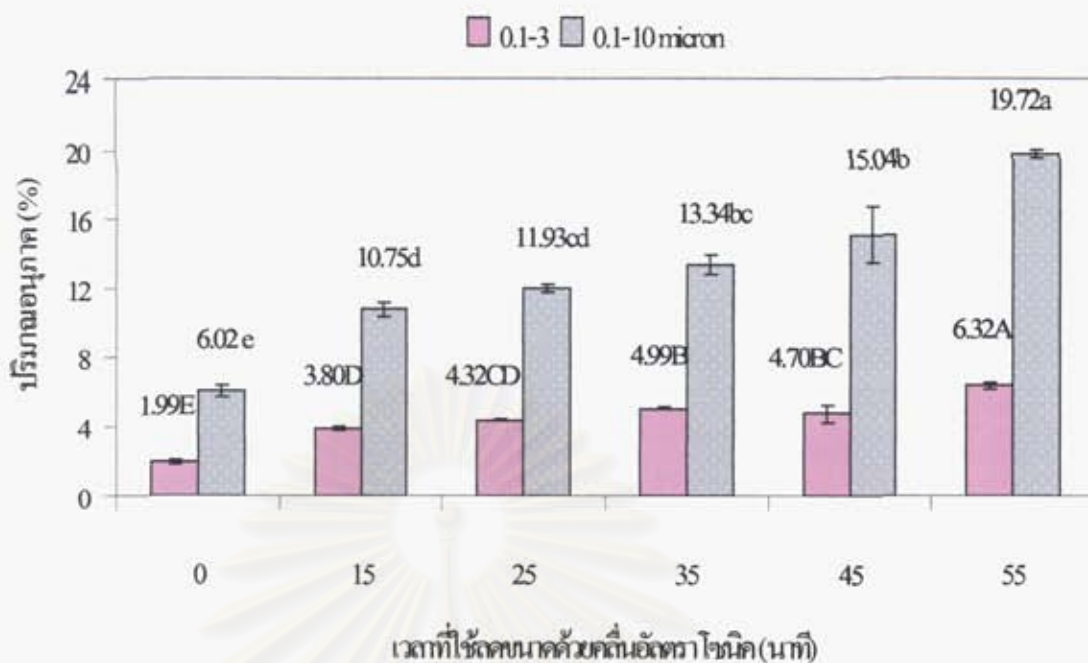
รูปที่ 2.6 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-10 10.1-100 และ >100 ไมครอน เมื่อตีปั่น โปรตีนถั่วมะสะะที่ผ่านความร้อนด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที

ผลของเวลาในการลดขนาดด้วยคลื่นเหนือเสียงต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน

จากการทดลองพบว่าปริมาณอนุภาคขนาด >100 ไมครอน มีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด (จากร้อยละ 41.98 เหลือเพียง 17.45 โดยปริมาตร) ในขณะที่อนุภาคขนาด 0.1-10 ไมครอน และ 10.1-100 ไมครอน มีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2.7) และเมื่อใช้เวลาลดขนาดนาน 60 นาที ปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-10 ไมครอน เพิ่มขึ้นร้อยละ 13.7 (จากร้อยละ 6.02 เป็น 19.72 โดยปริมาตร) เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ใช้คลื่นเหนือเสียง (0 นาที) และปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน เพิ่มขึ้น 4.33% จากร้อยละ 1.99 เป็น 6.32 โดยปริมาตร (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.7 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-10 10.1-100 และ >100 ไมครอน เมื่อลดขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะ (ที่ผ่านความร้อนและโฮโมจิไนเซชันที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที นาน 60 นาที) ด้วยคลื่นเหนือเสียงเป็นเวลา 0 15 25 35 45 และ 55 นาที



รูปที่ 2.8 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-3 และ 0.1-10 ไมครอน เมื่อลดขนาดอนุภาค โปรตีนถั่วมะแฮะ (ที่ผ่านความร้อนและ ไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที นาน 60 นาที) ด้วยคลื่นเหนือเสียงเป็นเวลา 0 15 25 35 45 และ 55 นาที

จากการศึกษาการลดขนาดอนุภาค โปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่านความร้อนเพื่อทำให้เสียสภาพก่อนนำมาลดขนาดด้วยไฮโมจิโนเซอร์และคลื่นเหนือเสียง สรุปได้ว่าการใช้คลื่นเหนือเสียง ช่วยเพิ่มปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาด 0.1-3 ไมครอนได้มากกว่าการตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์เล็กน้อย โดยเมื่อลดขนาดด้วยคลื่นเหนือเสียง 55 นาที สามารถเพิ่มปริมาณอนุภาคได้ร้อยละ 4.33 (จากร้อยละ 1.99 เป็น 6.32 โดยปริมาตร) ส่วนการตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.45 (จากร้อยละ 0.37 เป็น 3.82 โดยปริมาตร) แต่การใช้คลื่นเหนือเสียงสามารถลดปริมาณ โปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 100 ไมครอน ลงมากอย่างเห็นได้ชัด ทำให้อนุภาคขนาด 0.1-100 ไมครอน เพิ่มมากกว่าการตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์

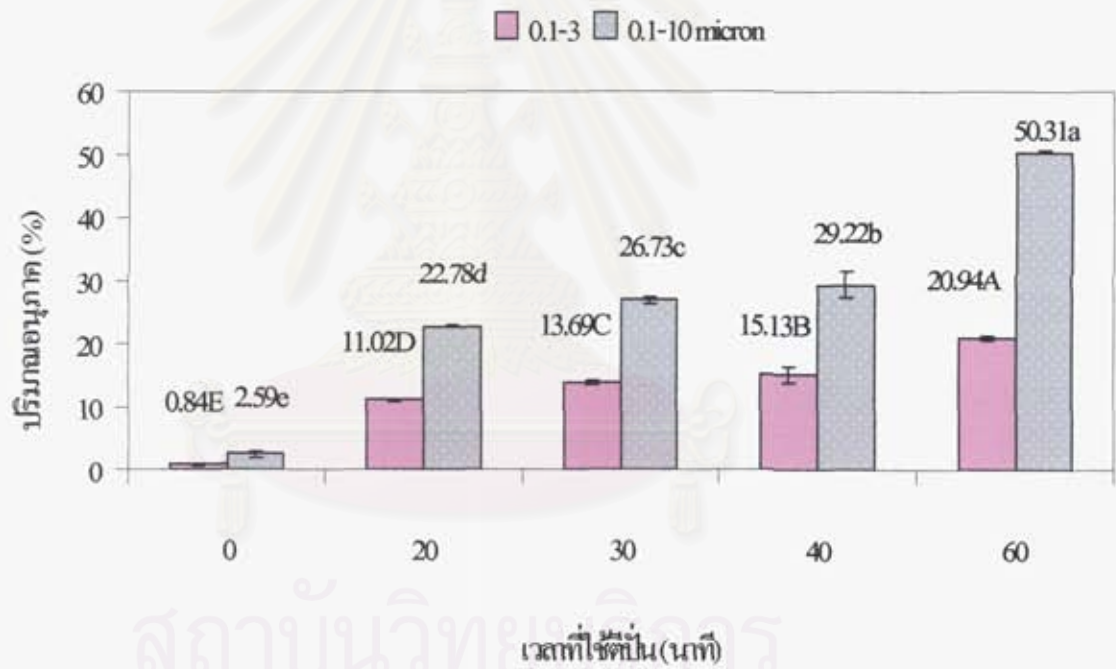
การลดขนาดโปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อน

เนื่องจากการลดขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ผ่านความร้อนเพื่อให้ได้ขนาด 0.1-3 ไมครอน โดยวิธีการตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์และการใช้คลื่นเหนือเสียง ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณอนุภาคให้ได้ขนาดที่ต้องการ (0.1-3 ไมครอน) มากนัก [ร้อยละ 3.82 และ 6.32 โดยปริมาตร เมื่อลดขนาดด้วยการตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์ 60 นาที (รูปที่ 2.6) และการใช้คลื่นเหนือเสียง 55 นาที (รูปที่ 2.8) ตามลำดับ] อาจเกิดจากขั้นตอนการเตรียมสารละลายโปรตีนมีการให้ความร้อน (83°C) แก่โปรตีนถั่วมะแฮะอาจทำให้โปรตีนเสียสภาพเกิดการรวมตัวกันทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นและแข็งแรง ทำให้ไม่สามารถทำการลดขนาดด้วยการตีปั่นและคลื่นเหนือเสียงเพื่อให้ได้ขนาดที่ต้องการ (0.1-3 ไมครอน) ได้ นอกจากนี้การตีปั่นที่ความเร็วสูงและการใช้คลื่นเหนือเสียงทำให้เกิดความร้อน ซึ่งถึงแม้มีการหล่อเย็นระหว่างกระบวนการก็อาจไม่พอเพียง ความร้อนที่เกิดขึ้นนี้

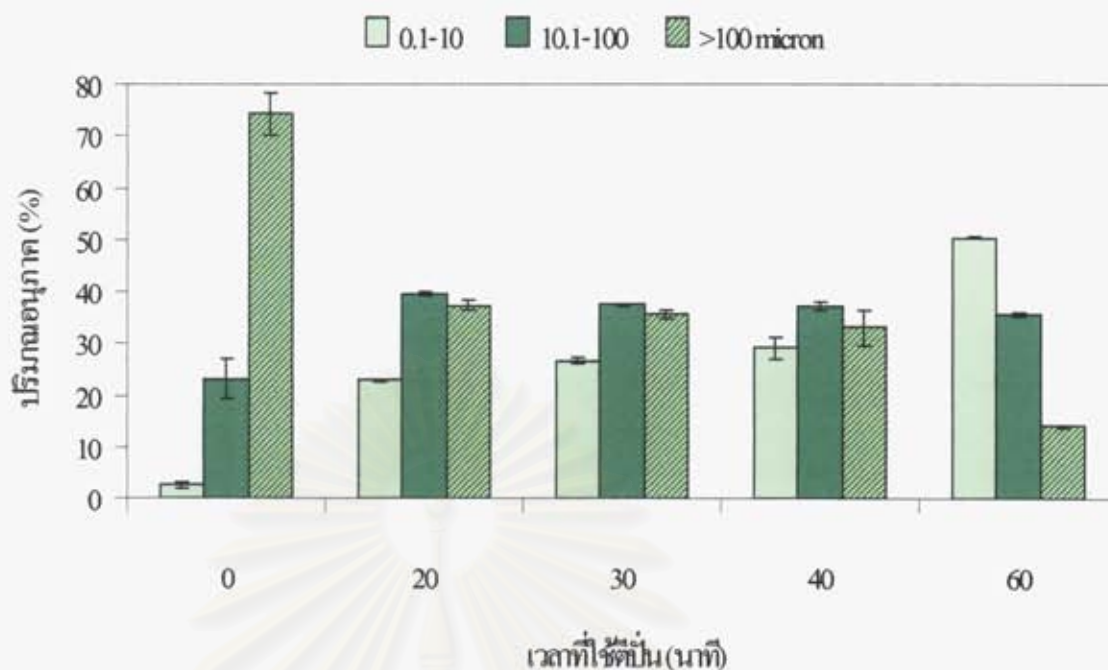
อาจทำให้เกิดการเสียดสภาพและจับกันของโปรตีนเป็นก้อนใหญ่ได้ ดังนั้น จึงศึกษาผลของการตีปั่นและการใช้คลื่นเหนือเสียงกับโปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อน ต่อปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน

ผลของเวลาในการตีปั่นโปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อนด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที ต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน

จากการทดลองลดขนาดอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนด้วยไฮโมจิโนเซอร์ พบว่าเมื่อระยะเวลาการตีปั่นเพิ่มขึ้นปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-10 ไมครอน เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.84 โดยปริมาตร ที่ 0 นาที เป็นร้อยละ 50.31 โดยปริมาตร ที่ 60 นาที โดยเป็นอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน ร้อยละ 20.94 โดยปริมาตร ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 24.93 เท่า เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ถูกตีปั่น (0 นาที) ดังแสดงในรูปที่ 2.9 ส่วนอนุภาคขนาด 10.1-100 ไมครอน และ >100 ไมครอน ปริมาณมีแนวโน้มลดลง โดยเฉพาะอนุภาคขนาด >100 ไมครอน มีปริมาณลดลงจากร้อยละ 74.34 เหลือเพียง 14.06 โดยปริมาตร (รูปที่ 2.9 และ 2.10)



รูปที่ 2.9 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-3 และ 0.1-10 ไมครอน เมื่อตีปั่น โปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อนด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที

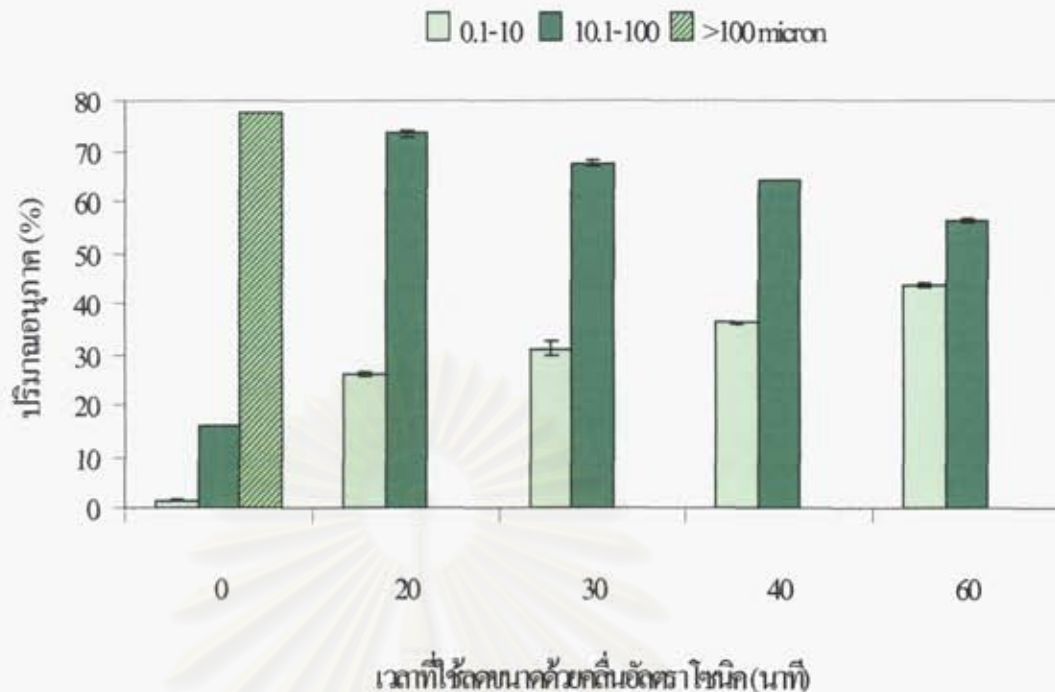


รูปที่ 2.10 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-10 10.1-100 และ >100 ไมครอน เมื่อตีปั่น โปรตีนถั่วมะ
แสะที่ไม่ผ่านความร้อนด้วยไฮโซไมจิในเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60
นาที

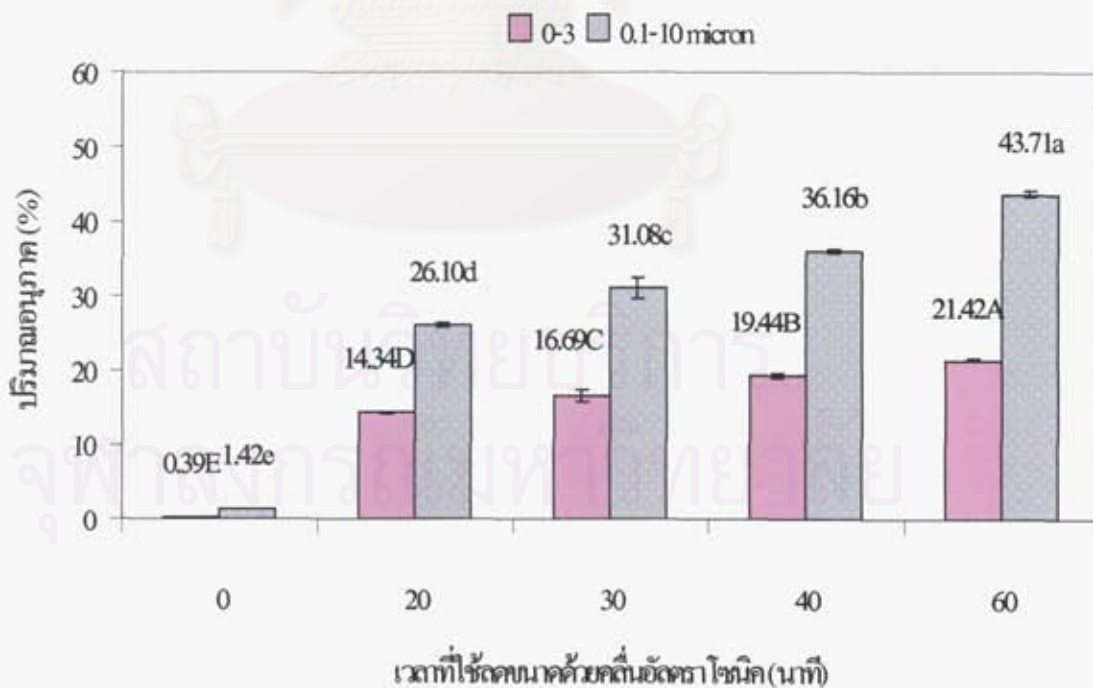
**ผลของเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงกับโปรตีนถั่วมะแสะที่ไม่ผ่านความร้อนต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง
0.1-3 ไมครอน**

จากการทดลอง พบว่าการใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 watt และ 0.9 Hz กับ โปรตีนถั่วมะแสะที่ไม่ผ่านความร้อน
เพียง 20 นาที ทำให้ไม่มีอนุภาคขนาดใหญ่กว่า 100 ไมครอน และเมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงพบว่าอนุภาคขนาด 10.1-
100 ไมครอนมีแนวโน้มลดลง ส่วนอนุภาคขนาด 0.1-10 ไมครอน มีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2.11) จากรูปที่ 2.12 เมื่อเพิ่มเวลาที่
ใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 60 นาที ปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-10 ไมครอน เพิ่มขึ้นร้อยละ 42.29 (จากร้อยละ 1.42 เป็น 43.71 โดย
ปริมาตร) โดยเป็นอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน เพิ่มขึ้นร้อยละ 21.1 (จากร้อยละ 0.32 เป็น 21.42 โดยปริมาตร)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.11 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-10 10.1-100 และ >100 ไมครอน เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 watt และ 0.9 Hz กับ โปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อน เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที



รูปที่ 2.12 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-3 และ 0.1-10 ไมครอน เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 watt และ 0.9 Hz กับ โปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อน เป็นเวลา 0 20 30 40 และ 60 นาที

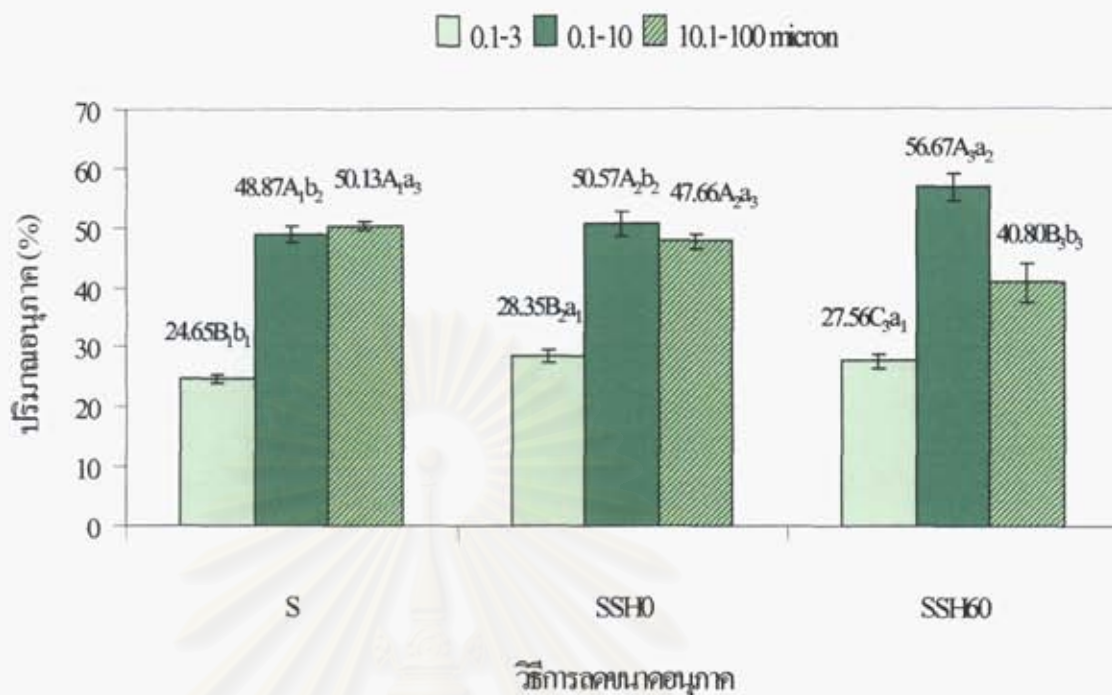
ผลของการตีป่นและคลื่นเหนือเสียงกับโปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อนต่อปริมาณอนุภาคโปรตีนขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลาง 0.1-3 ไมครอน

จากรูปที่ 2.13 พบว่าวิธี [S] (ซึ่งเป็นการนำโปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก มาตีป่นที่ 24000 รอบ/นาที 60 นาที แล้วใช้คลื่นเหนือเสียงที่ระดับ amplitude 400 watt และ ความถี่ 1 Hz นาน 60 นาที แล้วตีป่นต่อที่ 24000 รอบ/นาที 60 นาที แล้วกรองด้วยตะแกรงขนาด 300 mesh 2 รอบ) ให้ปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน ต่ำกว่าวิธี [SSH0] (ซึ่งเป็นการนำตัวอย่างที่ผ่านวิธี [S] มาให้คลื่นเหนือเสียงที่ระดับ amplitude 400 watt และ ความถี่ 1 Hz นาน 60 นาทีและกรองด้วยตะแกรงขนาด 300 mesh 1 รอบ) และวิธี [SSH60] (ซึ่งเป็นการนำตัวอย่างที่ผ่านวิธี [SSH0] มาตีป่นต่อที่ 24000 รอบ/นาที 60 นาที และกรองด้วยตะแกรงขนาด 300 mesh 1 รอบ) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ วิธี [SSH0] และวิธี [SSH60] ให้ปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน เท่ากับร้อยละ 28.35 และ 27.56 โดยปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.5$) แต่วิธี [SSH60] ทำให้ได้ปริมาณอนุภาคขนาด 10.1-100 ไมครอน น้อยกว่าวิธี [SSH0] อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

เนื่องจากวัตถุประสงค์ในการทดลองนี้ต้องการอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน ในปริมาณที่สูง (ประมาณร้อยละ 100) ซึ่งวิธีต่างๆที่ทำมาทำให้ปริมาณอนุภาคขนาด 0.1-3 ไมครอน สูงสุดเพียงร้อยละ 28 โดยปริมาตร เท่านั้น จึงต้องทำการทดลองต่อไป และเนื่องจากอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ศึกษาทั้งหมดข้างต้นใช้โปรตีนถั่วมะแฮะแห้งซึ่งอนุภาคโปรตีนที่ใช้เริ่มต้นประมาณร้อยละ 95 โดยปริมาตร มีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมครอน (รูปที่ 2.3) ดังนั้น ต่อไปจึงได้ทำการศึกษาการผลิตอนุภาคโปรตีนที่มีขนาด 0.1-3 ไมครอน สำหรับเป็นสารทดแทนไขมันจากตะกอนโปรตีนถั่วมะแฮะที่นำน้ำสกัดมาปรับให้ได้ pH 4.5 เลยโดยไม่ได้ทำให้เป็นโปรตีนแห้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.13 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-3 0.1-10 และ 10.1-100 ไมครอน ที่ได้จากวิธีการดังนี้

- [S] คือการนำโปรตีนถั่วมะแฮะที่ไม่ผ่านความร้อนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก มาตีปั่นที่ 24000 รอบ/นาที่ 60 นาที แล้วใช้คลื่นเหนือเสียงที่ระดับ amplitude 400 watt และ ความถี่ 1 Hz นาน 60 นาที แล้วตีปั่นต่อที่ 24000 รอบ/นาที่ 60 นาที แล้วกรองด้วยตะแกรงขนาด 300 mesh 2 รอบ
- [SSH0] คือการนำตัวอย่าง [S] มาให้คลื่นเหนือเสียงที่ระดับ amplitude 400 watt และ ความถี่ 1 Hz นาน 60 นาทีและกรองด้วยตะแกรงขนาด 300 mesh 1 รอบ
- [SSH60] คือการนำตัวอย่าง [SSH0] มาตีปั่นต่อที่ 24000 รอบ/นาที่ 60 นาที และกรองด้วยตะแกรงขนาด 300 mesh 1 รอบ

A₁, B₁ และ C₁ ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในวิธีการลดขนาดอนุภาค [S] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

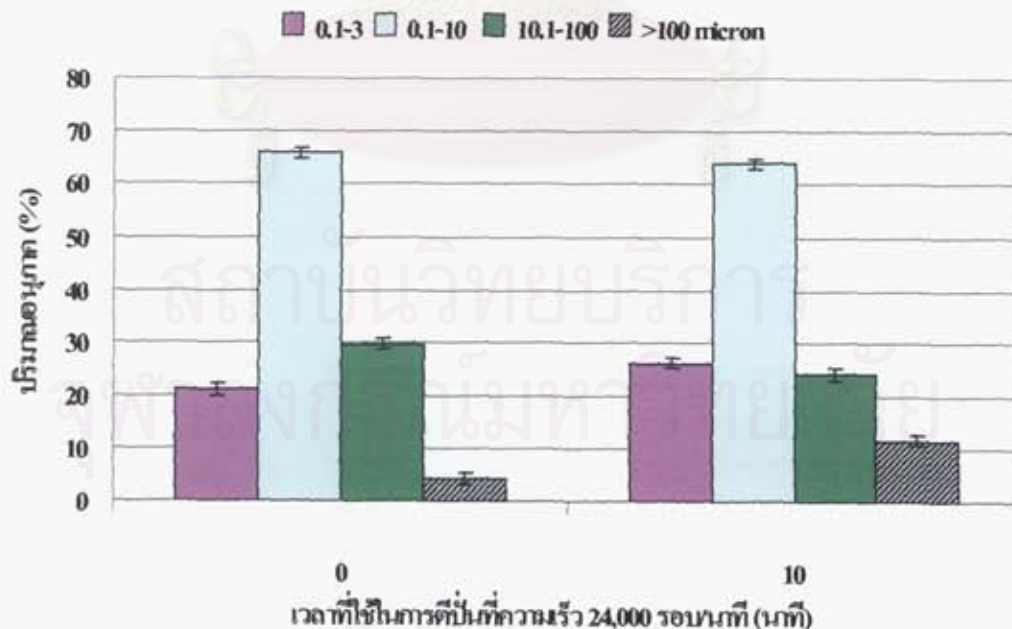
A₂, B₂ และ C₂ ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในวิธีการลดขนาดอนุภาค [SSH0] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

A₃, B₃ และ C₃ ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในวิธีการลดขนาดอนุภาค [SSH60] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

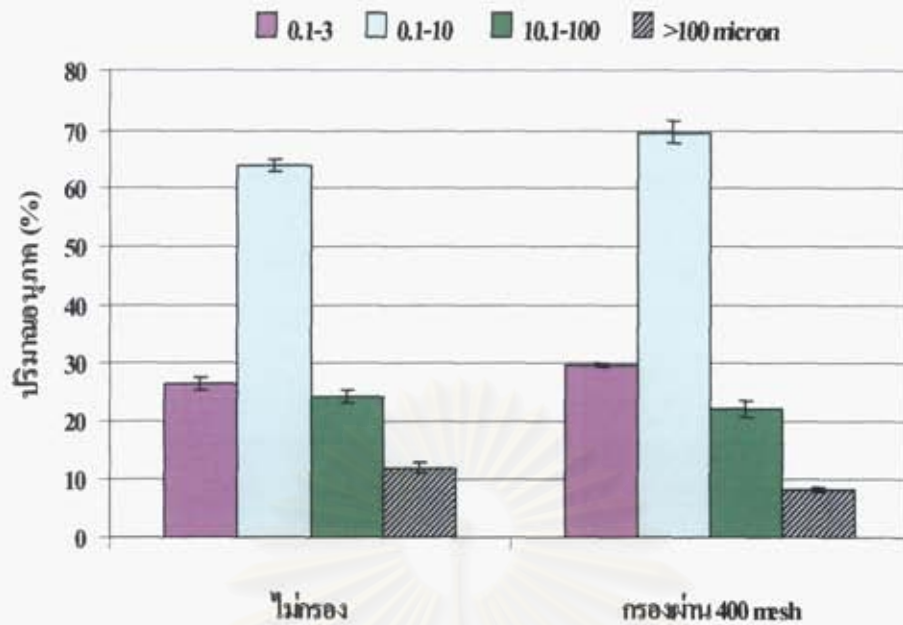
a_{1,2,3}, b_{1,2,3}, c_{1,2,3} ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแต่ละกราฟแท่งที่มีสีเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

การผลิตอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะจากน้ำสกัดโปรตีนถั่วมะแฮะ

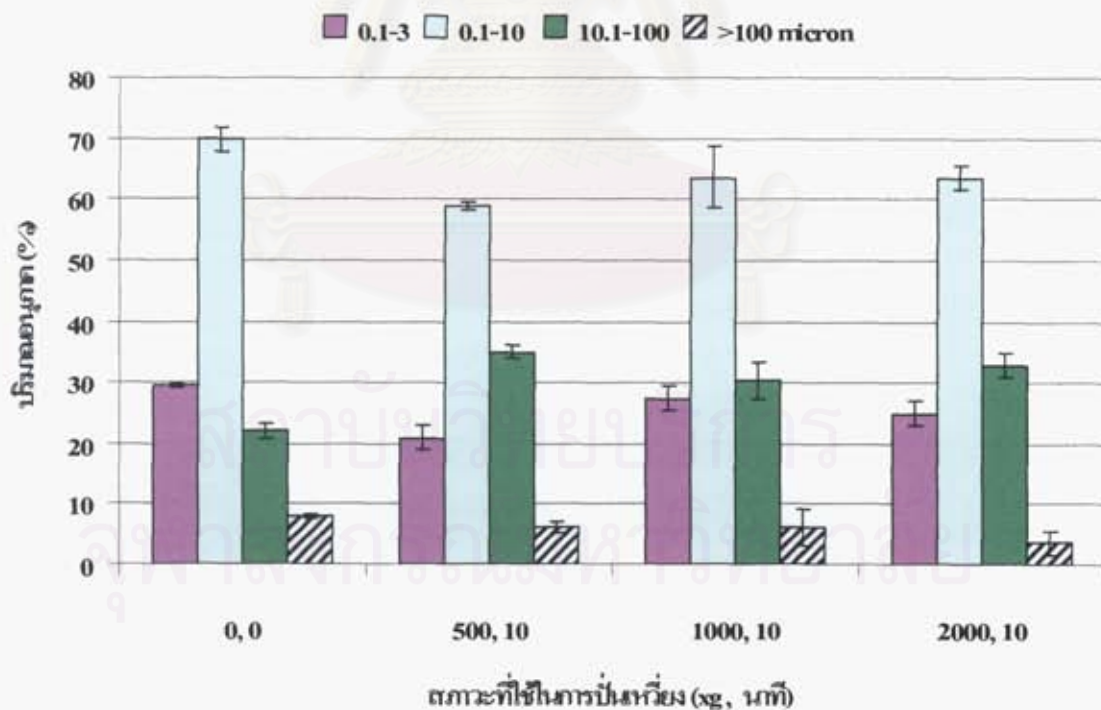
เมื่อนำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการปรับ pH ของน้ำสกัดโปรตีนให้ได้ pH 4.5 ด้วย 1 N HCl แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4000xg อุณหภูมิ 20°C นาน 20 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ใช้สัดส่วนตะกอนต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 4000xg อุณหภูมิ 20°C นาน 20 นาที นำส่วนตะกอนมาละลายในน้ำกลั่นในสัดส่วนตะกอนต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก แล้วนำสารแขวนลอยโปรตีนนี้ไปลดขนาดอนุภาคโปรตีนด้วยการตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์ พบว่าการตีปั่นที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ทำให้อนุภาคโปรตีนที่มีขนาด 0.1-3 ไมครอนมีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2.14) แต่อย่างไรก็ตามอนุภาคโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมครอน ก็ยังมีอยู่ประมาณร้อยละ 35 โดยปริมาตร ดังนั้นจึงได้ทำการแยกเอาอนุภาคโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมครอนออกด้วยการกรองผ่านตะแกรง 400 mesh (ซึ่ง nominal size ของช่องประมาณ 30 ไมครอน) รูปที่ 2.15 แสดงว่าการกรองช่วยเพิ่มปริมาณอนุภาคที่มีขนาด 0.1-3 ไมครอน และ 0.1-10 ไมครอน ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ก็ยังคงมีขนาดที่ใหญ่กว่า 10 และ 100 ไมครอน ในปริมาณประมาณร้อยละ 23 และ 8 โดยปริมาตร ตามลำดับ ดังนั้น จึงได้ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 500 1000 และ 2000 xg นาน 10 นาที เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมครอน ตกตะกอน และให้อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอน ยังคงแขวนลอยอยู่ในน้ำ จากรูปที่ 2.16 พบว่าการปั่นเหวี่ยงที่ทุกสภาวะที่ศึกษาทำให้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 100 ไมครอน ลดลงได้ประมาณครึ่งหนึ่งจากเดิม แต่ไม่ทำให้อนุภาคที่มีขนาด > 10 – 100 ไมครอน ตกตะกอน ดังนั้น เพื่อให้ต้นทุนในการผลิตต่ำจึงเลือกวิธีลดขนาดอนุภาคโปรตีนด้วยการตีปั่นด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 400 mesh ในการผลิตอนุภาคโปรตีน



รูปที่ 2.14 ปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-3 0.1-10 และ 10.1-100 ไมครอน เมื่อตีปั่นสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะแฮะด้วยไฮโมจิโนเซอร์ที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 และ 10 นาที

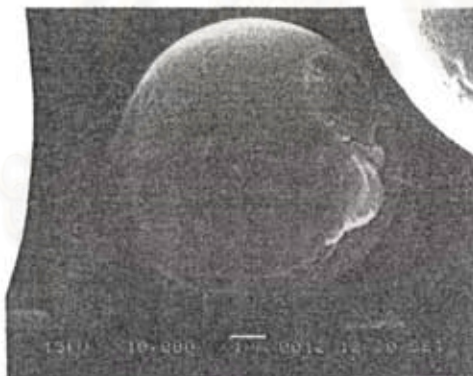


รูปที่ 2.15 ผลของการกรองสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะแฮะ(ที่ผ่านการตีปั่นที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาทีผ่าน 400 mesh) ต่อปริมาณอนุภาค (ร้อยละ โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-3 0.1-10 และ 10.1-100 ไมครอน



รูปที่ 2.16 ผลของการปั่นเหวี่ยงสารแขวนลอยโปรตีนถั่วมะแฮะ(ที่ผ่านการตีปั่นที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่าน 400 mesh) ที่ระดับต่างๆ นาน 10 นาที ต่อปริมาณอนุภาค (ihvp) โดยปริมาตร) ขนาด 0.1-3 0.1-10 และ 10.1-100 ไมครอน

อนุภาคโปรตีนที่ผลิตได้นี้มีรูปร่างเป็นทรงกลม (รูปที่ 2.17) แสดงว่า อนุภาคโปรตีนเป็น microparticulated ticle ซึ่งมีปริมาณโปรตีนประมาณร้อยละ 50 โดยน้ำหนักแห้ง และมีไขมันต่ำในปริมาณร้อยละ 9 โดยน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 1) อนุภาคโปรตีนแห้งนี้มีการดูดน้ำและน้ำมัน และ surface hydrophobicity กว่าโปรตีนแห้ง แต่มีค่า EAI สูงกว่า วิธีการทำแห้งไม่มีผลต่อการดูดน้ำและน้ำมัน และค่า EAI แต่การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งให้ค่า surface hydrophobicity ต่ำกว่าประมาณหนึ่ง (ตารางที่ 2.4) จากสมมติบ่งว่าอนุภาคโปรตีนดูดซับน้ำมันได้น้อยกว่าโปรตีนแห้ง จึงอาจเหมาะในการนำไปเคลือบอาหารที่จะนำไปทอดแบบน้ำมันท่วมได้ เพื่อลดการดูดซับน้ำมันในอาหาร ในการศึกษาที่สนใจในการนำอนุภาคโปรตีนไปสารถแทนไขมัน ซึ่งโดยทั่วไปมักใช้ microparticulated particle ที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดอนุภาคไขมันในอาหารคือ -3 ไมครอน ซึ่งให้ลักษณะเนื้อสัมผัสคล้ายครีม" แต่อนุภาคไขมันที่ผลิตได้ยังมีปริมาณอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 กรอนอยู่ถึงร้อยละ 30 โดยปริมาตร ซึ่งถ้านำไปทดแทนไขมันในอาหารเหลวอาจให้ผู้บริโภครู้สึกว่อาหารสาก ดังนั้น จึงก่นำไปทดแทนไขมันในอาหารแข็ง โดยเลือกใช้สปีนจ์เค้กเป็นอาหารที่นำมาศึกษา ผลการทดลองทางประสาทสัมผัสว่าผู้ทดสอบไม่สามารถหาความแตกต่างระหว่างสูตรมาตรฐานกับสูตรทดแทนไขมันร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก ที่ระดับ $p = 5$ ได้ แต่พบความแตกต่างระหว่างสูตรมาตรฐานกับสูตรทดแทนไขมันร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ได้ (ตารางที่ 2.5) บ่งว่ามารถใช้อนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะเป็นสารถแทนไขมันในสปีนจ์เค้กได้ โดยระดับการทดแทนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 30 โดยหนัก



รูปที่ 2.17 ภาพ SEM ของอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ได้จากการตีปั่นสารแขวนลอยโปรตีนที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่าน 400 mesh

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ได้จากการตีปั่นสารแขวนลอยโปรตีนที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่าน 400 mesh

องค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
ความชื้น	3.5±0.04
โปรตีน	56.11±1.50
ไขมัน	8.60±0.63
เถ้า	1.39±0.27
คาร์โบไฮเดรต	30.40

ตารางที่ 2.4 สมบัติของอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ได้จากการตีปั่นสารแขวนลอยโปรตีนที่ความเร็ว 24,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่าน 400 mesh

สมบัติ	วิธีการทำแห้ง	
	Vacuum dry	Freeze dry
การดูดซับน้ำ (กรัม น้ำ ต่อ กรัม โปรตีนแห้ง)	2.65 ± 0.10	2.14 ± 0.15
การดูดซับน้ำมัน (กรัม น้ำมัน ต่อ กรัม โปรตีนแห้ง)	1.46 ± 0.01	1.35 ± 0.06
EAI	33.93 ± 1.26	36.24 ± 2.3
Surface Hydrophobicity	9.92	4.83

ตารางที่ 2.5 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสปีนจ์เค้ก เพื่อหาความแตกต่างระหว่างสูตรมาตรฐานกับสูตรทดแทนไขมันด้วยอนุภาคโปรตีนถั่วมะแฮะที่ระดับร้อยละ 10 30 และ 50 โดยน้ำหนัก ด้วยวิธี Duo-Trio โดยผู้ทดสอบ 20 คน

ปริมาณการทดแทนไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ผลการทดสอบ		สรุป
	จำนวนผู้ตอบถูก (คน)	χ^2	
30	14	2.45	ไม่แตกต่างจากสูตรมาตรฐาน
50	16	6.05	แตกต่างจากสูตรมาตรฐาน

$\chi^2 < 2.71$ แสดงว่าไม่พบความแตกต่างจากสูตรมาตรฐาน (ไขมันเต็ม) ที่ระดับ $p = 0.05$

ปและเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป

การวิจัยนี้ได้สภาวะในการผลิตผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าจากถั่วมะแฮะได้ 2 ผลิตภัณฑ์ คือ โปรตีนแห้งและอนุภาคโปรตีน โปรตีนแห้งมีปริมาณโปรตีนประมาณร้อยละ 64 โดยน้ำหนัก และมีปริมาณไขมันต่ำ (ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก) สามารถนำไปใช้เพื่อเสริมปริมาณโปรตีนในอาหาร ส่วนอนุภาคโปรตีนจากถั่วมะแฮะสามารถนำไปใช้ทดแทนไขมันในอาหาร กุ้งปิ้งจืดได้ถึงร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก

เนื่องจาก อนุภาคโปรตีนที่ได้ยังมีปริมาตรที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 ไมครอน ประมาณร้อยละ 35 โดยปริมาตร ซึ่งอาจให้ ความรู้สึกสากได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาวิธีการลดขนาดต่อ หรือสกัดแยกเอาอนุภาคโปรตีนที่มีปริมาตรที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 ไมครอน ออก

สารอ้างอิง

1. Singer, N. S. and Dunn, J. M. 1990. Protein microparticulation: The principle and the process. *Journal of the American College of Nutrition* 9: 388.
2. Sirikulchayanont, P., Jayanta, S., Pradipasena, P. and Miyawaki, O. 2007. Characteristics of Microparticulated Particles from Mung Bean Protein. *Int. J. Food Properties*. 10: 621-630.
3. AOAC. 1995. *Official Method of Analysis*. 16th ed. Washington, DC. The Association of Official Analytical Chemists.
4. Sathe, S.K. and Salunkhe, D.K. 1981. Functional Properties of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Protein: Emulsion, Foaming, Viscosity, and Gelation Properties. *Journal of Food Science* 46: 71-74, 81.
5. Pearce, K.N. and Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26: 716-723.
6. Tang, C., Fen, Z., Wang, X., and Yang, X. 2006. Physicochemical and functional properties of Hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8945-8950.
7. Alizadeh-Pasdar, N. and Li-Chan, C. Y. 2000. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 328-334.
8. Vojdani, F. 1996. Solubility. In G. M., Hall (ed.), *Method of Testing Protein Functionality*, pp. 11-60. London: Blackie Academic & Professional.
9. Damodaran, S. 1996. Functional Properties. In: *Food Protein: Properties and Characterization*, S. Nakai and H.W. Modler (eds.), pp. 167-234. New York: VCH Publishers.
10. Franzen, K.L. and Kinsella, J.E. 1976. Functional Properties of Succinylated and Acetylated Soy Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 788-795.

11. Kohnhorst, A.L., Smith, D.M., Uebersax, M.A. and Bennink, M.R. 1991. Production and Characterization of a Protein Concentrate from Navy Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry* 41: 33-42.
12. Nwokolo, Emmanuel. 1987. Nutritional evaluation of pigeon pea meal. *Plant Foods for Human Nutrition* 37: 283-290.
13. ปฏิญญา สิริกุลชยานนท์. 2544. การผลิตสารทดแทนไขมันสำหรับอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจากโปรตีนถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
14. Tomotake, H., Shimaoka, I., Kayashita, J., Nakajoh, M., and Kato, N. 2002. Physicochemical and functional properties of Buckwheat protein product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2125-2129.
15. Chavan, U. D., McKenzie, D. B., Shahidi, F. 2001. Functional properties of protein isolate from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chemistry* 74: 177-187.
16. Mizubuti, I. Y., Biondo, O. Jr., Souza, L. W., da Silva, R. S. and Ida, E. I. 2000. Functional properties and protein concentrate of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) flour. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 50(3): 274-280.
17. Zayas, J. F. 1997. *Functionality of Proteins in Food*. Germany: Springer.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

ผศ. ดร. พาสวดี ประทีปะเสน

Asst.Prof. Dr. Pasawadee Pradipasena

Educational Background :

- B.Sc. Chemical Technology (CU, Thailand)
- S.M. Food Science and Technology (M.I.T., USA)
- Sc.D. Food Science and Technology (M.I.T., USA)

Research Interest :

Rheology of biopolymers, Biopolymer Characterization and Fabrication

Active Research :

- Rheological and thermal properties of starches , Production of fat replacer from mung been protein
- Encapsulation of vitamin A using polysaccharides

List of Publications :*Technical Papers*

- Pradipasena, P.**, Tattiyakul, J., Nakamura, K. And Miyawaki, O. 2007. Temperature dependence of fraction of frozen water in solutions of glucose and its oligomers, dextrans and potato starch. *Food Science and Technology Research*. 13(4): 286-290.
- Tattiyakul, J., **Pradipasena, P.**, and Asavasaksakul, S. 2007. Taro *Colocasia esculenta* (L.) Schott amylopectin structure and its effect on starch functional properties. *Starch/Stärke*. 59(7): 342-347.
- Sirikulchayanont, P., Jayanta, S., **Pradipasena, P.** and Miyawaki, O. 2007. Characteristics of microparticulated particles from mung bean protein. *International Journal of Food Properties*. 10(3): 621-630.
- Tattiyakul, J, Naksriarporn, T., **Pradipasena, P.**, and Miyawaki, O. 2006. Effect of moisture level on the hydrothermal modification of yam *Dioscorea hispida* Dennst starch. *Starch/Stärke*. 58: 170-176.
- Tattiyakul, J., Asavasaksakul, S., and **Pradipasena, P.** 2006. Chemical and physical properties of taro starch *Colocasia esculenta* (L.) Schott grown in Thailand. *Science Asia*. 32(3): 274-289.
- Noosuk, P., Hill, S.E., Farhat, I.A., **Pradipasena, P.**, and Mitchell, J.R. 2005. Relationship between viscoelastic properties and Starch Structure in Rice from Thailand. *Starch/Stärke* 57(12): 587-598
- Noosuk, P., Hill, S.E., **Pradipasena, P.**, and Mitchell, J.R. 2003. Structure-Viscosity Relationships for Thai Rice Starches. *Starch/Stärke*: 337-344.
- Pradipasena, P.**, Israeli, O., Lu, M., Chen, S.-GH., Brigant, G., and Rha, C.K. 1992. *Changes in Conformation of globular proteins induced by a non-ionic surface active agent*. In: **Protein Interaction**. H. Visser, ed., VCH Weinheim. pp 293-312.
- Yu, L.P., Burns, J.W., Shiedlin, A., Guo, Y., Jankowski, T., **Pradipasena, P.** and Rha, C. 1992. Rheological characteristics of microbially derived sodium hyaluronate. In: **Harnessing Biotechnology, 21st Century, Proc. Int. Biotechnol. Symp. Expo., 9th**. M.R. Ladish and A. Bose eds. Am. Chem. Soc. Washington D.C. pp. 80-84.
- Hur, J.W., Osten, C.V.D., **Pradipasena, P.**, and Rha, C.K. 1990. On energy saving and quality improvement of food process (1): Applications of hotwire monitoring system for food biotechnology. *K. J. Biotech. Bioeng.* 5(4):403-410. (in Korean)
- Nakamura, T., **Pradipasena, P.**, and Rha, C.K. 1988. *Hydrodynamic volume and chain flexibility of extracellular polysaccharid produced by Zoogloea ramigera*. 115. In: **Proceedings of International Symposium on Flocculation in Biotechnology and Separation Systems**. Y.A. Atia ed. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.

- Nakamura, T., Koo, S.J., **Pradipasena, P.**, Rha, C.K., and Sinskey, A.J. 1987. *Solution properties of polysaccharide flocculant produced by Zoogloea ramigera*. 115. In: **Proceedings of International Symposium on Flocculation in Biotechnology and Separation Systems**. Y.A. Atia ed. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. pp. 399-413.
- Pradipasena, P.**, and Rha, C.K. 1979. Effect of concentration on apparent viscosity of a globular protein solution. *Polym. Eng. Sci.* 17(2): 861-864.
- Pradipasena, P.**, and Rha, C.K. 1977. Pseudoplastic and rheopectic properties of a globular proteins solution. *J. Texture Studies* 8(3):311-325.

Book Chapter

- Rha, C.K. and **Pradipasena P.** 1986. *Viscosity of proteins*. In: **Functional Properties of Food Macromolecules**. J.R. Mitchell and D.A. Ledward, eds., Elsevier Applied Science Publisher, London. Pp.79-120.

Patents

- Rha, C.K., **Pradipasena, P.**, Nakamura, T., Easson, D.D., and Sinskey, A.J. 1991. Compositions Utilizing an Exocellular Polysaccharides Isolated from *Zoogloea ramigera*. U.S. Patent 5,008,108.
- Rha, C.K., **Pradipasena, P.**, Nakamura, T., Easson, D.D., and Sinskey, A.J. 1989. Method for Utilizing Exocellular Polysaccharides Isolated from *Zoogloea ramigera*. U.S. Patent 4,851,939.

Presentations

- Noosuk, P., Hill, S.E., **Pradipasena, P.** And Mitchell, J.R. 2005. Amylose content and amylopectin fine structure of Thai rice starches. *Proceeding of the 3rd Conference on Starch Technology, November 4th - 5th, 2005, Bangkok, THAILAND.*
- Naksriarporn, T., Tattiyakul, J., **Pradipasena, P.**, and Miyawaki, O. 2005. Chemical and physical properties of native and hydrothermal modified yam *Dioscorea hispida* Dennst starch. *Proceeding of the Thailand-Japan Technology Transfer Project Symposium, November 26th, 2005, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.*
- Asavasaksakul, S., Tattiyakul, J., and **Pradipasena, P.** 2005. Chemical and physical properties of taro starch *Colocasia esculenta* (L.) Schott grown in Thailand. *Proceeding of the 3rd Conference on Starch Technology, November 4th - 5th, 2005, Bangkok, THAILAND.*
- Naksriarporn, T., Tattiyakul, J., and **Pradipasena, P.** 2005. Heat moisture modification of Thai yam *Dioscorea hispida* Dennst starch. *Proceeding of the 3rd Conference on Starch Technology, November 4th - 5th, 2005, Bangkok, THAILAND.*
- Pradipasena, P.**, Jantawat, P., Sanguandeekul, R., and Chaiwanichsiri, S. 2000. Biopolymer Technology. *TProceeding of the 1st Conference on Science and Technology University-Industry Linkages under TJTTP Chulalongkorn University, December 6th - 7th, 2000, Bangkok, Thailand.*
- Chollakup, R., Rattanarojmongkol, T., Tantratian, S., and **Pradipasena, P.** 1994. Physical properties of cellulose film form Nata. *The 9th NRCT, NUS, DOST-JSPS Joint Seminar on Biotechnology : Biotechnology for Economy and Pollution Control, Khonkhan, Thailand.*
- Wongpiriyapong, O., **Pradipasena, P.**, and Chaiwanichsiri, S. 1994. Production of b-limit dextrin from mung bean starch. *The 9th NRCT, NUS, DOST-JSPS Joint Seminar on Biotechnology: Biotechnology for Economy and Pollution Control, Khonkhan, Thailand.*

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ม.ล. ศิริพัศตร์ ไชยันต์
2. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) M.L. Siripastr Jayanta
3. เลขประจำตัวประชาชน 3-1009-00182-09-5
4. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 7
5. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้อง 1228/1 อาคารมหามกุฏ

ถนน พญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2187610 โทรสาร 02-671-2288

Email: siripastr.ja@chula.ac.th

6. ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วท.บ.	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2526
M.S.	Analytical Chemistry	California Polytechnic State University at San Obispo, California, USA.	2529
M.S.	Physical Chemistry	State University of New York at Stony Brook, New York, USA.	2534

7. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ

- การแยกสารและ โครมาโตกราฟี (Separation and chromatography)
- การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ใหม่และการประเมินความเชื่อถือได้ของวิธีการวิเคราะห์ (Method development and validation)
- การประเมิน stability และ shelf-life ของยาตามข้อกำหนด NDA และ ANDA
- การพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่และกระบวนการ scale up
- ยางธรรมชาติด้านการผลิตน้ำยางข้น การขึ้นสูตรน้ำยาง กระบวนการจุ่มผลิตภัณฑ์ การผลิตวัสดุใหม่จากยางธรรมชาติ
- ระบบคุณภาพอุตสาหกรรม (Quality systems)
- การประยุกต์ทางเคมีเพื่อความยั่งยืน (Green Chemistry) ทางอุตสาหกรรมและความปลอดภัยทางเคมี
- เทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่และแหล่งทุน

เรื่องที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์พิวรีนนิวคลีโอไทด์ในไขหอยเม่นไทยโดยเทคนิค GPC

แหล่งทุน OECE และ โครงการการเรียนการสอนเพื่อส่งเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเผยแพร่ Phocharoen, S. Jayanta, O. Chailapakul, T. Shirai, GPC Method Development for Determining Purine Nucleotides in Thai Sea Urchin Roes. Poster, International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry 2002 (PACCON), Bangkok, Thailand.

เรื่องที่ 2 การผลิตสารทดแทนไขมันสำหรับอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจากโปรตีนถั่วเขียว

แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ กองทุนเพื่อการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร-อุตสาหกรรมอาหารของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเผยแพร่

- Sirikulchayanont, P. Pradeprasena, S. Jayanta, Production of Fat Replacer for Oil in Water Emulsion From Mungbean Protein. Poster, International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry 2002 (PACCON), Bangkok, Thailand.
- P. Sirikulchayanont, S. Jayanta, P. Pradipasena, Characteristics of Microparticulated particles from Mung Bean Protein, International Journal of Food Properties, Volume 10, Issue 3 July 2007, pages 621-630.

เรื่องที่ 3 การวิเคราะห์ระดับการปนเปื้อนของสารบิสฟีนอล-เอ-ไดโกลซิดิลอีเธอร์ บิสฟีนอล-เอฟ-ไดโกลซิดิลอีเธอร์และสารอนุพันธ์ที่เกี่ยวข้องจากสารเคลือบกระป๋องในอาหารกระป๋องประเภทน้ำมันที่ผลิตขึ้นในประเทศไทย

แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเผยแพร่

- N. Leepipatpiboon, W. Somboonsup, A. Khow, S. Pungboonlue, N. Kulkaew, Contamination of Coatings in Canned Foods Manufactured in Thailand: A Determination by HPLC. Full manuscript presented at Thaifex & Halfex 2004, the 6th Agro-Industry Conference, Food Safety: Thai Strategies Towards the World's Kitchen, May 28-29, 2004, Impact, Muang Thong Thani, Bangkok, Thailand.
- N. Leepipatpiboon, S. Jayanta, A. Khow, W. Somboonsup, Determination of Bisphenol-A-Diglycidyl Ether, Bisphenol-F-Diglycidyl Ether and Certain Derivatives in Oil-Based Foods, Oral Presentation, 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean, Thailand, October 2003.

เรื่องที่ 4 การตรวจหาการปนเปื้อนของสารบิสฟีนอล-เอ-ไดโกลซิดิลอีเธอร์ บิสฟีนอล-เอฟ-ไดโกลซิดิลอีเธอร์ และสารอนุพันธ์ในอาหารกระป๋องประเภทน้ำผสมน้ำมันและประเภทน้ำที่ผลิตในประเทศไทย

แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

การเผยแพร่

- N. Leepipatpiboon, W. Somboonsup, A. Khaw, S. Jayanta, Isolation and Characterization of Bisphenol-F-Diglycidyl Ether Derivatives. Poster, 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean, Thailand, October 2003.
- N. Leepipatpiboon, S. Jayanta, W. Somboonsup, A. Khaw, Determination of Bisphenol-A-Diglycidyl Ether, Bisphenol-F-Diglycidyl Ether and Their Hydroxy and Chlorohydroxy Derivatives. Poster, 29th Congress on Science and Technology of Thailand, Khon Kean, Thailand October 2003.
- N. Leepipatpiboon, O. Khaw, and S. Jayanta, Simultaneous Determination of BADGE, BFDGE, and Their Derivatives in Oil-In-Water and Aqueous-Based Canned Foods by HPLC with Fluorescence Detection, J. Chromatogr. A, 1073 (2005) 331-339.

เรื่องที่ 5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในอาหาร โดยการทำอนุพันธ์แบบก่อนเข้าคอลัมน์กับ 6-aminoquinoline-N-hydroxy-succinimyl carbamate ด้วยเทคนิครีเวอร์เฟสโครมาโตกราฟี

แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดินในชุด โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร-อุตสาหกรรมอาหารปี 2544-2546

เรื่องที่ 6 การวิเคราะห์โปรตีน กรดอะมิโน ทอกซิน และสารยับยั้งโภชนาการในพืชเกษตรกรรมของจังหวัดน่าน

แหล่งทุน ทุนอุดหนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2548-50

เรื่องที่ 7 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกลิ่นและรสในน้ำมันโค

แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน

การเผยแพร่

- U. Koesukwiwat, S. Jayanta, and N. Leepipatpiboon, Simultaneous Extraction and Determination of Sulfonamides, Tetracyclines, and Pyrimethamine in Cow Milk by LC-MS, Poster, ISC 2006, Copenhagen, Denmark, 21-25 August 2006.

- U. Koesukwiwat, S. Jayanta, and N. Leepipatpiboon, Validation of a Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Multi-Residue Method for the Simultaneous Determination of Sulfonamides, Tetracyclines, and Pyrimethamine in Milk, *J. Chromatography A*, 1140 (2007) 147-156.
- U. Koesukwiwat, S. Jayanta, and N. Leepipatpiboon, Solid-Phase Extraction for Multi-Residue Determination of Sulfonamides, Tetracyclines, and Pyrimethamine in Bovine's Milk, *J. Chromatography A*, 1149 (2007) 102-111.

8.2 งานวิจัยที่ก้ำกั้งดำเนินการ: ชื่อผลงานวิจัยและแหล่งทุน

- เรื่องที่ 1 การสกัดและการคัดแปร โปรตีนจากพืชเกษตรกรรมของจังหวัดน่านเพื่อใช้ในประโยชน์เชิงอุตสาหกรรม
แหล่งทุน ทุนอุดหนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2548-50
- เรื่องที่ 2 การสำรวจการปนเปื้อนจากสารเคลือบกระป๋องในอาหารกระป๋องที่จำหน่ายในประเทศไทยโดยเทคนิค HPLC-FLD, ATR-FTIR, และ LC-MS
แหล่งทุน โครงการการเรียนการสอนเพื่อส่งเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
- เรื่องที่ 3 การเคลื่อนย้ายของพลาสติกไซเซอร์จากแผ่นปะเก็นรองฝ่า โลหะของขวดแก้วเข้าสู่อาหาร
แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยปี 2550 และทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
- เรื่องที่ 4 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อประเมินการปนเปื้อนจากบรรจุภัณฑ์อาหาร
แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดินปี 2550-2551 และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการย่อยที่ 4

การพัฒนาผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มจากวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตร
ของจังหวัดน่าน

Value added product development from agricultural wastes in Nan Province



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มจากวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่าน" เป็นโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยเรื่อง "การวิเคราะห์และการตัดแปรทางเคมีเพื่อการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปผลิตภัณฑ์เกษตรของจังหวัดน่าน" ซึ่งได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2548 และ 2550 เพื่อดำเนินการศึกษาวิจัยโครงการจัดการทรัพยากรเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืนของจังหวัดน่าน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	๗
สารบัญ	๘
สารบัญตาราง	๑
สารบัญรูป	๑
บทที่ 1 การคัดแปรแถบเพื่อเป็นวัสดุดูดซับสารปนเปื้อนออกจากน้ำ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	1
บทนำ	2
วัตถุประสงค์และวิธีการ	2
การเตรียมแถบ	2
การเตรียมแผ่นแถบ	3
การเตรียมแถบด้วยการทำ surface modification	3
การศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของแผ่นแถบ	3
การศึกษาสมบัติการดูดซับ ไอออนของ โลหะและสารอินทรีย์ในน้ำ	3
การศึกษาสมบัติการดูดซับสารปนเปื้อนในน้ำประปาตัวอย่างด้วยวิธีคอลัมน์	4
ผลการศึกษาวิจัยและบทวิจารณ์	4
ค่า pH ของสารละลาย	5
โครงสร้างทางเคมีของแผ่นแถบ	5
การดูดซับ ไอออนของ โลหะและสารอินทรีย์ในน้ำแบบแบทช์	6
การศึกษาสมบัติการดูดซับสารปนเปื้อนในน้ำประปาตัวอย่างด้วยวิธีคอลัมน์	9
สรุป	10
เอกสารอ้างอิง	11
บทที่ 2 การเตรียมตัวดูดซับจากฟางข้าว	12
บทคัดย่อภาษาไทย	12
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	12
บทนำ	13
วัตถุประสงค์และวิธีการ	14

สารบัญ (ต่อ)

วัตถุประสงค์และสาระเคมี	14
การเตรียมตัวดูดซับ	14
การทดลองการดูดซับ	14
ผลการศึกษาวิจัยและบทวิจารณ์	15
การเตรียมตัวดูดซับโดยวิธีการให้ความร้อน 1 ชั้น	15
การเตรียมตัวดูดซับโดยวิธีการให้ความร้อน 2 ชั้น	16
การดูดซับฟีนอลและเมทิลีนบลูของตัวดูดซับ	17
สรุป	18
เอกสารอ้างอิง	19
บทที่ 3 การคัดแปรแปลบเพื่อเป็นวัตถุประสงค์สารอินทรีย์ออกจากรน้ำ	20
บทคัดย่อภาษาไทย	20
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	20
บทนำ	21
วัตถุประสงค์และวิธีการ	22
การเตรียมแก้วแกลบ	22
การศึกษาสมบัติการดูดซับสารอินทรีย์ในน้ำ	22
ผลการศึกษาวิจัยและบทวิจารณ์	22
สมบัติทางกายภาพของตัวดูดซับ	22
การดูดซับกรดสวามิก	24
สรุป	26
เอกสารอ้างอิง	26
ประวัติผู้วิจัย	28

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	พื้นที่ผิว ขนาดรูพรุน และปริมาตรรูพรุนของตัวดูดซับได้แก่ถล	22
3.2	ปริมาณกรดสวิมิกที่ดูดซับด้วยได้แก่ถลชนิดต่าง ๆ	24
3.3	Langmuir and Freundlich parameters สำหรับการดูดซับสีย้อมและกรดสวิมิก	26



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	XRD patterns ของเส้นแกลบ	5
1.2	FT-IR spectra ของเส้นแกลบ	6
1.3	SEM micrograph ของเส้นแกลบ	7
1.4	เปอร์เซ็นต์การดูดซับฟีนอลของตัวดูดซับชนิดต่างๆ (n=3)	7
1.5	เปอร์เซ็นต์การดูดซับไอออนทองแดงของตัวดูดซับชนิดต่างๆ (n=3)	8
1.6	ดูดซับไอออนแคลเซียมของตัวดูดซับชนิดต่างๆ (n=3)	9
1.7	ความจุดูดซับแบบสะสมของฟีนอล	9
1.8	ความจุดูดซับแบบสะสมของทองแดง	10
1.9	ความจุดูดซับแบบสะสมของแคลเซียมไอออน	10
2.1	โครงสร้างของเมทิลีน บลู	13
2.2	ประสิทธิภาพในการกำจัด Cu(II) ของตัวดูดซับที่เตรียมโดยการให้ความร้อน 1 ชั้น	15
2.3	ประสิทธิภาพในการกำจัด Cu(II) ของตัวดูดซับที่เตรียมโดยการให้ความร้อน 2 ชั้น	16
2.4	ประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลของตัวดูดซับที่เตรียมโดยการให้ความร้อน 2 ชั้น	17
2.5	ประสิทธิภาพในการกำจัดเมทิลีนบลูของตัวดูดซับที่เตรียมโดยการให้ความร้อน 2 ชั้น	18
3.1	(ก) Supramolecular architecture ของสารสีวามิก [18] (ข) โครงสร้างของ Methylene Blue	21
3.2	(ก) ผลของเวลา (ข) pH (ค) เกลือ (ง) ปริมาณและเวลาในการสัมผัสต่อการดูดซับสีวามิก	23
3.3	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นต่อการดูดซับ Methylene Blue ของเส้นแกลบ Ash	24
3.4	กราฟ Isotherm ของการดูดซับ Methylene Blue ของความสัมพันธ์แบบ (ก) Langmuir และ (ข) Freundlich	24
3.5	(ก) ผลของ pH และ (ข) เวลา ต่อการดูดซับด้วยเส้นแกลบ A-700	25
3.6	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นต่อการดูดซับกรดสีวามิกของเส้นแกลบ A-700	25
3.7	กราฟ Isotherm ของการดูดซับกรดสีวามิกของความสัมพันธ์แบบ (ก) Langmuir และ (ข) Freundlich	25

บทที่ 1 การดัดแปรแกลบเพื่อเป็นวัสดุดูดซับสารปนเปื้อนออกจากน้ำ

พรพรรณ อุดมกาญจนันท์ สุชาดา จุฬานุวัฒน์กุล วลัยภา เอื้องไมตรีภิมย์ เฟื่องฟ้า อุ่นอบ และ อภิชาติ อิมย์ม*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท ปทุมวัน กทม. 10330

Email: iapichat@chula.ac.th

บทคัดย่อ

ทำการเตรียมแกลบเพื่อเป็นวัสดุดูดซับสารมลพิษในน้ำด้วยการเผาแบบธรรมดา และทำ HCl treatment, NaOH treatment ก่อนนำไปเผาด้วยเตาเผาที่อุณหภูมิ 350 °C กับ 600 °C และทำการปรับปรุงพื้นผิวแกลบด้วย tartaric acid เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับ พิสูจน์เอกลักษณ์ของแกลบที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค X-ray Diffraction, Fourier Transform Infrared Spectrometry ลักษณะพื้นผิวด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy และศึกษาสมบัติการดูดซับไอออนของโลหะทองแดง แคลเซียม และฟีนอลจากสารละลายในน้ำโดยวิธีแบบแบทช์ พบว่าแกลบที่ปรับปรุงด้วยการทำ NaOH treatment และเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพในการดูดซับไอออนของโลหะทองแดง แคลเซียม และฟีนอลดีที่สุด โดยดูดซับไอออนของโลหะทองแดง 0.50 mg/g ฟีนอล 0.50 mg/g และแคลเซียมเท่ากับ 1.01 mg/g แล้วนำแกลบที่ได้ไปทำการดูดซับไอออนของโลหะทองแดง แคลเซียม และฟีนอล จากน้ำประปาตัวอย่างโดยวิธีแบบคอลัมน์ พบว่าให้ประสิทธิภาพในการดูดซับที่ดีกว่าระบบแบทช์ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นไส้กรองน้ำได้ต่อไป

Adsorbents prepared from rice husk for water-contaminant removal

Pornpan Udomkanjananan, Suchada Chuanuwatanakul, Wanlapa Aeungmaltrepirom,
Fuangfa Unob and Apichat Imyim

Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Rice husk ash was prepared by 2 procedures, i.e. burning and thermal treatment, and used as adsorbent for decontamination of water. Rice husk was initially treated with HCl and NaOH and then thermally treated at 350 and 600 °C in a furnace. Tartaric acid modification for rice husk was performed to improve its adsorptive property. The ashes obtained were characterized by X-ray Diffraction, Fourier Transform Infrared Spectrometry, and Scanning Electron Microscopy. Adsorption property of all materials towards copper ion, calcium ion, and phenol was studied by batch method. The ash prepared by NaOH treatment at 600 °C showed the highest adsorption efficiency. The adsorption capacity was 0.50, 1.09, and 0.50 mg/g for copper, calcium ions, and phenol, respectively. The column method was also performed. The adsorption efficiency was higher than that of the batch method. The prepared rice husk ash can be probably used for water purification sorbent.

Keywords: Rice Husk, Adsorption, Phenol, Copper, Calcium

บทนำ

ซิลิกา (SiO_2) และถ่านกัมมันต์ (Activated Carbon) เป็นวัสดุที่มีรูพรุนขนาดเล็ก มีพื้นที่ผิวสูง และมีสมบัติเป็นตัวดูดซับที่ดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งการดูดซับโลหะหนักและสารอินทรีย์ในน้ำ องค์ประกอบทางเคมีของถ่านจากการเผาถ่านประกอบด้วยซิลิกาและคาร์บอน จึงสามารถนำถ่านจากการเผาถ่านมาใช้เป็นวัสดุดูดซับสารปนเปื้อนในน้ำได้ นอกจากนี้การใช้ถ่านที่ปรับปรุงสมบัติการดูดซับที่พื้นผิวแล้วร่วมกับถ่านกลบจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการกรองและการดูดซับได้

ผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญที่สุดของจังหวัดน่านคือข้าว การแปรรูปข้าวเปลือกเป็นข้าวสาร ทำให้ได้ถ่านจำนวนมาก การใช้ถ่านส่วนมากจะใช้เป็นเชื้อเพลิงและมีถ่านกลบเกิดขึ้นหลังจากการเผาไหม้ ปัจจุบันมีการใช้ถ่านเป็นเชื้อเพลิงน้อยลง ทำให้ปริมาณของถ่านมีมากขึ้นและมูลค่าต่ำ องค์ประกอบทางเคมีของถ่านที่มีมากที่สุดคือซิลิกาและคาร์บอน มีรายงานการวิจัยอย่างต่อเนื่องของการใช้ถ่านและถ่านกลบเป็นวัสดุดูดซับในการผลิตซิลิกาที่บริสุทธิ์มากขึ้น[1] ใช้ในการสังเคราะห์ซีโอไลต์[2] ถ่านกัมมันต์[3] ถ่านกัมมันต์ประสิทธิภาพสูงสำหรับเซลล์แบตเตอรี่[4] ใช้เป็นสารเติมแต่งในพลาสติก[5] เป็นส่วนผสมในปูนซีเมนต์[6] และใช้เป็นวัสดุดูดซับสารมลพิษจากน้ำเสีย[7-13] สมบัติของถ่านกลบสำหรับการใช้งานแต่ละแบบจะแตกต่างกัน ซึ่งสมบัติขึ้นอยู่กับกระบวนการเผาถ่าน[4,14] การเผาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 300°C ได้ถ่านกลบที่ประกอบด้วยซิลิกาผสมกับคาร์บอน[7] ถ้าเผาที่อุณหภูมิสูงกว่านี้จะได้ซิลิกา[1,15] นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงสมบัติของถ่านกลบได้โดยการผสมสารอื่นลงไปขณะเผา การผลิตถ่านกลบด้วยกรรมวิธีการเผาที่แตกต่างกันทำให้สามารถเพิ่มมูลค่าของถ่านกลบได้ เช่น การทำ acid treatment [4, 8, 16], base treatment [11], phosphate treatment [10], tartaric acid modification [17] พบว่าถ่านกลบที่ได้จะมีประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะหนักเพิ่มขึ้น

ถ่านจากการใช้ถ่านเป็นเชื้อเพลิงมีสมบัติโดดเด่นในการใช้เป็นตัวดูดซับสารมลพิษในน้ำได้ดี ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษากรรมวิธีการเตรียมและการใช้ถ่านกลบเพื่อเป็นวัสดุดูดซับสิ่งเจือปนในน้ำ และพัฒนากระบวนการเตรียมถ่านกลบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับ เพื่อประยุกต์ใช้เป็นไส้กรองน้ำ

กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ได้มีการกำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม สำหรับงานวิจัยนี้เน้นการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งในต้นตัวกำหนดทางเคมี ในเรื่องของการลดปริมาณโลหะ เช่น โลหะทองแดง การลดปริมาณสารอินทรีย์ เช่น สารประกอบฟีนอล และการลดความกระด้างของน้ำโดยลดปริมาณแคลเซียมในน้ำ

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมถ่าน

ทำการเก็บตัวอย่างถ่าน ซึ่งเป็นถ่านชนิดเม็ดจากโรงสีข้าว ที่ยังไม่ผ่านกระบวนการบด ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน ฝั้ให้แห้งลม เก็บใส่ขวดพลาสติก ปิดฝาให้สนิท

นำตัวอย่างถ่านมาทำการลดขนาดด้วยเครื่องบดที่มีใบมีด โดยบดถ่านกับน้ำปราศจากไอออน กรองและนำไปอบในเตาอบที่ 120°C จนถ่านแห้ง แล้วนำถ่านที่แห้งมาร่อนให้ได้ ถ่านที่มีขนาดเล็กกว่า 2 mm ซึ่งถ่านนี้มา 5 กรัม 3 ส่วน ส่วนที่ 1 แซ่ด้วยน้ำปราศจากไอออน 100 mL เรียกว่า water ส่วนที่ 2 แซ่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N 100 mL เรียกว่า acid ส่วนที่ 3 แซ่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 N 100 mL เรียกว่า base แซ่ทิ้งไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงกรองและล้างถ่านด้วยน้ำปราศจากไอออนจนหมดกรด และเบส นำไปอบในเตาอบที่ 120°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

การเตรียมถ้ำกลบ

นำตัวอย่างกลบที่เก็บมาทำการเตรียมเป็นถ้ำกลบซึ่งแบ่งเป็น 2 วิธี คือ ถ้ำกลบที่เตรียมจากการเผาแบบธรรมดา โดยนำตัวอย่างกลบที่เก็บมาบรรจุลงบนเตาด่านที่มีรังผึ้ง เผาให้กลบไหมไฟ โดยการจุดไฟบริเวณด้านล่างของรังผึ้ง ทิ้งให้กลบไหมไฟตามธรรมชาติ จนกระทั่งไฟดับมอดเอง ตักถ้ำกลบที่ได้ใส่ในขวดพลาสติก ปิดฝาให้สนิท เรียกถ้ำกลบที่ได้จากการเผาแบบธรรมดานี้ว่า Ash และวิธีที่ 2 ถ้ำกลบที่เตรียมจากการเผาด้วยเตาเผาไฟฟ้า นำตัวอย่างกลบที่เก็บมาซึ่งน้ำหนักเป็น 3 ส่วน ส่วนละ 40 กรัม ดังนี้ ส่วนที่ 1 แช่ด้วยน้ำปราศจากไอออน 1000 mL ส่วนที่ 2 แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N 1000 mL ส่วนที่ 3 แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 N 1000 mL แช่ทั้งหมดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองสารละลายหรือน้ำที่ใช้แช่กลบ ทิ้ง แล้วล้างกลบที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออนหลายๆครั้ง ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แบ่งกลบแต่ละส่วนออกเป็น 2 ส่วนๆ ละเท่าๆ กัน ดังนี้ ส่วนที่ 1 นำไปใส่ในถ้วยสำหรับเผา (ครุชเบิ้ลที่มีฝาปิด) แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผาที่อุณหภูมิประมาณ 350 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้ถ้วยเผาเย็น นำถ้ำกลบที่ได้มาบดให้ละเอียดโดยมีขนาดเล็กกว่า 2 mm เก็บถ้ำที่ได้ในขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิด เรียกถ้ำชูดนี้ว่า W350 A350 และ B350 ตามลำดับ ส่วนที่ 2 นำไปใส่ในถ้วยสำหรับเผา แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผาที่อุณหภูมิประมาณ 600 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้ถ้วยเผาเย็น นำถ้ำมาบดให้ละเอียดโดยมีขนาดเล็กกว่า 2 mm เก็บถ้ำที่ได้ในขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิด เรียกถ้ำชูดนี้ว่า W600 A600 และ B600 ตามลำดับ

การเตรียมกลบด้วยการทำ surface modification

นำตัวอย่างกลบที่เก็บมาทำการลดขนาดด้วยเครื่องบดที่มีใบมีด โดยบดกลบกับน้ำปราศจากไอออน กรองและนำไปอบในเตาอบที่ 100°C นำกลบที่แห้งแล้วมาบดให้กลบที่ได้มีขนาดเล็กกว่า 2 mm แช่ในสารละลายกรดทาร์ทริกความเข้มข้น 1.2 M อุณหภูมิ 100°C เป็น 10 นาที กรอง ล้าง และผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เรียกกลบที่ได้นี้ว่า Tartaric acid rice husk (TARH)

การศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของถ้ำกลบ

ค่า pH

ชั่งถ้ำกลบชนิดต่างๆ และ TARH อย่างละ 0.1 กรัม ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำปราศจากไอออนลงไป 10 mL กวนสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที เซนทรีฟิวจ์และกรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า pH (Denver Model 215)

โครงสร้างทางเคมีของถ้ำกลบ

นำถ้ำกลบชนิดต่างๆทั้งหมดไปศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีด้วยเทคนิค X-ray Diffraction Spectroscopy (Rigaku DMAX 2200/Ultima+) Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Nicolet Impact 410) Scanning Electron Microscopy (JEOL JSM-5410LV)

การศึกษาสมบัติการดูดซับไอออนของโลหะและสารอินทรีย์ในน้ำ

ฟีนอล

ชั่งตัวดูดซับชนิดต่างๆ 0.1 กรัม ผสมกับสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 ppm ปริมาตร 10 mL ในขวดแก้วมีฝาปิด เขย่าสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที เซนทรีฟิวจ์ กรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน วัด pH ของสารละลาย เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เข้มข้น 50 % (w/w) ปริมาตร 100 μ L นำสารละลายไปตรวจสอบปริมาณฟีนอลที่เหลือในสารละลายด้วยเทคนิค UV-vis spectroscopy (HP 8543)

ทองแดง

เตรียมสารละลายทองแดงเข้มข้น 5 ppm จากสารละลาย $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ที่ทำการปรับ pH ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1% (w/w) จนมี pH ประมาณ 7 ± 1 ชั่งแก้วกลบ และ TARH 0.1 กรัม ผสมกับสารละลายทองแดงเข้มข้น 5.0 ppm ปริมาตร 10 mL ในขวดแก้วมีฝาปิด เขย่าสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 วัด pH ของสารละลาย นำสารละลายไปหาปริมาณไอออนทองแดงที่เหลือในสารละลาย ด้วยเทคนิค Atomic Absorption Spectroscopy (Perkin Elmer Analyst100)

แคลเซียม

ชั่งแก้วกลบและ TARH 0.1 กรัม ผสมกับสารละลายแคลเซียมเข้มข้น 50 ppm ที่เตรียมจากสารละลาย CaCO_3 ปริมาตร 10 mL ในขวดแก้วมีฝาปิด เขย่าสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เปิดสารละลายมา 10 mL เติมน้ำฟอสเฟอโรนโมเนีย pH 10 ลงไป 2 mL เติมน้ำ Eriochrome Black T 1-2 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.001 F เพื่อหาปริมาณไอออนของแคลเซียมที่เหลือในสารละลาย

การศึกษาสมบัติการดูดซับสารปนเปื้อนในน้ำประปาตัวอย่างด้วยวิธีคอลัมน์

เตรียมน้ำประปาตัวอย่างจำนวน 1000 mL โดยทำการ spike สารมาตรฐานต่างๆ ให้มีความเข้มข้นดังนี้ สารละลายทองแดงเข้มข้น 5 ppm สารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 ppm สารละลายแคลเซียมเข้มข้น 50 ppm นำน้ำประปาตัวอย่างก่อนปรับปริมาตรไปวัดค่า pH และทำการปรับ pH ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1% (w/w) จนมี pH ประมาณ 7 ± 1 และทำการปรับปริมาตร ชั่งแก้วกลบมา 0.5 กรัม ใส่ในหลอดฉีดยาซึ่งภายในบรรจุ frit อยู่ แล้วนำไปต่อเข้ากับเครื่อง Manifold นำน้ำประปาตัวอย่างเทผ่านคอลัมน์ครั้งละ 50 mL ดูดด้วยปั๊มที่ต่อกับเครื่อง Manifold จับเวลาตั้งแต่สารละลายเริ่มกรองออกจากคอลัมน์จนสารละลายออกจากคอลัมน์หมด นำไปหาค่าอัตราการไหลเฉลี่ย เก็บน้ำประปาตัวอย่างในแต่ละ fraction ไว้ในขวดแก้วมีฝาปิด และนำไปหาปริมาณฟีนอล ไอออนของทองแดง และไอออนของแคลเซียมที่เหลือในสารละลายด้วยวิธีเดียวกับข้างต้น

ผลการศึกษาวิจัยและบทวิจารณ์

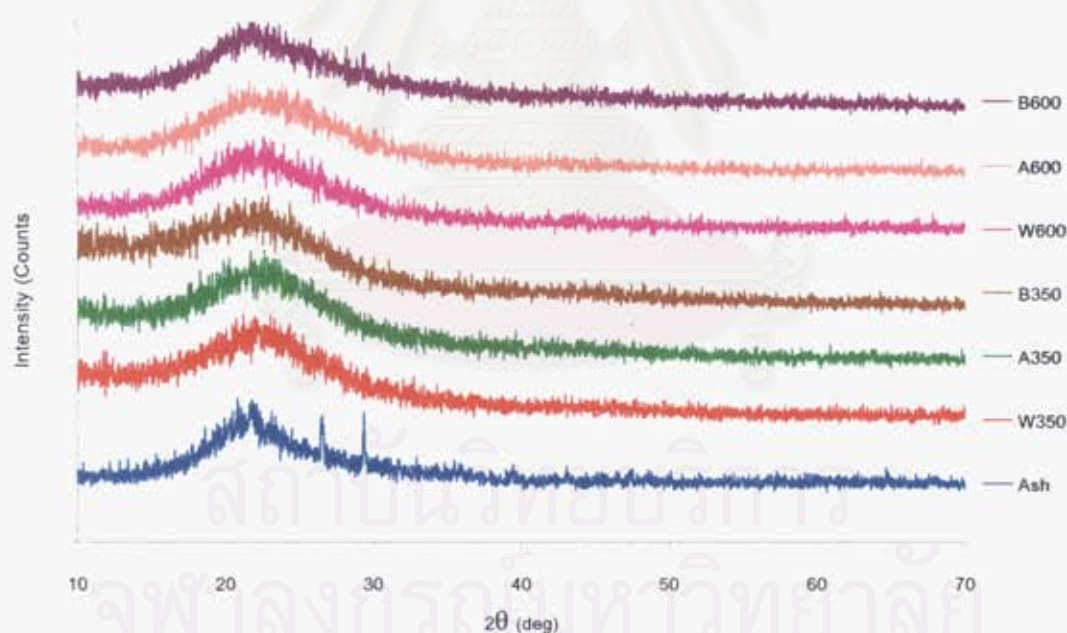
วัสดุดูดซับที่ปรับปรุงจากแกลบมีลักษณะแตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นการนำแกลบมาเผาแบบธรรมดา การทำ HCl treatment หรือการทำ NaOH treatment แล้วนำไปเผาด้วยเตาเผาที่อุณหภูมิ 350°C กับ 600°C โดยการนำแกลบมาเผาที่อุณหภูมิ 600°C จะได้ปริมาณซิลิกาที่มากขึ้น เมื่อเทียบกับการนำแกลบไปเผาที่อุณหภูมิ 350°C ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะภายนอก คือ แกลบที่เผาที่อุณหภูมิ 600°C เมื่อกลายเป็นเถ้าจะมีปริมาณของแอสซิวเพิ่มขึ้น ขณะที่อุณหภูมิ 350°C จะมีปริมาณของแอสซิวซึ่งแสดงปริมาณซิลิกาน้อยกว่า หรือมีแอสซิวซึ่งแสดงปริมาณของคาร์บอนมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ V.P. Della และคณะ [1] ที่ว่าการนำแกลบไปเผาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 300°C จะได้เถ้าแกลบที่ประกอบด้วยซิลิกาผสมกับคาร์บอนและการเผาที่อุณหภูมิสูงกว่านี้จะได้ซิลิกาที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะของเถ้าแกลบที่จะเปลี่ยนจากสีดำเป็นสีขาว ส่วนเถ้าที่ได้จากการเผาแบบธรรมดามีปริมาณของแอสซิวมากกว่าเถ้าตัวอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งแสดงว่าตัวดูดซับที่ได้จากการ

เผาแบบธรรมดาที่มีปริมาณของซิลิกาที่มากกว่า เมื่อเทียบกับการนำไปเผาที่อุณหภูมิ 600°C แสดงว่าการเผาแบบธรรมดาใช้อุณหภูมิมากกว่า 600°C

ค่า pH ของสารละลาย

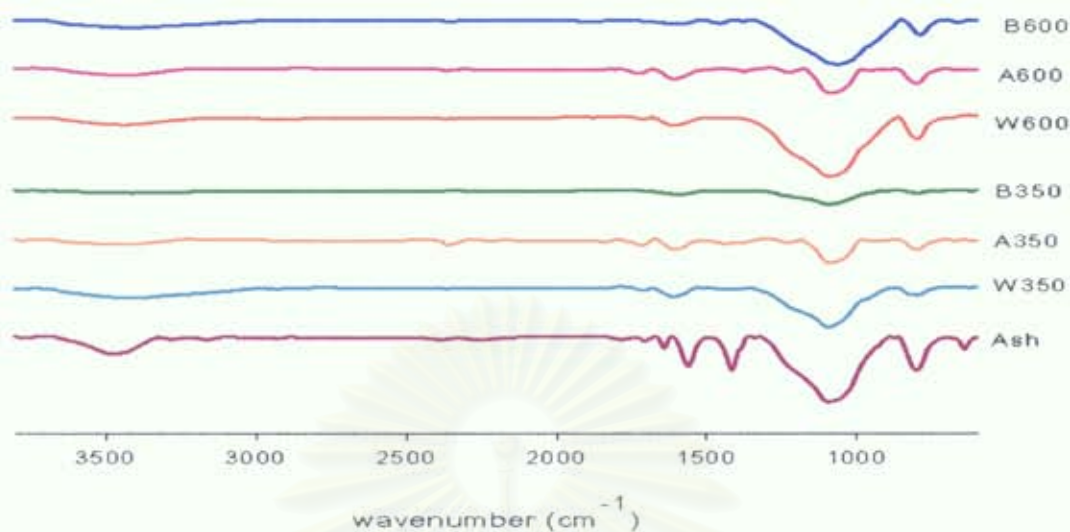
ค่า pH ของน้ำที่ผ่านการดูดซับด้วยเถ้าแกลบชนิดต่างๆ พบว่าการนำเถ้าไปพัฒนากระบวนการเตรียมเถ้าแกลบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับด้วยการทำ acid-base treatment หรือ surface modification ด้วย Tartaric acid ส่งผลให้ค่า pH ของสารละลายหรือน้ำที่ได้หลังจากผ่านเถ้าแกลบมีการเปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะกระบวนการเตรียมเถ้าแกลบ ซึ่งโดยปกติแล้วเถ้าธรรมดาที่มีคุณสมบัติเป็นเบส แต่เมื่อนำเถ้าไปทำ NaOH treatment ทำให้เถ้าที่ได้มีความเป็นเบสมากขึ้น ส่วนเถ้าที่นำไปทำ HCl treatment ทำให้เถ้าที่ได้มีความเป็นกรดเล็กน้อย ส่วนเถ้าที่ไม่ได้ทำทั้ง HCl treatment และ NaOH treatment ทำให้เถ้าแกลบที่ได้มีคุณสมบัติเป็นกลาง และเถ้าที่นำไปทำ surface modification ด้วย Tartaric acid ทำให้เถ้าที่ได้มีคุณสมบัติเป็นกรดมาก ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะว่า กระบวนการพัฒนาเถ้าที่เตรียมขึ้นนั้นไปมีผลต่อหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างของเถ้าไม่ว่าจะเป็นพื้นผิว รูพรุน โดยอาจเข้าไปอยู่ในรูพรุนของเถ้าแกลบแล้วสามารถละลายออกมาได้ จึงส่งผลให้ค่า pH ของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปตามรูปแบบของการเตรียม

โครงสร้างทางเคมีของเถ้าแกลบ



รูปที่ 1.1 XRD patterns ของเถ้าแกลบ

จากรูปที่ 1.1 แสดง XRD patterns ของเถ้าแกลบ จะพบว่าลักษณะของ XRD patterns ของเถ้าแกลบชนิดต่างๆ จะคล้ายกันคือเป็น amorphous silica ไม่มีผลึกเกิดขึ้น ยกเว้นเถ้าแกลบที่เผาแบบธรรมดา (Ash) จะปรากฏเห็นพีกของผลึกเกิดขึ้นที่ 2θ เท่ากับ 22 องศา ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการเผาแบบธรรมดาจะให้อุณหภูมิที่สูงกว่า ($> 700^{\circ}\text{C}$) เนื่องจากเกิด crystallization ของ amorphous silica เป็น cristobalite และถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นไปอีกจะทำให้เกิด tridymite (1000°C ขึ้นไป) ซึ่งผลึกที่เกิดขึ้นเหล่านี้เกิดจากการเผาที่อุณหภูมิสูงแล้วปล่อยให้เย็นตัวอย่างช้าๆ [18]



รูปที่ 1.2 FT-IR spectra ของเต้าแกลบ

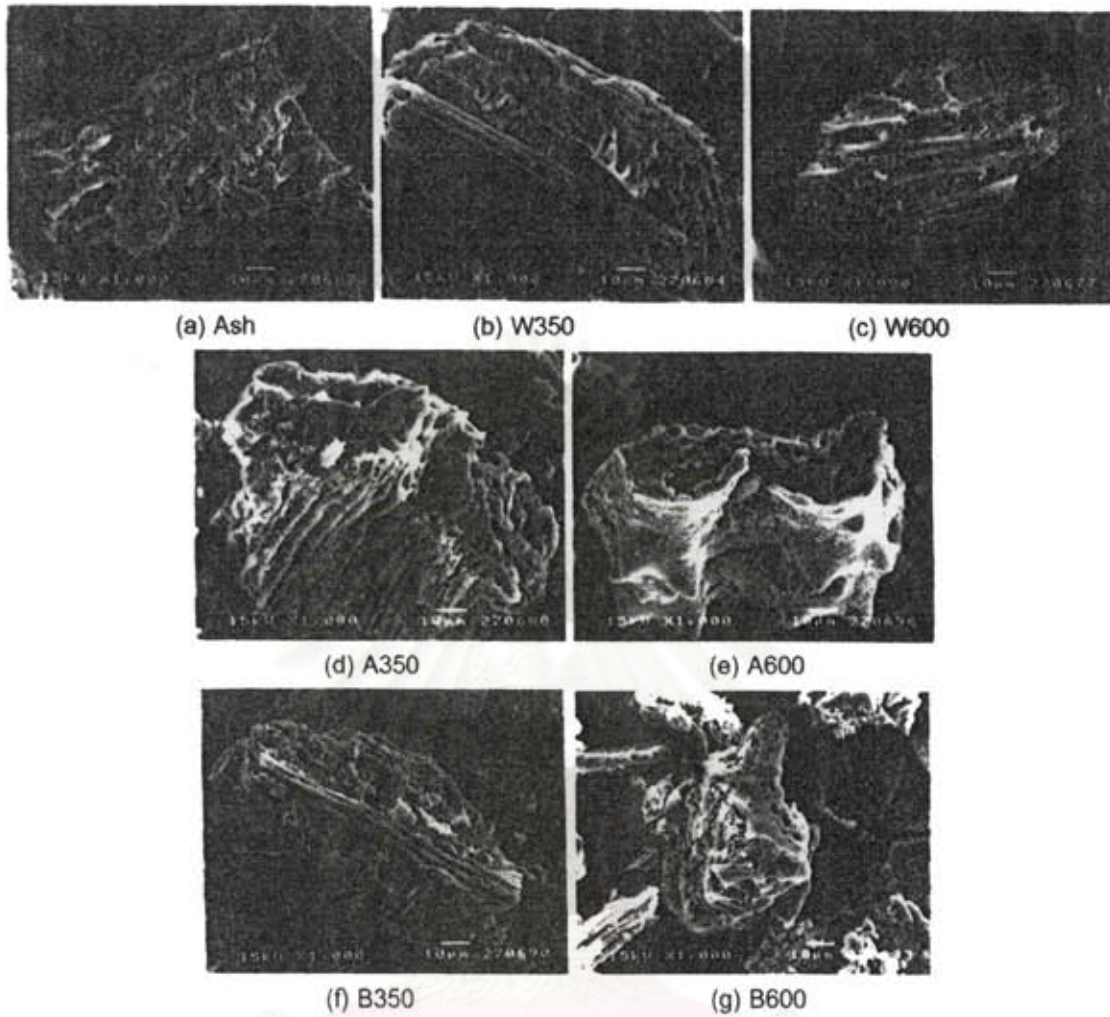
จากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FT-IR เมื่อพิจารณา IR spectrum ที่ได้ของเต้าแกลบชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 1.2 พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยจะพบแถบการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 1600 cm^{-1} ที่เกิดจากพันธะ Si-O (siloxane) แถบการดูดกลืนที่ประมาณ 800 cm^{-1} ถึง 1100 cm^{-1} ที่เกิดจาก Si-OH (silanol) และแถบการดูดกลืนช่วง $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งมีลักษณะ broad ที่เกิดจาก -OH silanol stretching แต่การนำไปที่อุณหภูมิ $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ รูปที่ 2.5-2.7 จะพบแถบการดูดกลืนช่วง $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเห็นได้ไม่ชัดเจนที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชัน C-C-H แสดงว่าเต้าแกลบที่เตรียมได้มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นคาร์บอนและซิลิกาจริง

จาก SEM ที่ได้ดังรูปที่ 1.3 จะพบว่าลักษณะของพื้นผิวที่ได้จะมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) และรูปทรงกลมและพบว่าลักษณะพื้นผิวของเต้าแกลบทุกชนิดมีรูพรุน เหมาะสำหรับการนำไปทำเป็นวัสดุดูดซับสิ่งเจือปนในน้ำจำพวกไอออนของโลหะและสารอินทรีย์ต่อไป

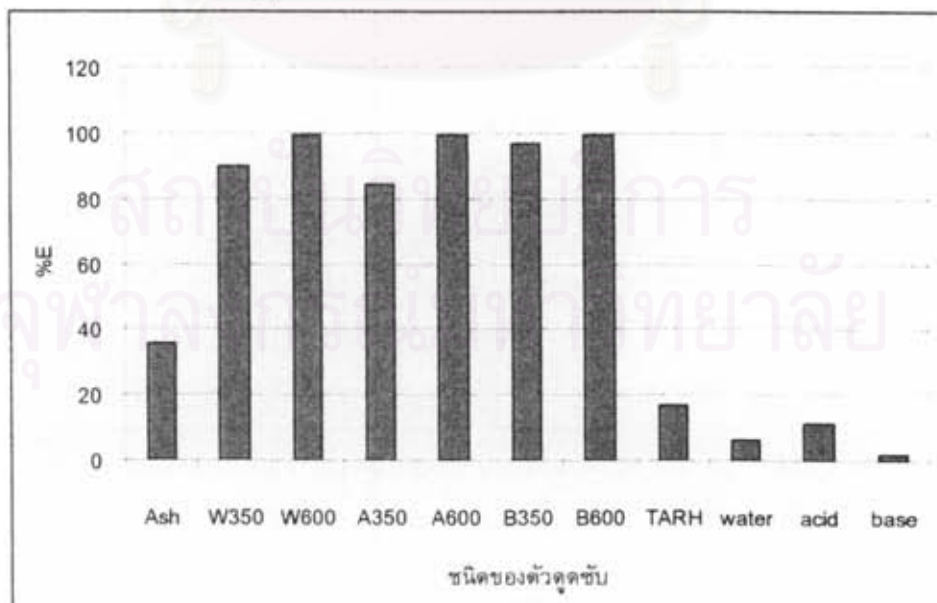
การดูดซับไอออนของโลหะและสารอินทรีย์ในน้ำแบบแบทช์

เต้าแกลบที่เผามีประสิทธิภาพในการดูดซับฟีนอลได้ดีกว่าแกลบที่ไม่ได้เผา ทั้งนี้เนื่องจากเต้าแกลบที่ทำการเผาจะมีขนาดเล็ก และมีรูพรุน ทำให้มีพื้นที่ผิวในการดูดซับฟีนอลได้ดีกว่าแกลบที่ทำการลดขนาดแต่ไม่ได้เผา เมื่อศึกษาการดูดซับฟีนอลของเต้าแกลบชนิดต่างๆ เทียบกับแกลบที่ทำ tartaric acid modification เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของตัวดูดซับและเปอร์เซ็นต์การดูดซับฟีนอล (%E) ได้ดังรูปที่ 1.4

เต้าแกลบที่ทำการเผาที่อุณหภูมิ $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ มีประสิทธิภาพการดูดซับฟีนอลได้ดีที่สุด คือสามารถดูดซับฟีนอลได้มากกว่า 99% ทั้งนี้เนื่องเพราะการเผาที่อุณหภูมิสูงทำให้องค์ประกอบทางเคมีของเต้าที่ได้เหมาะแก่การดูดซับ เมื่อพิจารณาผลการดูดซับฟีนอลของเต้าที่เผาที่อุณหภูมิ $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ เต้าแกลบที่ทำ NaOH treatment จะมีประสิทธิภาพการดูดซับมากกว่าเต้าแกลบที่ทำ HCl treatment ทั้งนี้เนื่องมาจากฟีนอลเป็นกรดอ่อน แดกตัวได้ฟีนอลิกไอออนซึ่งมีประจุลบ และสามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุกับตัวดูดซับ ซึ่งสามารถแตกตัวให้ไฮดรอกไซด์ไอออน (สันนิษฐานจากน้ำที่ผ่านการสัมผัสมีฤทธิ์เป็นเบส) ทำให้ตัวดูดซับมีประจุบวกได้ ส่วนแกลบที่ทำ Tartaric acid modification ให้ประสิทธิภาพในการดูดซับน้อยสุดนั้นอาจเป็นเพราะว่ามีหมู่ฟังก์ชันที่ผิวเป็นคาร์บอกซิลิก มีขนาดพื้นที่ผิวน้อยกว่าเต้าแกลบชนิดต่างๆ จึงไม่สามารถดูดซับฟีนอลได้

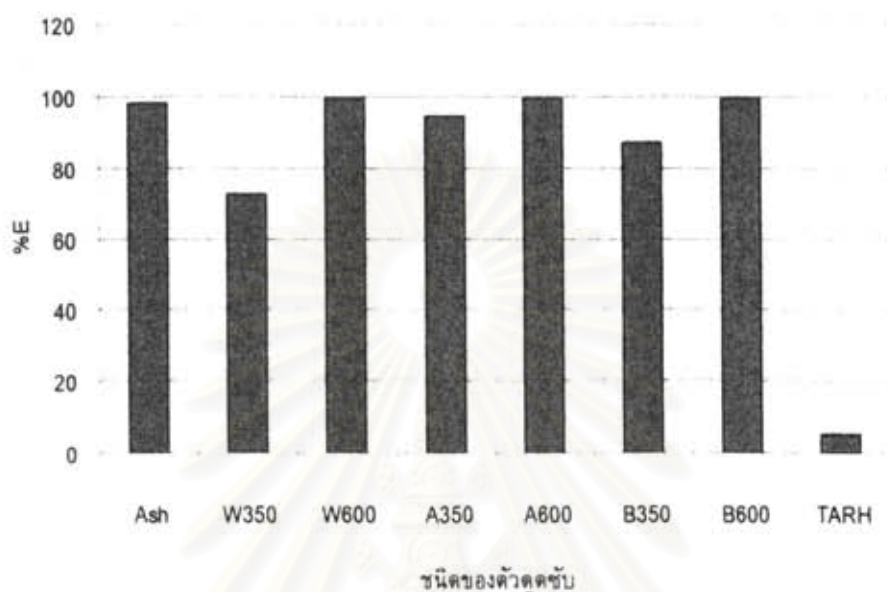


รูปที่ 1.3 SEM micrograph ของเต้าแกลบ



รูปที่ 1.4 เปอร์เซนต์การดูดซับฟีนอลของตัวดูดซับชนิดต่างๆ (n=3)

ผลการศึกษาการดูดซับไอออนของทองแดงของตัวดูดซับต่างๆ เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของตัวดูดซับและเปอร์เซ็นต์การดูดซับไอออนของทองแดง (%E) ได้ผลดังรูปที่ 1.5

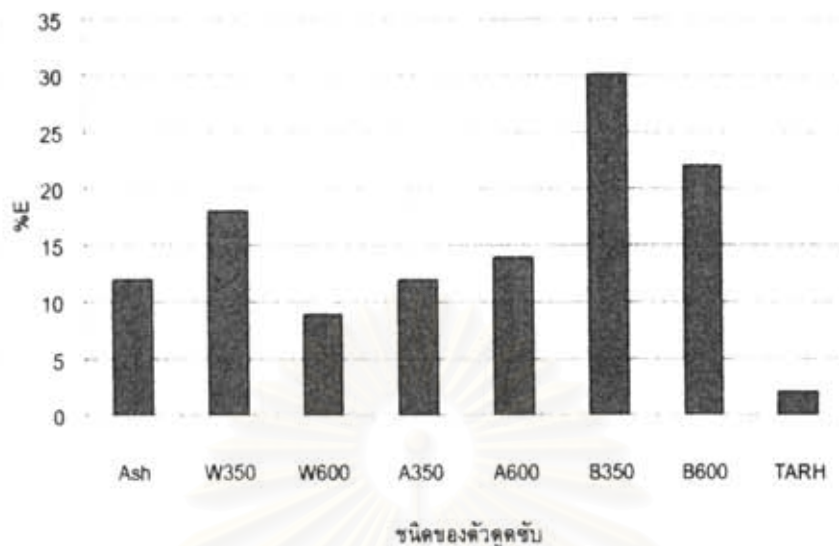


รูปที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์การดูดซับไอออนทองแดงของตัวดูดซับชนิดต่างๆ (n=3)

จากกราฟพบว่าถ้ำกลบที่ทำการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C มีประสิทธิภาพในการดูดซับไอออนของโลหะทองแดงได้ดีที่สุด คือสามารถดูดซับไอออนของโลหะทองแดงได้มากกว่า 99% การเผาที่อุณหภูมิสูงทำให้องค์ประกอบทางเคมีของถ้ำที่ได้เหมาะแก่การดูดซับ ดังที่กล่าวไว้แล้วในข้างต้น และเมื่อพิจารณาถ้ำกลบที่เผาที่อุณหภูมิ 350 °C พบว่าถ้ำกลบที่ทำ HCl treatment จะมีประสิทธิภาพการดูดซับมากกว่าถ้ำกลบชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากไอออนของทองแดง ซึ่งมีประจุบวกสามารถดูดซับบน ถ้ำกลบที่ทำ HCl treatment ซึ่งสามารถแตกตัวให้โปรตอนได้ ทำให้ตัวดูดซับมีประจุลบอยู่ จึงสามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุกับไอออนของโลหะทองแดง ซึ่งมีประจุบวกได้ดีกว่า ถ้ำกลบที่ทำ NaOH treatment ส่วนถ้ำกลบที่ทำ Tartaric acid modification อธิบายในทำเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น

ผลการศึกษาการดูดซับไอออนของแคลเซียม เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของตัวดูดซับและเปอร์เซ็นต์การดูดซับไอออนของแคลเซียม(%E) ได้ผลดังรูปที่ 1.6

จากกราฟจะพบว่าถ้ำกลบและ TARH ให้ประสิทธิภาพในการดูดซับไอออนของแคลเซียมค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบการดูดซับทองแดงและฟีนอล เนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นของแคลเซียมสูงถึง 50 ppm ซึ่งสูงกว่าทองแดงและฟีนอล โดยถ้ำกลบที่ทำ NaOH treatment แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 350 °C มีประสิทธิภาพในการดูดซับไอออนของแคลเซียมดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวดูดซับชนิดอื่นๆ ให้เปอร์เซ็นต์การดูดซับ 30% หรือคิดเป็น 1.52 mg/g

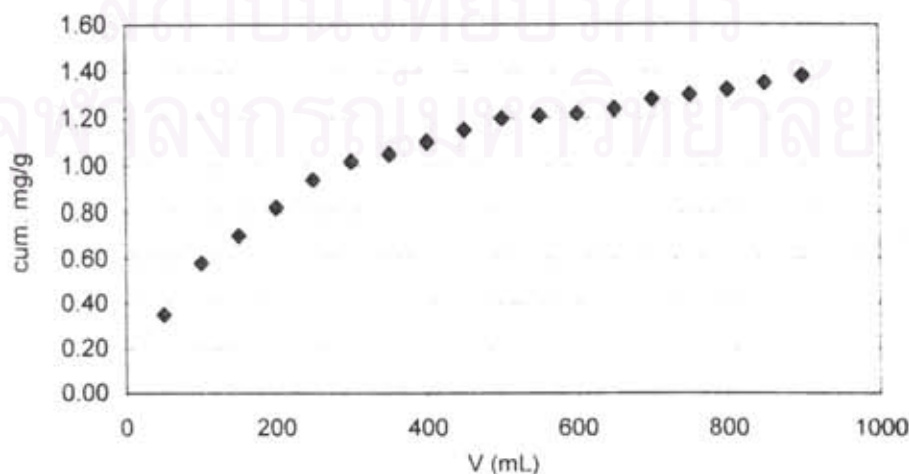


รูปที่ 1.6 เปอร์เซนต์การดูดซับไอออนแคลเซียมของตัวดูดซับชนิดต่างๆ (n=3)

จากผลการศึกษาการดูดซับฟีนอล ทองแดง และแคลเซียม สามารถเลือกตัวดูดซับที่ดีที่สุด คือ B600 เนื่องจากมีประสิทธิภาพการดูดซับฟีนอลและทองแดง สูงที่สุด ส่วนการดูดซับแคลเซียม นั้น B600 มีประสิทธิภาพต่ำกว่า B350 แต่ไม่ต่างกันมาก มีความจุการดูดซับเท่ากับ 1.09 mg/g

การศึกษาสมบัติการดูดซับสารปนเปื้อนในน้ำประปาตัวอย่างด้วยวิธีคอลัมน์

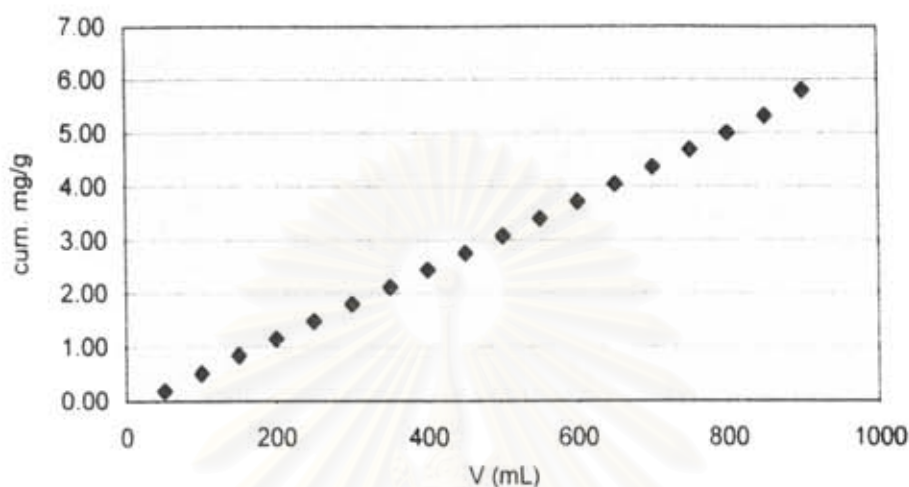
เมื่อผ่านคอลัมน์ด้วยน้ำประปาตัวอย่างครั้งที่ 1 พบว่า สามารถดูดซับฟีนอลได้ 77 % ครั้งที่ 2 ดูดซับฟีนอลได้ 51 % และมีแนวโน้มในการดูดซับได้น้อยลงเรื่อยๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก active site ในการดูดซับมีจำนวนจำกัด จึงทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับครั้งหลังๆ มีประสิทธิภาพในการดูดซับที่ต่ำลงเรื่อยๆ ความจุการดูดซับสะสม (cumulative adsorptivity) แสดงดังรูปที่ 1.7 พบว่าเมื่อทำการดูดซับต่อไปประสิทธิภาพในการดูดซับฟีนอลมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ แสดงว่าความจุการดูดซับสูงสุดประมาณ 1.4 mg/g



รูปที่ 1.7 ความจุดูดซับแบบสะสมของฟีนอล

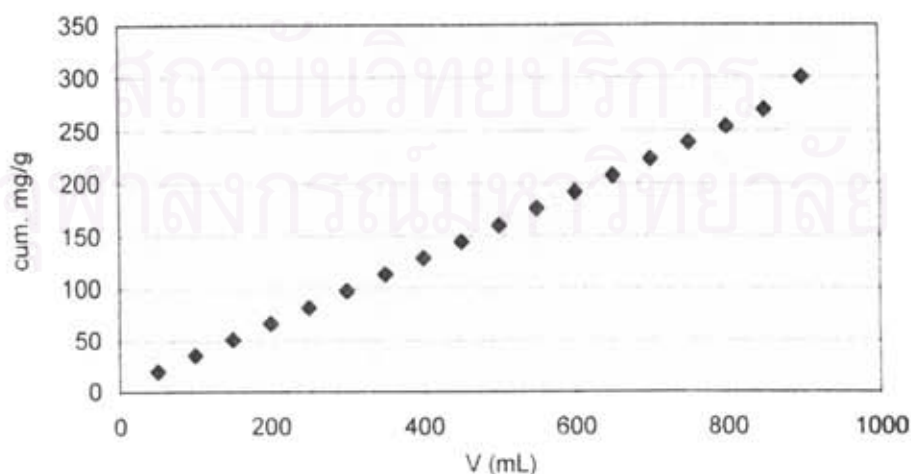
ความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะทองแดง มีแนวโน้มในการดูดซับน้อยลงเพียงเล็กน้อย แสดงว่า active site ยังสามารถดูดซับได้อยู่เมื่อผ่านคอลัมน์ด้วยน้ำประปาในจำนวนครั้งที่มากขึ้น ประสิทธิภาพในการ

ดูดซับไอออนของทองแดงมีแนวโน้มค่อยๆ ลดลง แต่ตัวดูดซับยังสามารถดูดซับไอออนของทองแดงได้อีก ความจุการดูดซับสะสม (cumulative adsorptivity) แสดงดังรูปที่ 1.8 จากผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถหาค่าความจุการดูดซับสูงสุดได้ ซึ่งบ่งถึงประสิทธิภาพที่ดีของตัวดูดซับ



รูปที่ 1.8 ความจุดูดซับแบบสะสมของทองแดง

ความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะแคลเซียม แสดงผลดังรูปที่ 1.9 จากกราฟรูปที่ 1.9 พบว่าประสิทธิภาพในการดูดซับไอออนของแคลเซียมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เหมือนในกรณีของไอออนของทองแดง ซึ่งยังสามารถทำการดูดซับไอออนของแคลเซียมเพิ่มขึ้นได้ ซึ่งอาจตั้งสมมติฐานได้ว่า ถ้าแก่กลบที่ทำ NaOH treatment แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 600 °C ส่วนที่ทำหน้าที่ดูดซับ ฟีนอล และโลหะ เป็นคนละส่วนกัน จึงทำให้เมื่อผ่านน้ำประปาในคอลัมน์จำนวนที่นานครั้งขึ้น ไอออนของทองแดง และไอออนของแคลเซียมมีความจุการดูดซับมากกว่าฟีนอล ฟีนอลมีประสิทธิภาพต่ำลงเนื่องจากความจุของ active site มีจำนวนจำกัด



รูปที่ 1.9 ความจุดูดซับแบบสะสมของแคลเซียมไอออน

สรุป

สามารถนำแก่กลบซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้จากการแปรรูปข้าวเปลือกเป็นข้าวสารมาทำปรับปรุงเป็นวัสดุดูดซับไอออนของโลหะและสารอินทรีย์ในน้ำได้ โดยถ้าที่ได้จากการนำแก่กลบไปทำ NaOH treatment และนำไปเผาที่

อุณหภูมิ 600 °C ให้ประสิทธิภาพในการดูดซับทั้งทองแดง แคลเซียม และฟีนอลดีที่สุด เมื่อเทียบกับถ้ำแกลบชนิดอื่นๆ และแกลบที่ทำ Tartaric acid modification จากการศึกษาการดูดซับแบบแบทช์ พบว่าการดูดซับของฟีนอลเท่ากับ 0.50 mg/g ไอออนของทองแดงเท่ากับ 0.50 mg/g และไอออนของแคลเซียมเท่ากับ 1.09 mg/g หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การดูดซับที่มากกว่า 99% สำหรับฟีนอลและทองแดงเมื่อเริ่มต้นด้วยความเข้มข้นที่ 5 mg/L แล้วนำถ้ำแกลบที่ได้ไปทำการดูดซับฟีนอล ไอออนของทองแดงและแคลเซียม จากน้ำประปาตัวอย่างโดยวิธีแบบคอลัมน์ พบว่าให้ประสิทธิภาพในการดูดซับและฟีนอลที่ 1.4 mg/g ไอออนของทองแดงมากกว่า 7.3 mg/g แคลเซียมมากกว่า 303 mg/g แสดงให้เห็นว่าสามารถนำถ้ำแกลบที่เตรียมได้ไปใช้เป็นวัสดุกรองน้ำต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. Della, V.P.; Kuhn, I.; Hotza, D. *Materials Letters* **2002**, *57*, 818.
2. Wang, H.P.; Lin, K.S.; Huang, Y.J.; Li, M.C.; Tsaur, L.K. *Journal of Hazardous Materials* **1998**, *58*, 147.
3. Daifullah, A.A.H.; Girgis, B.S.; Gad, H.M.H. *Materials Letters* **2003**, *57*, 1723.
4. Fey, G.T.K.; Chen, C.L. *Journal of Power Sources* **2001**, *97-8*, 47.
5. Park, B.D.; Wi, S.G.; Lee, K.H.; Singh, A.P.; Yoon, T.H.; Kim, Y.S. *Biomass & Bioenergy* **2003**, *25*, 319.
6. Yu, Q.J.; Sawayama, K.; Sugita, S.; Shoya, M.; Isojima, Y. *Cement and Concrete Research* **1999**, *29*, 37.
7. Bakircioglu, Y.; Bakircioglu, D.; Akman, S. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* **2003**, *21*, 467.
8. El-Shafet, E.I.; Canepa, P. *Journal de Physique IV* **2003**, *107*, 415.
9. Mbui, D.N.; Shiundu, P.M.; Ndonye, R.M.; Kamau, G.N. *Journal of Environmental Monitoring* **2002**, *4*, 978.
10. Ajmal, M.; Rao, R.A.K.; Anwar, S.; Ahmad, J.; Ahmad, R. *Bioresource Technology* **2003**, *86*, 147.
11. Guo, Y.P.; Qi, J.R.; Yang, et al. *Materials Chemistry and Physics* **2003**, *78*, 132.
12. Khalid, N.; Rahman, A.; Ahmad, S.; Kiani, S.N.; Ahmed, J. *Radiochimica Acta* **1998**, *83*, 157.
13. Khalid, N.; Ahmad, S.; Kiani, S.N.; Ahmed, J. *Separation Science and Technology* **1998**, *33*, 2349.
14. Sharma, A.; Rao, T.R. *Bioresource Technology* **1999**, *67*, 53.
15. Della, V.P.; Kuhn, I.; Hotza, D. *Advanced Powder Technology III Materials Science Forum* **2003**, *416-4*, 531.
16. Hou, G.H. *Journal of Inorganic Materials* **2003**, *18*, 407.
17. Wong, K.K.; Lee, C.K.; Low, K.S.; Haron, M.J. *Chemosphere* **2003**, *50*, 23.
18. Yalcin, N.; Sevinc, V. *Journal of Ceramics International* **2001**, *27*, 219-224.

บทที่ 2 การเตรียมตัวดูดซับจากฟางข้าว

พรพรรณ อุดมกาญจนันท์ สุชาดา ชูอนุวัฒน์กุล วัลภา เอื่องไมตรีภิรมย์ อภิชาติ อิมย์ม และ เฟื่องฟ้า รุ่นอบ*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท ปทุมวัน กทม. 10330

Email: Fuangfa.U@chula.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการเตรียมตัวดูดซับจากฟางข้าว โดยศึกษาวิธีการเตรียมสองวิธี คือ วิธีการเตรียมโดยให้ความร้อน 1 ชั้น และวิธีการเตรียมโดยให้ความร้อน 2 ชั้น และศึกษาผลของสารละลาย H_2SO_4 , KOH และ $NaCl$ ที่ใช้ในการเตรียมตัวดูดซับต่อประสิทธิภาพของตัวดูดซับที่ได้ในการกำจัด $Cu(II)$, ฟีนอล และเมทิลีนบลู (methylene blue) ออกจากสารละลาย โดยพบว่าสารเคมีไม่ได้ช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด $Cu(II)$ ของตัวดูดซับที่เตรียมโดยให้ความร้อน 1 ชั้น และการใช้สารเคมีมีผลต่อประสิทธิภาพของตัวดูดซับในการดูดซับ $Cu(II)$, ฟีนอลและเมทิลีนบลู เมื่อมีการให้ความร้อน 2 ชั้น นั่นคือ เตรียมแบบการให้ความร้อนสูง ($600^\circ C$) ในขั้นแรก (carbonization) และทำการ Activation ในขั้นที่สองโดยใช้สารเคมี ซึ่งในขั้นนี้จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิในการ Activation สูง ($600^\circ C$) โดยพบว่าสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการ Activation มีผลต่อประสิทธิภาพของตัวดูดซับที่ได้ และคุณสมบัติในการดูดซับของตัวดูดซับที่เตรียมได้โดยใช้ KOH จะแตกต่างจากตัวดูดซับที่เตรียมโดยใช้ H_2SO_4 และ $NaCl$ และตัวดูดซับที่เตรียมโดยใช้ KOH จะสามารถกำจัด $Cu(II)$ และเมทิลีนบลู ได้ดีกว่าตัวอื่นๆ ในขณะที่ตัวดูดซับที่เตรียมโดยใช้ H_2SO_4 และ $NaCl$ จะมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการกำจัดฟีนอลได้ดีกว่า

Preparation of adsorbent from rice straw

Pornpan Udomkanjananan, Suchada Chuanuwatanakul, Wanlapa Aeungmaitrepirom,

Fuangfa Unob and Apichat Imyim

Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

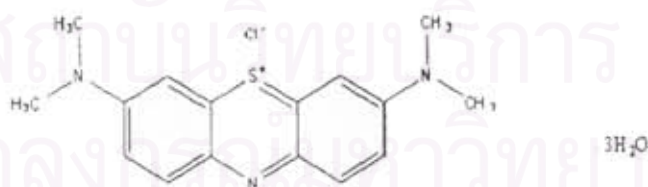
The preparation methods of adsorbents derived from rice straw were proposed. Both a one and two-stage process were developed. The effect of H_2SO_4 , KOH and $NaCl$ used in the processes was investigated. The adsorbents obtained were used to remove $Cu(II)$, phenol and methylene blue from aqueous solutions. It was observed that the use of H_2SO_4 , KOH or $NaCl$ did not improve the adsorption efficiency for $Cu(II)$ of the adsorbents obtained from a one-stage process. On the other hand, H_2SO_4 , KOH or $NaCl$ used as activators in the two-stage process increased the adsorption efficiency for $Cu(II)$, phenol and methylene blue. In this two-stage process, the rice straw was carbonized at $600^\circ C$ and then activated with different chemicals at $600^\circ C$. It was found that the adsorption property of KOH activated adsorbent was clearly different from those activated with H_2SO_4 and $NaCl$. The KOH activated adsorbents could remove $Cu(II)$ and methylene blue more efficiently than the H_2SO_4 or $NaCl$ activated adsorbents. In contrast, the removal efficiency of phenol was improved using H_2SO_4 or $NaCl$ activated adsorbents

Keywords: Rice straws, Adsorption, Phenol, Copper, Methylene Blue

บทนำ

ประเทศไทยมีการทำนาข้าวในหลายพื้นที่ เช่น จังหวัดอ่างทอง จังหวัดน่าน เป็นต้น เมื่อสิ้นสุดฤดูกาลเก็บเกี่ยว จะเหลือฟางข้าวเป็นจำนวนมาก การนำฟางข้าวไปใช้ มีได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้เป็นเชื้อเพลิง และเป็นอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาการนำมีการศึกษาการนำฟางข้าวไปใช้ร่วมกับแบคทีเรียในการกำจัดซีสต์เนียมออกจากรำทึง โดยฟางข้าวทำหน้าที่เป็นวัสดุที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่จำเป็นสำหรับการที่แบคทีเรียจะใช้ในการเปลี่ยนรูป Se(VI) ให้เป็น Se(0) [1] องค์ประกอบทางเคมีหลักของฟางข้าวคือ เซลลูโลส และลิกนิน จากองค์ประกอบดังกล่าวจึงมีการประยุกต์ใช้ฟางข้าวหลากหลายมากขึ้น โดยมีงานวิจัยที่ศึกษาคุณสมบัติของเซลลูโลสจากฟางข้าวเพื่อศึกษาคุณสมบัติของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าว [2,3] รวมถึงการนำฟางข้าวมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอ็กstras [4] นอกจากนี้ยังมีการเตรียมถ่านกัมมันต์จากฟางข้าวเพื่อนำไปเป็นตัวดูดซับ โดยมีกระบวนการเตรียมได้หลายวิธี เช่น การทำ activation ด้วยเบส เช่น KOH [5], การทำ physical activation และ chemical activation โดยการใช้กรด เช่น กรด H_3PO_4 [7] หรือการใช้เกลือโปแตสเซียม (KOH, KCl, K_2CO_3) ร่วมกับแก๊ส CO_2 [8] โดยในงานวิจัยที่ต่อเนื่องได้มีการนำถ่านกัมมันต์ที่เตรียมได้จากฟางข้าวไปดูดซับสารชนิดต่างๆ เช่น สารที่มีสีในกระบวนการผลิตน้ำตาล [9] และโลหะหนัก (Pb, Cu, Cd, Ni, Zn) [10] เป็นต้น พบว่าถ่านกัมมันต์ที่เตรียมจากฟางข้าวสามารถดูดซับสารอินทรีย์ที่มีสีและโลหะหนักได้ดี

กระบวนการเตรียมตัวดูดซับส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยขั้นตอนการเผา (carbonization หรือ pyrolysis) และขั้นตอนการ Activation ซึ่งมีทั้งที่ทำในบรรยากาศปกติ ภายใต้อากาศ CO_2 และภายใต้อากาศ N_2 ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการเตรียมตัวดูดซับจากฟางข้าวโดยใช้สารเคมีประเภทกรด (H_2SO_4) เบส (KOH) และเกลือ (NaCl) โดยทำ Activation ที่บรรยากาศปกติเพื่อให้ประยุกต์ใช้ในการเตรียมได้ง่าย และศึกษาการเตรียม 2 แบบ คือ การให้ความร้อน 1 ชั้น และ 2 ชั้น และศึกษาผลของสารเคมีต่อประสิทธิภาพในการดูดซับของตัวดูดซับที่เตรียมได้จากวิธีที่ใช้ นอกจากนี้ยังศึกษาการดูดซับสิ่งเจือปนในน้ำ 3 กลุ่ม ได้แก่ โลหะทองแดง (Cu(II)) ฟีนอล (phenol) และ สีย้อมประเภท basic dye คือ เมทิลีนบลู (methylene blue) (โครงสร้างดังรูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเมทิลีน บลู

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและสารเคมี

สารละลายโลหะทองแดงเตรียมจากการเจือจางสารละลายมาตรฐานทองแดง ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) เข้มข้น 1000 mg/L สารละลาย phenol, methylene blue, KOH, H_2SO_4 และ NaCl เตรียมจากสารมาตรฐาน reagent grade โดยไม่มีกรนำมาทำให้บริสุทธิ์ก่อน และใช้น้ำปราศจากไอออนในการเตรียมสารละลายทั้งหมดในการทดลอง โดยค่า pH เริ่มต้นจะเป็น pH 2 สำหรับสารละลาย Cu(II) และ pH 6 สำหรับสารละลาย ฟีนอล และเมทิลีนบลู

การเตรียมตัวดูดซับ

วิธีการทดลองได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Oh และ Park [5] โดยนำฟางข้าวมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆประมาณ 3 cm จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและนำฟางข้าวมาปั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว จากนั้นก็นำฟางข้าวมาทำการเตรียมตัวดูดซับโดยการให้ความร้อนที่แตกต่างกัน 2 วิธีคือ วิธีที่ให้ความร้อน 1 ชั้น และ วิธีที่ให้ความร้อน 2 ชั้น โดยเลือกใช้อุณหภูมิในการเผาที่ 600°C เนื่องจากการทดลองเบื้องต้นในการให้ความร้อน 1 ชั้น พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในช่วง 110, 350 และ 600°C จะทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับของตัวดูดซับที่เตรียมได้เพิ่มขึ้นด้วย จึงเลือกอุณหภูมิ 600°C ในการทดลองครั้งนี้

ในวิธีที่ให้ความร้อน 1 ชั้น จะนำฟางข้าวไปแช่ในสารละลาย KOH 1 M, H_2SO_4 1 M และ NaCl 1 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกฟางข้าวและนำฟางข้าวไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปเผาที่ 600°C นำตัวดูดซับที่ได้มาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนจนค่า pH ของน้ำคงที่และนำไปทำให้แห้ง บดให้ละเอียดและเก็บไว้ในขวดพลาสติกที่มีฝาปิด จะเรียกตัวดูดซับที่ได้ในขั้นตอนนี้ว่า C1K, C1HS และ C1Na สำหรับตัวดูดซับที่ผ่านการแช่ KOH, H_2SO_4 และ NaCl ตามลำดับ โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพเทียบกับถ่านที่แช่ด้วยน้ำปราศจากไอออน (C1W)

วิธีการให้ความร้อน 2 ชั้น จะนำฟางข้าวแห้งมาเผา หรือทำ Carbonization ที่อุณหภูมิ 600°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำให้มีขนาดเล็ก และนำไปแช่ในสารละลาย KOH 1 M, H_2SO_4 1 M และ NaCl 1 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกฟางข้าวและนำฟางข้าวไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปเผาในรอบที่สองหรือ Activation คอ์ที่อุณหภูมิ 600°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำตัวดูดซับที่ได้มาบดและล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนจนค่า pH ของน้ำคงที่ นำไปทำให้แห้งและเก็บไว้ในขวดพลาสติกมีฝาปิด โดยเรียกตัวดูดซับที่ได้ในขั้นตอนนี้ว่า C2AK, C2AHS และ C2ANa สำหรับตัวดูดซับที่ผ่านการแช่ KOH, H_2SO_4 และ NaCl ตามลำดับ และทำการศึกษา ประสิทธิภาพเทียบกับตัวดูดซับที่แช่ด้วยน้ำปราศจากไอออน (C2AW) และเทียบกับตัวดูดซับที่ไม่ได้ทำการ Activation ซึ่งใช้ชื่อ C2K, C2HS, C2Na และ C2W สำหรับตัวดูดซับที่ผ่านการแช่ KOH, H_2SO_4 , NaCl และน้ำตามลำดับ แต่ไม่ได้เผาต่อที่ 600°C ครั้งที่สอง

การทดลองการดูดซับ

ศึกษาการดูดซับโดยใช้วิธีแบทช์ (batch) โดยชั่งฟางข้าวหนักใกล้เคียง 0.05 g ใส่ในขวดพลาสติก เติมสารละลายโลหะทองแดงเข้มข้น 5 mg/L (pH 2.0) ปริมาตร 10 mL ปิดฝาและนำไปเขย่าเป็นเวลา 30 นาที นำไป centrifuge และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 นำสารละลายที่ได้ไปวัดหาความเข้มข้นของทองแดงที่เหลือ และ

ในการศึกษาการดูดซับฟีนอล จะใช้ฟางข้าว 0.1 g ผสมกับสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 mg/L และสำหรับเมทิลีน บลู จะใช้ฟางข้าว 0.02 g ผสมกับสารละลายเมทิลีน บลู เข้มข้น 100 mg/L

ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของทองแดง ใช้เครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrometer (Perkin Elmer, analyst 100) ที่ความยาวคลื่น 324.8 nm และการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฟีนอลและเมทิลีน บลู ใช้เครื่อง UV-Vis spectrometer (Hewlett Packard, HP 8543) ที่ความยาวคลื่น 235 และ 665 nm ตามลำดับ และนำผลการทดลองที่ได้มาหาประสิทธิภาพในการกำจัด (%Removal) ตามสมการที่ (2.1) เมื่อ m_i คือ ปริมาณสารเริ่มต้น (mg) และ m_f คือ ปริมาณสารที่เหลือ (mg)

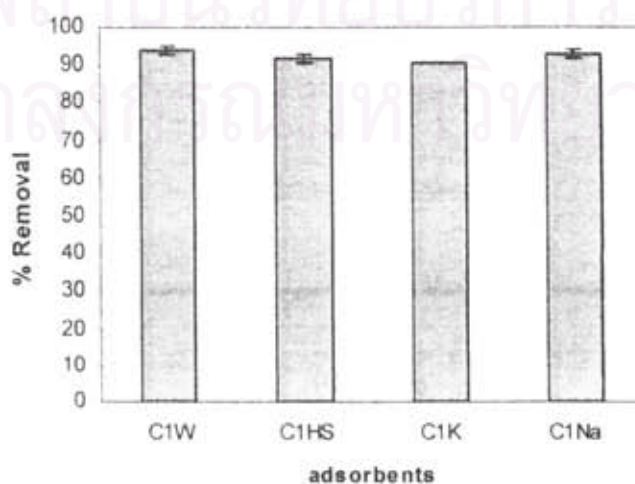
$$\% \text{Removal} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (2.1)$$

ผลการศึกษาวิจัยและบทวิจารณ์

1. การเตรียมตัวดูดซับโดยวิธีการให้ความร้อน 1 ชั้น

จากการเตรียมตัวดูดซับโดยการให้ความร้อน 1 ชั้นจะเป็นการเตรียมตัวดูดซับโดยการนำฟางข้าวแห้งมาแช่น้ำ สารละลาย H_2SO_4 , KOH และ NaCl ก่อนเผาที่ $600^\circ C$ จะได้ตัวดูดซับคือ C1W, C1HS, C1K และ C1Na ตามลำดับ และเมื่อนำตัวดูดซับมาหาประสิทธิภาพการดูดซับ Cu(II) จากสารละลายที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของ Cu(II) เป็น 5 mg/L พบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัด Cu(II) ของตัวดูดซับที่เตรียมได้มีค่าใกล้เคียงกันมาก และอยู่ในช่วง 91 – 94 % (ดังรูปที่ 2.2) ซึ่งสูงกว่าฟางข้าวที่ไม่ได้เผาและไม่ได้แช่สารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัด Cu(II) อยู่ที่ 59%

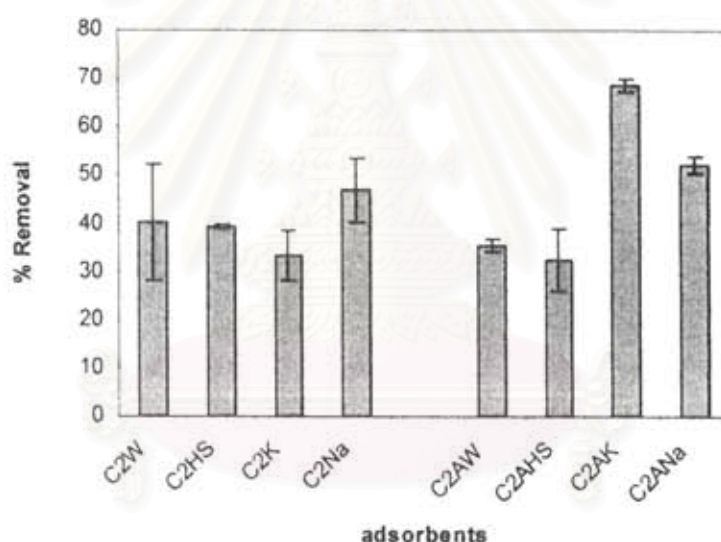
เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในการเผาโดยไม่มีการใช้สารเคมีพบว่า การเผาฟางข้าวที่อุณหภูมิ $600^\circ C$ เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด Cu(II) จาก 59% เป็น 94% และเมื่อเปรียบเทียบการใช้สารเคมีในการเตรียมตัวดูดซับ จากผลการทดลองพบว่า สารเคมีที่ใช้ไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด Cu(II) อย่างเด่นชัด ดังนั้นปัจจัยที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับคือ การเผาที่ $600^\circ C$ ในการทดลองต่อมาจึงได้เผาฟางข้าวก่อนนำมาแช่สารเคมี และคุณสมบัติของสารเคมีที่ใช้ต่อประสิทธิภาพของตัวดูดซับ



รูปที่ 2.2 ประสิทธิภาพในการกำจัด Cu(II) ของตัวดูดซับที่เตรียมโดยการให้ความร้อน 1 ชั้น

2. การเตรียมตัวดูดซับโดยวิธีการให้ความร้อน 2 ชั้น

ในการการเตรียมตัวดูดซับแบบให้ความร้อน 2 ชั้น จะเผาฟางข้าวที่ 600°C ก่อนที่จะนำมาแช่สารเคมีและนำไปให้ความร้อนต่อในขั้นที่สอง โดยในการทดลองนี้ได้แบ่งตัวดูดซับเป็น 2 ส่วน ตามการให้ความร้อนในขั้นที่สอง โดยส่วนแรกจะให้ความร้อนขั้นที่สองที่ 110°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้ตัวดูดซับในขั้นนี้คือ C2W, C2K, C2HS และ C2Na และส่วนที่สองให้ความร้อนขั้นที่สองที่ 110°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและทำการ Activation ต่อที่ 600°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้ตัวดูดซับคือ C2AW, C2AK, C2HS และ C2Na ตัวดูดซับที่ได้จะนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการดูดซับ Cu(II) จากสารละลายที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 7 mg/L ปริมาตร 10 mL และใช้ตัวดูดซับ 0.1 g ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2.3 โดยค่า pH ของสารละลายโลหะที่สัมผัสกับตัวดูดซับมีค่าไม่เกิน pH 7.3 ซึ่งโลหะยังไม่ตกตะกอนไฮดรอกไซด์ โดยพบว่าตัวดูดซับที่ใช้สารละลาย KOH ในการเตรียมจะทำให้สารละลายมีความเป็นเบสมากขึ้น



รูปที่ 3 ประสิทธิภาพในการกำจัด Cu(II) ของตัวดูดซับที่เตรียมโดยวิธีการให้ความร้อน 2 ชั้น

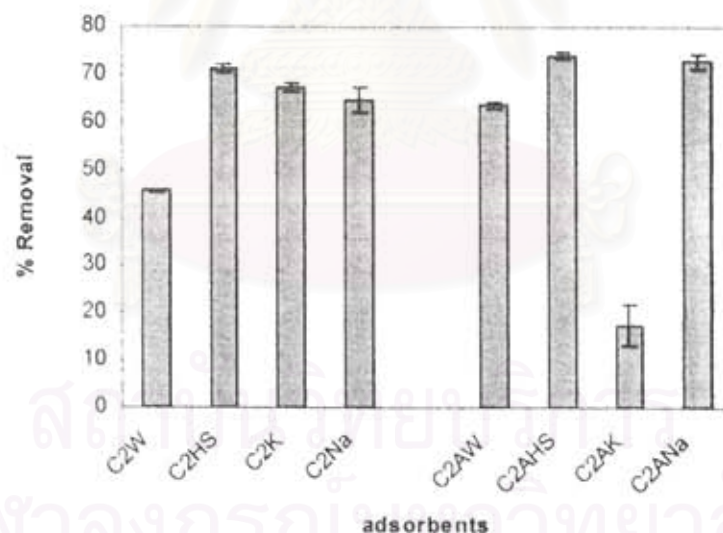
จากกราฟรูปที่ 2.2 แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้น้ำและสารละลายกรด H_2SO_4 , NaCl , KOH ในการแช่ตัวดูดซับที่ผ่านการเผาขั้นแรกมาแล้วและให้ความร้อนขั้นที่สองที่ 110°C ประสิทธิภาพของตัวดูดซับ C2W, C2HS, C2Na, C2K มีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในขั้นที่สองเป็น 600°C พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัด Cu(II) ของตัวดูดซับ C2AW, C2AHS, C2ANa เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการใช้อุณหภูมิ 110°C ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิในการเผาในขั้นที่สองจาก 110°C ไปเป็น 600°C ไม่ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดโลหะ Cu(II) ในขณะที่เมื่อใช้สารละลาย KOH ในการเตรียมตัวดูดซับ อุณหภูมิในการเผาในขั้นที่สองส่งผลต่อประสิทธิภาพของตัวดูดซับอย่างชัดเจน นั่นคือเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเผาเป็น 600°C ประสิทธิภาพของตัวดูดซับ C2AK ในการกำจัด Cu(II) เพิ่มขึ้นเป็น 69% จากเดิมที่มีประสิทธิภาพเพียง 33% (C2K) และเป็นประสิทธิภาพที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีตัวอื่น นั่นคือมีความสามารถในการดูดซับเป็น 0.46 mg/g

เพื่อเป็นการเปรียบเทียบคุณสมบัติของตัวดูดซับให้ชัดเจนมากขึ้น จึงได้นำตัวดูดซับที่เตรียมได้ทั้งหมดไปใช้ศึกษาการดูดซับสารประกอบอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและใหญ่ นั่นคือ ฟีนอล และ เมทิลีนบลู

ก. การดูดซับฟีนอลและเมทิลีนบลูของตัวดูดซับ

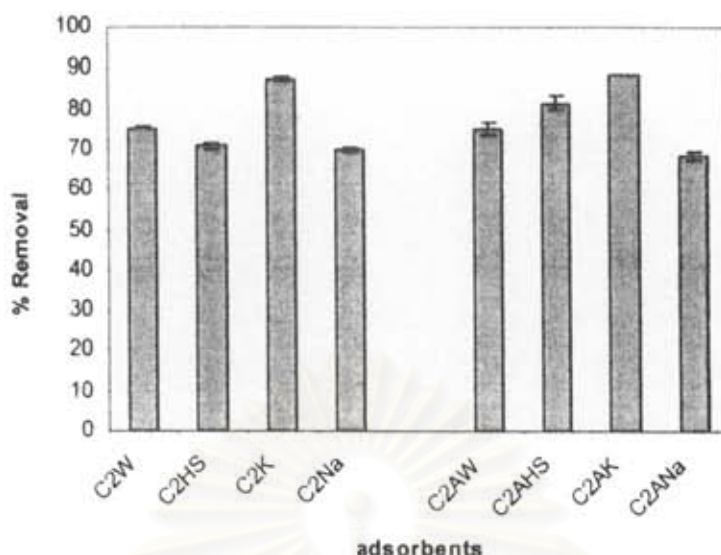
นำตัวดูดซับที่เตรียมได้จากวิธีการให้ความร้อน 2 ชั้น มาศึกษาการดูดซับฟีนอลและเมทิลีนบลู ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ โดยค่า pH ของสารละลายที่สัมผัสกับตัวดูดซับอยู่ในช่วง pH 7.0 -12.0 สำหรับสารละลายฟีนอลและ pH 6.5 – 11.2 สำหรับสารละลายเมทิลีนบลู โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวดูดซับที่เตรียมจาก KOH จะทำให้สารละลายมีความเป็นเบสเพิ่มขึ้นมากที่สุด

จากผลการทดลองพบว่า แนวโน้มของประสิทธิภาพในการดูดซับฟีนอลและเมทิลีนบลูของตัวดูดซับที่เตรียมได้ต่างจากแนวโน้มในการกำจัด Cu(II) นั่นคือ เมื่อใช้สารละลาย H_2SO_4 , KOH และ NaCl ในการเตรียมตัวดูดซับและให้ความร้อนขั้นที่สองที่ $110^{\circ}C$ ประสิทธิภาพในการดูดซับฟีนอลจะสูงขึ้นกว่าการไม่ใช้สารเคมีในการเตรียม แต่เมื่อมีการเผาตัวดูดซับในขั้นที่สองที่อุณหภูมิ $600^{\circ}C$ ก็ยังพบว่าประสิทธิภาพในการดูดซับของตัวดูดซับที่เตรียมจาก H_2SO_4 และ NaCl มีประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยและสูงกว่าตัวดูดซับที่ไม่ใช้สารเคมี ในขณะที่ประสิทธิภาพการดูดซับที่เตรียมโดยใช้สารละลาย KOH ลดอย่างมาก



รูปที่ 2.4 ประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลของตัวดูดซับที่เตรียมโดยการให้ความร้อน 2 ชั้น

ในการศึกษาการดูดซับเมทิลีนบลู พบว่าตัวดูดซับที่เตรียมโดยใช้ KOH จะมีประสิทธิภาพในการดูดซับเมทิลีนบลูสูงกว่าการใช้สารละลายประเภทอื่นในการเตรียม และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเผาจาก $110^{\circ}C$ ไปเป็น $600^{\circ}C$ ประสิทธิภาพในการดูดซับเมทิลีนบลูเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่แนวโน้มยังคงเป็นเหมือนเดิม นั่นคือตัวดูดซับที่เตรียมโดยใช้สารละลาย KOH ยังคงมีประสิทธิภาพที่สูงกว่าตัวดูดซับที่ใช้สารละลายชนิดอื่นและสูงกว่าไม่ใช้สารเคมีในการเตรียม นั่นคือมีความสามารถในการดูดซับเป็น 100.3 mg/g



รูปที่ 2.5 ประสิทธิภาพในการกำจัดเมทิลีนบลูของตัวดูดซับที่เตรียม โดยการใช้ความร้อน 2 ชั้น

จากผลการทดลองพบว่า ตัวดูดซับที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพในการดูดซับสารที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันได้ต่างกัน บ่งบอกถึงสภาพพื้นผิวที่แตกต่างกัน โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวดูดซับที่เตรียมโดยใช้ KOH จะเหมาะสมสำหรับเป็นตัวดูดซับสารที่มีประจุบวกอย่าง Cu(II) และ เมทิลีนบลู ทั้งนี้เนื่องจากมาจาก KOH จะช่วยเปลี่ยนโครงสร้างของถ่านที่ได้ให้มีหมู่คาร์บอกซิลิกเพิ่มขึ้น [8] โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำ Activation ที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงพบว่าตัวดูดซับที่ทำการ Activation หรือให้ความร้อนชั้นที่สองที่ 600°C นั้นจะดูดซับ Cu(II) และ เมทิลีนบลู ได้ดีมาก และจากผลการทดลองการดูดซับ Cu(II) เป็นตัวบ่งชี้ว่าการ Activation ที่อุณหภูมิสูงจำเป็นสำหรับการทำให้เกิดโครงสร้างและคุณสมบัติที่เหมาะสม ซึ่งผลการทดลองก็สอดคล้องกับวิธีการเตรียมตัวดูดซับในงานวิจัยที่มีการใช้ KOH นอกจากนี้การมีหมู่คาร์บอกซิลิกบนโครงสร้างส่งผลให้ความสามารถในการดูดซับฟีนอลลดลง อันเนื่องจากการทดลองนี้ฟีนอล ($\text{pK}_a = 10.0$, [11]) จะอยู่ในสารละลายในรูป Phenolate ซึ่งมีประจุลบ อันเป็นผลมาจากสารละลายที่สัมผัสกับตัวดูดซับที่เตรียมจาก KOH มีความเป็นเบสมาก ($\text{pH} 12$) ซึ่งประจุลบดังกล่าวจะผลัดกับประจุลบของหมู่คาร์บอกซิลิกบนตัวดูดซับ

ในขณะที่ตัวดูดซับที่เตรียมได้จาก H_2SO_4 และ NaCl มีแนวโน้มในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของตัวดูดซับสำหรับการดูดซับสารที่มีขนาดเล็กอย่าง Cu(II) และ ฟีนอล แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่อย่างเมทิลีนบลู ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าคุณสมบัติและลักษณะโครงสร้าง เช่น ขนาดรูพรุนที่เตรียมได้จากการ Activation ด้วยสารละลายดังกล่าวมีขนาดใกล้เคียงกับการทำ Activation โดยไม่ใช้สารเคมี

สรุป

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเตรียมตัวดูดซับจากฟางข้าว โดยศึกษาวิธีการเตรียมสองวิธี คือ วิธีการเตรียมโดยให้ความร้อน 1 ชั้น และวิธีการเตรียมโดยให้ความร้อน 2 ชั้น โดยพบว่าสารเคมีไม่ได้ช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับของตัวดูดซับที่เตรียมโดยให้ความร้อน 1 ชั้น ในขณะที่อุณหภูมิเป็นตัวแปรสำคัญที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับของตัวดูดซับหากใช้วิธีเตรียมด้วยการให้ความร้อน 1 ชั้น ส่วนการใช้สารเคมีมีผลต่อประสิทธิภาพของตัวดูดซับเมื่อมีการให้ความร้อน 2 ชั้น นั่นคือ เตรียมแบบการให้ความร้อนสูง (600°C) ในขั้นแรก (Carbonization) และทำ

การ Activation ร่วมกับการใช้สารเคมีในขั้นที่สอง ซึ่งจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิในการ Activation สูง (600°C) โดยพบว่าสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการ Activation มีผลต่อประสิทธิภาพของตัวดูดซับที่ได้ และคุณสมบัติในการดูดซับของตัวดูดซับที่เตรียมได้โดยใช้ KOH จะแตกต่างจากตัวดูดซับที่เตรียมโดยใช้ H_2SO_4 และ NaCl ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาสมบัติ (Characterization) ตัวดูดซับที่เตรียมได้อย่างละเอียดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Zhang, Y.; Frankenberger, W.T. *The Science of the Total Environment* **2003**, *305*, 207.
2. Xiao, B.; Sun, X.F.; Sun, R.C. *Polymer Degradation and Stability* **2001**, *74*, 307.
3. Sun, R.C.; Tomkinson, J.; Ma, P.L.; Liang, S.F. *Carbohydrate Polymers* **2000**, *42*, 111.
4. Lam, H.Q.; Le Bigot, Y.; Delmas, M.; Avignon, G. *Industrial Crops and Products* **2001**, *14*, 65.
5. Oh, G.H.; Park, C.R. *Fuel* **2002**, *81*, 327.
7. Ahmedna, M.; Marshall, W.E.; Rao, R.M. *Bioresource Technology* **2000**, *71*, 113.
8. Tsai, W.T.; Chang, C.Y.; Wang, S.Y.; Chang, C.F.; Chien, S.F.; Sun, H.F. *Bioresource Technology* **2001**, *78*, 203.
9. Pendyal, B.; Johns, M.M.; Marshall, W.E.; Ahmedna, M.; Rao, R.M. *Bioresource Technology* **1999**, *69*, 45.
10. Johns, M.M.; Marshall, W.E.; Toles, C.A. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **1998**, *71*, 131.
11. Merck Index 11th Edition, Merck & Co., Inc. Rahway NJ, USA 1989.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 การดัดแปรแกลบเพื่อเป็นวัสดุดูดซับสารอินทรีย์ออกจากน้ำ

พรพรรณ อุดมกาญจนันท์ สุชาดา จุณนุวัฒน์กุล วลัยภา เอื้องไมตรีภิรมย์ เฟื่องฟ้า อุ่ณอบ และ อภิชาติ อิ่มยิ้ม*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท ปทุมวัน กทม. 10330

Email: iapichat@chula.ac.th

บทคัดย่อ

นำซี้แกลบมาใช้เป็นตัวดูดซับสีย้อม Methylene Blue และกรดฮิวมิกออกจากน้ำเสียสังเคราะห์ สำหรับการดูดซับสีย้อม Methylene Blue เมื่อใช้ตัวดูดซับปริมาณต่าง ๆ กันจะส่งผลต่อเวลาในการเข้าสู่สมดุลของการดูดซับ สำหรับซี้แกลบ 50 100 150 mg การดูดซับจะเข้าสู่สมดุลที่เวลา 45 45 30 นาที ตามลำดับ ภาวะของ pH ที่เหมาะสมคือที่ pH 7.0 และเกลือโซเดียมจะมีผลเฉพาะต่อการดูดซับสีย้อม การดูดซับสีย้อม Methylene Blue ของแกลบเป็นไปตามไอโซเทอร์มการดูดซับของแลงเมียร์และฟรูนดลิช โดยมีความจุการดูดซับเท่ากับ 17.67 mg/g การดูดซับกรดฮิวมิกในน้ำโดยวิธีแบบแบทช์ พบว่าแกลบที่ปรับปรุงด้วยการทำ HCl treatment และเผาที่อุณหภูมิ 700 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพในการดูดซับกรดฮิวมิกที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับโดยมีตัวแปร ได้แก่ ระยะเวลาในการสัมผัส พีเอชและความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายกรดฮิวมิก พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการลดปริมาณกรดฮิวมิก คือ ใช้ระยะเวลาในการสัมผัสนาน 60 นาที และที่ pH 3.0 สามารถลดปริมาณกรดฮิวมิกได้สูงที่สุดเท่ากับ 3.55 mg/g การดูดซับกรดฮิวมิกของแกลบเป็นไปตามไอโซเทอร์มการดูดซับของแลงเมียร์และฟรูนดลิช โดยมีความจุการดูดซับเท่ากับ 2.72 mg/g ที่ pH 6.0 แสดงให้เห็นว่าแกลบที่เตรียมได้สามารถใช้ในการดูดซับสารอินทรีย์จากน้ำได้

Modification of rice husk for removal of organic pollutants from water

Pornpan Udomkanjananan, Suchada Chuanuwatanakul, Wanlapa Aeungmaitrepirom,

Fuangfa Unob and Apichat Imyim

Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

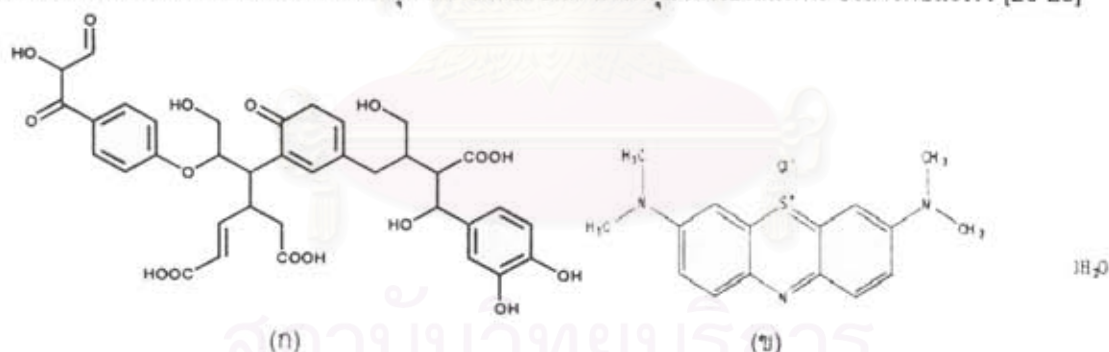
Rice husk ashes were used to remove methylene blue dye and humic acids from synthetic wastewater. For the adsorption study of methylene blue dye, the effect of adsorbent dosage, initial dye concentration, pH, contact time and co-ion were investigated. It was found that the adsorption equilibrium time decreased when reduce the adsorbent dosage. When 50, 100 and 150 mg of rice husk ash were used, the adsorption equilibrium time observed was 45, 45 and 30 min., respectively. The pH suitable for dye adsorption by the adsorbent was pH 7.0. The adsorption of methylene blue by rice husk ash follows Langmuir and Freundlich isotherms with adsorption capacity of 17.67 mg/g. For the adsorption of humic acids by batch method, the rice husk ash prepared from HCl treatment and burnt at 700 °C showed the best adsorption capacity. Optimum conditions for humic acids adsorption were found as follows, 60 min equilibrium time and initial pH 3.0 with adsorption capacity of 3.55 mg.g. Equilibrium data obtained have been found to agree with both Langmuir and Freundlich equations. The maximum adsorption capacity of rice husk ash was 2.7 mg/g, at pH 6.0.

Keywords: Rice Husk Ash, Adsorption, Dye, Humic acids

บทนำ

ผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญที่สุดของจังหวัดน่านคือข้าว การแปรรูปข้าวเปลือกเป็นข้าวสาร ทำให้ได้แกลบจำนวนมาก การใช้แกลบส่วนมากจะใช้เป็นเชื้อเพลิงและมีแถ้าแกลบเกิดขึ้นหลังจากการเผาไหม้ ปัจจุบันมีการใช้แกลบเป็นเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีแถ้าแกลบมากขึ้น องค์ประกอบทางเคมีของแกลบที่มีมากที่สุดคือซิลิกาและคาร์บอน มีรายงานการวิจัยอย่างต่อเนื่องของการใช้แกลบและแถ้าแกลบเป็นวัตถุดิบในการผลิตซิลิกาที่บริสุทธิ์มากขึ้น[1] ใช้ในการสังเคราะห์ซีโอไลท์[2] ถ่านกัมมันต์[3] ถ่านกัมมันต์ประสิทธิภาพสูงสำหรับเซลล์แบตเตอรี่[4] ใช้เป็นสารเติมแต่งในพลาสติก[5] เป็นส่วนผสมในปูนซีเมนต์[6] และใช้เป็นวัสดุดูดซับสารมลพิษจากน้ำเสีย[7-13] สมบัติของแถ้าแกลบสำหรับการใช้งานแต่ละแบบจะแตกต่างกัน ซึ่งสมบัตินี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการเผาแกลบ[4,14] การเผาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 300°C ได้แถ้าแกลบที่ประกอบด้วยซิลิกาผสมกับคาร์บอน[7] ถ้าเผาที่อุณหภูมิสูงกว่านี้จะได้ซิลิกา[1,15] นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงสมบัติของแถ้าแกลบได้โดยการผสมสารอื่นลงไปขณะเผา การผลิตแถ้าแกลบด้วยกรรมวิธีการเผาที่แตกต่างกันทำให้สามารถเพิ่มมูลค่าของแถ้าแกลบได้ เช่น การทำ acid treatment [4, 8, 16], base treatment [11], phosphate treatment [10], tartaric acid modification [17] พบว่าแถ้าแกลบที่ได้จะมีประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะหนักเพิ่มขึ้น

สารฮิวมิก (Humic Substances, HSs) เป็นสารในธรรมชาติที่เกิดจากการย่อยสลายของซากพืชและสัตว์สะสมอยู่ในดิน ดินตะกอนและแหล่งน้ำ เป็นสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และซับซ้อน (Complex Macromolecular Substances) มีมวลโมเลกุลประมาณ 2000 - 400,000 Da มีโครงสร้างที่ไม่แน่นอนดังรูปที่ 3.1 (ก) แบ่งได้เป็น 2 ประเภท [18,19] ตามสมบัติการละลายน้ำคือ กรดฮิวมิก (Humic Acids, HAs) จะตกตะกอนในสารละลายกรด pH 1-2 และ กรดฟุลวิก (Fulvic Acids, FAs) ละลายได้ในทุก pH จากรายงานวิจัยพบว่าการทำน้ำสะอาดหรือน้ำประปาในกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการคลอรีนชัน หากมีสารฮิวมิกปนเปื้อนในน้ำ จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงหลายชนิดเช่น สารกลุ่มไตรเฮโลอะซีติก สารกลุ่มไตรเฮโลมีเทน ซึ่งสารก่อมะเร็ง [20-23]



รูปที่ 3.1 (ก) Supramolecular architecture ของสารฮิวมิก [18] (ข) โครงสร้างของ Methylene Blue

สีย้อมจากอุตสาหกรรมที่ปนเปื้อนในน้ำเสียก่อให้เกิดปัญหาต่างๆตามมามากมาย ไม่เพียงแต่เกิดความไม่สวยงามทางด้านทัศนียภาพเท่านั้น แต่ที่สำคัญสีย้อมยังขัดขวางการส่องของแสงซึ่งมีประโยชน์ต่อพืชในแหล่งน้ำ ทำให้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตในน้ำโดยตรง นอกจากนี้สีย้อมที่ถูกทิ้งลงในแหล่งน้ำที่เป็นสารอินทรีย์ย่อยสลายได้ จะทำให้ค่าออกซิเจนในน้ำลดลง และสีย้อมบางชนิดยังเป็นพิษโดยตรงต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำด้วย Methylene Blue เป็นสีย้อมที่เป็นด่าง (Basic dye) มีโครงสร้างดังรูปที่ 3.1 (ข) พบได้ในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมต่างๆ ทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะโรงงานย้อมผ้า โรงงานหนังสัตว์ การบำบัดน้ำเสียที่มี Methylene Blue นิยมใช้ตัวดูดซับ ประเภท activated carbon ที่เตรียมได้จากวัสดุหลายชนิด เช่น ขี้เถ้าจากต้นไผ่, กะลามะพร้าว, เปลือกถั่วลิสง, แกลบ และฟางข้าว [24] ขี้เถ้าจากต้นชิงชันอินเดีย [25] Sludge ash [26]

แต่จากการใช้แกลบเป็นเชื้อเพลิงมีสมบัติโดดเด่นในการใช้เป็นตัวดูดซับสารมลพิษในน้ำได้ดี ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษารวมวิธีการเตรียมและการใช้แกลบเพื่อเป็นตัวดูดซับสารอินทรีย์ในน้ำเพื่อทำน้ำดื่ม และการกำจัดสีย้อมในน้ำเสีย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมแกลบ

เตรียมแกลบด้วย 2 วิธี คือ เตรียมจากการเผาแบบธรรมดาให้แกลบไหม้ไฟตามธรรมชาติ จนกระทั่งไฟดับมอดเอง เรียกว่า Ash และเตรียมจากการเผาด้วยเตาเผาไฟฟ้า นำตัวอย่างแกลบแช่ด้วยน้ำปราศจากไอออน สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 N เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแกลบที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออนหลายๆ ครั้ง ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แบ่งแกลบแต่ละส่วนออกเป็น 2 ส่วนๆ ละเท่าๆ กัน ส่วนที่ 1 นำไปเผาด้วยเตาเผาที่อุณหภูมิประมาณ 350°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้ด้วยเผาเย็น เรียกแกลบชุดนี้ว่า W-350 A-350 และ B-350 ตามลำดับ ส่วนที่ 2 นำไปเผาด้วยเตาเผาที่อุณหภูมิประมาณ 700°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เรียกแกลบชุดนี้ว่า W-700 A-700 และ B-700 ตามลำดับ ศึกษาสมบัติของตัวดูดซับด้วยเครื่อง Surface Area Analyzer (Thermofinnigan, Sorptomatic 1990)

การศึกษาสมบัติการดูดซับสารอินทรีย์ในน้ำ

นำตัวดูดซับผสมกับสารละลาย Methylene Blue และสารละลายกรดอินทรีย์ที่ pH ต่างๆ เขย่าที่เวลาแตกต่างกัน กรองสารละลายที่ได้และนำไปวัดปริมาณของสีย้อมและกรดอินทรีย์ที่เหลือจากการดูดซับด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry และศึกษาปริมาณตัวดูดซับ ความเข้มข้นของสีย้อมและกรดอินทรีย์ และไอโซเทอมของการดูดซับ

ผลการศึกษาวิจัยและบทวิจารณ์

สมบัติทางกายภาพของตัวดูดซับ

สมบัติทางกายภาพประกอบด้วยพื้นที่ผิว ขนาดรูพรุน และปริมาตรรูพรุน แสดงดังตารางที่ 3.1 พบว่าแกลบที่เตรียมจากการแช่กรดไฮโดรคลอริกและเผาด้วยเตาเผาไฟฟ้า (A-700) มีพื้นที่ผิวมากกว่าแกลบธรรมดา (Ash) ประมาณ 4 เท่าและมีขนาดรูพรุนเล็กกว่า แสดงว่าการเตรียมโดยการแช่กรดและเผาที่อุณหภูมิสูงน่าจะทำให้แกลบมีประสิทธิภาพการดูดซับดีกว่าการเผาแบบธรรมดา

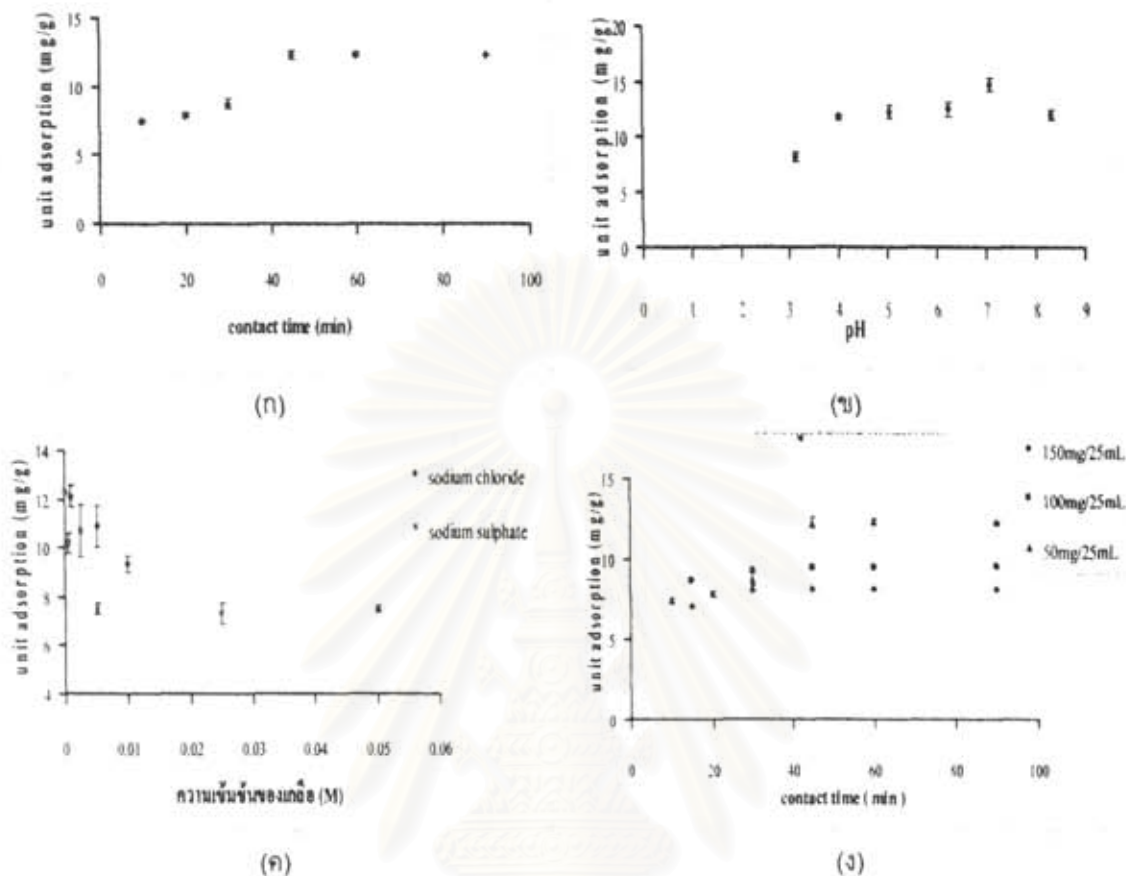
ตารางที่ 3.1 พื้นที่ผิว ขนาดรูพรุน และปริมาตรรูพรุนของตัวดูดซับแกลบ

สมบัติ	ตัวดูดซับ	
	Ash	A-700
Average pore diameter, Å	995	57
Total pore volume, mL/g	0.1222	0.2735
BET surface area, m ² /g	25.17	192.13

การดูดซับสีย้อม

ทำการศึกษาเฉพาะแกลบ Ash ผลของเวลา ค่า pH ผลของเกลือและปริมาณของตัวดูดซับต่อการดูดซับแสดงดังรูปที่ 3.2 เวลาที่ใช้ในการเข้าสู่สมดุลการดูดซับ (Equilibrium time) ของซีแกลบ คือ 45 นาที โดยมี

ความสามารถในการดูดซับได้ 13 mg/g พบว่า pH เริ่มต้นในช่วง 4-8 เหมาะสมในการนำซีเถ้าแกลบไปดูดซับสี
 ย้อม



รูปที่ 3.2 (ก) ผลของเวลา (ข) pH (ค) เกลือ (ง) ปริมาณและเวลาในการสัมผัสต่อการดูดซับสีย้อม

เมื่อใช้ซีเถ้าแกลบ Ash เป็นตัวดูดซับพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการจับสีย้อมจะลดลง และเมื่อใช้ตัวดูดซับปริมาณต่าง ๆ กันจะส่งผลต่อเวลาในการเข้าสู่สมดุลของการดูดซับ สำหรับซีเถ้าแกลบ 50 100 150 mg การดูดซับจะเข้าสู่สมดุลที่เวลา 45 45 30 นาที ตามลำดับ

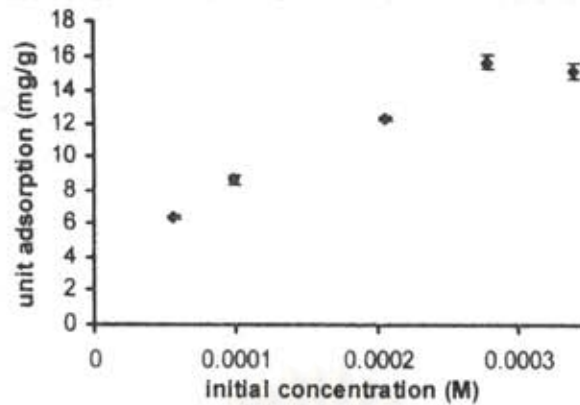
ทำการทดลองเพื่อหา Adsorption Isotherms ของการดูดซับสีย้อมของซีเถ้าแกลบ Ash โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (32 °C) และใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นในช่วง 5.00×10^{-5} , 1.00×10^{-4} , 1.50×10^{-4} , 2.00×10^{-4} , 2.50×10^{-4} M โดยใช้ปริมาณตัวดูดซับ 50 mg ต่อปริมาตรสารละลายสีย้อม 25 mL และระยะเวลาในการสัมผัสเป็น 60 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.3

Isotherm ที่เลือกศึกษา คือ Isotherm ของความสัมพันธ์ของ Langmuir และ Freundlich แสดงดังรูปที่ 3.4 ซึ่งใช้สมการในการคำนวณดังนี้

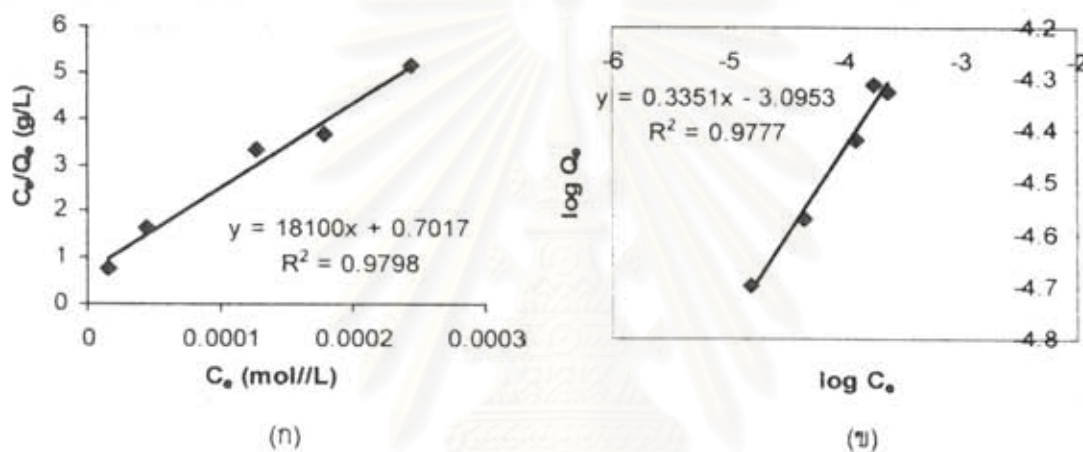
$$\text{Langmuir equation : } C_e/Q_e = C_e/Q_0 + 1/bQ_0 \quad (3.1)$$

$$\text{Freundlich equation: } \log Q_e = \log K_f + 1/n \log C_e \quad (3.2)$$

เมื่อ C_e = ความเข้มข้นที่สมดุล, Q_e = ปริมาณการดูดซับที่สมดุล, Q_0 = adsorption capacity ของตัวดูดซับ, b = ค่าคงที่ของ Langmuir, K_f และ n = ค่าคงที่ของ Freundlich



รูปที่ 3.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นต่อการดูดซับ Methylene Blue ของถ้ำแกลบ Ash



รูปที่ 3.4 กราฟ Isotherm ของการดูดซับ Methylene Blue ของความสัมพันธ์แบบ (ก) Langmuir และ (ข) Freundlich

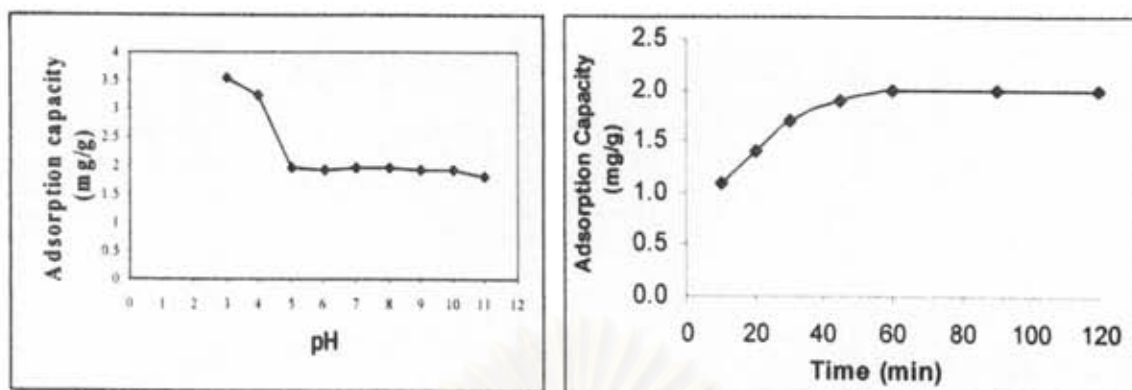
เมื่อใช้ถ้ำแกลบ Ash เป็นตัวดูดซับ และความเข้มข้นเริ่มต้นของสีย้อม ในช่วง 5×10^{-5} ถึง 2.5×10^{-4} M ซึ่งเมื่อนำไปแทนในสมการทั้งสองคือ Freundlich และ Langmuir จะได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9777 และ 0.9798 ตามลำดับ ทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่าการดูดซับ Methylene Blue โดยใช้ถ้ำแกลบเป็นตัวดูดซับว่าเป็น Isotherm แบบใด เนื่องจากค่า R^2 ใกล้เคียงกันมากโดยมีค่า Adsorption capacity เท่ากับ 17.67 mg/g

การดูดซับกรดฮิวมิก

เมื่อใช้กรดฮิวมิกเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 10 mL สารละลายมี pH 6.0 และใช้ตัวดูดซับ 50 mg ได้ปริมาณการดูดซับดังตารางที่ 3.2 พบว่า ถ้ำแกลบ A-700 มีประสิทธิภาพในการดูดซับมากที่สุด การทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ถ้ำแกลบ A-700 ในการศึกษาผลของ pH และเวลาในการสัมผัส ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.5 พบว่าที่ pH ต่ำกว่า 5 การดูดซับเกิดได้ดีขึ้นและการดูดซับเกิดได้มากขึ้นเมื่อ pH ของสารละลายลดลง และการดูดซับกรดฮิวมิกเข้าสู่สมตุลตั้งแต่เวลา 60 นาทีขึ้นไป

ตารางที่ 3.2 ปริมาณกรดฮิวมิกที่ดูดซับด้วยถ้ำแกลบชนิดต่าง ๆ

ถ้ำแกลบ	Ash	W-350	A-350	B-350	W-700	A-700	B-700
ปริมาณการดูดซับ (mg/g)	1.01	1.21	1.23	1.52	1.71	1.97	1.79

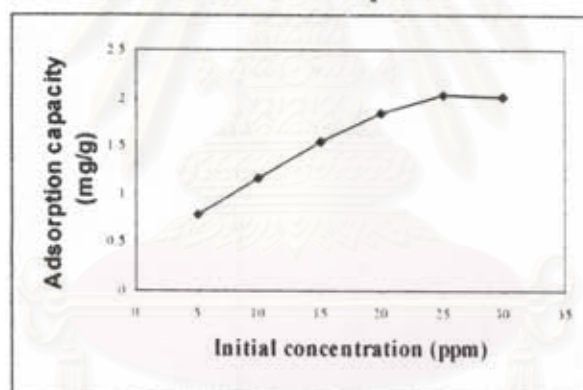


(ก)

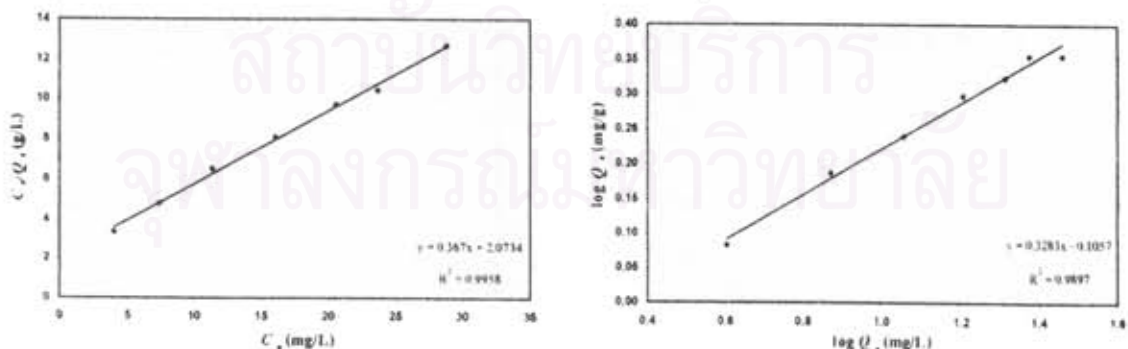
(ข)

รูปที่ 3.5 (ก) ผลของ pH และ (ข) เวลา ต่อการดูดซับด้วยถ้ำแกลบ A-700

ทำการทดลองเพื่อหา Adsorption Isotherms ของการดูดซับกรดฮิวมิก โดยทำการทดลองที่ 25°C และใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นในช่วง 5-30 ppm โดยใช้ปริมาณตัวดูดซับ 50 mg ต่อปริมาตรสารละลายกรดฮิวมิก 10 mL และระยะเวลาในการสัมผัส 60 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.6 เมื่อพลอตกราฟตามสมการการดูดซับของ Langmuir และ Freundlich ตามสมการที่ 3.1 และ 3.2 ได้ผลดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นต่อการดูดซับกรดฮิวมิกของถ้ำแกลบ A-700



(ก)

(ข)

รูปที่ 3.7 กราฟ Isotherm ของการดูดซับกรดฮิวมิกของความสัมพันธ์แบบ (ก) Langmuir และ (ข) Freundlich

จากรูปที่ 3.6 พบว่าเมื่อใช้กรดฮิวมิกเข้มข้นเริ่มต้นตั้งแต่ 25 ppm ขึ้นไป การดูดซับเริ่มคงที่ จากรูปที่ 3.7 พบว่าการดูดซับกรดฮิวมิกสอดคล้องกับสมการของ Langmuir มากกว่า Freundlich (ดูจากค่า R^2 ที่สูงกว่า) โดยมีค่าความจุการดูดซับสูงสุดเท่ากับ 2.72 mg/g

ตารางที่ 3.3 แสดง Langmuir and Freundlich parameters สำหรับการดูดซับสีย้อมและกรดฮิวมิกของตัวดูดซับ Ash และ A-700 ตามลำดับ พบว่า Ash สามารถดูดซับสีย้อมได้ดีกว่า A-700 ที่ใช้ดูดซับกรดฮิวมิก

ตารางที่ 3.3 Langmuir and Freundlich parameters สำหรับการดูดซับสีย้อมและกรดฮิวมิก

สารอินทรีย์	Langmuir isotherm			Freundlich isotherm		
	Q_0 (mg/g)	b (L/mg)	R^2	K_F	$1/n$	R^2
สีย้อม Methylene Blue	17.67	0.081	0.9798	8×10^{-4}	0.3351	0.9777
กรดฮิวมิก	2.72	0.177	0.9958	0.78	0.3283	0.9897

สรุป

การเตรียมถ้ำแกลบด้วยการเผาด้วยเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิสูงทำให้ถ้ำแกลบที่ได้มีพื้นที่ผิวมากกว่าถ้ำแกลบที่เตรียมจากการเผาแบบธรรมดา ถ้ำแกลบมีประสิทธิภาพในการดูดซับสีย้อมและกรดฮิวมิกในน้ำได้ดี โดยภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับ Methylene Blue ด้วยถ้ำแกลบที่ได้จากการเผาแบบธรรมดาดังนี้ เวลาที่ใช้ในการเข้าสู่สมดุลเท่ากับ 45 นาที ที่ pH เริ่มต้นในช่วง 4-8 การดูดซับเป็นทั้งแบบ Langmuir และ Freundlich isotherms โดยพบว่า Adsorption capacity เท่ากับ 17.67 mg/g เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมมากขึ้น ประสิทธิภาพในการดูดซับสีย้อมจะลดน้อยลง เมื่อใช้ตัวดูดซับปริมาณต่างๆ กันดังนี้ 50, 100, 150 mg จะเข้าสู่สมดุลการดูดซับที่เวลา 45, 45, 30 นาที ตามลำดับ ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับกรดฮิวมิกด้วยถ้ำแกลบที่แช่กรดและเผาด้วยเตาไฟฟ้าเป็นดังนี้ เวลาที่ใช้ในการเข้าสู่สมดุลเท่ากับ 60 นาที ที่ pH เริ่มต้นน้อยกว่า 5 การดูดซับเป็นทั้งแบบ Langmuir และ Freundlich isotherms โดยพบว่า Adsorption capacity เท่ากับ 2.72 mg/g

เอกสารอ้างอิง

- Della, V.P.; Kuhn, I.; Hotza, D. *Materials Letters* **2002**, *57*, 818.
- Wang, H.P.; Lin, K.S.; Huang, Y.J.; Li, M.C.; Tsaur, L.K. *Journal of Hazardous Materials* **1998**, *58*, 147.
- Daifullah, A.A.H.; Girgis, B.S.; Gad, H.M.H. *Materials Letters* **2003**, *57*, 1723.
- Fey, G.T.K.; Chen, C.L. *Journal of Power Sources* **2001**, *97-8*, 47.
- Park, B.D.; Wi, S.G.; Lee, K.H. et al. *Biomass & Bioenergy* **2003**, *25*, 319.
- Yu, Q.J.; Sawayama, K.; Sugita, S.; Shoya, M.; Isojima, Y. *Cement and Concrete Research* **1999**, *29*, 37.
- Bakircioglu, Y.; Bakircioglu, D.; Akman, S. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* **2003**, *21*, 467.
- El-Shafet, E.I.; Canepa, P. *Journal de Physique IV* **2003**, *107*, 415.
- Mbui, D.N.; Shiundu, P.M.; Ndonye, R.M.; Kamau, G.N. *Journal of Environmental Monitoring* **2002**, *4*, 978.
- Ajmal, M.; Rao, R.A.K.; Anwar, S. et al. *Bioresource Technology* **2003**, *86*, 147.
- Guo, Y.P.; Qi, J.R.; Yang, S.F., et al. *Materials Chemistry and Physics* **2003**, *78*, 132.
- Khalid, N.; Rahman, A.; Ahmad, S.; Kiani, S.N.; Ahmed, J. *Radiochimica Acta* **1998**, *83*, 157.
- Khalid, N.; Ahmad, S.; Kiani, S.N.; Ahmed, J. *Separation Science and Technology* **1998**, *33*, 2349.
- Sharma, A.; Rao, T.R. *Bioresource Technology* **1999**, *67*, 53.
- Della, V.P.; Kuhn, I.; Hotza, D. *Advanced Powder Technology III Materials Science Forum* **2003**, *416-4*, 531.
- Hou, G.H. *Journal of Inorganic Materials* **2003**, *18*, 407.
- Wong, K.K.; Lee, C.K.; Low, K.S.; Haron, M.J. *Chemosphere* **2003**, *50*, 23.
- Steelink, C. *Analytical Chemistry. A-Pages*, **2002**, *74*, 326A-333A.
- Janos, P. *Journal of Chromatography A*, **2003**, *983*, 1-18.

20. Urbansky, E.T.; Magnuson, M. L. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 260A-267A.
21. Richardson, S.D. *Trend in Analytical Chemistry* **2003**, 22, 666-684.
22. Richardson, S.D.; Simmons, J.E.; Rice, G. *Environmental Science & Technology* **2002**, 39, 198A-201A.
23. Richardson, S.D. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 2831-2857.
24. Kannan N.; Sundaram M.M. , *Dye and Pigments* **2001**, 51 , 25-40.
25. Garg V.K.; Amita M.; Kumar R.; Gupta R. *Dye and Pigments* **2004**, 63, 243-250.
26. Weng C.H.; Pan Y.F. *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects* **2006**, 274, 154-162.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-สกุล

(ภาษาไทย) นางพรพรรณ อุดมกาญจนนันท์

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Pornpan Udomkanjananan

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลข โทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 0-2218-7614 โทรสาร 02-254-1309 E-mail : pompan.u@chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	เคมี	2520
Oregon State University, USA.	M.Sc.	Analytical Chemistry	2523

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เคมีวิเคราะห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ชื่อ-สกุล

(ภาษาไทย) นางสุชาดา ชูอนุวัฒน์กุล
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Suchada Chuanuwatanakul

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 0-2218-7614 โทรสาร 02-254-1309 E-mail : suchada.c@chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	เคมี	2521
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.	เคมีวิเคราะห์	2524
Okayama University, Okayama, Japan	Ph.D.	Analytical Chemistry	2551

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เคมีวิเคราะห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ชื่อ-สกุล

(ภาษาไทย) นางสาววัลภา เอื่องไมตรีภิรมย์
(ภาษาอังกฤษ) Miss Wanlapa Aeungmaitrepirom

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กทม. 10330
โทรศัพท์ 0-2218-7607 โทรสาร 02-254-1309 E-mail : wanlapa.a@chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	เคมี	2534
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.	เคมี	2537
Louis Pasteur University, Strasbourg, France	DEA	Chemistry	2539
Louis Pasteur University, Strasbourg, France	Docteur de Science	Analytical Chemistry	2542

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เคมีวิเคราะห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ชื่อ-สกุล

(ภาษาไทย) นางสาวเฟื่องฟ้า อุ๋นอบ
(ภาษาอังกฤษ) Miss Fuangfa Unob

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 0-2218-7609 โทรสาร 02-254-1309 E-mail : Fuangfa.U@chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ. (เกียรตินิยม)	เคมี	2538
Louis Pasteur University, Strasbourg, France	DEA	Chemistry	2540
Louis Pasteur University, Strasbourg, France	Docteur de Science	Chemistry	2543

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เคมีวิเคราะห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ชื่อ-สกุล

(ภาษาไทย) นายอภิชาติ อิ่มยิ้ม
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Apichat Imyim

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 0-2218-7607 โทรสาร 02 254 1309 E-mail : iapichat@chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ. (เกียรตินิยม)	เคมี	2538
INSA Lyon, France	DEA	Waste Science Technology	2540
INSA Lyon, France	Docteur es Science	Chemistry	2543

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เคมีวิเคราะห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย