



การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนบางชนิดด้วยเทคนิค HPLC

โดย

นางสาวลัดดาวัลย์ ศรีวัฒนะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนบางชนิดด้วยเทคนิค HPLC

โดย

นางสาวลัดดาวัลย์ ศรีวัณณะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**DETEMINATION OF COMPLEXES OF COPPER AND SOME AMINO ACIDS BY
HPLC TECHNIQUE**

By

Laddawan Sriwattana

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Chemistry

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2011

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนบางชนิดด้วยเทคนิค HPLC” เสนอโดย นางสาวลัดดาวัลย์ ศรีวัฒนะ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ชารัทสนวงศ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. อาจารย์ ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี
2. อาจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร.ดลฤดี ฉิมพาลี)
...../...../.....

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิรัช พุททวงศ์)
...../...../.....

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง)
...../...../.....

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี)
...../...../.....

50310202 : สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

คำสำคัญ : ทองแดง / กรดอะมิโน / สารประกอบเชิงซ้อน / HPLC

ลัดดาวัลย์ ศรีวิณะ : การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนบางชนิดด้วยเทคนิค HPLC. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อ.ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี และ อ.ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง. 88 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้เตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine โดยเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนในสารละลายผสมของน้ำกับเอทานอลอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC) จากการเปรียบเทียบ IR สเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอะมิโนอิสระ พบว่าเกิดการเลื่อน (shift) ของพีคในย่าน N-H stretching และ C=O stretching และจากเทคนิค DSC พบว่าจุดหลอมเหลวของสารประกอบเชิงซ้อนต่างจากจุดหลอมเหลวของกรดอะมิโนอิสระ ดังนั้นเทคนิคทั้งสองสามารถยืนยันได้ว่าการสร้างพันธะระหว่างไอออนทองแดงกับกรดอะมิโน

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนสามารถวิเคราะห์ได้ทางอ้อมโดยอาศัยข้อมูลจากการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนด้วยวิธี continuous variation และ mole ratio method ร่วมกับการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดจากการแตกตัวของสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ trifluoroacetic acid (TFA) เป็น ion-pair reagent ผสมในสารละลายเคลื่อนที่ จากการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโน พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1:2 และกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ methionine, leucine และ phenylalanine ด้วยเทคนิค HPLC มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มากกว่า 0.98 โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเท่ากับ 5.2–25.8 mg/L, 24.8–49.7 mg/L และ 4.2–12.6 mg/L ตามลำดับ และพบว่า methionine มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection; LOD) เท่ากับ 0.56 mg/L และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (limit of quantification; LOQ) เท่ากับ 1.50 mg/L ส่วน leucine และ phenylalanine มีค่า LOD เท่ากับ 7.64 mg/L และ 29.5 mg/L และค่า LOQ เท่ากับ 0.111 mg/L และ 2.78 mg/L ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ปริมาณทองแดงในตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมขึ้น พบว่าเทคนิคนี้สามารถหาปริมาณทองแดงได้ใกล้เคียงกับเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณทองแดง ดังนั้นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1..... 2.....

50310202 : MAJOR : ANALYTICAL CHEMISTRY

KEY WORD : COPPER / AMINO ACID / COMPLEX / HPLC

LADDAWAN SRIWATTANA : DETERMINATION OF COMPLEXES OF COPPER AND SOME AMINO ACIDS BY HPLC TECHNIQUE : SUPHACHAI SUPALAKNARI, Ph.D., AND SIRIRAT CHOOSAKOONKRIANG, Ph.D.. 88 pp.

Complexes of copper and amino acids, namely, glycine, glutamine, methionine, leucine and phenylalanine were prepared and characterized by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The complexes were prepared in a mix solvent of water and ethanol. The volume of water to ethanol ratio was 1:1 (v/v). By comparison with the IR spectra of the free amino acids the spectra of the complexes displayed shifts of the IR band of N-H stretching and C=O stretching. In the DSC thermograms, the melting points of the complexes were observed at different temperatures from those of the corresponding free amino acids. The results from both techniques thus confirmed coordinated bonding between Cu(II) ion and the amino acid.

Indirect analysis of a copper complex was made by using the content of amino acid of the complex and stoichiometric ratio of the complex. The stoichiometric ratios of the complexes were determined by using method of continuous variation and mole ratio method. The mole ratio of Cu (II) to amino acid was found to be 1:2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was developed for determination of amino acids of the complexes by using trifluoroacetic acid (TFA) as an ion-pair reagent in the mobile phase. In the HPLC method analysis, the regression data for the complexes of Cu(II) and methionine, leucine and phenylalanine showed a good linear relationship with correlation coefficient (R^2) >0.98 over the concentration ranges of 5.2-25.8 mg/L, 24.8-49.7 mg/L and 4.2-12.6 mg/L, respectively, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were in the ranges of 0.11–7.64 mg/L and 1.50–29.5 mg/L, respectively. The amounts of amino acids measured by HPLC were taken to calculate Cu content by using the mole ratio Cu : amino acid of 1:2. The amounts of copper in the samples were also determined by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES). The results from the two techniques were in good agreement. Thus, the developed method can be used to measure the amounts of copper complexes.

Department of Chemistry Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2011

Student's signature

Thesis Advisors' signature 1. 2.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความร่วมมือและช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่านที่ได้สละเวลามาให้คำแนะนำ ข้อคิดและความรู้ต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.นรงค์ นิมพาลี และ ผศ. ดร.ชลฤดี นิมพาลี ที่ให้กรุณาช่วยเหลือและแนะนำในการวิเคราะห์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี และดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ ครอบครัว เพื่อนๆ และผู้ที่มีได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้ทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และเป็นกำลังใจให้จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
สมมติฐานของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
นิยามศัพท์ที่ใช้ในการวิจัย	3
กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplemented products)	6
ทองแดง (copper).....	8
กรดอะมิโน (amino acid)	10
amino acid chelate.....	15
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์	22
ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	22
4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	29
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	55
สรุปและอภิปรายผล	55
ข้อเสนอแนะ	58

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	63
ประวัติผู้วิจัย	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	มาตรการพิจารณาโฆษณาและบทกำหนดโทษ	8
2	กรดอะมิโน 20 ชนิด	11
3	บทบาทของกรดอะมิโนจำเป็น	14
4	ลักษณะทางกายภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน	30
5	ค่า molar absorptivity ของสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด	33
6	ข้อมูล FT-IR ของกรดอะมิโนอิสระและสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน	40
7	อุณหภูมิที่สารประกอบเชิงซ้อนและกรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลง.....	47
8	การวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค HPLC	51
9	ปริมาณทองแดง (copper) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IP-RPLC และ ICP-OES (n=3)	54
10	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ Glycine สำหรับเทคนิค Continuous variation.....	65
11	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine สำหรับเทคนิค mole ratio method	65
12	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine สำหรับเทคนิค continuous variation	66
13	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine สำหรับเทคนิค mole ratio method	66
14	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine สำหรับเทคนิค continuous variation	67
15	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine สำหรับเทคนิค mole ratio method.....	67
16	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine สำหรับเทคนิค continuous variation	68
17	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine สำหรับเทคนิค mole ratio method	68

ตารางที่		หน้า
18	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine สำหรับเทคนิค continuous variation	69
19	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine สำหรับเทคนิค mole ratio method	69
20	พื้นที่ใต้พีคสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ methionine ที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	70
21	พื้นที่ใต้พีคสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ leucine ที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	70
22	พื้นที่ใต้พีคสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ phenylalanine ที่ความเข้มข้น ต่างๆ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	70
23	การวิเคราะห์หาค่า LOD และ LOQ	71
24	ค่า intensity ของสารละลายทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-OES	71

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	stereo isomer ของกรดอะมิโน (amino acid)	11
2	โครงสร้าง amino acid chelate	16
3	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine (a), สารละลาย copper acetate (b) และสารละลาย glycine (c)	33
4	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine (a), สารละลาย copper acetate (b) และ สารละลาย glutamine (c).....	33
5	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine (a), สารละลาย copper acetate (b) และ สารละลาย methionine (c).....	34
6	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง สารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine (a), สารละลาย copper acetate (b) และ สารละลาย leucine (c)	34
7	UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine (a), สารละลาย copper acetate (b) และสารละลาย phenylalanine (c)	34
8	กราฟการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ด้วยวิธี continuous variation หรือ job's method.....	36
9	กราฟการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ด้วยวิธี mole ratio method.....	37
10	IR สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง glycine (a) และ สารประกอบเชิงซ้อนของ ทองแดงกับ glycine (b)	40
11	IR สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง glutamine (a) และ สารประกอบเชิงซ้อน ของทองแดงกับ glutamine (b).....	41
12	IR สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง methionine (a) และ สารประกอบเชิงซ้อน ของทองแดงกับ methionine (b).....	41
13	IR สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง leucine (a) และ สารประกอบเชิงซ้อนของ ทองแดงกับ leucine (b)	41

ภาพที่		หน้า
14	IR สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง phenylalanine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine (b)	41
15	IR สเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนอิสระและ copper acetate monohydrate	42
16	DSC เทอร์โมแกรมเปรียบเทียบระหว่าง glycine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine (b).....	44
17	DSC เทอร์โมแกรมเปรียบเทียบระหว่าง glutamine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine (b).....	44
18	DSC เทอร์โมแกรมเปรียบเทียบระหว่าง methionine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine (b).....	45
19	DSC เทอร์โมแกรมเปรียบเทียบระหว่าง leucine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine (b)	45
20	DSC เทอร์โมแกรมเปรียบเทียบระหว่าง phenylalanine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine (b)	45
21	สมการเคมีการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโน.....	47
22	โครงสร้างของ trifluoroacetic acid (TFA)	48
23	โครมาโทแกรมของสารละลายผสม 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid และ 1% (v/v) tetrahydrofuran pH 4.5.....	48
24	โครมาโทแกรมของสารละลายผสม glycine (A), glutamine (A), methionine (B), leucine (C) และ phenylalanine (D)	49
25	โครมาโทแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine (A), glutamine (A), methionine (B), Leucine (C) และ phenylalanine (D)...	49
26	กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine (mg/L) n=3	50
27	กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine (mg/L) n=3	50
28	กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine (mg/L) n=3	51
29	กราฟมาตรฐานระหว่าง intensity กับความเข้มข้นของทองแดง (mg/L).....	53

ภาพที่		หน้า
30	โครมาโทแกรมของสารละลาย copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	53
31	DSC เทอร์โมแกรมของ glycine อิสระ	74
32	DSC เทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine.....	75
33	DSC เทอร์โมแกรมของ glutamine อิสระ.....	76
34	DSC เทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine	77
35	DSC เทอร์โมแกรมของ methionine อิสระ.....	78
36	DSC เทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine	79
37	DSC เทอร์โมแกรมของ leucine อิสระ	80
38	DSC เทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine	81
39	DSC เทอร์โมแกรมของ phenylalanine อิสระ	82
40	DSC เทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine...	83
41	DSC เทอร์โมแกรมของ copper acetate	84
42	โครมาโทแกรมของสารละลาย glycine (A), glutamine (B), methionine (C), leucine (D) และ phenylalanine (E)	86
43	โครมาโทแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine (A), glutamine (B), methionine (C), leucine (D) และ phenylalanine (E).....	87

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประชากรทั่วโลกต่างให้ความสำคัญกับการบริโภคมากขึ้น เพราะภาวะโภชนาการที่ดีส่งผลต่อสุขภาพพลานามัยที่ดี โดยปกติร่างกายมนุษย์ต้องการสารอาหารหลัก 5 หมู่ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามินและเกลือแร่ แต่เนื่องจากนิสัยในการรับประทานอาหารในชีวิตประจำวันที่นิยมรับประทานอาหารสำเร็จรูปโดยเฉพาะในสังคมเมือง และกระบวนการแปรรูปอาหารซึ่งทำให้สูญเสียสารอาหารที่สำคัญไป รวมถึงการขาดแร่ธาตุในดินที่ใช้ในการเพาะปลูกทำให้ประชากรส่วนใหญ่ขาดสารอาหาร โดยเฉพาะวิตามินและเกลือแร่ ประชากรจึงหันมารับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplemented products) กันมากขึ้น ดังนั้นการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมจึงจำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ เพื่อเป็นข้อมูลในการตัดสินใจ เนื่องจากในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีความหลากหลายมากขึ้น โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เสริมเกลือแร่ ซึ่งเกลือแร่หรือแร่ธาตุ (minerals) ถือเป็นสารอาหารที่ร่างกายต้องการรองจากน้ำ ไขมัน และโปรตีน มีบทบาทในการควบคุมการทำงานของร่างกายและเป็นส่วนประกอบสำคัญของร่างกาย โดยเกลือแร่ที่พบมีด้วยกันจากหลายแหล่งทั้งที่อยู่ในรูปของเกลือแร่อินทรีย์ (organic minerals) และเกลือแร่อนินทรีย์ (inorganic minerals) ซึ่งพบมากที่สุด โดยเกลือแร่ที่อยู่ในรูปที่แตกต่างกันนี้ร่างกายสามารถดูดซึมได้ไม่เท่ากัน และจากงานวิจัยต่างๆ [1-8] พบว่าเกลือแร่อินทรีย์เป็นแหล่งของเกลือแร่ที่มีคุณภาพมากกว่าเกลือแร่อนินทรีย์ ซึ่งร่างกายสามารถดูดซึมเพื่อนำไปใช้ได้ดีกว่า เนื่องจากเกลือแร่เกือบทุกชนิดจำเป็นต้องจับ (bound) กับสารอินทรีย์ก่อนจึงจะดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ โดยเกลือแร่อินทรีย์ที่บรรจุอยู่ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารรวมทั้งอาหารสัตว์พบว่าส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะกับกรดอะมิโน หรือที่เรียกว่า metal amino acid chelate

การวิเคราะห์ชนิดของเกลือแร่ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือในอาหารสัตว์ว่าอยู่ในรูปของเกลือแร่อินทรีย์หรือเกลือแร่อนินทรีย์มีความสำคัญอย่างมาก ทำให้นักวิจัยพยายามพัฒนาวิธีเพื่อวิเคราะห์เกลือแร่อินทรีย์ เช่น งานวิจัยของ Park และ Harnton ในปี ค.ศ. 1994 [9] ที่พยายาม

วิเคราะห์ปริมาณธาตุไนโตรเจน (N) ในผลิตภัณฑ์เกลือแร่อินทรีย์ด้วยเทคนิค Kjeldahl method โดยนักวิจัยทั้งสองสันนิษฐานว่าปริมาณไนโตรเจนสามารถบ่งชี้ถึงปริมาณของโปรตีนหรือกรดอะมิโน (amino acid) และสามารถยืนยันได้ว่าเกลือแร่นั้นอยู่ในรูปของคีเลต (chelate) แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Kjeldahl คือเทคนิคนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างไนโตรเจนอิสระและไนโตรเจนที่อยู่ในโมเลกุลของสารอินทรีย์ได้ และที่สำคัญคือไม่สามารถยืนยันว่าในโครงสร้างโมเลกุลนั้นประกอบด้วยโลหะและสารอินทรีย์ ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนจึงไม่สามารถวิเคราะห์เกลือแร่อินทรีย์ได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1995 มีงานวิจัยของ Holwerda [10] ซึ่งเสนอเทคนิค Colorimetric method เพื่อวิเคราะห์หาอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไอออนโลหะ (metal ion) กับลิแกนด์ (ligand) ในสารละลายที่ pH ต่างๆ โดยสันนิษฐานว่าถ้าไอออนโลหะทำปฏิกิริยากับลิแกนด์แสดงว่าเกิดคีเลตขึ้น ซึ่งปัญหาที่พบในงานวิจัยนี้คือคีเลตไม่สามารถละลายได้ทุกตัว หรือบางตัวละลายได้เพียงเล็กน้อย และเนื่องจาก pH มีผลโดยตรงต่อการวิเคราะห์คีเลต ดังนั้นถ้าค่า pH ไม่เหมาะสมอาจทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้ และเทคนิคนี้ก็ไม่สามารถยืนยันการเกิดพันธะระหว่างโลหะกับลิแกนด์ได้จึงไม่สามารถวิเคราะห์เกลือแร่อินทรีย์ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าเทคนิคที่นิยมนำมาใช้เพื่อยืนยันการเกิดพันธะและโครงสร้างระหว่างโลหะกับกรดอะมิโนคือเทคนิค Infrared spectrophotometry (IR) [11-17] และ X-ray spectroscopy [15, 19] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่พัฒนาเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อวิเคราะห์สารประกอบซิลิเนียม (Se) กับสารอินทรีย์ โดยใช้ ion-pair reagent ผสมในสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งจากการศึกษาสามารถวิเคราะห์สารประกอบซิลิเนียมในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ [18-21]

งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาวิเคราะห์เกลือแร่อินทรีย์ที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน เนื่องจากทองแดงเป็นเกลือแร่สำคัญที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกายและช่วยให้ร่างกายทำงานได้ตามปกติ โดยศึกษาการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค Infrared spectrophotometry (IR) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC) และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกและวิเคราะห์ปริมาณทองแดงในสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมขึ้นด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และเปรียบเทียบกับปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานในการวิเคราะห์ทองแดง

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน
2. เพื่อศึกษาและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน
3. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน

3. สมมติฐานของการวิจัย

สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ด้วยเทคนิค Infrared Spectroscopy (IR) และเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) เนื่องจากเมื่อเกิดพันธะระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งสามารถพิจารณาได้จากการเปรียบเทียบ IR สเปกตรัม และ DSC เทอร์โมแกรมระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอะมิโนอิสระ และเนื่องจากกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่ศึกษามีโครงสร้างที่แตกต่างกันจึงสามารถแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละตัวได้ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

4. ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน 5 ชนิด ได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine
2. ศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโน ด้วยเทคนิค continuous variation (job's method) และ mole ratio method
3. พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค Infrared Spectroscopy (IR) และเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC)
4. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนและทองแดงที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ trifluoroacetic acid (TFA) เป็น ion-pair reagent และเปรียบเทียบปริมาณทองแดงกับเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP – OES)

5. นิยามศัพท์ที่ใช้ในการวิจัย

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary Supplemented Products) หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ใช้รับประทานโดยตรง นอกเหนือจากการรับประทานอาหารหลักตามปกติ โดยเป็นสิ่งที่รับประทาน

เสริมขึ้นเพื่อทดแทนเท่านั้นไม่นับเป็นอาหารหลัก ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะเน้นการบริโภคเพื่อป้องกันโรคมกกว่าการรักษาและมุ่งสำหรับบุคคลทั่วไปที่มีสุขภาพปกติไม่ใช่สำหรับผู้ป่วย โดยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีทั้งชนิดที่เป็นสารสังเคราะห์และชนิดที่เป็นสารสกัดธรรมชาติ สามารถอยู่ในลักษณะเป็นเกล็ด เม็ด ผง น้ำ แคปซูลหลอดแข็ง แคปซูลนิ่ม หรือลักษณะอื่นๆ

เกลือแร่ (minerals) หมายถึง แร่ธาตุหรือสารประกอบอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของอาหาร เป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อร่างกาย มีบทบาทและหน้าที่สำคัญในร่างกายหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของร่างกาย เป็นองค์ประกอบของเซลล์เนื้อเยื่อและเส้นประสาท เอนไซม์ ฮอร์โมน ซึ่งร่างกายคนเราต้องการเกลือแร่แต่ละชนิดแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

เกลือแร่หลักหรือแร่ธาตุปริมาณมาก (macro minerals) คือแร่ธาตุที่ร่างกายต้องการมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อวัน ได้แก่ กำมะถัน (S), คลอรีน (Cl), แคลเซียม (Ca), โคบอลต์ (Co), ซิลิคอน (Si), โซเดียม (Na), โพแทสเซียม (K), ฟอสฟอรัส (P), แมกนีเซียม (Mg), แมงกานีส (Mn), เหล็ก (Fe), ไอโอดีน (I)

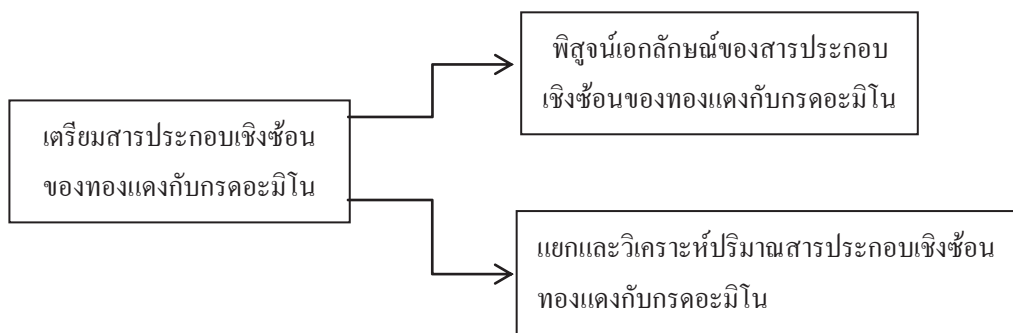
เกลือแร่รองหรือแร่ธาตุปริมาณน้อย (trace minerals) คือแร่ธาตุกลุ่มที่ร่างกายต้องการเล็กน้อยแต่ขาดไม่ได้ ได้แก่ โครเมียม (Cr), ซีลีเนียม (Se), ทองแดง (Cu), นิกเกิล (Ni), โบรมีน (Br), โบรอน (B), ฟลูรีน (F), โมลิบดีนัม (Mo), วานาเดียม (V), สตรอนเทียม (Sr), สังกะสี (Zn), อะลูมิเนียม (Al)

คีเลต (chelate) หมายถึง สารอินทรีย์ซึ่งสามารถจับกับแร่ธาตุประจุบวก (cation) ได้แก่ เหล็ก (Fe), สังกะสี (Zn), ทองแดง (Cu), แมงกานีส (Mn) เป็นต้น โดยสารคีเลตจะล้อมแคทไอออนของธาตุที่เป็นโลหะไว้ไม่ให้แอนไอออน (anion) จากที่อื่นเข้าทำปฏิกิริยาได้ปฏิกิริยาการรวมนี้เรียกว่า chelation จะได้คีเลต เช่น zinc-amino acid chelate

retention time หมายถึง เวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ผ่านคอลัมน์ (column) จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสูงสุดของพีค โดย retention time เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารในสภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน ค่า retention time ของสารชนิดเดียวกันที่วิเคราะห์ได้ควรจะตรงกันหรือมีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด ดังนั้นการตรวจพิสูจน์ชนิดของสารองค์ประกอบใดๆ ในของผสมตัวอย่างสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า retention time ระหว่างสารองค์ประกอบในของผสมตัวอย่าง (unknown) กับสารองค์ประกอบมาตรฐาน

ion-pair reagent หมายถึง ไอออนของสารประกอบที่มีประจุตรงข้ามกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) โดยมีส่วนที่เป็น hydrophobic เพื่อจับ (interact) กับเฟสอยู่นิ่ง (stationary phase) และส่วนที่มีประจุ (charge region) เพื่อทำหน้าที่จับกับสารตัวอย่าง

6. กรอบแนวความคิดในการวิจัย



แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิด

7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. เป็นแนวทางในการเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน
2. เป็นแนวทางในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องเพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดกรอบแนวคิดในการศึกษาวิจัยให้สามารถดำเนินการวิจัยได้อย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้นโดยจำแนกประเด็นที่มีความเกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

2.1 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplemented products)

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจัดเป็นอาหารประเภทหนึ่งตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ใช้รับประทานโดยตรงนอกเหนือจากการรับประทานอาหารหลักตามปกติเพื่อเสริมสารบางอย่าง มักอยู่ในรูปลักษณะเป็นเม็ด แคปซูล ผง เกล็ด ของเหลว หรือลักษณะอื่น และมีจุดมุ่งหมายสำหรับบุคคลทั่วไปที่มีสุขภาพปกติมิใช่สำหรับผู้ป่วย และไม่ควรให้เด็กและสตรีมีครรภ์รับประทาน [22]

2.1.1 ข้อควรทราบเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร [22]

2.1.1.1 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยทั่วไปมักพบว่ามีรูปลักษณะใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ยา แต่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ยา ดังนั้นจึงไม่สามารถรักษาหรือบรรเทาโรคใดๆ และไม่สามารถเปลี่ยนแปลงระบบการทำงานของร่างกาย หรือช่วยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของร่างกายได้

2.1.1.2 ขั้นตอนในการขออนุญาตผลิตหรือนำเข้าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อจำหน่ายแตกต่างจากการขอขึ้นทะเบียนเป็นผลิตภัณฑ์ยา ดังนั้นจึงห้ามมิให้โฆษณาเผยแพร่ในเชิงก่อให้เกิดความเข้าใจผิดว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสามารถรักษาหรือบรรเทาโรคใดๆ เพราะการโฆษณาเช่นนั้นเป็นการกล่าวอ้างสรรพคุณทางยา

2.1.1.3 ต้องไม่โฆษณาโดยทำให้เข้าใจว่าการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพียงอย่างเดียวแล้วสามารถทำให้สุขภาพร่างกายดีขึ้นได้ แต่ต้องให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่าต้องบริโภคอาหารหลักให้ครบส่วน รวมถึงต้องออกกำลังกายและการพักผ่อนที่เหมาะสม

2.1.1.4 ไม่อนุญาตให้มีการกล่าวอ้างหรือรับรองคุณภาพคุณประโยชน์โดยบุคคลองค์กร หรือหน่วยงานใดๆ

2.1.1.5 การโฆษณาคุณสมบัติของสารอาหารแต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนั้น สามารถทำได้เมื่อพิสูจน์ได้ว่ามีคุณสมบัติตามที่กล่าวอ้างจริง

2.1.1.6 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีการแสดงข้อความกล่าวอ้างทางโภชนาการหรือโฆษณาโดยกล่าวอ้างคุณค่าทางโภชนาการเพื่อส่งเสริมการขาย ต้องแสดงข้อมูลโภชนาการบนฉลากเพื่อให้ผู้บริโภคทราบด้วย

2.1.1.7 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้รับอนุญาตให้จำหน่ายจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแล้ว แสดงว่าสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยารับรองเฉพาะสรรพคุณตามที่ขออนุญาต ซึ่งกำหนดให้ระบุไว้บนฉลาก ผู้บริโภคจึงควรศึกษารายละเอียดบนฉลากผลิตภัณฑ์ก่อนทุกครั้งไม่ควรเชื่อจากการกล่าวอ้างของผู้ขาย

2.1.2 ฉลากของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร [22]

ข้อมูลที่ระบุบนฉลากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเป็นข้อมูลผ่านการพิจารณาแล้วว่าเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ดังนั้นก่อนตัดสินใจซื้อผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผู้บริโภคต้องตรวจสอบข้อมูลโฆษณาให้แน่ชัด และควรต้องตรวจสอบข้อความบนฉลากให้มีการแสดงสาระสำคัญครบถ้วนตามที่กฎหมายกำหนดด้วย

ฉลากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต้องระบุข้อความภาษาไทย ได้แก่ ชื่ออาหาร เลขสารบบอาหารในเครื่องหมาย ออย. ชื่อและที่ตั้งของผู้ผลิต/ผู้แบ่งบรรจุหรือผู้นำเข้า (ในผลิตภัณฑ์นำเข้าต้องระบุประเทศผู้ผลิตด้วย) ปริมาณสุทธิ ส่วนประกอบสำคัญ วันเดือนปีที่ผลิต และ วันเดือนปีที่หมดอายุโดยมีคำว่า “ผลิต” และ “หมดอายุ” หรือ “ควรบริโภคก่อน” กำกับไว้ด้วย คำแนะนำในการเก็บรักษา และในกรณีที่มีการเจือสีแต่งกลิ่นรส ใช้วัตถุกันเสีย วัตถุปรุงแต่งรสอาหาร หรือ วัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาล ต้องระบุบนฉลากด้วย

2.1.3 มาตรการพิจารณาโฆษณาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและบทกำหนดโทษ

การกำกับดูแลการโฆษณาผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ข้อกฎหมายที่กำหนดไว้ในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 นั้น มีมาตรการพิจารณาโฆษณา และบทกำหนดโทษ สำหรับผู้ฝ่าฝืน ดังนี้

ตารางที่ 1 มาตรการพิจารณาโฆษณาและบทกำหนดโทษ

มาตรการพิจารณาโฆษณา	บทกำหนดโทษ
- ห้ามมิให้ผู้ใดโฆษณาคุณภาพประโยชน์คุณภาพหรือสรรพคุณของอาหารอันเป็นเท็จ - ผู้ใดประสงค์จะโฆษณาคุณภาพประโยชน์คุณภาพหรือสรรพคุณของอาหาร ทางสื่อเผยแพร่ต่าง ๆ เพื่อประโยชน์ทางการค้า ต้องนำเสียงภาพหรือข้อความที่โฆษณานั้นให้ผู้อนุญาตตรวจพิจารณาก่อนเมื่อได้รับอนุญาตแล้วจึงจะโฆษณาได้ - เพื่อพิทักษ์ประโยชน์และความปลอดภัยของผู้บริโภค ให้ผู้อนุญาตมีอำนาจสั่งเป็นหนังสืออย่างใดอย่างหนึ่งให้ผู้ทำการโฆษณาปฏิบัติดังนี้ 1. ระงับการโฆษณาที่ไม่ได้รับการอนุญาต 2. ระงับการโฆษณาที่คณะกรรมการเห็นว่าไม่มีคุณภาพประโยชน์คุณภาพหรือสรรพคุณตามที่โฆษณา	- ผู้ฝ่าฝืนต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินสามปีหรือปรับไม่เกินสามหมื่นบาท หรือ ทั้งจำทั้งปรับ - ผู้ฝ่าฝืนต้องระวางโทษปรับไม่เกินห้าพันบาท - ผู้ฝ่าฝืนคำสั่งของผู้อนุญาต ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินสองปีหรือปรับไม่เกินสองหมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ และให้ปรับเป็นรายวันอีกวันละไม่น้อยกว่าห้าร้อยบาทแต่ไม่เกินหนึ่งพันบาท ตลอดเวลาที่มิปฏิบัติตามคำสั่งดังกล่าว

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อวันที่ 15 กันยายน 2554, เข้าถึงได้จาก <http://webnotes.fda.moph.go.th/consumer/csmb/csmb2546.nsf/723dc9fee41>

2.2 ทองแดง (copper)

2.2.1 ข้อมูลทั่วไป

ทองแดง (copper) ตัวย่อคือ Cu จัดอยู่ในกลุ่มเกลือแร่รองที่ร่างกายต้องการเพียงเล็กน้อยแต่ไม่สามารถขาดได้ โดยร่างกายคนมีทองแดงประมาณ 75-150 มิลลิกรัม [23] ส่วนใหญ่อยู่ในตับ สมอง หัวใจ และไต ส่วนน้อยอยู่ในนมและไข่กระดูก

2.2.2 ประโยชน์ของทองแดงต่อร่างกาย [23,24]

2.2.2.1 สำคัญต่อเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเหล็ก โดยที่ทองแดงในพลาสมาที่อยู่ในรูปของ เซรูโลพลาสมีน (ceruloplasmin) จะเปลี่ยนเหล็กจาก เหล็กเฟอร์รัสไปเป็นเหล็กเฟอริก แล้วเหล็กเฟอริกจะรวมตัวกับอะโพทรานส์เฟอร์ริน (apotransferrin) กลายเป็นทรานส์เฟอร์ริน (transferrin) ซึ่งทำหน้าที่ขนถ่ายเหล็กในร่างกาย

2.2.2.2 เป็นส่วนหนึ่งของน้ำย่อยไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งจำเป็นต่อการเปลี่ยนไทโรซีนไปเป็นเมลานิน (melanin) ซึ่งเป็นสีคล้ำของผมและผิวหนัง และเป็นส่วนประกอบในน้ำย่อยไซโตโครมซีออกซิเดส (cytochrome c oxidase) น้ำย่อยแคแทเลส (catalase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบหายใจและการปล่อยพลังงานในเซลล์

2.2.2.3 จำเป็นต่อการเผาผลาญโปรตีนและผลิต ribonucleic acid (RNA) ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสร้างเซลล์ต่างๆ ให้เป็นไปอย่างปกติและถูกต้อง และมีความสำคัญเกี่ยวกับระบบโครงสร้างเนื้อเยื่อ รวมทั้งการผลิตฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ซึ่งเป็นสารสำคัญในการสร้างแผ่นหุ้มรอบเส้นประสาท

2.2.2.4 ร่วมกับวิตามิน (vitamin) ในการสร้างคอลลาเจน (collagen) และอีลาสติน (elastin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของร่างกายที่ช่วยบำรุงรักษาผิวหนังและทำให้ผิวหนังเกิดความยืดหยุ่น

2.2.3 แหล่งที่พบ [23,24]

แหล่งอาหารที่มีทองแดงมากที่สุดคือ ถั่ว หอยนางรม อาหารทะเล และผลไม้เปลือกแข็ง เมล็ดพืช ถั่วที่ยังไม่ขัดสี ปลา เนื้อสัตว์ ผลไม้ ผักต่างๆ ในเมล็ดข้าว จะพบในส่วนของรำข้าว และจมูกข้าว ดังนั้นการขัดสีข้าวจึงเป็นการกำจัดทองแดงออกไปเช่นกัน รวมทั้งนมมารดาที่มีทองแดงสูงกว่านมวัว

2.2.4 ปริมาณที่แนะนำ [23]

คนปกติต้องการวันละ 1.24 mg แต่เพื่อป้องกันการขาดในกรณีที่มีการดูดซึมไม่ดีหรือร่างกายใช้ทองแดงมากขึ้น หรือต้องมีการสูญเสียมากขึ้น Recommended Dietary Allowance (RDA) ได้แนะนำไว้ดังนี้

ผู้ใหญ่	2-3 mg/วัน
ทารกและเด็ก	0.08 mg/น้ำหนักตัว 1 kg/วัน

2.2.5 เมตาบอลิซึมของทองแดง [23,24]

ทองแดงประมาณร้อยละ 30 ของที่บริโภคจะถูกใช้ภายในร่างกาย โดยทองแดงถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนต้น ภายหลังจากถูกดูดซึมทองแดงจะไปจับกับโปรตีน ชื่อ

เซรูพลาสมิน (ceruloplasmin) 95% และอีก 5% จับกับอัลบูมิน (albumin) เพื่อไปยังส่วนต่างๆ ที่ต้องการทองแดงโดยทองแดงถูกขับถ่ายออกทางอุจจาระและน้ำดี

2.2.6 ผลของการขาดธาตุทองแดง [23,24]

เนื่องจากธาตุทองแดงมีหน้าที่หลายอย่างในร่างกายสัตว์ ดังนั้นการขาดทำให้มีอาการแตกต่างกันไป ไม่มีอาการที่เฉพาะ แต่การขาดธาตุทองแดงอาจมีอาการดังนี้ เช่น มีระดับทองแดงในเลือดและในตับต่ำ (hypocupremia) ควบคู่ไปกับโลหิตจาง ผมมีลักษณะแข็งและขดเป็นเกลียว สีผมและสีผิวจาง บวม น้ำเป็นต้น

2.2.7 พิษของทองแดง [23]

พิษเฉียบพลัน (acute poisoning) พบในผู้ที่กินเข้าไปทีละมากๆ อาการที่พบคือ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเดิน ปวดศีรษะ เม็ดเลือดแดงและอาจทำให้ถึงตายได้

พิษเรื้อรัง (chronic poisoning) พบในผู้ที่ป่วยด้วยโรค Wilson's disease ซึ่งเป็นโรคทางกรรมพันธุ์ โดยคนที่ป่วยด้วยโรคนี้ร่างกายมีการสังเคราะห์เซรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) น้อยลงทำให้เอนไซม์นี้ในเลือดต่ำกว่าปกติ ($<20 \text{ g/dl}$) และทำให้ไอออนทองแดงอิสระและที่จับอยู่กับอัลบูมิน (albumin) สูงกว่าปกติ ทองแดงที่ถูกดูดซึมเข้ามาโดยไม่มีการควบคุมก็จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นและไปจับตามเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ตับและสมอง ทำให้มีการทำลายเนื้อตับและสมอง นอกจากนี้ยังพบว่าที่ขั้วตาตรงรอบๆ คอร์เนีย จะมีทองแดงมาจับมากทำให้เกิดเป็นวงสีเทาๆ เขียวๆ เรียกว่า Kayser-Fleischer ring และมีการขับถ่ายทองแดงออกมาในปัสสาวะเพิ่มขึ้น ซึ่งการประเมินภาวะทองแดงทำได้โดยวัดความแรงฤทธิ์ของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

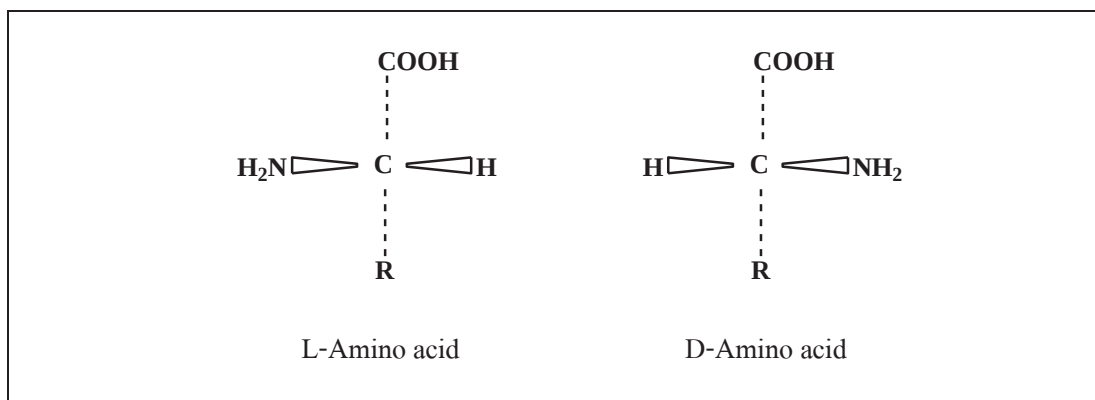
2.3 กรดอะมิโน (amino acid)

กรดอะมิโนคือหน่วยย่อยที่สุดของโปรตีน ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบในอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ คำว่าโปรตีนมาจากภาษากรีก proteios ซึ่งหมายถึง first โปรตีน คือสารประกอบ polymeramide เมื่อถูก hydrolyze จะได้ amino acids

2.3.1 โครงสร้างของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนจัดอยู่ในพวกที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ในโมเลกุล โดยสูตรโครงสร้างของกรดอะมิโนคือ $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$ ซึ่งอะตอมคาร์บอน (C) ในตำแหน่งอัลฟา (α -carbon) เป็นคาร์บอนที่ไม่สมมาตร (asymmetric carbon atom) ดังนั้นกรดอะมิโนทุกชนิด (ยกเว้น glycine ที่มีหมู่ R เป็นไฮโดรเจน) จะมี stereo isomer 2 ชนิดคือ ชนิดดี (D-) และชนิดแอล (L-) ดังภาพที่ 1 โดยกรดอะมิโนในธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นชนิดแอลและที่พบทั้งในพืชและสัตว์มีกรดอะมิโน 20 ชนิดเท่านั้น [25] แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งมีโครงสร้างต่างกันที่หมู่ R ทำให้กรดอะมิโนมีความแตกต่างกัน

ทั้งรูปร่าง ขนาด ความมีขั้วและประจุ เช่นถ้าหมู่ R มีจำนวนคาร์บอน (C) มากจะทำให้กรดอะมิโนมีขนาดใหญ่ หรือถ้าหมู่ R มีขั้วและมีประจุจะทำให้กรดอะมิโนแสดงคุณสมบัติละลายน้ำได้

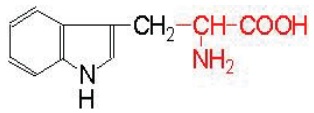
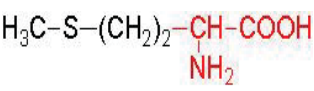
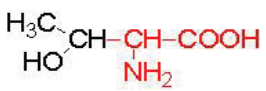
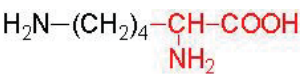
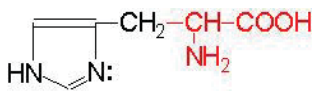
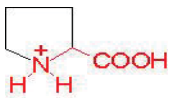
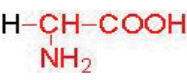
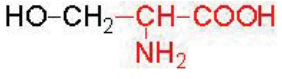
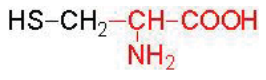
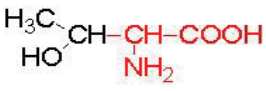


ภาพที่ 1 stereo isomer ของกรดอะมิโน (amino acid)

ตารางที่ 2 กรดอะมิโน 20 ชนิด

กรดอะมิโน	ชื่อย่อ	pKa			สูตรโครงสร้าง
		$\alpha - \text{COOH}$	$\alpha - \text{NH}_3^+$	side	
alanine	Ala	2.34	9.69	-	<chem>CC(N)C(=O)O</chem>
valine	Val	2.32	9.62	-	<chem>CC(C)C(N)C(=O)O</chem>
leucine	Leu	2.36	9.60	-	<chem>CC(C)CC(N)C(=O)O</chem>
isoleucine	Ile	2.36	9.68	-	<chem>CC[C@H](C)C(N)C(=O)O</chem>
phenylalanine	Phe	1.83	9.13	-	<chem>c1ccccc1CC(N)C(=O)O</chem>

ตารางที่ 2 กรดอะมิโน 20 ชนิด (ต่อ)

กรดอะมิโน	ชื่อ ย่อ	pKa			สูตรโครงสร้าง
		α - COOH	α - NH ₃ ⁺	side	
tryptophan	Trp	2.38	9.39	-	
methionine	Met	2.28	9.21	-	
threonine	Thr	2.63	9.10	-	
lysine	Lys	2.18	8.95	10.79	
histidine	His	1.82	9.17	6.04	
proline	Pro	1.99	10.60	-	
glycine	Gly	2.34	9.60	-	
serine	Ser	2.21	9.15	-	
cysteine	Cys	1.71	10.78	8.33	
tyrosine	Tyr	2.20	9.11	10.07	

ตารางที่ 2 กรดอะมิโน 20 ชนิด (ต่อ)

กรดอะมิโน	ชื่อย่อ	pKa			สูตรโครงสร้าง
		α - COOH	α - NH ₃ ⁺	side	
asparagine	Asn	2.02	8.84	-	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
glutamine	Gln	2.17	9.13	-	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
aspartic acid	Asp	2.09	9.82	3.86	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
glutamic acid	Glu	2.19	9.67	4.25	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$
arginine	Arg	2.17	9.04	12.48	$\text{HN}(\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$

ที่มา: Amino Acid pKa Values and Side Chain Identities [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อวันที่ 24 มกราคม 2555, เข้าถึงได้จาก http://homepage.smc.edu/kline_peggy/organic/amino_acid_pka.pdf

กรดอะมิโนส่วนมากสังเคราะห์จากสารประกอบอินทรีย์ของสิ่งมีชีวิต โดยมากจะเป็นการสังเคราะห์จากปฏิกิริยา transamination ซึ่งกรดอะมิโนชนิดที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นเองได้ถ้าร่างกายได้รับอาหารไม่เพียงพอจะเรียกว่า กรดอะมิโนไม่จำเป็น (non-essential amino acid) ส่วนกรดอะมิโนที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้คือพวกกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) ซึ่งต้องได้จากอาหาร โดยกรดอะมิโนจำเป็นมี 9 ชนิด ได้แก่ valine, leucine, isoleucine, phenylalanine, tryptophan, methionine, threonine, lysine และ histidine และพบว่าในเด็กทารกที่ระบบการทำงานของเอนไซม์ (enzyme) ยังไม่สมบูรณ์จึงยังไม่สามารถสร้าง arginine ได้ ดังนั้นสำหรับเด็กทารกกรดอะมิโนจำเป็นจึงมี 10 ชนิด ส่วนกรดอะมิโนไม่จำเป็นมี 11 ชนิด และเด็กทารกมี 10 ชนิด ได้แก่ proline, glycine, serine, cysteine, tyrosine, asparagine, glutamine, aspartic acid, alanine และ glutamic acid

2.3.2 การแบ่งหมู่ของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนสามารถแบ่งตามหมวดต่างๆ ได้โดยขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชันที่เกาะอยู่ที่ตำแหน่ง α -carbon โดยแบ่งได้ดังนี้คือ

2.3.2.1 กรดอะมิโนที่เป็นกลาง ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (carboxyl) และหมู่ฟังก์ชันอะมิโน (amino) อย่างละ 1 หมู่ โดยมีสมบัติเป็นกลางเมื่อละลายน้ำ มีดังนี้

กลุ่มที่มีหมู่ R เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic) เรียกว่า aromatic amino acid ได้แก่ phenylalanine, tyrosine และ tryptophan

กลุ่มที่มีหมู่ R เป็นสารประกอบ ซัลเฟอร์ (S) เรียกว่า sulfur amino acid ได้แก่ cysteine และ methionine

กลุ่ม α -amino acid ได้แก่ proline

2.3.2.2 กรดอะมิโนที่มีสมบัติเป็นกรด ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันอะมิโน 1 หมู่ และหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล 2 หมู่ โดยสารละลายของกรดอะมิโนนี้จะมี $\text{pH} < 7$ พวกที่หมู่ฟังก์ชันเป็นเอไมด์ (amide) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ carboxylic acid ก็จัดอยู่ในพวกนี้ด้วย แม้สารละลายของกรดอะมิโนพวกนี้เกือบจะเป็นกลาง ได้แก่ aspartic acid, asparagine, glutamic acid และ glutamine

2.3.2.3 กรดอะมิโนที่เป็นเบส ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล 1 หมู่และหมู่ฟังก์ชันอะมิโน 2 หมู่ สารละลายของกรดอะมิโนเหล่านี้จะมีสมบัติเป็นเบส $\text{pH} > 7$ ได้แก่ histidine, arginine และ lysine

2.3.3 บทบาทและหน้าที่ของกรดอะมิโน

ตารางที่ 3 บทบาทของกรดอะมิโนจำเป็น

กรดอะมิโน	บทบาท	ผลการขาด
isoleucine	- เสริมสร้างการเจริญเติบโตของร่างกาย - ช่วยให้ดับทำงานในการขจัดสารพิษได้ดีขึ้น - ช่วยการทำงานของระบบประสาท	- ร่างกายไม่เจริญเติบโตและสมองทำงานช้ากว่าปกติ
leucine	- ช่วยให้ดับทำงานได้ดีขึ้น	- ภูมิคุ้มกันลดลงทำให้ติดเชื้อได้ง่าย
methionine	- ป้องกันการสะสมไขมันในตับ - ป้องกันโรคซึมเศร้า	- อาการซึมเศร้า - ภูมิคุ้มกันลดลงทำให้ติดเชื้อได้ง่าย - แผลที่ผิวหนังหายช้ากว่าปกติ

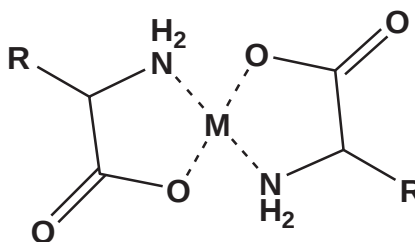
ตารางที่ 3 บทบาทของกรดอะมิโนจำเป็น (ต่อ)

กรดอะมิโน	บทบาท	ผลการขาด
lysine	- ช่วยสร้างคอลลาเจน - เพิ่มความแข็งแรงของผมและเล็บ - เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน - ป้องกันและรักษาโรคเรื้อรัง	- ร่างกายอ่อนเพลีย ตาลาย - โลหิตจาง - ติดเชื้อไวรัสได้ง่าย
phenylalanine	- เป็นต้นกำเนิดเม็ดสีเมลานินในเส้นผมและผิวหนัง - เป็นสารถ่ายทอดข้อมูลจากสมองสู่ประสาททำให้ความทรงจำและประสาทดีขึ้น	- ผมมีเม็ดสีจางลง ทำให้ผมหงอกก่อนวัย ผมร่วงแห้งแตกปลาย เล็บฉีก ผิวหนังหยาบ - สมองทำงานช้ากว่าปกติ
threonine	- เสริมสร้างการเจริญเติบโตของร่างกาย - ป้องกันการจับตัวของไขมันในตับ	- ร่างกายไม่เจริญเติบโต - โลหิตจาง
tryptophan	- ช่วยสร้างวิตามินบี 3 - ป้องกันอาการซึมเศร้า	- นอนไม่หลับ - มีอาการซึมเศร้า
valine	- เสริมสร้างการเจริญเติบโตของร่างกาย - รักษาสมดุลไนโตรเจนในเลือด	- ร่างกายไม่เจริญเติบโต
histidine	- จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเด็ก - ช่วยการทำงานของระบบประสาท	- ร่างกายไม่เจริญเติบโตและพัฒนาการในวัยเด็กช้า

ที่มา: นิภาพร ชนะกช, กรดอะมิโน [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อวันที่ 15 กันยายน 2554, เข้าถึงได้จาก http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/bsp_1_2550_amino.pdf.

2.4 amino acid chelate

The American Association of Feed Control Officials (AAFCO) ได้ให้คำนิยามสำหรับ amino acid chelate ว่าเป็น “ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไอออนโลหะ (metal ion) จากเกลือที่ละลายได้กับกรดอะมิโน โดยเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างไอออนโลหะกับกรดอะมิโนจำนวน 1-3 โมล (เกิด 2 โมลมากกว่า)” [26] เมื่อ amino acid chelate อยู่ในรูปที่เสถียรจะมีการปิดวงแบบ five-membered ring ระหว่างอะตอมออกซิเจนของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลและอะตอมไนโตรเจนของหมู่ฟังก์ชันอะมิโนของกรดอะมิโนกับอะตอมของโลหะ แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้าง amino acid chelate

amino acid chelate เป็นเกลือแร่อินทรีย์ (organic mineral) ที่มีการวิจัยมากมายยืนยันว่าเป็นแหล่งเกลือแร่ที่มีคุณภาพมากกว่าเกลือแร่อนินทรีย์ (inorganic mineral) เนื่องจากร่างกายสามารถดูดซึมเพื่อนำไปใช้ได้ดีกว่า ตัวอย่างงานวิจัย ได้แก่

งานวิจัยของ Apines-Amar และคณะ ในปี ค.ศ. 2004 [1] ที่ศึกษาผลของ amino acid chelate สำหรับเป็นอาหารเสริมแก่ปลาเทราท์ โดยทดลองให้เกลือแร่แก่ปลาชนิดต่างๆ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกให้เกลือแร่อนินทรีย์ (inorganic salt) กลุ่มที่สองให้เกลือแร่อินทรีย์ที่อยู่ในรูปของ amino acid chelate ส่วนกลุ่มสุดท้ายให้เกลือแร่ผสมระหว่างกลุ่มที่หนึ่งและกลุ่มที่สองอย่างละครึ่ง ซึ่งในการศึกษาจะทดลองให้อาหารเสริมเกลือแร่แก่ปลาแต่ละกลุ่มเป็นเวลา 15 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่าเกลือแร่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาทุกกลุ่มที่ศึกษา แต่พบว่าปริมาณทองแดง (Cu) ในกระดูก ดับ และเลือดของปลาในกลุ่มที่ให้ amino acid chelate เป็นเกลือแร่เสริมมีปริมาณทองแดงสูงกว่าในกลุ่มที่ให้เกลือแร่อนินทรีย์เป็นเกลือแร่เสริม ซึ่งจากการศึกษาผู้วิจัยสรุปว่า amino acid chelate เป็นแหล่งเกลือแร่ที่ดีกว่าเกลือแร่ที่อยู่ในรูปสารประกอบอนินทรีย์

งานวิจัยของ Ashmead และคณะ ในปี 2004 [2] ศึกษาผลของ amino acid chelate ต่อการเจริญเติบโตของโคนมและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโคนม โดยการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเกลือแร่ต่างๆ ได้แก่ ทองแดง (Cu), แมงกานีส (Mn), สังกะสี (Zn), แมกนีเซียม (Mg) และโพแทสเซียม (K) ในน้ำนมที่ได้จากโคนมที่ทดลองให้อาหารเสริมเกลือแร่เปรียบเทียบระหว่างเกลือแร่อินทรีย์ (organic mineral) คือ amino acid chelate กับเกลือแร่อนินทรีย์ (inorganic mineral) จากการศึกษาพบว่า amino acid chelate เป็นแหล่งเกลือแร่ที่ดีกว่าเกลือแร่อนินทรีย์ ซึ่งน้ำนมจากโคกลุ่มที่ได้รับเกลือแร่จาก amino acid chelate พบว่ามีปริมาณไขมันและโปรตีนทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเกลือแร่อนินทรีย์ โดยผู้วิจัยได้สรุปว่าร่างกายสามารถใช้ประโยชน์จาก amino acid chelate ได้มากกว่าเกลือแร่อนินทรีย์เนื่องจากร่างกายสามารถดูดซึม amino acid chelate ได้ดีกว่า

งานวิจัยของ Paik และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 [3] ได้ศึกษาผลของเกลือแร่ที่อยู่ในรูปของคีเลต (chelate) ได้แก่ methionine Cu chelate และ methionine Zn chelate ต่อการเจริญเติบโตของไก่

และหมู โดยเปรียบเทียบกับเกลือแร่อนินทรีย์คือ copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) และ zinc oxide (ZnO) จากการศึกษาพบว่า methionine Cu chelate ทำให้น้ำหนักของไก่และหมูเพิ่มขึ้นมากกว่า copper sulfate และ methionine Zn chelate สามารถเพิ่มน้ำหนักของหมูได้มากกว่า zinc oxide เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า methionine Fe chelate ช่วยเพิ่มธาตุเหล็ก (Fe) ให้แก่ไข่แดงของไก่ได้มากกว่า ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ซึ่งจากผลการทดลองแสดงว่าเกลือแร่ที่อยู่ในรูปของคีเลตกับกรดอะมิโนสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและนำไปใช้ได้ดีกว่าเกลือแร่อนินทรีย์

2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 เอกสารและงานวิจัยเกี่ยวกับการเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะกับกรดอะมิโน

งานวิจัยของ Devereux และคณะ ปี ค.ศ. 1997 [12] ศึกษาและเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของแมงกานีส (Mn) กับกรดอะมิโน (amino acid) ได้แก่ L-leucine, glycine, L-valine, L-glutamine, L-theonine, L-tryptophan, L-phenylalanine, L-methionine, L-aspartic acid และ L-glutamic acid และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบด้วยเทคนิค IR spectroscopy โดยพิจารณาจากการเลื่อน (shift) ของแบนด์ (band) N-H stretching ที่เลขคลื่นประมาณ 3100 cm^{-1} และแบนด์ของ C=O stretching ที่เลขคลื่นประมาณ 1600 cm^{-1} และอาศัยข้อมูลจาก CHN analyzer เพื่อวิเคราะห์ร้อยละของปริมาณคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และไนโตรเจน (N) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของแมงกานีสกับกรดอะมิโนเท่ากับ 1:2

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Farias และคณะ ปี ค.ศ. 1999 [15] ที่พิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแคดเมียม (Cd) กับ glycine ด้วยเทคนิค IR spectroscopy จากการศึกษาพบว่าเกิดการเลื่อน (shift) ของพีคที่หมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (carboxyl) ของสารประกอบเชิงซ้อนโดยเปรียบเทียบกับ glycine อิสระ ซึ่งเกิดจากการสร้างพันธะระหว่างอะตอมออกซิเจน (O) กับอะตอมโลหะ และในปี ค.ศ. 2006 มีงานวิจัยของ Han และคณะ [13] ซึ่งศึกษาโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะ ได้แก่ ทองแดง (Cu), เหล็ก (Fe) และสังกะสี (Zn) กับ methionine ด้วยเทคนิค FT-IR ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเทคนิค FT-IR สามารถยืนยันการเกิดพันธะระหว่างโลหะกับกรดอะมิโน โดยเปรียบเทียบ IR สเปกตรัมระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนกับ methionine อิสระ และจากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนระหว่างโลหะกับ methionine เท่ากับ 1:2

งานวิจัยที่ศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค continuous variation (job's method) และ mole ratio method โดยใช้ UV-VIS spectroscopy ในการวัดค่าการ

ดูลักษณะการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน เช่นงานวิจัยของ Mizyed และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 [27] ได้ศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง fullerene (C60) กับ 1-methylpiperazine, 1-methylpyrrolidine, 1-methylpiperidine, triethylamine และ trihexylamine พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง C60 กับสารประกอบเอมีน (amine) ทุกชนิดที่ศึกษาในงานวิจัยนี้มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:1 ยกเว้น 1-methylpiperazine ที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:2 (C60:amine) และจากงานวิจัยของ Nezhadali ในปี ค.ศ. 2007 [28] ศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง iodoquinol กับ Co(II), Mn(II), Cd(II), Pb(II) และ Zn(II) โดยวิธี continuous variation และ mole ratio method ซึ่งจากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะกับ iodoquinol เท่ากับ 1:1

งานวิจัยของ Abd-Elmoneim และคณะ ปี ค.ศ. 2008 [16] ได้ศึกษาสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe(III) กับ phenylalanine และ glycine ด้วยเทคนิค IR และ Electron paramagnetic resonance โดยเปรียบเทียบระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe(III) เกิดพันธะกับ COO^- และ NH_3^+ ของกรดอะมิโน โดยมีอัตราส่วนของโลหะและกรดอะมิโนเท่ากับ 1:3 และในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถในการดูดซึมเกลือแร่ของหนูเปรียบเทียบระหว่างเกลือแร่ที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งเป็นเกลือแร่อินทรีย์กับเกลือแร่อนินทรีย์ และจากการศึกษาพบว่าร่างกายสามารถดูดซึมสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe(III) กับกรดอะมิโนได้ดีกว่า

งานวิจัยของ Stanila และคณะ ปี ค.ศ. 2009 [11] ศึกษาและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะ ได้แก่ ทองแดง (Cu), โคบอลต์ (Co) และ สังกะสี (Zn) กับ leucine โดยใช้เทคนิค FT-IR และ DSC ซึ่งพบว่าสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารเชิงซ้อนได้โดยเปรียบเทียบระหว่างกรดอะมิโนอิสระกับสารประกอบเชิงซ้อน จากเทคนิค FT-IR สามารถยืนยันการเกิดพันธะระหว่างไอออนโลหะกับอะตอมออกซิเจน (O) ที่หมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (carboxyl) และอะตอมไนโตรเจน (N) ที่หมู่ฟังก์ชันอะมิโน (amino) เนื่องจากเกิดการเลื่อน (shift) ของพีคในย่านของ C=O stretching และ N-H stretching และจากการศึกษาด้วยเทคนิค DSC สามารถยืนยันการเกิดพันธะระหว่างโลหะกับกรดอะมิโนได้โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิที่สารประกอบเชิงซ้อนเกิดการเปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับ leucine อิสระ และจากการศึกษาอัตราส่วนของโลหะกับ leucine ด้วยเทคนิค CHN analyzer พบว่ามีอัตราส่วนระหว่างโลหะกับ leucine เท่ากับ 1:2 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mamun และคณะในปี ค.ศ. 2010 [14] ที่ศึกษาวิธีการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอออนโลหะ (M^{2+}) ได้แก่ แมงกานีส (Mn), โคบอลต์ (Co), นิกเกิล (Ni), ทองแดง (Cu), สังกะสี (Zn), แคดเมียม (Cd) และปรอท (Hg) กับ methionine และพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ

เชิงซ้อนด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าสามารถยืนยันการเกิดพันธะระหว่าง -NH_3^+ และ -COO^- ของ methionine กับ ไอออนโลหะโดยเปรียบเทียบจาก IR สเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนกับ methionine อิสระ และศึกษาค่าคงที่ของอัตรา charge transfer ของโลหะในรูปสารประกอบเชิงซ้อน พบว่ามีค่าน้อยกว่าโลหะที่อยู่ในรูปเกลือ ซึ่งแสดงว่ามีการเกิดพันธะระหว่างโลหะกับ methionine โดยอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะกับ methionine เท่ากับ 1:2

2.5.2 เอกสารและงานวิจัยเกี่ยวกับการแยกและวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะกับกรดอะมิโน

งานวิจัยของ Yokoyama และคณะ ปี ค.ศ. 1996 [29] ศึกษาสถานะและวิเคราะห์กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก (nucleic acid), ครีตินิน (creatinine) และ bioactive amine ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ perchloric acid ทำหน้าที่เป็น ion-pair reagent ผสมในสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) และใช้ reverse phase C18 เป็นคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์ ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่าสามารถแยกสารแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์และสามารถใช้สถานะที่ศึกษาเพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ และในงานวิจัยของ Petritis และคณะ ปี ค.ศ. 1999 [30] ได้วิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ trifluoroacetic acid (TFA) เป็น ion-pair reagent และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของคอลัมน์ระหว่าง Purospher RP-18e, LiChrospher RP-Select B และ Supelcosil ABZ⁺ Plus ซึ่งเป็นคอลัมน์ reverse phase ทั้งหมด นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้เปรียบเทียบผลของ ion-pair reagent ต่อการแยกของกรดอะมิโน โดยเปรียบเทียบระหว่าง nonafluoropentanoic acid (NFPA), tridecafluoroheptanoic acid (TDFHA), heptafluorobutyric acid (HFBA) และ pentadecafluorooctanoic acid (PDFOA) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าจำนวนคาร์บอนของ ion-pair reagent มีผลต่อการแยกของกรดอะมิโน ต่อมาในปี ค.ศ. 2002 Petritis และคณะยังได้ศึกษาและเปรียบเทียบผลของเครื่องตรวจจับ (detector) ได้แก่ Chemiluminescent nitrogen detector (CLND), Evaporative light scattering detector (ELSO), Nuclear magnetic resonance spectrometer (NMR), Conductivity detector, Reflexive index, UV และ Electrospray quadupole mass spectrometry สำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโน โดยใช้ pentadecafluorooctanoic acid เป็น ion-pair reagent ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเครื่องตรวจจับหลายชนิดมีศักยภาพในการวิเคราะห์กรดอะมิโนได้โดยไม่ต้องเตรียมตัวอย่างด้วยการทำ derivatization ยกเว้น UV และ IR ที่วิเคราะห์กรดอะมิโนได้บางชนิดเท่านั้นเนื่องจากการรบกวนจากระบบของสารละลายเคลื่อนที่

งานวิจัยของ Zheng และคณะ ปี ค.ศ. 2000 [31] ศึกษาและวิเคราะห์ซิลิเนียม (Si) ที่อยู่ในรูปต่างๆ ได้แก่ selenite, selenate, selenocysteine, selenourea, selenomethionine, selenoethionine และ trimethyl-selenonium ion ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้สารละลายผสม ion-pair

reagent ประกอบด้วย 2.5 mM sodium 1-butesulfonate และ 8 mM tetramethylammonium hydroxide ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสามารถแยกสารประกอบอินทรีย์ของซีลีเนียม (Se) ทั้งที่เป็น neutral, anionic และ cationic ได้โดยใช้คอลัมน์ RP-C18 และในปี ค.ศ. 2000 มีงานวิจัยของ Kotrebai และคณะ [20] ซึ่งได้ศึกษาและพัฒนาเทคนิค HPLC เพื่อวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนซีลีเนียม โดยในการศึกษาได้เปรียบเทียบผลของจำนวนคาร์บอนของ perfluorinate carboxylic acid ที่ใช้เป็น ion-pair reagent ได้แก่ trifluoroacetic acid (TFA), pentafluoropropanoic acid (PEPA) และ heptafluorobutanoic acid (HFBA) โดยผสมในสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) และคอลัมน์ที่ใช้คือ reverse phase C18 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าจำนวนคาร์บอนมีผลต่อการแยกสารประกอบเชิงซ้อน selenium และพบว่า pH ของสารละลายเคลื่อนที่มีผลต่อการแยกและวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของซีลีเนียม

งานวิจัยของ Gosetti และคณะ ปี ค.ศ. 2007 [33] ศึกษาและพัฒนาเทคนิค HPLC MS/MS สำหรับวิเคราะห์สารประกอบซีลีเนียม (Se) ที่อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ โดยใช้ trifluoroacetic acid (TFA) เป็น ion-pair reagent จากการศึกษาพบว่าการใช้เทคนิค ion-pair reverse phase HPLC สามารถวิเคราะห์สารประกอบ selenium ได้โดยไม่ต้องเตรียมตัวอย่างด้วยการทำ derivatization ซึ่งเทคนิคนี้มีความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์สูง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยเรื่อง “การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนบางชนิดด้วยเทคนิค HPLC” มีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นแนวทางในการพิสูจน์เอกลักษณ์และวิเคราะห์ปริมาณเกลือแร่อินทรีย์ โดยมีขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัยดังต่อไปนี้

3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. 25% ammonium solution ; NH_3 , Merck
2. copper acetate monohydrate ; $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$, Lab. grade, BHD
3. copper standard solution ; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ in HNO_3 0.5 mol/L, 1000 mg/L, Merck
4. copper Sulfate ; $(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$, AR grade, Ajex Finechem Pty Ltd.
5. ethanol ; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 95%
6. glycine ; $\text{C}_2\text{H}_2\text{NO}_2$, $\geq 99\%$, Fluka
7. leucine ; $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$, 98.5%, BHD
8. L-glutamine ; $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich
9. L-methionine ; $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$, $\geq 99\%$, Fluka
10. methanol ; CH_3OH , $\geq 99\%$, Merck
11. nitric acid ; HNO_3 , 69.0-70.0%, J.T. Baker
12. phenylalanine ; $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$, $\geq 99\%$, Fluka
13. potassium bromide ; KBr , $\geq 99.5\%$, Fluka
14. tetrahydrofuran (THF) ; $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$, $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich
15. trifluoroacetic acid (TFA) ; $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$, $\geq 99\%$, Riedel-deHaën

3.2 เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์

1. เครื่อง Ultraviolet and Visible spectrophotometer (UV-VIS) ยี่ห้อ Hewlet Packard รุ่น HP-8453 UV-VIS spectrophotometer
2. เครื่อง Infrared spectrophotometer (IR) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX FT-IR system
3. เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DCS) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Pyris Diamond Differential Scanning Calorimeter
4. เครื่อง Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP – OES) ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 700-ES series ICP-OES
5. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ยี่ห้อ Water รุ่น Delta 600 ส่วนของ detector ใช้ UV-Vis detector ยี่ห้อ Water รุ่น 2487 Dual λ Absorbance Detector

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด

เตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด ได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine โดยการชั่ง copper acetate monohydrate ประมาณ 0.01 โมล ละลายในน้ำร้อน 25 mL เติมน้ำเอทานอล (ethanol) ร้อน 25 mL แล้วผสมกับสารละลายกรดอะมิโนขณะร้อน $\sim 70^{\circ}\text{C}$ ซึ่งสารละลายกรดอะมิโนนี้เตรียมโดยชั่งกรดอะมิโนแต่ละชนิด 0.02 โมล แล้วละลายด้วยน้ำร้อน 25 mL จากนั้นกวนสารละลายผสมและรักษาอุณหภูมิให้อยู่ที่ $\sim 70^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 min แล้วจึงทำให้สารละลายผสมเย็นลงโดยแช่ในอ่างน้ำแข็งจนเกิดตะกอนของสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น นำไปกรองแบบลดความดันเพื่อแยกตะกอน ล้างตะกอนด้วยเอทานอลเย็นและทิ้งให้แห้งใน decicator ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 การศึกษาหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด

ในงานวิจัยนี้ศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโน ได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine ด้วยเทคนิค continuous variation (job's method) และ mole ratio ซึ่งในงานวิจัยนี้จะศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนด้วยเทคนิค continuous variation และ mole ratio โดยการพิจารณา UV สเปกตรัมของสารเชิงซ้อนเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารละลายทองแดง (copper acetate) และสารละลายกรดอะมิโนแต่ละชนิด ซึ่งความยาวคลื่นที่เหมาะสมควร

เป็นความยาวคลื่นที่สารเชิงซ้อนดูดกลืนแสงได้สูงและไม่มีการรบกวนจากสารละลายอื่นๆ และในงานวิจัยจะศึกษาค่า molar absorptivity (ϵ) ของสารประกอบเชิงซ้อนแต่ละตัว โดยหาค่า ϵ ที่ความยาวคลื่นนั้นๆ ได้จากกฎเบียร์-แลมเบิร์ตคือ

$$A = \epsilon cl$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorption)
 C คือ ความเข้มข้นของสาร (M)
 l คือ ระยะทางที่แสงผ่านตัวอย่าง (cm)

3.3.2.1 วิธี continuous variation หรือ job's method [34]

การหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธี continuous variation หรือ job's method มีหลักการ คือผสมสารละลาย แคทไอออน (cation ; M) และ ลิแกนด์ (ligand ; L) ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน โดยให้ปริมาตรรวมของสารผสมคงที่ แต่อัตราส่วนโดยปริมาตรของสารละลาย M และ L ต่างๆ กัน นำสารละลายผสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (wavelength) ที่เหมาะสม แล้วสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorption) กับเศษส่วนปริมาตรของ M หรือปริมาตรของ L คือ $V_M/(V_M + V_L)$ หรือ $V_L/(V_M + V_L)$ ตามลำดับ ซึ่งจุดสูงสุดเกิดขึ้นที่ V_M/V_L เท่ากับอัตราส่วนของแคทไอออนและลิแกนด์ในสารเชิงซ้อน (หรือจุดต่ำสุด ถ้าสารเชิงซ้อนดูดกลืนน้อยกว่าตัวทำปฏิกิริยา)

ขั้นตอนในการทดลองเตรียมสารละลายเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดเพื่อวิเคราะห์มีดังนี้

สารละลายเชิงซ้อนของทองแดง กับ glycine

ผสมสารละลายทองแดงเข้มข้น 5.0 mM กับสารละลาย glycine เข้มข้น 5.0 mM ให้ปริมาตร(mL) สารละลายทองแดง : สารละลาย glycine ดังนี้ 0.00:1.00, 0.10:0.90, 0.20:0.80, 0.30:0.70, 0.40:0.60, 0.50:0.50, 0.60:0.40, 0.70:0.30, 0.80:0.20, 0.90:0.10 และ 1.00:0.00 แล้วปรับปริมาตรเป็น 3.00 mL ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายเชิงซ้อนของทองแดง กับ glutamine

ผสมสารละลายทองแดงเข้มข้น 5.0 mM กับสารละลาย glutamine เข้มข้น 5.0 mM ให้ปริมาตร(mL) สารละลายทองแดง : สารละลาย glutamine ดังนี้ 0.00:1.00, 0.10:0.90, 0.20:0.80, 0.30:0.70, 0.40:0.60, 0.50:0.50, 0.60:0.40, 0.70:0.30, 0.80:0.20, 0.90:0.10 และ 1.00:0.00 แล้วปรับปริมาตรเป็น 6.00 mL ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายเชิงซ้อนของทองแดง กับ methionine

ผสมสารละลายทองแดงเข้มข้น 0.5 mM กับสารละลาย methionine เข้มข้น 0.5 mM ให้ปริมาตร(mL) สารละลายทองแดง : สารละลาย methionine ดังนี้ 0.00:1.00, 0.10:0.90, 0.20:0.80, 0.30:0.70, 0.40:0.60, 0.50:0.50, 0.60:0.40, 0.70:0.30, 0.80:0.20, 0.90:0.10 และ 1.00:0.00 แล้วปรับปริมาตรเป็น 3.00 mL ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายเชิงซ้อนของทองแดง กับ leucine

ผสมสารละลายทองแดงเข้มข้น 0.5 mM กับสารละลาย leucine เข้มข้น 0.5 mM ให้ปริมาตร(mL) สารละลายทองแดง : สารละลาย leucine ดังนี้ 0.00:1.00, 0.10:0.90, 0.20:0.80, 0.30:0.70, 0.40:0.60, 0.50:0.50, 0.60:0.40, 0.70:0.30, 0.80:0.20, 0.90:0.10 และ 1.00:0.00 แล้วปรับปริมาตรเป็น 3.00 mL ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายเชิงซ้อนของทองแดง กับ phenylalanine

ผสมสารละลายทองแดงเข้มข้น 0.5 mM กับสารละลาย phenylalanine เข้มข้น 0.5 mM ให้ปริมาตร(mL) สารละลายทองแดง : สารละลาย phenylalanine ดังนี้ 0.00:1.00, 0.10:0.90, 0.20:0.80, 0.30:0.70, 0.40:0.60, 0.50:0.50, 0.60:0.40, 0.70:0.30, 0.80:0.20, 0.90:0.10 และ 1.00:0.00 แล้วปรับปริมาตรเป็น 3.00 mL ด้วยน้ำกลั่น

จากนั้นตั้งสารละลายผสมทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง และนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer แล้วหาอัตราส่วนระหว่าง ทองแดง กับกรดอะมิโนแต่ละชนิด โดยสร้างกราฟตามวิธีของ Job ซึ่งพลอตระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับ $V_L/(V_M + V_L)$ และ $V_M/(V_M + V_L)$ และนำค่าไปคำนวณหาเศษส่วนโมลของโลหะต่อลิแกนด์คือ

$$\text{เศษส่วนโมลของโลหะต่อลิแกนด์} = \frac{V_M/(V_M + V_L)}{V_L/(V_M + V_L)} = V_M/V_L$$

เมื่อ V_L = ปริมาตรของลิแกนด์หรือกรดอะมิโน

V_M = ปริมาตรของโลหะ

3.3.2.2 mole ratio method [34]

การหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธี mole ratio มีหลักการ คือเตรียมสารละลายผสมโดยให้ความเข้มข้นของไอออนโลหะ (metal ion ; M) คงที่ และความเข้มข้นของลิแกนด์ (ligand ; L) ต่างๆ กัน โดยให้ปริมาตรรวมของสารละลายผสมคงที่ จากนั้นวัดการดูดกลืนแสง (absorption) ของสารละลายที่ความยาวคลื่น (wavelength) ที่เหมาะสม แล้วสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับอัตราส่วนโดยโมลของ M และ L จะได้เส้นตรง 2

เส้นที่มี slope ต่างกัน เมื่อต่อเส้นตรงทั้งสองให้ตัดกันจะเป็นจุดที่อัตราส่วนโดยโมลที่เกิดสารเชิงซ้อน

ขั้นตอนในการทดลองเตรียมสารละลายเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับ กรดอะมิโนแต่ละชนิดเพื่อวิเคราะห์ดังนี้

สารละลายเชิงซ้อนของทองแดง กับ glycine

ผสมสารละลายทองแดงเข้มข้น 5.0 mM ปริมาตร 0.20 mL กับสารละลาย glycine เข้มข้น 10.0 mM ปริมาตรดังนี้ 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 และ 1.00 mL แล้วปรับปริมาตรเป็น 3.00 mL ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายเชิงซ้อนของทองแดง กับ glutamine

ผสมสารละลายทองแดงเข้มข้น 5.0 mM ปริมาตร 0.20 mL กับสารละลาย glutamine เข้มข้น 10.0 mM ปริมาตรดังนี้ 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 และ 1.00 mL แล้วปรับปริมาตรเป็น 6.00 mL ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายเชิงซ้อนของทองแดง กับ methionine

ผสมสารละลายทองแดงเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 0.20 mL กับสารละลาย methionine เข้มข้น 1.0 mM ปริมาตรดังนี้ 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 และ 1.00 mL แล้วปรับปริมาตรเป็น 3.00 mL ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายเชิงซ้อนของทองแดง กับ leucine

ผสมสารละลายทองแดงเข้มข้น 0.25 mM ปริมาตร 0.20 mL กับสารละลาย leucine เข้มข้น 0.5 mM ปริมาตรดังนี้ 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 และ 1.00 mL แล้วปรับปริมาตรเป็น 3.00 mL ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายเชิงซ้อนของทองแดง กับ phenylalanine

ผสมสารละลายทองแดงเข้มข้น 0.5 mM ปริมาตร 0.20 mL กับสารละลาย Phenylalanine เข้มข้น 1.0 mM ปริมาตรดังนี้ 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 และ 1.00 mL แล้วปรับปริมาตรเป็น 3.00 mL ด้วยน้ำกลั่น

จากนั้นตั้งสารละลายผสมทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายผสมที่เตรียมขึ้นไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer และหาอัตราส่วนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด โดยสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับอัตราส่วนของจำนวนโมลทองแดงต่อจำนวนโมลกรดอะมิโนตามวิธีการหาอัตราส่วนโดยโมล

3.3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน

งานวิจัยนี้จะพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC) โดยเปรียบเทียบ IR สเปกตรัม (IR spectrum) และ เทอร์โมแกรม (thermogram) ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนและกรดอะมิโนอิสระ

3.3.3.1 เทคนิค Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR)

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค FT-IR อาศัยการพิจารณาความแตกต่างของหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนอิสระ โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการอัดเม็ด (pellet method) มีขั้นตอนดังนี้

นำสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกับ potassium bromide (KBr) โดยปริมาณ KBr ต่อปริมาณของตัวอย่าง ประมาณ 99:1 จากนั้นอัดด้วยความดันสูงเพื่อให้เป็นแผ่นตัวอย่างโปร่งแสง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง IR spectrometer ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX FT-IR system ในช่วงเลขคลื่น $4000-400\text{ cm}^{-1}$

3.3.3.2 เทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC)

ศึกษาเอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค DSC โดยพิจารณาความแตกต่างของเทอร์โมแกรม (thermogram) ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนอิสระ การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ดังนี้

ชั่งตัวอย่าง 2-3 mg แล้วนำไป encapsulate ใน pan aluminium จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DSC ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Pyris Diamond Differential Scanning Calorimeter ในช่วงอุณหภูมิ $50-400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ด้วยอัตราการให้ความร้อนเท่ากับ $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$

3.3.4 การแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน

ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนทั้งทางคุณภาพและปริมาณ โดยศึกษา retention time ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงสำหรับสารประกอบเชิงซ้อนแต่ละตัว และสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (Limit of quantification; LOQ) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณทองแดงในตัวอย่างที่เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ทองแดง โดยตัวอย่างที่วิเคราะห์ในงานวิจัยมีทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง ซึ่งสมมติให้สารประกอบ

เชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine, leucine และ phenylalanine ที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยเป็นสารตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 1 เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine ตัวอย่างที่ 2 เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine และตัวอย่างที่ 3 เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ Phenylalanine ส่วนตัวอย่างที่ 4 เป็นตัวอย่างผสมระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine, leucine, phenylalanine และ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

3.3.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard) สำหรับการวิเคราะห์ทองแดงด้วยเทคนิค ICP-OES

เตรียมสารละลายทองแดงมาตรฐานเข้มข้น 100 mg/L โดยปิเปตสารละลายทองแดงมาตรฐาน (copper standard solution) เข้มข้น 1000 mg/L ปริมาตร 10 mL ใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย 0.2%(v/v) HNO_3 จากนั้นเจือจาง (dilute) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 5, 10, 15, 20 และ 30 mg/L โดยปิเปตสารละลายทองแดงมาตรฐานเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 1, 5, 10, 15, 20 และ 30 mL ใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย 0.2%(v/v) HNO_3

3.3.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับเทคนิค ICP-OES

ชั่งตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 40-50 mg ละลายด้วย 0.2%(v/v) HNO_3 จากนั้นปรับปริมาตรด้วย 0.2%(v/v) HNO_3 ในขวดปริมาตรขนาด 100 mL จากนั้นเจือจางตัวอย่างที่ 1-3 ลง 10 เท่า โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 5 mL ใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย 0.2%(v/v) HNO_3 ส่วนตัวอย่างที่ 4 เจือจางลง 20 เท่า โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 5 mL ใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย 0.2%(v/v) HNO_3

3.3.4.3 การเตรียมสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) สำหรับเทคนิค HPLC

ผสมสารละลายกรด trifluoroacetic acid (TFA) และ tetrahydrofuran (THF) ในน้ำปราศจากไอออน (deionize water) ให้มีความเข้มข้น 0.1% (v/v) และ 1% (v/v) ตามลำดับ จากนั้นปรับ pH ของสารละลายผสมให้อยู่ประมาณ 4.5 ด้วยสารละลาย ammonium (NH_3) เข้มข้น 1%(v/v)

3.3.4.4 สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์สำหรับเทคนิค HPLC

Instrument : HPLC ยี่ห้อ Water รุ่น Delta 60

Column : Ascentis™ C18, 5 μm , i.d. 15 cm x 4.6 mm

Mobile phase : สารละลายผสม 0.1% TFA และ 1% THF (pH 4.5)

Flow rate : 0.5 mL/min

Injection volume : 20 μL

Detector : UV-Vis detector ยี่ห้อ Water รุ่น 2487 Dual λ Absorbance Detector

Wavelength : 200 nm

3.3.4.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard) สำหรับการวิเคราะห์ทองแดงด้วยเทคนิค HPLC

เตรียมสารละลายสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine ความเข้มข้นในช่วง 5.2–25.8 mg/L โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวทำละลาย จากนั้นกรองสารละลายด้วย millipore filter ขนาด 0.45 μm แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์ด้วยเข็มฉีดยา (syringe) ขนาด 100 μL จากนั้นนำพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนแต่ละชนิด โดยในการวิเคราะห์จะทำซ้ำ 3 ครั้ง และสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine กับ phenylalanine ด้วยวิธีเดียวกัน โดยให้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 24.8–49.7 mg/L และ 4.2–12.6 mg/L ตามลำดับ

3.3.4.6 การหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ) ด้วยเทคนิค HPLC

ทำโดยการเติมสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ ลงไปในสารละลาย blank จนสามารถตรวจวัดสัญญาณได้ ทำการวิเคราะห์จำนวน 10 ซ้ำ แล้วนำพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) เพื่อนำไปหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ) ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{limit of detection (LOD)} = 3 \times \text{SD}$$

$$\text{limit of quantification (LOQ)} = 10 \times \text{SD}$$

3.3.4.7 การเตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับเทคนิค HPLC

ชั่งตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 8-10 mg ยกเว้นตัวอย่างที่ 3 ชั่งน้ำหนักประมาณ 4 mg ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ในขวดปริมาตรขนาด 100 mL จากนั้นเจือจางลงให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและปรับปริมาตรด้วยสารละลายเคลื่อนที่ จากนั้นกรองสารละลายด้วย millipore filter ขนาด 0.45 μm แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์

บทที่ 4

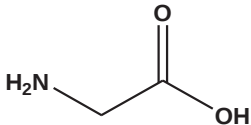
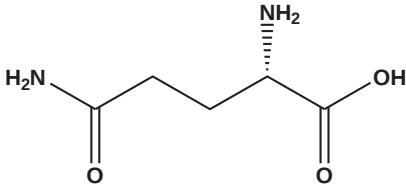
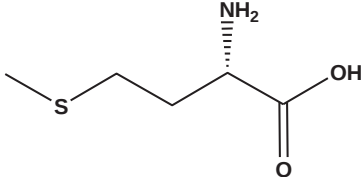
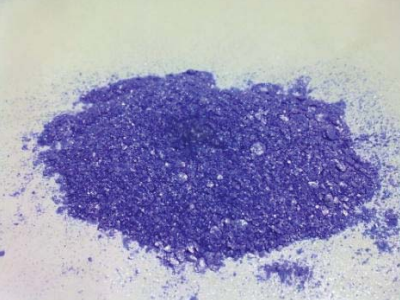
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

glycine และ glutamine จัดเป็นกรดอะมิโนชนิดที่ไม่จำเป็น (non-essential amino acid) เนื่องจากร่างกายสามารถสังเคราะห์เองได้เมื่อขาดนอกจากนี้ glycine ยังเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กที่สุดและมีหน้าที่เป็น neurotransmitter [35] อีกด้วย ส่วน methionine, leucine และ phenylalanine จัดเป็นกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) ที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ และเนื่องจากมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาวิธีการเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะกับ glycine [7,12,17], glutamine [12], methionine [5,6,12,13], leucine [11,12] และ phenylalanine [12] ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC) ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Devereux และคณะในปี ค.ศ. 1997 [12] โดยการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของแมงกานีสกับกรดอะมิโน ได้แก่ leucine, glycine, glutamine, phenylalanine, และ methionine และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบด้วยเทคนิค IR spectroscopy โดยเปรียบเทียบ IR สเปกตรัม (spectrum) ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอะมิโนอิสระ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Stanila [36] ในปี ค.ศ. 2007 ที่ศึกษาสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine และ phenylalanine ด้วยเทคนิค FT-IR [36] ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine ขึ้นและพิสูจน์เอกลักษณ์ของตะกอนสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค FT-IR และ DSC เพื่อยืนยันการเกิดพันธะระหว่างไอออนทองแดงกับกรดอะมิโน และนำสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนที่เตรียมได้ไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ปริมาณทองแดงที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน โดยอาศัยการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ร่วมกับข้อมูลจากการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค continuous variation และ mole ratio ซึ่งอาศัยเทคนิค UV-Vis spectroscopy ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorption) ของสารเชิงซ้อน โดยในงานวิจัยได้เปรียบเทียบปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค HPLC กับเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณทองแดง โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ[40-42]

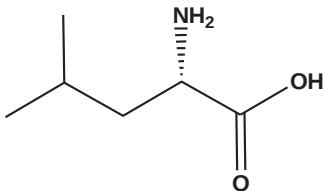
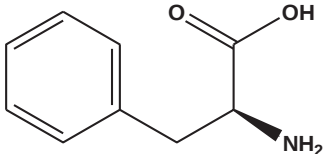
4.1 การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน

จากการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine พบว่าได้ตะกอนที่มีสีและลักษณะแตกต่างกันคือ สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine ได้ตะกอนที่มีลักษณะเป็นผง เนื้อละเอียด มีสีฟ้า ส่วนสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine, methionine และ leucine ตะกอนที่ได้มีสีม่วง โดยสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine และ leucine มีลักษณะเป็นผง เนื้อละเอียด ส่วนสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine ที่มีลักษณะเป็นเกร็ด และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine พบว่าตะกอนที่ได้มีลักษณะเป็นผง เนื้อละเอียด มีสีฟ้า-ม่วงอ่อน แสดงดังตารางที่ 4 ซึ่งตะกอนของสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 5 ชนิดที่เตรียมขึ้นนี้พบว่าสามารถละลายได้ในน้ำร้อน

ตารางที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน

ลิแกนด์	ลักษณะของสารประกอบเชิงซ้อน
glycine 	
glutamine 	
methionine 	

ตารางที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน(ต่อ)

ลิแกนด์	ลักษณะของสารประกอบเชิงซ้อน
leucine 	
phenylalanine 	

4.2 การหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน

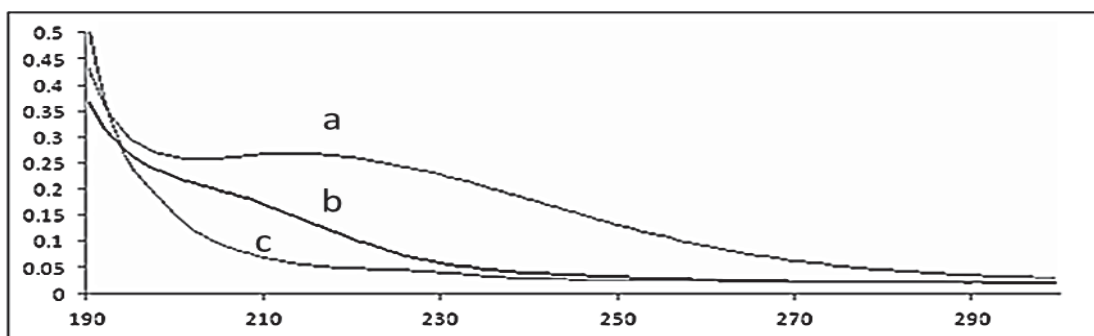
การศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนในงานวิจัยนี้ อาศัยเทคนิค continuous variation (job's method) และ mole ratio ร่วมกันเพื่อเป็นการยืนยันและเพิ่มความน่าเชื่อถือแก่ผลการวิจัย ซึ่งในการศึกษาจะติดตามผลด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ดังนั้นจึงต้องศึกษาหาความยาวคลื่น (wavelength) ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์โดยพิจารณาจาก UV สเปกตรัม (spectrum) ของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับสารละลายทองแดงและสารละลายกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งความยาวคลื่นที่เหมาะสมควรเป็นความยาวคลื่นที่สารประกอบเชิงซ้อนดูดกลืนแสงได้สูงและไม่มีการรบกวนจากสารอื่น โดยเฉพาะสารละลายทองแดงและกรดอะมิโนอิสระ

จาก UV สเปกตรัมของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine เปรียบเทียบกับสารละลายทองแดงและสารละลาย glycine อิสระ แสดงดังภาพที่ 3 พบว่าสเปกตรัมของสารละลายเชิงซ้อนดูดกลืนแสงได้สูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 220 nm ซึ่งแตกต่างจากสเปกตรัมของสารละลาย glycine อิสระอย่างชัดเจน แต่ที่ความยาวคลื่น 220 nm นี้พบว่ามี การรบกวนจากสารละลายทองแดงค่อนข้างมาก ผู้วิจัยจึงเลือกความยาวคลื่น 230 nm เพื่อใช้ศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่สารละลายเชิงซ้อนสามารถดูดกลืนแสงได้สูงและไม่มีการรบกวนจากสารละลายทองแดงและ glycine อิสระ เช่นเดียวกับสเปกตรัมของ

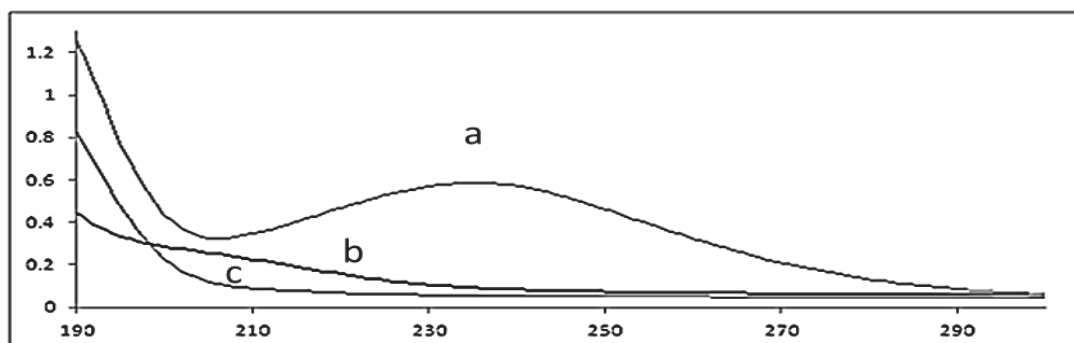
สารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine ที่พบว่ามีความแตกต่างจากสเปกตรัมของสารละลาย leucine อิสระอย่างชัดเจน โดยสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 220 nm แต่เนื่องจากการรบกวนจากสารละลายทองแดงสูง ดังภาพที่ 6 ดังนั้นความยาวคลื่นที่เหมาะสมต่อการศึกษาหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine คือที่ความยาวคลื่น 250 nm ซึ่งมีการรบกวนจากสารละลายทองแดงไม่สูงมากนักและไม่มีการรบกวนจากสารละลาย leucine ส่วนความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine มากที่สุดคือที่ความยาวคลื่น 235 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่สารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine ดูดกลืนแสงได้สูงที่สุด และไม่มีการรบกวนจากสารละลายทองแดงและสารละลาย glutamine อิสระ ดังสเปกตรัมในภาพที่ 4 และจากภาพที่ 5 จะเห็นว่าสเปกตรัมของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine มีลักษณะพีคที่คล้ายกับพีคของสารละลาย methionine อิสระมาก ทำให้ไม่สามารถยืนยันได้ว่าเกิดสารเชิงซ้อนขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้เลือกความยาวคลื่น 240 nm เพื่อใช้วิเคราะห์อัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine ซึ่งเป็นบริเวณที่พีคของสารเชิงซ้อนมีลักษณะของพีคที่กว้าง (broad) กว่าสเปกตรัมของ methionine อิสระ ซึ่งมีการรบกวนจากสารละลายทองแดงและ methionine อิสระเล็กน้อย เช่นเดียวกันเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสเปกตรัมระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine สารละลายทองแดงและ phenylalanine อิสระ แสดงดังภาพที่ 7 พบว่าสเปกตรัมของสารเชิงซ้อนมีลักษณะคล้ายกับสเปกตรัมของสารละลาย phenylalanine ทำให้ไม่สามารถยืนยันการเกิดสารเชิงซ้อนได้เช่นกัน แต่จากสเปกตรัมของสารเชิงซ้อนจะเห็นว่ามีความยาวของพีคที่สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้โดยไม่มีการรบกวนจากสารละลาย phenylalanine อิสระ ดังนั้นความยาวคลื่นสำหรับใช้ศึกษาหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนจะเลือกที่ความยาวคลื่น 240 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่มีการรบกวนจากทั้งสารละลายทองแดงและ phenylalanine เล็กน้อย โดยความยาวเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีค่า molar absorptivity (ϵ) ดังตารางที่ 5 ซึ่งค่า ϵ เป็นค่าคงที่ที่ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและความยาวคลื่นที่วัด มีประโยชน์มากในการคำนวณช่วงความเข้มข้นของสารให้มีค่าการดูดกลืนอยู่ในช่วงการใช้งานปกติ (working range) ซึ่งโดยทั่วไปนิยมวัดให้ค่าการดูดกลืนอยู่ในช่วง 0.1–1.0

ตารางที่ 5 ค่า molar absorptivity ของสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด

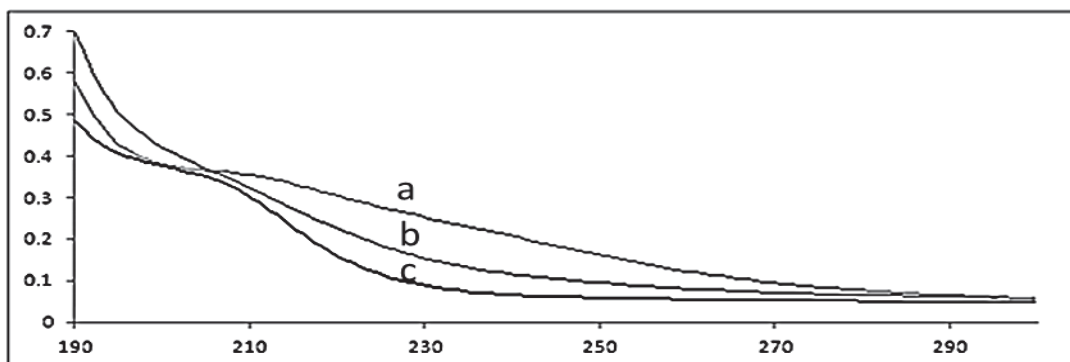
สารตัวอย่าง	molar absorptivity ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ glycine	$\epsilon_{230} : 543$
สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ glutamine	$\epsilon_{235} : 1620$
สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ methionine	$\epsilon_{240} : 3862$
สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ leucine	$\epsilon_{250} : 1841$
สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ phenylalanine	$\epsilon_{240} : 4891$



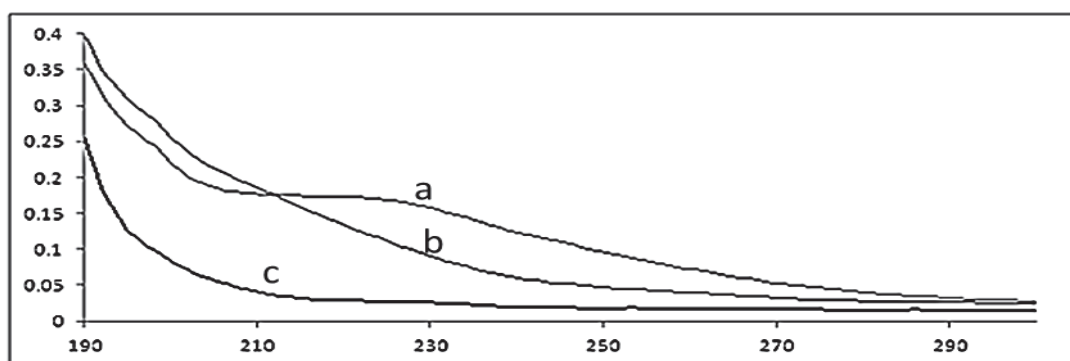
ภาพที่ 3 UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine (a), สารละลาย copper acetate (b) และสารละลาย glycine (c)



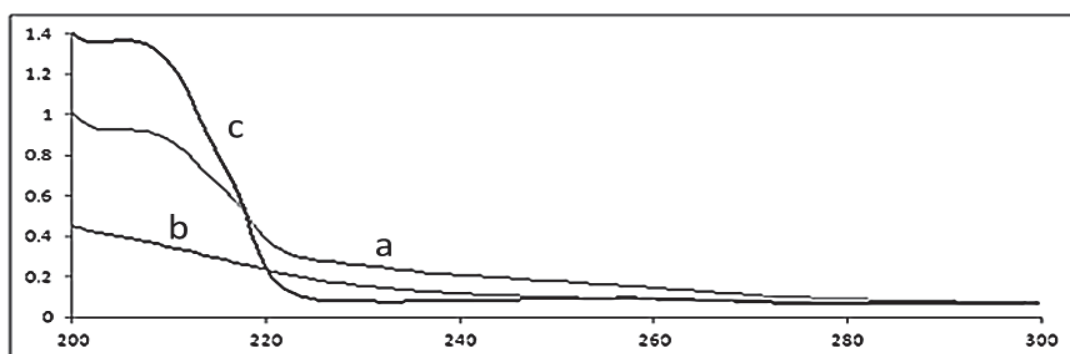
ภาพที่ 4 UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine (a), สารละลาย copper acetate (b) และสารละลาย glutamine (c)



ภาพที่ 5 UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine (a), สารละลาย copper acetate (b) และสารละลาย methionine (c)



ภาพที่ 6 UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine (a), สารละลาย copper acetate (b) และสารละลาย leucine (c)

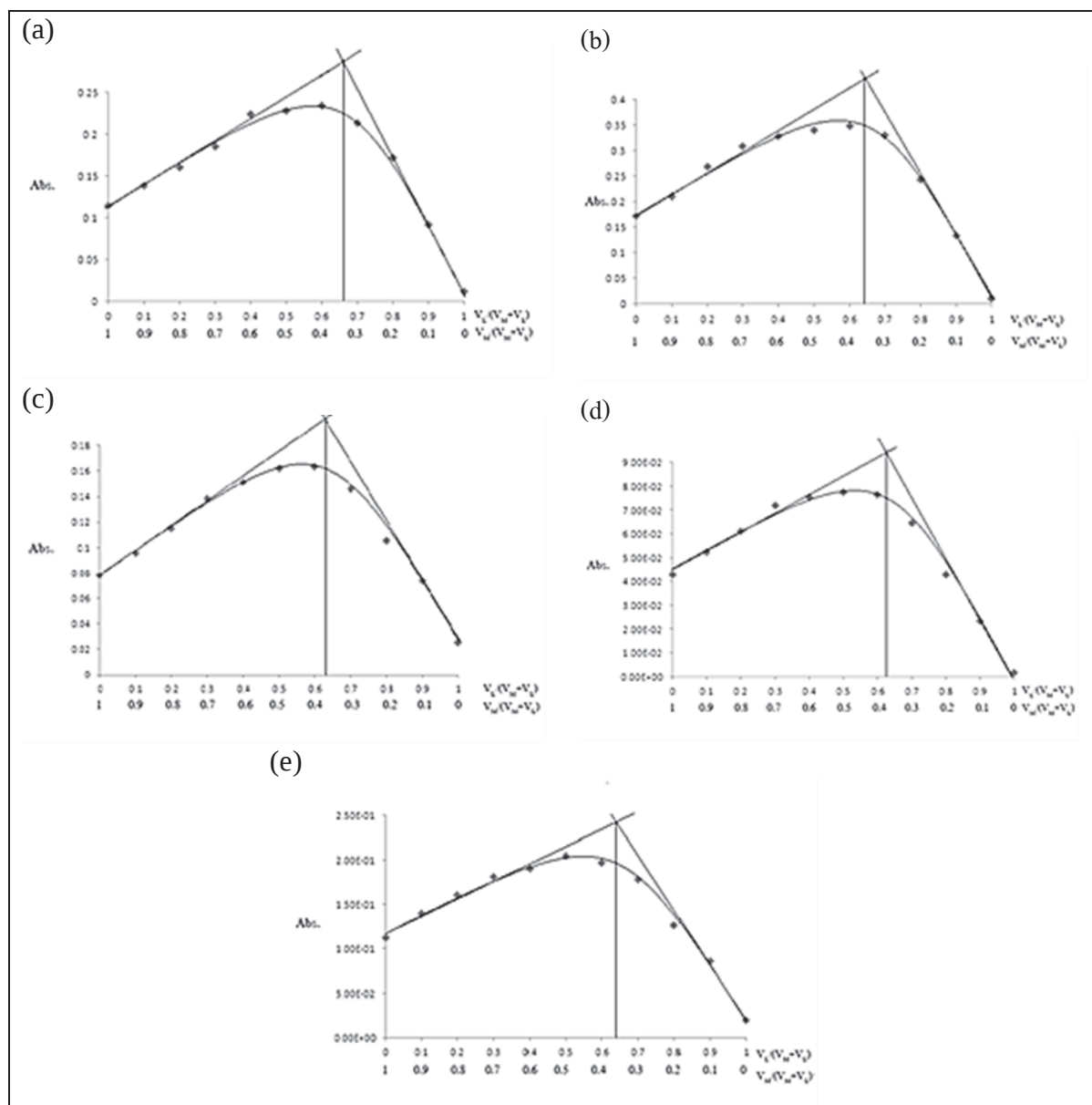


ภาพที่ 7 UV สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่างสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine (a), สารละลาย copper acetate (b) และสารละลาย phenylalanine (c)

การศึกษาหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ด้วยวิธี continuous variation หรือ job's method สามารถศึกษาได้โดยการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนกับเศษส่วนโมลของลิแกนด์ ซึ่งที่จุดสูงสุดเกิดขึ้นที่ V_M/V_L เท่ากับอัตราส่วนระหว่างทองแดงต่อกรดอะมิโน กราฟแสดงการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแสดงดังภาพที่ 8 ซึ่งในภาพ (a) แสดงการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine โดยที่จุดสูงสุดมีค่า V_M/V_L ประมาณ 0.34/0.66 เท่ากับ 1:1.9 คิดเป็นอัตราส่วนทองแดงต่อ glycine เท่ากับ 1:2 ส่วนในภาพ (b) และ (c) แสดงกราฟการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine และ phenylalanine พบว่าที่จุดสูงสุดมีค่า V_M/V_L ประมาณ 0.36/0.64 เท่ากับ 1:1.8 ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วน 1:2 และจากการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine แสดงดังภาพ (c) พบว่าที่จุดสูงสุดมีค่า V_M/V_L ประมาณ 0.38/0.62 เท่ากับ 1:1.7 คิดเป็นอัตราส่วน 1:2 ซึ่งมีค่าเท่ากับค่าที่ได้จากการหาอัตราส่วนเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine ดังภาพ (d) ดังนั้นจากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิดด้วยวิธี continuous variation มีค่าเท่ากับ 1:2

และจากการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค mole ratio method สามารถหาได้โดยการสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับอัตราส่วนโดยโมลของทองแดงและกรดอะมิโน ซึ่งจะได้เส้นตรง 2 เส้นที่มีความชัน (slope) ต่างกัน และเมื่อต่อเส้นตรงทั้งสองให้ตัดกันจะเป็นจุดที่อัตราส่วนโดยโมลที่เกิดสารเชิงซ้อน จากการศึกษาพบว่าจุดที่เส้นตรงทั้งสองตัดกันมีค่าอัตราส่วนของทองแดงต่อกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิดที่ศึกษาในงานวิจัยนี้มีค่าเท่ากับ 1:2 ดังภาพที่ 9 ซึ่งสอดคล้องกับเทคนิค continuous variation

ดังนั้นจากการศึกษาหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine ด้วยเทคนิคทั้งสองพบว่ามีอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเท่ากัน โดยมีอัตราส่วนระหว่างทองแดงต่อกรดอะมิโนเท่ากับ 1:2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค CHN analyzer เช่น งานวิจัยของ Han และคณะ [13] ในปี 2006 และ Mamun และคณะ [14] ในปี ค.ศ. 2010 ซึ่งพบว่าอัตราส่วนระหว่างทองแดงกับ methionine เท่ากับ 1:2 และงานวิจัยของ Stanila และคณะ ในปี ค.ศ. 2007 [36] พบว่าอัตราส่วนระหว่างทองแดงกับ methionine และ phenylalanine เท่ากับ 1:2 และต่อมาในปี 2009 [11] Stanila ได้ศึกษาและศึกษาเอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ leucine โดยพบว่าอัตราส่วนระหว่างทองแดงกับ leucine เท่ากับ 1:2



ภาพที่ 8 กราฟการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนด้วยวิธี

continuous variation หรือ job's method

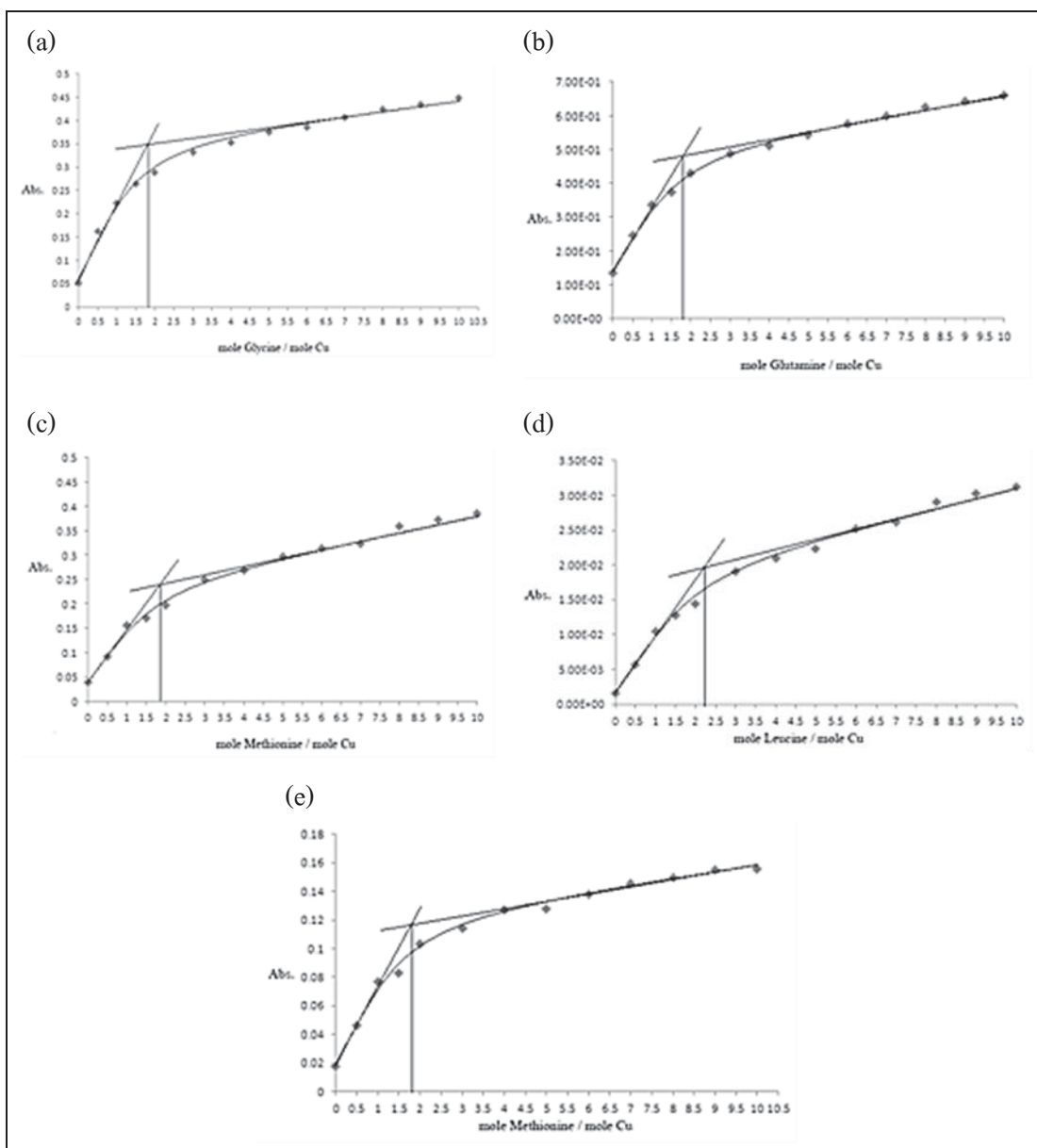
(a) สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine

(b) สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine

(c) สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine

(d) สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine

(e) สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine



ภาพที่ 9 กราฟการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนด้วยวิธี

mole ratio method

(a) สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine

(b) สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine

(c) สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine

(d) สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine

(e) สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine

4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยนี้ อาศัยเทคนิค Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้และน่าเชื่อถือในการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบเชิงซ้อน ผลจากการศึกษามีดังนี้

4.3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค FT-IR

เทคนิค FT-IR เป็นเทคนิคที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญภายในโครงสร้างของโมเลกุล ดังนั้นจาก IR สเปกตรัม (spectrum) สามารถยืนยันการสร้างพันธะระหว่างไอออนของทองแดงกับกรดอะมิโนได้ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะพีคและตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) ของแบนด์ (bands) ที่สำคัญระหว่าง IR สเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนเปรียบเทียบกับ IR สเปกตรัมของกรดอะมิโนอิสระแต่ละชนิด โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนที่เป็นของแข็งในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิค transmission ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR มีหลักการคือให้แสงอินฟราเรด (Infrared) ส่องผ่านตัวอย่างและตกสู่ตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) โดยเทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งตัวอย่างที่เป็นของแข็ง (solid) ของเหลว (liquid) และก๊าซ (gas) และสำหรับตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสามารถเตรียมตัวอย่างได้ในรูปของ KBr pellet โดยผลจากการเปรียบเทียบ IR สเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนกับ IR สเปกตรัมของกรดอะมิโนอิสระ แสดงดังภาพที่ 10-14 และตารางที่ 6

เมื่อพิจารณา IR สเปกตรัมของกรดอะมิโนอิสระทั้ง 5 ชนิด คือ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine พบว่าพีคสำคัญที่แสดงการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนคือพีคของหมู่ฟังก์ชัน -NH_3^+ ที่ให้แบนด์ (band) การสั่นแบบยืด N-H stretching ที่มีลักษณะกว้าง (broad) และมีความเข้ม (intensity) สูงในย่าน $3100\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ จากสเปกตรัมในภาพที่ 10-14 จะเห็นว่าพีคนี้ขยายไปจนถึงเลขคลื่นประมาณ 2000 cm^{-1} ซึ่งเกิดจากมีแบนด์รวม (combination bands) และแบนด์โอเวอร์โทน (overtone bands) โดยมีแบนด์สำคัญอยู่ที่ประมาณ $2000\text{--}2220\text{ cm}^{-1}$ [12,37,38] แต่เมื่อพิจารณาแบนด์ของ N-H stretching ของสเปกตรัมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน พบว่ามีการหายไปของแบนด์รวมและแบนด์โอเวอร์โทนทำให้พีคมีลักษณะแหลมกว่าและเกิดการเลื่อน (shift) ไปที่ย่าน $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเกิดจากหมู่ฟังก์ชัน -NH_3^+ ของกรดอะมิโนถูกดึงโปรตอนออกไปกลายเป็น -NH_2 และเกิดพันธะโคออร์ดิเนต (coordinate) ขึ้นกับไอออนทองแดงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Devereux [12] และ Mamun [14]

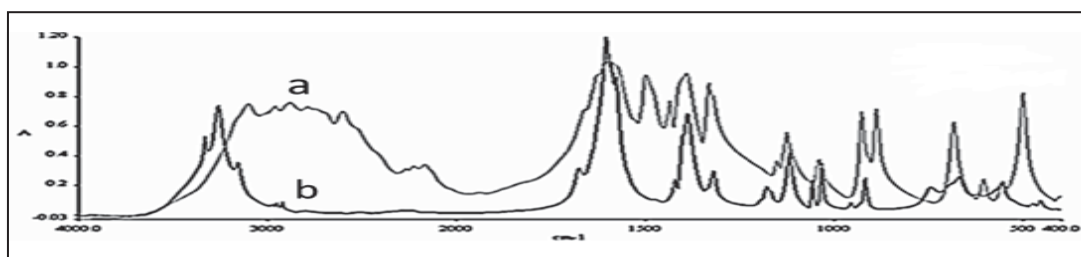
จากการพิจารณาสเปกตรัมของกรดอะมิโนอิสระในย่าน $1600-1590\text{ cm}^{-1}$ และย่าน 1400 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ C=O stretching แบบไม่สมมาตร (asymmetry) และ C=O stretching แบบสมมาตร (symmetry) ของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล ($-\text{COO}^-$) ตามลำดับ [23] จากสเปกตรัมในภาพที่ 10-14 เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด พบว่าพีคในย่าน $1600-1590\text{ cm}^{-1}$ และย่าน 1400 cm^{-1} ของสารประกอบเชิงซ้อนมีลักษณะที่แหลมกว่าและเกิดการเลื่อน (shift) ของพีคไปที่เลขคลื่นที่ต่างจากกรดอะมิโนอิสระ ดังตารางที่ 5 ซึ่งแสดงว่าเกิดพันธะขึ้นระหว่างไอออนทองแดงกับอะตอมออกซิเจน (O) ของหมู่ฟังก์ชัน $-\text{COO}^-$ ของกรดอะมิโน นอกจากนี้ยังพบว่าสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ glycine มีการหายไปของพีคที่เลขคลื่น 504 cm^{-1} ซึ่งพีคนี้ปรากฏอยู่ในสเปกตรัมของกรด glycine อิสระ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hartle [17] โดย Hartle อธิบายว่าการหายไปของพีคที่เลขคลื่น 504 cm^{-1} เกิดจากการสร้างพันธะระหว่างหมู่ฟังก์ชัน $-\text{COO}^-$ ของ glycine กับสังกะสี (Zn) ดังนั้นผู้วิจัยจึงคาดว่า การหายไปของพีคที่เลขคลื่น 504 cm^{-1} ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine ในงานวิจัยนี้จะเกิดจากการเกิดพันธะระหว่าง $-\text{COO}^-$ ของ glycine กับทองแดงเช่นเดียวกัน และจากสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนจะเห็นว่าไม่มีแบนด์ในย่านที่เลขคลื่นมากกว่า 3450 cm^{-1} ซึ่งเป็นแบนด์ที่เกิดจากการสั่นแบบยืด O-H stretching แสดงว่าไม่มีโมเลกุล (molecule) ของน้ำอยู่ในสารประกอบเชิงซ้อน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mamun [14] ที่ศึกษาและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงและโลหะอื่นๆ กับ Methionine ด้วยเทคนิค FT-IR โดย Mamun สรุปจากสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่พบแบนด์ที่มีเลขคลื่นสูงกว่า 3450 cm^{-1} ว่าไม่มีโมเลกุลของน้ำอยู่ในสารประกอบเชิงซ้อน

และจากรูปที่ 15 แสดง IR สเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนอิสระแต่ละชนิด (ภาพ a – e) และ copper acetate monohydrate (ภาพ f) ซึ่งจากสเปกตรัมจะเห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนทุกตัวมีการเลื่อนของพีคในย่านของ N-H stretching เมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนอิสระ แสดงว่ามีการสร้างพันธะระหว่างอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโนกับอะตอมทองแดง และจากสเปกตรัมจะเห็นว่ามีการเลื่อนของพีคในย่าน C=O stretching ทั้งแบบสมมาตรและแบบไม่สมมาตร ซึ่งแสดงว่าเกิดพันธะระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมทองแดง และเมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนกับสเปกตรัมของ copper acetate monohydrate ร่วมด้วยจะเห็นว่าพีคของสารประกอบเชิงซ้อนไม่ได้เกิดจากการตกตะกอนร่วมกันระหว่างกรดอะมิโนกับ copper acetate monohydrate ดังนั้นแสดงว่าสารประกอบเชิงซ้อนเกิดจากการสร้างพันธะระหว่างไอออนทองแดง

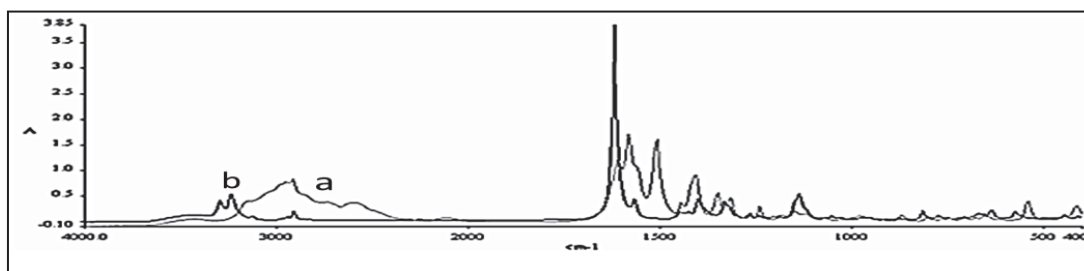
กับกรดอะมิโน โดยเกิดพันธะระหว่างอะตอมทองแดงกับอะตอมออกซิเจนของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลและอะตอมไนโตรเจนของหมู่ฟังก์ชันอะมิโนของกรดอะมิโน

ตารางที่ 6 ข้อมูล IR ของกรดอะมิโนอิสระและสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน

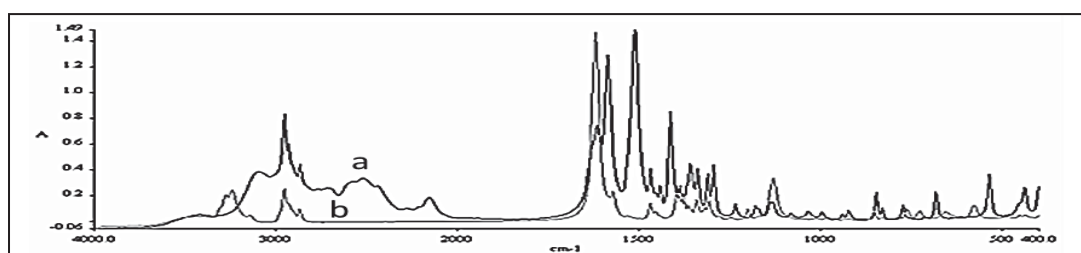
สารตัวอย่าง	เลขคลื่น (wave number) cm^{-1}		
	N – H stretching	C=O stretching	
		asymmetry	symmetry
glycine อิสระ	2888	1590	1396
สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ glycine	3264	1606	1391
glutamine อิสระ	2930	1587	1411
สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ glutamine	3203	1618	1427
methionine อิสระ	2917	1584	1411
สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ methionine	3242	1621	1427
leucine อิสระ	2953	1587	1416
สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ leucine	3242	1619	1396
phenylalanine อิสระ	3031	1563	1411
สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ phenylalanine	3333	1622	1456



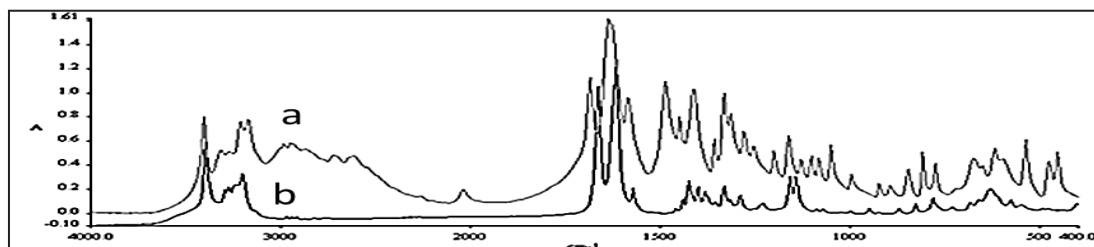
ภาพที่ 10 IR สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง glycine (a) และ สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine (b)



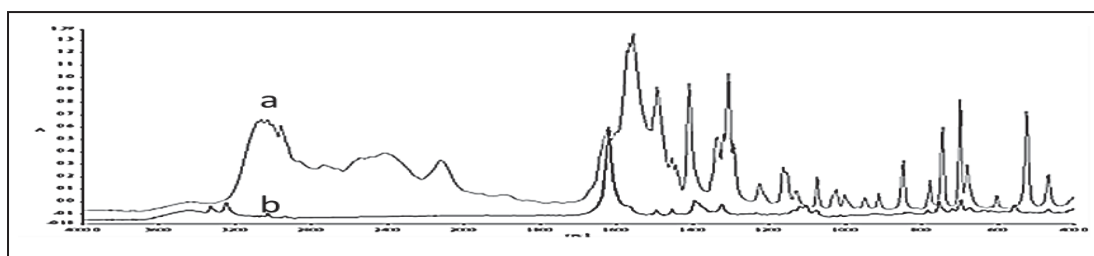
ภาพที่ 11 IR สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง glutamine (a) และ สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine (b)



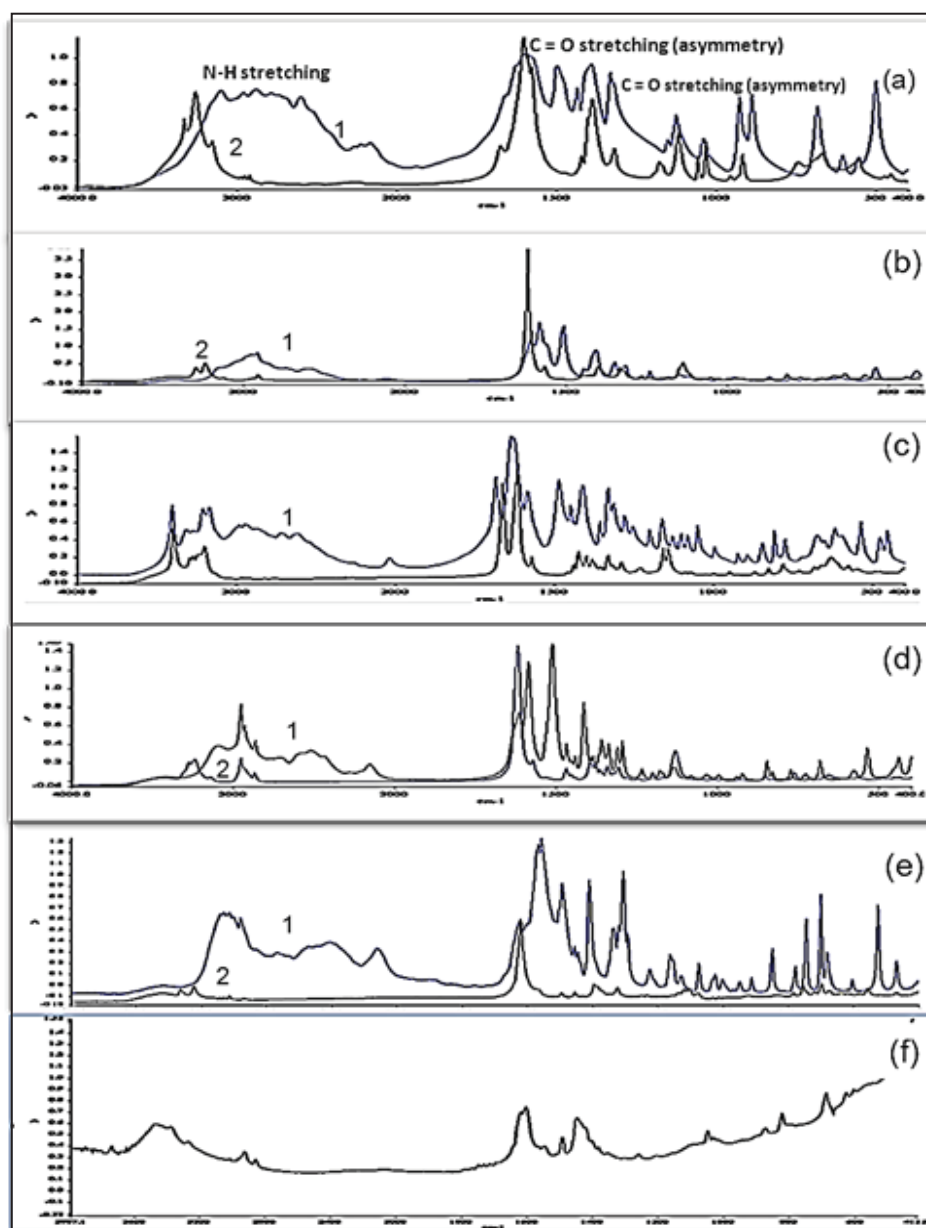
ภาพที่ 12 IR สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง methionine (a) และ สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine (b)



ภาพที่ 13 IR สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง leucine (a) และ สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine (b)



ภาพที่ 14 IR สเปกตรัมเปรียบเทียบระหว่าง phenylalanine (a) และ สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine (b)



ภาพที่ 15 IR สเปกตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนอิสระและ copper acetate monohydrate

(a) glycine (1), สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ glycine (2)

(b) glutamine (1), สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ glutamine (2)

(c) methionine (1), สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ methionine (2)

(d) leucine (1), สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ leucine (2)

(e) phenylalanine (1), สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ phenylalanine (2)

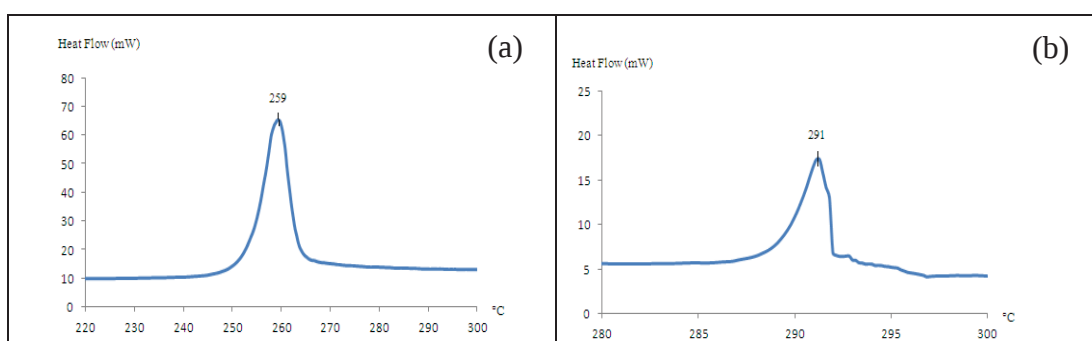
(f) copper acetate monohydrate

4.3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค DSC

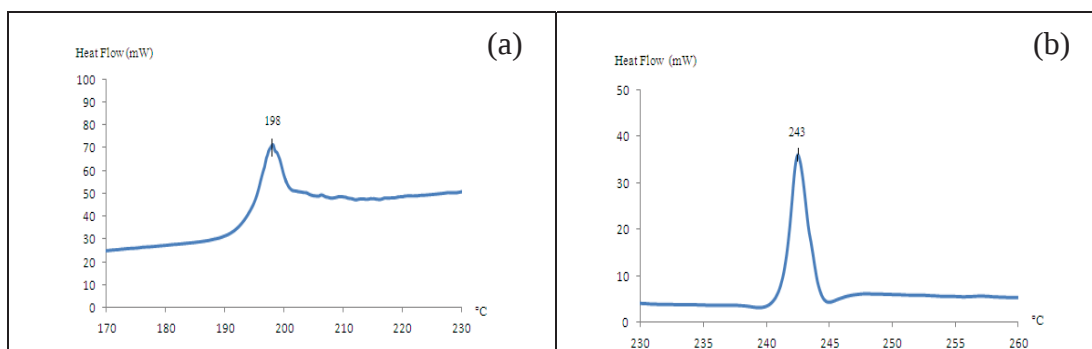
เทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางความร้อน (thermal analysis) ที่นิยมสำหรับวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ (physical property) ของสารมากที่สุดวิธีหนึ่ง ซึ่งข้อมูลที่ได้จากเทคนิคนี้มีทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative) และเชิงปริมาณ (quantitative) หลักการคือวัดอุณหภูมิและปริมาณความร้อนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงความร้อน (thermal transition) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและ/หรือทางเคมี เปรียบเทียบกับอุณหภูมิหรือเวลา ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง DSC เทอร์โมแกรม (thermogram) ของสารประกอบเชิงซ้อนเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนอิสระจึงสามารถยืนยันการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้[9]

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค DSC แสดงเทอร์โมแกรมดังภาพที่ 16-20 และตารางที่ 7 โดยเทอร์โมแกรมของ glycine, glutamine, methionine และ leucine พบพีก endothermic ที่มีจุดสูงสุดของพีกที่อุณหภูมิ 259, 198, 282 และ 287°C ตามลำดับ ส่วน phenylalanine พบว่ามีพีก endothermic 2 พีก คือที่อุณหภูมิ 265 และ 289°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine เกิดการหลอมเหลว และเนื่องจาก phenylalanine มีอุณหภูมิที่เกิดการหลอมเหลว 2 อุณหภูมิ แสดงว่า phenylalanine ที่ใช้ในงานวิจัยนี้อาจไม่บริสุทธิ์ เนื่องจากสารที่บริสุทธิ์จะมีจุดหลอมเหลวเพียงอุณหภูมิเดียว และเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิที่สารประกอบเชิงซ้อนเกิดการหลอมเหลว พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของพีก endothermic ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine ไปที่อุณหภูมิ 291, 243, 260, 283 และ 258°C ตามลำดับ เมื่อดูจุดหลอมเหลวของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine และ glutamine เมื่อเปรียบเทียบกับจุดหลอมเหลวของ glycine และ glutamine อิสระ ตามลำดับ พบว่าจุดหลอมเหลวของสารประกอบเชิงซ้อนมีอุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากมวลโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนทำให้จุดหลอมเหลวสูงขึ้น แต่เมื่อพิจารณาจุดหลอมเหลวของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine, leucine และ phenylalanine เปรียบเทียบกับอุณหภูมิของ methionine, leucine และ phenylalanine อิสระ ตามลำดับ พบว่าอุณหภูมิของจุดหลอมเหลวลดลง ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าเป็นผลมาจากแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อนมีค่าน้อยกว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของกรดอะมิโนอิสระส่งผลให้อุณหภูมิจุดหลอมเหลวของสารประกอบเชิงซ้อนต่ำกว่ากรดอะมิโนอิสระ ซึ่งอุณหภูมิของจุดหลอมเหลวที่เปลี่ยนแปลงไปของสารประกอบเชิงซ้อนเมื่อเทียบกับกรดอะมิโนอิสระนี้ แสดงว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยนี้มีสมบัติที่แตกต่างจากกรดอะมิโนอิสระ โดยสารประกอบเชิงซ้อนเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างไอออนทองแดงกับกรดอะมิโน และได้เกิดจากการตกตะกอนร่วมกันของ copper acetate

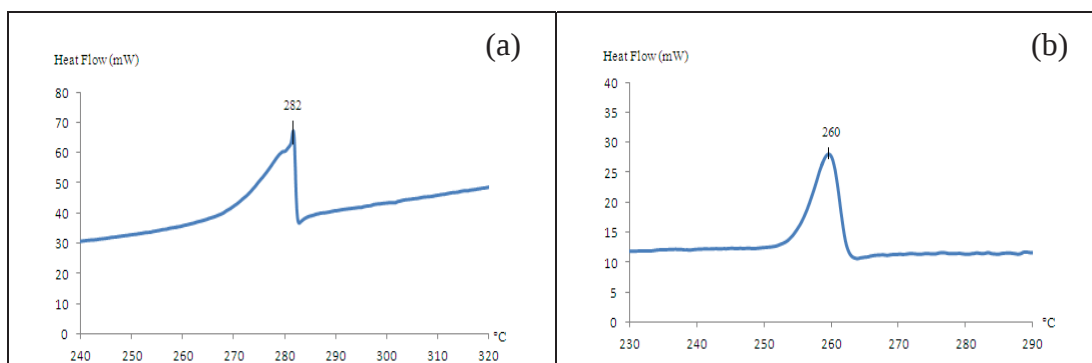
monohydrate กับกรดอะมิโน นอกจากนี้จากเทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด ซึ่งพบว่าไม่มีพิกของจุดหลอมเหลวเพียงพิกเดียวเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยนี้มีความบริสุทธิ์ และผลจากงานวิจัยนี้ยังพบว่าจุดหลอมเหลวของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine เกิดกระบวนการหลอมเหลว (melting process) ที่อุณหภูมิ 255°C จากการศึกษาของ Stanila [36] ด้วยเทคนิค thermogravimetric analysis (TGA)



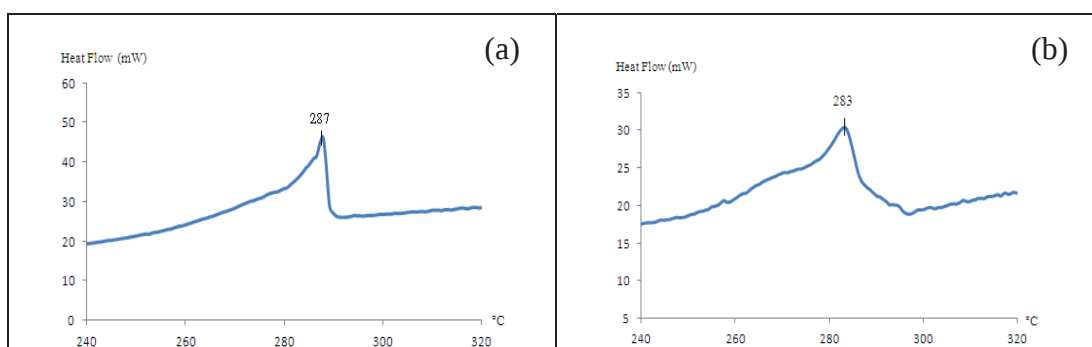
ภาพที่ 16 DSC เทอร์โมแกรมเปรียบเทียบระหว่าง glycine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine (b)



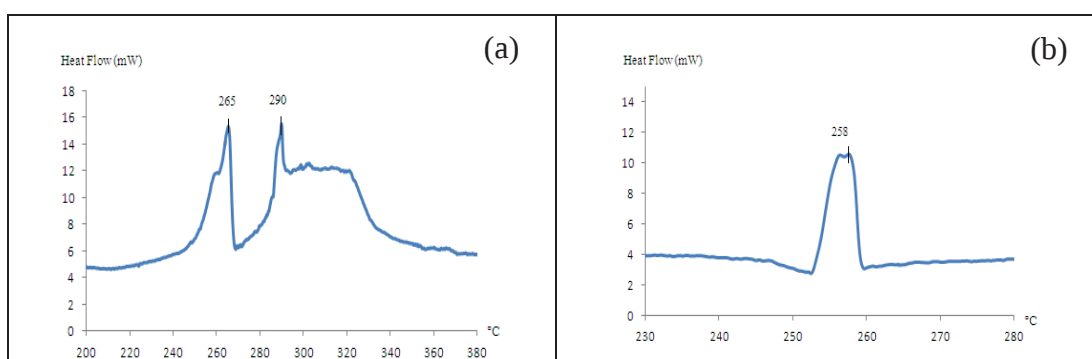
ภาพที่ 17 DSC เทอร์โมแกรมเปรียบเทียบระหว่าง glutamine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine (b)



ภาพที่ 18 DSC เทอร์โมแกรมเปรียบเทียบระหว่าง methionine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine (b)



ภาพที่ 19 DSC เทอร์โมแกรมเปรียบเทียบระหว่าง leucine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine (b)

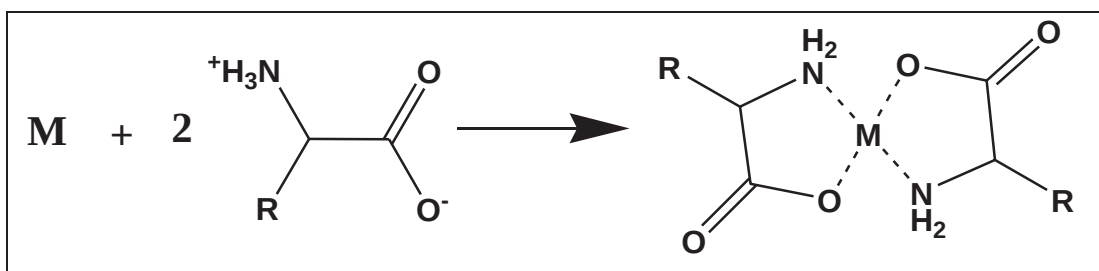


ภาพที่ 20 DSC เทอร์โมแกรมเปรียบเทียบระหว่าง phenylalanine (a) และสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine (b)

ตารางที่ 7 อุณหภูมิที่สารประกอบเชิงซ้อนและกรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลง

สารตัวอย่าง	อุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลง °C
glycine	259
สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine	291
glutamine	198
สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine	243
methionine	282
สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine	260
Leucine	287
สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine	283
Phenylalanine	265, 289
สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine	258

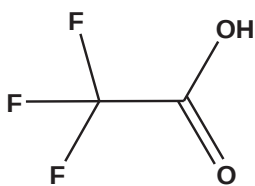
เมื่อพิจารณาผลจากเทคนิค FT-IR และ DSC ร่วมกับผลจากการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน สามารถสรุปโครงสร้างและสมการการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนได้ดังภาพที่ 21 ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนมีการปิดวงแบบ five membered ring โดยเกิดจากการสร้างพันธะโคเวเลนต์ (covalent bonding) ระหว่างอะตอมของทองแดงกับอะตอมของออกซิเจนและอะตอมไนโตรเจนของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลและอะมิโนของกรดอะมิโน ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Han [13] ที่ศึกษาโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine และงานวิจัยของ Stanila [11, 36] ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ด้วยเทคนิค FT-IR และ DSC และสรุปว่าการเกิดพันธะระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนและมีโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนเช่นเดียวกับที่ผู้วิจัยสรุป โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะและการเลื่อน (shift) ของพีค N-H stretching และ C=O stretching เปรียบเทียบระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอะมิโนอิสระ โดยสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า “Copper amino acid chelates” ตาม The American Association of Feed Control Officials (AAFCO) และ The National Nutritional Food Association (NNFA) ซึ่งให้คำนิยามสำหรับ amino acid chelate ว่าเป็น “ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไอออนโลหะ (metal ion) จากเกลือที่ละลายได้กับกรดอะมิโน โดยเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างไอออนโลหะกับกรดอะมิโนจำนวน 1-3 โมล (เกิด 2 โมล มากกว่า)” [20]



ภาพที่ 21 สมการเคมีการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโน

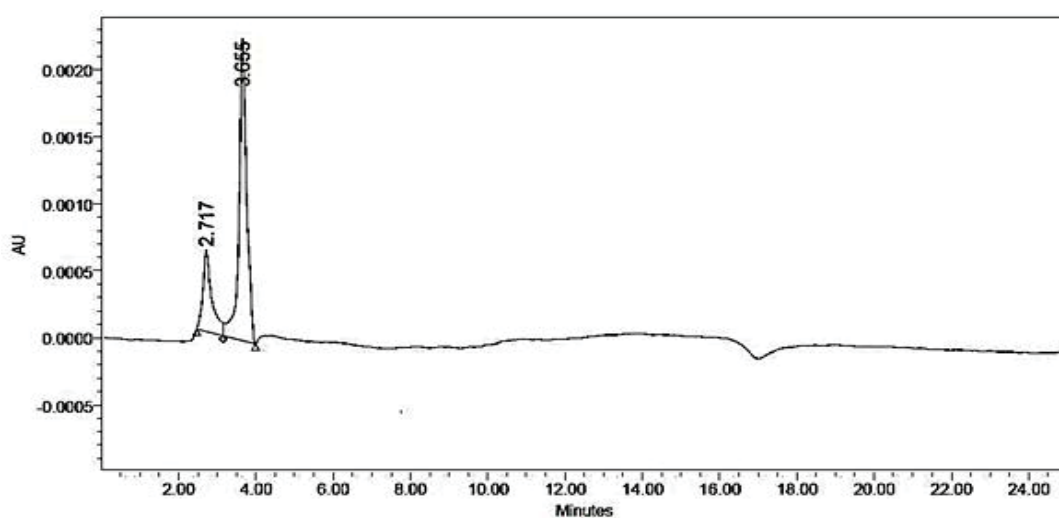
4.4 การวิเคราะห์ปริมาณทองแดงที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับกรดอะมิโน ด้วยเทคนิค HPLC

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิค HPLC โดยใช้วิธี ion pair เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยนี้ ซึ่งเทคนิคนี้เรียกว่า Ion-pair Reversed-phase Liquid Chromatography หรือ IP-RPLC [29-33] โดยสภาวะที่ใช้ศึกษาคือ ใช้คอลัมน์ reversed-phase C18 วิเคราะห์ด้วยระบบ isocratic และตั้งเครื่องตรวจสัญญาณ UV-VIS ที่ความยาวคลื่นแสง 200 nm โดยใช้ trifluoroacetic acid (TFA) ทำหน้าที่เป็น ion-pair reagent ผสมในสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่ง TFA เป็น ion pairing agent ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์โดยเฉพาะกรดอะมิโนและสารประกอบของโลหะกับกรดอะมิโน เช่น สารประกอบซีลีเนียม (Se) ได้แก่ selenomethionine selenocystine และ selenocystamine เป็นต้น [18, 27, 31] นอกจากนี้ TFA ยังมีความบริสุทธิ์สูงและสามารถละลายน้ำได้จึงสะดวกและง่ายในการเตรียมเพื่อใช้ในวิเคราะห์ โครงสร้างของ TFA แสดงดังภาพที่ 22 โดยการทดลองใช้ความเข้มข้นของ TFA เท่ากับ 0.1% (v/v) และเนื่องจาก TFA มีสมบัติที่เป็นกรด ซึ่งทำให้คอลัมน์เสื่อมคุณภาพได้ ในการทดลองจึงต้องปรับ pH ของสารละลายเคลื่อนที่ให้อยู่ที่ pH ประมาณ 4.5 และจากการศึกษาโครมาโทแกรม (chromatogram) ของสารละลายเคลื่อนที่พบพีคที่ retention times ประมาณ 2.7 และ 3.7 min ดังภาพที่ 23 ซึ่งพบว่าซ้อนทับ (overlap) กับ glycine และ glutamine จากการศึกษารetention times ของกรดอะมิโนอิสระได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine พบพีคที่ของ glycine และ glutamine ซ้อนทับกัน (overlap) ที่ retention time เท่ากับ 3.4 min ส่วน methionine, leucine และ phenylalanine พบพีคที่ retention times เท่ากับ 4.5, 5.3 และ 9.7 ตามลำดับ ซึ่งโครมาโทแกรมแสดงดังภาพที่ 24

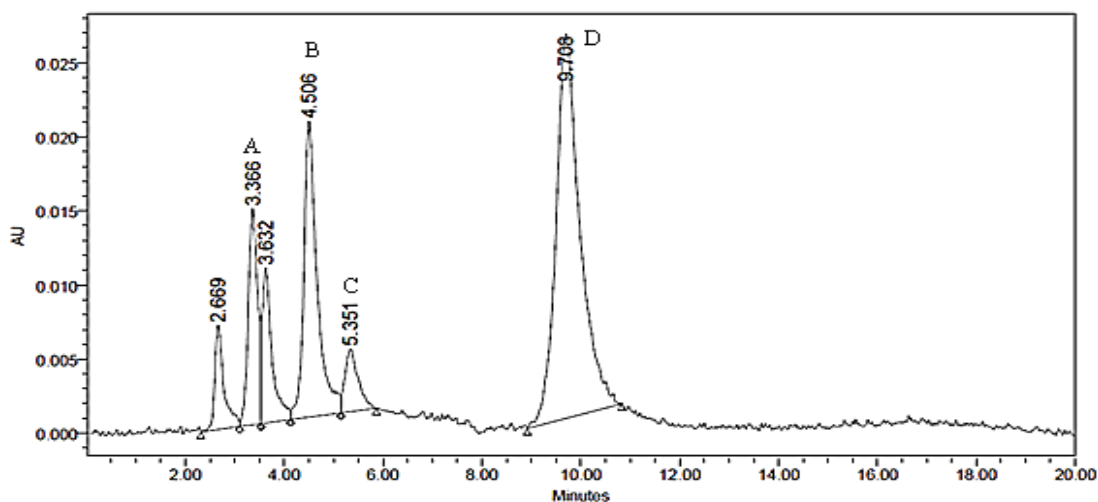


ภาพที่ 22 โครงสร้างของ trifluoroacetic acid (TFA)

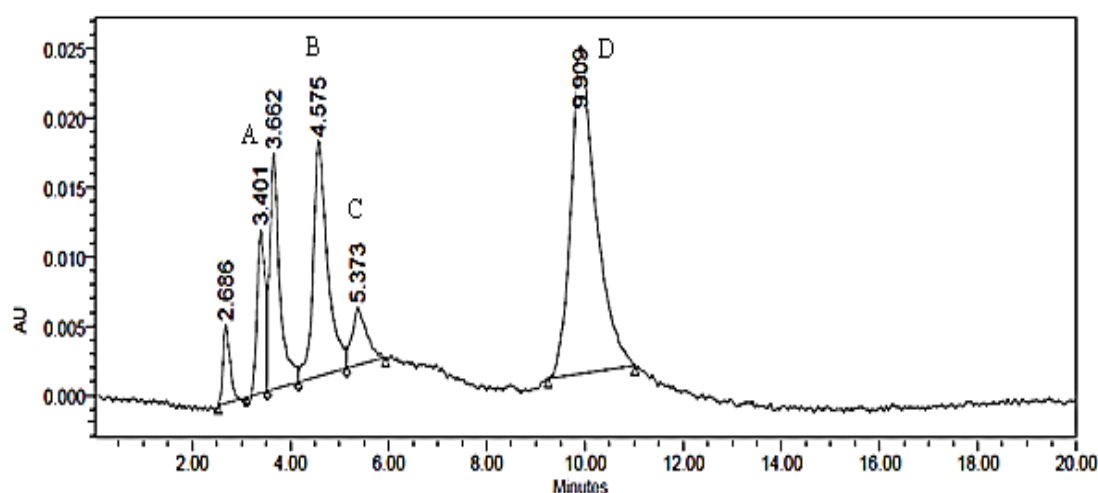
จากการศึกษา retention times ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine ได้โครมาโทแกรมดังภาพที่ 25 ซึ่งพบว่ามี retention times เท่ากับ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine อิสระ ผลที่ได้จากการทดลองนี้แสดงว่า พิกที่พบจากการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดเป็นพิกของกรดอะมิโนอิสระที่เกิดจากการแตกตัวของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนที่เตรียมขึ้น อย่างไรก็ตามเทคนิค IP-RPLC ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถประยุกต์เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณทองแดงที่อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดอะมิโนแต่ละชนิดได้ทางอ้อม โดยอาศัยข้อมูลจากอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณทองแดงจากปริมาณของกรดอะมิโนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IP-RPLC ยกเว้น glycine และ glutamine ซึ่งพิกไม่สามารถแยกออกจากกันได้ และมีการรบกวนจากสารละลายเคลื่อนที่



ภาพที่ 23 โครมาโทแกรมของสารละลายผสม 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid และ 1% (v/v) tetrahydrofuran pH 4.5



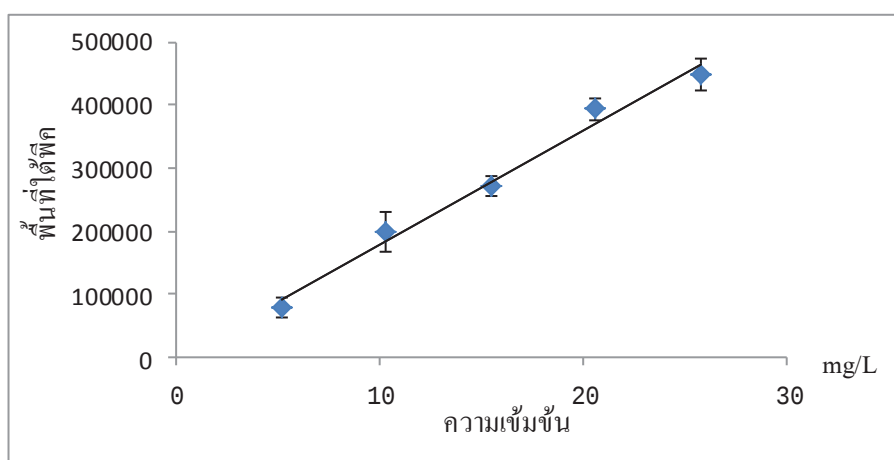
ภาพที่ 24 โครมาโทแกรมของสารละลายผสม glycine (A), glutamine (A), methionine (B), leucine (C) และ phenylalanine (D)



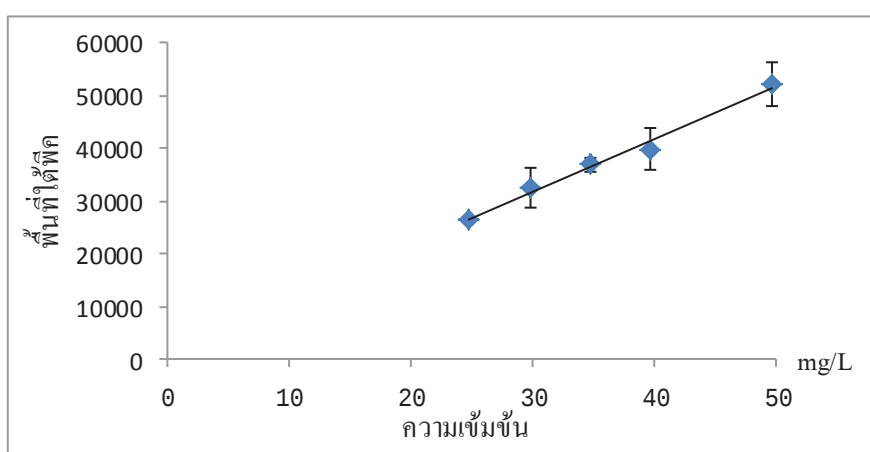
ภาพที่ 25 โครมาโทแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine (A), glutamine (A), methionine (B), leucine (C) และ phenylalanine (D)

กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine, leucine และ phenylalanine สร้างได้โดยการพลอต (plot) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนแต่ละชนิดในหน่วย mg/L ดังภาพที่ 26–28 พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9866 ในช่วงความเข้มข้น 5.2–25.8 mg/L และได้สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 18128x - 2851$ ส่วนกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ leucine และ phenylalanine มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9872

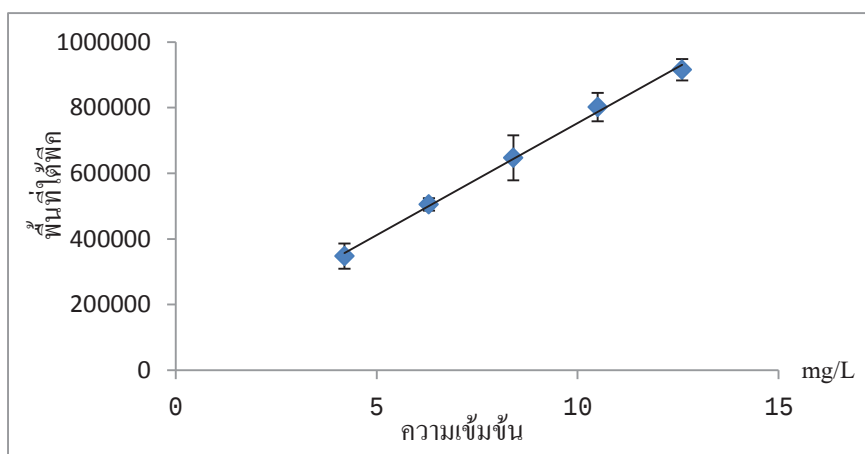
ในช่วงความเข้มข้น 24.8–49.7 mg/L และ 0.9973 ในช่วงความเข้มข้น 4.2–12.6 mg/L ตามลำดับ โดยมีสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 1004x + 1736$ และ $y = 68230x + 70312$ ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 8 และจากการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (limit of quantification; LOQ) พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine, leucine และ phenylalanine มีค่า LOD เท่ากับ 0.561, 7.64 และ 0.111 mg/L ตามลำดับ และมีค่า LOQ เท่ากับ 1.50, 29.5 และ 2.78 mg/L ตามลำดับ (n=10)



ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ที่ได้พิกกับความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine (mg/L) n=3



ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ที่ได้พิกกับความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine (mg/L) n=3



ภาพที่ 28 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ผิวที่ได้พิกกับความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine (mg/L) n=3

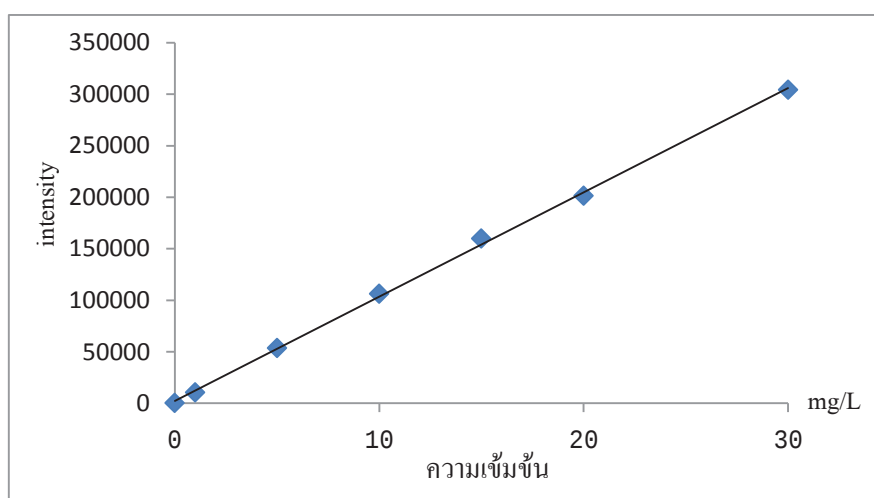
ตารางที่ 8 การวิเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค HPLC

ข้อมูลเปรียบเทียบ	สารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน		
	methionine	leucine	phenylalanine
ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (mg/L)	5.2 – 25.8	24.8 – 49.7	4.2 – 12.6
สมการเส้นตรง	$y = 18128x - 2851$	$y = 1004x + 1736$	$y = 68230x + 70312$
R^2	0.9866	0.9872	0.9973
LOD (mg/L) ; n=10	0.56	7.64	0.11
LOQ (mg/L) ; n=10	1.50	29.5	2.78

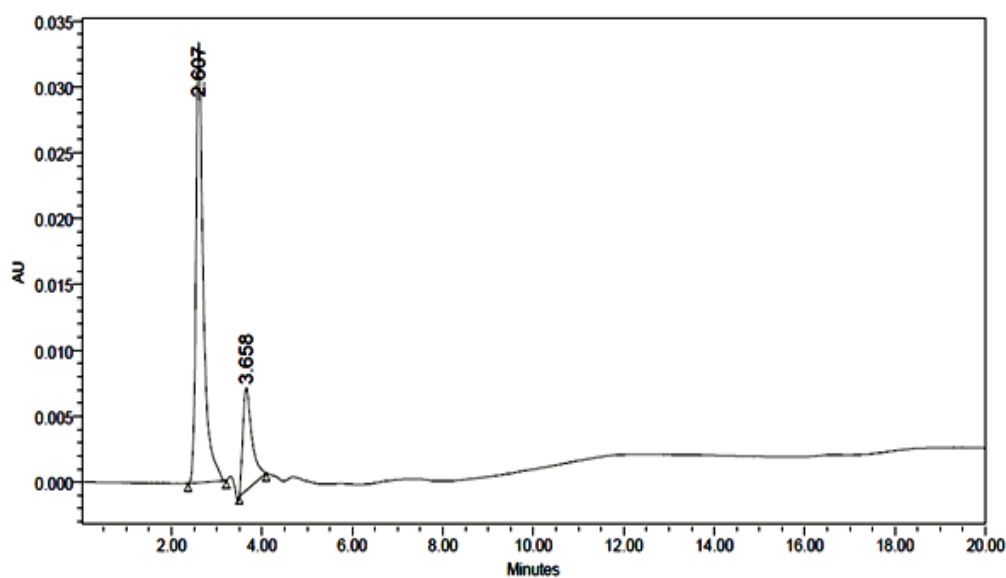
จากสภาวะและข้อมูลการวิเคราะห์สามารถนำมาใช้หาปริมาณทองแดงที่อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับ methionine, leucine และ phenylalanine ได้ทางอ้อม โดยอาศัยข้อมูลจากอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ซึ่งพบว่าอัตราส่วนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนเท่ากับ 1:2 ในการคำนวณหาปริมาณทองแดงจากปริมาณของกรดอะมิโนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IP-RPLC โดยในงานวิจัยได้เตรียมตัวอย่างขึ้นจากสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงในตัวอย่างเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค IP-RPLC กับเทคนิค ICP-OES ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณ

ทองแดง โดยการศึกษารูปกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ทองแดงด้วยเทคนิค ICP-OES ได้โดยการพลอต (plot) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า intensity กับความเข้มข้นของทองแดง (mg/L) มีสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 10119x + 2345.9$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9992 ในช่วงความเข้มข้น 1–30 mg/L ดังภาพที่ 29 ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณทองแดงในตัวอย่างเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค IP-RPLC และ ICP-OES พบว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองเทคนิคมีค่าที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน แสดงดังตารางที่ 9 โดยการศึกษาด้วยเทคนิค IP-RPLC พบว่าตัวอย่างที่ 1 เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ได้กับเทคนิค ICP-OES พบว่ามีร้อยละความคลาดเคลื่อน (%error) ของปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ได้เท่ากับร้อยละ 24 ส่วนตัวอย่างที่ 2 และ 3 พบว่าเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine และ phenylalanine จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IP-RPLC โดยมีร้อยละความคลาดเคลื่อนของปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค ICP-OES เท่ากับร้อยละ 17 และ 13 ตามลำดับ และในตัวอย่างที่ 4 ซึ่งเป็นตัวอย่างผสมระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine, leucine, phenylalanine และ copper sulfate ซึ่งเป็นทองแดงที่อยู่ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-OES พบว่ามีปริมาณทองแดงในตัวอย่างทั้งหมด 0.27 g/g และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IP-RPLC พบว่าเป็นทองแดงที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine, leucine และ phenylalanine ปริมาณ 0.04, 0.14 และ 0.02 g/g ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณของทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 0.20 g/g ซึ่งเหตุผลที่ทำให้ปริมาณทองแดงในตัวอย่างที่ 4 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IP-RPLC มีปริมาณแตกต่างกับปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-OES ส่วนหนึ่งเนื่องมาจากเทคนิค IP-RPLC นี้ไม่สามารถวิเคราะห์ทองแดงที่อยู่ในรูปของ copper sulfate ได้ดังโครมาโทแกรมของสารละลาย copper sulfate ดังภาพที่ 30 ทำให้ปริมาณทองแดงทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค IP-RPLC น้อยกว่าที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-OES โดยปริมาณ copper sulfate ที่เติมลงไป ในตัวอย่างที่ 4 มีปริมาณเท่ากับ 0.03 g/g ดังนั้นปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค IP-RPLC รวมกับปริมาณ copper sulfate ที่เติมลงในตัวอย่างที่ 4 เท่ากับ 0.23 g/g ซึ่งถือว่าใกล้เคียงกับปริมาณทองแดงทั้งหมดที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-OES ซึ่งข้อดีของเทคนิค IP-RPLC นี้คือสามารถจำแนกชนิดของทองแดงได้ว่าอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอะมิโนชนิดใดและที่สำคัญคือสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับสารประกอบเชิงซ้อนได้ โดยจากการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างที่ 1 มีปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine เท่ากับ 1.23 g/g ตัวอย่างที่ 2 และ 3 มีปริมาณทองแดงกับ leucine และ phenylalanine เท่ากับ 1.03 g/g และ 1.08 g/g ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 4 พบว่ามีปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดง

กับ methionine, leucine และ phenylalanine เท่ากับ 0.21, 0.71 และ 0.097 g/g ตามลำดับ ดังตารางที่ 9 ดังนั้นการทดลองนี้แสดงว่าเทคนิค IP-RPLC สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนและปริมาณทองแดงที่อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine, leucine และ phenylalanine ได้ทางอ้อม โดยอาศัยข้อมูลการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดร่วมด้วย



ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐานระหว่าง intensity กับความเข้มข้นของทองแดง (mg/L)



ภาพที่ 30 โครมาโทแกรมของสารละลาย copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

ตารางที่ 9 ปริมาณทองแดง (copper) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IP-RPLC และ ICP-OES (n=3)

ตัวอย่าง	ICP-OES	IP-RPLC	
	ปริมาณ copper ทั้งหมด (g/g)	ปริมาณ copper จากการคำนวณ (g/g)	ปริมาณ copper complexes จากการคำนวณ (g/g)
สารประกอบเชิงซ้อน ทองแดงกับ methionine	0.17	0.21	1.23
สารประกอบเชิงซ้อน ทองแดงกับ leucine	0.18	0.21	1.03
สารประกอบเชิงซ้อน ทองแดงกับ phenylalanine	0.15	0.17	1.08
ตัวอย่างผสมระหว่าง - สารประกอบเชิงซ้อน ทองแดงกับ methionine - สารประกอบเชิงซ้อน ทองแดงกับ leucine - สารประกอบเชิงซ้อน ทองแดงกับ phenylalanine - copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.27	0.04 (ในสารประกอบ เชิงซ้อนทองแดงกับ methionine) 0.14 (ในสารประกอบ เชิงซ้อนทองแดงกับ leucine) 0.02 (ในสารประกอบ เชิงซ้อนทองแดงกับ phenylalanine)	0.21 (สารประกอบ เชิงซ้อนทองแดงกับ methionine) 0.71 (สารประกอบ เชิงซ้อนทองแดงกับ leucine) 0.097 (สารประกอบ เชิงซ้อนทองแดงกับ phenylalanine)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาวิธีที่สามารถแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ศึกษาโดยการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด ได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine และนำสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมขึ้นไปศึกษาต่อด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC) เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบเชิงซ้อนและยืนยันการเกิดพันธะระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโน และสุดท้ายคือศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ trifluoroacetic acid (TFA) ทำหน้าที่เป็น ion-pair reagent ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้สามารถใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนได้ทางอ้อม โดยอาศัยข้อมูลจากการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนที่ศึกษาด้วยเทคนิค continuous variation (job's method) และ mole ratio โดยในงานวิจัยได้เปรียบเทียบปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค HPLC กับเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) ซึ่งเทคนิค ICP-OES เป็นเทคนิคมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ทองแดง โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างได้อย่างถูกต้องแม่นยำและเชื่อถือได้

5.1 สรุปและอภิปรายผล

ตะกอนสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน ได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine สามารถเตรียมขึ้นได้ โดยผสมสารละลาย copper acetate monohydrate (0.01 โมล) ในสารละลายน้ำ : เอทานอล (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) กับสารละลายกรดอะมิโน (0.02 โมล) ที่อุณหภูมิประมาณ 70 °C จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง จนเกิดตะกอน นำตะกอนไปกรองและล้างด้วยเอทานอล แล้วทิ้งให้แห้งใน decicator ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งตะกอนของสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมได้ในงานวิจัยนี้มีสีและลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน โดยตะกอนของสารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้สามารถละลายได้ในน้ำร้อน จากการศึกษ้อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค continuous variation (job's

method) และ mole ratio พบว่ามีอัตราส่วนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดเท่ากับ 1:2 ทุกตัว โดยสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนที่เตรียมขึ้นนี้สามารถยืนยันการเกิดพันธะระหว่างไอออนทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิดได้ด้วยเทคนิค FT-IR โดยพิจารณา IR สเปกตรัมในย่านของ N-H stretching และ C=O stretching เปรียบเทียบระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งข้อมูลจากเทคนิค FT-IR บ่งบอกว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยนี้มีการสร้างพันธะระหว่างไอออนทองแดงกับกรดอะมิโน และเมื่อพิจารณาร่วมกับข้อมูลจากเทคนิค DSC ซึ่งช่วยสนับสนุนว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมขึ้นเป็นสารผลิตภัณฑ์ (product) ที่เกิดขึ้นใหม่จากปฏิกิริยาระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโน โดยสังเกตได้จากอุณหภูมิของจุดหลอมเหลว (melting point) ที่เปลี่ยนแปลงไปของสารประกอบเชิงซ้อน เมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนอิสระ โดยพันธะที่เกิดขึ้นคือพันธะโคเวเลนต์ (covalent) ระหว่างไอออนทองแดง (Cu^{2+}) กับอะตอมออกซิเจน (O) และไนโตรเจน (N) ของกรดอะมิโนที่หมู่ฟังก์ชัน carboxyl และ amino ตามลำดับ ทำให้เกิดการปิดวงของสารประกอบเชิงซ้อนแบบ five-membered ring ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนนี้เรียกว่า “copper amino acid chelate” ตามการนิยามของ The American Association of Feed Control Officials หรือ AAFCO ซึ่งให้คำนิยามสำหรับ amino acid chelate ว่าคือ “ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไอออนโลหะ (metal ion) จากเกลือที่ละลายได้กับกรดอะมิโน โดยเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างไอออนโลหะกับกรดอะมิโนจำนวน 1-3 โมล (มักเกิดแบบ 2 โมลมากกว่า)”[20]

การศึกษาสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีสภาวะการทดลองคือ ใช้คอลัมน์ C18-reverse phase ระบบ isocratic และสารละลายผสมระหว่าง 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) และ 1% tetrahydrofuran (THF) ที่ pH เท่ากับ 4.5 เป็นสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเทคนิคนี้เรียกว่า Ion-pair Reversed-Phase Liquid Chromatography หรือ IP-RPLC ซึ่งจากการศึกษา retention times ของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนแต่ละชนิด ได้แก่ glycine, glutamine, methionine, leucine และ phenylalanine พบว่าตรงกับ retention times ของกรดอะมิโนอิสระแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ด้วยสภาวะเดียวกัน โดย glycine และ glutamine มีพิคซ้อนทับกันที่ retention time ประมาณ 3.4 min ส่วน methionine, leucine และ phenylalanine มี retention times เท่ากับ 4.6, 5.3 และ 9.8 min ตามลำดับ ดังนั้นสารที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค IP-RPLC คือกรดอะมิโนอิสระที่เกิดจากการแตกตัวของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน และจากการศึกษาด้วยเทคนิค IP-RPLC นี้ไม่พบพิคของทองแดงอิสระ แสดงว่าเทคนิคนี้ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณทองแดงได้โดยตรง แต่จากการทดลองนี้พบว่าสามารถคำนวณหาปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอะมิโนและทองแดงที่อยู่ใน

รูปสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนได้ทางอ้อม จากปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ร่วมกับข้อมูลจากอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนที่ศึกษาด้วยเทคนิค continuous variation และ mole ratio ซึ่งพบว่ามีอัตราส่วนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนเท่ากับ 1 ต่อ 2 โดยโมล และเนื่องจากฟิสิกของ glycine และ glutamine ทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนและกรดอะมิโนอิสระไม่สามารถแยกกันได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IP-RPLC ดังนั้นเทคนิค IP-RPLC ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้จึงสามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะปริมาณ methionine, leucine และ phenylalanine ที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนเท่านั้น โดยกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ methionine มีช่วงความเข้มข้นระหว่าง 5.2–25.8 mg/L โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.561 mg/L และ LOQ เท่ากับ 1.50 mg/L ส่วนกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ leucine มีช่วงความเข้มข้น 24.8–49.7 mg/L โดยมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 7.64 และ 29.5 mg/L ตามลำดับ และกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ phenylalanine มีช่วงความเข้มข้น 4.2–12.6 mg/L มีค่า LOD เท่ากับ 0.111 mg/L และค่า LOQ เท่ากับ 2.78 mg/L โดยสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine, leucine และ phenylalanine ทุกตัวมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มากกว่า 0.98 และจากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่างที่เตรียมขึ้นจากสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโน เมื่อนำไปคำนวณหาปริมาณทองแดง พบว่าเทคนิค IP-RPLC สามารถวิเคราะห์ปริมาณทองแดงที่อยู่ในตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค ICP-OES ซึ่งความคลาดเคลื่อนของปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ได้ระหว่างเทคนิค IP-RPLC และ ICP-OES ผู้วิจัยคาดว่าอาจเนื่องมาจากสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมขึ้นไม่ได้มีอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงต่อกรดอะมิโนเท่ากับ 1 ต่อ 2 ทั้งหมด เนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนสามารถเกิดพันธะระหว่างไอออนทองแดงกับกรดอะมิโนได้ตั้งแต่ 1-3 โมล [20] ทำให้ปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค IP-RPLC มีปริมาณไม่เท่ากับเทคนิค ICP-PES และที่สำคัญคือเทคนิค IP-RPLC สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนได้

ดังนั้นเทคนิค IP-RPLC ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถใช้ในการหาปริมาณกรดอะมิโนเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอะมิโนและทองแดงที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนได้ทางอ้อม โดยอาศัยข้อมูลการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับกรดอะมิโนร่วมด้วย นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ควรพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณทองแดงว่าอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนหรือไม่ด้วยเทคนิค FT-IR และ DSC และเพื่อความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ควรเปรียบเทียบปริมาณทองแดงที่วิเคราะห์ได้กับเทคนิคมาตรฐาน เช่น เทคนิค ICP-OES ซึ่งข้อดีที่

สำคัญของการวิเคราะห์ปริมาณทองแดงด้วยเทคนิค IP-RPLC คือ สามารถจำแนกได้ว่าทองแดงที่พบอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดอะมิโนชนิดใด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ Glycine และ Glutamine ออกจากกันได้ด้วยเทคนิค HPLC

5.2.2 ควรนำสถานะที่ศึกษาไปทดลองวิเคราะห์กับตัวอย่างจริง เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรืออาหารสัตว์ที่มีขายทั่วไปตามท้องตลาด

บรรณานุกรม

- [1] Apines-Amar, Mary. (2004). "Amino acid-chelate: a better source of Zn, Mn and Cu for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." **Aquaculture** 240 : 345–358.
- [2] Ashmead, Dewayne, Stephen Ashmead, and Royce Samford. (2004). "Effects of Metal Amino Acid Chelates on Milk Production, Reproduction, and Body Condition in Holstein First Calf Heifers." **Intern J Appl Res Vet Med** 2 : 252-260.
- [3] Paik, K. et al. (2000). "Effect of Chelated Mineral Supplementation on the Performance of Chickens and Pigs." **Asian-Aus. J. Anim. Sci.** (July 13) : 313-316.
- [4] Iost, Cristina. (1998). "Repleting Hemoglobin in Iron Deficiency Anemia in Young Children through Liquid Milk Fortification with Bioavailable Iron Amino Acid Chelate." **Journal of the American College of Nutrition** 17 : 187–194.
- [5] Lim, H., and Paik K.. (2003). "Effects of Supplementary Mineral Methionine Chelates (Zn, Cu, Mn) on the Performance and Eggshell Quality of Laying Hens." **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 16 : 1804-1808.
- [6] Puchala, R., T. Sahlua,, and J.J. Davis. (1999). "Effects of zinc-methionine on performance of Angora goats." **Small Ruminant Research** 33 : 1-8.
- [7] Feng, J. et al. (2009). "The effect of iron glycine chelate on tissue mineral levels, fecal mineral concentration, and liver antioxidant enzyme activity in weanling pigs." **Animal Feed Science and Technology** 150 : 106-113.
- [8] Gou, R. et al. (2001). "Chemical characteristic and relative bioavailability of supplemental organic copper sources for poultry." **J. Anim. Sci.** 79 : 1132-1141.
- [9] Parks, F.P., and K. Harmston. (1994), "An Assay Method for Proteinates: Judging Organic Trace Minerals." **Feed Management** 45 (October) : 35-38.
- [10] Holwerda, R. (1995). "Chelation Effectiveness on zinc Proteinates Demonstrated." **Feedstuffs** 67, 23 (June 19) : 12-13.
- [11] Stanila, A. et al. (2009). "Spectroscopic investigation of new metallic complexes with leucine as ligand." **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** 267 : 419-421.
- [12] Devereux, Micheal et al. (1997). "Preparation and catalyse-type activity of manganese(II) amino acid complexes." **Polyhedron** 17, 1 (May 20) : 153-158.

- [13] Jachong, Han et al. (2006). "FT-IR and XRD analyses of Commercial Methionine-Mineral Chelate." **Agric. Chem. Biotechnol** 49, 1 : 8-11.
- [14] Mamun, M.A. et al. (2010). "Synthesis and spectroscopic, magnetic and cyclic voltammetric characterization of some metal complexes of methionine: $[(C_5H_{10}NO_2S)_2MII]$; MII = Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II) and Hg(II)." **Journal of Saudi Chemical Society** 14 : 23–31.
- [15] Farias, Robson , Helio Scatena, and Claudio Airoidi. (1999). "Thermoanalytical investigations about the metal–amino acid interactions." **Journal of Inorganic Biochemistry** 73 : 253–257.
- [16] Abd-Elmoneim1, M.M. et al. (2008). "Investigation and Biological Activity of Some Nonpolar Iron Amino Acid Chelates." **Pakistan Journal of Nutrition** 7, 5 : 673-678.
- [17] Hartle, Jennifer, and Dewayne Ashmead. (2006). "Bonds important for amino acid chelate." **Feedstuff** 78, 37 (September 11) : 1-3.
- [18] Jian, Zheng, Yasuyuki Shibata, and Naoki Furuta. (2003). "Determination of selenoamino acid using two-dimensional ion-pair reversed phase chromatography with on-line detection by inductively couple plasma mass spectrometry." **Talanta** 59 : 27-36.
- [19] Bird, Susan et al. (1997). "Speciation of selenoamino acid and organoselenium compounds in selenium-enriched yeast usind High-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry." **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 12 (July) ; 785-788.
- [20] Kotrebai, Mihaly et al. (2000). "High-performance liquid chromatography of selenium compounds utilizins perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents and inductively coupled plasma and electrospray ionization mass spectrometric detection." **Journal of Chromatography A** 866 : 51-63.
- [21] Tsopelas, Fotioos et al. (2005). "Comparison of ultra-violet and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry for the on-line quantification of selenium species after their separation by reverse-phase liquid chromatography." **Analytical Chimica Acta** 539 : 327-333.
- [22] สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. กองพัฒนาศักยภาพผู้บริโภค. (2546). **ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร**. เข้าถึงเมื่อ 15 กันยายน 2554. เข้าถึงได้จาก <http://webnotes.fda.moph.go.th/consumer/csmb/csmb2546.nsf/723dc9fee41>.
- [23] ศูนย์สุขภาพและโภชนาการไทย. ทองแดง (Copper). เข้าถึงเมื่อ 1 พฤศจิกายน 2554. เข้าถึงได้จาก <http://www.nutritionthailand.com/nutrition/87-mineral/350-copper>.

- [24] ทองแดง. เข้าถึงเมื่อ 1 พฤศจิกายน 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.pharm.chula.ac.th/physiopharm/2542_sem2/g9/ทองแดง.html.
- [25] นิภาพร ชนะคช. กรดอะมิโน. เข้าถึงเมื่อ 15 กันยายน 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/bsp_1_2550_amino.pdf.
- [26] Spears, Jerry. (1996). "Organic trace minerals in ruminant nutrition." **Animal Feed Science Technology** 58 : 151-163.
- [27] Mizyed, Shehadeh, Hajar Tarabsheh, and Deeb Marji. (2007). "A Spectrophotometric Study of the Charge Transfer Complexation of (60) Fullerene with Some Amines." **Jordan Journal of Chemistry** 2, 2 : 145-153.
- [28] Nezhadali, A., H. A. Hosseini, and P. Langara. (2007). "Study of Complex Formation Between Iodoquinol (IQ) and Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} Cations in Binary Aqueous/Non-aqueous Solvent Using Spectrophotometry." **E-Journal of Chemistry** 4, 4 (October) : 581-586.
- [29] Yukio, Yokoyama, Osamu Ozaki, and Hisakuni Sato. (1996). "Separation and determination of amino acids, creatinine, bioactive amines and nucleic acid bases by dual-mode gradient ion-pair chromatography." **Journal of Chromatography A** 739 : 333-342.
- [30] Petritis, Konstantinos et al. (1999). "Ion-pair reversed-phase liquid chromatography for determination of polar underivatized amino acids using perfluorinated carboxylic acids as ion pairing agent." **Journal of Chromatography A** 833 : 147-155.
- [31] Jian, Zheng et al. (2000). "Speciation of selenium compounds with ion-pair reversed-phase liquid chromatography using inductively coupled plasma mass spectrometry as element-specific detection." **Journal of Chromatography A** 874 : 55-64.
- [32] Petritis, Konstantinos, Claire Elfakir, and Michel Dreux. (2002). "A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids." **Journal of Chromatography A** 961 : 9-21.
- [33] Gosetti, F. et al. (2007). "Speciation of selenium in diet supplements by HPLC-MS/MS methods." **Food Chemistry** 105 : 1738-1747.
- [34] Wear, O. (1968). "Mathematics of the variation and mole ratio methods of complex determination." **Arkansas Academy of Science Proceedings** 22 : 97-101.

- [35] พัชรีย์ วิชยานุวัตติ. เมตะบอไลสมของกรดอะมิโน. เข้าถึงเมื่อ 15 กันยายน 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.si.mahidol.ac.th/department/biochemis/บทที่10_เมตะบอไลสมของกรดอะมิโน-อ.พัชรีย์.doc
- [36] Stanila, A. et al. (2007). "Spectroscopic studies of some copper (II) complexes with amino acid." **Journal of Molecular Structure** 834-836 : 364-368.
- [37] Rouessac, Francis, and Annick Rouessac. (2000). **Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques**. 4th ed. West Sussex : John Wiley & Sons, LTd.
- [38] วิชัย ธีวระกุล และคณะ. (2526). **การประยุกต์สเปกโตรสโคปีในเคมีอินทรีย์**. กรุงเทพมหานคร: ห.จ.น.อักษรการพิมพ์.
- [39] Max, Dunn, and Brophy T. W. (1932). **Decomposition points of the amino acid**. Accessed October 19, 2010. Available from www.jbc.org
- [40] Anna, Krejcova, Cernohorsky Tomas and Meixner. (2007). "Elemental analysis of instant soups and seasoning mixtures by ICP-OES." **Food Chemistry** 105 : 242-247.
- [41] Barbara, Feist et al. (2008). "Determination of heavy metal by ICP-OES and F-AAS after preconcentration with 2,2'-bipyridyl and erythrosine." **Journal of Hazardous Materials** 152 : 1122-1129.
- [42] Dimitar, Hristozov et al. (2004). "Direct ultrasound-assisted extraction of heavy metals from sewage sludge samples for ICP-OES analysis." **Analytical chemical Acta** 516 : 187-196.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ตารางแสดงข้อมูลการวิเคราะห์

ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine สำหรับเทคนิค continuous variation

$V_L / (V_M + V_L)$	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	0.0195	0.0083	0.0073	0.0117
0.9	0.0914	0.0908	0.0908	0.0910
0.8	0.1689	0.1763	0.1704	0.1718
0.7	0.2106	0.2109	0.2188	0.2134
0.6	0.2307	0.2393	0.2339	0.2346
0.5	0.2276	0.2272	0.2289	0.2279
0.4	0.2067	0.2567	0.2079	0.2238
0.3	0.1836	0.1857	0.1870	0.1854
0.2	0.1538	0.1622	0.1635	0.1598
0.1	0.1366	0.1383	0.1394	0.1381
0	0.1110	0.1154	0.1183	0.1149

ตารางที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine สำหรับเทคนิค mole ratio method

[L]/[M]	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.0	0.0565	0.0495	0.0472	0.0511
0.5	0.1525	0.1605	0.1753	0.1628
1.0	0.2053	0.2308	0.2319	0.2227
1.5	0.2479	0.2658	0.2828	0.2655
2.0	0.2780	0.2887	0.2976	0.2881
3.0	0.3027	0.3413	0.3531	0.3324
4.0	0.3318	0.3623	0.3675	0.3539
5.0	0.3378	0.3957	0.3915	0.3750
6.0	0.3540	0.3972	0.4052	0.3855
7.0	0.3807	0.4207	0.4176	0.4063
8.0	0.3980	0.4369	0.4381	0.4243
9.0	0.4179	0.4448	0.4417	0.4348
10.0	0.4305	0.4658	0.4506	0.4490

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine สำหรับเทคนิค continuous variation

$V_L / (V_M + V_L)$	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	0.0000	0.0157	0.0172	0.0110
0.9	0.1404	0.1256	0.1354	0.1338
0.8	0.2538	0.2336	0.2423	0.2432
0.7	0.3313	0.3319	0.3257	0.3297
0.6	0.3573	0.3431	0.3456	0.3487
0.5	0.3243	0.3597	0.3364	0.3401
0.4	0.3262	0.3005	0.3603	0.3290
0.3	0.3051	0.3106	0.3082	0.3080
0.2	0.2694	0.2665	0.2720	0.2693
0.1	0.1990	0.2154	0.2168	0.2104
0	0.1668	0.1735	0.1755	0.1719

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine สำหรับเทคนิค mole ratio method

[L]/[M]	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.0	0.1222	0.1820	0.0952	0.1331
0.5	0.2466	0.2351	0.2549	0.2455
1.0	0.3397	0.3402	0.3309	0.3369
1.5	0.3585	0.3860	0.3794	0.3746
2.0	0.4384	0.4137	0.4354	0.4292
3.0	0.5003	0.4816	0.4823	0.4880
4.0	0.5174	0.5158	0.5040	0.5124
5.0	0.5316	0.5389	0.5601	0.5435
6.0	0.5878	0.5656	0.5726	0.5754
7.0	0.5793	0.6007	0.6200	0.6000
8.0	0.6080	0.6418	0.6251	0.6250
9.0	0.6403	0.6506	0.6345	0.6418
10.0	0.6543	0.6594	0.6632	0.6589

ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine สำหรับเทคนิค continuous variation

$V_L / (V_M + V_L)$	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	0.0147	0.0305	0.0305	0.0253
0.9	0.0743	0.0792	0.0683	0.0739
0.8	0.1039	0.1044	0.1083	0.1055
0.7	0.1440	0.1444	0.1503	0.1462
0.6	0.1656	0.1639	0.1607	0.1634
0.5	0.1598	0.1590	0.1678	0.1622
0.4	0.1573	0.1553	0.1675	0.1600
0.3	0.1330	0.1407	0.1411	0.1383
0.2	0.1163	0.1148	0.1148	0.1153
0.1	0.0973	0.0940	0.0961	0.0958
0	0.0758	0.0796	0.0790	0.0782

ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine สำหรับเทคนิค mole ratio method

[L]/[M]	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.0	0.0376	0.0361	0.0413	0.0383
0.5	0.0993	0.0832	0.0921	0.0915
1.0	0.1446	0.1684	0.1529	0.1553
1.5	0.1718	0.1655	0.1770	0.1714
2.0	0.1975	0.1939	0.2022	0.1979
3.0	0.2492	0.2564	0.2458	0.2504
4.0	0.2813	0.2549	0.2722	0.2695
5.0	0.3011	0.2816	0.3069	0.2965
6.0	0.3080	0.3197	0.3131	0.3136
7.0	0.3340	0.3241	0.3129	0.3237
8.0	0.3675	0.3556	0.3556	0.3596
9.0	0.3800	0.3691	0.3680	0.3723
10.0	0.3858	0.3811	0.3890	0.3853

ตารางที่ 16 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine สำหรับเทคนิค continuous variation

$V_L / (V_M + V_L)$	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	0.0437	0.0430	0.0417	0.0428
0.9	0.0508	0.0496	0.0563	0.0522
0.8	0.0590	0.0633	0.0611	0.0612
0.7	0.0724	0.0712	0.0722	0.0719
0.6	0.0745	0.0745	0.0772	0.0754
0.5	0.0778	0.0766	0.0777	0.0773
0.4	0.0762	0.0785	0.0750	0.0766
0.3	0.0654	0.0634	0.0654	0.0647
0.2	0.0421	0.0430	0.0438	0.0430
0.1	0.0326	0.0031	0.0347	0.0235
0	0.0006	0.0014	0.0033	0.0018

ตารางที่ 17 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine สำหรับเทคนิค mole ratio method

[L]/[M]	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.0	0.0049	0.0000	0.0000	0.0049
0.5	0.0063	0.0094	0.0014	0.0063
1.0	0.0148	0.0088	0.0079	0.0148
1.5	0.0156	0.0137	0.0089	0.0156
2.0	0.0188	0.0119	0.0125	0.0188
3.0	0.0228	0.0181	0.0164	0.0228
4.0	0.0263	0.0183	0.0183	0.0263
5.0	0.0256	0.0196	0.0218	0.0256
6.0	0.0211	0.0244	0.0302	0.0211
7.0	0.0252	0.0271	0.0261	0.0252
8.0	0.0293	0.0303	0.0277	0.0293
9.0	0.0303	0.0307	0.0296	0.0303
10.0	0.0321	0.0313	0.0302	0.0321

ตารางที่ 18 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine สำหรับ
เทคนิค continuous variation

$V_L / (V_M + V_L)$	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	0.0175	0.0225	0.0183	0.0194
0.9	0.0834	0.0905	0.0841	0.0860
0.8	0.1233	0.1264	0.1289	0.1262
0.7	0.1777	0.1795	0.1790	0.1787
0.6	0.1999	0.1969	0.1944	0.1971
0.5	0.2047	0.2054	0.2063	0.2054
0.4	0.1900	0.1882	0.1923	0.1902
0.3	0.1808	0.1800	0.1814	0.1807
0.2	0.1606	0.1559	0.1635	0.1600
0.1	0.1389	0.1401	0.1399	0.1396
0	0.1184	0.1178	0.1012	0.1124

ตารางที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine สำหรับ
เทคนิค mole ratio method

[L]/[M]	ค่าการดูดกลืนแสง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.0	0.0000	0.0217	0.0316	0.0178
0.5	0.0014	0.0845	0.0537	0.0465
1.0	0.0577	0.0969	0.0763	0.0770
1.5	0.0603	0.1026	0.0858	0.0829
2.0	0.0793	0.1206	0.1095	0.1031
3.0	0.0817	0.1358	0.1259	0.1144
4.0	0.1001	0.1541	0.1273	0.1272
5.0	0.1274	0.1332	0.1228	0.1278
6.0	0.1317	0.1401	0.1428	0.1382
7.0	0.1452	0.1552	0.1354	0.1453
8.0	0.1098	0.1875	0.1519	0.1497
9.0	0.1174	0.1866	0.1605	0.1548
10.0	0.1192	0.1773	0.1703	0.1556

ตารางที่ 20 พื้นที่ใต้พีคสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ methionine ที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ความเข้มข้น mg/L	พื้นที่ใต้พีค			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 3		
5.2	90336	61214	84514	78688	15410
10.3	231944	190243	172307	198165	16812
15.5	264832	257850	289826	270836	17350
20.6	409640	393862	374987	392830	25093
25.8	473938	447260	423786	448328	30598

ตารางที่ 21 พื้นที่ใต้พีคสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ leucine ที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ความเข้มข้น mg/L	พื้นที่ใต้พีค			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 3		
24.8	25940	26506	26583	26343	26291
29.8	28272	33856	35641	32590	32116
34.7	38557	36376	36051	36995	39920
39.7	40715	35551	43214	39827	44623
49.6	55977	52866	47878	52240	60063

ตารางที่ 22 พื้นที่ใต้พีคสารประกอบเชิงซ้อนทองแดงกับ phenylalanine ที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ความเข้มข้น mg/L	พื้นที่ใต้พีค			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 3		
4.2	387615	311625	343089	347443	38182
6.3	490582	498890	526261	505244	18669
8.4	663621	572269	705669	647186	68202
10.5	765243	789828	850055	801709	43636
12.6	898216	895454	953198	915623	32570

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์หาค่า LOD และ LOQ

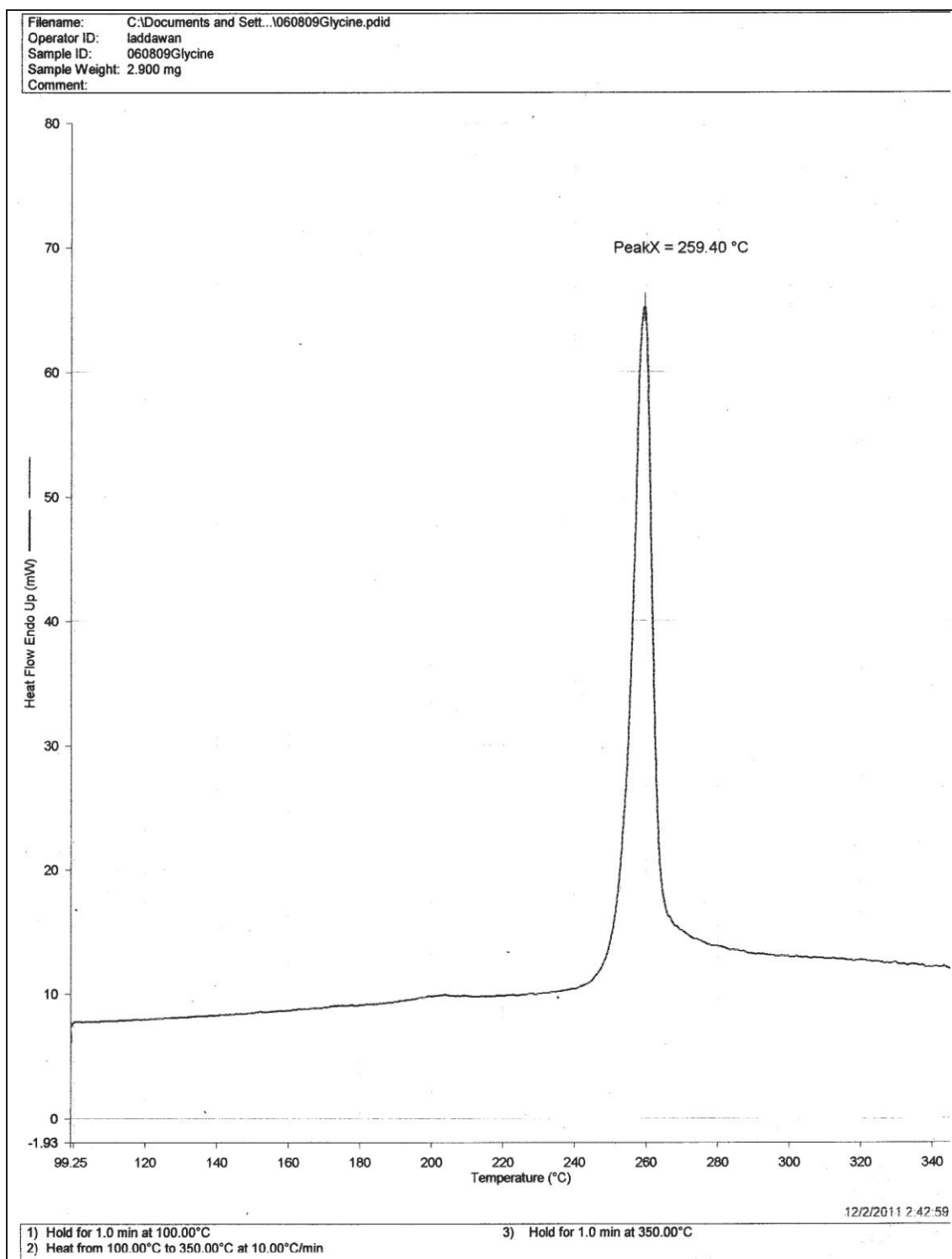
ครั้งที่	พื้นที่ได้ผล		
	สารประกอบเชิงซ้อน ทองแดงกับ methionine	สารประกอบเชิงซ้อน ทองแดงกับ leucine	สารประกอบเชิงซ้อน ทองแดงกับ phenylalanine
1	12251	5716	87600
2	13472	2271	50490
3	13763	2547	37644
4	16333	3497	40022
5	16073	2304	35872
6	14780	3836	40659
7	21077	2897	31927
8	15104	4141	25433
9	17304	2304	98577
10	15583	12584	19433
ค่าเฉลี่ย	15574	3279	46766
ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	2442	3137	25976
LOD	0.561	7.64	0.111
LOQ	1.50	29.5	2.78

n = 10

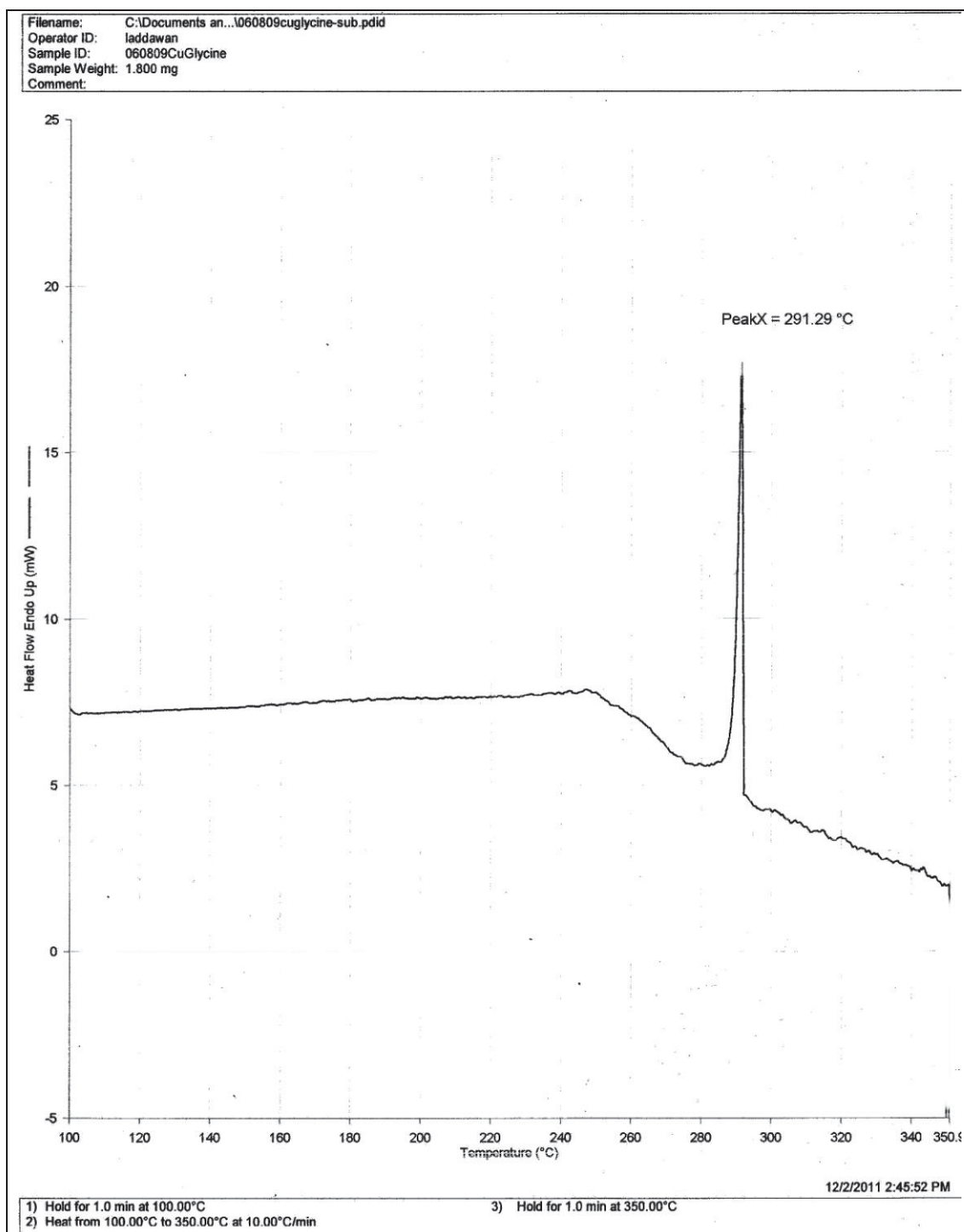
ตารางที่ 24 ค่า intensity ของสารละลายทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-OES

ความเข้มข้น (mg/L)	ค่าเฉลี่ย Intensity (n=3)
0	240.3
1	10517
5	53564
10	106130
15	159760
20	201533
30	304348

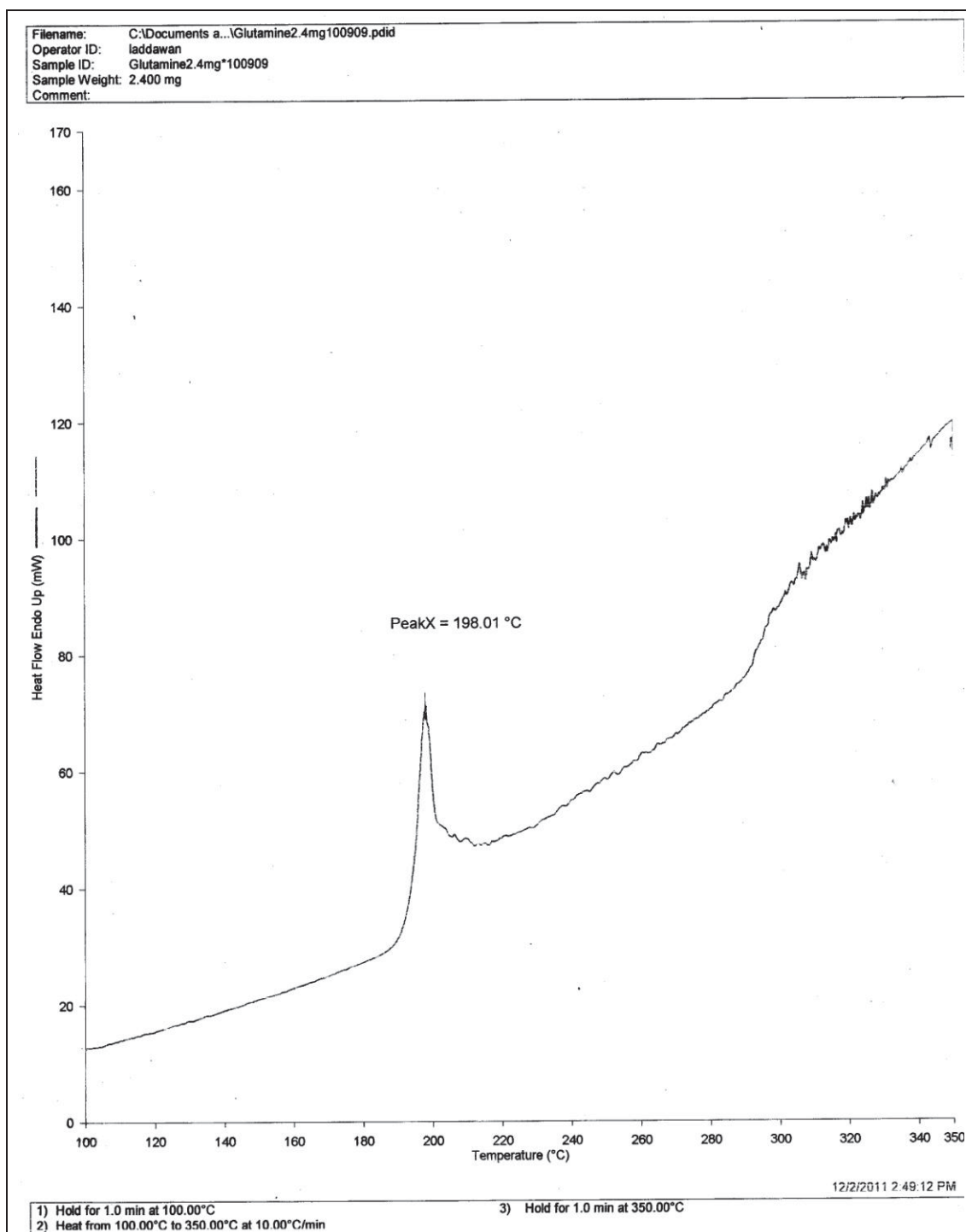
ภาคผนวก ข
DSC เทอร์โมแกรม



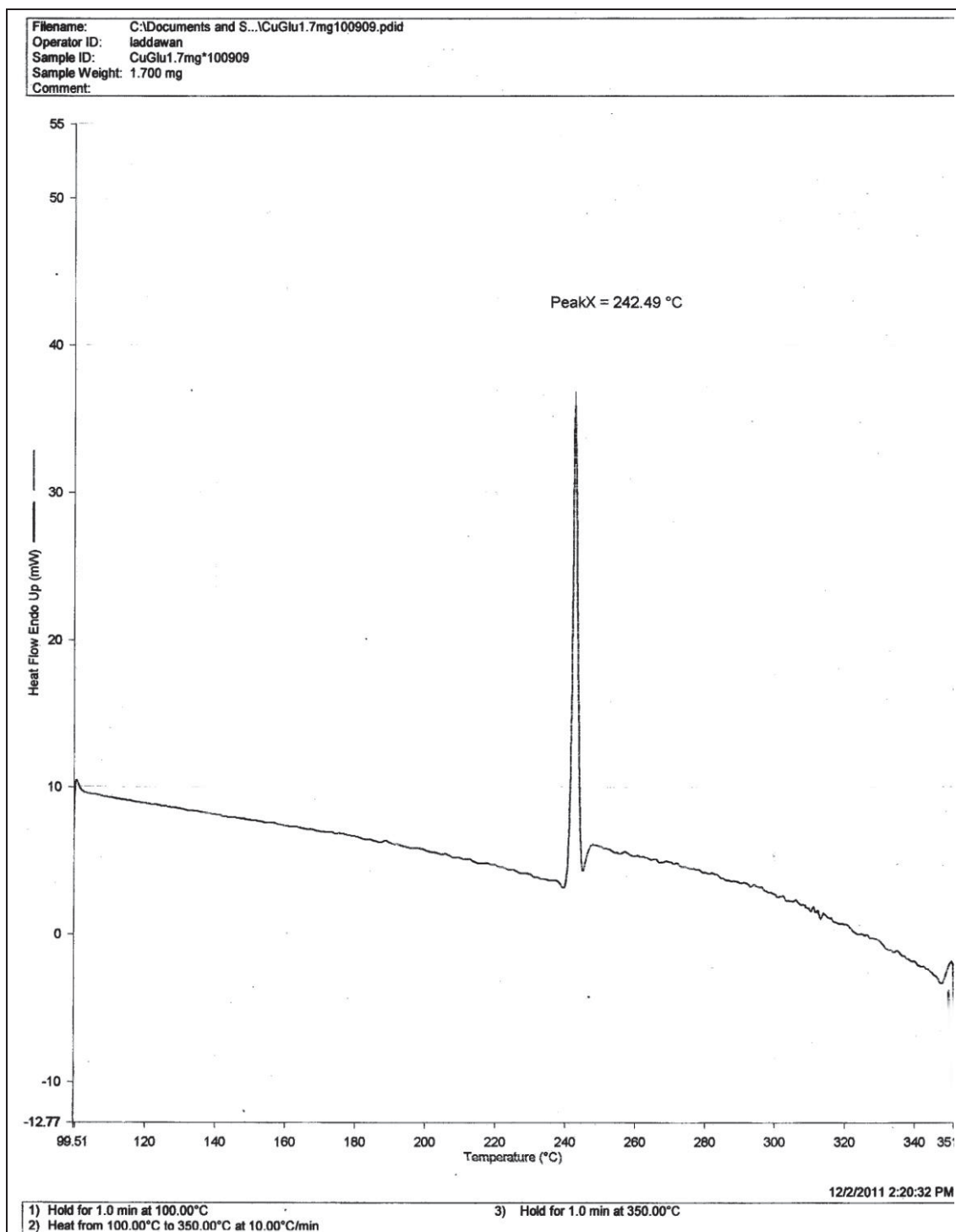
ภาพที่ 31 DSC เทอร์โมแกรมของ glycine อิสระ



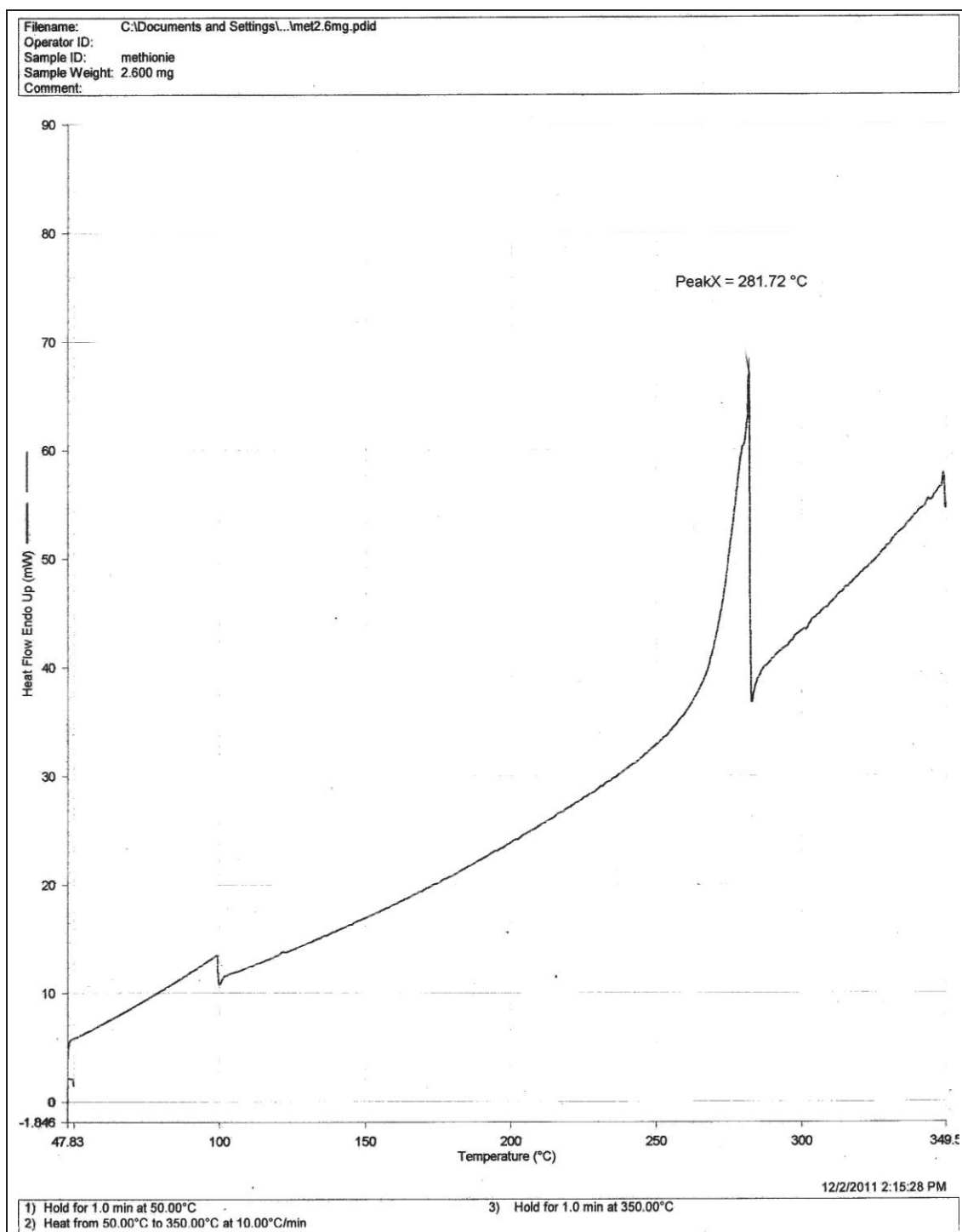
ภาพที่ 32 DSC เทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine



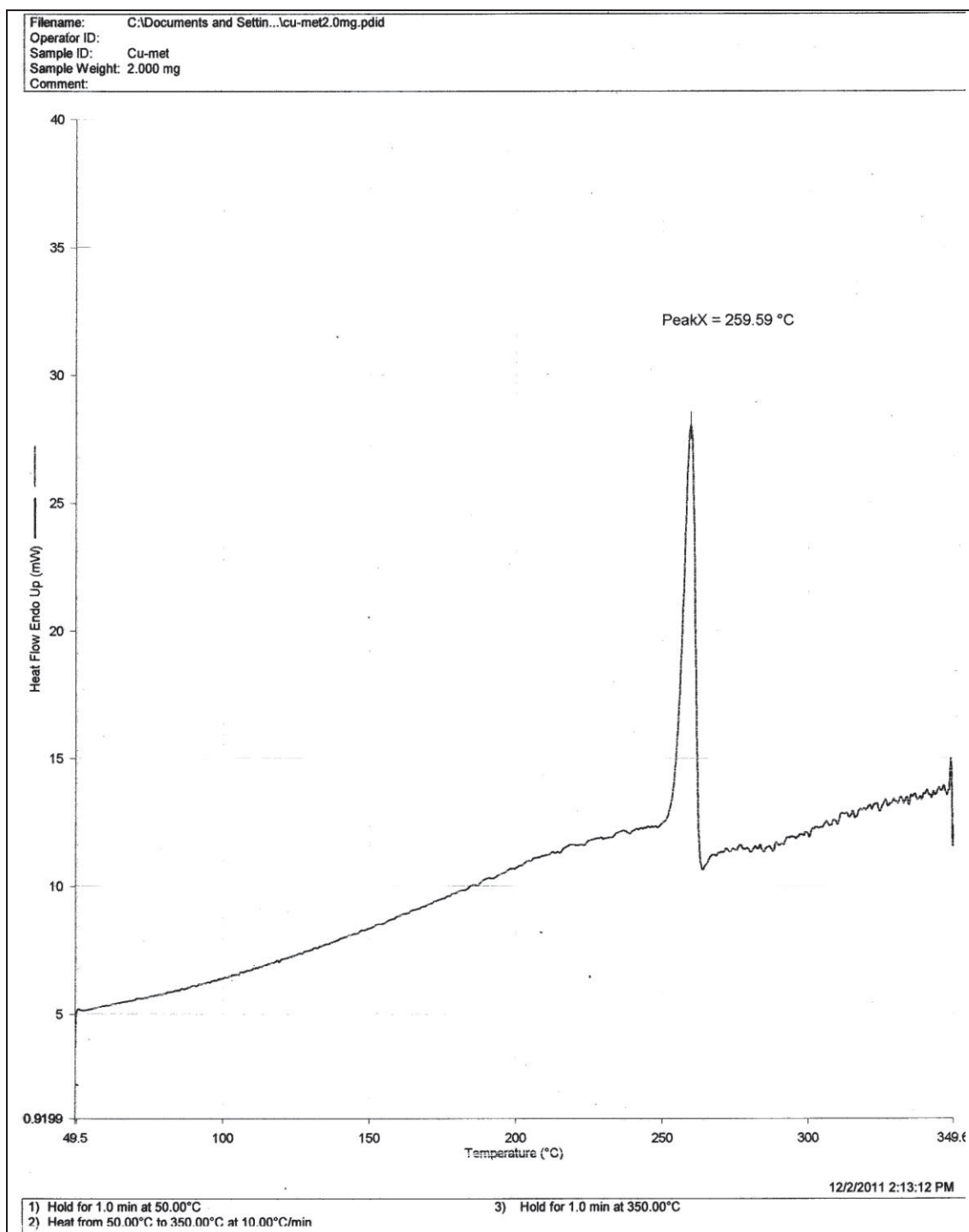
ภาพที่ 33 DSC เทอร์โมแกรมของ glutamine อีสระ



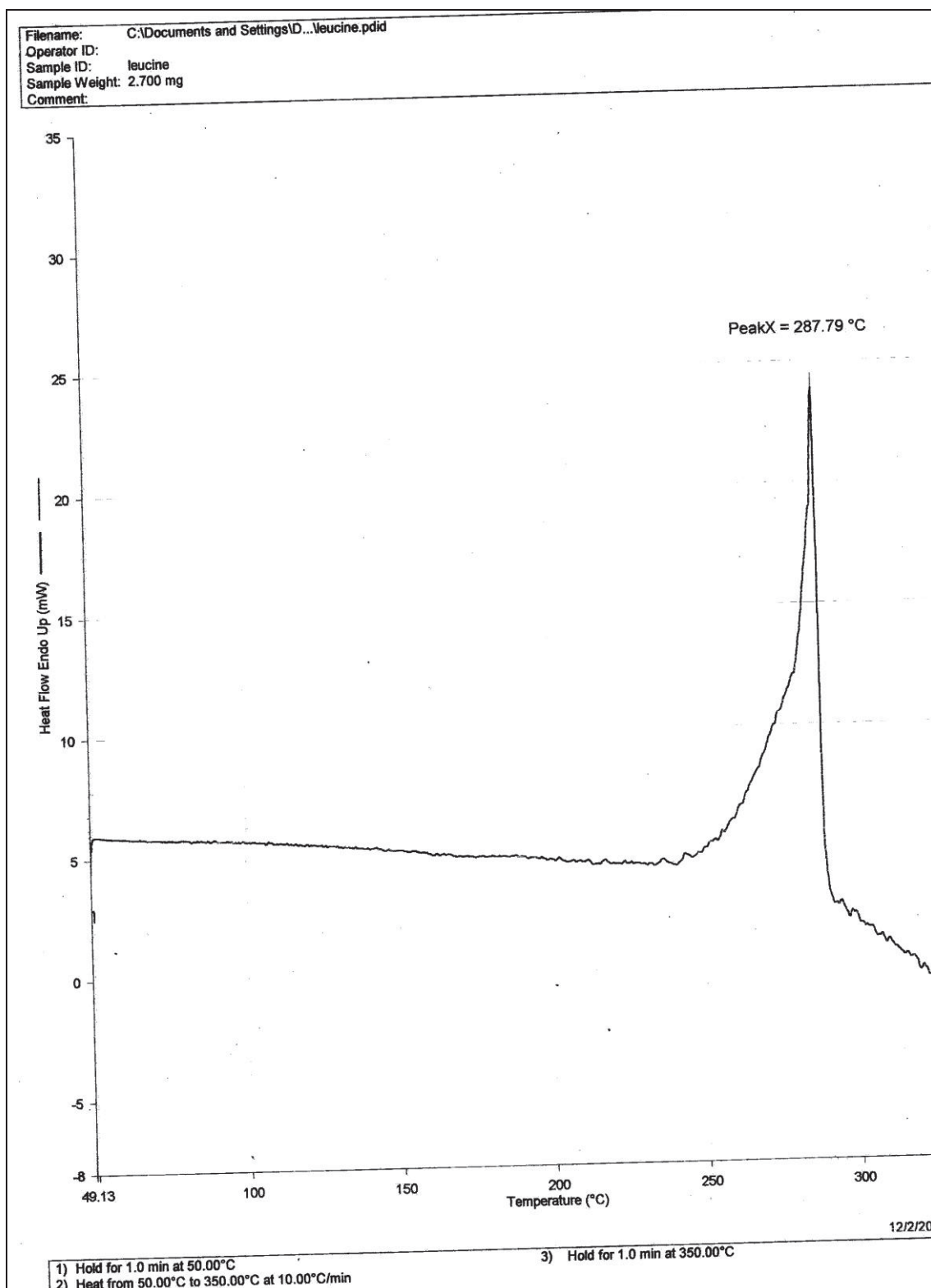
ภาพที่ 34 DSC เทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glutamine



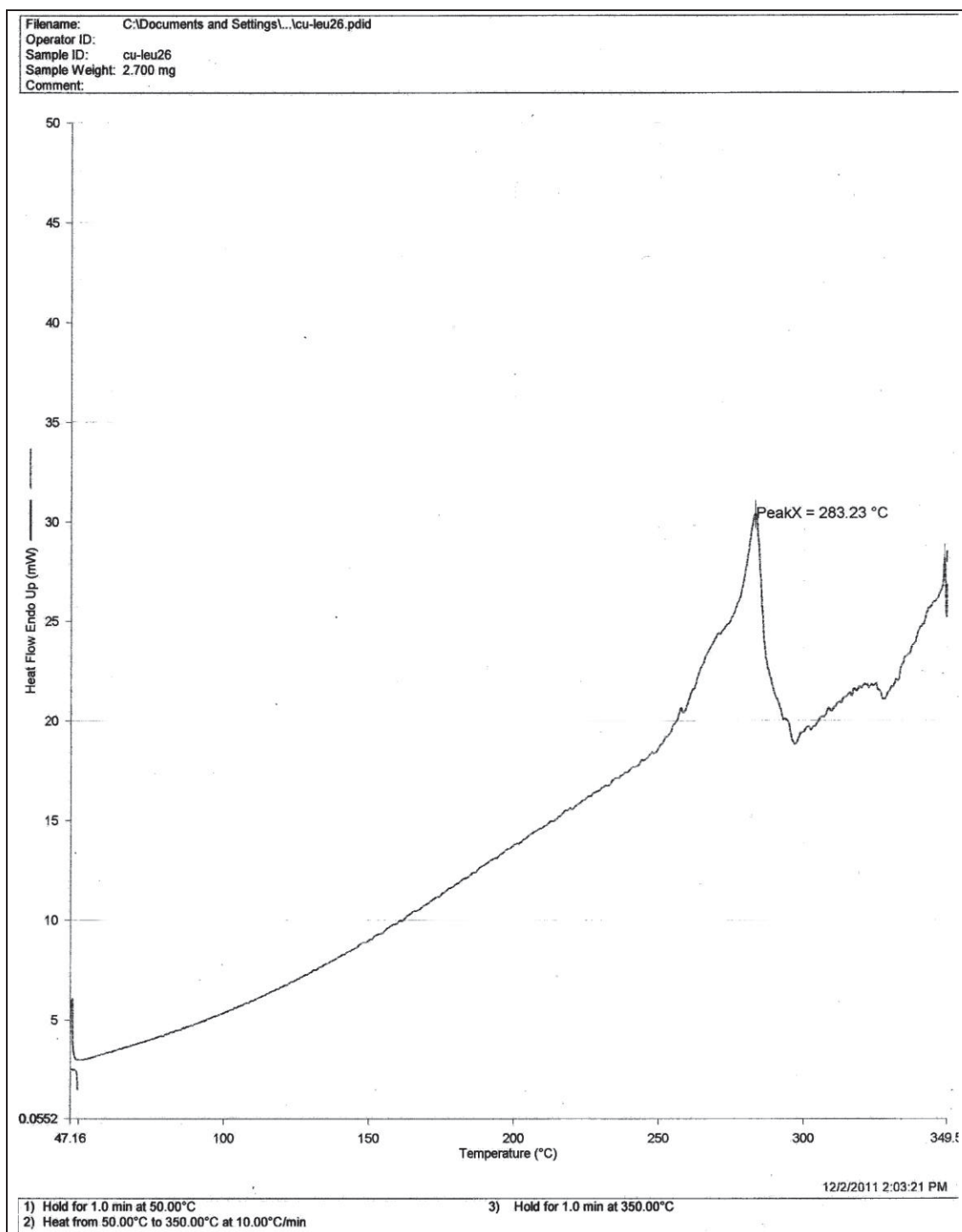
ภาพที่ 35 DSC เทอร์โมแกรมของ methionine อิสระ



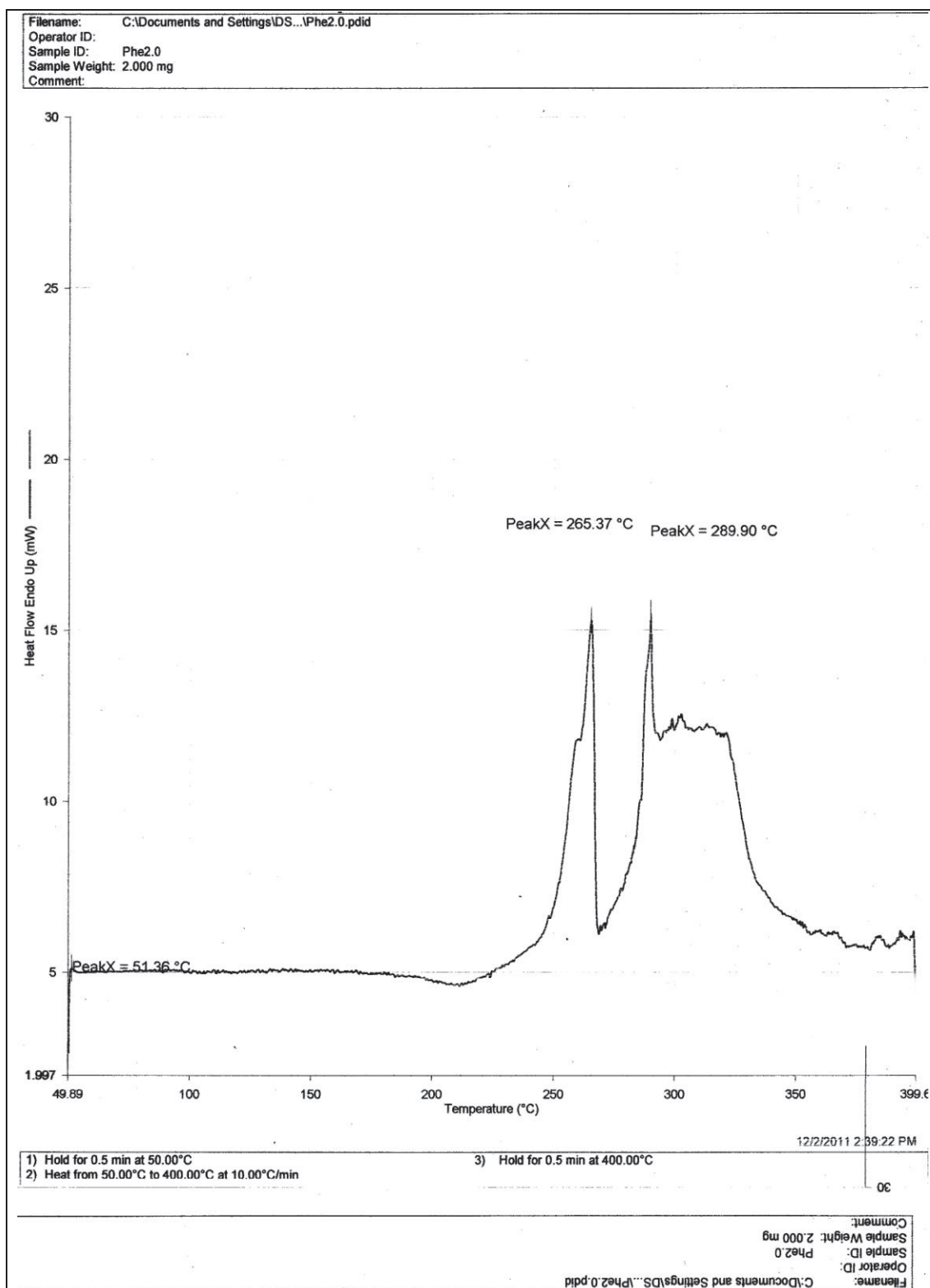
ภาพที่ 36 DSC เทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ methionine



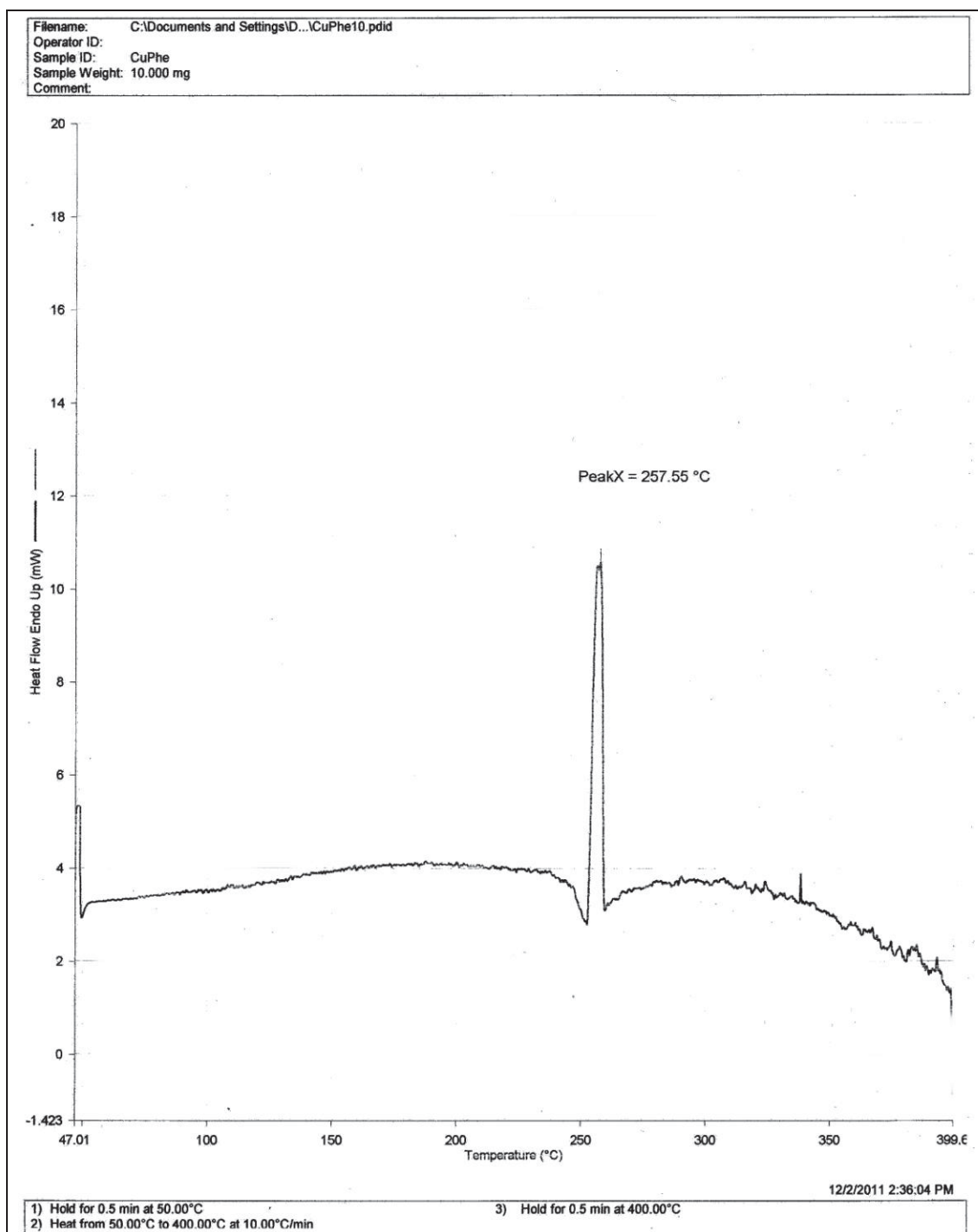
ภาพที่ 37 DSC เทอร์โมแกรมของ leucine อิสระ



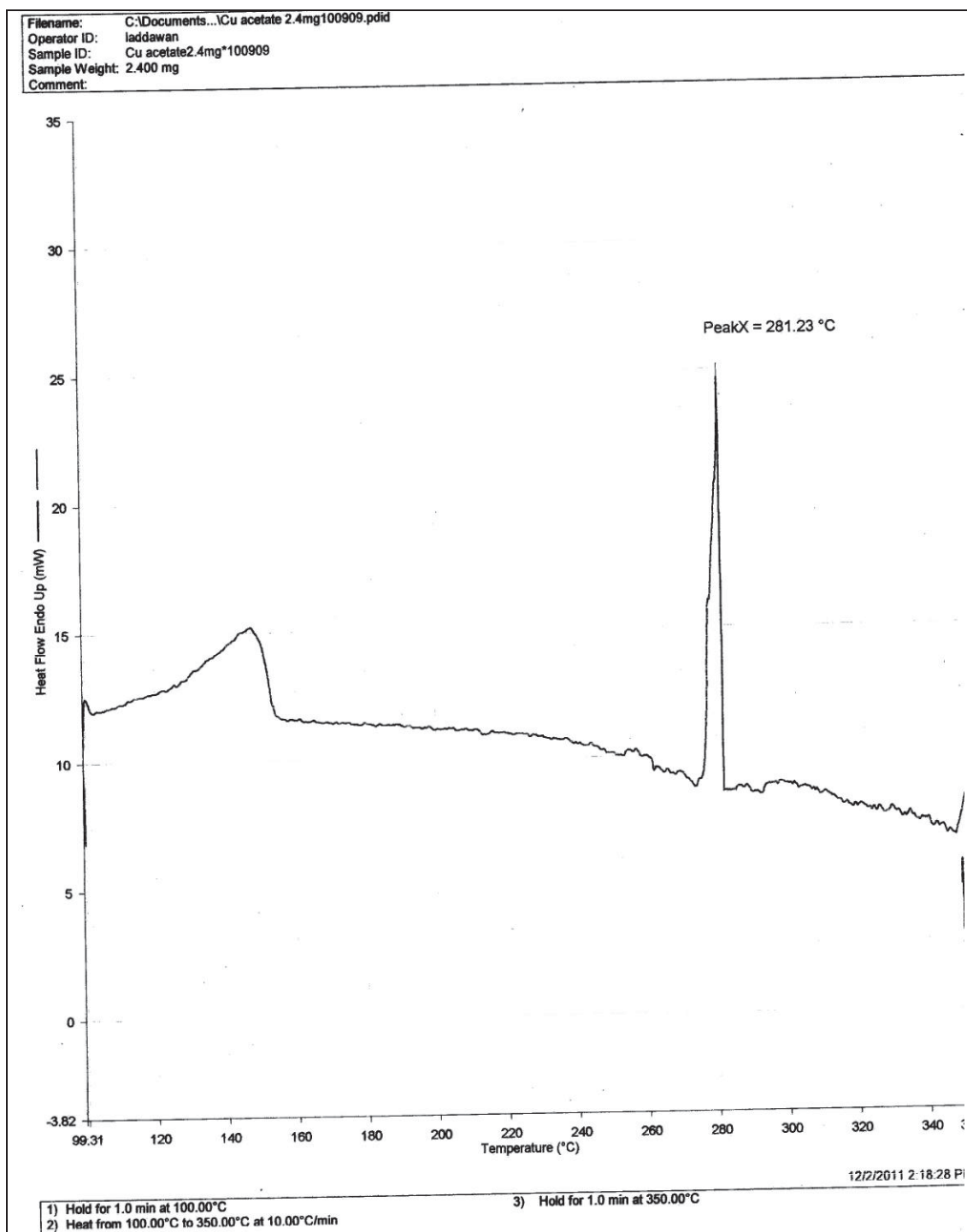
ภาพที่ 38 DSC เทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ leucine



ภาพที่ 39 DSC เทอร์โมแกรมของ phenylalanine อิสระ

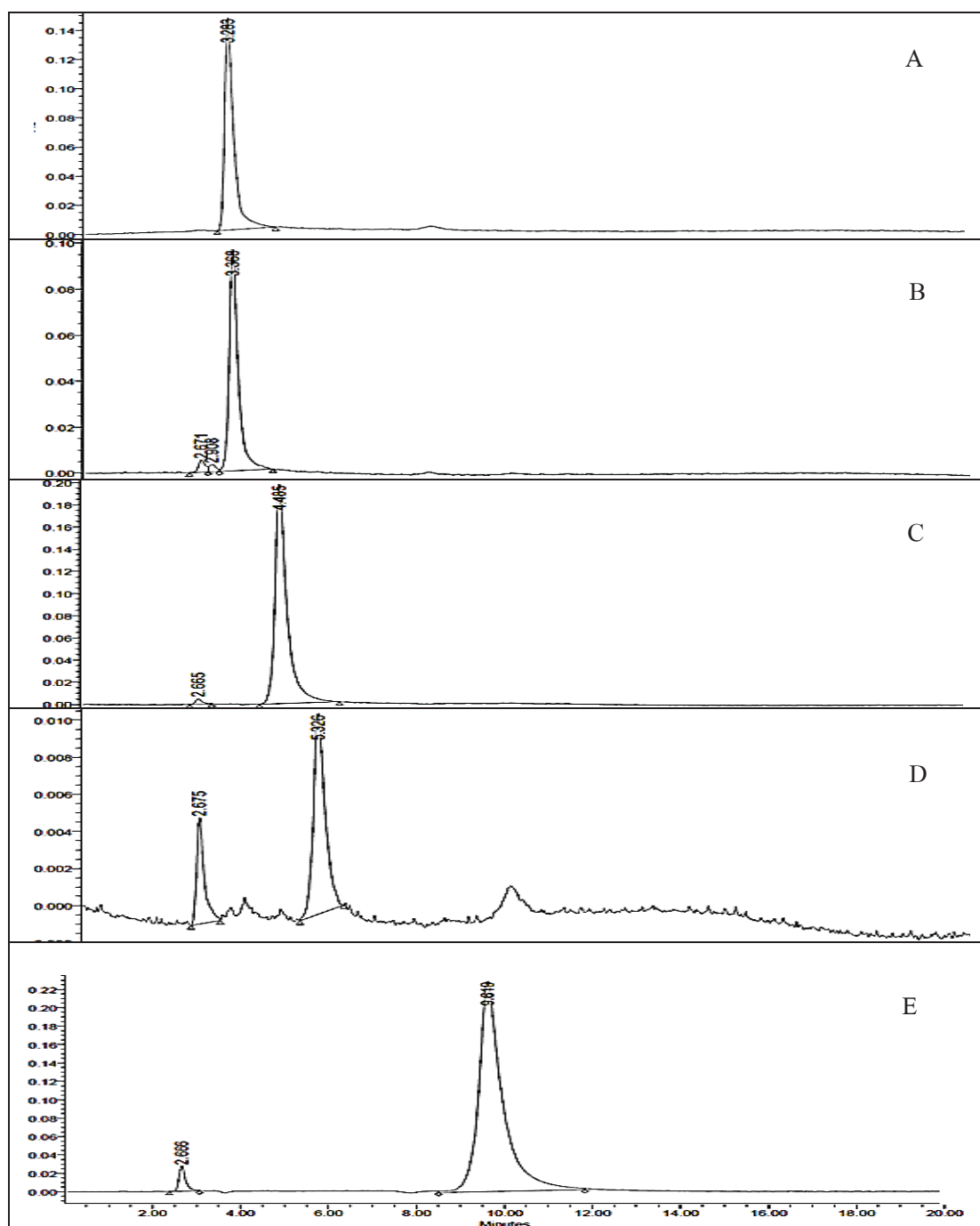


ภาพที่ 40 DSC เทอร์โมแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ phenylalanine

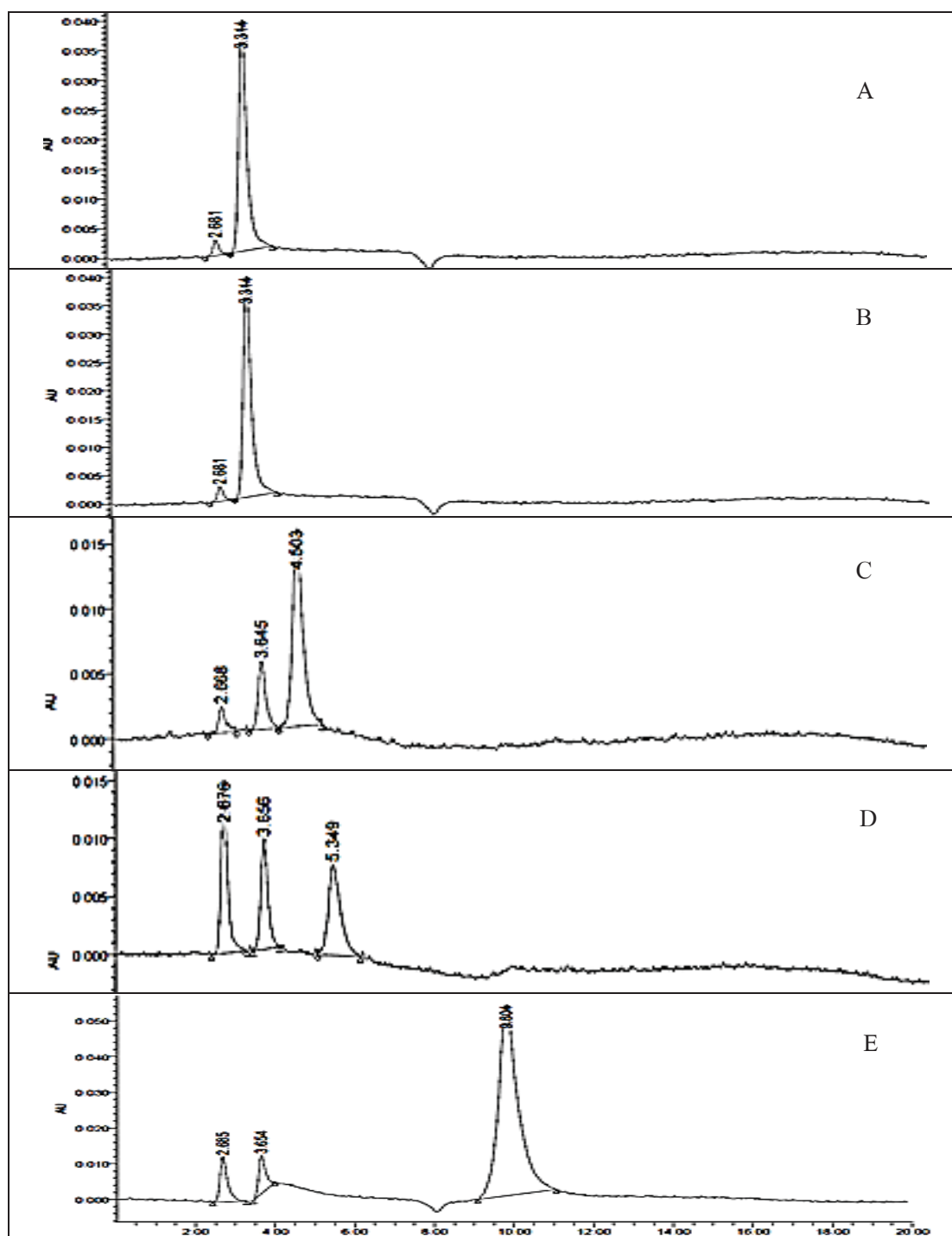


ภาพที่ 41 DSC เทอร์โมแกรมของ copper acetate

ภาคผนวก ค
โครมาโทแกรม



ภาพที่ 42 โครมาโทแกรมของสารละลาย glycine (A), glutamine (B), methionine (C), leucine (D) และ phenylalanine (E)



ภาพที่ 43 โครมาโทแกรมของสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับ glycine (A), glutamine (B), methionine (C), leucine (D) และ phenylalanine (E)

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวลัดดาวัลย์ ศรีวัฒนะ
ที่อยู่	65 ถนนจันทอุดม ตำบลท่าประดู่ อำเภอเมือง จังหวัดระยอง 2100
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2548	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต วิชาเอกเคมี จากมหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม
พ.ศ. 2550	ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเคมีวิเคราะห์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
การเสนอผลงานวิจัย	
ระดับประเทศ	

L. Sriwattana, , S. Supaluknari and S. Choosakoonkriang “Characterization of complexes of copper and amino acids by IR and DSC techniques”, Poster presentation, 36th Congress on Science and Technology of Thailand, October 26-28, 2008, Bangkok, Thailand.