การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกันในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์

ของ

จตุรงค์ จงเจริญ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

มิถุนายน 2555

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกันในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์

ของ

จตุรงค์ จงเจริญ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

มิถุนายน 2555

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกันในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

บทคัดย่อ

ของ

จตุรงค์ จงเจริญ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

มิถุนายน 2555

จตุรงค์ จงเจริญ. (2555). *การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกันในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย, ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) และปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ (HMF) พร้อมกัน ซึ่งสารทั้งสองจัดเป็นสารก่อมะเร็งที่สามารถพบได้ในอาหารหลายชนิด โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมสารอนุพันธ์ระหว่าง MDA และ HMF กับ สารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก ทำการแยกและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงประเภทรีเวิร์สเฟส ซึ่งได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ อัตราส่วนของตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ pH อุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ ระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ และ ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ ทั้งนี้ได้ตรวจวัดสารทั้งสองที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร และ 448 นาโนเมตร ตามลำดับ พบว่าสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ อัตราส่วนของเมทานอลต่อฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ ร้อยละ 40:60 โดยปริมาตร โดยใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 6.5 ทำการควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับการเตรียมอนุพันธ์จะทำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 150 นาที โดยใช้กรด2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เป็นรีเอเจนต์ในการเตรียมอนุพันธ์ ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของ MDA และ HMF ได้ที่ระยะเวลารีเทนชัน 2.6 และ 3.4 นาที ตามลำดับ ผลการศึกษาความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์สารทั้งสอง ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม พบว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นในการวัดปริมาณ MDA มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.01 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ) เท่ากับ 0.07 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ส่วนการตรวจวัดปริมาณ HMF มีค่า LOD เท่ากับ 0.30 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร และ LOQ เท่ากับ 2.38 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยของร้อยละการคืนกลับของวิธีการมีค่า 75.7 และ 107.5 สำหรับ MDA และ HMF ตามลำดับ และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ในการวิเคราะห์ในวันเดียวกันอยู่ที่ 8.5 และ 4.5 สำหรับ MDA และ HMF ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ระหว่างวันอยู่ที่ 10.7 และ 6.2 สำหรับ MDA และ HMF ตามลำดับ เมื่อนำวิธีดังกล่าวไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ สารทั้งสองในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม พบว่า ปริมาณ MDA ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มอยู่ในช่วง 3.00 – 20.00 นาโนกรัม/กรัม ส่วน HMF ตรวจพบได้ในน้ำนมรสช็อคโกแลตเท่านั้น ซึ่งมีปริมาณน้อยมากในช่วง 0.39 – 0.42 ไมโครกรัม/กรัม วิธีนี้สามารถนำไปใช้ตรวจหาสารทั้งสองได้รวดเร็ว สะดวก ถูกต้อง แม่นยำ และสามารถประยุกต์ในการตรวจวิเคราะห์กับตัวอย่างอื่นได้

METHOD DEVELOPMENT FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MALONDIALDEHYDE AND HYDROXYMETHYLFURFURALDEHYDE IN DRINKING MILK BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

AN ABSTRACT

BY

JATURONG CHONGCHAROEN

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

June 2012

Jaturong Chongcharoen. (2012*). Method development for simultaneous determination of malondialdehyde and hydroxymethylfurfuraldehyde in drinking milk by high performance liquid chromatography.* Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Associate Professor Dr. Pornpimol Muangthai, Dr. Piyada Jittangprasert.

The optimal conditions for simultaneous analysis of malondialdehyde and hydroxymethylfurfuraldehyde contents were investigated. Both substance are claimed to be carcinogenic substances in several foods. In this research, the derivertized substances of malondialdehyde and hydroxymethylfurfuraldehyde were prepared with 2-thiobarbituric acid. Then those derivertized substances were separated and analyzed theirs content by reverse phase high performance chromatographic technique. The optimized parameters such as mole ratio of mobile phase, flow rate, pH, temperature, time and reagent concentration were studied and detected both substance by diode array detector at 530 and 448 nm, respectively. The optimum condition showed that the ratio between methanol and phosphate buffer (pH 6.5) was 40 : 60 (v/v). The flow rate was controlled at 1.0 ml/min. The derivertized substances were prepared by 40 mM thiobarbituric acid as the reagent to react with both substances at 25°C for 150 min. Both derivatived substances showed different color, so derivative compounds were separated and identified at retention time 2.6 and 3.4 min,respectively. The result of validate method for analysis both substances in milk sample including LOD and LOQ showed that LOD (S/N = 3) and LOQ (S/N = 10) of MDA ware 0.01 nmol/ml and 0.07 nmol/ml, respectively. The LOD in HMF analysis was 0.30 nmol/ml and LOQ was 2.38 nmol/ml. The recoveries (%) of MDA and HMF were 75.7% and 107.5%, respectively. The relative standard deviation (%RSD) on intra-day of both compounds were 8.5 and 4.5%, respectively. The inter-day of both compounds were 10.7 and 6.2%, respectively. The experimental method in this research was applied to analyses both substances in drinking milk. The results presented that MDA was detected in drinking milk samples in the range of 3.00 – 20.00 ng/g, meanwhile HMF could be detected only in chocolate milk in range 0.39 – 0.42 µg/g. These methods were successfully developed for the determination of HMF and MDA in drinking milk samples and can be applied for detection in several samples.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกันในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ของ

จตุรงค์ จงเจริญ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่..... เดือน..... พ.ศ. 2555

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

..... กรรมการ
(ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ประธาน
(ดร.วินัย อวงพิพัฒน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

..... กรรมการ
(ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะยูโซ๊ะ กูโน)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ ความช่วยเหลือ ความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจากคณาจารย์ในภาควิชาเคมีหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำชี้แนะ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการแก้ปัญหาทุกขั้นตอนอันเกิดจากการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ดร. วินัย อวงพิพัฒน์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยูโซ๊ะ กูโน ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ ประธานกรรมการบริหารหลักสูตร รวมถึง ดร.พนารัตน์ อรุณรัติยากร อาจารย์ที่ปรึกษา และคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเมตตาเอาใจใส่แก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกๆ ท่านเป็นอย่างยิ่ง

ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดาและญาติสนิททุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดู ให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัย ขอบพระคุณอาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทุกๆ ท่านที่มิได้กล่าวรายนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

จตุรงค์ จงเจริญ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
	ความสำคัญของงานวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	น้ำนมและสมบัติของน้ำนม	5
	สารประกอบมาลอนไดแอลดีไฮด์และปฏิกิริยาลิปิดออกซิเดชัน	9
	สารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์และปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล	14
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	24
	อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	24
	วิธีดำเนินการวิจัย	26
	ตอนที่ 1 การศึกษาปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์	26
	ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน	26
	ตอนที่ 3 การศึกษาปัจจัยแปรผันในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์	28
	ตอนที่ 4 การศึกษาการหาค่าของประสิทธิภาพของระบบที่ทดลอง	30
	ตอนที่ 5 การศึกษาผลของสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมที่พบได้ในตัวอย่าง	33
	ตอนที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่ม	34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	**ผลการวิจัย**	36
	ตอนที่ 1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเตรียมสารอนุพันธ์…….....	36
	ตอนที่ 2 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน…….....	38
	ผลของ pH ที่ใช้ในการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์…….....	38
	อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่.....	39
	อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่…….....	42
	ตอนที่ 3 ผลการศึกษาปัจจัยแปรผันในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์.....	44
	ระยะเวลาใช้ในการเตรียมอนุพันธ์.....	44
	ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์.....	45
	ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์	46
	ตอนที่ 4 ผลการศึกษาการหาค่าของประสิทธิภาพของระบบที่ทดลอง.....	48
	การสร้างกราฟมาตรฐาน.....	48
	การหาค่าของขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และค่าของขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์.....	49
	การหาค่าความถูกต้องของวิธีการ.....	49
	การหาค่าความแม่นยำของวิธีการ.....	49
	ตอนที่ 5 ผลการศึกษาผลของสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมที่พบได้ในตัวอย่าง.....	52
	ตอนที่ 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่ม.....	54
5	**สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ**.....	58
บรรณานุกรม.....		62
ภาคผนวก.....		69
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....		83

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ร้อยละขององค์ประกอบของน้ำนมของสัตว์ชนิดต่างๆ และน้ำนมมนุษย์.....	5
2	ปริมาณ(ตัน)การผลิตน้ำนมจากสัตว์ให้น้ำนมตั้งแต่ปี ค.ศ. 1994-2005.....	6
3	ธาตุที่อยู่ในองค์ประกอบของน้ำนม.....	8
4	ค่าขีดจำกัดต่ำสุดการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ.....	49
5	ร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการวิเคราะห์.....	50
6	ผลการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มชนิดพาสเจอร์ไรซ์.....	55

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ ทั้งในรูปของอัลดีไฮด์และอีนอล	9
2	การเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันจนได้ผลิตภัณฑ์เป็น MDA	11
3	ทำลายสารพันธุกรรม 2'-deoxyguanosine โดยมาลอนไดอัลดีไฮด์	12
4	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำลายดีเอนเอ โดยมาลอนไดอัลดีไฮด์	13
5	โครงสร้างของ lysine-lysine cross-links โดยมาลอนไดอัลดีไฮด์	13
6	โครงสร้างของ *N-dG,N-dG*-Malondialdehyde	14
7	ปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาลในผลกล้วย	15
8	กลไกการเกิดสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์	18
9	ปฏิกิริยาการเกิดสารอนุพันธ์ระหว่างกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก	37
10	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์	37
11	ผล pH ที่มีต่อการวิเคราะห์สารอนุพันธ์	38
12	โครมาโทแกรมจากผลการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์อนุพันธ์จากมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์	40
13	ผลของการศึกษาผลจากองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อค่าระยะเวลารีเทนชัน	41
14	ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีต่อระยะเวลารีเทนชัน	42
15	แสดงโครมาโทแกรมจากสภาวะที่เหมาะของเทคนิคเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน	44
16	ผลของอุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์	45
17	ผลของระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อพื้นที่พีคของสารอนุพันธ์	46
18	การเปลี่ยนแปลงพื้นที่พีคของสารอนุพันธ์ เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารละลายกรด 2- ไทโอบาร์บิทูริก	46

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

19 โครมาโทแกรมที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ดังนี้ อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 40:60 (เมทานอล:ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 6.5) อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิและระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ที่ 25°C เป็นเวลา 150 นาที และใช้ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ 40mM..... 47

20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความเข้มข้นกับสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์..... 48

21 แสดงโครมาโทแกรม ดังนี้..... 51

ก แทน โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างนมพร้อมดื่มชนิดพาสเจอร์ไรท์ รสจืด

ข แทน โครมาโทแกรมสารละลายผสมของสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

ค แทน โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างนมพร้อมดื่มชนิดพาสเจอร์ไรท์ รสจืด ที่มีการเติมสารละลายผสมของสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ลงไป

22 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมของสารรบกวนทั้ง 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 nmol..... 53

23 ปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลกับหมู่อัลดีไฮด์ในการปิดวงของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคส..... 54

24 โครมาโทแกรมในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มชนิดสเตอริไรส์..... 56

25 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีการอื่นๆที่นิยมในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์..... 57

26 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 5 nmol/ml และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ความเข้มข้น 40 nmol/ml..... 71

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

27 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 10 nmol/ml และ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ความเข้มข้น 80 nmol/ml..... 71

28 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 20 nmol/ml และ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ความเข้มข้น 160 nmol/ml..... 72

29 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 40 nmol/ml และ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ความเข้มข้น 320 nmol/ml..... 72

30 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ รสจืด..... 73

31 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมยูเอชที รสจืด..... 73

32 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมสเตอริไรส์ รสจืด..... 74

33 แสดงการตกตะกอนของสารประกอบ MDA ในรูปของเกลือโซเดียม..... 77

34 การสังเคราะห์มาลอนไดอัลดีไฮด์ จาก TEP โดยปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส..... 77

35 ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดของสารละลายมาลอนไดอัลดีไฮด์..... 78

36 สีของสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น..... 80

37 เครื่องอังไอน้ำที่สามารถควบคุมอุณภูมิได้ใช้ในการให้ความร้อน ในการเตรียมอนุพันธ์..... 80

38 ชุดกรองที่ใช้ในการกรองสารมาตรฐานและสารตัวอย่างก่อนนำไปฉีดเข้าสู่ระบบ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง..... 81

39 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง..... 81

40 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน..... 82

41 เครื่องยูวี วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์..... 82

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

น้ำนมมีความสำคัญต่อชีวิตประจำวันของประชากร โดยทั่วไปในปีหนึ่งๆ ประเทศไทยต้องสั่งผลิตภัณฑ์จากน้ำนมนำเข้าจากต่างประเทศคิดเป็นมูลค่าหลายร้อยล้านบาท เนื่องจากประเทศไทยมีการเลี้ยงโคนมไม่มากเพียงพอเมื่อเทียบกับความต้องการภายในประเทศ ในขณะที่จำนวนประชากรของประเทศเพิ่มขึ้นในอัตราสูง ทำให้ความต้องการผลิตภัณฑ์จากน้ำนมเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ จึงจำเป็นต้องหาวิธีส่งเสริมกิจการอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์จากน้ำนมให้เจริญก้าวหน้า (ประดิษฐ์. 2518: 1) อุตสาหกรรมนมเป็นอุตสาหกรรมใหญ่ประเภทหนึ่งที่มีผลิตภัณฑ์จากน้ำนมหลายชนิด ได้แก่ น้ำนมพร้อมดื่มประเภทต่างๆ ไอศกรีม นมผง นมข้นหวาน โยเกิร์ต เป็นต้น น้ำนมเป็นสารที่มีคุณค่าทางอาหารครบถ้วนซึ่งสามารถให้พลังงานและสารที่มีประโยชน์แก่ร่างกาย น้ำนมที่มีคุณภาพไม่ดีอาจก่อให้เกิดผลที่เสี่ยงกับการเป็นโรค จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพอย่างเข้มงวดของน้ำนมและผลิตภัณฑ์จากน้ำนมเมื่อเทียบเทียบผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ โดยน้ำนมที่มีคุณภาพดีนั้นสามารถพิจารณาได้จากคุณสมบัติทั่วไป เช่น รส สี และกลิ่นของน้ำนม ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการเสื่อมคุณภาพของน้ำนมได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการเสื่อมคุณภาพของน้ำนมมีหลายสาเหตุ เช่น การย่อยสลายของจุลชีพ นอกจากนี้การเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีบางประเภท อาจช่วยให้ทราบถึงคุณภาพน้ำนมได้ เช่น การเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ของไขมันต่างๆที่มีอยู่ในองค์ประกอบของน้ำนม (Let. 2005: 7802-7809) การเกิดปฏิกิริยาสารสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์หรือที่รู้จักกันดีในชื่อของ “ปฏิกิริยาเมลลาร์ด” (maillard reaction) (Van. 1998: 403–414)

ปฏิกิริยาสำคัญที่สามารถเกิดขึ้นได้ในอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ คือปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยผลของปฏิกิริยานี้จะให้สารผลิตภัณฑ์ต่างๆ หลายชนิดที่เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดโรคและพัฒนาการของโรค เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (Barry. 2000: 410-418) โรคความดันโลหิตสูง (Russo. 1998: 1267-71) โรคเบาหวาน (Davì. 2005: 256-68.) ในปี ค.ศ. 2002 Lawrence. (Lawrence. 2002: 219-222) ได้ทำการศึกษาผลของการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ซึ่งอาจทำให้ได้ผลิตผลเป็นมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, หรือ MDA) แล้วไปทำลายโครงสร้างของสารประกอบทางพันธุกรรม โดยเมื่อร่างกายได้รับมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้าไปจะไปทำปฏิกิริยาต่อกับสารพันธุกรรมของมนุษย์ เช่น 2'-deoxyguanosine จนส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นสารประกอบใหม่ที่เรียกว่า M_1G (3-(2-deoxy-β-D-erythropento furanosyl)- pyrimido[1,2-α]purin-10(3H)) ซึ่งผลของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบ

พันธุกรรมนี้ เป็นสาเหตุของความผิดปกติทางพันธุกรรมต่างๆ ที่เกิดขึ้นตามมามากมาย เช่น โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน และโรคมะเร็ง ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันจึงใช้เป็นดัชนีชี้วัดผลของการเกิดออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระได้ สำหรับสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันนั้นมีมากมาย แต่ผลิตภัณฑ์หนึ่งที่สำคัญอันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งคือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารประกอบอัลดีไฮด์และมีโครงสร้างที่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีจากสารประกอบอัลดีไฮด์เป็นสารประกอบไดอีนได้ เนื่องจากมาลอนไดอัลดีไฮด์นั้นเป็นผลิตผลหนึ่งที่เกิดจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจวัดผลของการเกิดออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระได้

ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสารสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์ ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดขึ้นหลายขั้นตอนแต่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดเป็นสารสีน้ำตาลที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเรียกว่า “เมลานอยดิน (melanoidins)” ปฏิกิริยานี้มีความสำคัญต่ออาหารบางประเภท เช่น ขนมอบ คาราเมล ทอฟฟี่ เป็นต้น ทั้งนี้เพราะทำให้เกิดสีน้ำตาลในอาหารดังกล่าวและชวนให้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยานี้ก็มีข้อเสียคือทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง ถ้าอาหารนั้นมีโปรตีนสูงและได้รับความร้อนสูงด้วยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นสารก่อมะเร็ง สารผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่สำคัญและเป็นสารพิษดังกล่าวคือ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ (hydroxymethylfurfuraldehyde หรือ HMF) (นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549:324)

ดังนั้นน้ำนมที่ไม่ได้มาตรฐานและเสื่อมคุณภาพนอกจากจะทำให้ลักษณะของสีและกลิ่นของน้ำนมไม่ชวนบริโภคแล้ว ยังอาจผลทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ เช่น สารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์และสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ อีกทั้งการได้รับปริมาณของสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลฟิวรัลดีไฮด์และสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ยังอาจเป็นปัจจัยหนึ่งของสาเหตุหลักในการเกิดโรคมะเร็งได้ (Wang. 1996: 705) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะทำการตรวจวิเคราะห์สารทั้งสองชนิด โดยจะศึกษาและพัฒนาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ และสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์พร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) นอกจากนี้จะนำวิธีที่พัฒนาได้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของน้ำนมพร้อมดื่ม

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์
3. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มประเภทต่างๆ

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทราบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์
3. ทราบปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่
    1.1 องค์ประกอบและค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่
    1.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่
    1.3 ค่า pH ของบัฟเฟอร์
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ของสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์
    2.1 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์
    2.2 ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้เตรียมอนุพันธ์
3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น
    3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์
    3.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD)
    3.3 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOQ)
    3.4 ค่าความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์

4. ศึกษาผลของสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วม ได้แก่
    - กรดอะมิโนโพรลีน
    - กรดอะมิโนกลูตามิค
    - กรดอะมิโนไลซีน
    - น้ำตาลกาแลกโทส
    - น้ำตาลกลูโคส
    - น้ำตาลฟรักโทส
    - น้ำตาลของแลคโตส
    - กรดไลโนลีอิค
5. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ในตัวอย่างประเภทต่างๆ
    - น้ำนมพร้อมดื่มไขมันครบถ้วน
    - น้ำนมพร้อมดื่มไขมันต่ำ
    - น้ำนมพร้อมดื่มปรุงแต่งกลิ่นรส เช่น รสหวาน รสช็อคโกแลต รสสตอร์เบอรี่

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น
3. ศึกษาผลของสารรบกวนที่น่าจะเกิดอนุพันธ์ร่วมในตัวอย่างน้ำนม
4. วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบ 2 ชนิด ได้แก่ ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ในตัวอย่างน้ำนม โดยผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ตามหัวข้อดังต่อไปนี้

- น้ำนมและส่วนประกอบของน้ำนม
- สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และปฏิกิริยาลิปิดออกซิเดชัน
- สารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ และปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ในตัวอย่างน้ำนม

น้ำนมและส่วนประกอบของน้ำนม

น้ำนม หมายถึง ของเหลวสะอาดที่กลั่นจากเต้านมของสัตว์เลี้ยงลูกเพื่อใช้เลี้ยงลูกอ่อน โดยสัตว์ที่มีความสำคัญมากที่สุดที่ให้น้ำนมคือ โคนม เนื่องจากโคนมเป็นสัตว์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างน้ำนมดีที่สุด ดังนั้นโคนมจึงเป็นสัตว์ที่นิยมเลี้ยงเพื่อใช้ผลิตน้ำนมมากที่สุด ด้วยเหตุที่น้ำนมเป็นอาหารธรรมชาติที่มีความสมบูรณ์และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมด้วยธาตุอาหารครบทุกหมู่ คือ โปรตีน วิตามิน เกลือแร่ คาร์โบไฮเดรต และไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลนมหรือแลคโตส (lactose) และโปรตีนที่เรียกว่า เคซีน (casein) ซึ่งจะพบในน้ำนมธรรมชาติเท่านั้น ดังนั้นน้ำนมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการใช้เป็นอาหารที่ช่วยพัฒนาร่างกายและสมองของเด็กและเยาวชน (Huppertz; & Kelly. 2009: 23)

องค์ประกอบหลักของน้ำนมได้แก่ โปรตีน ไขมัน น้ำตาลแลคโตส วิตามิน แร่ธาตุ ของแข็งอื่นๆ และน้ำ โดยองค์ประกอบของน้ำนมยกเว้นน้ำ ในสัตว์ที่ให้น้ำนมชนิดต่างๆ รวมถึงน้ำนมของมนุษย์ แสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ร้อยละขององค์ประกอบของน้ำนมของสัตว์ชนิดต่างๆ และน้ำนมมนุษย์

สัตว์ที่ให้น้ำนม	ไขมัน	โปรตีน	แลคโตส	เถ้า	ของแข็ง
มนุษย์	3.80	1.00	7.00	0.20	12.20
โคนม	3.70	3.40	4.80	0.70	12.70
แพะ	4.50	2.90	4.10	0.80	12.30
แกะ	7.40	4.50	4.80	1.00	19.30
สุกร	6.80	4.80	5.20	-	18.80

ตาราง 1 (ต่อ)

สัตว์ที่ให้น้ำนม	ไขมัน	โปรตีน	แลคโตส	เถ้า	ของแข็ง
ม้า	1.90	2.50	6.20	0.50	11.20
ลา	1.40	2.00	7.40	0.50	11.70
กวางเรนเดีย	16.90	11.50	2.80	-	33.10
กระต่ายยักษ์	18.30	11.90	2.10	1.80	32.80
วัวกระทิง	3.50	4.50	5.10	0.80	14.60
กระบือ	6.71	4.52	4.45	0.80	10.11
ช้างอินเดีย	11.60	4.90	4.70	0.70	31.90
หมีขั้วโลก	33.10	10.90	0.30	1.40	47.60
แมวน้ำสีน้ำตาล	53.10	11.20	0.70	-	67.7

ที่มา: Huppertz T.; & Kelly L. (2009). *Milk processing and quality management*. p. 23.

ตารางที่ 2 ปริมาณ(ตัน)การผลิตน้ำนมจากสัตว์ให้น้ำนมตั้งแต่ปี ค.ศ. 1994-2005

สิ่งมีชีวิตที่ให้น้ำนม	1993	1995	1997	1999	2001	2003	2005
โคนม	460.1	465.2	472.1	483.0	492.0	505.3	527.0
กระบือ	50.0	54.5	59.7	64.9	68.9	72.7	77.5
แพะ	9.9	11.8	12.1	12.1	12.5	12.4	12.3
แกะ	7.8	8.0	8.2	8.0	8.2	7.8	8.2
สัตว์อื่นๆ	1.2	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
รวม	**529.0**	**540.8**	**553.4**	**569.4**	**582.9**	**599.6**	**626.3**

ที่มา: Huppertz T.; & Kelly L. (2009). *Milk processing and quality management*. p. 24.

จากข้อมูลในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าโคนมเป็นสัตว์ที่ให้น้ำนมที่สำคัญที่สุดและมักใช้เป็นวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์จากน้ำนม ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำนมโคที่นิยมใช้ในการตีราคาในการซื้อขายน้ำนมโค คือ ปริมาณไขมันและของแข็งทั้งหมด (total solid) ที่มีอยู่ในน้ำนม (มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, มกอช, 6003-2548)

องค์ประกอบต่างๆ ในน้ำนมมีความสำคัญดังนี้

น้ำ เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของน้ำนมประมาณร้อยละ 86-88 ของส่วนประกอบทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากน้ำเป็นสื่อกลางให้สารอาหารหลายชนิดละลาย และสารหลายชนิดอยู่ในสภาพแขวนลอย มีน้ำจำนวนเล็กน้อยที่อยู่ในรูปของสารประกอบของเกลือหรือน้ำตาลแลคโตส และเป็นส่วนประกอบของโปรตีน

น้ำตาลแลคโตส เป็นน้ำตาลที่พบในน้ำนมเท่านั้น สำหรับในน้ำนมโคจะมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสประมาณร้อยละ 4.9 โดยน้ำหนัก ซึ่งต่ำกว่าที่พบในน้ำนมมนุษย์ ซึ่งมีประมาณมากถึงร้อยละ 6.3 และมีอยู่ในองค์ประกอบของของแข็งทั้งหมด ในน้ำนมร้อยละ 50-52 น้ำตาลแลคโตสเป็นหนึ่งในสารอาหารที่สำคัญในน้ำนม น้ำตาลแลคโตสเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูงจึงสามารถนำมาใช้ในการผลิตอาหารเลี้ยงเด็กอ่อน น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งของน้ำตาลแกแลคโตสซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของซีรีโบรไซด์ (cerebrosides) ที่เป็นส่วนหนึ่งของมันสมองและเซลล์ประสาท นอกจากนั้นน้ำตาลแลคโตสยังใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน และใช้เป็นส่วนประกอบของการผลิตยารักษาโรคชนิดอื่นๆ อีกด้วย

วิตามิน ในน้ำนมโคพบวิตามินทั้งประเภทที่ละลายในไขมันและไม่ละลายในไขมัน โดยวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี วิตามินเค และแคโรทีนอยด์ โดยปริมาณของวิตามินเหล่านี้ที่พบส่วนใหญ่ขึ้นกับอาหารที่ใช้เลี้ยงโคนม สำหรับวิตามินที่ละลายน้ำได้แก่ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบีรวม วิตามินบี 6 วิตามินบี 12 วิตามินซี วิตามินดี และวิตามินดี 3 ซึ่งช่วยป้องกันโรคลักปิดลักเปิด อัมพาต โรคผิวหนัง โรคลำไส้ โรคฟันผุ มักพบอยู่ในหางน้ำนมเป็นส่วนใหญ่และปริมาณที่พบไม่ขึ้นกับอาหารที่ใช้เลี้ยงโค เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ในกระเพาะของโค โดยวิตามินเหล่านี้นอกจากจะให้คุณค่าทางโภชนาการแล้ว ยังมีบทบาทต่อการรักษากลิ่นรสของน้ำนมอีกด้วย

โปรตีน น้ำนมมีโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ เคซีน และเวย์โปรตีน (whey proteins) หรือซีรัมโปรตีน (serum proteins) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิด คือ แอลฟา-แลกตัลบูมีน (α-lactalbumin) และเบตา-แลกโตโกลบูลีน (β- lactoglobulin) นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโน (amino acid) อยู่ 19 ชนิด ซึ่งมีประโยชน์ต่อการสร้างเนื้อเยื่อ เลือด และกระดูก นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ชนิดต่างๆ อีกด้วย

เถ้าและแร่ธาตุ เถ้าของน้ำนมแตกต่างจากแร่ธาตุของน้ำนม เถ้าเป็นเพียงส่วนที่เหลืออยู่หลังจากเผาน้ำนมจนเป็นเถ้าที่ 600 องศาเซลเซียส เถ้าของน้ำนมประกอบด้วยออกไซด์และคลอไรด์ของโซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ ส่วนแร่ธาตุในน้ำนม ได้แก่ ฟอสเฟตคลอไรด์และซิเตรตของโพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียม โดยโพแทสเซียมและคลอไรด์จะอยู่ในรูปของไอออนที่ละลายน้ำทั้งหมด ส่วนฟอสเฟต แคลเซียม แมกนีเซียมและซิเตรต บางส่วนจะอยู่ในรูปไอออนที่ละลายน้ำและบางส่วนอยู่ในรูปสารเชิงซ้อนคอลลอยด์ ส่วนแคลเซียมพบว่า ประมาณสองในสามจะกระจายเป็นคอลลอยด์ และเพียงหนึ่งในสิบเท่านั้นที่เป็นไอออนของสารละลาย โดยส่วนใหญ่ของเถ้าจะประกอบด้วยแร่ธาตุต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำนม ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ธาตุที่อยู่ในองค์ประกอบของน้ำนม

แร่ธาตุ	ปริมาณ mg ใน100g	%ที่มีในซีรัม
Na	48	0.95
K	143	0.94
Ca	117	0.32
Mg	11	0.66
Cl	110	1
CO_3	10	1
SO_4	10	1
PO_4	203	0.53
Citrate	175	0.92

ที่มา: Huppertz T.; & Kelly L. (2009). *Milk processing and quality management*. p. 24.

ไขมันและสารประกอบไขมัน ไขมันหรือที่รู้จักในนามของมันเนย จัดเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของน้ำนม ทั้งในด้านโภชนาการ อีกทั้งยังมีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิดละลายได้ในมันเนย เช่น สารพวกแคโรทีน ซึ่งเป็นแหล่งของวิตามินต่างๆ นอกจากนี้ยังมีการใช้ค่าปริมาณมันเนยเป็นตัวกำหนดราคาซื้อขายน้ำมัน ส่วนประกอบส่วนใหญ่ในมันเนยจะอยู่ในรูปของกรดไขมันประมาณร้อยละ 98-99 ของมันเนยทั้งหมด ซึ่งมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 4 ตัว ไปจนถึง 20 ตัว แยกเป็นกรดไขมันอิ่มตัวประมาณร้อยละ 57 และกรดไขมันไม่อิ่มตัวประมาณร้อยละ 43 ของไขมันและสารประกอบไขมันในน้ำนม นอกจากนี้ไขมันนมยังประกอบด้วยฟอสโฟลิปิด (phospholipids) กรดคีโตกลีเซอไรด์ (keto acid glycerides) สเตรอล (sterols) และวิตามินที่ละลายในไขมันคือ วิตามินเอ ดี เค และ อี ตลอดจนแคโรทีนอยด์ปริมาณเล็กน้อย

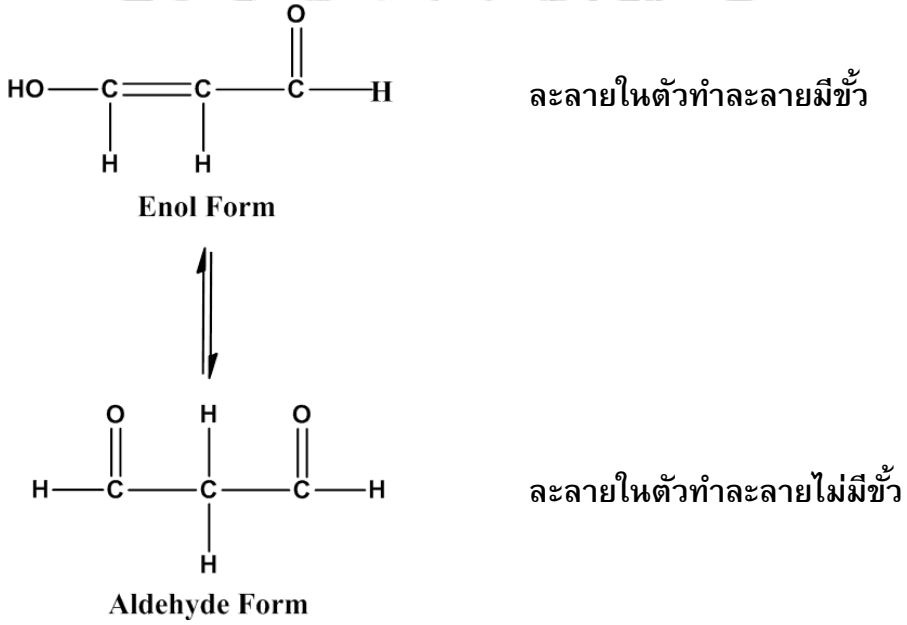
ไขมันนมมักจะอยู่ในลักษณะที่เป็นอนุภาคเล็กๆ เรียกว่า เม็ดไขมัน (fat globule) เส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดไขมันประมาณ 1 ส่วน 1000 นิ้ว ซึ่งใน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรของน้ำนมโคจะมีปริมาณของเม็ดไขมันประมาณ 250 ล้านเม็ด (รัชนี, 2543: 283)

เนื่องจากน้ำนมของสัตว์ที่มีหลายกระเพาะ (สัตว์เคี้ยวเอื้อง) เช่น โค หรือ กระบือ มักจะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่าร้อยละ 40 ซึ่งเป็นกรดไขมันประเภทที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้วสลายตัวให้สารประกอบที่ระเหยง่ายและมีกลิ่น ดังนั้นน้ำนมของสัตว์เหล่านี้จึงมีกลิ่นหืนเมื่อเก็บไว้นานๆ หรืออยู่ในสภาวะที่มีอนุมูลอิสระสูงจะสามารถช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่าย

สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และปฏิกิริยาลิปิดออกซิเดชัน

สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ เป็นผลิตภัณฑ์ขั้นที่สองที่เกิดจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน(peroxidation) ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ถูกใช้เป็นตัวชี้วัดถึงระดับการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระอันเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ

สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์สามารถเตรียมได้จากสารประกอบ 1,1,3,3-Tetramethoxypropane โดยอาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งโครงสร้างโดยทั่วไปของมาลอนไดอัลดีไฮด์ จะเป็นสารประกอบอัลดีไฮด์ ถ้าละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้ว แต่จะอยู่ในรูปของสารประกอบอีนอลถ้าละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว ดังแสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ ทั้งในรูปของอัลดีไฮด์และอีนอล
ที่มา : Trivella A. (2008). *Malonaldehyde Synthesis*. pp. 3285-3290.

ลักษณะทั่วไปของมาลอนไดอัลดีไฮด์เป็นสารที่มีจุดหลอมเหลว 72–74 องศาเซลเซียส แต่ถ้ามาลอนไดอัลดีไฮด์อยู่ในรูปของผลึกเกลือโซเดียมจะมีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 245 องศาเซลเซียส มาลอนไดอัลดีไฮด์บริสุทธิ์จะละลายน้ำได้ดี มีค่า pK_a เท่ากับ 4.46 และสามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้เล็กน้อยที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร

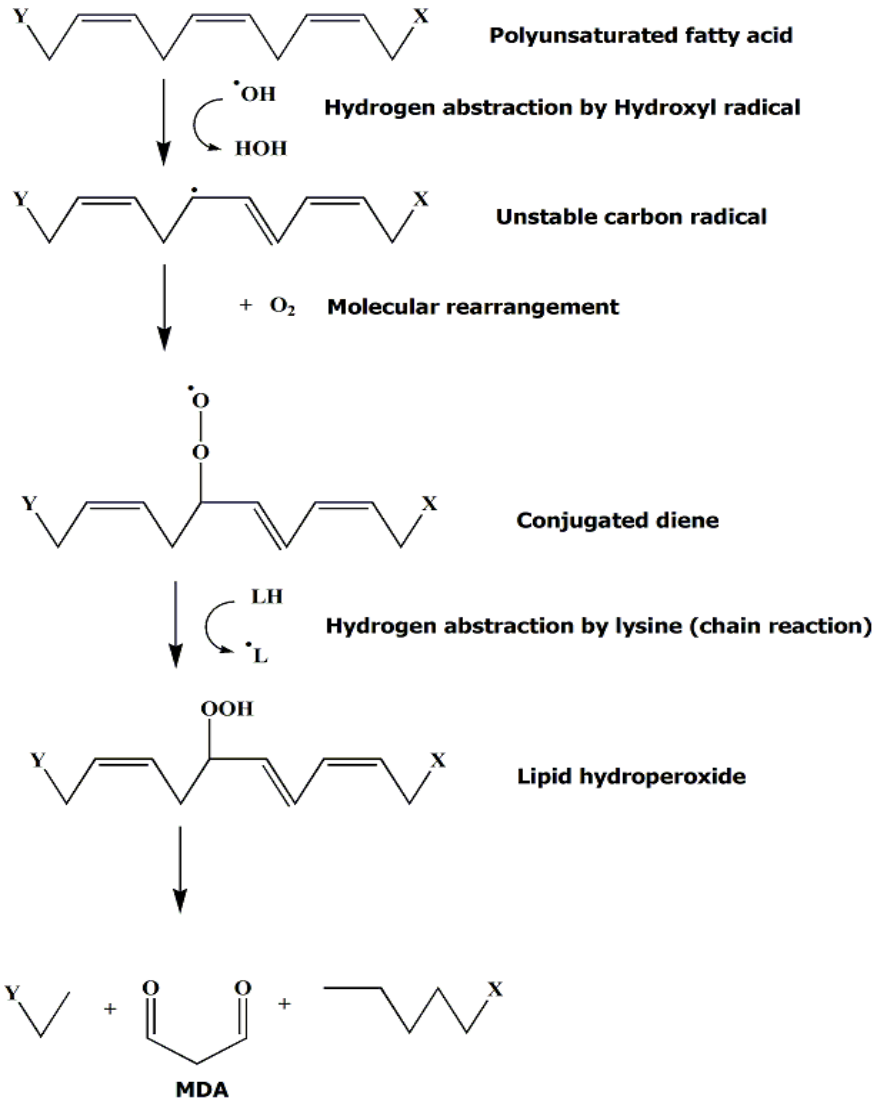
ในปี ค.ศ. 2006 Romieu (Romieu. 2006: S302) และคณะ ได้รายงานผลการตรวจพบมาลอนไดอัลดีไฮด์อิสระในอากาศหรือแหล่งน้ำโดยมักจะเป็นผลมาจากการปนเปื้อนจากการกระทำของมนุษย์ เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในอากาศ พบว่าปริมาณของสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์สัมพันธ์กับปริมาณของโอโซนในบริเวณนั้น เนื่องจากโอโซนมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระได้ดีทำให้สารตั้งต้นที่มีอยู่ในอากาศบริเวณนั้นถูกออกซิไดซ์เป็นสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์จึงสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดถึงมลพิษที่เกิดจากผลของการเกิดอนุมูลอิสระในอากาศได้

นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบปริมาณของสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเนื้อเยื่อของพืชและเนื้อเยื่อสัตว์ที่อาศัยในสิ่งแวดล้อม โดยในปี ค.ศ. 2005 James (James. 2005: 2337-2345) ได้ศึกษาถึงการเกิดออกซิไดซ์ในเนื้อเยื่อของพืชตระกูลฝ้ายโดยใช้ตัวชี้วัดการเกิดออกซิไดซ์หลายชนิดได้แก่ มาลอนไดอัลดีไฮด์ แอสคอร์เบท เปอร์ออกซิเดส (ascorbate peroxidase activity, APX) กลูตาไทโอน รีดักเทส (glutathione reductase activity, GR) กลูตาไทโอนรวม (total glutathione, GLUT) และ ออกซิไดส์กลูตาไทโอน(oxidized glutathione, GSSG) พบว่าการวิเคราะห์การเกิดออกซิไดซ์โดยใช้ มาลอนไดอัลดีไฮด์ เป็นตัวชี้วัดดีที่สุด

สำหรับการตรวจพบสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่เจือปนในอาหารนั้นได้มีการทำการศึกษามานานแล้วไม่ต่ำกว่า 20 ปี ในตัวอย่างต่างๆ เช่น เนื้อปลา (Kurkhanova. 1971: 73-78) น้ำมันปลา (Koning. 1963: 167-169) น้ำส้มคั้น (Braddock. 1971: 1095-1097) น้ำมันพืช (Arya. 1971: 144-180) ไขมัน (Braddock. 1964: 1095-1097) ถั่วเขียวแช่แข็ง (Chow. 1969: 973-974) น้ำนม (Downey. 1969: 154-162) และไขมันนม (Patton. 1951: 669-674) การตรวจพบ สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ในผลิตภัณฑ์อาหารเกือบทุกชนิดนั้น เป็นผลมาจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) และการที่อาหารได้รับความร้อนสูง (Yahya; et al. 1996: 3-9)

ในส่วนของการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน จะเริ่มจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หรือพันธะสามในสายโมเลกุล ดังแผนภาพประกอบ 2 เกิดการสูญเสียไฮโดรเจนอะตอมโดยอนุมูลอิสระเกิดเป็นกรดไขมันที่ไม่เสถียรแล้วทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนเป็นสารประกอบคอนจู

เกตไดอีน (conjugated diene) และจากนั้นออกซิเจนอะตอมจะเข้ามาทำปฏิกิริยาต่อตรงตำแหน่งที่เป็นอนุมูลของสายกรดไขมันจนเกิดเป็นสารประกอบที่เรียกว่าอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล (peroxyl radical) ต่อมาก็จะเกิดการรีดิวซ์ (reduce) อนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลแล้วเกิดการจัดเรียงโครงสร้างใหม่จนในที่สุดจะได้สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ ดังภาพประกอบ 2

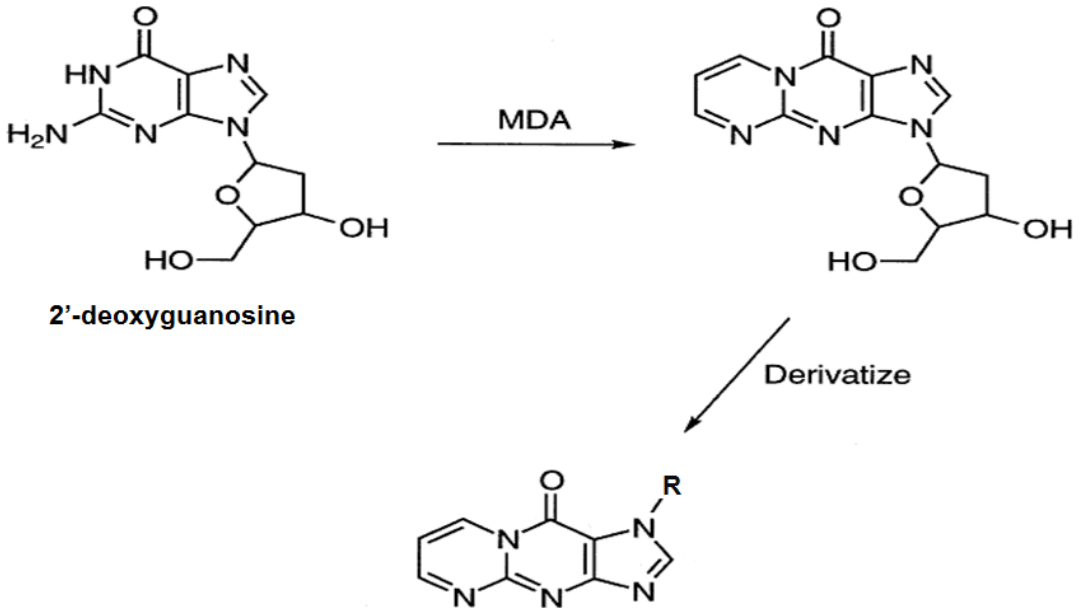


ภาพประกอบ 2 การเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันจนได้ผลิตภัณฑ์เป็น MDA

ที่มา : Largillière C. (2004). *Free malondialdehyde determination in human plasma by high-performance liquid chromatography*. pp. 123-126.

การศึกษาความเป็นพิษและอันตรายจาก MDA

ในปี ค.ศ. 2002 Lawrence (Lawrence. 2002: 219-222) ได้รายงานผลวิจัยที่ระบุถึงแนวโน้มในการเกิดมะเร็งในมนุษย์จากการได้รับมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยได้ทำการศึกษาผลการทำลายโครงสร้างของสารประกอบทางพันธุกรรมของมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่เป็นผลิตผลของ การเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยเมื่อมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้าสู่ร่างกายจะทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมของมนุษย์ เช่น 2'-deoxyguanosine เกิดเป็นสารประกอบใหม่ที่เรียกว่า M_1G (3-(2-deoxy-β-D-*erythro* pentofuranosyl)pyrimido[1,2-α]purin-10(3H)) ตามภาพประกอบ 3



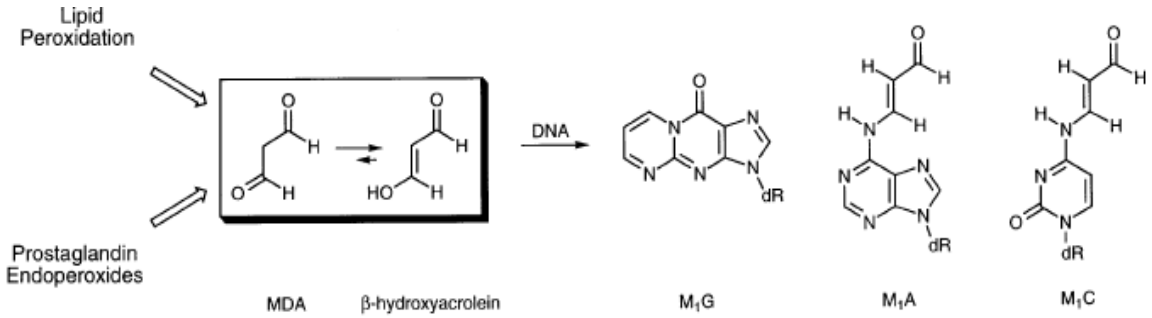
2'-deoxyguanosine

3-(2-deoxy-β-D-*erythro* pentofuranosyl)pyrimido[1,2-α]purin-10(3H) (M_1G)

ภาพประกอบ 3 ทำลายสารพันธุกรรม 2'-deoxyguanosine โดยมาลอนไดอัลดีไฮด์

ที่มา : Lawrence J.M. (2002). *Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage*. pp. 219-222.

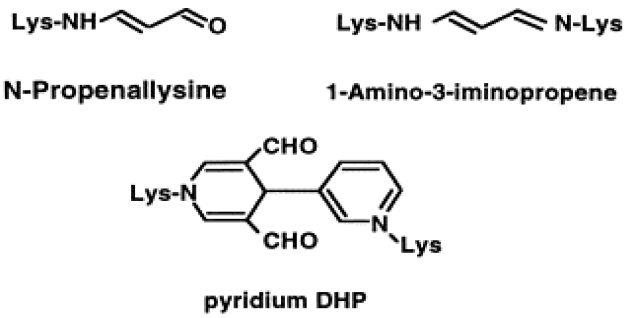
นอกจาก 2-deoxyguanosine ที่สามารถถูกทำลายด้วยมาลอนไดอัลดีไฮด์ สารพันธุกรรมอื่นๆ อย่างเช่น อะดีนีน (adenine, A) และ ไซโทซีน (cytosine, C) ก็สามารถถูกทำลายจนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ได้เช่นกัน ดังแสดงในแผนภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำลายดีเอนเอ โดยมาลอนไดอัลดีไฮด์
ที่มา : Lawrence J.M. (2000). *Oxyradicals and DNA damage*. pp. 361-370.

สารประกอบ M_1G ที่เกิดขึ้นนี้ถ้าไปสะสมที่อวัยวะส่วนไหนมากก็มีโอกาสทำให้เกิดเซลล์มะเร็งที่บริเวณนั้นได้ เช่น ตับ ปอด และเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้น Lawrence จึงติดตามสารประกอบ M_1G ที่เกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ของมนุษย์โดยอาศัยการทำอนุพันธ์ระหว่างสารประกอบ M_1G กับสารประกอบเพนตะฟลูออโรเบนซิล โบรไมด์ (pentafluorobenzyl bromide) จากนั้นจึงวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นโดยอาศัยเครื่อง GC/MS โดยผลการทดสอบพบว่าโดยเฉลี่ยในแต่ละ 10^8 ของลำดับนิวคลีโอไซด์ (nucleosides) ของ DNA 1 mg จะพบสารประกอบ M_1G อยู่ 2-3 ตัวเสมอ ดังนั้นจึงเป็นผลให้รหัสของสายพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงหรือถูกทำลายไป และด้วยเหตุผลนี้เองจึงเชื่อว่า มาลอนไดอัลดีไฮด์มีส่วนสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งในร่างกายมนุษย์

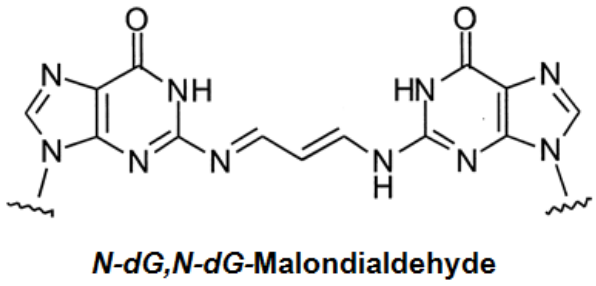
นอกจากนี้ การได้รับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในปริมาณมากยังสามารถเกิดผลกระทบโดยตรงต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยมาลอนไดอัลดีไฮด์สามารถเข้าไปทำการ cross-links กับสารประกอบจำพวกเอมีนปฐมภูมิ (primary amines) จนเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ เช่น สารประกอบ N-Propenallysine สารประกอบ 1-Amino-3-iminopropene และสารประกอบ Pyridium DHP ดังแสดงในแผนภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ lysine-lysine cross-links โดยมาลอนไดอัลดีไฮด์
ที่มา : Uchida K. (2000). *Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases*. pp. 1685-1696.

โดยสารประกอบเอมีนปฐมภูมิ ส่วนใหญ่จะพบมากใน apoliprotein B-100 (apo-B) ที่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ลำเลียงไขมันไปยังอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ ทำให้ apo-B ถูกเปลี่ยนแปลงไปไม่สามารถลำเลียงไขมันได้เกิดการสะสมของไขมันในเส้นเลือด จนเกิดเป็นภาวะหลอดเลือดแดงแข็งแบบ atherosclerosis ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary heart disease) โรคของหลอดเลือดแดงส่วนปลาย (peripheral arterial disease) โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease) (Uchida. 2000: 1685-1696)

มาลอนไดอัลดีไฮด์ ยังสามารถเกิดการเชื่อมไขว้ cross-links ระหว่าง DNA ด้วยกันเอง จนเกิดเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่เรียกว่า *N-dG,N-dG*-Malondialdehyde (Niedernhofer. 2003: 31426 – 31433) ดังแสดงในภาพประกอบ 6 ทำให้เกิดการสะสมและอุดตันบริเวณผนังเส้นเลือดจนเป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดและหัวใจ ที่มีจำนวนผู้เสียชีวิตสูงในกลุ่มประเทศแถบยุโรปและสหรัฐอเมริกาซึ่งมีการบริโภคอาหารที่มีไขมันผสมในปริมาณสูง (Daniele. 2005: 316–328)



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของ *N-dG,N-dG*-Malondialdehyde

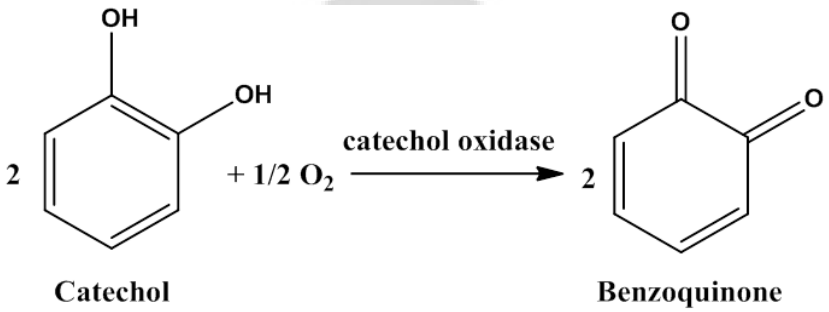
ที่มา : Daniele D.R. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. pp. 316–328.

สารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์และปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล

ปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล เป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้กับอาหารเกือบทุกชนิด ซึ่งมักพบในอาหารโดยเฉพาะ ผัก ผลไม้ และอาหารทะเล โดยเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของอาหาร เมื่อสัมผัสกับอากาศ ตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนสีของผิวหน้าเนื้อแอปเปิ้ลหรือมันฝรั่งที่มีการปอกเปลือกแล้ว ปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาลเป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่ค่อนข้างสลับซับซ้อนเนื่องจากเกิดจากหลาย ๆ ปฏิกิริยารวมกัน โดยจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของอาหาร แต่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ การเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์และการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์

การเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์

การเกิดสีน้ำตาลประเภทนี้ พบมากในผัก ผลไม้สด และน้ำผลไม้ โดยเกิดกับผลไม้ที่ช้ำ มีรอยแตก ผลไม้ถูกปอกเปลือกหรือหั่น โดยจะพบว่าในเซลล์ของพืชเหล่านี้มักจะมีสารตั้งต้น เป็นสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จำพวกฟีนอลออกซิเดส (phenol oxidase) เกิดผลิตภัณฑ์เป็นรงควัตถุประเภทต่าง ๆ อันเป็นสาเหตุของการเกิดสีน้ำตาลขึ้นมาในผักและผลไม้หลายชนิด เช่น สารประกอบคาทีโคล ที่ถูกเอนไซม์คาทีโคลออกซิเดสเปลี่ยนให้เป็นเบนโซควิโนน (benzoquinone) เป็นสารประกอบสีเหลืองเข้ม อันเป็นสาเหตุของการดำคล้ำในผลกล้วย ดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาลในผลกล้วย

ที่มา: Jolley R. (1974). *Oxytyrosinase.* p. 335.

การเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์

การเกิดสีน้ำตาลแบบที่ไม่มีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง โดยมักเกิดขึ้นจากการแปรรูปและการเก็บรักษา ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อยได้แก่

- คาราเมลไลเซชัน (caramelization) เกิดจากน้ำตาลได้รับความร้อนสูงเกินจุดหลอมเหลว ทำให้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเปลี่ยนไปอยู่ในรูป 1,2-enol แล้วเกิดเป็นพอลิเมอร์ ของสารประกอบคาร์บอนได้เป็นสารสีน้ำตาล ที่มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว เรียกว่าคาราเมล (caramel) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการเกิดคาราเมล จะนำมาใช้เพื่อแต่งสี และกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารจำพวกลูกกวาด และเครื่องดื่ม เป็นต้น

- ปฏิกิริยาออกซิเดชันของวิตามินซี เป็นปฏิกิริยาสีน้ำตาลประเภทหนึ่งซึ่งเกิดจากการกระตุ้นได้หลายทาง เช่น การสัมผัสกับออกซิเจน การอยู่ในสภาวะกรด หรือการอยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง

- ปฏิกิริยาเมลลาร์ด เป็นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์แบบหนึ่ง ที่เกิดขึ้นจากผลของปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกับกรดอะมิโนของโปรตีน แล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของสารประกอบกลูโคส-เอมีนที่มีสีน้ำตาล

ปฏิกิริยาเมลลาร์ด

ปฏิกิริยาเมลลาร์ด เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างน้ำตาลรีดิวซิ่ง (reducing sugar) เช่น กลูโคส หรือ ฟลุคโทส กับกรดอะมิโน ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่บริเวณของหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์กับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนที่เป็นอิสระ โดยมีความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจนนำไปสู่การเกิดเม็ดสีของเมลานอยดินที่เป็นสารประกอบที่ให้สีน้ำตาลและกลิ่นรสต่างๆ ทั้งที่พึงประสงค์ เช่น สีน้ำตาลของคุ๊กกี้ที่เกิดขึ้นระหว่างการอบเป็นต้น และผลิตภัณฑ์สารประกอบที่ให้สีน้ำตาลและกลิ่นรสต่างๆ ที่ไม่พึงประสงค์อย่างเช่น การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มของนมผงหรือน้ำผึ้งระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์ในอาหารนั้นจะเกิดได้มากน้อยขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นของการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด รวมถึงปัจจัยอื่นๆ ยกตัวอย่างเช่น วิตามินซี pH ออกซิเจน เวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษา (Wong. 1989: 285-293)

ในปี ค.ศ. 1912 Louis Maillard (Maillard. 1912: 66-68) นักเคมีชาวฝรั่งเศส เป็นคนแรกที่อธิบายเกี่ยวกับปรากฏการณ์การเกิดสารสีน้ำตาลหลังจากได้รับความร้อนกับสารละลายผสมของกลูโคสกับไกลซีน (glycine) ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้เรียกว่า Maillard reaction product (MRP) ซึ่งมีลักษณะเป็น สารประกอบกลูโคส-เอมีน ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาก็ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาเมลลาร์ดมากมาย ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพมีประเด็นน่าสนใจอยู่ 2 ประเด็น คือ ประเด็นแรก ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดขึ้นในระหว่างการผลิตอาหารซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพทางโภชนาการ ซึ่งทำให้สูญเสียสารอาหารบางชนิดไปและอาจเกิดกลิ่นหรือรสชาติเปลี่ยนไป สิ่งที่สำคัญมากในประเด็นนี้คือการที่เกิดสารประกอบกลูโคส-เอมีน ทำให้สูญเสียน้ำตาลและกรดอะมิโน ซึ่งอาจมีผลต่อการดูดซึมและเมตาโบลิซึมของสารอาหารบางชนิด ประเด็นที่สองปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกี่ยวข้องกับกระบวนการแก่ของเซลล์ (tissue-aging process) พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและโปรตีน เซลล์ และเนื้อเยื่อ ยกตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยเบาหวานจะมีน้ำตาลฟลุคโทสสูงในเนื้อเยื่อโดยเฉพาะในเลนส์ตา อาจทำให้เกิดต้อกระจก หรือการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในผู้ป่วยโรคไตระยะสุดท้ายที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาไกลโคออกซิเดชัน ซึ่งส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพของโรคจากอาการของโรค อย่างเช่น ภาวะกระดูกสลายตัว (bone resorption) และภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) เป็นต้น (อมรรัตน์. 2545: 4)

กระบวนการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีทั้งหมด 3 ช่วง ได้แก่

ช่วงที่ 1 น้ำตาลรีดิวซิ่งจะเกิดปฏิกิริยาควบแน่น (condensation) ที่ตำแหน่งของหมู่คาร์บอนิลกับหมู่อะมิโนที่มาจากโปรตีน แล้วทำให้เกิดการเคลื่อนของอิเล็กตรอนเป็น N-subtituted glycosylamine ภายใต้สภาวะกรด หลังจากนั้นก็จะเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชันเกิดเป็นสารประกอบคีโตน โดยเรียกว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอะมาโดริ จนได้ผลิตผลเป็นสารอนุพันธ์ 1-อะมิโน-1-ดีออกซี-2-คีโตส ซึ่งสารที่เกิดในช่วงนี้ยังเป็นสารที่ยังไม่มีสี

ช่วงที่ 2 ปฏิกิริยาในช่วงนี้จะเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนอิเล็กตรอนของหมู่อะมิโนที่จะประกอบด้วยกระบวนการ dehydration, clyclization, fragmentation หรือ amine condensation โดยสามารถแบ่งได้ 3 รูปแบบหลักคือ

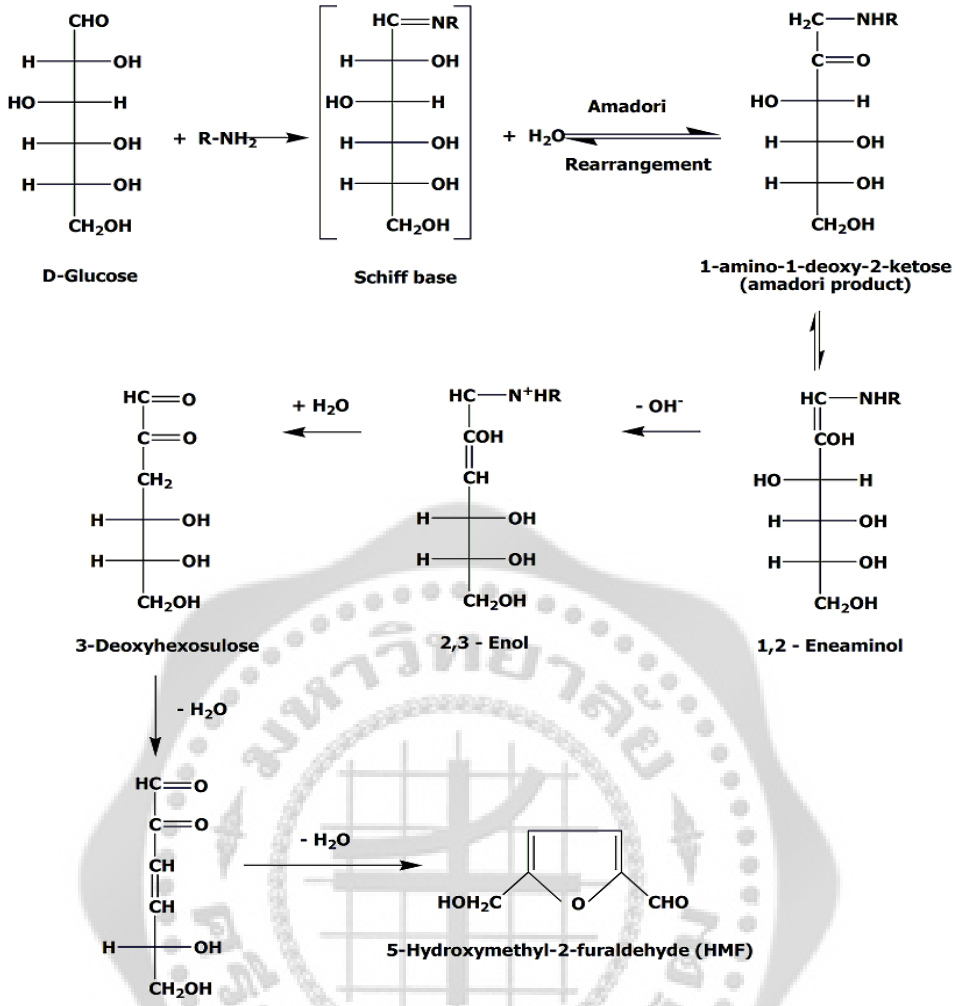
1. สภาวะกรด กระบวนการ dehydration และ cyclization ทำให้ hexose เปลี่ยนไปเป็น 5-hydroxyfurfural (HMF) หรือ pentose เปลี่ยนไปเป็น furfural แล้วจึงเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบสีเหลืองคือ g-unsaturated decarboxyl

2. สภาวะด่าง 2-keto glycosyl form เปลี่ยนเป็น 1,2-enol glycosyl form และถูกกระบวนการ dehydration และ oxidation เปลี่ยนเป็น 2,3-enol form ได้ผลิตผลเป็น reductones และ dehydroreductones และ amino-keto derivatives เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Strecker dehydration

3. สภาวะที่อุณหภูมิสูง จะเกิดกระบวนการแตกตัวของผลิตภัณฑ์อะมาโดริกลายเป็นสารประกอบอัลดีไฮด์ แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์และคีโตน ซึ่งมีสีและกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ของการเกิดสารสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard browning) โดยเฉพาะ

ช่วงที่ 3 เป็นช่วงที่มีความซับซ้อนมากและไม่ทราบแน่ชัด โดยปฏิกิริยาในช่วงนี้เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา polymerization ของผลิตภัณฑ์ในช่วงที่ 2 และจากนั้นก็เกิด copolymerization กับสารประกอบที่มีหมู่อะมิโนจนสุดท้ายจะได้ผลิตผลที่มีสีที่เรียกว่า เมลานอยดิน

สารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เป็นหนึ่งในสารที่นำมาให้เป็นตัวชี้วัดการเกิด ปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยกระบวนการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 กลไกการเกิดสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

ที่มา : Fayle S.E. (2002). *The Maillard reaction*. Royal Society of Chemistry. Cambridge. 2002. 5-18.

อนุพันธ์วงแหวนฟูแรน เช่น สารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ จะเกิดพอลิเมอไรซ์อย่างรวดเร็วได้จนเป็นสารสีน้ำตาลที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่และไม่ละลายน้ำ สารสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า เมลานอยดิน (นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549: 324) นอกจากนี้ในระหว่างขั้นตอนของกระบวนการ Amadori rearrangement ของปฏิกิริยาเมลลาร์ดอาจจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้ (Yusuf & Toledo. 2005: 273–278)

ปฏิกิริยาเมลลาร์ดทำให้เกิดสารสีน้ำตาล ซึ่งเป็นการเพิ่มรสชาติและกลิ่นกับผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น ขนมอบ คาราเมล ทอฟฟี่ เป็นต้น แต่ปฏิกิริยาเมลลาร์ดทำให้เกิดการสูญเสียคุณค่าทางอาหารได้ เนื่องจากต้องใช้น้ำตาลและกรดอะมิโนเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา อีกทั้งการที่อาหารนั้นมีองค์ประกอบของโปรตีนที่สูงและได้รับความร้อนสูงจากการปรุงที่ย่อมสามารถก่อให้เกิด

ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารประกอบจำพวกเฮทเทอโรไซคลิกเอมีน (heterocyclic amine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งได้ (นิธิยา. 2549: 326)

นอกจากนี้ปริมาณสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ยังถูกใช้เป็นดัชนีวัดการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด เนื่องจากเป็นสารมัธยันต์ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนหนึ่งของปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งสามารถแสดงถึงการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการรายงานการวิจัยระบุออกมาว่าสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์และอนุพันธ์ของสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ อย่างเช่น 5-คลอโรเมธิลเฟอร์ฟิวรัล (5-(chloromethyl)furfuraldehyde) มีความเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอันเป็นสาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็งในลำไส้ ตับ และบริเวณผิวหนังอีกด้วย (Nadia. 2006: 1390-1395)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และปริมาณสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

ในปี ค.ศ. 1976 Yagi (Yagi. 1976: 212-216) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างเลือด โดยในขั้นตอนการเตรียมสารจะทำการตกตะกอนไขมันและโปรตีนออกก่อนภายใต้สภาวะกรดที่อุณหภูมิ 95°C แล้วจึงวัดปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์โดยอาศัยการทำอนุพันธ์กับกรดไทโอบาบิทุริก (thiobarbituric acid, TBA) แล้วจึงตรวจวัดอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี ซึ่งหลังจากนั้นวิธีการดังกล่าวจึงถูกนิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์เรื่อยมาและเรียกวิธีการนี้ว่า “TBA reaction substance” (TBARS)

ในปี ค.ศ. 1994 Chirico (Chirico. 1994: 314-318) ได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้ตัวตรวจวัดแบบชนิดยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปีในการแยกและวิเคราะห์อนุพันธ์ MDA-TBA โดยจะใช้คอลัมน์ช่วยในการแยกโปรตีนที่มีในตัวอย่างออกจากกันเป็นครั้งแรก โดยสามารถตรวจวัดปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ได้เป็นอย่างดี ให้ผลการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.1-1.0 nmol/ml นอกจากนี้ยังมีการเติม BHT เข้าช่วยในการหลีกเลี่ยงผลของตัวรบกวนจากอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในระบบ

ในปี ค.ศ. 1999 Gokmen และ Acar (Gokmen; & Acar. 1999: 69-74) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์สารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์และพาทูลีนในน้ำแอ๊ปเปิ้ลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยตัวตรวจวัดแบบไดโอดอะเรย์ ทำการชะสารด้วยสารละลายผสมของน้ำต่ออะซิโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 99:1 โดยปริมาตร ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ได้ค่าร้อยละการกลับคืนของ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์อยู่ในช่วง 86-100 โดยมีค่าเฉลี่ยที่ร้อยละ 94 และมีค่าร้อยละการกลับคืนของพาทูลีนอยู่ในช่วง 94-125 โดยมี

ค่าเฉลี่ยที่ร้อยละ 103 วิธีนี้ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรของสาร HMF และน้อยกว่า 5 ไมโครกรัมต่อลิตรของสารพาทูลีนในตัวอย่างน้ำแอ๊ปเปิ้ล

ในปี ค.ศ. 2000 Ferrer และคณะ (Ferrer; et al. 2000: 599-606) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบในกลุ่มเฟอร์ฟิวราลทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากผลของปฏิกิริยาเมลลาร์ดในน้ำนมโค โดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้ตัวตรวจเป็นวัดยูวี-วิสิเบิล (HPLC/UV-Vis) ในการตรวจวิเคราะห์ โดยผลการวิเคราห์พบว่าในตัวอย่างน้ำนมมีปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ อยู่ในช่วง 0.29 ถึง 0.41 mg/100g ของปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำนม

ในปี ค.ศ. 2001 Nozal และคณะ (Nozal; et al. 2001: 95-103) ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารประกอบ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์, 2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์, ฟิวแรน-2-คาร์บอกซิลิกแอซิด, ฟิวแรน-3-คาร์บอกซิลิคแอซิด, ฟิวแรน-3-คาร์บอกซาลดีไฮด์ และ 2-อะมิโนเบนโซอิคแอซิดเมทิลเอสเทอร์ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยได้ทำการกำจัดสิ่งรบกวนและสารปนเปื้อนด้วย micro solid-phase extraction จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งทำการชะสารแบบเกรเดียนท์ (gradient) โดยใช้สารละลายผสม A คือ 1% สารละลายกรดอะซิติกต่ออะซิโตไนทริลในอัตราส่วนร้อยละ 97:3 โดยปริมาตร และสารละลายอะซิโตไนทริลต่อน้ำในอัตราส่วนร้อยละ 50:50 โดยปริมาตร ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยตัวตรวจวัดแบบอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังได้นำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างยาที่ได้จากพืชอีกด้วย

ในปี ค.ศ. 2002 Steghens และคณะ (Steghens; et al. 2001: 242-249) ได้พัฒนาวิธีในการหาปริมาณ สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์อิสระและสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์รวม (total-MDA)ในพลาสมา หรือ ซีรัม โดยการทำอนุพันธ์กับไดอะมิโนแนฟทาลีน (diaminonaphthalene) แล้ววิเคราะห์อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งสภาวะในการทำอนุพันธ์กับ DAN จะอาศัยสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงแต่ใช้อุณหภูมิห้องในการทำปฏิกิริยา จากการทดสอบพบว่าให้ผลที่มีความแม่นยำสูง จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ในตัวอย่างพลาสมาของมนุษย์สุขภาพดีพบว่า มีปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเพศชายเท่ากับ 0.162 nmol/ml และในเพศหญิงเท่ากับ 0.138 nmol/ml

ในปี ค.ศ. 2002 Karatas และคณะ (Karatas; et al. 2002: 76-79) ได้เสนอถึงวิธีการหาปริมาณ สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ในพลาสมา โดยการทำไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กับสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ ที่ทำพันธะอยู่กับโปรตีนให้หลุดออกซึ่งส่งผลให้โปรตีนที่หลุดออกมานั้นตกตะกอน จากนั้นจึงนำเอาพลาสมาที่ไม่มีโปรตีนแล้วนั้น ฉีดเข้าสู่ระบบเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้ตัวตรวจเป็นวัดยูวี-วิสิเบิล (HPLC/UV-Vis) โดยตรงแล้วทำการตรวจ

วิเคราะห์การดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 nm ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว โดยมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่ค่อนข้างต่ำ (1.2×10^{-8} µmol/ml) อีกทั้งยังใช้ตัวอย่างพลาสมาปริมาณน้อยเพียง 50 µL ในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่าง

ในปี ค.ศ. 2002 Agarwal และ Chase (Agarwal; & Chase. 2002: 121-126) ได้นำเสนอวิธีการทดสอบสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ จากการทำอนุพันธ์กับ TBA แล้วใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงช่วยในการวิเคราะห์แต่เปลี่ยนตัวตรวจวัดเป็น หัดตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ โดยหลีกเลี่ยงขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนเช่นกัน ทำให้สามารถหาปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ ทั้งที่อยู่ในรูปอิสระและอยู่ในรูปที่เกิดพันธะกับโปรตีน แต่ว่าก็ยังคงใช้สภาวะในการทำอนุพันธ์ที่ยังรุนแรงอีกทั้งยังให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดที่สูงมากเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ

ในปี ค.ศ. 2002 Wilson และคณะ (Wilson; et al. 1997: 1982-1984) ได้นำเสนอวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์โดยไม่ทำอนุพันธ์และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค high performance capillary electrophoresis (HPCE) ซึ่งวิธีดังกล่าวมีถูกต้องและความแม่นยำสูงมาก โดยเริ่มต้นตัวอย่างจะถูกตกตะกอนโปรตีนโดยอาศัยอะซิโตไนไตรล์เท่านั้น จากนั้นจึงใช้หลักของศักย์ไฟฟ้าในการแยกสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์อิสระที่ไม่สร้างพันธะกับโปรตีนหรือสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ในพลาสมาออกมาแล้วเคลื่อนที่ไปสู่ตัวตรวจวัด โดยหลักการของเทคนิค HPCE นั้นสามารถกำจัดสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ออกไปจากระบบจึงไม่เกิดสัญญาณของสารรบกวนอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำวิธีการดังกล่าวไปวิเคราะห์สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างพลาสมาจริงนั้นไม่พบปริมาณของสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างในขณะที่เปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น เช่น เทคนิค TBA และ colorimetric กลับตรวจพบปริมาณของสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเทคนิค TBA และ colorimetric สามารถตรวจวิเคราะห์สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ได้ดีกว่า หรือเทคนิค TBA และ colorimetric ไม่มีความจำเพาะเจาะจงทำให้สัญญาณที่ได้เป็นสัญญาณของสารรบกวนก็เป็นไปได้

ในปี ค.ศ. 2003 Sim และคณะ (Sim; et al. (2003: 337-344) ได้นำเสนอวิธีการที่เพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้ตัวตรวจเป็นวัดยูวี-วิสิเบิล (HPLC/UV-Vis) ในการวิเคราะห์สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยอาศัยการทำอนุพันธ์กับ 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH) นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวมีความน่าสนใจเนื่องจากมีการใช้ methyl MDA มาใช้เป็นสารมาตรฐาน internal standard โดยปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ยังใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง(25 $^{\circ}$C เป็นเวลา 10 นาที) แต่ทว่าอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นจาก DNPH มีประสิทธิภาพในการแยกด้วยระบบ HPLC ไม่ดีเท่าไหร่นัก ซึ่งหากมีการปรับสภาวะในปฏิกิริยาทำอนุพันธ์ให้แรงขึ้นกว่าเดิมก็จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพดังกล่าวได้ดีขึ้น

ในปี ค.ศ. 2006 Alcazar และคณะ (Alcazar; et al. 2006: 22-28) ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารประกอบ 2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ และ5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์แบบ C-18 และทำการชะสารด้วยสารละลายผสมของน้ำกับอะซิโตไนทริล พบว่าวิธีการนี้มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 98-103% โดยมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดอยู่ที่ 0.005 µg/ml

ในปี ค.ศ. 2008 Candan และ Tuzmena (Candan; & Tuzmena. 2008: 708-713) ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในตัวอย่างสมองหนูที่ได้รับปริมาณของโลหะชนิดต่างๆ ซึ่งเชื่อว่ามีผลต่อการเกิดสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยอาศัยเทคนิคโครมาโท กราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยมีตัวตรวจวัดเป็นแบบฟลูออเรสเซนต์ ในการตรวจวัดอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างกรดไทโอบาบิทุริก (thiobarbituric acid, TBA) และ สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ ผลการวิเคราะห์พบว่า เทคนิคดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ในเวลาอันสั้น 1.495 นาที มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.036 nmol/ml ช่วงความเข้มข้นในการวิเคราะห์อยู่ที่ 2.5-20.0 nmol/ml นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิคดังกล่าวยังมีความถูกต้องและแม่นยำสูง

ในปี ค.ศ. 2010 Khalil และคณะ (Khalil; et al. 2010: 1390-1395) ได้นำเสนอการวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในน้ำผึ้ง โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อแก้ปัญหาความไม่จำเพาะเจาะจงและลดปัญหาสัญญาณการรบกวนในตัวอย่าง โดยพบว่าเทคนิคที่พัฒนานี้มีประสิทธิภาพ สามารถวิเคราะห์ HMF ในตัวอย่างน้ำผึ้งได้ในช่วง 5–140 mg kg^{-1} อีกทั้งยังมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดต่ำถึง 1.9 mg kg^{-1} และมีความคลาดเคลื่อนเพียงร้อยละ 2

ในปี ค.ศ. 2011 Marian และคณะ (Marian; et al. 2011) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างทางชีวภาพและอาหารสัตว์ โดยอาศัยการทำอนุพันธ์กับ 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) ก่อนจะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้คอลัมน์เป็น C18 และตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 307 หรือ 303 nm โดยพบว่ามาลอนไดอัลดีไฮด์จะถูกชะออกมาที่เวลา 10 นาทีและใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งสิ้นรวมเป็นเวลา 20 นาที

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่มนั้นยังไม่มีรายงานมาก่อน นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ว่าปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์มีแนวโน้มที่เกี่ยวข้องกับผล

ของการกระทำจากอนุมูลอิสระที่เจือปนอยู่ในตัวอย่างน้ำนมอันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณของปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกันและประยุกต์ใช้ตรวจวิเคราะห์สารดังกล่าวกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่มในท้องตลาด

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบ diode array (จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100) โดยใช้คอลัมน์ C18 (Eclipse XDB 5 µm ขนาด 4.6 × 150 mm)) (บริษัท Agilent)
- เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-2401 PC (บริษัท Shimadzu)
- ไมโครปิเปตต์ขนาด 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร (จากบริษัท Gilson)
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (บริษัท Mettier Toledo รุ่น AB104-S)
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนรุ่น LaboStar (บริษัท Siemens)
- เครื่อง pH meter (บริษัท Mettier Toledo)
- เครื่องเขย่า รุ่น Vortex-genie 2 (จากบริษัท Scientific Industries)
- เครื่องเซนตริฟิวจ์ รุ่น Zentrifugen EBA 8S (บริษัท Ilettich)
- เครื่องอังไอน้ำ (บริษัท Memmert)
- Syringe Filters PTFE (polytetrafluoroethylene) ขนาด 0.45 ไมครอน (บริษัท International Scientific)

2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- Acetonitrile (HPLC grade) (บริษัท Merck)
- Di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (บริษัท Fluka)
- 5-Hydroxymethylfurfural (บริษัท Fluka)
- Methanol (HPLC grade) (บริษัท Merck)
- Sodium dihydrogen phosphate (บริษัท Sigma)
- Sulfuric acid (บริษัท Carlo Erbra)
- Orthophosphoric acid (บริษัท Carlo Erbra)
- Trichloroacetic acid (บริษัท Sigma)
- 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) (บริษัท Sigma)
- 2-Thiobarbituric acid (บริษัท Fluka)

3 ตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม

- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ A รสจืด วันที่ผลิต 6 เมษายน 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ A รสพร่องมันเนย วันที่ผลิต 4 เมษายน 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ A รสหวาน วันที่ผลิต 4 เมษายน 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ A รสช็อคโกแลต วันที่ผลิต 4 เมษายน 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ A รสสตอเบอร์รี่ วันที่ผลิต 4 เมษายน 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบ UHT A รสจืด วันที่ผลิต 13 มกราคม 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบ UHT A รสพร่องมันเนย วันที่ผลิต 19 มกราคม 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบ UHT A รสหวาน วันที่ผลิต 16 มกราคม 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบ UHT A รสช็อคโกแลต วันที่ผลิต 13 มกราคม 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบ UHT A รสสตอเบอร์รี่ วันที่ผลิต 16 มกราคม 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ B รสจืด วันที่ผลิต 26 มีนาคม 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ B รสพร่องมันเนย วันที่ผลิต 27 มีนาคม 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ B รสหวาน วันที่ผลิต 27 มีนาคม 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ B รสช็อคโกแลต วันที่ผลิต 28 มีนาคม 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ B รสสตอเบอร์รี่ วันที่ผลิต 27 มีนาคม 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ C รสจืด วันที่ผลิต 2 เมษายน 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ C รสพร่องมันเนย วันที่ผลิต 2 เมษายน 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ C รสหวาน วันที่ผลิต 4 เมษายน 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ C รสช็อคโกแลต วันที่ผลิต 4 เมษายน 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ C รสสตอเบอร์รี่ วันที่ผลิต 2 เมษายน 2555
- น้ำนมพร้อมดื่มแบบสเตอริไรส์ D รสจืด วันที่ผลิต 23 ธันวาคม 2554

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์

1.1 นำหลอดทดลองมาจำนวน 3 หลอด

1.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานปริมาตร 1 ml ลงไปในหลอกทดลองทั้ง 3 ดังนี้

- หลอดที่ 1 สารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้มข้น 25 nmol/ml
- หลอดที่ 2 สารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เข้มข้น 198 nmol/ml
- หลอดที่ 3 สารละลายผสมของมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้มข้น 25 nmol/ml และสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เข้มข้น 198 nmol/ml

1.3 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น

1.4 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

1.5 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมาทำการตรวจสอบสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 nm จนถึง 800 nm ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

1.6 บันทึกสเปกตรัมที่ได้จากการศึกษา

ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน

2.1 ผลของ pH ที่ใช้ในการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้มข้น 25 nmol/ml และสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เข้มข้น 198 nmol/ml มาอย่างละ 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.2.2 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น

2.2.3 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

2.2.4 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

2.2.5 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อทำการวิเคราะห์

2.2.6 กำหนดช่วง pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษา ได้แก่ 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0

2.2.7 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาผลของ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2.2 ศึกษาองค์ประกอบที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้มข้น 25 nmol/ml และสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เข้มข้น 198 nmol/ml มาอย่างละ 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

1.2.2 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น

1.2.3 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

1.2.4 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

1.2.5 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อทำการวิเคราะห์

1.2.6 กำหนดช่วงองค์ประกอบวัฏภาคเคลื่อนที่ในการศึกษา ได้แก่ อัตราส่วนเมทานอล:ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ร้อยละ 45:55 40:60 35:65 และ 30:70 โดยปริมาตร โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง

1.2.7 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาผลขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.3 ศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้มข้น 25 nmol/ml และสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เข้มข้น 198 nmol/ml มาอย่างละ 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

1.2.2 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น

1.2.3 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

1.2.4 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

1.2.5 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อทำการวิเคราะห์

1.2.6 กำหนดช่วงอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในการศึกษา ได้แก่ 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0 1.1 และ 1.2 ml/min

1.2.7 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากผลการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

โดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทั้งหมด จะกำหนดสภาวะของระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงไว้ ดังนี้

- คอลัมน์ เป็น C18 (Eclipse XDB 5 µm ขนาด 4.6 × 150 mm)
- องค์ประกอบวัฏภาคเคลื่อนที่ของอัตราส่วนเมทานอลต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ร้อยละ 40:60 โดยปริมาตร
- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 ml/min
- ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 10mM ที่ pH เท่ากับ 6.5
- ตัวตรวจวัดเป็นแบบชนิด diode array detector โดยวัดตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 448 นาโนเมตร (HMF) และ 530 นาโนเมตร (MDA)
- ปริมาตรต่อหนึ่งตัวอย่างการวิเคราะห์เท่ากับ 20 µl (1 loop)

ตอนที่ 3 การศึกษาปัจจัยในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

3.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์

3.1.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้มข้น 25 nmol/ml และสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เข้มข้น 198 nmol/ml มาอย่างละ 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.1.2 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.1.3 ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์ในช่วงอุณหภูมิ ได้แก่ 25ºC 30ºC 35ºC 40ºC 45ºC 50ºC 55ºC 60ºC 65ºC 70ºC 75ºC 80ºC 85ºC และ 90 แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์เกิดขึ้น

3.1.4 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

3.1.5 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

3.1.5 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟี

3.1.6 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากผลของอุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์

3.2 การศึกษาผลของเวลาในการเตรียมอนุพันธ์

3.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้มข้น 25 nmol/ml และสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เข้มข้น 198 nmol/ml มาอย่างละ 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.2.2 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.2.3 ทำการศึกษาผลของเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้องในช่วงเวลา ได้แก่ 0 นาที 10 นาที 20 นาที 30 นาที 40 นาที 50 นาที 60 นาที 70 นาที 80 นาที 90 นาที 100 นาที 110 นาที 120 นาที 130 นาที 140 นาที 150 นาที 160 นาที 170 นาที 150 นาที 190 นาที และ 200 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์เกิดขึ้น

3.2.4 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

3.2.5 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

3.2.5 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟี

3.2.6 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากผลของเวลาในการเตรียมอนุพันธ์

3.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

3.3.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้มข้น 25 nmol/ml และสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เข้มข้น 198 nmol/ml มาอย่างละ 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.3.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ โดยปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก ในช่วงความเข้มข้น ได้แก่ 10 mM 20 mM 30 mM และ 40 mM ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ล่ะหลอด

3.3.3 ทำการเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์เกิดขึ้น

3.3.4 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

3.3.5 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

3.3.5 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟี

3.3.6 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากผลความเข้มข้นของรีเอเจนต์ในการเตรียมอนุพันธ์

ตอนที่ 4 การศึกษาหาประสิทธิภาพของระบบที่ทดลอง

4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

4.1.1 เตรียมสารละลายผสมของสารละลายมาตรฐาน มาลอนไดอัลดีไฮด์ในช่วงเข้มข้น 0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 nmol/ml และสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ เข้มข้น 0.00, 1.58, 3.17, 4.75, 6.34 nmol/ml ตามลำดับ

4.1.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานมาอย่างละ 1 ml ลงในหลอดทดลอง แล้วปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 1 ml ใส่ลงไป ผสมให้เข้ากัน

4.1.3 ทำการเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์เกิดขึ้น

4.1.4 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

4.1.5 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

4.1.6 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟี

4.1.7 บันทึกโครมาโทแกรมเพื่อนำไปสร้างสมการกราฟมาตรฐานของ มาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

4.2 การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และค่าของขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์

4.2.1 ปิเปตน้ำปราศจากไอออน (สารละลาย blank) 10 ml ชั่งน้ำหนัก

4.2.2 เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที เพื่อตกตะตอนโปรตีนในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม

4.2.3 ปิเปตสารละลายใส มาอย่างละ 1 ml ลงในหลอดทดลอง

4.2.4 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM 1 ml ใส่ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่เตรียมไว้และผสมให้เข้ากัน

4.1.5 ทำการเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์เกิดขึ้น

4.1.6 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

4.1.7 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

4.1.8 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟี จำนวน 5 ครั้ง

4.2.9 บันทึกโครมาโทแกรม แล้วนำข้อมูลของสัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าของ ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD; S/N > 3) และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOQ; S/N > 10)

4.3 การหาค่าความถูกต้อง

4.2.1 ปิเปตตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มปริมาตร 10 ml ชั่งน้ำหนัก

4.2.2 เติมสารละลายผสมของสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ให้มีความเข้มข้น 10 nmol/ml และ 79.20 nmol/ml ตามลำดับ โดยทำการทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ และตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มที่ยังไม่มีการเติมสารละลายผสมสารมาตรฐานลงไป

4.2.3 เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที เพื่อตกตะตอนโปรตีนในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม

4.2.4 ปิเปตสารละลายใสจากตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มที่มีการเติมสารมาตรฐานและตัวอย่างน้ำนมที่ยังไม่มีการเติมสารมาตรฐาน มาอย่างละ 1 ml ลงในหลอดทดลอง

4.2.5 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM 1 ml ใส่ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่เตรียมไว้และผสมให้เข้ากัน

4.1.6 ทำการเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์เกิดขึ้น

4.1.7 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

4.1.8 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

4.1.9 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟี

4.2.10 บันทึกโครมาโทแกรม แล้วนำข้อมูลของสัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery)

โดยการคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับจะคำนวณ จากสมการที่ 1

$$\text{ค่าร้อยละการคืนกลับ} = \frac{(C_A \text{ in sample} + C_A \text{ added}) - C_A \text{ in sample}}{C_A \text{ added}} \times 100 \quad \text{.....1)}$$

หมายเหตุ C_A in sample = ความเข้มข้นของสารสนใจวิเคราะห์ในตัวอย่าง

C_A added = ความเข้มข้นของสารสนใจวิเคราะห์ที่เติมในระบบ

4.4 การหาค่าความแม่นยำ

4.3.1 ปิเปตตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มปริมาตร 10 ml ชั่งน้ำหนัก

4.3.2 เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที เพื่อตกตะตอนโปรตีนในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม

4.3.3 ปิเปตสารละลายใสจากตัวอย่างน้ำนมพร้อมปริมาตร 1 ml ลงในหลอดทดลอง

4.3.4 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM 1 ml ใส่ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่เตรียมไว้และผสมให้เข้ากัน

4.3.5 ทำการเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์เกิดขึ้น

4.3.6 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

4.3.7 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

4.3.8 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟี

4.3.9 บันทึกโครมาโทแกรม แล้วนำข้อมูลของสัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ตามการศึกษาดังนี้

- Intra-day คือ การทำซ้ำภายในวันเดียวกัน โดยทำซ้ำ 10 ครั้ง
- Inter-day คือ การทำซ้ำกันระหว่างวันเป็นจำนวน 3 วัน วันล่ะ 3 ซ้ำ

การคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจะคำนวณ จากสมการที่ 2

$$\text{ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \times 100 \qquad \text{.....2)}$$

ตอนที่ 5 การศึกษาผลของสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมที่พบได้ในตัวอย่าง

5.1 เตรียมสารละลายผสมที่ประกอบไปด้วยสารรบกวนที่สามารถพบได้ในตัวอย่างดังนี้ สารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์เข้มข้น 25 nmol/ml, สารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ เข้มข้น 198 nmol/ml, กรดอะมิโนโพรลีน 100 nmol/ml, กรดอะมิโนกลูตามิค 100 nmol/ml, กรดอะมิโนไลซีน 100 nmol/ml, น้ำตาลกาแลกโทส 100 nmol/ml, น้ำตาลกลูโคส 100 nmol/ml, น้ำตาลฟรักโทส 100 nmol/ml, น้ำตาลแลคโตส 100 nmol/ml, กรดไลโนลีอิค 100 nmol/ml

5.2 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM 1 ml ใส่ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่เตรียมไว้และผสมให้เข้ากัน

5.3 ทำการเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์เกิดขึ้น

5.4 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

5.5 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

5.6 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟี

5.7 บันทึกโครมาโทแกรมเพื่อศึกษาผลของสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมที่พบได้ในตัวอย่าง

ตอนที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่ม

6.1 นำตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มรสชาติต่างๆ ที่ขายในท้องตลอดทั้งแบบพาสเจอร์ไรซ์และ UHT ปริมาตร 10 ml บันทึกน้ำหนัก

6.2 ปิเปตสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM 1 ml ใส่ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่เตรียมไว้และผสมให้เข้ากัน

6.3 ทำการเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที จนได้สารละลายสีของอนุพันธ์เกิดขึ้น

6.4 นำสารละลายสีของอนุพันธ์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที

6.5 นำชั้นของสารละลายชั้นบนมากรองด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง ติดฉลาก

6.6 ฉีดสารละลายสีของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟี

6.7 บันทึกโครมาโทแกรมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ มาลอนไดอัลดีไฮด์และปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในตัวอย่าง

6.8 ทำการวิเคราะห์ซ้ำเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ได้ของวิธีการที่พัฒนาขึ้น โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีการอื่น ได้แก่

6.8.1 การวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ อ้างอิงจากวิธีการของ Fenaille ในปี 2001 โดยอาศัยสภาวะดังนี้

- ทำอนุพันธ์กับสารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกเข้มข้น 40 mM ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลานาน 60 นาที
- องค์ประกอบวัฏภาคเคลื่อนที่ของอัตราส่วนเมทานอลต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ร้อยละ 40:60 โดยปริมาตร
- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 ml/min
- ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 50mM ที่ pH เท่ากับ 6.0
- ตัวตรวจวัดเป็นแบบชนิด diode array detector โดยวัดตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 nm

6.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ อ้างอิงจากวิธีการของ Jorge ในปี 2005 โดยอาศัยสภาวะดังนี้

- องค์ประกอบวัฏภาคเคลื่อนที่ของน้ำปราศจากไอออนต่ออะซีโตไนไตรล์ร้อยละ 95:5 โดยปริมาตร

- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 ml/min
- ตัวตรวจวัดเป็นแบบชนิด diode array detector โดยวัดตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 448 นาโนเมตร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

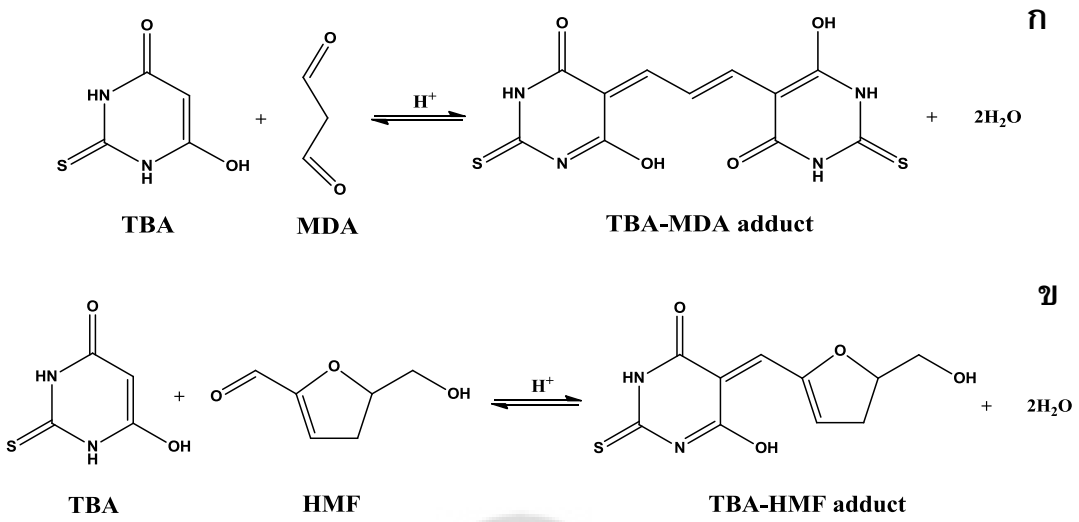
สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอผลการวิจัยตามลำดับดังนี้

1. ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์
2. ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน
3. ผลการศึกษาปัจจัยแปรผันในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์
4. ผลการศึกษาการหาประสิทธิภาพของระบบที่ทดลอง
5. ผลการศึกษาสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมที่พบได้ในตัวอย่าง
6. ผลการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่ม

ตอนที่ 1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเตรียมสารอนุพันธุ์

ในงานวิจัยนี้อาศัยหลักการเตรียมสารอนุพันธุ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายของกรด 2-ไทโอบาร์บิทุริกโดยเมื่อทำปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดีไฮด์แล้วจะให้อนุพันธ์ที่เป็นสีชมพูและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 532 nm (λ_{max}=532, $TBARS_{532}$) (Romieu. 2006: S302) ขณะที่สารละลายของกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์จะเกิดสาร อนุพันธ์ที่เป็นสีเหลืองและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 448 nm (λ_{max}=448, $TBARS_{448}$) (Kosugi. 1987: 456-464) วิธีนี้ปกติทราบกันในนามของ TBA-assay โดยในงานวิจัยนี้จะได้ทำการแยกสารอนุพันธุ์ทั้งสองด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธุ์ทั้งสองด้วยตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์โดยวัดที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน สำหรับสีของสารละลายอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นกับมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ แสดงในภาคผนวก ค

โดยปฏิกิริยาที่เกิดระหว่างกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก กับสารประกอบจำพวกอัลดีไฮด์ เป็นปฏิกิริยาการควบแน่นของหมู่คาร์บอกซิลเกิดเป็นอนุพันธ์ (Dongmao. 2010: 3193-3201) แสดงในภาพประกอบ 9



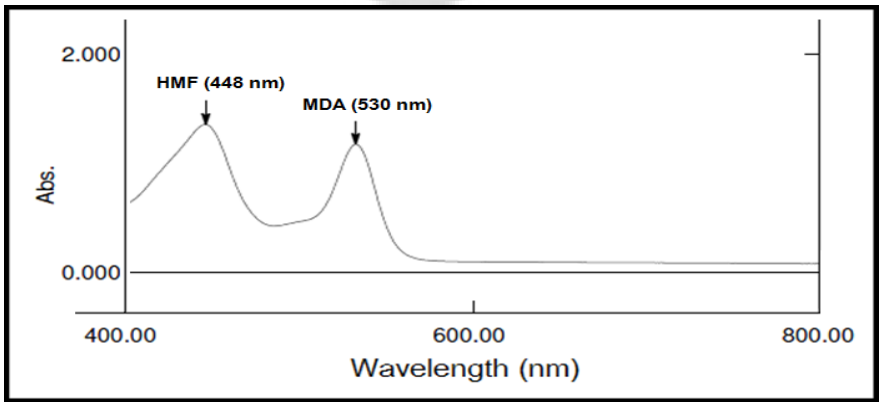
ภาพประกอบ 9 ปฏิกิริยาการเกิดสารอนุพันธุ์ระหว่างกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก

ก แทน อนุพันธุ์ที่เกิดจากสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์

ข แทน อนุพันธุ์ที่เกิดจากสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

ที่มา : Dongmao, Z. (2010). *Ultrasensitive detection of malondialdehyde with surface-enhanced raman spectroscopy*. pp. 3193-3201

โดยเมื่อนำสารละลายผสมของมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ไปทำปฏิกิริยาการเตรียมอนุพันธ์จนได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายสีแล้ว จึงนำสารละลายสีของอนุพันธ์ผสมระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ไปบันทึกสเปกตรัมเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ พบว่า อนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดอยู่ที่ 530 nm และ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดอยู่ที่ 448 nm ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 10



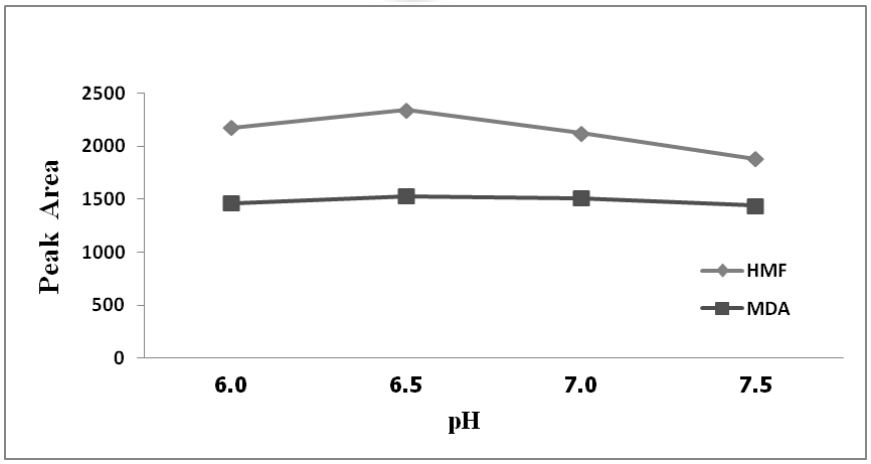
ภาพประกอบ 10 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

ตอนที่ 2 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน

2.1 ผลของ pH ที่ใช้ในการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เนื่องจากสารประกอบบางชนิดมีความไม่เสถียรหรือสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อ pH ของระบบเปลียนไป แล้วส่งผลกระทบทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบอินทรีย์เปลี่ยนแปลงตามไปส่งผลกระทบต่อสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ ดังนั้นในกระบวนการวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีของเหลวบางครั้งจึงจำเป็นต้องรักษาระดับ pH ให้คงที่ ด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมค่า pH ไม่ให้เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยทั่วไปในการวิเคราะห์ปริมาณ MDA นิยมใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการควบคุมค่า pH ในช่วงกลางตั้งแต่ pH 6 (Fenaille. 2001: 237-45) pH 6.8 (Candan. 2008: 708-713) สำหรับความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีการเลือกใช้ ในช่วงตั้งแต่ 10mM จนถึง 50mM ตามความจุของความสามารถในการรักษา pH ของบัฟเฟอร์ ที่จำเป็นต้องใช้ในงานนั้นๆ แต่สำหรับในงานวิจัยนี้เป็นวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นอยู่ในระดับที่ต่ำมาก ดังนั้นจึงเลือกใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 10mM ก็เพียงพอสำหรับการควบคุม pH ในระบบ อีกทั้งยังปลอดภัยจากผลของตะกอนเกลือต่อระบบโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงอีกด้วย

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมของ pH ที่มีต่อสัญญาณในการวิเคราะห์อนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์ และ อนุพันธ์ของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ สำหรับการทดสอบจะเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ช่วงของ pH ที่ 6.0 6.5 7.0 7.5 ไปใช้เป็นองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่แล้วจึงทำการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบทั้งสองชนิดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยผลการทดลองดังภาพประกอบ 11



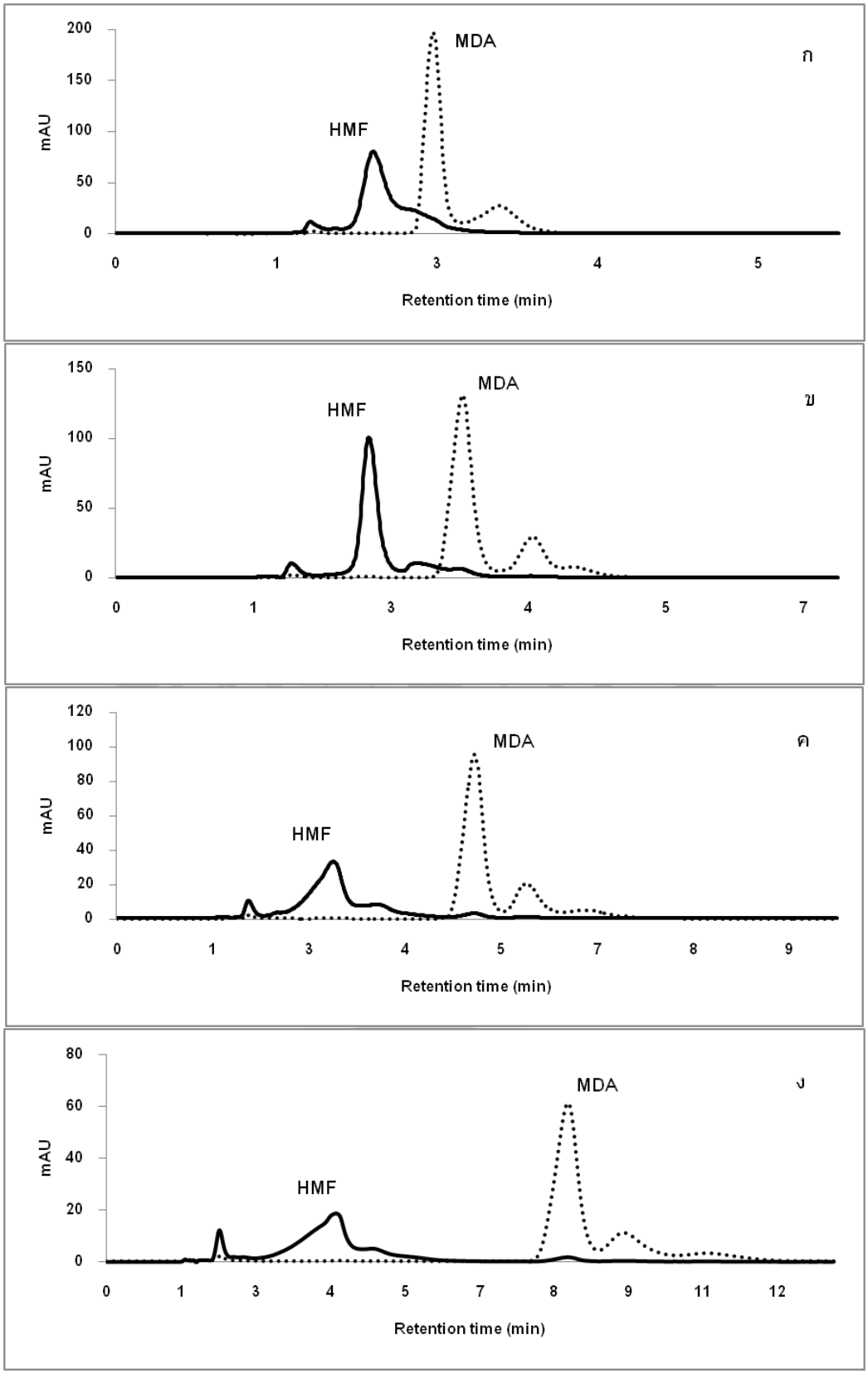
ภาพประกอบ 11 ผล pH ที่มีต่อการวิเคราะห์สารอนุพันธ์

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของค่า pH พบว่า ค่าสัญญาณการตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์มีแนวโน้มคงที่เมื่อค่า pH ของระบบเปลี่ยนแปลง แต่ในขณะที่ค่าสัญญาณการตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของระบบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Morales ในปี 1992 ที่ระบุว่า สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อนุพันธ์จาก 2-ไทโอบาร์บิทุริกกับไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจะอยู่ในช่วงที่เป็นกรดเล็กน้อย (Morales. 1992: 32-35) เหตุผลเนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ได้จากอนุพันธ์ของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เกิดการเคลื่อน (shift) เมื่อสภาวะของ pH ในระบบเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าของ pH ที่ 6.5 ให้ค่าสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์สูงที่สุด ดังนั้นสภาวะของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 6.5 จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์และอนุพันธ์ของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.2 องค์ประกอบของตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

โดยทั่วไปองค์ประกอบของตัวทำละลายในทางโครมาโทกราฟีจะส่งผลถึงความสามารถในการแยกรวมถึงรูปร่างหน้าตาของพีคที่ได้จากโครมาโทแกรม ซึ่งการเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ในระบบของรีเวรส์เฟสจะทำให้วัฏภาคเคลื่อนที่มีความแรงขึ้นทำให้กระบวนการชะเกิดขึ้นได้ไว แต่การเพิ่มอัตราส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ก็อาจส่งผลทำให้ค่าการแยกทางโครมาโทกราฟี (separation factor) ลดลง (Barry. 1980: 1373-1383) ดังนั้นการศึกษาผลขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่จึงจำเป็นต่อการเลือกใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยจะเตรียมจากสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เมทานอล : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, v/v) และทำการศึกษาการชะที่อัตราส่วนตัวทำละลาย ที่ช่วงตั้งแต่ 45 : 55 40 : 50 35 : 75 และ 30 : 70 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

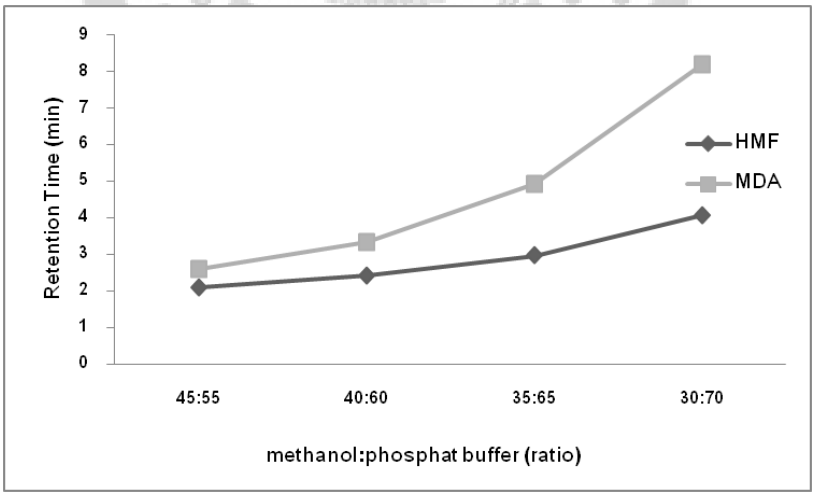
จากผลการศึกษาพบว่า องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่มีผลต่อรูปร่างของพีคที่เกิดขึ้นจากกระบวนการแยกอย่างชัดเจน โดยเมื่อกำหนดให้องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มีเปอร์เซนต์ของเมทานอลที่สูง จะพบว่าพีคสัญญาณของสารมาตรฐานของทั้งมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ยังไม่สามารถแยกตัวออกจากสารรบกวนได้ชัดเจน แต่เมื่อลดองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มีเปอร์เซนต์ของเมทานอลลดลงจะทำให้พีคสัญญาณของสารมาตรฐานของทั้งสามารถแยกตัวออกจากสารรบกวนได้ ดังภาพในประกอบ 12



ภาพประกอบ 12 โครมาโทแกรมจากผลการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์อนุพันธ์จากมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

ก แทน องค์ประกอบเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 45:55 v/v
ข แทน องค์ประกอบเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 40:60 v/v
ค แทน องค์ประกอบเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 35:65 v/v
ง แทน องค์ประกอบเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 30:70 v/v

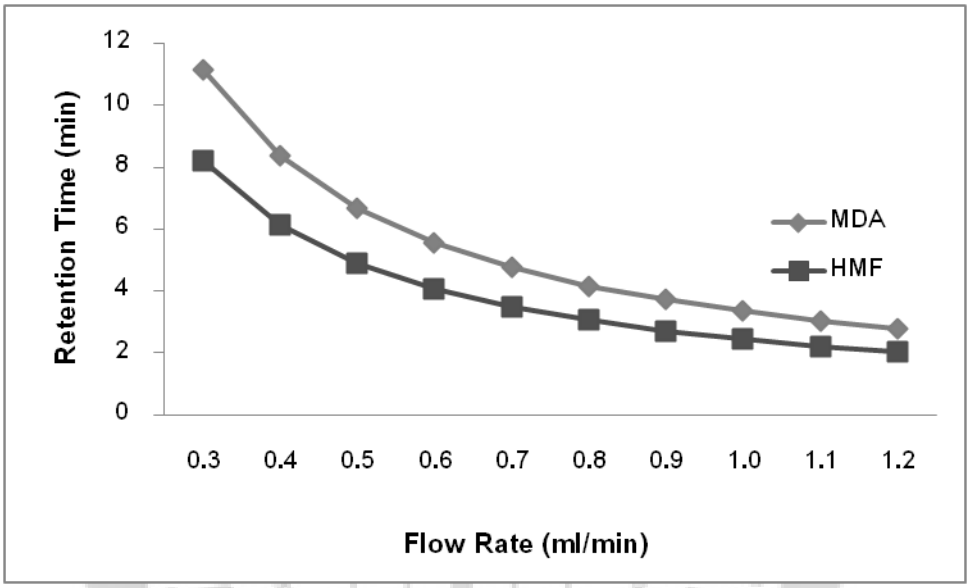
จากภาพประกอบ 12 พบว่า โครมาโทแกรมที่สามารถแยกพีคสัญญาณสารรบกวนออกจากพีคสัญญาณของอนุพันธ์จากสารมาตรฐานทั้งสองได้ดีที่สุด เมื่อเลือกใช้องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ในอัตราส่วนตัวทำละลายของเมทานอลต่อฟอสเฟตบัพเฟอร์เท่ากับ 40:60 (ข) และเมื่อทำการศึกษาผลจากองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อค่าระยะเวลารีเทนชัน (retention time) ดังแสดงในภาพประกอบ 13 พบว่า เมื่อทำการลดองค์ประกอบของเมทานอลที่ใช้เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ให้ต่ำลง ค่าของระยะเวลารีเทนชันจากอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ และทำให้เวลาที่ใช้ในกระบวนการวิเคราะห์มากขึ้น ซึ่งที่องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ของเมทานอลต่อฟอสเฟตบัพเฟอร์เท่ากับ 40:60 ให้ค่าระยะเวลารีเทนชันของอนุพันธ์ทั้งสองอยู่ในช่วงเหมาะสม โดยเมื่อทำการคำนวณหาค่าของประสิทธิภาพในการแยก (resolution, R_s) ซึ่งเป็นค่าพารามิเตอร์สำคัญที่ใช้บอกความประสิทธิภาพของวิธีการทางโครมาโทกราฟี พบว่า เมื่อเลือกใช้องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ในอัตราส่วนตัวทำละลายของเมทานอลต่อฟอสเฟตบัพเฟอร์เท่ากับ 40:60 ให้ค่าของประสิทธิภาพในการแยกที่ดี (อยู่ในช่วงระหว่าง 1.0 – 1.5) โดยในส่วนของอนุพันธ์จากมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์อยู่ที่ 1.28 และ 1.25 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 13 ผลของการศึกษาผลจากองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อค่าระยะเวลารีเทนชัน

2.3 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่จะทำการศึกษาในช่วงอัตราการไหลที่ 0.3 จนถึง 1.2 ml/min โดยพิจารณาผลของระยะเวลารีเทนชันที่ได้จากโครมาโทแกรมของอนุพันธ์ทั้งมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ดังแสดงในภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีต่อระยะเวลารีเทนชัน

จากผลการทดลองมีความเกี่ยวข้อง ตามหลักการของ ทฤษฎี plate theory ซึ่งเกี่ยวข้องอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่าความสูงของแต่ละโซนในการแยกหรือ Height equivalent to a theoretical plate ซึ่งใช้อักษรย่อว่า HETP (H) ซึ่งเป็นค่าที่สมมุติขึ้น แต่ทฤษฎี plate theory ไม่สามารถอธิบายกลไกในการหาแฟกเตอร์ต่างๆได้ จึงต้องอาศัยทฤษฎีของอัตราความเร็ว (rate theory) ที่สามารถอธิบายพฤติกรรมทางโครมาโทกราฟีได้ โดยทฤษฎีนี้ขึ้นอยู่กับพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น อัตราการถ่ายเทของมวลระหว่างวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการแพร่กระจายของตัวถูกละลายในคอลัมน์ อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่และไฮโดรไดนามิก (hydrodynamics) ซึ่งข้อมูลจากโครมาโทแกรมจะสามารถอธิบายได้ว่าการแยกสารนั้นได้ดีมากน้อยอย่างไรนั้น ขึ้นอยู่กับตัวแปร 3 ชนิด คือ การแพร่กระจายแบบธรรมดา (ordinary diffusion) การแพร่กระจายแบบเอ็ดดี (Eddy diffusion) และความไม่สมดุลเฉพาะแห่ง ซึ่งสมการ *Van Deemter* สามารถอธิบายผลของตัวแปรทั้ง 3 ออกเป็นเทอมต่างๆ ทั้งสิ้น 3 เทอม ที่มีความสัมพันธ์กับค่า H ซึ่งจะส่งผลถึงประสิทธิภาพของระบบทางโครมาโทกราฟีได้ ดังสมการที่ 3

$$H = A + \frac{B}{u} + C.u \qquad \text{.....3)}$$

H = HETP

A = eddy diffusion term

B = longitudinal diffusion term

u = linear velocity

C = Resistance to mass transfer coefficient

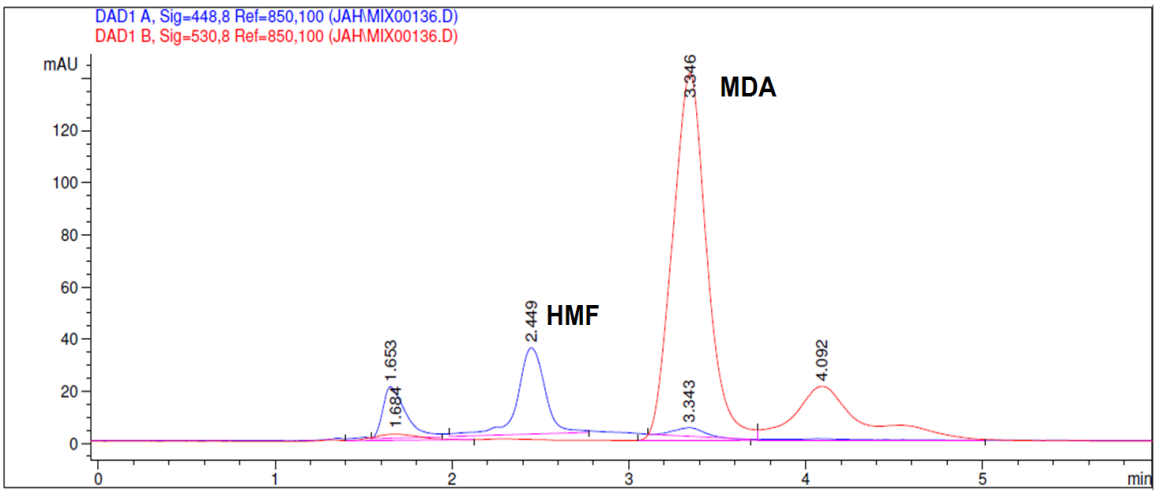
โดยทั่วไปการเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่จะมีส่วนช่วยลดระยะเวลาในการชะสารลงทำให้การวิเคราะห์มีความรวดเร็วมากขึ้น เหตุผลเนื่องจากโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์เกิดการส่งผ่านมวล ระหว่างวัฏภาคคงที่กับวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลง ทำให้การเกิดสมดุลของอันตรกิริยาการกระจายตัว (Distribution Coefficient, *K*) ระหว่างโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์กับวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลงตามไปด้วย ส่งผลทำให้ให้ค่าการเลือกลดลงและค่าการแยกก็ลดลงตามไปด้วย

จากผลการทดลองนี้ พบว่าการเพิ่มอัตราการไหลส่งผลให้อนุพันธ์ทั้งสองถูกชะออกมาไวยิ่งขึ้น ดังแสดงในภาพประกอบ 14 แต่เนื่องจากสมการ *Van Deemter* ได้อธิบายไว้ว่าการเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้สูงขึ้น แม้ว่าจะไปลดผลของการแพร่ตามแนวยาวแต่ก็ส่งผลในการต้านการส่งผ่านมวลในสมดุลของการแยก ทำให้พีคสัญญาณจากโครมาโทแกรมของสารทั้งชนิดมีโอกาสการซ้อนทับกันได้ นอกจากนี้ยังส่งผลให้แรงดันในระบบสูงขึ้นจนเกินไปในระบบที่ใช้อัตราการไหลสูงๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 1.0 ml/min เป็นสภาวะที่เหมาะสมของระบบ

ดังนั้นจากการทดลองข้างต้น สภาวะที่เหมาะสมเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ควรใช้ในการแยกอนุพันธ์ของสารประกอบทั้งสอง มีดังนี้

1. pH ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 6.5
2. องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 40:60 (เมทานอล:ฟอสเฟตบัฟเฟอร์)
3. อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

จากการใช้สภาวะข้างต้นดังกล่าว จะทำให้สามารถทำการแยกอนุพันธ์ของและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์และมาลอนไดอัลดี ได้ที่เวลาประมาณ 2.6 และ 3.4 นาที ตามลำดับ โดยโครมาโทรแกรมที่ทดลองได้ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 5 นาที ต่อหนึ่งตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ดังแสดงในภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 แสดงโครมาโทแกรมจากสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน

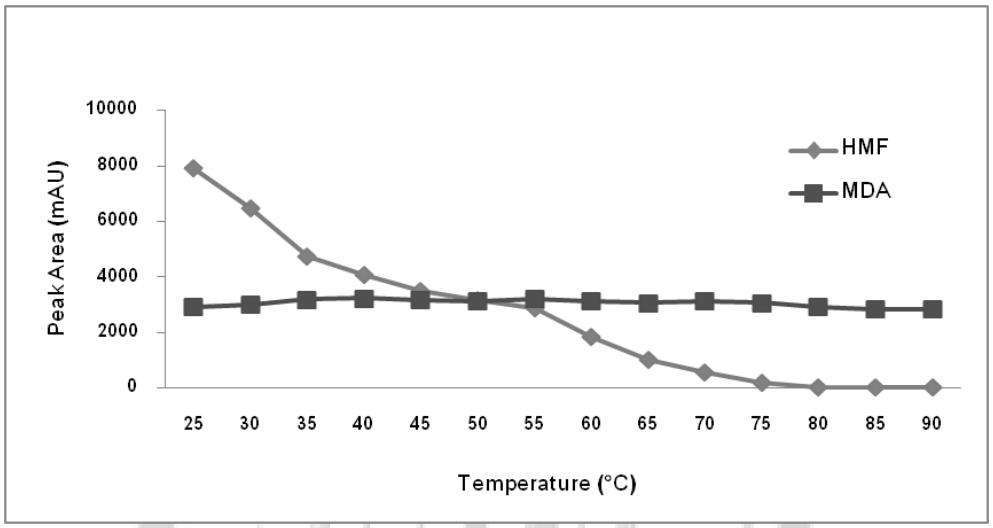
ตอนที่ 3 ผลการศึกษาปัจจัยในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

3.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของความร้อนที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ระหว่าง สารละลายกรด 2 –ไทโอบาร์บิทูริก กับสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ โดยได้ทำการศึกษาในช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ตั้งแต่ 25°C จนถึง 90°C และเมื่อเตรียมอนุพันธ์ได้แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของอนุพันธ์ของทั้งสารประกอบ MDA และ HMF ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแล้วพิจารณาจากค่าของสัญญาณการตรวจวัดที่ได้จากโครมาโทแกรม โดยแสดงดังภาพประกอบ 16

ผลการศึกษาพบว่าพื้นที่พีคของสารอนุพันธ์ของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ มีแนวโน้มลดลงอย่างมากตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความเสถียรของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ซึ่งมีความเสถียรต่ำ สามารถสลายตัวได้ง่าย (Jaroslaw. 2001: 17-54) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Girisuta และคณะในปี 2006 ที่ศึกษาจลนศาสตร์การเปลี่ยนแปลงของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดอะมิโนลิวูลินิก (5-aminolevulinic acid) โดยผลการวิจัยพบว่า ปริมาณของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ จะลงลดไปเรื่อยๆเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิของระบบ ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลทำให้สัญญาณการวิเคราะห์อนุพันธ์จากของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการทำปฏิกิริยา จากผลของการศึกษานี้จึงพบว่า มีการสลายตัวของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

และสลายตัวไปจนหมดที่อุณหภูมิการทดลองที่ 80°C ในขณะที่พื้นที่พีคของสารอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์ มีแนวโน้มคงที่ในทุกช่วงของอุณหภูมิ แสดงว่าอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์ มีความเสถียรมากกว่าอนุพันธ์ที่ได้จากสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ดังนั้นในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์จึงอยู่ที่ 25-30°C หรือในช่วงอุณหภูมิห้อง

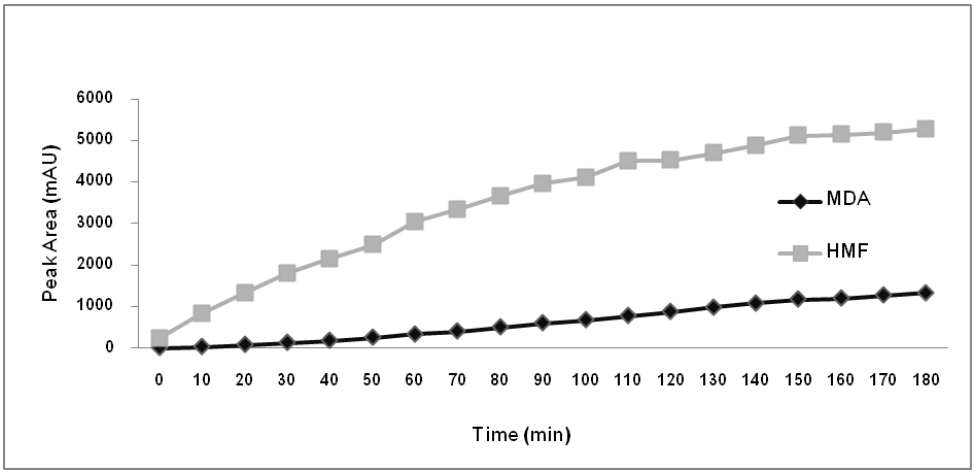


ภาพประกอบ 16 ผลของอุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

3.2 ระยะเวลาใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

ในการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในเตรียมอนุพันธ์ของสารทั้งสอง โดยการเก็บสารละลายสีของอนุพันธ์ทั้งสองทุกๆ 10 นาที แล้วทำการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบทั้งสองโดยทันทีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากนั้นจึงพิจารณาผลของเวลาที่มีต่อการเตรียมอนุพันธ์จากการพลอตกราฟระหว่างพื้นที่พีคของสารอนุพันธ์ทั้งสองที่ได้จากโครมาโทแกรมกับระยะเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา แสดงดังภาพประกอบ 17

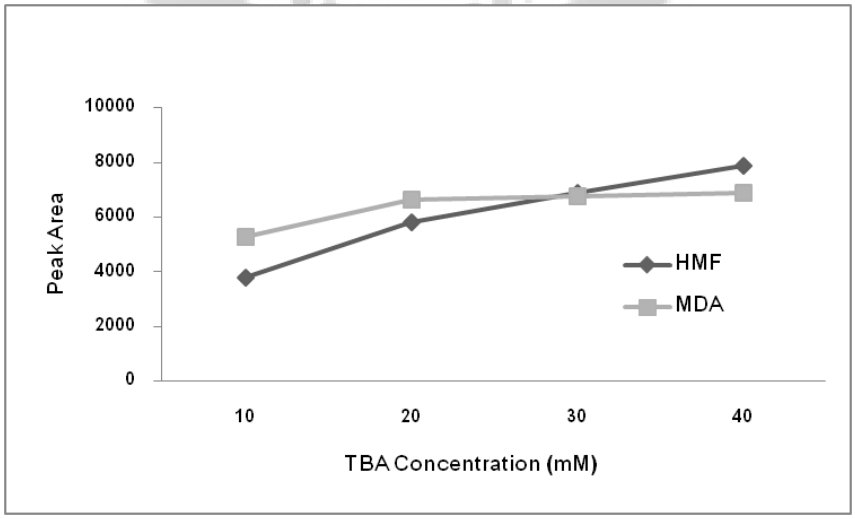
จากภาพประกอบ 17 จะเห็นว่า เมื่อใช้เวลาในการเตรียมอนุพันธ์นานมากขึ้น จะสามารถตรวจพบสารอนุพันธ์แต่ละชนิดได้มากขึ้น เนื่องจากพบ พื้นที่พีคในโครมาโทแกรมสูงขึ้น แสดงว่าในปฏิกิริยาของการเตรียมสารอนุพันธ์ จะเกิดสารอนุพันธ์จากสารตั้งต้นอย่างต่อเนื่อง โดยอนุพันธ์ของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ มีอัตราการเกิดสูงกว่า เมื่อเทียบกับอัตราการเกิดอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์ แต่เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 150 นาที อัตราการเพิ่มขึ้นของพื้นที่พีคของสารอนุพันธ์ของสารประกอบทั้งสองมีแนวโน้มคงที่ โดยพิจารณาจากค่า %RSD ระหว่าง 150 นาที กับ 180 ของอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์อยู่ที่ 1.3 และอนุพันธ์ของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์อยู่ที่ 3.4 ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมของระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ของสารทั้งสองคือ ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานอย่างน้อย 150 นาที



ภาพประกอบ 17 ผลของระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อพื้นที่พีคของสารอนุพันธ์

3.3 ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

ความเข้มข้นของสารละลายกรด 2- ไทโอบาร์บิทูริก ที่ใช้เป็นรีเอเจนต์ในการเตรียมอนุพันธ์เป็นปัจจัยที่สำคัญโดยเป็นสารกำหนดปริมาณของการเกิดปฏิกิริยาเคมีนี้ ผลจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของสารละลายกรด 2- ไทโอบาร์บิทูริก ซึ่งทำการทดลองโดยใช้สารละลายกรด 2- ไทโอบาร์บิทูริก ที่แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 10 20 30 และ 40 mM แล้วจึงนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมอนุพันธ์กับสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ผลการศึกษาค่าพื้นที่พีคของโครมาโทแกรมของสารอนุพันธ์ทั้งสอง เมื่อพลอตกราฟกับค่าความเข้มข้นของสารละลายกรด 2- ไทโอบาร์บิทูริกดังแสดงในภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 การเปลี่ยนแปลงพื้นที่พีคของสารอนุพันธ์ เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารละลายกรด 2- ไทโอบาร์บิทูริก

จากการศึกษาพบว่า ค่าของพื้นที่พีคของสารอนุพันธ์ของสารประกอบทั้งสองชนิดมีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลง โดยเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายกรด 2- ไทโอบาร์บิทูริกที่เพิ่มมากขึ้น โดยจะขึ้นสูงสุดเมื่อเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายกรด 2- ไทโอบาร์บิทูริก 40mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเตรียมเป็นสาระละลายได้ เนื่องจากสารมาตรฐาน 2- ไทโอบาร์บิทูริก 40mM ไม่สามารถละลายเพิ่มขึ้นได้ ถึงแม้ใช้ความร้อนช่วยก็จะเกิดการตกผลึกกลับคืนมา ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้น สารละลายกรด 2- ไทโอบาร์บิทูริก จึงควรเลือกใช้ความเข้มข้น 40mM

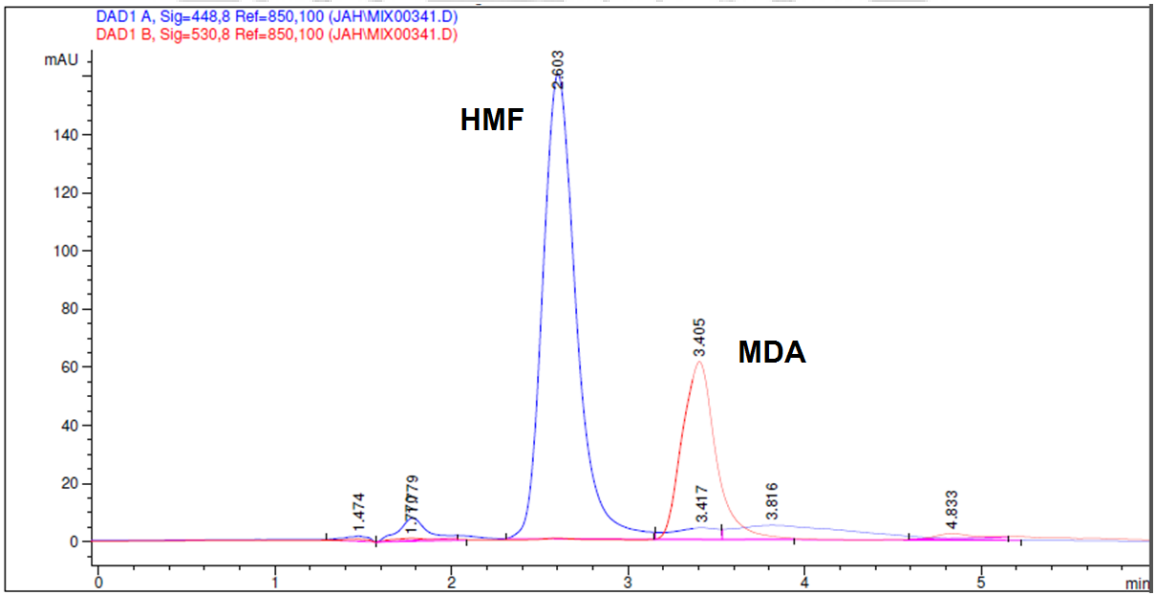
ดังนั้นจากการทดลองข้างต้น อาจกล่าวได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมต่างๆที่ควรใช้ในการเตรียมอนุพันธ์กับ 2- ไทโอบาร์บิทูริก 40mM จะมีดังนี้

1.อุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์ที่ 25°C

2.ระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์นาน 150 นาที

3.ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ 40mM

จากการใช้สภาวะข้างต้นดังกล่าว เมื่อใช่ร่วมกับสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากเทคนิคเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จะให้โครมาโทแกรมจากอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ดังแสดงในภาพประกอบ 19



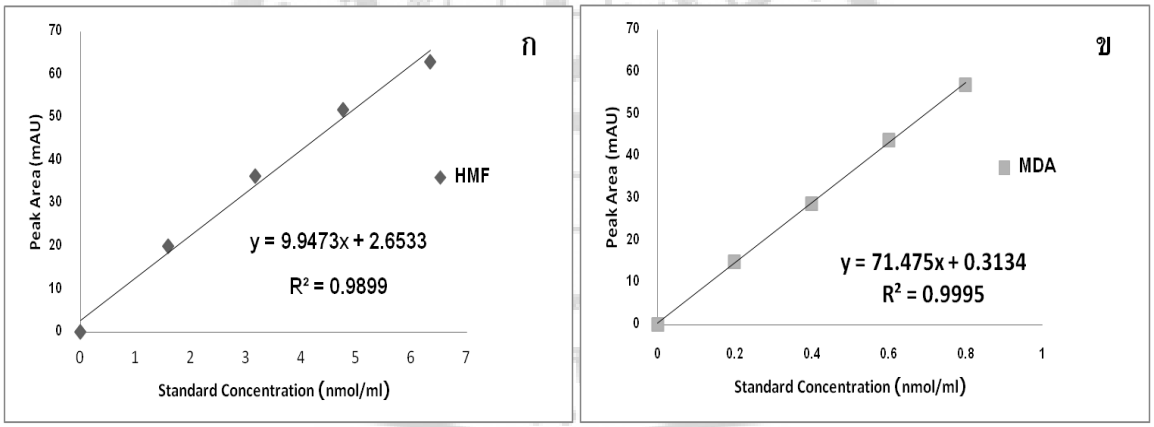
ภาพประกอบ 19 โครมาโทแกรมที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ดังนี้ อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 40:60 (เมทานอล:ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 6.5) อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิและระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ที่ 25°C เป็นเวลา 150 นาที และใช้ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ 40mM

ตอนที่ 4 ผลการศึกษาการหาค่าของประสิทธิภาพของระบบที่ทดลอง

4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคที่ทดลองในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการสร้างสมการกราฟของสารมาตรฐานในการวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกันในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม เนื่องจากปริมาณสารประกอบทั้งสองพบในตัวอย่างมีน้อยมาก ดังนั้นจึงเป็นต้องทำการสร้างกราฟมาตรฐานให้มีความเข้มข้นช่วงต่ำ คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในช่วง 0.2 nmol/ml จนถึง 0.8 nmol/ml และความเข้มข้นของสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในช่วง 1.58 nmol/ml จนถึง 6.34 nmol/ml

ซึ่งหลังจากทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้งสองด้วยเทคนิคเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแล้ว จึงได้นำโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานในช่วงดังกล่าวไปคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความเข้มข้นกับสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์เพื่อนำไปสร้างสมการกราฟของสารมาตรฐานทั้งสอง ดังแสดงในภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความเข้มข้นกับสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ก แทน กราฟมาตรฐานของสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

ข แทน กราฟมาตรฐานของสารประกอบสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์

จากภาพประกอบ 20 จะเห็นว่าจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความเข้มข้นกับสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ มีสมการเส้นตรง Y = 9.9473X + 2.6533 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ R^2 = 0.9899 ส่วนสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ มีสมการเส้นตรงคือ Y = 71.475X + 0.3134 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ R^2 = 0.9995

นอกจากนี้ยังทดสอบการสร้างสมการกราฟเส้นของสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้นสูง โดยการเตรียมสารมาตรฐานผสมของสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 5.0 nmol/ml จนถึง 40.0 nmol/ml และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในช่วงความเข้มข้น ตั้งแต่ 40.0 nmol/ml จนถึง 320.0 nmol/ml (ดังโครมาโทแกรมในภาคผนวก ก.) จากนั้นจึงนำข้อมูลของพื้นที่พีคจากโครมาโทแกรมไปสร้างสมการกราฟมาตรฐาน โดยสมการกราฟเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นสูงที่ได้จากมาตรฐานของสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ มีสมการเส้นตรง คือ Y = 77.113X + 35.238 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ R^2 = 0.9997 ส่วนกราฟมาตรฐานของสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์มีสมการเส้นตรง คือ Y = 170.8X + 221.45 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ คือ 0.9922 ตามลำดับ

4.2 การหาค่าของขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด และค่าของขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์

เมื่อทำการวัดสัญญาณของสารละลาย blank จำนวน 5 ครั้ง เพื่อนำไปหาค่าของขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD, S/N=3) และค่าของขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOQ, S/N=10) ตามแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้

สารที่วิเคราะห์	LOD(nmol/ml)	LOQ (nmol/ml)
มาลอนไดอัลดีไฮด์	0.01	0.07
ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์	0.30	2.38

4.3 การหาค่าความถูกต้อง

การคำนวณหาค่าของร้อยละการคืนกลับ โดยจะทำการทดสอบโดยอาศัยการวัดสัญญาณการวิเคราะห์ของงตัวอย่างนมที่มีการเติมสารมาตรฐานลงไปเทียบสัญญาณที่ได้จากสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่เติมลงไปดังกล่าว หรือเรียกว่าการทำ spike โดยโครมาโทแกรมสารละลายผสมของสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์สารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ โครมาโทแกรมของตัวอย่างนมที่มีการเติมสารมาตรฐานทั้งสองไป และโครมาโทแกรมของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรท์จะแสดงดังภาพประกอบ 21

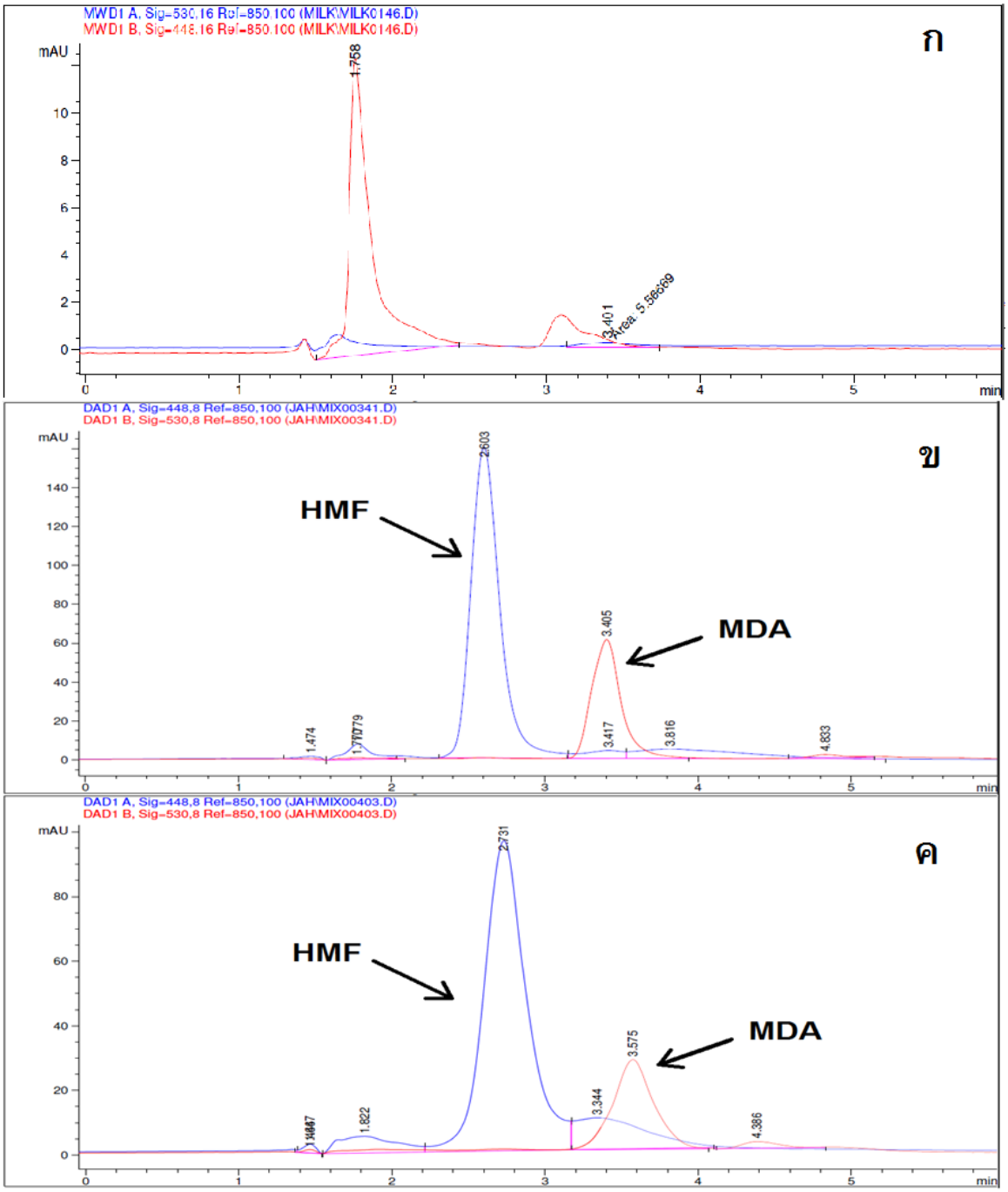
โดยจากผลการทดลอง พบว่า การวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ และปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ จากวิธีการทดลองในงานวิจัยนี้ให้ค่าของร้อยละการคืนกลับเฉลี่ยอยู่ที่ 75.71% และ 107.51% ตามลำดับ

4.4 การหาค่าความแม่นยำ

สำหรับการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดลองในงานนี้ จะแสดงผลในรูปของ %RSD ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการวิเคราะห์

สารที่วิเคราะห์	% RSD intra day	% RSD inter day
มาลอนไดอัลดีไฮด์	8.5	10.7
ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์	4.5	6.2



ภาพประกอบ 21 แสดงโครมาโทแกรม ดังนี้

ก แทน โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างนมพร้อมดื่มชนิดพาสเจอร์ไรท์ รสจืด

ข แทน โครมาโทแกรมสารละลายผสมของสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

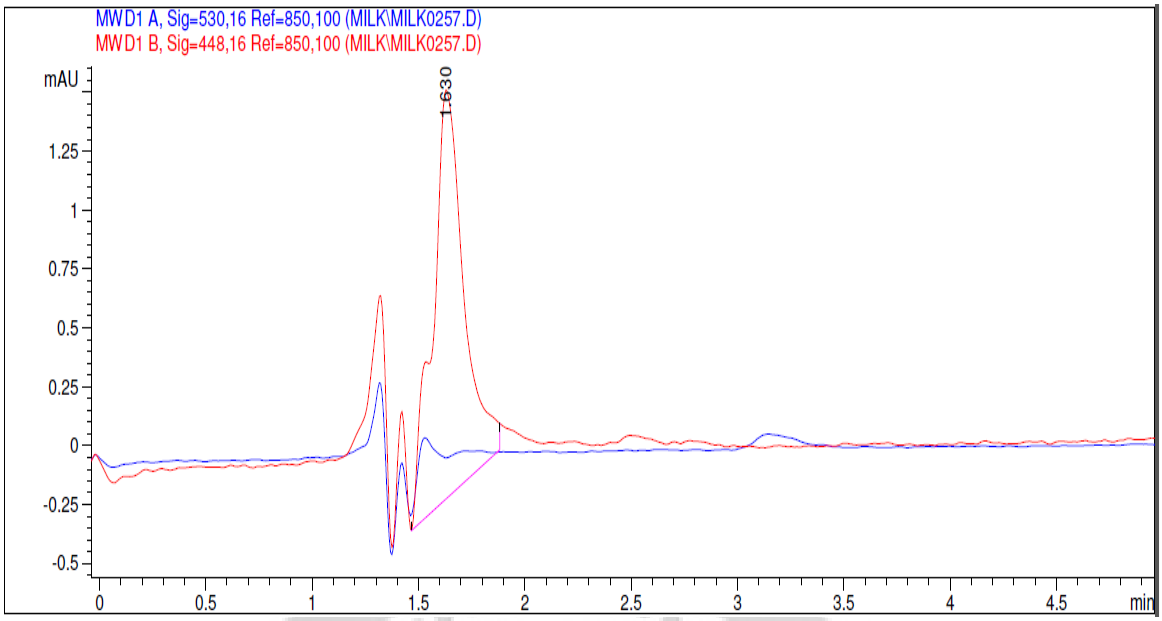
ค แทน โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างนมพร้อมดื่มชนิดพาสเจอร์ไรท์ รสจืดที่มีการเติมสารละลายผสมของสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ และสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ลงไป

ตอนที่ 5 ผลการศึกษาผลของสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมที่พบได้ในตัวอย่าง

เนื่องจากตัวอย่างนมพร้อมดื่มที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ เป็นตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนและมีสารรบกวนอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น โปรตีน กรดอะมิโน ไขมัน น้ำตาล และอื่นๆ ดังนั้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างสารประกอบใดๆในตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนจึงจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนเพื่อแยกสารรบกวนต่างๆออกจากตัวอย่าง ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิเคราะห์การตกตะกอนโปรตีนด้วย 10%TCA แล้วจึงนำไป centrifuge ให้เกิดการแยกชั้นของตะกอนได้ดีขึ้น ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถทำให้แยกส่วนของโปรตีนและไขมันที่ไม่ละลายน้ำออกไปบางส่วนแล้วจึงนำส่วนสารละลายใสที่ได้ไปทำอนุพันธ์กับ TBA แล้วจึงทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อ แต่สารละลายใสของตัวอย่างที่ได้นั้นยังอาจจะมีสารรบกวนบางชนิดที่สามารถละลายน้ำได้เจือปนอยู่ ยกตัวอย่างเช่น กรดอะมิโน น้ำตาล และโมเลกุลกรดไขมัน ซึ่งสารรบกวนต่างๆเหล่านี้อาจไปเกิดปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์คือ TBA แล้วทำให้เกิดอนุพันธ์สีที่อาจส่งผลกระทบต่อสัญญาณวิเคราะห์ได้

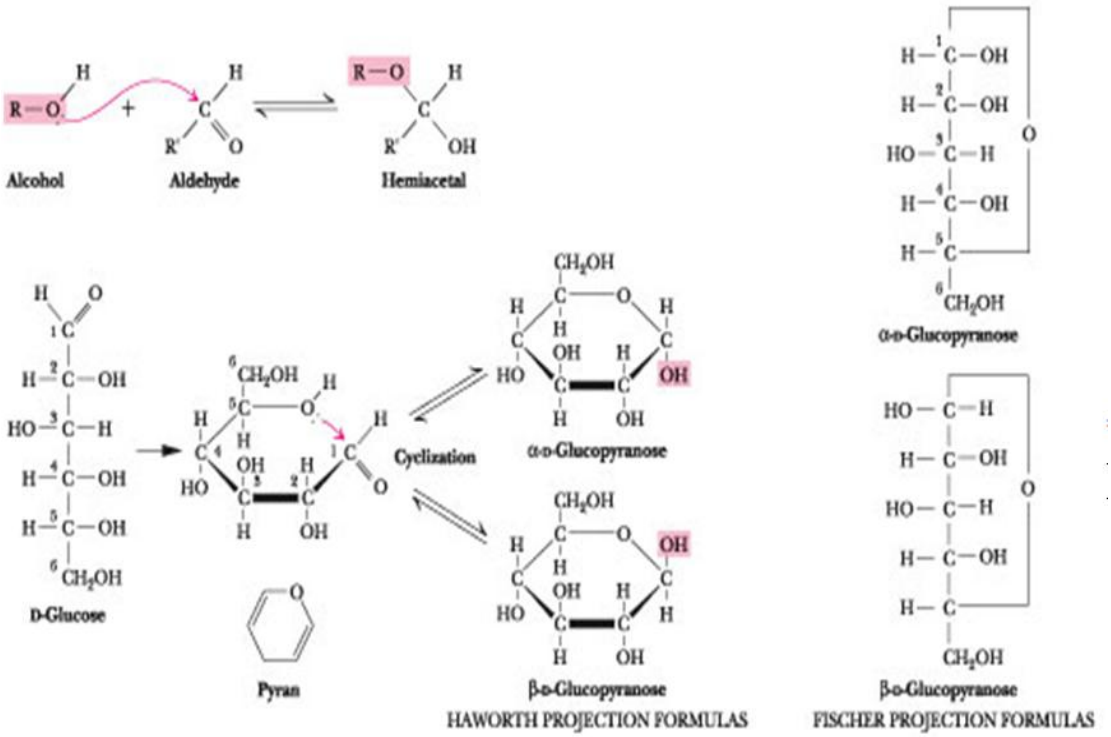
ซึ่งในการศึกษาผลของสารรบกวนในตัวอย่างนมพร้อมดื่มจะเลือกทดสอบสารที่พบได้มากในตัวอย่างนมพร้อมดื่มทั้งหมด 8 ชนิด ดังนี้ กรดอะมิโนโพรลีน กรดอะมิโนกลูตามิค กรดอะมิโนไลซีน น้ำตาลกาแลกโทส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลแลคโตส กรดไลโนลีอิค แล้วจึงนำไปทำอนุพันธ์กับ TBA แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงของทั้งช่วงของอนุพันธ์จาก HMF และ อนุพันธ์จาก MDA ด้วยเครื่อง UV-Vis สเปคโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อทดสอบเบื้องต้นก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อไป

โดยผลการทดสอบพบว่า หลังจากผ่านขั้นการเตรียมอนุพันธ์ของสารรบกวนทั้ง 8 ชนิด กลับไม่พบสารละลายสีใดๆเกิดเลยในสารรบกวนทั้ง 8 ชนิด แม้ว่าจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วจึงค่อยนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงอีกครั้ง ซึ่งโครมาโทแกรมของสารละลายผสมของสารรบกวนทั้ง 8 ชนิดจะแสดงดังภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 22 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมของสารรบกวนทั้ง 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 nmol/ml

ข้อน่าสนใจคือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลกาแลกโทส ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของน้ำตาลแอลโดส (aldose) หรือ น้ำตาลที่มีหมู่อัลดีไฮด์ในโครงสร้างแต่กลับไม่เกิดอนุพันธ์สีเกิดขึ้นกับสารประกอบ TBA เหตุผลเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก โมเลกุลของน้ำตาลเหล่านี้ในสภาวะปกติจะไม่แสดงโครงสร้างเป็นโซ่เปิด (open-chain structure) แต่จะแสดงโครงสร้างเป็นวงของน้ำตาล (six-membered ring) โดยจะทำปฏิกิริยาการปิดวง ณ ตำแหน่งของหมู่อัลดีไฮด์หรือหมู่คีโตนเดิม ซึ่งทำให้น้ำตาลที่มีโครงสร้างเป็นวงจะมีความเสถียรกว่าโครงสร้างแบบโซ่เปิด ดังภาพประกอบ 23 จึงทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก ได้



ภาพประกอบ 23 ปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลกับหมู่อัลดีไฮด์ในการปิดวงของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคส

ที่มา : (2012). http://web.virginia.edu/Heidi/chapter7/chp7frameset.htm

ตอนที่ 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในผลิตภัณฑ์น้ำนมพร้อมดื่ม

เมื่อทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นแล้ว จึงได้นำวิธีการดังกล่าวไปประยุกต์ในการวัดปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในตัวอย่างนมพร้อมดื่ม ในการวิจัยนี้ได้จัดซื้อตัวอย่างนมพร้อมดื่มที่ได้จากการสำรวจตลาดโดยคัดเลือกนมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ มาจำนวน 3 ยี่ห้อ รวมถึงนมพร้อมดื่มแบบ UHT อีกจำนวน 1 ยี่ห้อ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาในตัวอย่างนมพร้อมดื่มที่มีรสแตกต่างกันทั้งหมด 5 รส ได้แก่ รสจืดแบบไขมันครบถ้วน รสจืดแบบพร่องไขมัน รสหวาน รสช็อคโกแลต และรสสตอเบอร์รี่ ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบผลของไขมัน ที่มีต่อปริมาณสารประกอบทั้งสอง และ เปรียบเทียบผลของรสนมตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์จะแสดงดังตาราง 6

ตาราง 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มชนิดพาสเจอร์ไรซ์

ตัวอย่างนมพร้อมดื่ม	รส	ปริมาณ HMF (µg/g) ± SD	ปริมาณ MDA (ng/g) ± SD
นมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ ยี่ห้อ A	รสจืดไขมันครบถ้วน	nd	3.99 ± 1.30
	รสจืดพร่องไขมัน	nd	2.04 ± 1.28
	รสหวาน	nd	3.74 ± 0.82
	รสช็อคโกแลต	0.39 ± 0.17	14.6 ± 0.77
	รสสตอเบอร์รี่	nd	3.86 ± 0.25
นมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ ยี่ห้อ B	รสจืดไขมันครบถ้วน	nd	4.08 ± 0.57
	รสจืดพร่องไขมัน	nd	6.30 ± 0.07
	รสหวาน	nd	3.79 ± 0.15
	รสช็อคโกแลต	0.44 ± 0.07	13.84 ± 0.73
	รสสตอเบอร์รี่	nd	5.58 ± 0.30
นมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรซ์ ยี่ห้อ C	รสจืดไขมันครบถ้วน	nd	3.81 ± 0.55
	รสจืดพร่องไขมัน	nd	17.7 ± 2.05
	รสหวาน	nd	4.21 ± 0.48
	รสช็อคโกแลต	0.42 ± 0.13	16.14 ± 1.39
	รสสตอเบอร์รี่	nd	4.61 ± 0.24
นมพร้อมดื่มแบบยูเอชที ยี่ห้อ A	รสจืดไขมันครบถ้วน	nd	3.81 ± 0.23
	รสจืดพร่องไขมัน	nd	17.7 ± 0.21
	รสหวาน	nd	4.21 ± 0.23
	รสช็อคโกแลต	0.42 ± 0.07	16.14 ± 2.63
	รสสตอเบอร์รี่	nd	4.61 ± 0.13

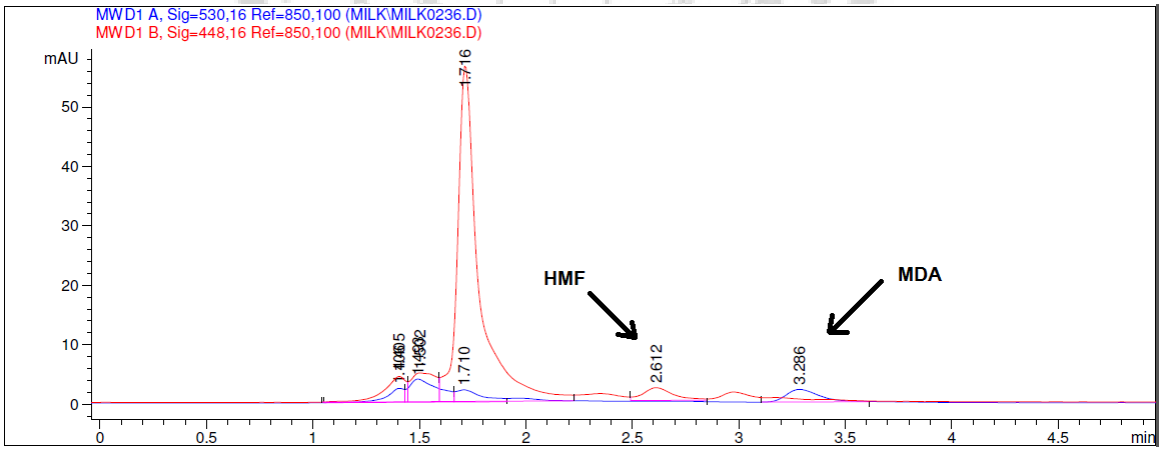
หมายเหตุ nd หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบสารด้วยวิธีที่ทดลองในงานวิจัยนี้

จากตารางที่ 6 เมื่อพิจารณาผลการทดลอง พบว่าปริมาณของสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มในแต่ล่ะยี่ห้อ มีปริมาณที่น้อยมาก อยู่ในช่วง 3.00 – 20.00 นาโนกรัมต่อกรัมตัวอย่าง โดยพบว่านมพร้อมดื่มตัวอย่างที่แต่งรสหวานและรสสตอเบอร์รี่จะมีปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในแต่ละยี่ห้อน้อยรสชาติอื่นๆ แต่ในตัวอย่างนมรสช็อคโกแลตจะมีปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในแต่ละยี่ห้อมากที่สุด แต่สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ พบว่า ไม่สามารถตรวจพบได้ในนมพร้อมดื่มเกือบทุกรส ยกเว้นในตัวอย่างที่เป็นรส

ช็อคโกแลตที่จะพบสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ทุกยี่ห้อ เหตุผลในการตรวจพบปริมาณสารทั้งสองในตัวอย่างนมรสช็อคโกแลตทุกยี่ห้อ อาจเป็นผลจากผงโกโก้ที่มีการปรุงแต่งในระหว่างกระบวนการแปรรูปน้ำนม อย่างไรก็ตามพบว่ามีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์เกี่ยวกับผงโกโก้กับปริมาณของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ (Teresa. 2009: 147–152) เพราะในขั้นตอนการผลิตผงโกโก้จำเป็นต้องคั่วเมล็ดโกโก้จนได้สีน้ำตาลและกลิ่นที่เฉพาะเจาะจงจากปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล

เมื่อนำตัวอย่างนมแบบชนิดสเตอริไรส์มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ พบว่าในตัวอย่างนมแบบชนิดสเตอริไรส์มีปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ เท่ากับ 26.43 ng/g และ 22.54 µg/g ตามลำดับ โดยพบสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ในปริมาณที่สูงกว่านมพร้อมดื่มแบบพาสเจอร์ไรส์และยูเอชที ทั้งนี้อาจเป็นผลจากปัจจัยของความร้อนและระยะเวลาในการเก็บที่มีผลต่อการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ (Van. 1998: 403–414) ถึงแม้การเก็บรักษานมแบบพาสเจอร์ไรซ์และยูเอชทีจะให้ความร้อนในการฆ่าเชื้อที่สูงแต่ใช้เวลาอันสั้น จึงไม่ส่งผลให้เกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์มากเมื่อเทียบกับการให้ความร้อนในการฆ่าเชื้อที่สูงและเวลายาวนานในกระบวนการเก็บรักษาแบบชนิดสเตอริไรส์ ดังนั้นจึงอาจส่งผลทำให้ผลการวิเคราะห์พบปริมาณสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์มากกว่าการเก็บรักษาแบบอื่นๆ

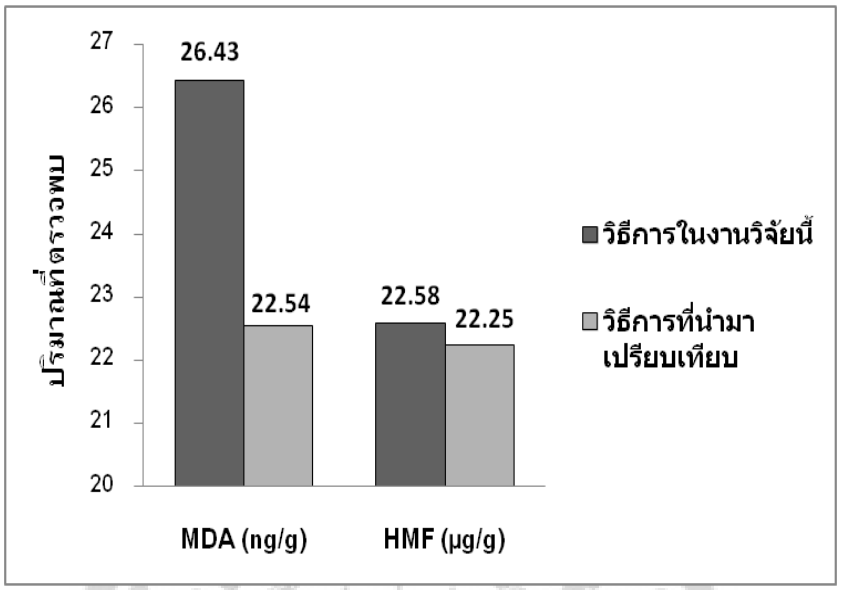
โดยตัวอย่างโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งสองในตัวอย่างนมที่เก็บรักษาแบบชนิดสเตอริไรส์ แสดงในภาพประกอบ 24



ภาพประกอบ 24 โครมาโทแกรมในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มชนิดสเตอริไรส์

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับวิธีอื่นที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ โดยในวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ จะใช้วิธีของ Fenaille ในปี 2001 และการวิเคราะห์ปริมาณของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิว

ราลดีไฮด์ จะใช้วิธีของ Jorge ในปี 2005 และใช้ตัวอย่างนมสเตอริไรส์มาใช้ในการทดสอบ ซึ่งผลการเปรียบเทียบจะแสดงดังภาพประกอบ 25



ภาพประกอบ 25 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีการอื่นๆที่นิยมในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ โดยสารประกอบทั้งสองชนิดนี้เป็นปัจจัยหนึ่งของการเกิดโรคมะเร็ง ซึ่งงานวิจัยนี้จึงได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ขึ้นพร้อมกัน โดยการศึกษาออกเป็นสองส่วนได้แก่ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมรวมถึงประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น และการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบทั้ง 2 ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มที่มีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด ชนิดพาสเจอร์ไรซ์ยูเอชที ทั้งแบบไขมันครบถ้วนและพร่องไขมัน นอกจากนี้ยังได้ทดลองตรวจหาปริมาณสารทั้งสองในน้ำนมพร้อมดื่มที่มีการปรุงแต่งรสชาติ

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัย สรุปผลได้ดังนี้

1. งานวิจัยนี้ได้สนใจที่จะวิเคราะห์สารประกอบอัลดีไฮด์ 2 ชนิด ได้แก่ สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์เป็นผลิตผลที่เกิดจากปฏิกิริยาลิปิดออกซิเดชัน ส่วนสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เป็นผลิตผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล ประเภทไม่ใช้เอนไซม์ ที่ ทราบในนามของปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลน้ำตาล กับ หมู่เอมีนในกรดอะมิโน

หลักการสำคัญการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน คือ การเตรียมสารอนุพันธ์ ซึ่งอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารประกอบที่สามารถสร้างอนุพันธ์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู่อัลดีไฮด์ โดยสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นต้องมีสามารถดูดกลืนคลื่นแสงช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลได้แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกสัญญาณการตรวจวัดของอนุพันธ์ของสารทั้งสอง

สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์เมื่อทำปฏิกิริยากับ กรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก จะให้สารอนุพันธ์ที่มีสีชมพู มีหมู่โครโมฟอร์ (chromophore)ในสารอนุพันธ์นี้ ทำให้สารอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์ดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดในช่วงคลื่นวิสิเบิลที่ 530 nm สำหรับสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์เมื่อทำปฏิกิริยากับกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก จะให้อนุพันธ์ที่มีสีเหลือง มีหมู่โครโมฟอร์ในสารอนุพันธ์นี้ ทำให้สารอนุพันธ์ของสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์สามารถดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดในช่วงคลื่นวิสิเบิลที่ 480 nm ซึ่งเมื่อผสมอนุพันธ์ทั้งสองเข้าด้วยกันจะได้สารละลายที่มีสีส้ม แต่อย่างไรก็ตามค่าความยาวคลื่นที่สารอนุพันธ์ทั้งสองแสดงความสามารถในการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดมีความแตกต่างกันมาก จึงทำให้สามารถแยกอนุพันธ์ทั้งสองออกจากกันได้ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

2.การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกัน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่

2.1 วัฏภาคเคลื่อนที่ใช้เมทานอลต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5)

2.2 ควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์คือ 25°C

2.4 ระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์นาน 150 นาที

2.5 ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ คือ กรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก ที่เหมาะสมคือ 40mM

2.6 การติดตามการเกิดและการแยกสารอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์ ด้วยตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm สำหรับสารอนุพันธ์ของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 480 nm

จากสภาวะข้างต้นดังกล่าวสามารถทำการแยกอนุพันธ์ของสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์และสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยมีระยะเวลารีเทนชันประมาณ 2.6 และ 3.4 นาทีตามลำดับ ซึ่งทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์สารทั้งสองได้ในเวลาเพียง 5 นาที ต่อหนึ่งตัวอย่าง

3. จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์พบว่าอนุพันธ์ที่ได้จากสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์มีความเสถียรต่อการได้รับความร้อนสูงที่มากกว่าอนุพันธ์ที่ได้จากสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ซึ่งพบว่ามีการสลายตัวอันเนื่องมาจากผลของการได้รับความร้อนสูง โดยเมื่อใช้ความร้อนที่สูงมากกว่า 80°C อนุพันธ์ของสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์จะสลายตัวไปจนหมด

4. สารชีวโมเลกุลส่วนใหญ่ที่พบในตัวอย่างอาหาร ได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโน น้ำตาล และกรดไขมัน ไม่ส่งผลรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมกับกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก แม้จะมีหมู่อัลดีไฮด์ในโครงสร้างก็ตาม เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแล็กโทส เหตุผลเนื่องจากกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริกจะเกิดอนุพันธ์ที่เฉพาะเจาะจงกับสารประกอบอัลดีไฮด์ที่มีโครงสร้างแบบโซ่เปิดเท่านั้น โดยทั้งสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ต่างก็มีโครงสร้างของหมู่อัลดีไฮด์ที่เป็นโซ่เปิด นอกจากนี้ยังมีอัลดีไฮด์อีกหลายชนิดที่สามารถเกิดอนุพันธ์ร่วมกับกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก ได้เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น 2-ฟิวรัลดีไฮด์ (2-furaldehyde) 5- เมทิล-2-ฟิวรัลดีไฮด์ (5-methyl-2-furaldehyde) เป็นต้น

5. ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มที่มีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลอด พบว่ามีปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์อยู่ในช่วง 2.0 ถึง 20.0 นาโนกรัมต่อกรัมของตัวอย่างนมพร้อมดื่ม และสำหรับสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง 0.0-0.5 ไมโครกรัมต่อกรัมของตัวอย่างนมพร้อมดื่ม ซึ่งแต่ละประเทศจะมีข้อกำหนดปริมาณสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในอาหารที่แตกต่างกัน โดยมักจะอยู่ในช่วงที่ไม่เกิน 40 ไมโครกรัมต่อกรัม จนถึง 80 ไมโครกรัมต่อกรัม ในบางประเทศ

6. ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม พบว่าปริมาณของทั้งสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ขึ้นอยู่กับกระบวนในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์และการเจือปนของสารปรุงแต่งรสกลิ่นในผลิตภัณฑ์ เช่น ผงกาแฟ ผงโกโก้ หรือน้ำผึ้ง ก็มีผลทำให้สามารถตรวจพบสารประกอบทั้งสองในตัวอย่างนมพร้อมดื่มได้มากขึ้น

7. วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จัดว่าเป็น วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ได้พร้อมกันด้วยเทคนิคการเตรียมสารอนุพันธ์และแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ตรวจสอบในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม จัดว่ามีความสะดวก ไม่ซับซ้อน ค่าใช้จ่ายต่ำ และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย แต่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ใกล้เคียงกับการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ชั้นสูง โดยพบว่ามีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของมาลอนไดอัลดีไฮด์มีค่า 0.009 nmol/ml และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ของมาลอนไดอัลดีไฮด์มีค่า 0.07 nmol/ml ส่วนการตรวจหาปริมาณ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์พบว่า ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้มีค่า 0.31 nmol/ml และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้มีค่า 2.38 nmol/ml

ข้อเสนอแนะ

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกันในตัวอย่างนมพร้อมดื่มไม่ควรเก็บสารละลายมาตรฐานของสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ให้นานเกิน 1 สัปดาห์ เนื่องจากสารประกอบทั้งสองชนิดนี้ มีความเสถียรต่ำและสลายตัวได้ง่ายจะทำให้เกิดการวิเคราะห์คลาดเคลื่อน

2. สารละลายบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้ในการตัวทำละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ ควรเตรียมจากสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยสามารถเลือกใช้ได้ทั้งโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์และโพแทสเซียม

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เนื่องจากมีความสามารถในการควบคุมค่า pH ในช่วง 5 - 8 ได้ดี สำหรับความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้จำเป็นต้องคำนึงถึงความสามารถในการควบคุม pH เป็นสำคัญ โดยช่วงความเข้มข้นที่นิยมใช้ได้แก่ 10 มิลลิโมลาร์ จนถึง 50 มิลลิโมลาร์ โดยในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์สารประกอบทั้งสองในความเข้มข้นระดับต่ำ จึงเลือกใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงแค่ 10 มิลลิโมลาร์ ก็เพียงพอต่อการควบคุมค่า pH แล้ว อีกทั้งการเลือกช่วงความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่สูงนั้น อาจจะส่งผลกระทบกับระบบภายในของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงได้ โดยจะกลายเป็นผลึกเกลือฟอสเฟตที่แข็งและคม ซึ่งอาจจะไปเกิดการขีดข่วนและอุดตันภายในระบบของเครื่องมือ

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์และสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์พร้อมกันนี้ สามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารและตัวอย่างทางชีวภาพอื่นๆได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ประดิษฐ์ รังสฤษฏ์กุล. (2518). *อุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์.

วรรณา ตั้งเจริญชัย; และ วิบูลย์ศักดิ์ กาวิละ. (2531). *อุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2549). *เคมีอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. (2547). *เคมีอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

วรรณา ตุลยธัญ. (2549). *เคมีอาหารของคาร์โบไฮเดรต*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิวาพร ศิวเวชช. (2546). *วัตถุเจือปนอาหาร เล่ม 1*. นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.

สุธาสินี บุญเชียงมา; และคนอื่นๆ. (2550). *การวิเคราะห์เชิงปริมาณของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลในน้ำผึ้ง*. ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 33(วทท. 33). นครศรีธรรมราช: สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์และมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

สุภาภรณ์ ครัดทัพ ฮาร์เวล. (2550). *การคำนวณขั้นพื้นฐานสำหรับเคมีวิเคราะห์*. เชียงใหม่: สถานบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (สวท.-มช.) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อมรรัตน์ จงสวัสดิ์วรกูล; และคนอื่นๆ. (2545). Evidence-based Maillard reaction: focusing on parenteral nutrition, *วารสารโภชนบำบัด*, ปีที่ 13(1) : 3-11.

Alcazar, A. Jurado, J. Pablos, F. Gonzalez, A. Martin, M. (2006). HPLC determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in alcoholic beverages. *J. Microchemical.* 82: 22-28.

Agarwal, R. & Chase, S.D. (2002). Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. 775: 121-126.

Akul, M. (2011). Principle ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy. *Analytical chemistry*.

Arya, S.S. & Ninnala, N. (1971). Determination of free malonaldehyde in vegetable oils. *J. Food Sci. Technol*. 8: 144-180.

Barry, H. (2000). Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?. *Cardiovasc. Res*. 47: 410-418.

Barry, N., et al. (1980). Effects of flow rate and eluant composition on the high performance liquid chromatography of proteins. *J. Liquid Chromatography. 3*: 1373-1383.

Braddock, R.J. & Petrus, D.R. (1971). Malonaldehyde in aqueous orange juice essences. *J. Food Sci*. 36: 1095-1097.

Burt, J. et al. (1991). Carcinogenicity of acetaldehyde and malonaldehyde, and mutagenicity of related low-molecular-weight aldehydes. *Niosh.* Publication number: 91-112

Candan, N. & Tuzmena, N. (2008) Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *NeuroToxicology*. 29: 708-713.

Ceconi, C., et al. (2003). Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact?. *Arch. Biochem. Biophys*. 420: 217-221.

Chirico, S. (1994). High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods Enzymol*. 233: 314-318.

Chow, L., & Watts, B.M. (1969). Origin of off-odors in frozen green beans. *Food Technol*. 23: 973-974.

Daniele, D.R. Amanda, J.S. Nicoletta, P. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases.* 15: 316–328.

Davì, G. Falco, A. Patrono, C. (2005). Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid. Redox. Signal.* 1-2: 256-68.

Dills Js WL. Protein fructosylations: fructosylation: fructose and the Maillard reation. *J. Cli.n Nutr*. 1993:58(suppl): S779-87.

Dongmao, Z. (2010). Ultrasensitive detection of malondialdehyde with surface-enhanced raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 398: 3193-3201

Doureradjou, P. & Koner, B. (2008). Effect of different cooking vessels on heat induced lipid peroxidation of different edible oils. *Journal of Food Biochemistry*. 32(6): 740-751

Downey, W.K. (1969). Lipid oxidation as a source of off-flavor development during the storage of dairy products. *J. Soc. Dairy Technol*. 22: 154-162.

Fayle, S.E. & Gerrard, J.A. (2002). *The Maillard reaction*. Royal society of chemistry. Cambridge. 2002. 5-18.

Fenaille, F. Mottier, P. Turesky, R.J. Ali, S. Guy, P.A. (2001). Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *J Chromatogr A*. 2: 237-45.

Girisuta, B. Janssen, L. P. B. M. Heeres, H. J. (2006). A kinetic study on the decomposition of 5-hydroxymethylfurfural into levulinic acid. *Green Chemistry*. 8: 701-709.

Gokmen, Vural.; & Acar, Jale. (1999). Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid Chromatography. *J. Chromatography A*. 847: 69-74.

Helmut, H. (1986). Formation and polymerisation of malonaldehyde during irradiation of aqueous solutions of d-glucose and lactose with ultrasound. *Carbohydrate Research*. 54: 37–48.

Holland, D.C. (1971). Determination of malonaldehyde as an index of rancidity in nut meats. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem*. 54: 1024-1026.

Huppertz, T,; & Kelly, A.L. (2009). *Milk processing and quality management*. First edition. Blackwell Publishing Ltd. 23.

James, R.M.; & Steven, A. (2005). Antioxidant metabolism in cotton seedlings exposed to temperature stress in the field crop. *Physiology & metabolism*. 23: 2337-2345.

Jaroslaw, L. (2001). Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethylfurfural and its derivatives. *ARKIVOC*. (i): 17-54.

Jolley, R.,et al. (1974). Oxytyrosinase. *J. Biol. Chem.* 249: 335.

Jorge, L. et al. (2005). Analysis of potential and free furfural compounds in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography evolution during storage. *J. Chromatography A*. 1076: 133–140.

Khalil, M.I., et al. (2010). High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food Chemical Toxicology*. 48: 2388-2392.

Karatas, F., et al. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem*. 311: 76-79.

Koning, A.M. & Silk, M.H. (1963). The 2-thiobarbituric acid reagent for determination of oxidative rancidity in fish oils, *J. Am. Oil Chemists Soc*. 40: 167-169.

Kosugi, H., Kato, T., & Kikugawa, K. (1987) Formation of yellow, orange, and red pigments in the reaction of alk-2-enals with 2-thio-barbituric acid. *Anal. Biochem*., 165: 456-464.

Kurkhanova, V.M.; & Onekhova, N.V. (1971). Determination of thiobarbituric acid number in fish meat. *Issled Technol*. Ryb: 73-78.

Largillière, C., & Serge, B.M. (2004). Free malondialdehyde determination in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 170: 123-126.

Laura, J., et al. (2003). Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells, *The journal of biological chemistry*. 278: 31426–31433.

Lawrence, J.M. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 21: 361-370.

Lawrence, J.M. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*. 181-182: 219-222.

Lawrence, J.M., et al. (1979). Studies of the hydrolysis of ^{14}C-labeled tetraethoxy-propane to malondialdehyde. *Analytical Biochemistry*. 99: 458–463.

Let, M.B. Jacobsen, C. Meyer, A.S. (2007). Lipid oxidation in milk, yoghurt, and salad dressing enriched with neat fish oil or pre-emulsified fish oil. *J. Agric. Food. Chem.* 55: 7802-7809.

Maillard, L. (1912). Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoïdines par voie méthodique. *Compte-rendu de l'Académie des sciences.* 154: 66-68.

Marian, C. Jan, K. Milan, M. (2011). The simple and sensitive measurement of malondialdehyde in selected specimens of biological origin and some feed by reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatography B.* 879: 2251-2258.

Nair V., O'Neil C.L. and Wang P.G. (2008). "Malondialdehyde" Encyclopedia of reagents for organic synthesis. Jon Wiley and Sons, New York. 1.

Niedernhofer, L.J. Daniels, J.S. Rouzer, C.A. Greene, R.E. Marnett, L.J. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. J. Biol. Chem. 278: 31426–31433.

Nozal, Maria J.; et al. (2001). High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *J. Chromatography A*. 917: 95-103.

Ferrer, E. Alegría, A. Courtois, G. Farré, R. (2000). High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. *J. Chromatography A*. 881: 599-606

Patton, S., & Kurtz, G.W. (1951). 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk-fat oxidation. *J. Dairy Sci*. 34: 669-674.

Romieu, I., et al. (2006). Malonaldehyde in exhaled breath and air pollution exposure in asthmatic children exposed. *Epidemiology*. 17: S302.

Russo, C. Olivieri, O. Girelli, D. Faccini, G. Zenari, ML. Lombardi, S. Corrocher, R. (1998). Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J. Hypertens.* 16: 1267-71.

Sim, A.S., et al. (2003). Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. 785: 337-344.

Spano, Nadia.; et al. (2006). An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey. *Talanta*. 68: 1390-1395.

Steghens, J.P., et al. (2001). Diaminonaphthalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Radic. Biol. Med*. 31: 242-249.

Teresa, O. Edoardo, C. Bettina, C. Vincenzo, F. (2009). Influence of roasting on the antioxidant activity and HMF formation of a cocoa bean model systems. *J. Agric. Food Chem.* 57: 147–152.

Trivella, A. Coussan, S. Chiavassa, T. (2008). Malonaldehyde Synthesis. *Synthetic Communications.* 38: 3285-3290.

Uchida, K. (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases, *Free Radic. Biol. Med*. 28: 1685-1696.

Van, B. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*. 62: 403–414.

Wang, M. Dhingra, K. Hittelman, W.N. Liehr, J.G. Andrade, M. Li, D. (1996). *Cancer. Epidemiol. Biomarkers.* 5: 705.

Wilson, D.W., et al. (1997). Direct method for quantification of free malondialdehyde with high-performance capillary electrophoresis in biological samples. *Clin. Chem.* 43: 1982-1984.

Wong, D.W.S. (1989). *Mechanism and theory in food chemistry.* New York: Van Nostrand Reinhold.

Yagi, K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med*. 15: 212-216.

Yahya, M.D., et al. (1996) Antibodies against Malondialdehyde (MDA) in MRL/ lpr / lpr mice: evidence for an autoimmune mechanism Involving lipidp. *J. Autoimmunity*. 9: 3-9.

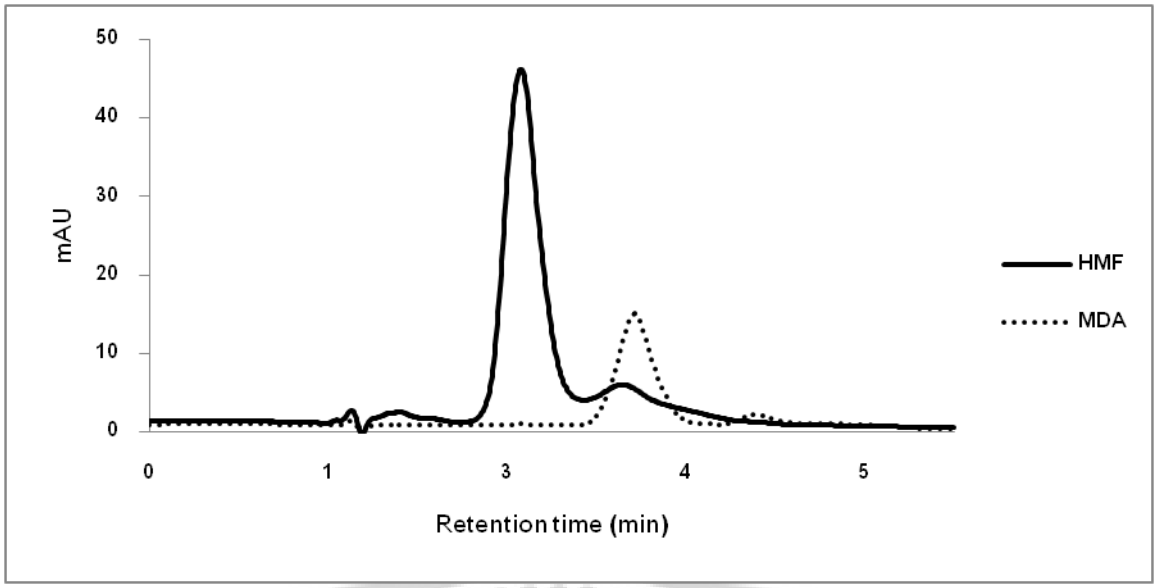
Yusuf, Y. & Toledo, Romeo. (2005). Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chem.* 93: 273–278.

Zervalaki. P, Culturing. B, Attiki, C. (2001). The effect of heating on honey hmf and invertase. *Canadian Institute Of Food Science And Technology Journal* . 36: 1977-1979.

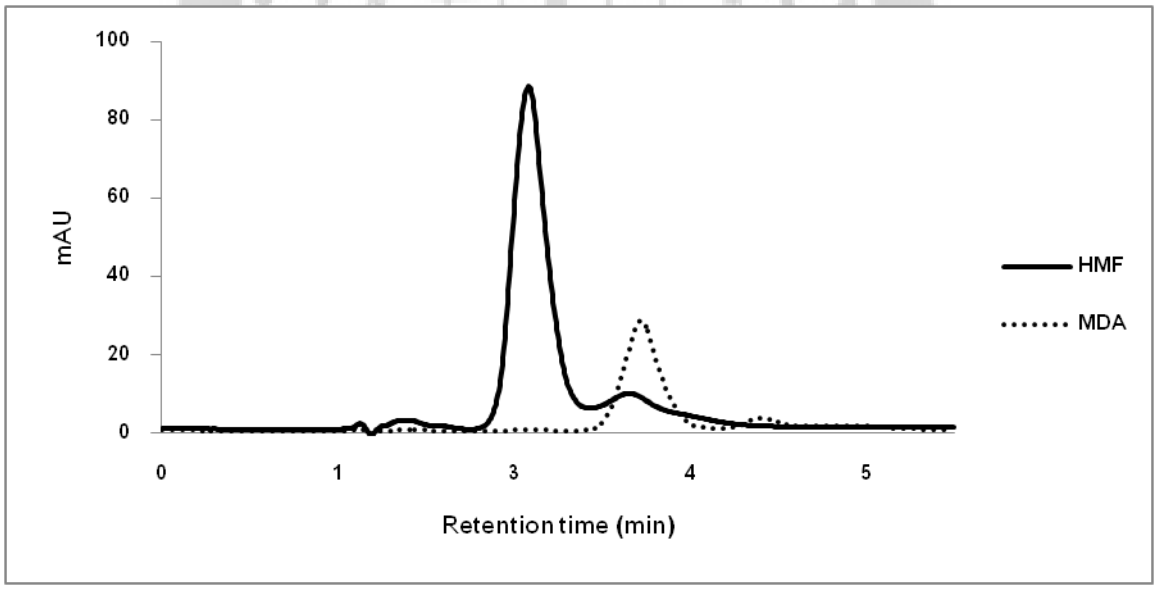
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

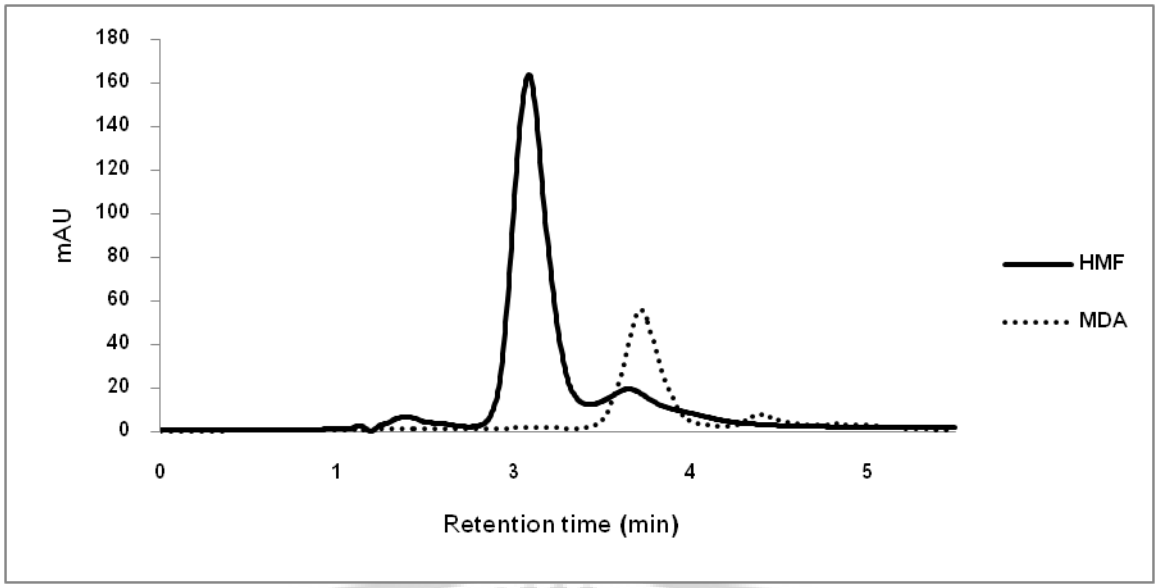
โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและตัวอย่าง



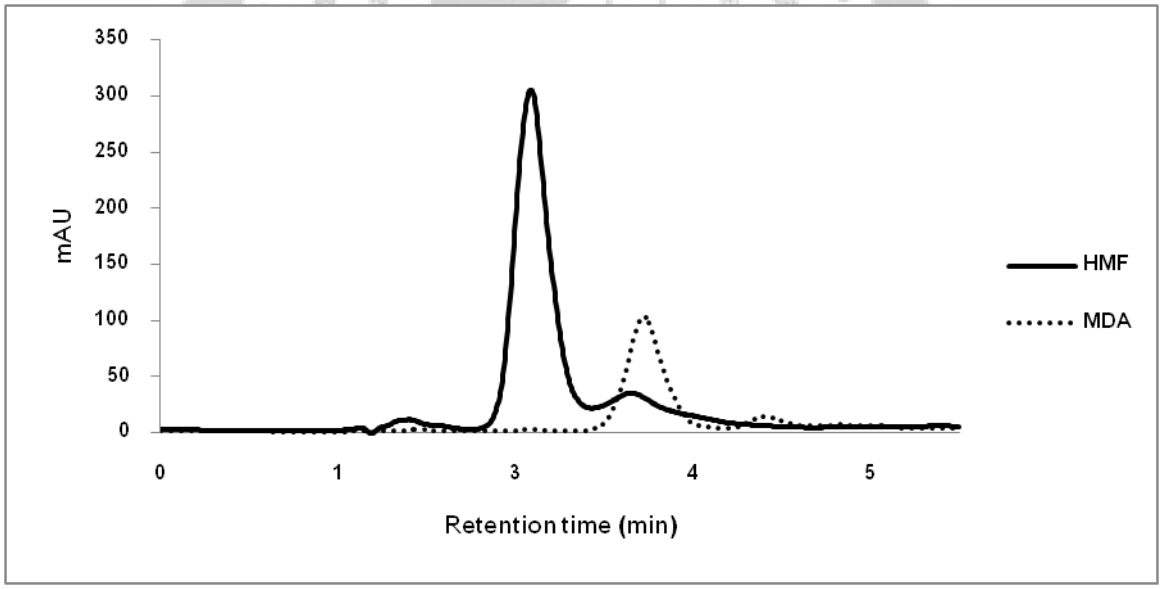
ภาพประกอบ 26 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 5 nmol/ml และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ความเข้มข้น 40 nmol/ml



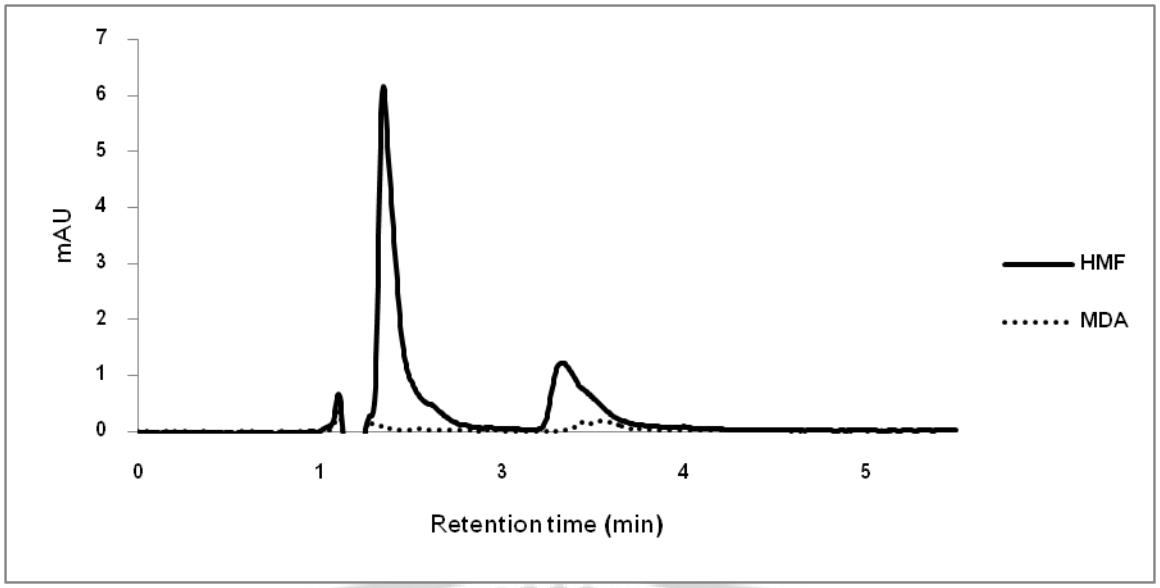
ภาพประกอบ 27 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 10 nmol/ml และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ความเข้มข้น 80 nmol/ml



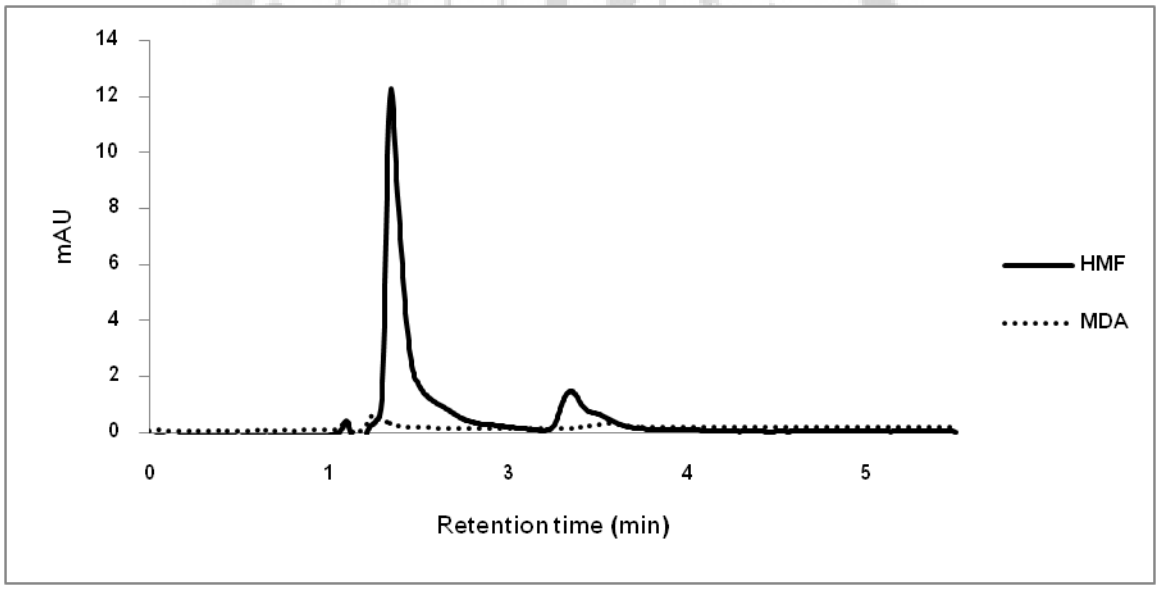
ภาพประกอบ 28 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 20 nmol/ml และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ความเข้มข้น 160 nmol/ml



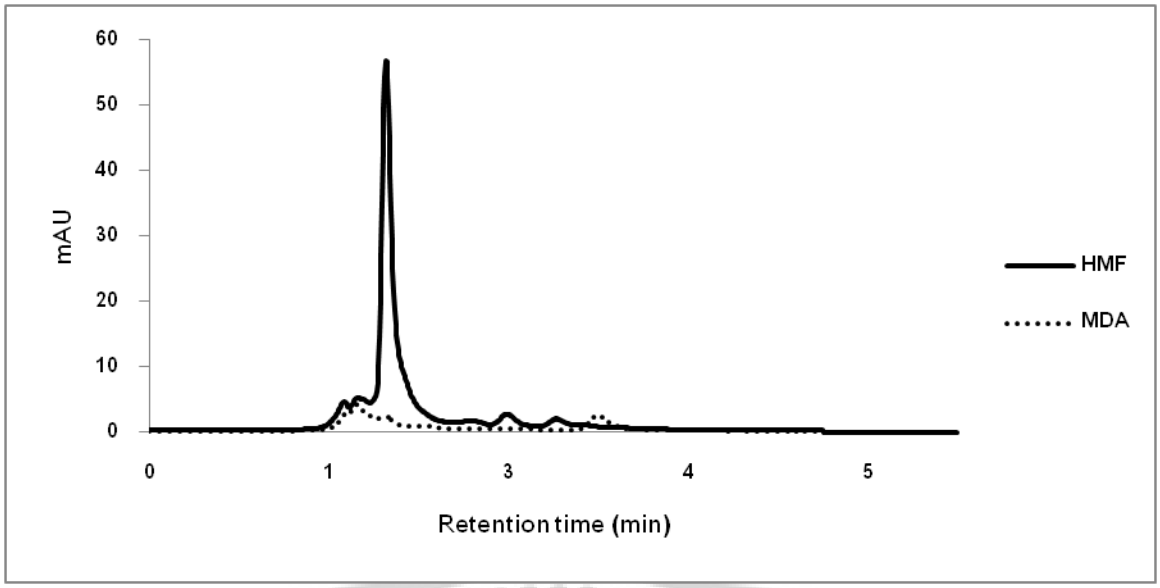
ภาพประกอบ 29 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 40 nmol/ml และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ความเข้มข้น 320 nmol/ml



ภาพประกอบ 30 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ รสจืด



ภาพประกอบ 31 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมยูเอชที รสจืด



ภาพประกอบ 32 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมสเตอริไรส์ รสจืด

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์

ปิเปต 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) ปริมาตร 2.474 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย 1% กรดไฮโรคลอริกจนครบปริมาตร 100 ml นำสารละลายที่เตรียมได้เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีเหลืองของมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 100 µmol/ml แล้วปิเปตสารละลายของมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ได้ 0.1 ml ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน จนครบปริมาตรจะได้สารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้น 100 nmol/ml

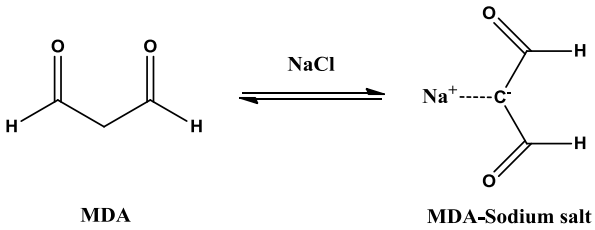
2. สารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

ชั่งสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ 0.01 g ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐาน 5-hydroxymethyl-furfural ความเข้มข้น 100 ppm เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้น

3. สารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก

ชั่งกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก 0.5884 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 ml แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 40 ml แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 80ºC คนจนกว่ากรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก ละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนจนครบปริมาตร จะได้สารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทูริก ความเข้มข้น 40 mM

สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์บริสุทธิ์จะมีความเสถียรต่ำมากและมักจะตกตะกอนได้ กับเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Helmut. 1986: 37–48) ดังภาพประกอบที่ 33

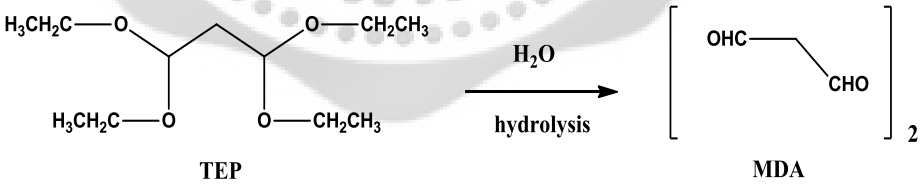


MDA MDA-Sodium salt

ภาพประกอบ 33 แสดงการตกตะกอนของสารประกอบ MDA ในรูปของเกลือโซเดียม

ที่มา : Helmut H. (1986). *Formation and polymerisation of malonaldehyde during irradiation of aqueous solutions of d-glucose and lactose with ultrasound*. pp. 37–48.

สารมาลอนไดอัลดีไฮด์สลายตัวได้ง่ายในอากาศ นอกจากนี้มาลอนไดอัลดีไฮด์ยังมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นๆได้ (Burt. 1991: 91-112) จึงเป็นเหตุผลให้ไม่มีสารมาตรฐานบริสุทธิ์ที่อยู่ในรูปของมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยตรง ดังนั้นการนำสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ มาใช้ในการทดลองนี้ ต้องอาศัยการเตรียม จากสารประกอบ 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (TMP) หรือสารประกอบ 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) โดยการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ในสารละลายกรด จะได้สารมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยให้ผลผลิตสุทธิอยู่ที่ 80% (Lawrence. 1979: 458–463) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 34



TEP MDA

ภาพประกอบ 34 การสังเคราะห์มาลอนไดอัลดีไฮด์ จาก TEP โดยปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส

ที่มา : Nair V. (2008). *"Malondialdehyde" Encyclopedia of reagents for organic synthesis*. Jon Wiley and Sons, New York. p. 1.

โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของการเตรียมสารมาตรฐาน มาลอนไดอัลดีไฮด์จาก TEP ด้วยทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1% โดยทำการศึกษาที่กับ TEP ความเข้มข้น 1000 nmol/ml จำนวน 10 ตัวอย่าง หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 472 nm ด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์เพื่อ

เปรียบเทียบความแม่นยำที่ได้จากการสังเคราะห์มาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยผลจากการทดสอบจากแสดงในภาพประกอบที่ 35

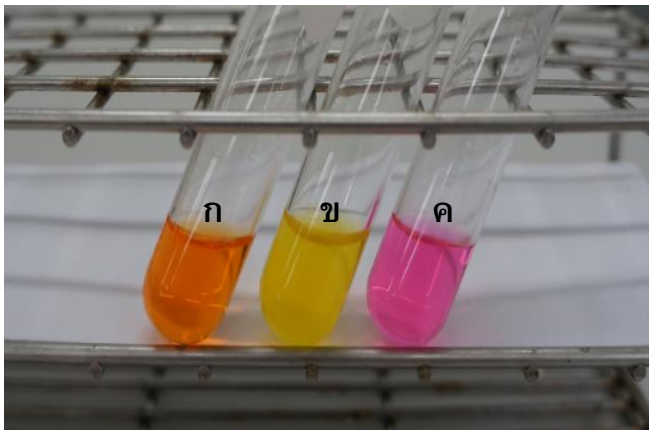
Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL472.0	Wgt.Factor
1	1	Standard		10.000	0.116	1.000
2	2	Standard		10.000	0.110	1.000
3	3	Standard		10.000	0.097	1.000
4	4	Standard		10.000	0.109	1.000
5	5	Standard		10.000	0.111	1.000
6	6	Standard		10.000	0.099	1.000
7	7	Standard		10.000	0.104	1.000
8	8	Standard		10.000	0.102	1.000
9	9	Standard		10.000	0.104	1.000
10	10	Standard		10.000	0.092	1.000

ภาพประกอบ 35 ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดของสารละลายมาลอนไดอัลดีไฮด์

ในภาพประกอบที่ 35 พบว่า ประสิทธิภาพในการเตรียมมาลอนไดอัลดีไฮด์ จากผลของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารประกอบ TEP ให้ค่าของ %RSD อยู่เท่ากับ 6.95%

ภาคผนวก ค
รูปสารละลายอนุพันธ์ เครื่องมือ และอุปกรณ์



ภาพประกอบ 36 สีของสารอนุพันธุ์ที่เกิดขึ้น

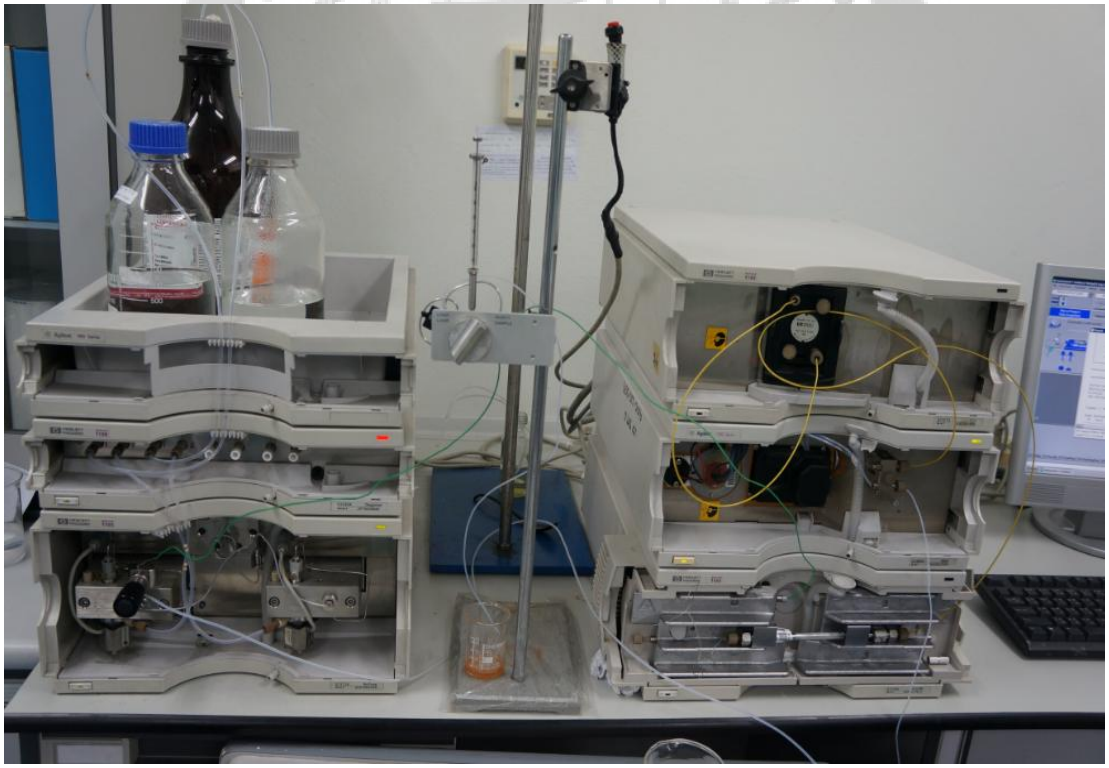
ก แทน สารละลายสีส้มของอนุพันธุ์ผสมที่เกิดจากสารมาตรฐานของมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ กับ สารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทุริก

ข แทน สารละลายสีเหลืองของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ กับ สารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทุริก

ค แทน สารละลายสีชมพูของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับ สารละลายกรด 2-ไทโอบาร์บิทุริก

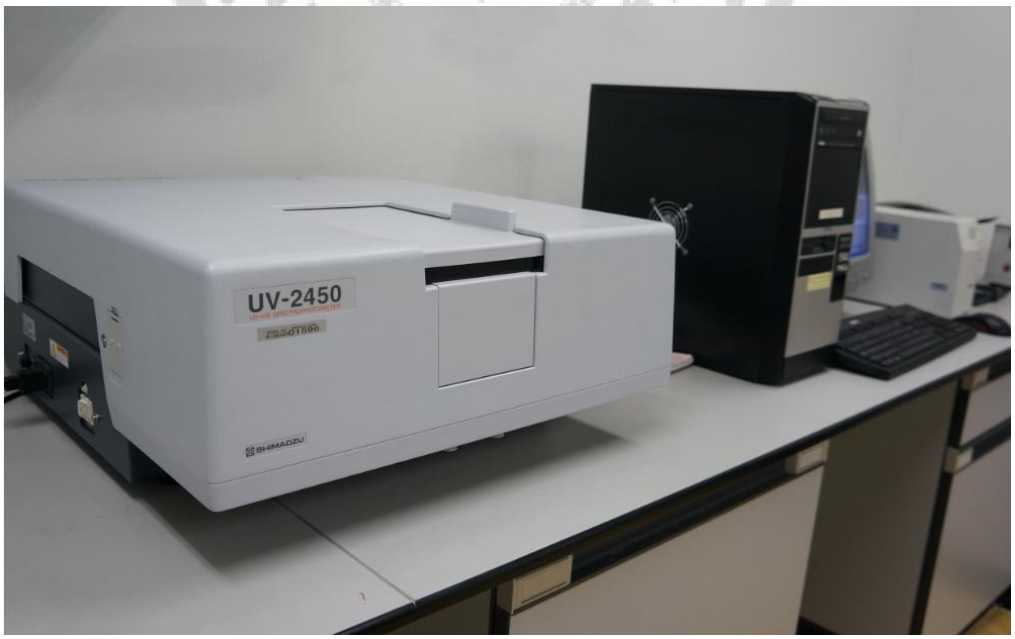
ภาพประกอบ 37 เครื่องอังไอน้ำที่สามารถควบคุมอุณภูมิได้ใช้ในการให้ความร้อนในการเตรียมอนุพันธ์

ภาพประกอบ 38 ชุดกรองที่ใช้ในการกรองสารมาตรฐานและสารตัวอย่างก่อนนำไปฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



ภาพประกอบ 39 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ภาพประกอบ 40 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน



ภาพประกอบ 41 เครื่องยูวี วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายจตุรงค์ จงเจริญ
วันเดือนปีเกิด	8 ธันวาคม พ.ศ. 2530
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลบำราษฎร์นราดูร นนทบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 60 หมู่ 3 ตำบลสวนพริกไทย อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2548	จากโรงเรียนดอนเมืองจาตุรจินดา เขตดอนเมือง กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2551	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2555	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร