รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2555

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 : พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 : พัฒนาเทคนิคระบบการตรวจวิเคราะห์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พืช

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์น้ำตาลในพืช

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Method Validation on Analysis of sugar in plant

4. คณะผู้ดำเนินงาน

ชื่อหัวหน้าโครงการ นางจิติมา ยถาภูธานนท์ สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

หัวหน้าการทดลอง นางสาธิดา โพธิ์น้อย สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน นางสาวสุพิศสา ทองเขียว กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

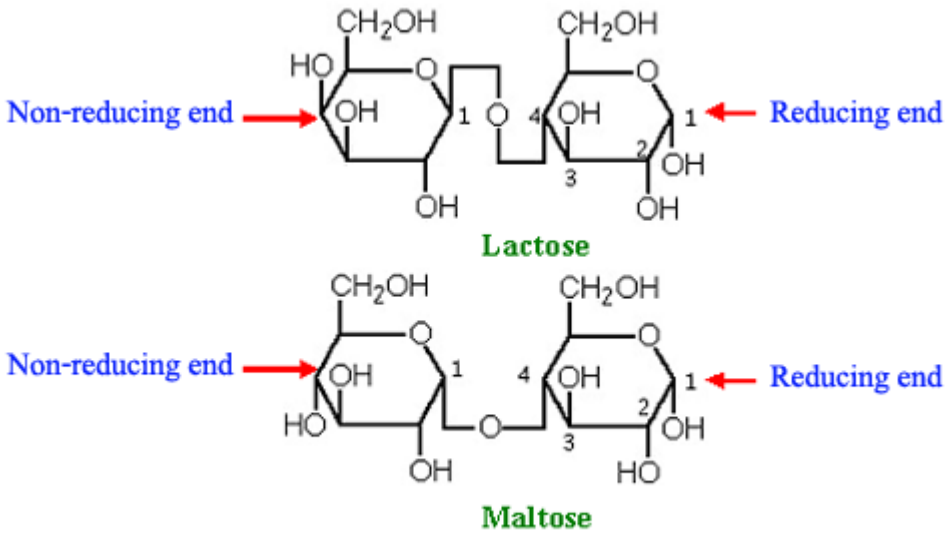
5. บทคัดย่อ

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจสอบคือ น้ำตาลรีดิวซ์ ทำการตรวจสอบในผักพื้นบ้าน (มะเขือเทศรูปฟักทอง) ด้วยวิธี Somogyi-Nelson และนำมาวัดด้วยเครื่อง UV/spectrophotometer ที่ 500 นาโนเมตร และวิธี aldital acetate วัดด้วยเครื่อง gas chromatograph พบว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผักพื้นบ้าน (มะเขือเทศรูปฟักทอง) ด้วยวิธี Somogyi-Nelson ด้วยเครื่อง UV/spectrophotometerที่ 500 นาโนเมตร มีค่า LOD เท่ากับ 1.26, LOQ เท่ากับ 4.21 mg/l โดยมีช่วงของการวิเคราะห์อยู่ที่ 15-150 mg/l ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) มีค่า เท่ากับ 0.99867 ความถูกต้อง (Accuracy) ของการวิเคราะห์พิสูจน์จาก % recovery ที่ความเข้มข้น 30 60 และ 150 mg/l มีค่าเท่ากับ 100.30 99.69 และ 100.49 ตามลำดับ มีค่าความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์ซ้ำคิดจาก %RSD ที่ความเข้มข้นเดียวกัน เท่ากับ 1.61 1.49 และ 1.44 ตามลำดับ เมื่อนำไปคิดค่าการยอมรับด้วย Horwitz's

Ratio จากการใช้เครื่องมือ บุคคล และเวลาเดียวกันได้ค่า HORRAT เท่ากับ 2.0 1.88 และ 1.82 ตามลำดับ จากผลการทดสอบทุกค่าเป็นค่าที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสากลยอมรับ แต่การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี aldital acetate วัดด้วยเครื่อง gas chromatograph ยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากต้องใช้สารเคมีใช้สารเคมีจำนวนมากและที่มีราคาแพง นอกจากนี้ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยังไม่เหมาะสมทำให้ตัวอย่างที่ได้ไม่มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะแยกชนิดของน้ำตาลได้ ดังนั้นวิธีการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี aldital acetate ด้วยเครื่อง gas chromatograph จึงต้องมีการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีให้ได้ความบริสุทธิ์ของน้ำตาลก่อนที่จะนำมาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ต่อไป

6. คำนำ

น้ำตาลรีดิวส์ (reducting sugar) คือ น้ำตาลที่มีกลุ่มอัลดีไฮด์ (aldehyde) หรือคีโตน (ketone) ที่เป็นอิสระ ถูกออกซิไดส์ ได้ง่ายด้วยตัวออกซิไดส์ (oxidizing agent) อย่างอ่อน ตัวอย่างของน้ำตาลพวกนี้ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ทุกชนิดเช่น น้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลกาแลคโตส (galactose) น้ำตาลฟรุกโตส (fructose) (พิมพ์เพ็ญ, 2554) ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวซ์ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวซ์

การทดสอบว่าน้ำตาลชนิดใดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หรือไม่ สามารถทดสอบได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายเบเนดิกส์ (Benedict,s reagent) หรือสารละลายเฟฮ์ลิง (Fehling,s reagent) โดยหมู่แอลดีไฮด์หรือคีโทหรือเฮมิอะซีทาลโอเอชของน้ำตาลจะไปรีดิวซ์โลหะคือ Cu^{2+} ที่เป็นส่วนประกอบในสารละลายเบเน

ดิกส์หรือสารละลายเฟฮ์ลิงให้เป็น Cu^+ เกิดตะกอนสีแดง น้ำตาลที่มีสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ได้แก่ มอโนแซ็กคาไรด์ทุกชนิด ไดแซ็กคาไรด์พวกมอลโทสและแลกโทส (นิรนาม, 2554)

มะเขือเทศ (รูปฟักทอง) เป็นผักพื้นบ้านที่มีลักษณะเหมือนมะเขือเทศโดยทั่วไปคือ เป็นพืชชนิดหนึ่งที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหาร มะเขือเทศขนาดปานกลางจะมีปริมาณวิตามินซีครึ่งหนึ่งของส้มโอทั้งผล มะเขือเทศผลหนึ่งจะมีวิตามินเอราว 1 ใน 3 ของวิตามินเอที่ร่างกายต้องการในหนึ่งวัน นอกจากนี้มะเขือเทศยังมีโปแตสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียมและแร่ธาตุอื่นๆ อีกหลายชนิด มะเขือเทศนับเป็นพืชผักที่มีความสำคัญมากในเขตต่าง ๆ ของโลกหลายประเทศ ผลใช้บริโภค
สด ปรุงอาหารคาวหวาน และใช้ทำซุป (soup), เชื่อม, ดอก, แคทซับ (catsup) ซ๊อสมะเขือเทศ, น้ำมะเขือเทศ (juice) และมะเขือเทศผง ซึ่งต้องใช้มะเขือเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี (นิรนาม, 2555) ในมะเขือเทศมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 2.8 เปอร์เซ็นต์น้ำตาลต่อส่วนที่บริโภคได้

เนื่องจากกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์ฯ ให้บริการทางด้านการวิเคราะห์ธาตุอาหารและคุณค่าทางโภชนาการของพืช รวมถึงการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งมีวิธีมาตรฐานหลายวิธีแต่การวิเคราะห์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1994) เป็นวิธีที่ใช้สารปริมาณน้อยและไม่ยุ่งยากในการเตรียม ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ ตามมาตรฐานสากลยอมรับ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1994) โดยนำมาเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี aldital acetate ด้วยเครื่อง gas chromatography ที่สามารถแยกชนิดของน้ำตาลได้

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

เครื่อง UV/vis spectrophotometer รุ่น Cary 3E, เครื่อง gas chromatography รุ่น 6890N ที่มีตัวตรวจจับชนิด flam ionization detector (FID), เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง รุ่น TA 201, เครื่องเขย่าผสมสารเคมี(Vortex mixer) เตาให้ความร้อน, หลอดทดลองขนาด 2, 5, 10 และ 15 มิลลิลิตร, ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร, ขวดแก้วสีชา ขนาด 2.5 ลิตร, บีกเกอร์ ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร, ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 1 มิลลิลิตร

สารเคมี (สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson)

1. สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)

เตรียมโดย ละลาย Sodium potassium tartate 12 กรัม Na_2CO_3 anhydrous 24 กรัม NaHCO3 16 กรัม และ $NaSO_4$ anhydrous 144 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และเติมสารละลายที่มี $CuSO_4.5H_2O$ 4 กรัม และ Na_2CO_4 36 กรัม ผสมให้เข้ากันปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน กรอง (หากมีตะกอน) เก็บใส่ขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายเนลสัน (Nelson reagent)

เตรียมโดย ละลาย $(NH_4)MoO_4.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรด H_2SO_4 42 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติม $Na_2HaS_2SO_4$.$7H_2O$ 3 กรัม ที่ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กรอง (หากมีตะกอน) เก็บใส่ขวดสีชา

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 เตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส เข้มข้น 0 15 30 60 90 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่น ใส่สารละลายมาตรฐานลงในหลอดทดลองหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันที เติมสารละลายเนลสัน 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสง

3.2 วิเคราะห์ตัวอย่างโดยเจือจางให้อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีข้อ 3.1

สารเคมี (สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี aldital acetate)

myo-Inositol สำหรับเป็น Internal standard (20 mg/มล. ในน้ำ deionized หรือน้ำกลั่น), 72% (w/w) H_2SO_4 , 25% NH_4OH, $NaBH_4$(solid), dimethylsulfoxide(DMSO), Acetic acid anhydride,1-methylimidazole, Dichloromethane, Anhydro-sodium sulfate (Na_2SO_4), 18M acetic acid

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช (มะเขือเทศ รูปฟักทอง)

1.1 นำตัวอย่าง มะเขือเทศที่ทำความสะอาดแล้วมาอบที่ อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียดเก็บใส่ขวด เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

1.2 ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม เอทานอล 80 % 20 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสด้วย อลูมิเนียมฟอยล์ อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.3 กรองใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เก็บเพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช แบ่งเป็น 2 วิธี คือ วิธี Somogyi-Nelson และ วิธี aldital acetate ทั้งสองวิธีใช้สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ที่ 98% (โดยน้ำหนัก)

2.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ด้วยวิธี Somogyi-Nelson พารามิเตอร์ที่ตรวจสอบมีดังนี้

2.1.1 การตรวจสอบช่วง (rang) ของวิธี

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 15-150 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาล พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงที่ให้ค่า Correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995

2.1.2 การตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ของวิธี

เลือกความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงจากค่า range มา 6 ความเข้มข้น เตรียมสารมาตรฐานน้ำตาล 6 ความเข้มข้นๆละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer ด้วยความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล พิจารณาค่า correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995

2.1.3 การตรวจสอบขีดจำกัดของการทดสอบ LOD และ LOQ

เลือกช่วงของความเข้มข้นต่ำสุด คือ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer ด้วยความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) LOD คือ 3SD และ LOQ คือ 10SD

2.1.4 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) และ ความเที่ยง (Precision) ของวิธี

เลือกความเข้มข้นจากค่า range มา 3 ค่า ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง การทดลองนี้เลือกที่ความเข้มข้น 30 60 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้เพื่อหาค่า Accuracy จากสูตร

% recovery = (x2-x1)/c x 100

โดย x2 = ค่าที่วิเคราะห์ได้

x1 = ค่าจริง

C = ความเข้มข้นที่เติม

คำนวณ precision จาก ค่า mean, SD และ %RSD ของแต่ละชุดความเข้มข้น จากสูตร

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\%\text{RSD Experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log c)}$$

C = ความเข้มข้นที่วิเคราะห์

2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ด้วยวิธี aldital acetate

2.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.2.1.1 เตรียมสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ชั่งสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ประมาณ 50 มิลลิกรัม และชั่ง myo-inosital ประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ในขวดขนาด 4 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษสำหรับชั่งสาร

2.2.1.2 Dimethylsulfoxide (DMSO)

เท molecular sieve ลงในขวดปริมาตร 250 มล. สูงประมาณ 2-3 ซม. ค่อยๆเท dimethylsulfoxise ลงไปประมาณ 200 มิลลิลิตร ปิดฝาตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน(ห้ามเขย่าหรือเคลื่อนย้าย)

2.2.1.3 72% w/w H_2SO_4

ตวงน้ำ deionized ปริมาตร 300 มล.เทใส่ในบิกเกอร์ขนาด 2000 มล. แล้วตวงกรดซัลฟูริกเข้มข้น 98 %ปริมาตร 665 มล. (ใช้กระบอกตวงคนละตัวกับการตวงน้ำ)ค่อยๆเทกรดลงในบิกเกอร์ที่ใส่น้ำ 300มล. (บิกเกอร์ ต้องวางอยู่ในอ่างน้ำแข็งป้องกันไม่ให้เกิดความร้อนหรือการระเบิดในระหว่างที่เทกรดลงไป) เทครั้งละประมาณ 100 มิลลิลิตร และในระหว่างเทต้องคนอยู่ตลอด หาค่า specific gravity (ค่าที่ปรับคือจะต้องได้ 1.6385 ที่ 15 ^{o}C หรือ 1.6338 ที่ 20 ^{o}C หากสูงเกินไปแสดงว่ามี H_2SO_4 มากเกินไป ต้องเติมน้ำ จนได้ค่า specific gravity ที่กำหนดไว้)

2.2.1.4 $NaBH_4$

ชั่ง $NaBH_4$ ประมาณ 2 กรัม เติม Dimethylsulfoxide 100 มิลลิลิตร นำเข้าตู้อบ 105°C 10 นาที เอาออก ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ดูว่าละลายหมดค่อยนำออกจากตู้อบ)

2.2.2 วิธีการวิเคราะห์ (Hydrolysis of cell wall)

2.2.2.1 ชั่งสารมาตรฐาน monosaccharides ทั้งหมดประมาณ 1.0-2.0 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 ม จำนวน 3 ซ้ำ (น้ำหนักต่างกันเล็กน้อย)

2.2.2.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 20-30 มก.(S1) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มล.จำนวน 3 ซ้ำ

2.2.2.3 นำสารมาตรฐานและตัวอย่างไปเติม 0.25 มล.72% H_2SO_4 (จากข้อ 2.2.1.3) ผสมกันด้วยเครื่อง vortex mixer เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 45 นาที

2.2.2.4 เติมน้ำ 6.93 มล. เพื่อเจือจาง 72% H_2SO_4 ให้เหลือประมาณ 4 % นำไปย่อยด้วย หม้อต้มความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2.2.5 ทำให้เย็นด้วยน้ำแข็งแล้วเติม myo-inosital 0.05 มล. (ที่ชั่งมา 200 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ) นำสารข้างต้นมาปรับ pH โดยปิเปตสารตัวอย่างมา 500 μL ใส่ในขวด ขนาด 4 มิลลิลิตร เติม 28-30% NH_4OH ประมาณ 40 μL แล้วทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส ปรับจนได้ pH 4-6 ด้วยการเติม ตัวอย่างหรือ NH_4OH ทีละน้อย (Reduction of monosaccharide)

2.2.2.6 นำหลอดทดลองจากขั้นตอนที่ 1 มาเติม Sodiumborohydride ($NaBH_4$)(จากข้อ 23) 1 มล. แล้วนำไป reduce ใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิ 40°C และเขย่า นาน 90

นาที หรือจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน (ในการปฏิบัติใช้วิธีแรก) จากนั้นเติม 18 M acetic acid 0.1 มล. เพื่อไล่ $NaBH_4$

2.2.2.7 เติม 1- methylimidazole 0.2 มล. และ acetic anhydride 2 มล. ผสมด้วย vortex mixer ปล่อยให้เย็นประมาณ 10-20 นาที จนถึงอุณหภูมิห้อง เติมน้ำ 5 มล.เพื่อไล่ acetic anhydride ปล่อยให้เย็นประมาณ 10-20 นาทีจนถึงอุณหภูมิห้อง

2.2.2.8 เติม dichloromethane ตั้งทิ้งไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ (ค้างคืน ห้ามเคลื่อนย้าย) ปิเปต dichloromethane ที่อยู่ชั้นล่างมาประมาณ 2-3 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาด 4 มิลลิลิตร ที่บรรจุ Na_2SO_4 ประมาณ 0.3 มิลลิเมตร จากก้นขวด ปิดฝาเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (ดูว่า Na_2SO_4 ดูดน้ำออกหมดหรือไม่ จากลักษณะตะกอนของ Na_2SO_4 เมื่อแน่ใจว่าไม่มีน้ำเหลืออยู่แล้ว ให้ดูดสารละลายใสใส่ในขวดปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรโดยการพ่นแก๊สไนโตรเจนให้เหลือประมาณ 100 μL

2.2.2.9 เก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิน้อยกว่า 5 ^{o}C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์โดย GC

2.2.3 การเตรียมเครื่องมือก่อนการวิเคราะห์

การ set condition ของเครื่อง GC ดังนี้

Detector : Flame ionized detector

Carrier gas : Helium

Column : TB 17 (Rtx-17) capillary column (30 m x 0.25 mm (id))

Column oven temp : 150 ^{o}C -210°C

Injector temp :230 ^{o}C

Detector temp : 230 ^{o}C

Injection volume : 1 μL

Runtime : 24 นาที

2.2.4 การตรวจสอบช่วง (rang) ของวิธี

จากสารมาตรฐานกลูโคส ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 นำมาปรับให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml เพื่อเตรียม std curve ให้อยู่ในช่วง 0 ถึง 1.0 mg/ml ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ นำมาวิเคราะห์ตามวิธีการข้อ 2.2.2

2.2.5 การตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ของวิธี

นำสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 นำมาปรับให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml เตรียม std curve และ เตรียม ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 mg/ml ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงจาก ค่า correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995

2.2.6 การตรวจสอบขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และ ขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ได้ (LOQ)

-เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2555

สถานที่ กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจสอบคือ น้ำตาลรีดิวซ์ ทำการตรวจสอบในผักพื้นบ้าน (มะเขือเทศรูปฟักทอง) ด้วยวิธี Somogyi-Nelson และนำมาวัดด้วยเครื่อง UV/spectrophotometer ที่ 520 นาโนเมตร (ภาพที่ 1)

เมื่อพิจารณาการตรวจสอบช่วงของการวัด (range) ของวิธี พบว่า การวิเคราะห์มีช่วงของความเป็นเส้นตรงคลอบคลุมความเข้มข้นที่ 15-150 mg/l (ภาพที่ 2) และเมื่อตรวจสอบค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงของความเข้มข้น 30- 120 mg/l พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) มีค่า เท่ากับ 0.9987 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ที่ค่า r ต้องมีค่ามากกว่า 0.995

เมื่อทำการตรวจสอบขีดจำกัดต่ำสุดที่เครื่องสามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานผลของวิธีการวิเคราะห์ (LOQ) จากการใช้ความเข้มข้นที่ 15 mg/l ทดสอบและนำมาหา SD จากนั้นนำมาประเมิน LOD จาก 3SD และประเมิน LOQ ที่ 10SD พบว่ามีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 1.26 และ 4.21 mg/l ตามลำดับ

การตรวจสอบความแม่น (accuracy) ของการวิเคราะห์พิสูจน์จาก % recovery ที่ความเข้มข้น 30 60 และ 150 mg/l ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่า% recovery เท่ากับ 100.30, 99.69 และ 100.49 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง 98- 102 % (ตารางที่ 1)

นอกจากนี้ต้องมีการทดสอบความเที่ยง (precision) ซึ่งเป็นการทดสอบเพื่อหาความเที่ยงของการวิเคราะห์ซ้ำทั้งจากเครื่องมือ วิธีการและผู้ทดสอบ โดยคำนวณจาก %RSD ที่ 3 ระดับความเข้มข้น เช่นเดียวกับการตรวจสอบความแม่น (accuracy) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มี%RSD เท่ากับ 1.61, 1.49 และ 1.44 ตามลำดับเมื่อนำไปคิดค่าการยอมรับด้วย Horwitz's Ratio จากการใช้เครื่องมือ บุคคล และเวลาเดียวกันได้ค่า HORRAT เท่ากับ 2.00, 1.88 และ 1.82 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องได้ค่า HORRAT น้อยกว่าหรือ เท่ากับ 2

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจสอบคือ น้ำตาลรีดิวซ์ ทำการตรวจสอบในผักพื้นบ้าน (มะเขือเทศรูปฟักทอง) ด้วยวิธี aldital acetate โดยใช้เครื่อง

GC chromatograph ยังไม่สามารถทำได้เนื่องจากเมื่อดำเนินการตรวจสอบและวัดค่าโดยใช้สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส พบว่า โครมาโทแกรมที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เพราะมีโครมาโทรแกรมอื่นนอกเหนือจากน้ำตาลกลูโคส และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส พื้นที่ใต้พีคของทุกพีค เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 3) ทำให้ไม่สามารถรู้ได้ว่า พีคใดเป็นชนิดของน้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี aldital acetate ต้องใช้สารเคมีหลายชนิด และมีสารเคมีที่นำเข้าได้ยากคือ dimethylsulfoxide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นเพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีและลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างจึงใช้สารทำ derivatives (MBTFA) เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นน้ำตาล free sugars ในรูปของ aldital acetate ให้สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี GC ได้ แต่เนื่องจากสารตัวนี้มีราคาแพงและมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการนำมาต้องใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี aldital acetate จึงต้องมีการพัฒนาวิธีเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมให้สามารถแยกชนิดของน้ำตาล ก่อนที่จะนำมาทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ด้วยวิธี Somogyi-Nelson และนำมาวัดด้วยเครื่อง UV/spectrophotometer ที่ 520 นาโนเมตร โดยทำการตรวจสอบช่วงของการวัด (range) ตรวจสอบค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) การทดสอบความเที่ยง (precision) และการตรวจสอบความแม่น (accuracy) จากการใช้เครื่องมือ บุคคล และเวลาเดียวกัน จากผลการทดสอบทุกค่าเป็นค่าที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสากลยอมรับ แต่การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี aldital acetate วัดด้วยเครื่อง gas chromatograph ต้องมีการพัฒนาวิธีเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมให้สามารถแยกชนิดของน้ำตาลก่อนที่จะนำมาทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในพืช ด้วยวิธี Somogyi-Nelson และนำมาวัดด้วยเครื่อง UV/spectrophotometer ที่ 520 นาโนเมตร สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ เป็นฐานข้อมูลให้กับนักวิจัย นักศึกษา และผู้ที่สนใจต่อไป

11. คำขอบคุณ(ถ้ามี)

-

12. เอกสารอ้างอิง

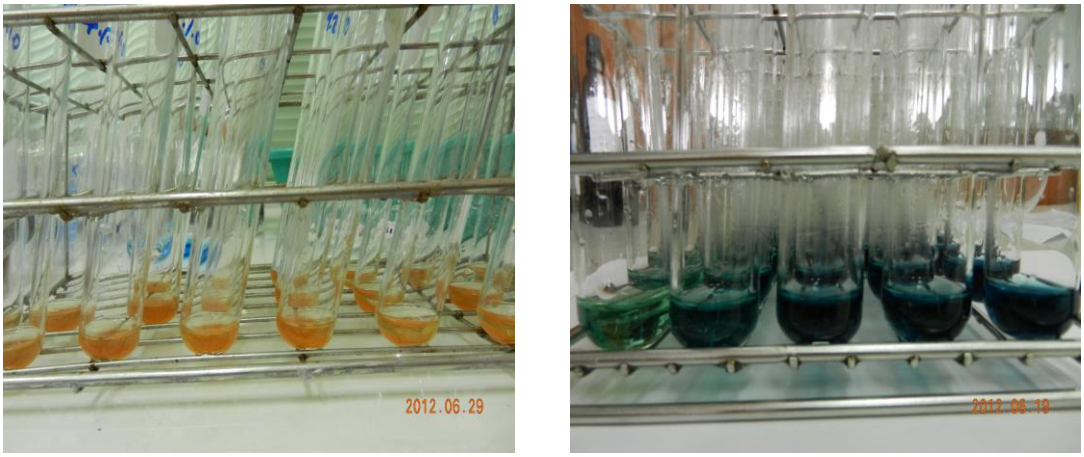
นิรนาม. 2554. http://science.srru.ac.th/org/sci-elearning/courseonline/4022503/chapter3-disac.htm. 21 พฤษภาคม 2554.

นิรนาม. 2555. **ความสำคัญของมะเขือเทศ**. coursewares.mju.ac.th:81/e-learning47/section2/.../chapter02.pdf. 21 พฤษภาคม 2554.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2554. **น้ำตาลรีดิวซ์.** http://www.foodnetworksolution.com. 21 พฤษภาคม 2554.

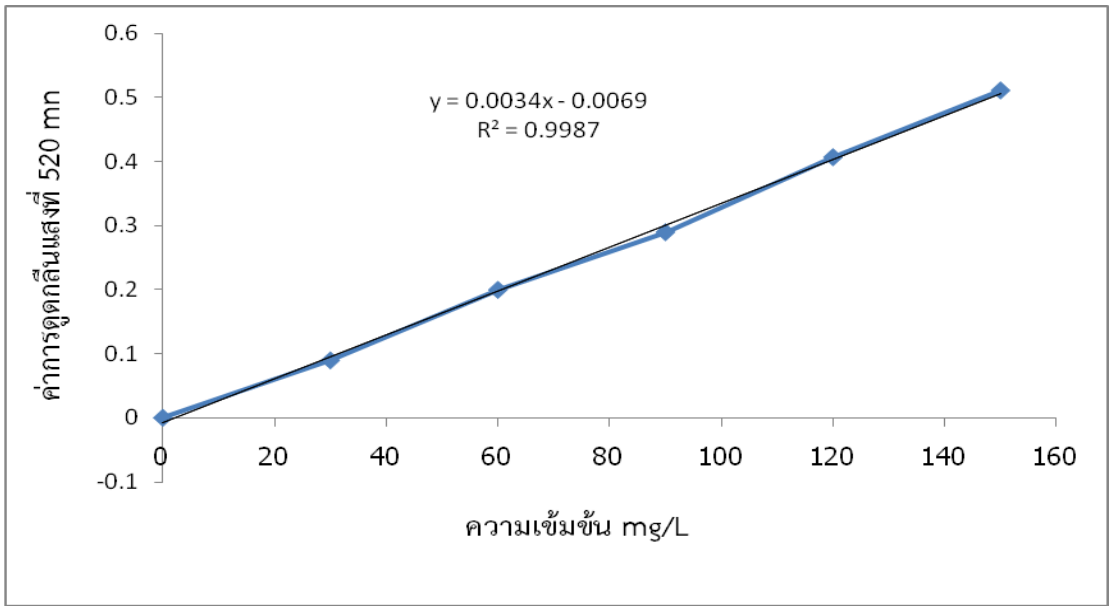
Laurence D. Melton and Bronwen G. Smith. 2001. Determination of Neutral Sugars by Gas Chromatography of their Alditol Acetates. Food Analytical chemistry. E3.2.1-E3.2.13

13. ภาคผนวก



(ก) (ข)

ภาพที่ 1 ลักษณะของตัวอย่างจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (ก) ลักษณะตัวอย่างหลังเติมสารละลายคอปเปอร์ และนำไปต้ม 10 นาที (ข) ลักษณะตัวอย่างที่เติมสารละลายเนลสันก่อนนำไปวัดที่ 520 nm



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ 0-150 mg/l กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ของวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วย วิธี Somogyi-Nelson จาก % recovery

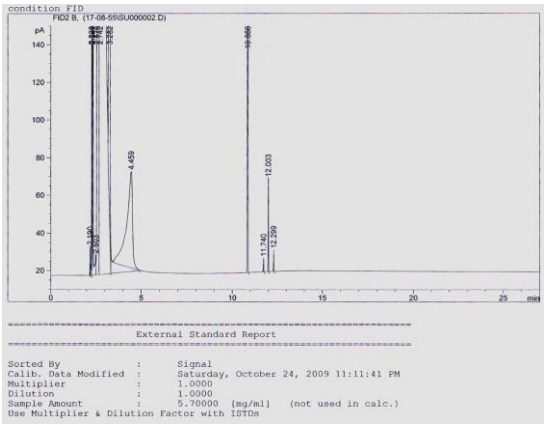
ครั้งที่	ความเข้มข้น (mg/L)		
	30	60	150
1	102.9	101.33	102.33
2	98.67	98.71	100.67
3	100.67	98.09	101.00
4	100.19	101.9	99.40
5	99.33	99.52	102.00
6	101.76	100	99.67
7	98.57	98.29	98.33
mean	100.3	99.69	100.49
sd	1.82	1.48	1.44
%rsd	1.61	1.49	1.43

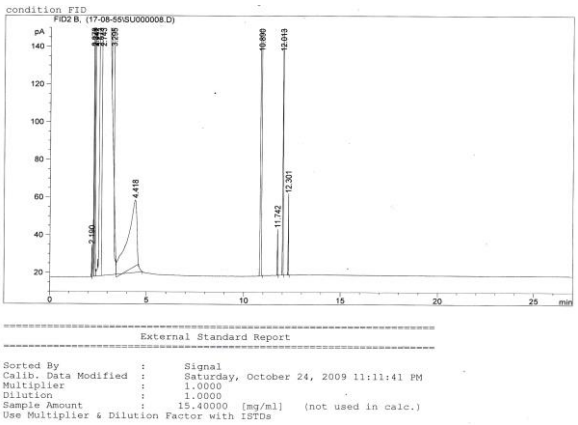
ตารางที่ 2 การตรวจสอบความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี Somogyi-Nelson จากการนำ % Rsd มาประเมินด้วย Horrate

Conc. mg/l	%RSD Experimental	Predicted Horwitz RSD	HORRAT*
30	1.61	0.79	2.00
60	1.49	0.79	1.88

150	1.44	0.79	1.82

HORRAT* $\leq$ 2 (AOAC)





ภาพที่ 3 ลักษณะโครมาโทรแกรมของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี aldital acetate วัดด้วยเครื่อง gas chromatograph