การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในนมถั่วเหลืองตัวอย่างด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์
ของ
อำนาจ กะฐินเทศ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
เมษายน 2556
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในนมถั่วเหลืองตัวอย่างด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์
ของ
อำนาจ กะฐินเทศ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
เมษายน 2556

การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในนมถั่วเหลืองตัวอย่างด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

บทคัดย่อ

ของ

อำนาจ กะฐินเทศ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
เมษายน 2556

อำนาจ กะฐินเทศ . (2553). *การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในนมถั่วเหลืองตัวอย่าง ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง* . ปริญญานิพนธ์ วท .ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ด ร. พรพิมล ม่วงไทย , ดร. นวลละออ รัตนวิมานวงศ์ , ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ.

มาลอนไดอัลดีไฮด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน สารนี้ทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคมะเร็ ง โรคพาร์กินสัน และ บอกถึงการเสื่อมของคุณค่าทางโภชนาการข องอาหารในระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในน้ำนมถั่วเหลือง ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยได้เตรียมสารอนุพันธ์ ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) กับกรดไทโอบาร์บิทูริก (TBA) และ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน (DNPH) ทำการแยกและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพของวิ ธีการวิเคราะห์และทำการตรวจหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่จำหน่ายตามซุปเปอร์มาร์เก็ต ผลการศึกษาพบว่าในการเตรียมสารอนุพันธ์ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับกรดไทโอบาร์บิทูริกในสภาวะกรด ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และการเตรียมสารอนุพันธ์ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ใช้ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการแยกและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าวิธี MDA-TBA ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ต่อเมธานอล อัตราส่วนร้อยละ 60:40 และ pH 6.8 และวิธี MDA-DNPH จะใช้อะซิโตไนทริลต่อน้ำ ที่อัตราส่วน 55:45 สำหรับการ ศึกษาประสิทธิภาพวิธีการทดลองพบว่าวิธี MDA-TBA ให้ค่าขีดจำกัดล่าง ของการวิเคราะห์ 0.01 ไมโครโมลาร์ และร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 100-105 วิธี MDA-DNPH ให้ค่าขีดจำกัดล่างของการวิเคราะห์ 0.72 ไมโครโมลาร์ ร้อยละการกลับคืน 96-102 การศึกษาสารรบกวนได้แก่ กรดปาล์มมิติ ก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส และ น้ำตาลซูโครส ในการเกิดอนุพันธ์ พบว่ากรดลิโนเลอิก ส่งผลต่อการวิเคราะห์เท่านั้น ผลการตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดี ไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง จะพบมาลอนไดอัลดีไฮด์ในปริมาณ 0.3331-0.6754 ไมโครโมลาร์

COMPARATIVE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD ON QUANTITATIVE ANALYSIS OF MALONDIALDEHYDE IN SOYBEAN MILK SAMPLES

AN ABSTRACT

BY

AMNAJ KATINTET

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

April 2013

Amnaj Katintet. (2013). *Comparative high performance liquid chromatography method on quantitative analysis of malondialdehyde in soybean milk samples.* Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Associate Professor Dr. Pornpimol Muangthai, Dr. Nuanlaor Ratanavimanwong, Dr. Piyada Jittangprasert.

Malondialdehyde is a products from lipid peroxidation reaction. It related to many symptoms such as diabetes, cancer and parkinson's disease. In food industry, malondialdehyde effects on a quality deterioration during storage of lipid-rich food. In this work, the optimization method for malondialdehyde analysis by high performance liquid chromatography was studied by formation of derivertised products between malondialdehyde (MDA) with 2-thiobarbituric acid (TBA) and 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH). Then the efficiency of the method was also studied. The malondialdehyde contents were also analysed in soybean milk samples that sold in supermarket. The results showed that the optimization method for malondialdehyde analysis was to perform derivertised products between malondialdehyde and 2-thiobarbituric acid in acid medium by heating at 80^{o}C, 60 minutes. The derivertisation between malondialdehyde and 2,4-dinitrophenyl hydrazine was performed by heating at 60^{o}C, 10 minutes. Then those derivertised products were analysed using high performance liquid chromatography. The optimum conditions showed that ratio between phosphate buffer (pH 6.8) and methanol was 60:40 (v/v) for MDA-TBA system and ratio between acetonitrile and water was 55:45 (v/v) for MDA-DNPH system. The validation method studies of MDA-TBA showed LOD 0.01 μM, 100-105 percentage recovery. MDA-DNPH method showed LOD at 0.72 μM, 96-102 percentage recovery. The effect of palmitic acid, linoleic acid, lactose and sucrose were also studied and presented that only linoleic acid effect on the analysis. The malondialdehyde content in soybean milk samples were analysed, the result showed that all samples contained malondialdehyde 0.3331-0.6754 μM.

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในนมถั่วเหลืองตัวอย่างด้วย
เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ของ

อำนาจ กะฐินเทศ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2556

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์	คณะกรรมการสอบปากเปล่า
.....ประธาน	.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)	(ดร.วินัย อวงพิพัฒน์)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(ดร.นวลละออ รัตนวิมานวงศ์)	(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)	(ดร.นวลละออ รัตนวิมานวงศ์)
	.....กรรมการ
	(ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริธร สโมสร)

ประกาศคุณูประการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ ความช่วยเหลือ ความอนุเคราะห์อย่างยิ่ง งจากคณาจารย์ในภาควิชาเคมีหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ

รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ดร.นวลละออ รัตนวิมานวงศ์ และ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ และคณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำชี้แนะ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการแก้ปัญหาทุกขั้นตอนอันเกิดจากกา รวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร .วินัย อวงพิพัฒน์ ที่ให้ความกรุณาในก ารเป็นประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร .สิริธร สโมสร ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆเพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย ประธานกรรม การบริหารหลักสูตร รวมถึง ดร .นวลละออ รัตนวิมานวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเมตตาเอาใจใส่แก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเ คมี ที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกๆท่านเป็นอย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงผู้พระคุณบิดา มารดา และญาติสนิททุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดู ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจั ย ขอบพระคุณอาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทุกๆท่านที่มิได้กล่าวรายนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

อำนาจ กะฐินเทศ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**.....	1
	ภูมิหลัง.....	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
	ความสำคัญของการวิจัย.....	2
	ขอบเขตของการวิจัย.....	3
	ขั้นตอนของการวิจัย.....	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**.....	5
	ถั่วเหลือง.....	5
	น้ำนมถั่วเหลือง.....	8
	การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน.....	10
	ศึกษาความเป็นพิษ และอันตรายจากมาลอนไดอัลดีไฮด์.....	16
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**.....	22
	อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	22
	วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
	การเตรียมอนุพันธ์สารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์.....	24
	ขั้นตอนการเตรียมสารอนุพันธ์ ของสารมาตรฐาน MDA กับ TBA.....	24
	ขั้นตอนการเตรียมสารอนุพันธ์ ของสารมาตรฐาน MDA กับ DNPH.....	25
	ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา MDA ด้วยเทคนิค อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรเมทรี.....	25
	ศึกษาการแยกมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครโมโทกราฟีของเหลวสมรรถสูง...	26
	ศึกษาหาค่าขีดจำกัดล่างในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดล่างในการวิเคราะห์หาปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ).....	31
4	**ผลการวิจัย**.....	36
	ตอนที่ 1 ผลการศึกษาการเตรียมอนุพันธ์ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับกรดไทโอบาร์บิทูริก และ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน.....	36

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

4 (ต่อ)

ตอนที่ 2 ผลการศึกษาปัจจัยแปรผันในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ MDA-TBA ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรเมทรี

ผลของความเข้มข้นของกรดไทโอบาร์บิทูริกที่มีผลต่อการทำอนุพันธ์กับมาลอนไดอัลดีไฮด์…… 37

ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำอนุพันธ์ระหว่างกรดไทโอบาร์บิทูริกกับมาลอนไดอัลดีไฮด์…….. 38

ผลของเวลาที่มีผลต่อการทำอนุพันธ์ระหว่างกรดไทโอบาร์บิทูริกกับมาลอนไดอัลดีไฮด์…….. 38

ตอนที่ 3 ศึกษาการแยกมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ศึกษาการแยกด้วยวิธี MDA-TBA

ผลการศึกษาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ และอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA…….. 39

ศึกษาผลของ pH ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA…… 42

ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์MDA-TBA…… 43

ศึกษาการแยกด้วยวิธี MDA-DNPH

ผลการแยกด้วยกรดอะซิติกความเข้มเข้นร้อยละ 0.2 0.5 (v/v) ต่ออะซิโตไนทริล โดยปริมาตร และอัตราส่วนอะซิโตไนทริลต่อน้ำ …… 43

ผลของความเข้มข้นของ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดี ไฮด์…… 45

ผลของอุณหภูมิ และเวลาที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮซีน…… 46

ผลของเวลาที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนที่อุหภูมิห้อง…… 47

ตอนที่ 4 ผลการศึกษาสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมที่พบได้ในตัวอย่าง

ศึกษาผลของไขมัน และน้ำตาลทำการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-TBA…….. 48

ศึกษาผลของไขมัน และน้ำตาลที่มีผลต่อการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-DNPH… 50

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

4 (ต่อ)

ตอนที่ 5 ผลการศึกษาการหาประสิทธิภาพของระบบที่ทดลอง

ศึกษาหา Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)…….. 52

ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืน (%recovery) และความแม่นยำ(precision).. 53

ตอนที่ 6 ผลการตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง พร้อมดื่มจากตลาดที่มีจำหน่ายทั่วไป น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที แบบเจ และแบบผสมนมผง…….. 54

5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ……. 56

บรรณานุกรม…… 58

ภาคผนวก…….. 61

ประวัติย่อผู้วิจัย…… 73

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองแห้งทั้งเมล็ด.....	6
2	ปริมาณโปรตีน ไขมัน และแคลเซียมจากถั่วชนิดต่างๆ.....	7
3	ส่วนประกอบของนมถั่วเหลือง นมวัว และนมมนุษย์ต่อน้ำหนัก 100 กรัม.....	9
4	ศึกษาผลของกรดไขมันและน้ำตาลที่มีผลต่อ TBA.....	30
5	ศึกษาผลของกรดไขมันและน้ำตาลที่มีผลต่อ DNPH.....	31
6	ผลของ Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ).....	52
7	เปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืน (%recovery) และความแม่นยำ (precision) ของระบบที่ทดลอง.....	53
8	ปริมาณ MDA ที่ได้จากกตรวจวัดตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม.....	54

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 กลไกการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน..... 11
2 มาลอนไดอัลดีไฮด์รูปของ enolate ion 13
3 ปฏิกิริยาของมาลอนไดอัลดีไฮด์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก 14
4 ปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน..... 14
5 โครมาโทแกรมของ MDA-TBA complex 15
6 ปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับดีออกซีกัวโนซีนเกิดเป็นสาร M_1G..... 16
7 มาลอนไดอัลดีไฮด์กับเอมีนปฐมภูมิ (primary amine) ที่ cross-links กับ1-amino-3-iminopropene และ pyridyl-dihydropyridine 17
8 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ (ก) λ_{max}=531 nm MDA-TBA และ (ข) λ_{max} =307 nm MDA-DNPH..... 37
9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดไทโอบาร์บิทูริกและค่าการดูดกลืนแสงอนุพันธ์ MDA-TBA..... 37
10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าการดูดกลืนแสงอนุพันธ์ MDA-TBA.... 38
11 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและค่าการดูดกลืนแสงอนุพันธ์ MDA-TBA..... 39
12 ผลของความเข้มข้น KH_2PO_4 ต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA..... 41
13 ผลการแยกสารที่แปรผันอัตราส่วนระหว่าง KH_2PO_4 กับเมธานอล..... 41
14 ผลของ pH ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA..... 42
15 ผลของการแปรผันอัตราการไหลวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA..... 43
16 ผลการแยกที่แปรผันอัตราส่วนระหว่างกรดอะซิติก 0.2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่ออะซิโตไนทริลที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-DNPH..... 44
17 ผลการแยกที่แปรผันอัตราส่วนระหว่างกรดอะซิติก 0.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่ออะซิโตไนทริลที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-DNPH..... 44
18 ผลการแยกที่แปรผันอัตราส่วนระหว่างอะซิโตไนทริลต่อน้ำ ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-DNPH..... 45
19 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ต่อการทำปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดีไฮด์ 46
20 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิ และเวลาที่มีต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน 46

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

21 ผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน..... 47

22 ผลการศึกษาผลของกรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส และน้ำตาลซูโครส..... 48

23 ปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิค..... 49

24 ผลการศึกษาผลของฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อ TBA..... 50

25 ผลการศึกษาผลของกรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส และน้ำตาลซูโครส ที่มีผลต่อการเกิดอนุพันธ์ MDA-DNPH 51

26 ผลการศึกษาผลของฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตนความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อ DNPH..... 51

27 กราฟมาตรฐาน (ก) MDA-TBA และ (ข) MDA-DNPH..... 53

28 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน MDA-TBA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์..... 63

29 โครมาโทแกรม MDA-TBA ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง..... 63

30 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน MDA-DNPH ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์..... 63

31 โครมาโทแกรมอนุพันธ์ MDA-DNPH โดย Spike สารมาตรฐาน MDA ที่ 15 ไมโครโมลาร์ลงในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง..... 64

32 โครมาโทแกรมอนุพันธ์ MDA-DNPH ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง..... 64

33 ลักษณะตัวอย่างนมถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง..... 69

34 สีของสารอนุพันธ์สารละลาย MDA-TBA..... 69

35 สีของสารอนุพันธ์สารละลาย MDA-DNPH..... 69

36 สีของสารละลายตัวอย่าง..... 70

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

การเกิดออโตออกซิเดชัน (autoxidation) เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพของอาหารหลายประเภท โดยเฉพาะประเภท ที่อุดมไปด้วย ไขมัน หรือ น้ำมัน โดยกรดไขมันประเภท ไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids, PUFA) สามารถเกิด ปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid-peroxidation) ได้ง่าย (Fernandez; et al. 1997: 345-353) การเสื่อมลงของอาหารประเภทนี้ มีความสัมพันธ์กับการเกิดเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารนี้จะไม่เสถียร และเป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (primary product) ของปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน เมื่อเปอร์ออกไซด์เกิดการสลายตัวจะทำให้เกิดผลิตผล 2 ชนิด ได้แก่ อัลดีไฮด์ และ คีโตน ซึ่งสารสองชนิดนี้จะส่งผลต่อการเสื่อมลงของรสชาติอาหาร และการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ แต่โดยส่วนใหญ่สาร ที่เป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ (secondary product) ของกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชันจะเป็นมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde หรือ MDA)

มาลอนไดอัลดีไฮด์จะใช้เป็นสารต้นแบบ (model) หรือตัวชี้บอกทางชีววิทยา (biomarker) สำหรับศึกษากระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชันทั้งในสิ่งมีชีวิต ซึ่งถ้าสารนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้น จะแสดงถึงความผิดปกติหรือเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคความจำเสื่อม โรคเส้นเลือดอุดตัน โรคอ้วน เป็นสารตั้งต้นในการเป็นโรคมะเร็ง (Grotto; et al. 2007. 619–624) และในอุตสาหกรรมอาหาร มาลอนไดอัลดีไฮด์จะเป็นตัวบ่งบอกถึงการเสื่อม ของรสชาติ คุณค่าทางโภชนาการของ อาหารในระหว่างกระบวน การผลิต และการเก็บรักษาอาหาร เนื่องจากมาลอนไดอัลดีไฮด์ เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก มีความมีขั้วสูง สามารถละลายน้ำได้ดี และไม่เสถียร จึงทำให้ยากในการสกัด และมาลอนไดอัลดีไฮด์ เองไม่มี โครโมฟอร์ (chromophore) อิเล็กโทรฟอร์ (electrophore) หรือฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ที่จะสามารถตรวจวัดได้ ดังนั้นการ วิเคราะห์จะสร้างอนุพันธ์กับสาร 2 ชนิด ได้แก่ กรดไทโอบาร์บิทูริก (2-thiobarbituric acid หรือ TBA) เกิดเป็นสารเชิงซ้อนของมาลอนไดอัลดีไฮด์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก (MDA-TBA complex) ปฏิกิริยาจะเกิดได้ง่าย MDA-TBA complex สามารถตรวจวัดได้ทั้งทางตรง ได้แก่ การใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และทางอ้อม ได้แก่ การใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (Grotto; et al. 2009. 169-174) และเตรียมเป็นสารอนุพันธุ์กับ 2,4-ไดไนโทรฟี

นิลไฮดราซีน (MDA-DNPH) เกิดเป็นไฮดราโซน ซึ่งวิธีดังกล่าวมีความจำเพาะมากกว่า MDA-TBA (Al-Fawaeir; et al. 2011. 11-14)

ในปัจจุบันนมเป็นอาหารที่คุณค่าทางโภชนาการ นิยมบริโภคกันทุกเพศทุกวัย เนื่องจากนมมีไขมันเป็นส่วนประกอบ โดยเฉพาะในนมวัวมีปริมาณไขมันค่อนข้างสูง สามารถเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้

อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน ยังมีน้ำนมพร้อมดื่มจำนวนมากที่ผลิตจาก วัตถุดิบอื่น ที่นิยมบริโภคมากที่สุด คือ น้ำนมจากถั่วเหลือง ในน้ำนมถั่วเหลืองก็อาจเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้เช่นกัน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการเกิดมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่าง น้ำนมถั่วเหลืองแปรรูป โดยศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจวัดสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในตัวอย่างด้วยการศึกษาเปรียบเทียบ วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง ตลอดจนศึกษาปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการตรวจปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง นอกจากนี้จะได้ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสมด้วย

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการตรวจหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยการเตรียมสารอนุพันธ์

2. เพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อวิธีการตรวจหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์

3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ใน ตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่มโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

4. เพื่อตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่มจากตลาดที่มีจำหน่ายทั่วไป น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชทีแบบเจ แบบผสมน้ำตาล และแบบผสมนมผง

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบข้อดี ข้อด้อยของวิธีการตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยการเตรียมสารอนุพันธ์แบบต่างๆ

2. ทราบผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อวิธีการตรวจหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์

3. ทำให้ทราบปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่ม จากตลาดที่มีจำหน่ายทั่วไป และน้ำนมถั่วเหลืองยูเอชทีแบบเจ แบบผสมน้ำตาล และแบบผสมนมผง

ขอบเขตของการวิจัย

1. การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยศึกษาผลการ เปรียบเทียบการเตรียมสารอนุพันธ์ ระหว่างมาลอนไดอัลดีไ ฮด์กับสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์ ได้แก่ กรดไทโอบาร์บิทูริก และ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

2. ศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ได้แก่

2.1 ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในระบบ

2.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

2.3 เวลาที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

2.4 ค่า pH ของบัฟเฟอร์

อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.6 ชนิด และ ปริมาณสารอื่นในระบบ เช่น ไขมัน น้ำตาล ได้แก่ กรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส และน้ำ ตาลซูโครส รวมถึงผลของ ฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตน

3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมสารอนุพันธ์แต่ละชนิด โดยการหาค่าขีดจำกัดล่างของการวิเคราะห์ (LOD) ขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOQ) ร้อยละการกลับคืน (% recovery) และความแม่นยำ (precision)

4. ศึกษาหาปริมาณในตัวอย่างน้ำนม ถั่วเหลืองพร้อมดื่ม ด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ขั้นตอนของการวิจัย

1. การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการเตรียมสารอนุพันธ์ระหว่าง

1.1 สารมาลอนไดอัลดีไฮด์มาตรฐานกับกรดไทโอบาร์บิทูริก

1.2 สารมาลอนไดอัลดีไฮด์มาตรฐานกับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

2. ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ได้แก่

2.1 แปรผันความเข้มข้นของกรดไทโอบาร์บิทูริก และ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

2.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

2.3 เวลาที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

2.4 ค่า pH ของบัฟเฟอร์

2.5 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.6 ชนิด และ ปริมาณสารอื่นในระบบ เช่น ไขมัน น้ำตาล ได้แก่ กรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส และน้ำตาลซูโครส รวมถึงผลของ ฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตน

3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมสารอนุพันธ์แต่ละชนิด โดยการหาค่าขีดจำกัดล่างของการวิเคราะห์ (LOD) ขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOQ) ร้อยละการกลับคืน (%recovery) และความแม่นยำ (precision)

4. ตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในตัวอย่างน้ำ นมถั่วเหลืองพร้อมดื่มจากตลาดที่มีจำหน่ายทั่วไป น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที แบบเจ และ แบบผสมนมผง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการศึกษาการเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในนม ถั่วเหลือง โดยเทคนิค โครมาโ ทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและนำเสนอตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

1. ถั่วเหลือง นมถั่วเหลือง และองค์ประกอบของนมถั่วเหลือง
2. การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน
3. การศึกษาความเป็นพิษ และอันตรายจากมาลอนไดอัลดีไฮด์
4. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นเมล็ดพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการ เป็นแหล่งที่ดีข องไขมันและ โปรตีน ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ถั่วเหลืองเป็นพืชล้มลุก ลำต้นสูงประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นสี่เหลี่ยมปกคลุมด้วยขนสีเทาขาว ใบต้นถั่วเหลืองเป็นใบประกอบแบบนิ้วมือ ประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบ รูปร่างคล้ายรูปไข่ปลายแหลมใบค่อนข้างหนา ผิวมันทั้งด้านบนและด้านล่าง ดอกเป็นช่อสีขาวหรือม่วง แดง ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 25-30 วันเก็บเกี่ยวอายุประมาณ 90-100 วัน ฝักแบนขาวติดเป็นกระจุกที่ข้อของต้น และกิ่ง ในฝักมีเมล็ด 3-5 เมล็ดรูปไข่ เมล็ดกลม เมล็ดถั่วเหลืองมีหลายขนาดและหลากหลายสีรวมถึงสีดำ สีน้ำตาล สีฟ้า สีเหลือง เปลือกถั่วเหลืองที่แก่แล้วจะแข็งแรงทนต่อน้ำ เมล็ดถั่วเหลืองบรรจุโปรตีนไว้สูง และสามารถทำให้แห้งโดยไม่เสียหาย และสามารถทำให้ฟื้นกลับมาโดยการใส่น้ำ

ส่วนประกอบทางเคมี

ส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง ถั่วเหลือง แห้ง ทั้งเมล็ดมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันไปโดยแปรผันตามแต่ปัจจัยต่างๆ เช่น สภาวะแวดล้อม สายพันธุ์ฤดูกาล และสภาพภูมิประเทศ องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองแห้งทั้งเมล็ดดังตาราง 1

ตาราง 1 ส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองแห้งทั้งเมล็ด

ส่วนประกอบทางเคมี	ปริมาณ (ร้อยละ)
โปรตีน	34.0
คาร์โบไฮเดรท	26.7
ไขมัน	18.7
ความชื้น	11.1
เส้นใย	4.7
เถ้า	4.8
แร่ธาตุต่าง ๆ	0.755
วิตามินต่าง ๆ	0.016

ที่มา: องค์ประกอบที่สำคัญของเมล็ดถั่วเหลือง. (2012).

โปรตีน ถั่วเหลืองแห้งทั้งเมล็ดมีโปรตีนอยู่ประมาณร้อยละ 33-44 ในขณะที่ถั่วชนิดอื่ นมีโปรตีนร้อยละ 20-30 ถั่วเหลืองมีโปรตีนมากกว่าเนื้อสัตว์ชนิดต่าง ๆ ถึงสองเท่า แต่คุณภาพของโปรตีนจากถั่วเหลืองอาจด้อยกว่าโปรตีนจากสัตว์ เพราะถึงแม้ถั่วเหลืองจะมีกรดอะมิโนที่จำเป็นคร บทั้ง 8 ชนิด แต่สัดส่วนกรดอะมิโนบางตัวไม่เหมาะสม มีน้อยก ว่าเกณฑ์ที่กำหนด ทำให้คุณภาพโปรตีนในถั่วเหลืองมีคุณค่าด้อยกว่า ในเนื้อสัตว์ โปรตีน ถั่วเหลือง ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนประเภทโกลบูลิน

คาร์โบไฮเดรท ในเมล็ดถั่วเหลือง มีคาร์โบไฮเดรท ประมาณร้อยละ 35 อยู่ในรูปโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยส่วนของ อะไมโลสและอะไม โลเพคติน และในรูปน้ำตาลไดแซคคาไรด์ ได้แก่ ซูโครส โอลิโกแซคคาไรด์ ได้แก่ ราฟิโนส และสตาชิโอส นอกจากคาร์โบไฮเดรทดังกล่าว ยังพบคาร์โบไฮเดรท ชนิดไม่ละลายน้ำหรือเส้ นใยอาหาร ได้แก่ เซลลูโลส ร้อยละ 20 และเฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 50

ไขมัน เป็นส่วนประกอบที่มีมากรองลงมาจากโปรตีน การสะสมของไขมัน และส่วนประกอบของกรดไขมันในถั่วเหลืองขึ้นกับสายพันธุ์และสภาพแวดล้อมในช่วงของการสะสม โดยเฉลี่ยถั่วเหลืองของไทยจะมีไขมันอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 16-18 แต่ถ้าเกิดฝนแล้งปริมาณไขมันจะลดลงอยู่ใน ช่วงระหว่างร้อยละ 14-15 ไขมันที่สะสมจะประกอบด้วย กรดไลโนเลอิก ร้อยละ 50 กรดไ ขมันชนิดไม่อิ่มตัวหนึ่งตำแหน่ง ร้อยละ 20 กรดไขมันชนิดอิ่มตัว ร้อยละ 20 กรดไขมันแอลฟ่าลิโนเลอิกร้อยละ 7 กรดไขมันห่วงโซ่ขนาดยาว และฟอสโฟลิปิด ร้อยละ 3 ซึ่งกรดไลโนเลอิก

มีหน้าที่ สำคัญ คือ ช่วยลด ระดับโคเลสเตอรอล และช่วยในการเจ ริญเติบโตของเด็ก และทารก ส่วนฟอสโฟลิปิดเป็นสารคล้ายไขมัน (fat like substances) มีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย

แร่ธาตุ ในถั่วเหลืองมีโปแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียม คลอไรด์ โซเดียมและธาตุอื่นๆ

วิตามิน ในถั่วเหลืองพบทั้งวิตามินที่ละลายในน้ำ และวิตามินที่ละลายในไขมัน วิตามินที่ละลายในน้ำที่พบได้แก่ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ไนอะซิน กรดแพนโทนิก และกรดโฟลิก ส่วนวิตามินซีพบในถั่วเหลืองที่ยังอ่อน วิตามินที่ละลายในไขมันที่ พบได้แก่ วิตามิ นเอในรูปของเบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นโปรวิตามินเอ ส่วนวิตามินอีพบในรูปของแอลฟ่า บีต้า แกมม่า และเดลต้า โทโคฟีรอล แต่จะไม่พบวิตามินดี และวิตามินเค

ส่วนประกอบของสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่พบมีดังนี้ ไอโซฟลาโวน (isoflavones) ซาโปนิน (saponin) กรดไฟติก (phytic acid) และกรดฟีโนลิก (phenolic acid) ในถั่วแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันดังตาราง 2

ตาราง 2 ปริมาณโปรตีน ไขมัน และแคลเซียมจากถั่วชนิดต่างๆ

ชนิดของถั่ว	โปรตีน (กรัมต่อ100 กรัม)	ไขมัน (กรัมต่อ100 กรัม)	แคลเซียม (มิลลิกรัมต่อ100 กรัม)
ถั่วเหลือง	34.0	18.7	245
ถั่วเขียว	23.4	1.3	125
ถั่วดำ	23.8	0.3	57
ถั่วลิสง	29.7	38.7	20
ถั่วแดงหลวง	18.2	2.2	965
งาดำ	21.9	46.3	1,100

ที่มา: กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำบนพื้นที่พืชไร่. (2549). หน้า 89

น้ำนมถั่วเหลือง

น้ำนมถั่วเหลือง หมายถึง เครื่องดื่มชนิดหนึ่งที่ได้จากการนำถั่วเหลืองมาล้างให้สะอาด แช่น้ำ บดกับน้ำ ทำการต้ม แล้วกรอง อาจปรุงแต่งรสด้วยน้ำตาล และอาจเติมส่วนประกอบอื่น เช่น น้ำลูกเดือย ชาเขียว นมผงสเตบิไลเซอร์ เช่น กัม แป้งดัดแปร ต้มฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม บรรจุในภาชนะบรรจุขณะร้อน แล้วทำให้เย็นทันที หรือความหมายของน้ำนมถั่วเหลือง ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวสกัดได้จากเมล็ดถั่วเหลือง ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max Merr.* หรือแป้งถั่วเหลืองผสมด้วยน้ำ อาจผสมนม สารที่ให้คุณค่าทางโภชนาการ หรือสารปรุงแต่ง สี กลิ่น และรส หรือไม่ก็ได้ แล้วนำมาผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อน เพื่อให้ปลอดภัยต่อการบริโภค

น้ำนมถั่วเหลือง หรือน้ำเต้าหู้ เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่นิยม บริโภคกันมาก เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เหมาะที่จะใช้เป็น อาหารเสริม เนื่องจากมีสารอาหารที่ มีประโยชน์ต่อร่างกายมีจำหน่าย ทั่วไป ราคาถูก คุณค่าทางโภชนา การของน้ำนมถั่วเหลือง คือโปรตีน ปริมาณโปรตีนในน้ำนมถั่วเหลืองมีมากกว่านมวัว แต่คุณภาพโปรตีนด้อยกว่า เนื่องจากมีสัดส่วนของกรดอะมิโนเมทไทโอนีน (methionine) ในปริมาณที่น้อยกว่ากำหนด แต่มีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ในปริมาณที่สูง ส่วนกรดอะมิโนที่จำเป็นตัวอื่นใกล้เคียงกับในเนื้อสัตว์ กรดไขมันที่พบประกอบด้วย กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) ร้อยละ 50 กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวหนึ่งตำแหน่ง (monounsaturated fatty acid) ร้อยละ 20 กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) ร้อยละ 20 กรดไขมันแอลฟ่าลิโนเลอิก (α-linoleic acid) ร้อยละ 7 กรดไขมันห่วงโซ่ขนาดยาว (long chain fatty acid) และฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ร้อยละ 3 ซึ่งส่วนมากอยู่ในรูปเลซิติน (lecithin) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยเพิ่มโคเลสเตอรอลชนิด (high density liproprotein หรือ HDL) คาร์โบไฮเดรทที่พบส่วนมากเป็นน้ำตาลทรายหรือซูโครสที่ใส่เพื่อปรุงแต่งรสหวาน นอกจากสารอาหารดังกล่าว ในนมถั่วเหลืองยังมีสารไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen)

นมถั่วเหลือง แต่เดิมนิยมดื่มกันเฉพาะชาวจีนเป็นส่วนใหญ่ แต่ปัจจุบัน นมถั่วเหลืองหรือน้ำเต้าหู้ เป็นที่นิยมดื่มกันทั่วไป เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับนมวัว แต่ราคาถูกกว่าจึงสามารถใช้เป็นอาหารเสริมดื่มแทนนมวัวได้ อีกทั้งนมถั่วเหลืองไม่มีน้ำตาลแลกโตส จึงทำให้ผู้ที่ ดื่มนมวัวแล้วท้องเสียสามารถดื่มได้ นอกจากนี้นมถั่วเหลืองยังสามารถใช้เป็นนมสำหรับเด็กทารกหรือใช้เป็นส่วนผสมของสูตรนมเด็กทารก ส่วนประกอบของนมถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับนมวัว และนมมนุษย์ ดังตาราง 3

ตาราง 3 ส่วนประกอบของนมถั่วเหลือง นมวัว และนมมนุษย์ต่อน้ำหนัก 100 กรัม

ส่วนประกอบ	นมถั่วเหลือง	นมวัว	นมมนุษย์
พลังงาน (กิโลแคลอรี่)	44	59	62
น้ำ (กรัม)	90.8	88.6	88.2
โปรตีน (กรัม)	3.6	2.9	1.4
ไขมัน (กรัม)	2	3.3	3.1
คาร์โบไฮเดรท (กรัม)	2.9	4.5	7.1
เถ้า (กรัม)	0.5	0.7	0.2
แร่ธาตุ (มิลลิกรัม)			
- แคลเซียม	15	100	35
- ฟอสฟอรัส	49	90	25
- โซเดียม	2	36	15
- เหล็ก	1.2	0.1	0.2
วิตามิน (มิลลิกรัม)			
- ไทอะมิน	0.03	0.04	0.02
- ไรโบฟลาวิน	0.02	0.15	0.03
- ไนอะซิน	0.05	0.2	0.20
กรดไขมันอิ่มตัว	40-80	60-70	55.3
กรดไขมันไม่อิ่มตัว	52-60	30-40	44.7
โคเลสเตอรอล (มิลลิกรัม)	0	9.24-9.9	9.3-18.6

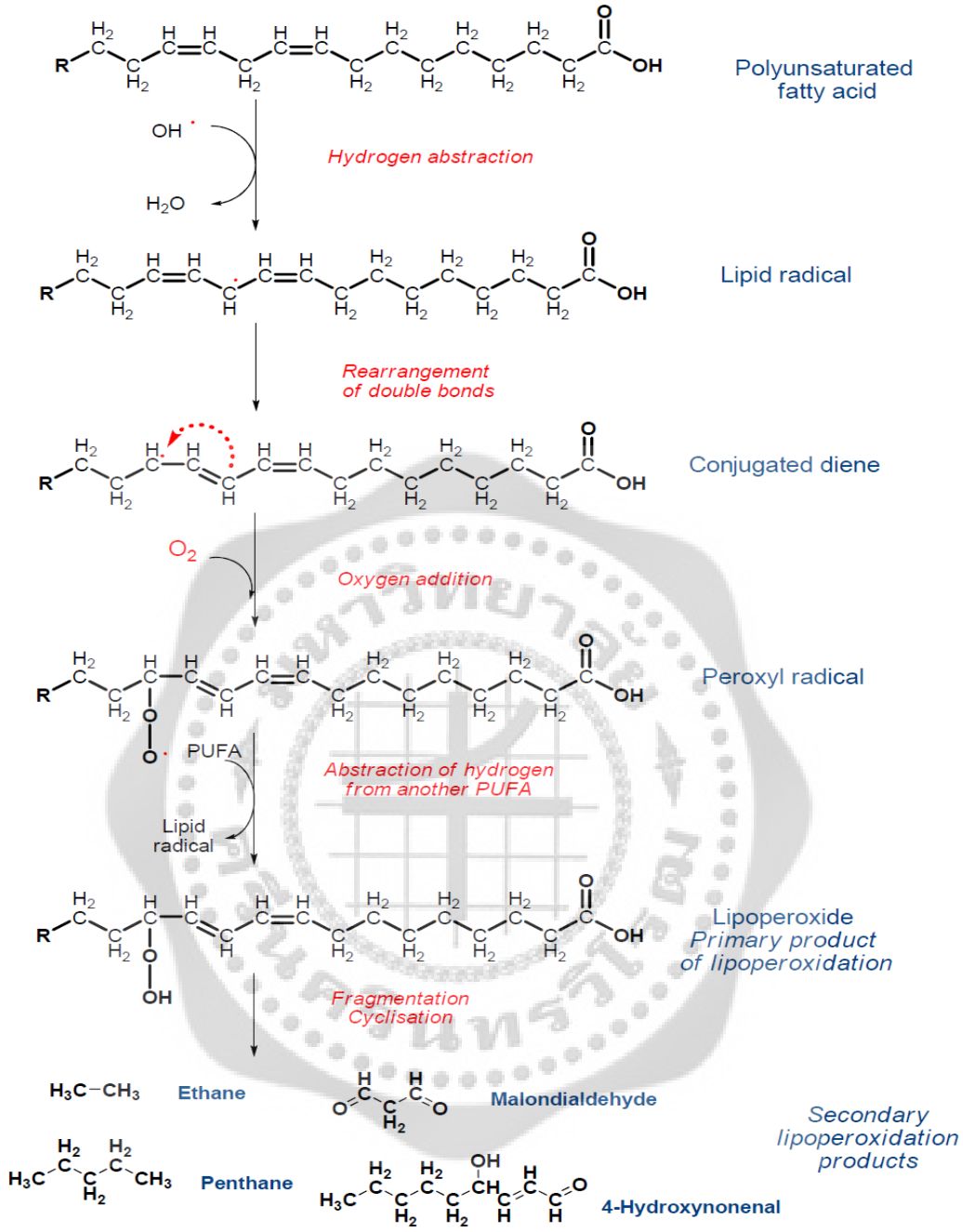
ที่มา: สุรีย์ แถวเที่ยง. (2552). เครื่องดื่มน้ำนมถั่วเหลืองผสมน้ำแครอท. หน้า 8

ปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน

ลิปิดเปอร์ออกซิเดชันเกิดจากปฏิกิริยา ออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตั ว อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดลิปิดเปอร์ออกไซด์ เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา ในสิ่งมีชีวิต ปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน สามารถเกิดได้ง่ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ ที่ประกอบด้วยลิปิด 2 ชั้น การเกิดลิปิด ออกซิเดชัน กับลิปิดในเยื่อหุ้มเ ซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป ส่งผลกระทบต่อเอนไซม์และรีเซพเตอร์ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เอนไซม์และรีเซพเตอร์มีการทำงานที่เสียไป ซึ่งเป็นสาเหตุใน การเกิดโรคต่าง ๆได้อีกด้วย ผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจากลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ได้แก่ สารไฮโดรคาร์บอน เช่น อีเทน อีทีน และเพนเทน รวมถึงสารคีโตน และสารอัลดีไฮด์ เป็นต้น สารอัลดีไฮด์ ที่มีความสำคัญคือ มาลอนไดอัลดี ไฮด์ (Malondialdehyde หรือ MDA) ซึ่งมาลอนไดอัลดีไฮด์จะเป็นสารเริ่มต้ นในการเกิดมะเร็ง และการกลายพันธุ์ ปกติแล้วสารมาลอนไดอัลดีไฮด์จะใช้เ ป็นตัวชี้บอกการถูกทำลายโดยการเกิดออกซิเดชันในตัวอย่างทางชีว วิทยา (biological samples) หรือในอุตสาหกรรมอาหาร (Fenaille; et al. 2001: 237–245)

ในอาหารการเกิดลิปิดเปอร์ ออกซิเดชันจะสัมพันธ์กับการเกิดกลิ่นเหม็นหืน และการเสื่อมคุณค่าทางอาหารจากการเกิด ออกซิเดชัน การมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่สูง จะทำให้เร็วต่อการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในระหว่างการเก็บ กระบวนการผลิต และการประกอบอาหาร ถ้าเกิดลิปิดเปอร์ ออกซิเดชัน จะทำให้ได้ สารประเภทไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารนี้จะไม่เสถียร สามารถสลาย ตัวได้เปลี่ยน เป็นผลิตภัณฑ์ทุติ ยภูมิหลายชนิด ได้แก่ อัลดีไฮด์ คีโตน แอลกอฮอลล์ กรด และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน สารเหล่านี้สามารถเปลี่ยนคุณภาพ สี เนื้อสัมผัส รสชาติ หรือกลิ่นของอาหารได้

ปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ปฏิกิริยาเริ่มต้นของการ เกิดโซ่ ปฏิ กิริยาการทวีเพิ่มขึ้น และการสิ้ นสุดปฏิกิริยา ปฏิกิริยาลูกโซ่เริ่มต้นด้วยการมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น และอนุมูลอิสระนี้ เข้าไปทำปฏิกิริยากับลิปิดและทำให้เกิดอนุมูลลิปิด ดังภาพประกอบ 1 แสดงถึงกลไกลการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน



ภาพประกอบ 1 กลไกการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัว

ที่มา: Lenka Fialova (2010/2011). Lipids (fatty acids,lipoperoxidation, digestion). p.4

ปฏิกิริยาเริ่มต้น (initiation step)

การเกิดปฏิกิริยาเริ่มจากกรดไขมันสายยาวชนิดไม่อิ่มตัว ถูกดึงไฮโดรเจนอะตอมออกจากกลุ่มเมทิลลีน (methylene (-CH_2-) group) ที่ตำแหน่งถัดออกจากพันธะคู่ โดยอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) หรืออนุมูลอิสระตัวอื่นทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร (lipid radical หรือ carbon-centered radical) จึงพยายามทำให้ตัวเองเสถียรโดยจัดเรียงโมเลกุลใหม่เป็นรูปคอนจูเกตไดอีน (conjugated diene) ซึ่งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน จะได้เป็นอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล (ROO•) จากนั้นอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลจะไปดึงไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุลของไขมัน เพื่อทำให้ตัวเองเสถียร ขณะเดียวกันก็ทำให้เกิดอนุมูลอิสระชนิดไขมัน ดังสมการ 1

$$L\text{-}H \longrightarrow L\bullet + \text{radical} - H \qquad \text{.....(1)}$$

ปฏิกิริยาการทวีเพิ่มขึ้นหรือปฏิกิริยาต่อเนื่อง (propagation step)

อนุมูลอิสระชนิดไขมันที่เกิดขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจน เกิดเป็นอนุมูลอิสระไขมันเปอร์ออกซิล (lipid peroxyl radical; LOO•) จากนั้นอนุมูลอิสระไขมันเปอร์ออกซิลจะไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลไขมันที่อยู่ข้างเคียง โดยดึงไฮโดรเจนอะตอมออกแล้วเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของไขมัน (LOOH) และอนุมูลอิสระไขมันที่ไม่คงตัวโดยเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อเนื่องไป ดังสมการ 2 และ 3

$$L\bullet \longrightarrow L\text{-}O\text{-}O\bullet \qquad \text{.....(2)}$$

$$L\text{-}O\text{-}O\bullet \longrightarrow L\text{-}O\text{-}O\text{-}H + L\bullet \qquad \text{.....(3)}$$

การสิ้นสุดปฏิกิริยา (termination step)

อนุมูลอิสระไขมันที่ไม่คงตัว 2 โมเลกุลมาจับกันหรือการที่อนุมูลอิสระไขมันที่ไม่คงตัวมาจับกับอนุมูลอิสระไขมันเปอร์ออกซิลทำให้เป็นโมเลกุลที่คงตัว ได้แก่ อีเทน (ethane) และแอลดีไฮด์ของไขมัน (lipid aldehyde) ดังสมการ 4

$$L\bullet + L\bullet \longrightarrow L - L \qquad \text{.....(4)}$$

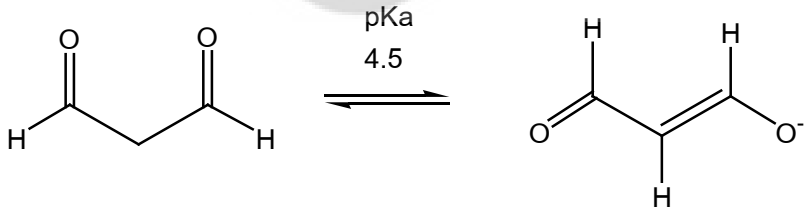
ความสำคัญของปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน

1. การเกิด ลิปิดเปอร์ ออกซิเดชัน ถ้าดำเนินไปโดยไม่สามารถควบคุมได้ จะทำลายกระบวนการในสิ่งมีชีวิต เพราะนอกจากอนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับลิ ปิดในเซลล์แล้ว ยังเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับเมมเ บรนโปรตีนด้วย ซึ่งได้แก่ เอ็นไซม์และกรดนิวคลีอิกที่ฝั งตัวอยู่ อนุมูลอิสระจะไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ทางกายภาพของสารประกอบเหล่านี้

2. การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในสิ่งไม่มีชีวิตจะมุ่งเน้นไปที่การศึกษาในเคมีของอาหาร ซึ่งการเกิด ลิปิดเปอร์ ออกซิเดชัน สามารถเกิดได้ในช่วงของกระบวนการ ผลิต หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง จะมีเพียงกรดไขมันอิ่มตัวเท่านั้นที่ถูกออกซิไดส์โดยออก ซิเจนในอากาศ ส่วนที่อุณหภูมิ สูง การเกิด ลิปิดเปอร์ ออกซิเดชั นจะเกิดในช่วงระหว่างการอบ การทอด การปิ้งย่าง ปฏิกิริยา ออกซิเดชัน ของลิปิด จะสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพอาหาร ที่รู้จักกัน ดีได้แก่ การเหม็นหืน (rancidity of fat)

การเกิด คุณสมบัติ และ การวิเคราะห์มาลอนไดอัลดีไฮด์ (มาลอนอัลดีไฮด์)

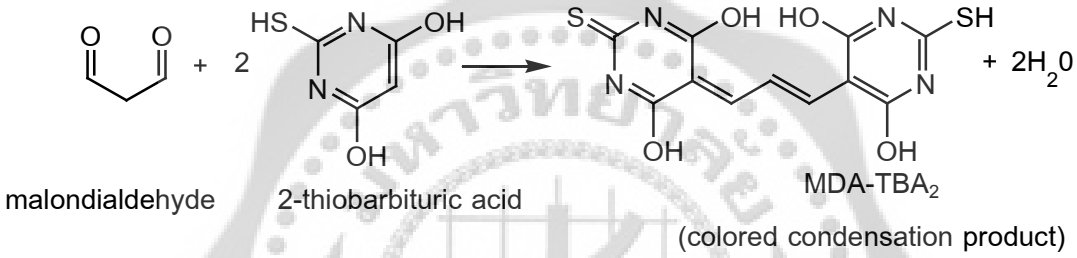
มาลอนไดอัลดีไฮด์ ประกอบด้วย 1,3-dicarbonyl ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ 72.07 กรัมต่อโมล ($gmole^{-1}$) สามารถระเหยได้ มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน เพราะ มีค่า pK_a ของหมู่อิโนอิคไฮดรอกไซด์ (enolic OH group) เท่ากับ 4.5 ดังนั้นในสภาวะที่เป็นกลางหรือเบสจึงอยู่ในรูปของ อีโนเลท ไอออน (enolate ion) ดังภาพประกอบ 2 โมเลกุลของมาลอนไดอัลดีไฮด์จะดูดกลืนแสงยูวีได้ทั้งในสารละลายที่เป็นกรด (λ_{max} = 245 nm, $\varepsilon \approx 13000$) เป็นกลางหรือเป็นเ บส ($\lambda_{max}$ = 267 nm, $\varepsilon \approx 31000$) มาลอนไดอัลดีไฮด์ ได้มาจากป ฏิกิริยาลิปิดเปอร์ ออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะสามหรือพันธะคู่ เช่น กรดลิโนเลอิก (18:3) กรดอะราชิโดนิก (20:4) และกรดโดโคสะเฮกซะอีโนอิก (22:6)



ภาพประกอบ 2 มาลอนไดอัลดีไฮด์ในรูปของอีโนเลท ไอออน (enolate ion)

ที่มา: Bohnstedt, K.C. (2005). Determination of biomarker for lipid peroxidation and oxidative stress. p.20

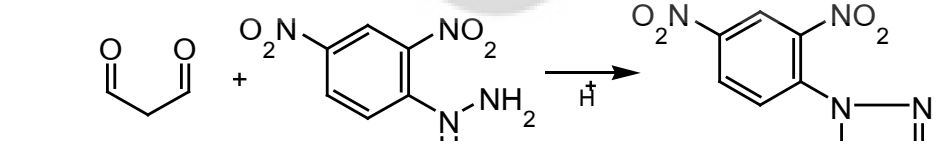
เนื่องจากว่ามาลอนไดอัลดีไฮด์เป็นสารโมเลกุลเล็ก ที่ไม่เสถียร มีความมีขั้วสูง ละลายน้ำได้ดีจึ งทำให้ยากในการสกัด และมาลอนไดอัลดีไฮด์เองไม่มีโครโมฟอร์ (chromophore) อิเล็กโทรฟอร์ (electrophore) และฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ที่จะสามารถตรวจวัดได้ดี ดังนั้นในการตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ จึงเลือกใช้วิธีการสร้างอนุพันธ์กับ สาร 2 ชนิด ได้แก่ กรดไทโอบาร์บิทูริก หรือ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ทำให้ตรวจวัดได้ง่ายกว่า วิธี แรกเป็นการสร้างอนุพันธ์ ระหว่าง มาลอนไดอัลดีไฮด์กั บกรดไทโอบาร์บิทูริก โดยปฏิกิริยา เกิด การควบแน่น (condensation) ของกรดไทโอบาร์บิทูริกสองโมเลกุลเกิดเป็นสารมีสีเรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ในสภาวะที่เป็นกรด ดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 ปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก

ที่มา: Lenka Fialova (2010/2011). Lipids (fatty acids,lipoperoxidation, digestion). p.9

วิธีที่สองเป็นการสร้างอนุพันธ์ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน (MDA-DNPH) ในสภาวะที่เป็นกรด เกิดเป็นไฮดราโซน มีสีเหลืองเข้ม ดังภาพประกอบ 4



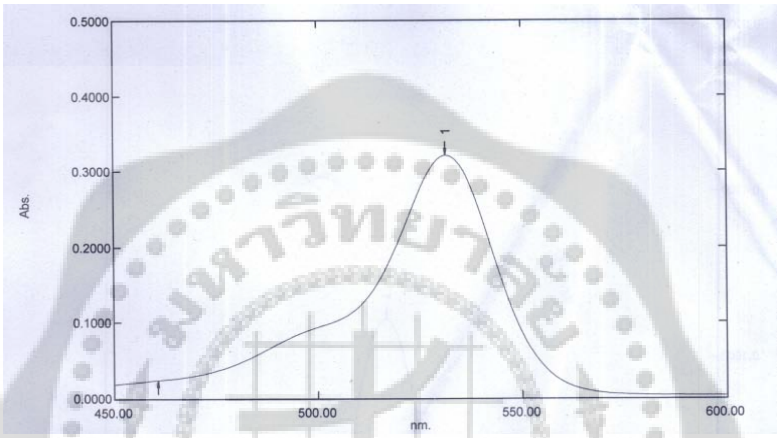
ภาพประกอบ 4 ปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

ที่มา: Berdyshev, E.V. (2011). Biochimica et biophysica acta. p.680-693

เทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจวัด MDA-TBA complex และ MDA-DNPH สามารถตรวจวัดด้วยวิธีทางตรง และวิธีทางอ้อมตรง แต่ที่นิยมมี 2 วิธี

1. วิธีทางสเปกโทรโฟโทเมทรีสำหรับกรดไทโอบาร์บิทูริก (TBA test)

วิธีนี้จะสร้างอนุพันธ์ระหว่าง มาลอนไดอัลดีไฮด์กับกรดไทโอบาร์บิทูริกในอัตราส่วน 1:2 โมล ในสภาวะกรด ที่อุณหภูมิสูง ได้ MDA-TBA complex ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 532-535 นาโนเมตร ดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 โครมาโทแกรมของ MDA-TBA complex

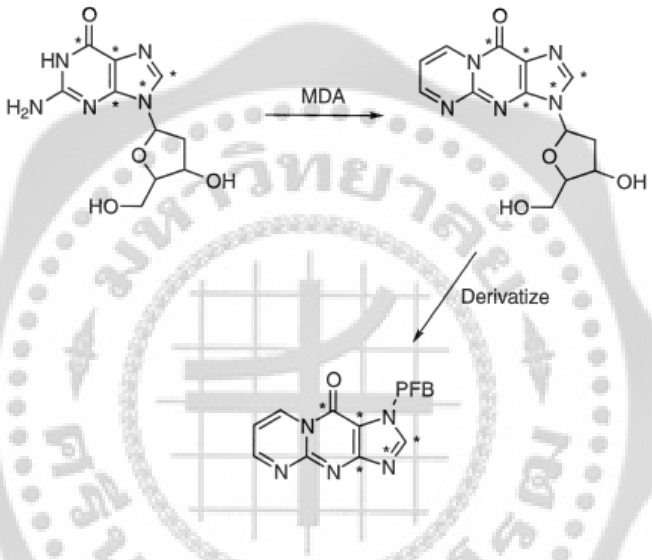
ที่มา: Bohnstedt, K.C. (2005). Determination of biomarker for lipid peroxidation and oxidative stress. p.20

2. วิธีการวิเคราะห์แบบอื่นๆ

วิธีการวิเคราะห์แบบอื่นๆ ที่นำมาใช้แทนวิธีทางสเปกโทรโฟโทเมทรีในการตรวจวัด MDA-TBA complex และ MDA-DNPH ได้แก่ เทคนิคฟลูออเรสเซนต์ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ร่วมกับการตรวจวัดด้วยสเปกโทรโฟโทเมทรี และการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนต์

ศึกษาความเป็นพิษ และอันตรายจากมาลอนไดอัลดีไฮด์

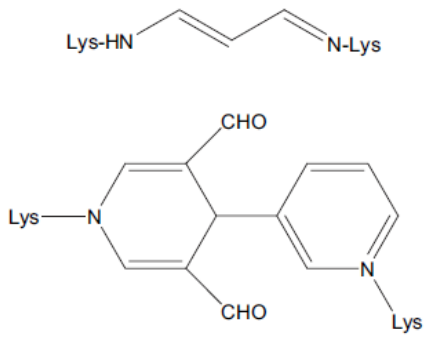
ลอเรนซ์ เจ มาร์เนต (Marnett. 1999: 83-95) ได้ทำการศึกษาผลมาลอนไดอัลดีไฮด์ได้ทำลายโครงสร้างทางพันธุกรรมเมื่อเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ ได้แก่ ดีออกซีกัวโนซีน (deoxyguanosine) และดีออกซีอะดิโนซีน (deoxyadenosine) มาลอนไดอัลดีไฮด์ จะทำปฏิกิริยากับ ดีออกซีกัวโนซีน เกิดเป็นอนุพันธ์ตัวใหม่ขึ้นมา คือ M_1G (pyrimido-[1,2α]purin-10(3H)-one) ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกสะสมในส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น ตับ ลำไส้ ตับอ่อน และเม็ดเลือดขาว โดย M_1G จะไปทำลายโครงสร้างพันธุกรรมของมนุษย์ทำให้เกิดเป็นโรคมะเร็งเกิดขึ้น ดังภาพประกอบที่ 6



ภาพประกอบ 6 ปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับดีออกซีกัวโนซีนเกิดเป็นสาร M1G

ที่มา: Lawrence J. Marnett. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. p.83-95

แดเนียล เดล ริโอ และคนอื่นๆ (Rio; et al. 2005: 316-328) ได้ทำการทบทวนผลการศึกษาอันตรายจากมาลอนไดอัลดีไฮด์ ที่ทำปฏิกิริยากับเอมีนปฐมภูมิ (primary amine) ที่ cross-links กับ 1-amino-3-iminopropene และ pyridyl-dihydropyridine ซึ่งโมเลกุลดังกล่าวจะก่อให้เกิดโรคหัวใจ (cardiovascular) ดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 มาลอนไดอัลดีไฮด์กับเอมีนปฐมภูมิ (primary amine) ที่ cross-links กับ 1-amino-3-iminopropene และ pyridyl-dihydropyridine

ที่มา: Rio; et al. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. p.316-328

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาหาปริมาณ มาลอนไดอัลดีไฮด์จากการเกิดลิปิดเปอร์ ออกซิเดชันในตัวอย่างทางชีวภาพ (biological sample) และตัวอย่างอาหารต่างๆ ดังนี้

เคนจิ ฟุกุนากะ; โกโซ นากะมา; และ เททซึยะ ซูซุกิ (Fukunaga; Takama; & Tetsuya. 1995: 20-23) ได้ทำการศึกษาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างพลาส มาทำอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนต์ โดยทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ ODS-2 ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นอะซิโตไนทริลต่อน้ำอัตราส่วนร้อยละ 70:30 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากการศึกษาพบว่าสามารถแยกสารภายในระยะเวลา 2.5 นาที ขีดจำกัดล่างของการวิเคราะห์ (LOD) เท่ากับ 0.01 พิโกโมล (pmol) ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ง่าย และเร็ว สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างทางคลินิกได้ 200 ถึง 300 ตัวอย่างต่อวัน

เจอเกน พิลซ์; อินกอล์ฟ ไมนิเก; และ คริสทอฟ กลิทเตอร์ (Pilz; Meineke; & Gleiter. 2000: 315-325) ได้ทำการศึกษาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์อิสระ และมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่เกาะกับโปรตีนในตัวอย่างพลาสมาในมนุษย์ โดยการ ทำอนุพันธ์กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้ตัวตรวจวัดไดโอดแอเรย์ โดยจะตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดเปอร์คลอริกก่อน หลังจากนั้นจะไฮโดรไลซ์ตัวอย่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อตรวจวัดมาลอนไดอัลดีไฮด์รวม ทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ C_{18} ขนาด 125 x 3 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นอะซิโตไนทริลต่อน้ำต่อกรดอะซีติก ในอัตราส่วนร้อยละ 38:62:0.2 โดยปริมาตร วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 310 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่า ขีดจำกัด

ล่างของการวิเคราะห์ มาลอนไดอัลดีไฮด์อิสระ มีค่าเท่ากับ 25 พิโกโมลต่อมิลลิลิตร ($pmolml^{-1}$) และมาลอนไดอัลดีไฮด์รวมเท่ากับ 0.3 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ($nmolml^{-1}$) ร้อยละการกลับคืน 93.6 วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่ง่าย และมีความจำเพาะต่อมาลอนไดอัลดีไฮด์สูง

จีน พอล สเทกเฮน และคนอื่นๆ (Steghens; et al. 2001: 242-249) ได้ทำการศึกษาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์อิสระ และมาลอนไดอัลดีไฮด์รวมด้วยการทำอนุพันธ์กับไดอะมิโนแนฟทาลีน ในสภาวะกรด ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 180 นาที ในตัวอย่างพลาสมาของมนุษย์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดที่ใช้เป็นไดโอดแอเรย์ ทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ C_{18} วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นแอมโมเนียม อะซิเตท พีเอช 2.0 ต่ออะซิโตไนทริล อัตราส่วนร้อยละ 89.5:10.5 โดยปริมาตร อัตราการไหล 0.23 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 50 องศาเซลเซียส และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 311 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าในผู้หญิงอายุระหว่าง 45 ถึง 51 ปี มีมาลอนไดอัลดีไฮด์รวม 162±51 นาโนโมล และมาลอนไดอัลดีไฮด์อิสระ 24±15 นาโนโมล ส่วนผู้หญิงที่อายุเยาว์วัยกว่าระหว่าง 21 ถึง 37 ปี จะพบมาลอนไดอัลดีไฮด์รวม 138±28 และมาลอนไดอัลดีไฮด์อิสระ 19±9 นาโนโมล จากวิธีดังกล่าวให้ความไวที่ดี และความจำเพาะต่อมาลอนไดอัลดีไฮด์

ฟรานโคอีส และคนอื่นๆ (Fenaille; et al. 2001: 237–245) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการศึกษาหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในนมผง โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงใช้ตัวตรวจวัดแบบยูวี (HPLC-UV) และเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ใช้ตัวตรวจวัดแบบแมสสเปกโทรโฟโทรเมทรี (GC-MS) โดยทำอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก (TBA) และ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน (DNPH) เกิดเป็น MDA-TBA และ MDA-DNPH โดยในการวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV จะทำการแยกอนุพันธ์ 2 ชนิดด้วยระบบรีเวริส์เฟส สภาวะการแยก ดังนี้ ในการตรวจวัดอนุพันธ์ MDA-TBA คอลัมน์ Ultrasphere ODS-C_{18} วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50 มิลลิโมลาร์ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พีเอช 6.0 ต่อเมทานอล อัตราส่วนร้อยละ 60:40 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ส่วนการตรวจวัดอนุพันธ์ MDA-DNPH ใช้คอลัมน์ Ultrasphere ODS-C_{18} วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมอะซีเตรทต่ออะซิโตไนทริล อัตราส่วนร้อยละ 55:45 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 307 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ด้วย GC-MS แยกอนุพันธ์ MDA-DNPH เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 เทคนิค พบว่า การตรวจปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยเทคนิค GC-MS จะมีความจำเพาะ และถูกต้องมากกว่าการใช้เทคนิค HPLC-UV เนื่องจากสามารถกำจัดสารรบกวนตัวอื่นๆ ออกจากระบบได้

สลาโวเมอร์ มาร์ซินคาก และคนอื่นๆ (Marcinčák; et al. 2003: 491-496) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเนื้อไก่ย่าง โดยทำอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริกด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโทเมทรี และทำอนุพันธ์กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ด้วยเทคนิค

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากการศึกษาพบว่าการตรวจ วัดด้วยการทำอนุพันธ์กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน จะให้ค่าการตรวจวัดที่ต่ำกว่า เนื่องจากวิธีดังกล่าวมีความจำเพาะสูง และมีความถูกต้องกว่าการตรวจวัดด้วยการทำอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก ซึ่งจะให้ผลที่สูงมากปกติ

อาห์ ชิว ชิม และคนอื่นๆ (Sim; et al. 2003: 337-344) ได้ทำการศึกษาเพื่อยืน ยันการตรวจปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างพล าสมา โดยใช้เมทธิลมาลอนไดอัลดีไฮด์เป็นอินเทอร์นอล สแตนดาร์ด ในการศึกษามาลอนไดอัลดีไฮด์จะทำอนุพันธ์กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดเป็นยูวี วัดค่าดูดกลืนแสงสูงสุด 307 นาโนเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ เป็นอะซิโตไนทริลต่อน้ำ ต่อกรดอะซิติก อัตราส่วนร้อยละ 38:62:0.2 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที จากการศึกษาพบมาลอนไดอัลดีไฮด์ในอาสาสมัคร 20 คน เท่ากับ 13.8 ไมโครโมลาร์ และร้อยละการกลับคืน 88.5

แอนนา เดอ ลาส เฮอเลส และคนอื่นๆ (Heras; et al. 2003: 180-184) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในไส้กรอกแห้ง ทำอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริกด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรเมทรี และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนต์ ทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ LichroCART ขนาด 125 x 4 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ เป็นโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ต่ออะซิโตไนทริล อัตราส่วนร้อยละ 85:15 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากการศึกษาพบว่าการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนต์เป็นวิธีที่ง่าย มีความไวดีกว่าและมีความจำเพาะมากกว่าวิธีอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรเมทรี โดยมีค่าร้อยละการกลับคืน 92

โอลกา โกชากินา; คริสโตเฟอร์ เอกเล่ห์; และ สตีเฟน แอนดรู สเปนเซอร์ (Korchazhkina; Exley; & Spencer. 2003: 353–362) ได้ศึกษาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในปัสสาวะโดยใช้วิธีที่ มีความไวและความจำเพาะ และอาศัยหลักการเกิดอนุพันธ์ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการ ตรวจวัดด้วย เทคนิค โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สภาวะการแยกเป็นแบบเกรเดียน โดยใช้คอลัมน์เป็น Waters Symmetry™ C_{18} ขนาด 3.9 x 150 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นอะซิโตไนทริล ต่อน้ำ อัตราส่วนร้อยละ 30:70 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า สามารถแยกสารได้ภายใน 30 นาที จากการตรวจวัดโดยการใช้เทคนิค การเติมสารมาตรฐาน (standard addition) พบว่าขีดจำกัดล่างของการวิเคราะห์ มาลอนไดอัลดีไฮด์ในปัสสาวะ มีค่าเท่ากับ 56 มิลลิโมลลาร์ และมีค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 93.4± 8.6

สเตฟาเนีย ซีซา (Cesa. 2004: 2119-2122) ได้ทำการศึกษาหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในนมทารก สกัดด้วยวิธีสารละลายกรดร่วมกับวิธีกรดไทโอบาร์บิทูริก (TBA test) ซึ่งในตัวอย่างน้ำนมทารก มีการเติมน้ำมันพืช ที่มีปริมาณของกรดไขมันประเภทไม่อิ่มตัว (PUFA) เข้าไปในกระบวนการผลิตน้ำนมด้วย ผลจากการตรวจปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างนม 20 ชนิด และ

ตัวอย่างนมวัวบางชนิด เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลกันพบว่า ระดับปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในนมทารก อยู่ในช่วง 200-1200 ppb ซึ่งค่าทั้งหมดจะสูงกว่าในนมวัวถึง 5 เท่า

เดนนิส กรอทโต และคนอื่นๆ (Grotto; et al. 2007: 619–624) ได้ทำการศึกษาวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในพลาสมา โดยเทคนิค โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งศึกษาในส่วนของการไฮโดรไลซ์ด้วยเบส สกัดด้วย นอร์มาล-บิวทานอล และความเสถียรของมาลอนไดอัลดีไฮด์ ทำการแยกด้วยคอลัมน์ Eurospher-100 (150 x 4 mm) แบบรีเวริส์เฟส โดยใช้น้ำต่อเมทานอล อัตราส่วนร้อยละ 50:50 โดยปริมาตร อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า ค่าร้อยละการกลับคืนมากกว่า 95 มีค่าขีดจำกัดล่างของการวิเคราะห์ และค่าขีดจำกัดล่างในการวิเคราะห์หาปริมาณเท่ากับ 0.05 และ 0.17 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ความเสถียรของตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส มาลอนไดอัลดีไฮด์ในพลาสม าจะไม่เสถียรเมื่อเก็บตัวอย่างหลังจากไฮโดรไลส์ด้วยเบส และจะเสถียรเป็นเวลา 30 วัน หลังการทำอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก และจะเสถียรเป็นเวลา 3 วันหลังสกัดด้วย นอร์มาล-บิวทานอล ระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในพลาสมาของผู้หญิงเป็น 4.45 ± 0.81 ไมโครโมลาร์ และระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในพลาสมาของผู้ชายเป็น 60 ± 0.95 ไมโครโมลาร์ จากการทดลองนี้ เดนนิสสรุปไว้ว่าวิธีนี้มีความสามารถในการ วิเคราะห์ซ้ำ มี ความถูกต้อง มีความเสถียร มีความไว ในการตรวจวิเคราะห์ และสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องป ฏิบัติการ ทางคลินิค แบบประจำได้ จะสามารถกำ จัดสารรบกวนได้เมื่อสกัดด้วย นอร์มาล- บิวทานอล และใช้เวลาในการ วิเคราะห์ได้เร็ว การวิเคราะห์ดังกล่าวปราศจากการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งจะลดการเกิดหางของพีคได้

เดนนิส กรอทโต และคนอื่นๆ (Grotto; et al. 2009: 169-174) ได้ศึกษาถึงความสำคัญของลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และการใช้เป็นวิธีสำหรับตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ซึ่งมาลอนไดอัลดีไฮด์เป็นผลิตผลหลักที่สำคัญเพื่อใช้ศึกษาปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ ออกซิเดชัน โดยส่วนใหญ่การตรวจปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ จะทำอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก ได้อนุพันธ์เป็นสารละลาย สีแดง ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิลได้ด้วยวิธีทางอ้อมด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโทรเมทรี เนื่องจากการวัดปริมาณมาลอนไดอัลดิไฮด์โดยตรงไม่สามารถ ตรวจวัด ได้ แต่การ ตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จะให้ความจำเพาะในการวัดลิปิดเปอร์ ออกซิเดชันที่น่าเชื่อถือมากกว่า

โรเจอริโอ เมนเดส; คาลอส คาลอสโซ; และ คาลา เปสทาน่า (Mendes; Cardoso; & Pestana. 2009: 1038–1045) ได้ทำการศึกษา ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในปลากระป๋ อง ได้แก่ hake, sea bream และ sardine โดยวิธีแบบดั้งเดิมคือสเปกโ ทโฟโทเมทรีวิเคราะห์ (MDA-TBA) complex (วิธี A) เปรียบเทียบ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำอนุพันธ์กับสาร 2 ชนิด คือ กรดไทโอบาร์บิทูริก (วิธี B) และ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน (วิธี C) ทำการแยกด้วยระบบรีเวริสร์เฟส คอลัมน์ที่ใช้เป็น Phenomenex Gemini C_{18} ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตรทั้งวิธี B

และ C โดยวิธี B ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ 50 มิลลิโมลาร์ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อเมทานอล ต่ออะซิโตไนทริล อัตราส่วนร้อยละ 72:17:11 โดยปริมาตร ควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเลื่อนที่ ที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที วิธี C ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่น้ำต่ออะซิโตรไนทริล ต่อกรดอะซิตริก อัตราส่วน ร้อยละ 55:45:0.2 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองพบว่า ขีดจำกัดล่างของการวิเคราะห์ 0.16 0.10 และ 0.20 ไมโครโมลาร์ และขีดจำกัดล่างในการวิเคราะห์หาปริมาณ 0.23 0.17 และ 0.26 ไมโครโมลาร์ ตามวิธี A B และ C ส่วน ค่าร้อยละการกลับคืน วิธี A จะต่ำกว่า 71 เปอร์เซ็นต์ วิธี B ซึ่งมีค่าร้อยละการกลับคืน อยู่ในช่วง 100-108 เปอร์เซ็นต์ และวิธี C อยู่ในช่วง 90-112 เปอร์เซ็นต์ และการตรวจวัดด้วยวิธี C จะให้ความถูกต้อง และจำเพาะมากกว่าวิธี A และ B

ซาอัด อัล-ฟาวาเอียร์ และคนอื่นๆ (Al-Fawaeir; et al. 2011: 11-14) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างซีรั่ม โดยการทำอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริกด้วยเทคนิคสเปกโทโฟโท เมทรี และ ทำอนุพันธ์กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้ตัวตรวจวัดยูวี ทำการแยก ด้วยคอลัมน์ ODS-2 C_{18} วัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ เป็นอะซิโตไนทริลต่อน้ำต่อกรดอะซิติก อัตราส่วนร้อยละ 34:66:0.2 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากการศึกษาพบว่าการตรวจด้วยเทคนิคสเปกโทโฟโท เมทรีเท่ากับ 2.47±0.18 ไมโครโมลต่อลิตร ร้อยละการกลับคืนต่ำกว่า 90.0 เปอร์เซ็นต์ และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเท่ากับ 1.85±0.09 ไมโครโมลต่อลิตร ร้อยละการกลับคืน มีค่าเท่ากับ 98.8 ดังนั้นวิธีดังกล่าวง่าย เร็ว และมีความจำเพาะมากกว่าการทำอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก

จากข้อมูลเบื้องต้น พบว่า วิธีการ ตรวจหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทั่วไปนิยมใช้วิธีทางสเปกโทรเม ทรี ส่วนวิธีทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนิยมใช้วิธีการเตรียมสา รอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก แต่อย่างไรก็ตามยังพบรายงานการวิเคราะ ห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยการเตรียมสารอนุพันธ์ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน มีบ้างทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวอย่างที่ทำการวิจัย ยังไม่พบรายงานในการนำไปตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง จึงเป็นที่น่าสนใจจะทำการศึกษาในงานวิจัยนี้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบ diode array จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100
- คอลัมน์ C_{18} (SphereClone 5 µm ODS, ขนาด 250 x 4.60 mm) จากบริษัท Phenomenex
- Syringe Filters PTFE (polytetrafluoroethylene) ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท International Scientific
- ชุดกรอง mobile phase ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากบริษัท Alltech
- เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโทรโฟโทรมิเตอร์ รุ่น UV-2401 PC จากบริษัท Shimadzu
- ไมโครปิเปตขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร จากบริษัท Socorex
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (Mettier Toledo รุ่น AB104-S) จากบริษัท Mettier
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนรุ่น LaboStar จากบริษัท Siemens
- เครื่อง pH meter จากบริษัท Mettier Toledo
- เครื่องเขย่า รุ่น Vortex-genie 2 จากบริษัท Scientific Industries
- เครื่อง Centrifuge รุ่น Zentrifugen EBA 8S จากบริษัท Ilettich
- เครื่อง Water bath จากบริษัท Memmert
- เครื่องอัลตราโซนิค cleanser จากบริษัท Mettler electronic
- เครื่อง hotplate จากบริษัท Scientific Co.,Ltd

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- Acetic acid (AR grade) จากบริษัท Mallinckrodt Chemicals
- Acetonitrile (HPLC grade) จากบริษัท Merck
- 2,4-Dinitrophenylhydrazine จากบริษัท Sigma
- Hydrochloric acid (AR grade) จากบริษัท Carlo Erbra
- Lactose (AR grade) จากบริษัท Ajax Finechem
- Linoleic acid (AR grade) จากบริษัท Sigma
- Methanol (HPLC grade) จากบริษัท Merck

- Orthophosphoric acid (AR grade) จากบริษัท Carlo Erbra
- Palmitic acid (AR grade) จากบริษัท Sigma
- Potassium dihydrogen phosphate (AR grade) จากบริษัท Scharlau
- Sucrose (AR grade) จากบริษัท Fisher Sciencetific
- Sulfuric acid (AR grade) จากบริษัท Mallinckrodt Chemicals
- 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) จากบริษัท Sigma
- 2-Thiobarbituric acid (HPLC grade) จากบริษัท Fluka
- Trichloroacetic acid (AR grade) จากบริษัท Sigma

3. ตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่ม

- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที สูตรน้ำตาลน้อย 4.0 เปอร์เซ็นต์ ควรบริโภคก่อน วันที่ 28 พฤศจิกายน 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที สูตรน้ำตาลน้อย 3.75 เปอร์เซ็นต์ ผลิตวันที่ 1 มกราคม2555 สุ่มตัวอย่างสุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที สูตรน้ำตาลน้อย 4.0 เปอร์เซ็นต์ ควรบริโภคก่อนวันที่ 4 มกราคม 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที รสช็อกโกมอลต์ สูตรหวาน น้ำตาล 6.0 เปอร์เซ็นต์ ควรบริโภคก่อนวันที่ 6 มิถุนายน 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที ผสมงาดำ สูตรหวานน้ำตาล 5.5 เปอร์เซ็นต์ ควรบริโภคก่อนวันที่ 28 พฤศจิกายน 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที ผสมข้าวบาร์เลย์และมอลต์ สูตรหวานน้ำตาล 5.5 เปอร์เซ็นต์ ควรบริโภคก่อนวันที่ 20 ตุลาคม 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที สูตรเจ รสหวานน้ำตาล 7.2 เปอร์เซ็นต์ ควรบริโภคก่อนวันที่ 21 มกราคม 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที สูตรเจ รสหวานน้ำตาล 5.0 ควรบริโภคก่อนวันที่ 4 มกราคม 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองพลาสเจอร์ไรซ์ สูตรเจ รสหวานน้ำ ตาล 6.0 เปอร์เซ็นต์ ควรบริโภคก่อนวันที่ 18 มกราคม 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที สูตรเจ รสหวานน้ำตาล 5.0 เปอร์เซ็นต์ ควรบริโภคก่อนวันที่ 4 ตุลาคม 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที สูตรผ สมนมผง 1 เปอร์เซ็นต์ รสหวานน้ำตาล 8.0 เปอร์เซ็นต์ ควรบริโภคก่อนวันที่ 11 ธันวาคม 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555

- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที สูตรผสมนมผง 2 เปอร์เซ็นต์ รสหวานน้ำตาล 7.0 เปอร์เซ็นต์ ผลิตวันที่ 5 ธันวาคม2555 ควรบริโภคก่อนวันที่ 22 กันยายน 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555
- น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที สูตรผสมนมผง 2 เปอร์เซ็นต์ รสหวานน้ำตาล 7.5 เปอร์เซ็นต์ ควรบริโภคก่อนวันที่ 14 กันยายน 2556 สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555

น้ำเต้าหู้จากตลาดมีนบุรี สุ่มตัวอย่างวันที่ 25 ธันวาคม 2555

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การเตรียมอนุพันธ์สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับสาร 2 ชนิด คือ กรดไทโอบาร์บิทูริก และ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

1.1 วิธีการเตรียมอนุพันธ์ระหว่าง สารมาตรฐาน มาลอนไดอัลดีไฮด์ กับกรดไทโอบาร์บิทูริก (MDA-TBA)

การทำอนุพันธ์ของสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับกรดไทโอบาร์บิทูริก ทำการทดลองโดยใช้สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ 4 ความเข้มข้น คือ 0.0 3.0 5.0 และ 10.0 ไมโครโมลาร์ โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1.1.1 ปิเปตสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10.0 มิลลิลิตร

1.1.2 เติมสารมาตรฐาน มาลอนไดอัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร ดังนี้ 0.00 0.15 0.25 และ 0.50 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออนเติมลงไป ปริมาตร 1.0 0.85 0.75 และ 0.50 มิลลิลิตร

1.1.3 เติมสารละลายกรดไทโอบาร์บิทูริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 วินาที จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 0.0 3.0 5.0 และ 10.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

1.1.4 นำสารมาตรฐาน มาลอนไดอัลดีไฮด์ ข้างต้น ไปบ่มใน เครื่องอังไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำสารละลายไปแช่ในน้ำเย็นทันที เป็นเวลานาน 10 นาที

1.1.5 นำสารละลายมาตรฐานดังกล่าวไปบันทึกหาความยาวคลื่น ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (Maximum wavelength, (λ_{max})) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโทมิเตอร์

1.2 วิธีการเตรียมอนุพันธ์ระหว่าง สารมาตรฐาน มาลอนไดอัลดีไฮด์ กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน (MDA-DNPH) (Al-Fawaeir; et al. 2011: 11-14)

การทำอนุพันธ์ของสารมาตรฐาน มาลอนไดอัลดีไฮด์ กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ทำการทดลองโดยใช้สารมาตรฐาน มาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น คือ 1,000 ไมโครโมลาร์ โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟุริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ให้เป็น 50 มิลลิลิตร จะได้สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

1.2.2 จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานความ ข้างต้น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติม 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

1.2.3 กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง PTFE นำสารละลายใสไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (µL) บันทึกโครมาโทแกรม ที่ความยาวคลื่น ที่มีการดูดกลืนสูงสุด 307 นาโนเมตร

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา มาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรเมทรี

2.1 ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยามาลอนไดอัลดีไฮด์

ทำการ ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ กรดไทโอบาร์บิทูริก อุณหภูมิ และ เวลา ทำการตรวจวัดด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรเมตรี

2.1.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ กรดไทโอบาร์บิทูริก ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดีไฮด์

ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ กรดไทโอบาร์บิทูริก ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10 20 30 40 50 60 และ 70 มิลลิโมลาร์ โดยกำหนดสภาวะคงที่ ดังนี้

- สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์
- กรดไตรคลอโรอะซีติกความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส
- เวลา 60 นาที
- ทดลองซ้ำ 5 ซ้ำ (n=5)

2.1.2 ศึกษาผลของ อุณหภูมิที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก

ทำการศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 50 60 70 80 90 และ 95 องศาเซลเซียสโดยกำหนดสภาวะคงที่ ดังนี้

- สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์
- กรดไตรคลอโรอะซีติกความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- กรดไทโอบาร์บิทูริกความเข้มข้น 25.0 มิลลิโมลาร์
- เวลา 60 นาที
- ทดลองซ้ำ 5 ซ้ำ (n=5)

2.1.3 ศึกษาผลของ เวลาที่มีผลต่อกา รทำปฏิกิริยา ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก

ทำการศึกษาที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 30 40 50 60 และ 70 นาที โดยกำหนดสภาวะคงที่ ดังนี้

- สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์
- กรดไตรคลอโรอะซีติกความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- กรดไทโอบาร์บิทูริกความเข้มข้น 25.0 มิลลิโมลาร์
- อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
- ทดลองซ้ำ 5 ซ้ำ (n=5)

ตอนที่ 3 ศึกษาการแยก มาลอนไดอัลดีไฮด์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง

3.1 ศึกษาการแยกด้วยวิธี MDA-TBA

3.1.1 ศึกษาความเข้มข้นของ บัฟเฟอร์ และอัตราส่วนของโมบายเฟส (Mobile phase) ที่มีผลต่อการแยกด้วยวิธี MDA-TBA

วิธีการเตรียมสารละลาย และสารละลายบัฟเฟอร์

1. เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์

ชั่ง KOH ปริมาณ 28.055 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งคนให้ละลาย จากนั้นเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ล้างสารที่ค้างในบีกเกอร์ด้วย น้ำปราศจากไอออน 2-3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละล ายบัฟเฟอร์ โปแตสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4) ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิโมลาร์

2.1 ชั่ง KH_2PO_4 ปริมาณ 2.7218 4.0827 5.4436 6.8045 และ 8.1654 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.2 เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งคนให้ละลาย เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ล้างสารที่ค้างในบีกเกอร์ด้วยน้ำ ปราศจากไอออน 2-3 ครั้ง เติมน้ำให้เป็น 800 มิลลิลิตร

2.3 ปรับ pH ให้ได้ 6.00 ด้วยโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์

2.4 นำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำ กลั่นปราศจากไอออน ให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายบัฟเฟอร์ไปกรอง และไล่ฟองอากาศ (degas) ด้วยเครื่องอัลตราโซนิค

การทดลอง

ทำการศึกษาโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นต่างๆ ของบัฟเฟอร์ KH_2PO_4 และอัตราส่วนระหว่างบัฟเฟอร์ KH_2PO_4 กับเมธานอล (CH_3OH) มีดังนี้

- ความเข้มข้นบัฟเฟอร์ KH_2PO_4 ที่ทดลอง ได้แก่ 20 30 40 50 และ 60 มิลลิโมลาร์
- อัตราส่วนความเข้มข้นบัฟเฟอร์ KH_2PO_4 และเมธานอล อัตราส่วนร้อยละ ได้แก่ 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30

โดยกำหนดสภาวะที่คงที่ ดังนี้

- ค่า pH บัฟเฟอร์ KH_2PO_4 แต่ละความเข้มข้น 6.00
- อัตราการไหลวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- สารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์
- คอลัมน์ C_{18} (4.6 x 250 mm)
- อุณหภูมิห้อง (ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)
- ทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3)

3.1.2 ศึกษาผลของ pH ที่มีผลต่อการแยก MDA-TBA

ทำการศึกษาที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 5.40 5.60 5.80 6.00 6.20 6.40 6.60 6.80 และ 7.00 โดยกำหนดสภาวะที่คงที่ดังนี้

- อัตราส่วนความเข้มข้นบัฟเฟอร์ 50 mM KH_2PO_4 และเมธานอล คือ 60:40
- อัตราการไหลวัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์
- คอลัมน์ C_{18} (4.6 x 250 mm)
- อุณหภูมิห้อง (ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)
- ทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3)

3.1.3 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่มีผลต่อการแยก MDA-TBA

ทำการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (Flow rate) ได้แก่ 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยกำหนดสภาวะที่คงที่ ดังนี้

- อัตราส่วนความเข้มข้นบัฟเฟอร์ 50 mM KH_2PO_4 (pH = 6.80) และเมธานอล คือ 60:40
- สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์
- คอลัมน์ C_{18} (4.6 x 250 mm)
- อุณหภูมิห้อง (ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)
- ทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3)

3.2 ศึกษาการแยกด้วยวิธี MDA-DNPH

ทำการศึกษาการแยกอนุพันธ์ MDA-DNPH โดยกำหนดที่สภาวะต่างๆ ดังนี้

- ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ 100 ไมโครโมลาร์
- อัตราการไหลวัฏภาคเลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- คอลัมน์ C_{18} (4.6 x 250 mm)
- อุณหภูมิห้อง (ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)
- ทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3)

3.2.1 ศึกษาการแยกด้วยกรดอะซิติกความเข้มเข้นร้อยละ 0.2 และ 0.5 (v/v) ต่ออะซิโตไนทริล โดยปริมาตร และอัตราส่วนอะซิโตไนทริลต่อน้ำ

- ทำการศึกษากรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (v/v) ต่ออะซิโตไนทริล โดยปริมาตร ที่อัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 40:60 50:50 60:40 62:38 65:35 70:30 75:25 และ 80:20

- ทำการศึกษากรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (v/v) ต่ออะซิโตไนทริล โดยปริมาตร ที่อัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 55:45 60:40 และ 62:38

- ทำการศึกษาด้วยอะซิโตไนทริลต่อน้ำ โดยปริมาตร ที่อัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 45:55 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30

3.2.2 ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

ทำการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน อุณหภูมิ และ เวลา

3.2.2.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดร าซีนที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดีไฮด์

ทำการศึกษาผลของความเข้มข้น 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.05 0.10 0.50 1.0 5.0 10.0 และ 20.0 มิลลิโมลาร์

การเตรียมสารละลาย 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

ชั่ง 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนปริมาณ 0.0010 0.0020 0.0099 0.0198 0.0990 0.1980 และ 0.3960 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.0 นอร์มอล จากนั้นเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลายดังกล่าว 2-3 ครั้ง และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.05 0.10 0.50 1.0 5.0 10.0 และ 20.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

โดยกำหนดสภาวะคงที่ ดังนี้

- ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ 100 ไมโครโมลาร์
- อัตราส่วนอะซิโตไนทริลต่อน้ำ 55:45
- อัตราการไหลวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- คอลัมน์ C_{18} (4.6 x 250 mm)
- อุณหภูมิห้อง (ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)
- ทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3)

3.2.2.2 ศึกษาผลของ อุณหภูมิ และเวลา ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

ทำการศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30 40 60 และ 80 องศาเซลเซียส แต่ละช่วงอุณหภูมิทดลองที่เวลา 10 และ 30 นาที โดยกำหนดสภาวะคงที่เหมือนกับหัวข้อ 3.2.2.1

3.2.2.3 ศึกษาผลของเวลาที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่าง ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนที่อุหภูมิห้อง

ทำการศึกษาที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 10 15 30 45 และ 60 นาที โดยกำหนดสภาวะคงที่เหมือนกับหัวข้อ 3.2.2.1

ตอนที่ 4 ศึกษาผลของไขมัน และ น้ำตาล

4.1 ศึกษาผลของไขมัน และน้ำตาลทำการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-TBA

ทำการศึกษาผลของไขมัน คือ ปาล์มมิติก และลิโนเลอิก โดยนำสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 100.0 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมด้วยกรดปาล์มมิติกความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติมกรดไตรคลอโรอะซิติก ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร และกรดไทโอบาร์บิทูริกความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ผสมให้เข้ากัน และให้ความร้อนบนเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทดลองเช่นเดิม แต่เปลี่ยนเป็นใช้กรดไขมันลิโนเลอิก ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ทำการศึกษาผลของน้ำตาล คือ น้ำตาลแลคโทส และ น้ำตาล ซูโครส โดยนำสารละลายมาตรฐาน มาลอนไดอัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 100.0 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมด้วยน้ำตาลแลคโทส ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมกรดไตรคลอโรอะซิติก ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร และกรดไทโอบาร์บิทูริกความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ผสมให้เข้ากัน และให้ความร้อนบนเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทดลองเช่นเดิม แต่เปลี่ยนเป็นใช้น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5.0 เปอร์เซ็นต์ ฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการศึกษาผลของไขมันและน้ำตาลรวม โดยทำการเตรียมส ารผสมตามตาราง 4 ดังนี้

ตาราง 4 การศึกษาผลของไขมันและน้ำตาลที่มีผลต่อ TBA

ชุดการทดลองที่	สารมาตรฐาน MDA 100 µM (ml)	กรดปาล์มมิติก 5%(ml)	กรดลิโนเลอิก 5%(ml)	น้ำตาลแลคโทส 50%(ml)	น้ำตาลซูโครส 50%(ml)	กรดไตรคลอโรอะซิติก 5%(ml)	25 mM TBA (ml)
1	0.25	-	-	-	-	3	1
2	0.25	1	-	0.5	-	2.25	1
3	0.25	-	1	-	0.5	2.25	1
4	0.25	1	1	0.5	0.5	0.75	1

ทำการศึกษาผลของฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตน ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1,000 ไมโครโมลาร์ ทำการทดลองโดยเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายข้างต้นมา 50 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เติมน้ำปราศจากไอออน 950 ไมโครลิตร เติมกรดไทโอบาร์บิทูริกความเข้มข้น 25.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในเครื่องอังน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

4.2 ศึกษาผลของไขมัน และน้ำตาลทำการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-DNPH

ทำการศึกษาผลของไขมัน คือ ปาล์มมิติก และ ลิโนเลอิก ปิเปต นำสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมกรดปาล์มมิติกความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟุริกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 จากนั้นปิเปตสารข้างต้นมา 1.0 มิลลิลิตร เติม 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮ ดราซีนความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และให้ความร้อนบนเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทดลองเช่นเดิม แต่

เปลี่ยนเป็นใช้กรดไขมันลิโนเลอิก ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ทำการศึกษาผลของน้ำตาล คือ น้ำตาลแลคโทส และ น้ำตาลซูโครส ปิเปตนำสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลแลคโทสความ เข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟุริกความเข้มข้น 1.0 จากนั้นปิเปตสารข้างต้นมา 1.0 มิลลิลิตร เติม 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และให้ความร้อนบนเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทดลองเช่นเดิมแต่เปลี่ยนเป็นใช้ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5.0 เปอร์เซ็นต์ ฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการศึกษาผลของไขมันและน้ำตาลรวม โดยทำการเตรียมสารผสมตามตาราง 5 ดังนี้

ตาราง 5 การศึกษาผลของไขมันและน้ำตาลที่มีผลต่อ DNPH

ชุดการทดลองที่	สารมาตรฐาน MDA 1000 µM(ml)	กรดปาล์มมิติก 5%(ml)	กรดลิโนเล อิก 5%(ml)	น้ำตาลแลคโทส 50%(ml)	น้ำตาลซูโครส 50%(ml)
1	0.25	-	-	-	-
2	0.25	10	-	5	-
3	0.25	-	10	-	5
4	0.25	10	10	5	5

ทำการศึกษาผลของฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตน ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1,000 ไมโครโมลาร์ ทำการทดลองปิเปตสารละลายข้างต้นมา 0.5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองเหมือนหัวข้อ 6.2.2-6.2.3 จากนั้นปิเปตมาปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติม 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

ตอนที่ 5 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

5.1 ศึกษาหา Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

5.1.1 ศึกษาทำการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-TBA

ทำการศึกษาโดย spike สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.10 ไมโครโมลาร์ ทำการทดลองดังนี้

ปิเปตสารละลาย กรดไตรคลอโรอะซีติก ความเข้มข้น ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10.0 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐาน

มาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 995 ไมโครลิตร ทดลองตามหัวข้อ 6.1.3-6.1.5

5.1.2 ศึกษาทำการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-DNPH

ทำการศึกษาโดย spike สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 3.0 ไมโครโมลาร์ ทำการทดลองดังนี้

ปิเปตสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟุริกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ให้เป็น 50 มิลลิลิตร ทดลองตามหัวข้อ 6.2.2-6.2.3 จากนั้นคำนวณหาค่า สมการ 5 และ 6

- LOD = 3SD ..... (5)
- LOQ = 10SD ..... (6)

5.2 ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืน (%recovery) และความแม่นยำ (precision)

5.2.1 ศึกษาทำการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-TBA

ชั่งตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง ชนิดยูเอชทีปริมาณ 12.5 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดี ไฮด์ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ ปราศจากไอออนให้เป็น 25 มิลลิลิตร จากนั้นทดสอบเหมือนข้อ 7.1.2-7.1.3 ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.0 ไมโครโมลาร์ ทำการทดลอง 10 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละการกลับคืน

5.2.2 ศึกษาทำการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-DNPH

ชั่งตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองปริมาณ 12.5 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.875 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำ ปราศจากไอออนให้เป็น 25 มิลลิลิตร จากนั้นทดสอบเหมือนข้อ 7.2.2-7.2.3 ความเข้มข้นสุดท้าย 15.0 ไมโครโมลาร์ ทำการทดลอง 10 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละการกลับคืน

การคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน จากสมการ 7

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{((C_{\text{in sample}} + C_{\text{added}}) - C_{\text{in sample}})) \times 100}{C_{\text{added}}} \quad \text{..... (7)}$$

เมื่อ $C_{\text{in sample}}$ คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์

C_{added} คือ ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง

ตอนที่ 6 การสร้างกราฟมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์

6.1 เตรียมกราฟมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยการทำอนุพันธ์ กับกรดไทโอบาร์บิทูริก

ทำการทดลองโดยเตรียมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ 6 ความเข้มข้น คือ 0.0 0.2 0.50 1.0 2.0 และ 5.0 ไมโครโมลาร์ โดยมีวิธีการเตรียมต่างๆ ดังนี้

6.1.1 ปิเปตสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10.0 มิลลิลิตร

6.1.2 เติมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรดังนี้ 0.00 10.0 25.0 50.0 100.0 และ 250.0 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออนเติมลงไปปริมาตร 1,000 990 975 950 900 และ 750 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.0 0.2 0.5 1.0 2.0 และ 5.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

6.1.3 เติมสารละลายกรดไทโอบาร์บิทูริก ความเข้มข้น 25.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 วินาที

6.1.4 นำสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ข้างต้น ไปบ่มในเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที เป็นเวลานาน 10 นาที

6.1.5 กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ด้วยกระดาษกรอง PTFE นำไปฉีดเข้าเครื่อง โครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอเรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 531 นาโนเมตร

6.2 เตรียมกราฟมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยการทำอนุพันธ์กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

ทำการทดลองโดยเตรียมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ 6 ความเข้มข้น คือ 0.0 5.0 10.0 15.0 20.0 และ 25.0 ไมโครโมลาร์ โดยมีวิธีการเตรียมต่างๆ ดังนี้

6.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 และ 1.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟุริกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ให้เป็น 50 มิลลิลิตร จะได้สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.0 5.0 10 20 และ 25 ไมโครโมลาร์

6.2.2 จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติม 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยาในที่มืด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่องอังไอน้ำ

6.2.3 กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง PTFE นำสารละลายใสไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บันทึกโครมาโทรแกรม โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 307 นาโนเมตร

ตอนที่ 7 วิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง

ตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองที่นำมาทดลอง ได้แก่ น้ำนมถั่วเหลืองชนิด home made จัดซื้อจากตลาดสดในเขตกรุงเทพ น้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่มชนิดสูตรเจ สูตรผสมน้ำตาล สูตรผสมนมผง และอื่นๆ จัดซื้อจากซุบเปอร์มาร์เก็ต

7.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองตรวจวัดด้วยวิธี MDA-TBA

7.1.1 ชั่งตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองปริมาณ 12.50 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนเพื่อละลายน้ำนมถั่วเหลือง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้เป็น 25 มิลลิลิตร

7.1.2 นำตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองไปบ่มใน เครื่องอังไอน้ำ ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

7.1.3 ปิเปตสารละลายไตรคลอโรอะซีติกความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองปริมา ตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดไทโอบาร์บิทูริกความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 วินาที นำตัวอย่างดังกล่าวไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสของ ตัวอย่างไปบ่มใน เครื่องอังไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำสารละลายไปแช่ในน้ำเย็นทันที เป็นเวลานาน 10 นาที เก็บตัวอย่างเพื่อไว้ทดลองต่อไป

7.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองตรวจวัดด้วยวิธี MDA-DNPH

7.2.1 ชั่งตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือ งปริมาณ 12.50 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนเพื่อละลายน้ำนมถั่วเหลือง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้เป็น 25 มิลลิลิตร

7.2.2 นำตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองไปบ่มใน เครื่องอังไอน้ำ ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

7.2.3 ปิเปตสารละลายไตรคลอโรอะซีติกความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 วินาที นำตัวอย่างดังกล่าวไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสของตัวอย่างลงในหลอดทดลองอันใหม่ เติม 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มใน เครื่องอังไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไปแช่ในน้ำเย็นทันที เป็นเวลานาน 10 นาที เก็บตัวอย่างเพื่อไว้ทดลองต่อไป

7.3 การทดลองวิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง

นำตัวอย่างจากข้อ 7.1.3 และ 7.2.3 กรองด้วยกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง โครมาโทกราฟี ของเหลว สมรรถนะสูง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทดลองตามสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองตอนที่ 3 บันทึกพื้นที่ใต้พีคของพีคสารอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์ เพื่อนำไปเทียบกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ คำนวณหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง

บทที่ 4
ผลการทดลอง

สำหรับการศึกษาการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอผลการวิจัยตามลำดับดังนี้

1. ผลการศึกษาเตรียมอนุพันธ์ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับกรดไทโอบาร์บิทูริก และ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

2. ผลการศึกษาปัจจัยแปรผันในขั้ นตอนการเตรียมอนุพันธ์ MDA-TBA ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรเมทรี

3. ผลการศึกษาปัจจัยแปรผันในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA และ MDA-DNPH ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

4. ผลการศึกษาสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมที่อยู่ในระบบ

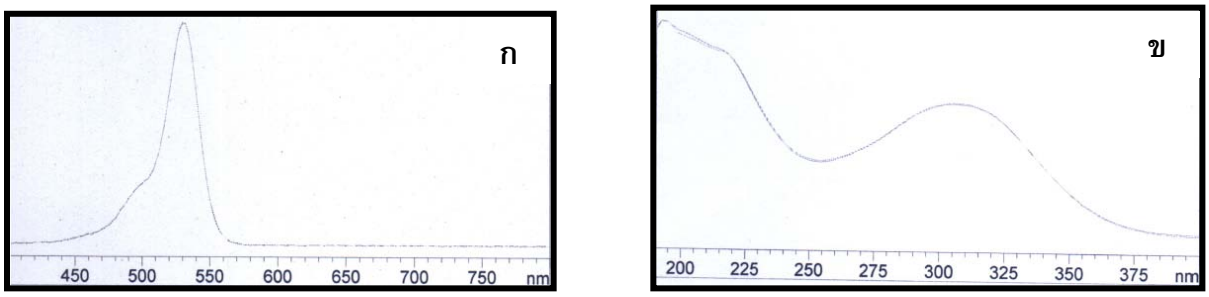
5. ผลการศึกษาการหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

6. ผลการตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่มจากตลาดที่มีจำหน่ายทั่วไป น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที แบบเจ และแบบผสมนมผง

ตอนที่ 1 ผลการศึกษาการเตรียมอนุพันธ์ระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับกรดไทโอบาร์บิทูริก และ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้อาศัยหลักการเตรียมอนุพันธ์ กับกรดไทโอบาร์บิทูริก และ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน เมื่อ มาลอนไดอัลดีไฮด์ทำปฏิ กิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก เกิด อนุพันธ์ MDA-TBA adduct เป็นสารสี แดง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 532-535 นาโนเมตร (TBARS) (Grotto; et al. 2009: 169-174) และมาลอนไดอัลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน เกิดอนุพันธ์ MDA-DNPH มีสีเหลือง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 310 นาโนเมตร (λ_{max}=310 nm) (Berdyshev. 2011: 680-693) โดยงานวิจัยนี้จะทำการแยกส ารอนุพันธ์สองชนิดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมถรรนะสูง ทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ที่ความยาวคลื่น และระบบการแยกที่ต่างกัน

โดยมาลอนไดอัลดีไฮด์จะเกิดปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation) กับกรดไทโอบาร์บิทูริกสองโมเลกุลที่ตำแหน่งหมู่คาร์บอกซิล เกิดเป็นสารที่มีสีแดง เรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ในสภาวะที่เป็นกรด ดังภาพประกอบ 3 และมาลอนไดอัลดีไฮด์เกิดปฏิกิริยากับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน เกิดเป็นวงไพราโซล ในสภาวะที่เป็นกรด ดังภาพประกอบ 4 โดยนำอนุพันธ์สองชนิด ไปบันทึกสเปกตรัมที่ ดูดกลืนแสง พบว่าอนุพันธ์ของ MDA-TBA ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 531 นาโนเมตร และอนุพันธ์ของ MDA-DNPH จะดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 307 นาโนเมตร ดังภาพประกอบ 8

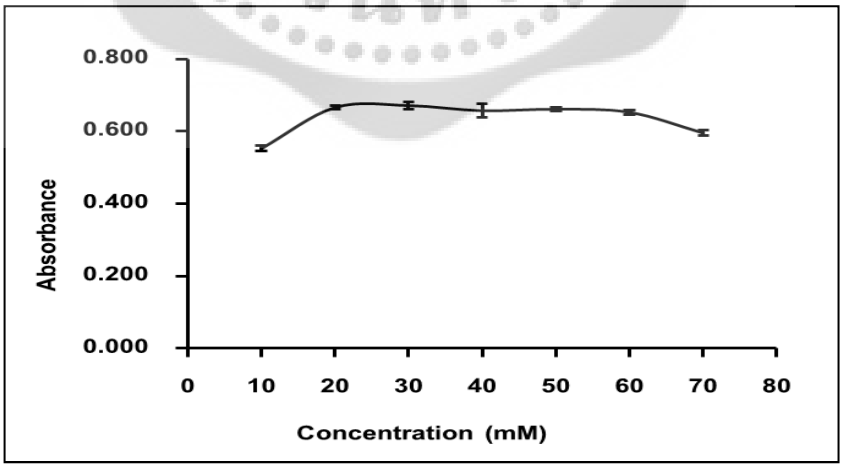


ภาพประกอบ 8 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ (ก) λ_{max}=531 nm MDA-TBA และ (ข) λ_{max}=307 nm MDA-DNPH

ตอนที่ 2 ผลการศึกษาปัจจัยแปรผันในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ MDA-TBA ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรเมตรี

2.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ กรดไทโอบาร์บิทูริกที่มีผลต่อการ ทำอนุพันธ์กับมาลอนไดอัลดีไฮด์

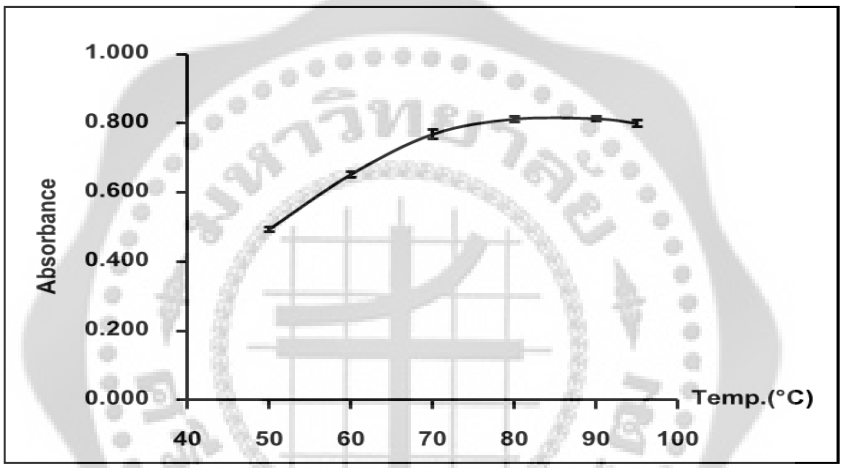
การศึกษา ความเข้มข้นของกรดไทโ อบาร์บิทูริกที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ MDA-TBA ซึ่งทำการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของกรดไทโอบาร์บิทูริกตั้งแต่ 10 ถึง 70 มิลลิโมลาร์ จากภาพประกอบ 9 จะพบว่าเมื่อทำการเพิ่มระดับความเข้มข้นของกรดไทโอบาร์บิทูริกขึ้นเรื่อยๆ จะส่งผลทำให้การดูดกลืนแสงลดลงตามลำดับ สาเหตุเนื่องมาจากเมื่อความเข้มข้นของกรดไทโอบาร์บิทูริกเพิ่มขึ้น โมเลกุลดังกล่าวจะไปรบกวน จากการศึกษาจะพบว่าที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำการศึกษาจะอยู่ที่ 25 มิลลิโมลาร์



ภาพประกอบ 9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดไทโอบาร์บิทูริก ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์และค่าการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ MDA-TBA

2.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำอนุพันธ์ระหว่างกรดไทโอบาร์บิทูริกกับมาลอนไดอัลดีไฮด์

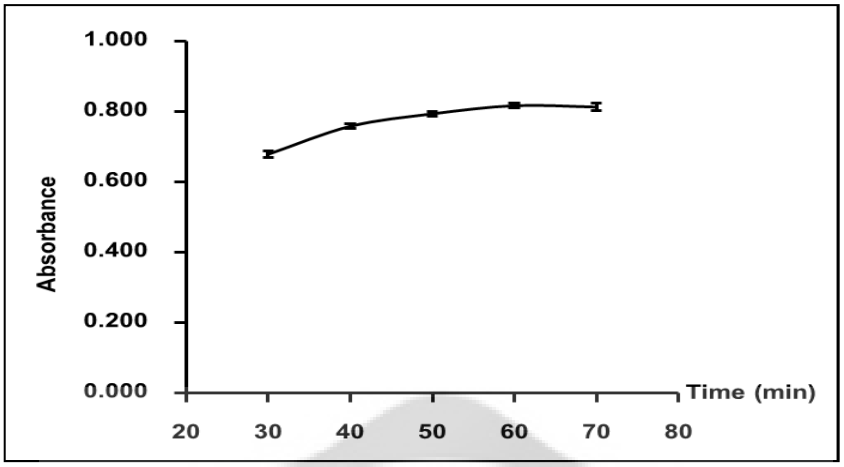
การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมการเตรียมอนุพันธ์ MDA-TBA ซึ่งทำการศึกษาโดยการให้ความร้อนเพื่อเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 ถึง 95 องศาเซลเซียส จากภาพประกอบ 10 จะพบว่าเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น และจะเกิดสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 ถึง 90 องศาเซลเซียส โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ และลดลงเมื่อให้ความร้อนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากการศึกษาจะพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบ 10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าการดูดกลืนแสงอนุพันธ์ MDA-TBA

2.3 ศึกษาผลของเวลาที่มีผลต่อการทำอนุพันธ์ระหว่างกรดไทโอบาร์บิทูริกกับมาลอนไดอัลดีไฮด์

การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ MDA-TBA ทำการศึกษาโดยการให้ความร้อนเพื่อเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลาตั้งแต่ 30 ถึง 70 นาที จากภาพประกอบ 11 จะพบว่าเมื่อทำการเพิ่มเวลาขึ้นเรื่อยๆ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น และปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์ที่เวลา 60 นาที และเมื่อทำการศึกษาโดยการเพิ่มเวลาเป็น 70 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป จะพบว่าปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ซึ่งจากการศึกษาจะพบว่าเวลาที่เหมาะสมจะอยู่ที่ 60 นาที



ภาพประกอบ 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์และค่าการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ MDA-TBA

ตอนที่ 3 ศึกษาการแยกมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.1 ศึกษาการแยกด้วยวิธี MDA-TBA

3.1.1 ศึกษาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ และอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA

ในการศึกษา ทางโครมาโทกราฟี องค์ประกอบทั่วไปที่ใช้ในการพิจารณาในการแยกหรือรูปร่างของพีคในระบบรีเวริสร์เฟส ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ pH และอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ สิ่งเหล่านี้ล้วนมีผลต่อการแยก ดังนั้นการศึกษาจะเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์ในเทอมของ H (Height equivalent to a theoretical plate) โดยทฤษฎีที่ใช้อธิบาย เรียกว่า ทฤษฎีเพลต (plate theory) ซึ่งอธิบายไว้ว่า อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับความสูงของเพลต ถ้ามีจำนวนเพลตที่บรร จุอยู่ในคอลัมน์มากประสิทธิภาพการแยกก็จะดี ซึ่งจำนวนเพลตจะแปรผันตรง กับความยาว ของคอลัมน์และแปรผกผันกับ H โดยทฤษฎีดังกล่าวไม่สามารถอธิบายได้ครอบคลุม ดังนั้นจึงต้องอาศัยทฤษฎีอัตรา (rate theory) ที่สามารถอธิบายพฤติกรรมทางโครมาโทกราฟีได้ ซึ่งทำเกิดแบนด์กว้างในกระบวนการชะสาร โดยมีสาเหตุที่สำคัญ 3 ประการ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ ชะสาร คือ กลไกของการเกิดการแพร่กระจาย ซึ่งมี 3 กลไก คือ การแพร่กระจายแบบเอ็ดดี้ (eddy diffusion) การแพร่กระจายแบบลองจิ ทูดินอล (longitudinal diffusion) และ การเคลื่อนมวลโดยการส่งผ่าน (mass transfer effect) ซึ่งกลไกดังกล่าวจะอธิบายผลของตัวแปรทั้ง 3 ออกเป็นเทอมต่างๆ ทั้งสิ้น 3 เทอม ที่มีความสัมพันธ์กับค่า H ตามสมการ Van Deemter ในสมการที่ 8

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \qquad \text{..... (8)}$$

H = HETP

A = eddy diffusion

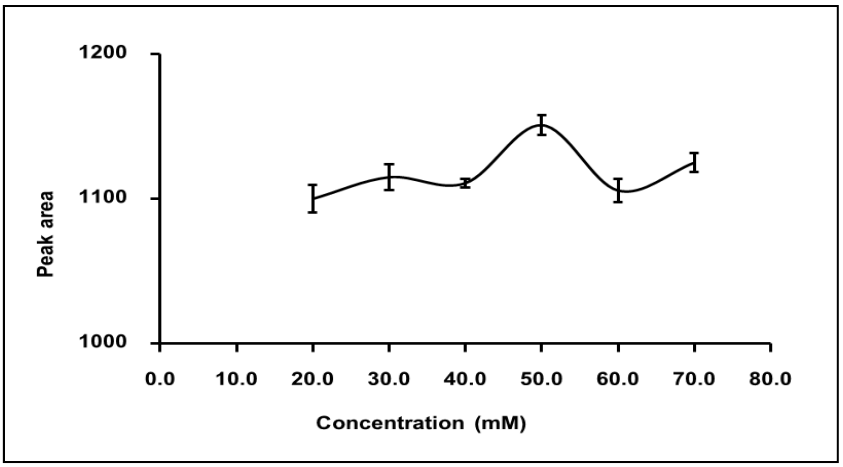
B = longitudinal diffusion

C = mass transfer effect

u = linear velocity

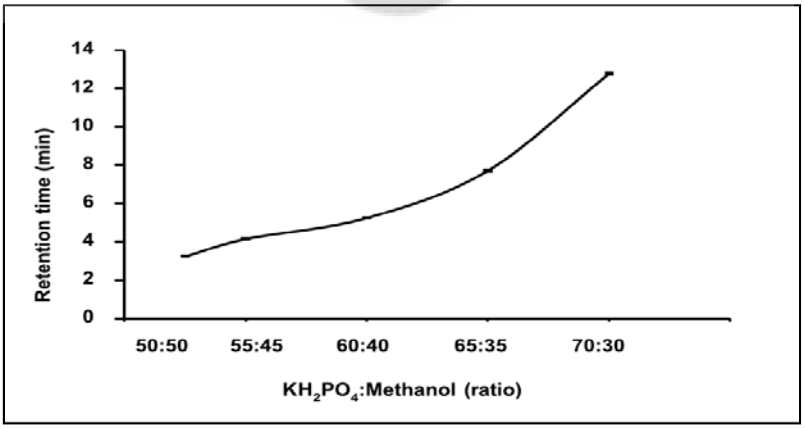
จากสมการจะเห็นได้ชัดเจนว่า ถ้าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (u) มีค่าน้อย จะทำให้เทอม B มีค่ามาก คือ ตัวถูกละลายแพร่ กระจายอยู่ในคอลัมน์ได้นานขึ้น จะส่งผลให้ H จะมากตาม จะทำให้ประสิทธิภาพการแยกต่ำ ดังนั้นควรเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มากขึ้น เพื่อลดเทอม B ในทางกลับกันถ้าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (u) มีค่ามากขึ้น จะทำให้เทอม C มากขึ้นด้วย เนื่องจากตัวถูกละลายมีการแพร่ยังไม่ถึงสมดุลระหว่างเฟสอยู่กับที่และ วัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ H มากตาม ประสิทธิ การแยกเลยต่ำ ดังนั้น เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (u) และประสิทธิภาพของคอลัมน์ (H) ในทางโครมาโทกราฟี โดยการลดขนาดอนุภาคลง ไม่ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง จะทำให้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากการศึกษาผลของ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการแยก ที่ระดับความเข้มข้น 20 30 40 50 60 และ 70 มิลลิโมลาร์ โดย (Grotto; et al. 2009: 169-174) พบว่าที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จะให้สัญญาณของพีคที่สูงใกล้เคียงกับ 60 และ 70 มิลลิโมลาร์ แต่พีคที่ได้มีความสมมาตร และมีหางน้อย กว่า เวลาที่ใช้ในการแยก คือ 5.25 นาที และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นที่ 70 มิลลิโมลาร์ จะพบว่าพีค MDA-TBA จะมีหางเพิ่มมากขึ้น ดังภาพประกอบ 12 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์มากขึ้นจะทำให้สารถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้นานมากขึ้น แพร่กระจายถึงจุดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง คือเฟสที่อยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ทำให้ประสิทธิภาพการแยกดี ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการเลือกใช้ คือ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์



ภาพประกอบ 12 ผลของความเข้มข้น KH_2PO_4 ต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA

จากการศึกษาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่มีผลต่อการแยก สาร MDA-TBA โดยศึกษาที่อัตราส่วนระหว่าง KH_2PO_4 กับเมธานอล ในอัตราส่วนดังนี้ 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30 ผลจากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่าง KH_2PO_4 กับเมธานอล ที่ 60:40 จะให้สัญญาณของพีคสูง เกิดการแยกได้ดี ซึ่ง MDA-TBA จะถูกหน่วงในคอลัมน์ไม่นาน และใช้เวลา 5.24 นาที ดังภาพประกอบ 13 เมื่อศึกษาโดยเพิ่มอัตราส่วนของ KH_2PO_4 และลดเมธานอล พบว่า MDA-TBA จะถูกหน่วงในคอลัมน์ได้นานมากขึ้น ทำให้สารใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ได้นานมากขึ้น ส่งผลทำให้เกิดการแยกนาน พีคที่ได้เกิดแถบกว้าง และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเมธานอล และลด KH_2PO_4 พบ MDA-TBA จะทำให้ถูกหน่วงในคอลัมน์ได้น้อยลง ทำให้การแยกได้ไม่ดี ซึ่งสอดคล้องทฤษฎี ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการเลือกใช้ คือ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ต่อเมธานอล อัตราส่วนร้อยละ 60:40

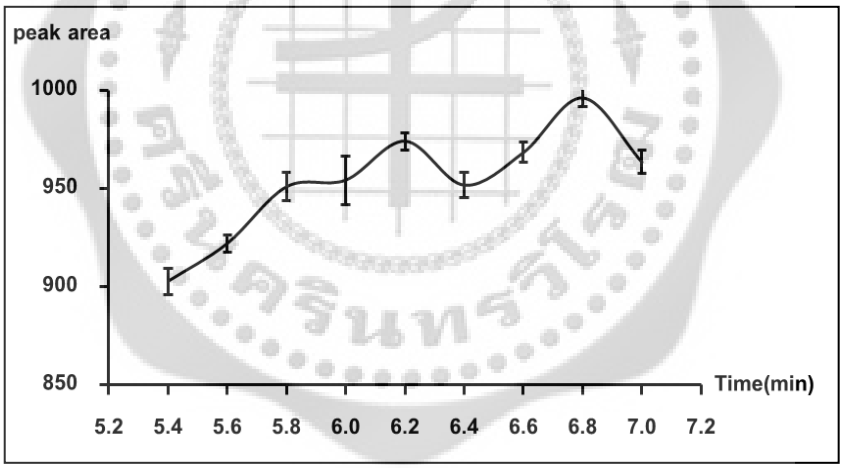


ภาพประกอบ 13 ผลการแยกสารที่แปรผันตามอัตราส่วนระหว่าง KH_2PO_4 กับเมธานอล

3.1.2 ศึกษาผลของ pH ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA

โดยทั่วไปสารประกอบจะมีความไม่เสถีย ร หรือสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง เนื่องจาก pH ในระบบเปลี่ยนแปลงไป โดยจะส่งผลต่อการวิเคราะห์ ซึ่งอาจจะทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้เนื่องจากการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย ด้วยสาเหตุดังกล่าวในระบบการวิเคราะห์ MDA-TBA ที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์จึงมีการควบคุม pH ให้คงที่ตลอดการวิเคราะห์ โดยบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้เป็น KH_2PO_4 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่มีค่า ความจุของสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer capacity) ที่สูง pH ของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย โดย pH ที่ใช้ในการศึกษาจะอยู่ในช่วง pH ที่เป็นกลาง โดย (Fanille; et al. 2001: 237-245) ได้ทำการศึกษาโดยใช้โปแตสเซียม ฟอสเฟตที่ pH เท่ากับ 6.0 ในการแยก MDA-TBA ในตัวอย่างนมผง

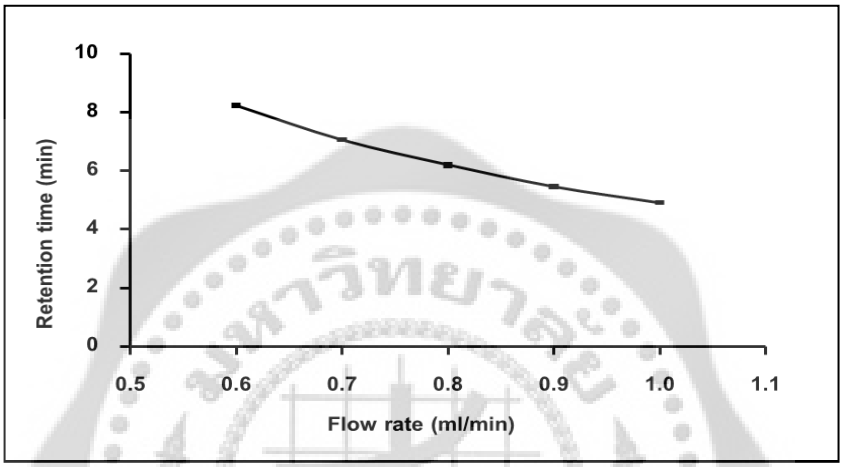
โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแยก MDA-TBA ด้วยบัฟเฟอร์ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยช่วง pH ที่ศึกษา คือ 5.4 5.6 5.8 6.0 6.2 6.4 6.6 6.8 และ 7.0 จากการศึกษาพบว่าเมื่อค่อยๆ เพิ่ม pH ของสารละลาย บัฟเฟอร์ จะมีผลทำให้สารถูกหน่วง ในคอลัมน์ลดลง พีคที่ได้จะแคบลง และทำให้สัญญา ณสูงขึ้นตามลำดับ ดังภาพประกอบ 14 และเมื่อพิจารณาจะพบว่าที่ pH 6.8 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์



ภาพประกอบ 14 ผลของ pH ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA

3.1.3 ศึกษา ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเ คลื่อนที่ที่ มีผลต่อการแยกอนุพันธ์MDA-TBA

จากการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเ คลื่อนที่ดังนี้ 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบที่ 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที ให้สัญญาณที่สูง แบนด์พีคแคบ ใช้เวลา 7.063 นาที จากการศึกษาพบว่าที่ 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที คือสภาวะเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ ภาพประกอบ 15

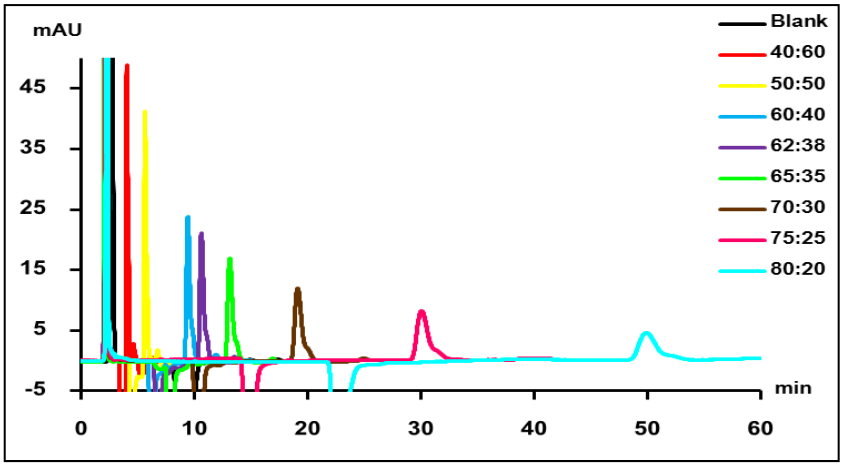


ภาพประกอบ 15 ผลของการแปรผันอัตราการไหลวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-TBA

3.2 ศึกษาการแยกด้วยวิธี MDA-DNPH

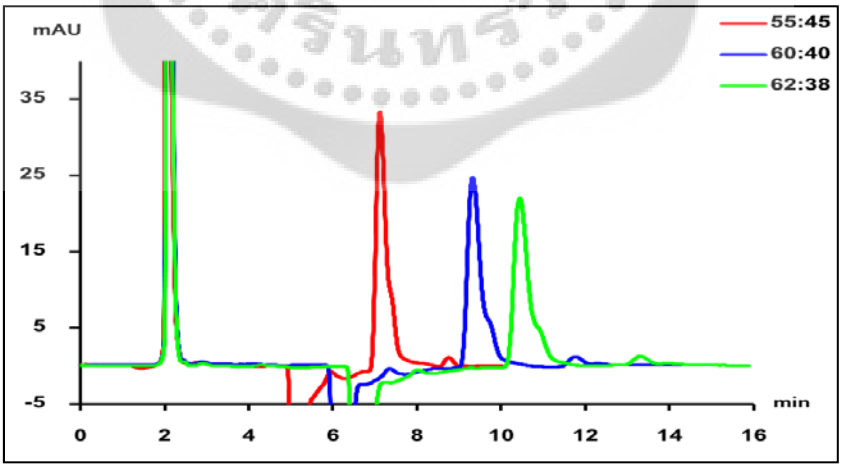
3.2.1 ศึกษาการแยกด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ 0.5 (v/v) ต่ออะซิโตไนทริล โดยปริมาตร และอัตราส่วนอะซิโตไนทริลต่อน้ำ

การศึกษาการแยกอนุพันธ์ MDA-DNPH โดยใช้อัตราการไหลของ วัฏภาคการเคลื่อนที่กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (v/v) ต่ออะซิโตไนทริล ในอัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 40:60 50:50 60:40 62:38 65:35 70:30 75:25 และ 80:20 ดังภาพประกอบ 16 พบว่าเมื่อเพิ่มอะซิโตไนทริลมากขึ้น จะทำให้สารไม่ถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์ได้นาน แบนด์ที่ได้จะแคบ และการแยกสารจะไม่ดี แต่เมื่อค่อยๆ ลดปริมาณอะซิโตไนทริล และเพิ่มปริมาณกรดจะพบว่าจะทำให้สารแยกได้ดีมากขึ้น เนื่องสารถูกหน่วงในคอลัมน์นานมากขึ้น แต่จะทำให้พีคเกิดแบนด์กว้าง และสัญญาณลดลงตามลำดับ และพีคที่ได้ไม่สมมาตร ดังภาพประกอบที่ 16 จากการศึกษายังต้องพิจารณาสภาวะอื่นร่วมด้วย เพื่อประกอบการตัดสินใจในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมกว่า ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (v/v) ต่ออะซิโตไนทริลต่อไป



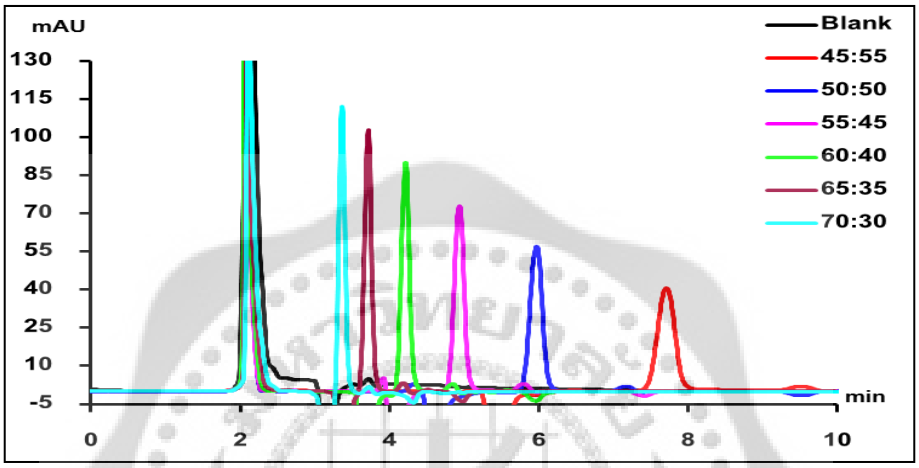
ภาพประกอบ 16 ผลการแปรผันอัตราส่วนระหว่างกรดอะซิติก 0.2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่ออะซิโตไนทริลที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-DNPH

เมื่อทำการศึกษาต่อด้วยการเพิ่มความเข้มข้นกรดอะซิติกเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่ออะซิโตไนทริล ที่อัตราส่วนของวัฏภาคการเคลื่อนที่ต่างๆ ดังนี้ 55:45 60:40 และ 62:38 จากผลการศึกษาดังภาพประกอบ 17 จะพบว่าจะสอดคล้องกับการศึกษาข้างต้น และเพิ่มความเข้มข้นกรดจากเดิม 0.2 เป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ก็ไม่ได้ทำให้สารออกเร็วมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบที่อัตราส่วนเดียวกัน คือ 60:40 และ 62:38 พีคที่ได้ไม่สมมาตร จากนั้นจึงได้ศึกษาดูผลของอะซิโตไนทริลต่อน้ำเพื่อประกอบพิจารณาในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์



ภาพประกอบ 17 ผลการแปรผันอัตราส่วนระหว่างกรดอะซิติก 0.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่ออะซิโตไนทริลที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-DNPH

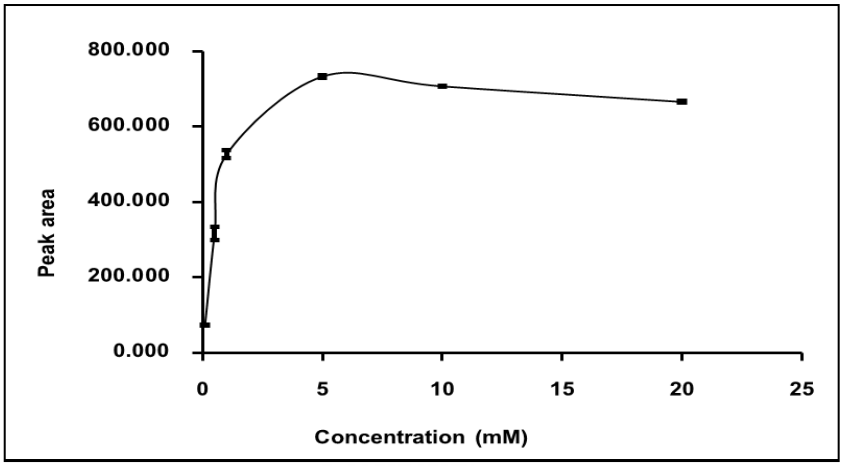
จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาต่อด้วยการเปลี่ยนจากการใช้กรดมาเป็นน้ำปราศจากไอออนแทน โดยทำการศึกษาที่อัตราส่วนวัฏภาคการเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตไนทริลต่อน้ำ ในอัตราส่วนต่างๆ ดังนี้ 45:55 50:50 55:45 60:40 65:35 และ 70:30 จากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนที่ดีที่สุดในการศึกษานี้ คือ 55:45 ซึ่งพีคจะแยกได้ดี พีคแคบ เนื่องจากถูกหน่วงในคอลัมน์ไม่นาน ใช้เวลาในการแยก 4.936 นาที ดังภาพประกอบ 18 ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ MDA-DNPH จะใช้อะซิโตไนทริลต่อน้ำ ที่อัตราส่วน 55:45



ภาพประกอบ 18 ผลการแปรผันอัตราส่วนระหว่างอะซิโตไนทริลต่อน้ำ ที่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ MDA-DNPH

3.2.2 ผลของความเข้มข้นของ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดีไฮด์

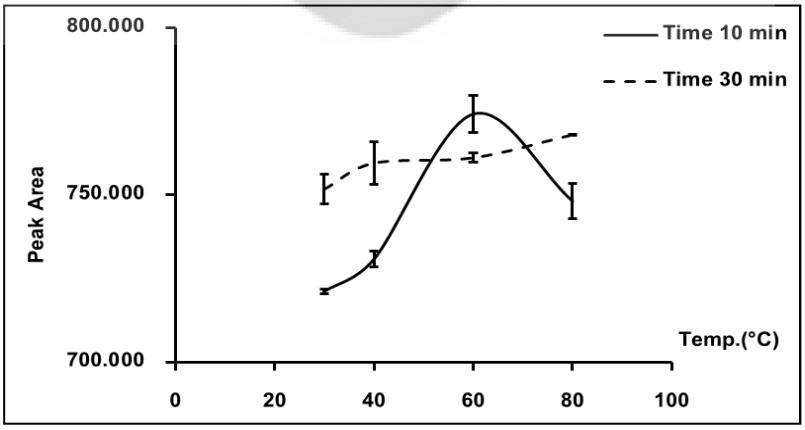
จากการศึกษาผลของความเข้มข้น 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.05 0.10 0.50 1.0 5.0 10.0 และ 20.0 มิลลิโมลาร์ ดังภาพประกอบ 19 ผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน เพิ่มขึ้นจะทำให้พื้นที่ใต้พีคเพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้นในช่วง 0.05 ถึง 5.0 มิลลิโมลาร์ และจะเห็นว่าพื้นที่ใต้พีคเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากว่าความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยา ได้ดี หรือสามารถเกิดปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดีไฮด์ได้หมด ทำให้ได้สารอนุพันธ์ MDA-DNPH ในปริมาณที่มากพอ และพื้นที่พีคจะลดลงเมื่อ ความเข้มข้นเป็น 10.0 และ 20.0 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากว่าความเข้มข้นที่มากเกินไปอาจจะไปเกิดการบดบังการดูดกลืนแสงของ อนุพันธ์ MDA-DNPH ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ในการทำปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดีไฮด์ได้ดีที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์



ภาพประกอบ 19 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน ต่อการทำปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดีไฮด์

3.2.3 ผลของอุณหภูมิ และเวลาที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

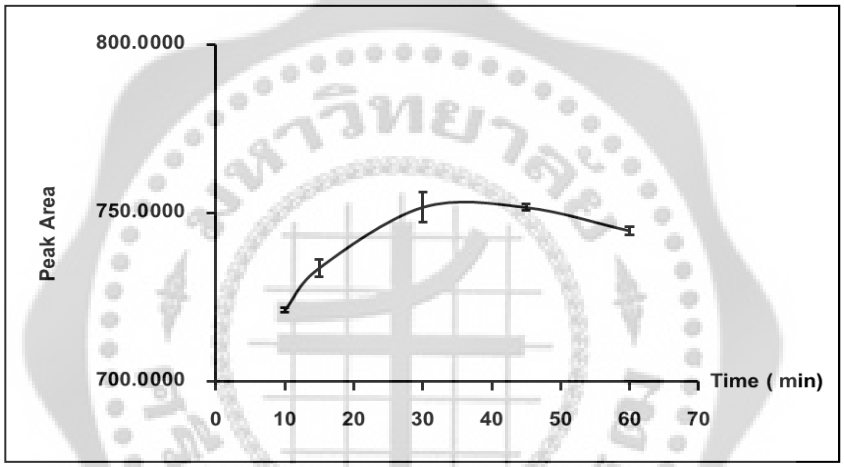
จากการศึกษาผลของ อุณหภูมิ และเวลาที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนความเข้มข้ น 5.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 40 60 และ 80 องศาเซลเซียส ดังภาพประกอบ 20 ในการทดลองแต่ละช่วงอุณหภูมิทดลองที่เวลา 10 และ 30 นาที พบว่า ที่เวลา 10 นาที 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนสามารถเกิดปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดีไฮด์ ได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ ที่ เวลา 30 นาที 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนสามารถเกิดปฏิกิริยากับมาลอนไดอัลดีไฮด์ ได้ดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม คือ 60 องศาเซลเซียส ที่เวลา 10 นาที



ภาพประกอบ 20 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิ และเวลาที่มีต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

3.2.4 ผลของเวลาที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนที่อุณหภูมิห้อง

จากการ ทำการศึกษา การทำปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) และใช้เวลาในการทดลอง 10 15 30 45 และ 60 นาที พบว่าความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนจะค่อย ๆเพิ่มขึ้น ตามเวลา คือ 10 15 และ 30 นาที แต่เมื่อเวลามากกว่า 30 นาที ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของสารทั้งสองจะค่อย ๆ ลดลงเช่นกัน ดังนั้นเวลาที่อุณหภูมิห้องที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 30 นาที ดังภาพประกอบ 21



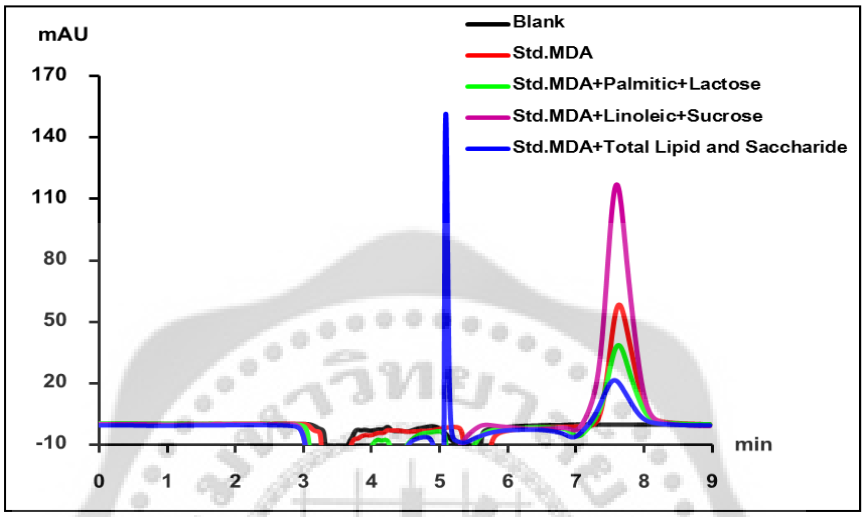
ภาพประกอบ 21 ผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์ กับ 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน

ตอนที่ 4 ผลการศึกษาสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมที่พบได้ในตัวอย่าง

สาเหตุที่ต้องทำการศึกษาผลของสารรบกวน เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองโดยการตกตะกอนโปรตีน และไขมัน ด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้น ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถตกตะกอนโปรตีน และไขมัน ออกไปได้บางส่วน และในส่วนประกอบของตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองยังประกอบไปด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ปนอยู่ โดยน้ำตาลจะประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโครงสร้าง ซึ่งจะสามารถละลายในน้ำได้เป็นอย่างดี หลังจากตกตะกอนแล้วจากนั้นนำสารละลายไปทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี MDA-TBA และ MDA-DNPH โดยอาจมีผลทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของไขมัน และน้ำตาล ได้แก่ กรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส และน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นสารที่พบมากในตัวอย่าง รวมถึงผลของฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง การทดลองมีดังนี้

4.1 ศึกษาผลของไขมัน และน้ำตาลทำการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-TBA

จากการศึกษาผลของไขมัน และน้ำตาล ได้แก่ กรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส และน้ำตาลซูโครส ผลการทดลองดังภาพประกอบ 22

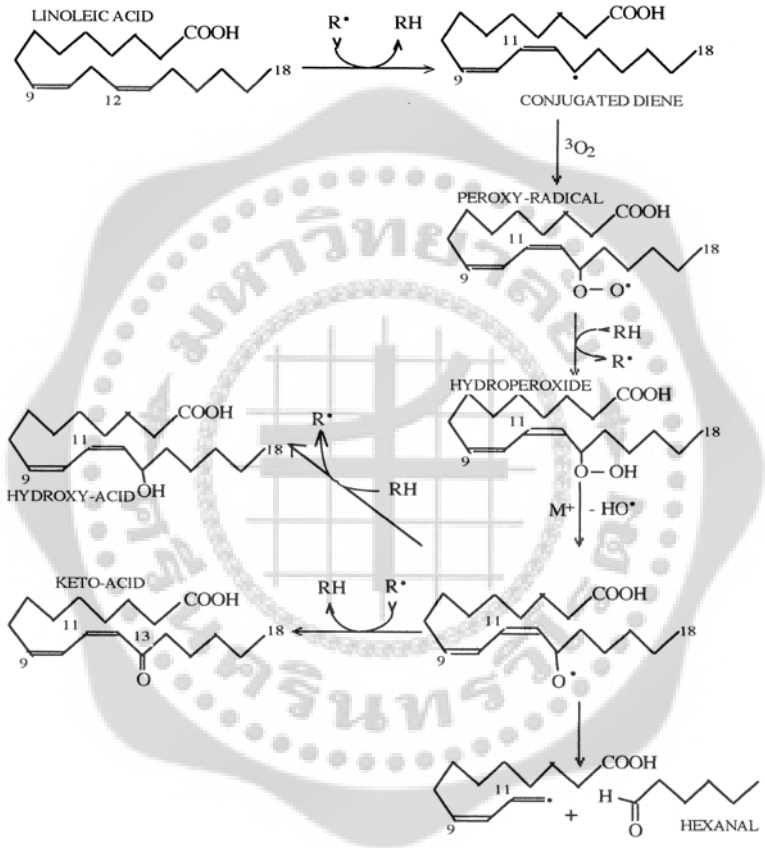


ภาพประกอบ 22 ผลการศึกษาผลของกรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส และน้ำตาลซูโครส

1. เมื่อสารผสมระหว่างกรดปาล์มมิติก น้ำตาลแลคโทส และสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ พบว่ามีผลทำให้สัญญาณที่ได้ลดลง เนื่องจากกรดไขมันปาล์มมิติกเป็นกรดไขมันชนิดที่อิ่มตัว พบได้ในพืช ไม่เกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และการเติมลงไปทำให้ค่าการละลายลดลง จึงทำให้เกิดการรบกวน ส่งผลทำให้สัญญาณที่ได้ลดลง ส่วนน้ำตาลแลคโทส เป็นน้ำตาลไดแซ็คคาไรด์ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส และกาแลค โทส เชื่อมกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-glicosidic ซึ่งน้ำตาลดังกล่าวจะสามารถแตกพันธะได้ง่ายด้วยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด ได้เป็นกลูโคส และกาแลคโทส และจะทำการปิดวงตรงตำแหน่งหมู่อัลดีไฮด์ ซึ่งจะทำให้โมเลกุลดังกล่าวเสถียร และถ้าจะต้องการทำให้โครงสร้างดังกล่าวเปิดวง และเกิ ดปฏิกิริยาได้ต้องทำในสภาวะกรดที่รุนแรง ด้วยสาเหตุดังกล่าว น้ำตาลแลคโทสจึงไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก

2. เมื่อสารผสมระหว่างกรดลิโนเลอิก น้ำตาลซูโครส และสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ พบว่ามีผลทำให้สัญญาณที่ได้สูง (Okawa; Ohishi; & Yagi. 1978: 1053-1057) ได้รายงานปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว สามารถเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดลิโนเลอิกไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารดังกล่าวสามารถเกิดปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริกเกิดเป็นสารละลาย สีแดง ดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ซึ่งเป็นย่านเดียวกับ MDA-TBA adduct ดังภาพประกอบ 9 และ (Södergren. 2000: 1-78) ได้รายงานว่าโมเลกุลไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างเสถียร แต่จะสลายตัวเป็นโมเลกุลอื่นๆ เมื่อให้ความร้อนที่สูงในสภาวะที่เป็นกร ดในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอัลดีไฮด์ชนิดต่างๆ และสามารถเกิดปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เดียวกัน ทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ซึ่งสอดคล้องจากการทดลองข้างต้น และน้ำตาลซูโครสจัดเป็นน้ำตาล non-reducing ซึ่งน้ำตาลดังกล่าว จะมีโครงสร้างแบบปิดวง ทำให้ตรงตำแหน่งหมู่อัลดีไฮด์หรือคีโตนของน้ำตาลไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับกรดไทบาร์บิทูริกได้

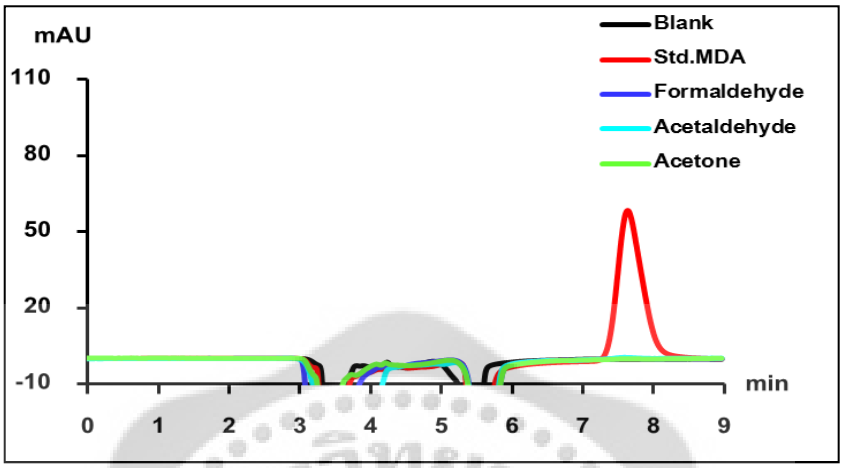


ภาพประกอบ 23 ปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิค

ที่มา: R.Alan Wheatley (2000). Some recent trends in analytical chemistry of lipid peroxidation. p.617-627

3. เมื่อผสมระหว่างกรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลซูโครส และสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ พบว่ามีผลทำให้สัญญาณที่ได้ลดลง เนื่องจากกรดปาล์มิติกที่เติมไปในระบบทำให้การละลายลดลง ปฏิกิริยาเกิดได้ไม่สมบูรณ์

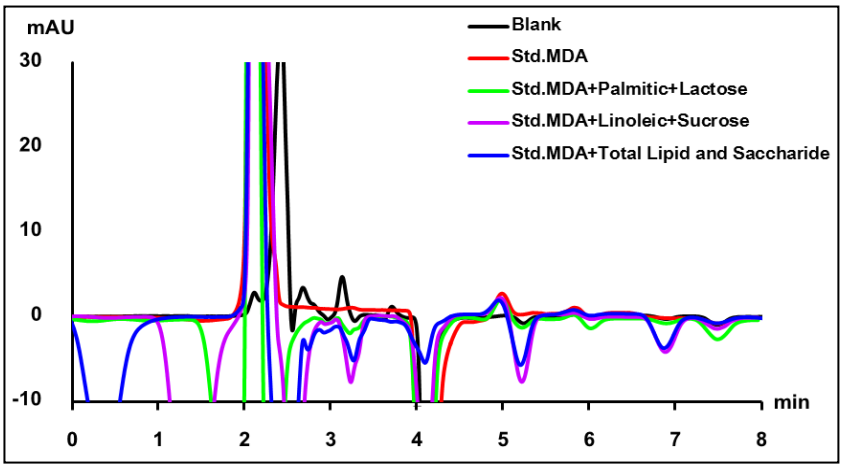
4. เมื่อทดลองฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตน ทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก ผลพบว่าสารดั งกล่าวไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา และไม่ส่งผลรบกวนการวิเคราะห์ได้ ดังภาพประกอบ 24



ภาพประกอบ 24 ผลการศึกษาผลของฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อ TBA

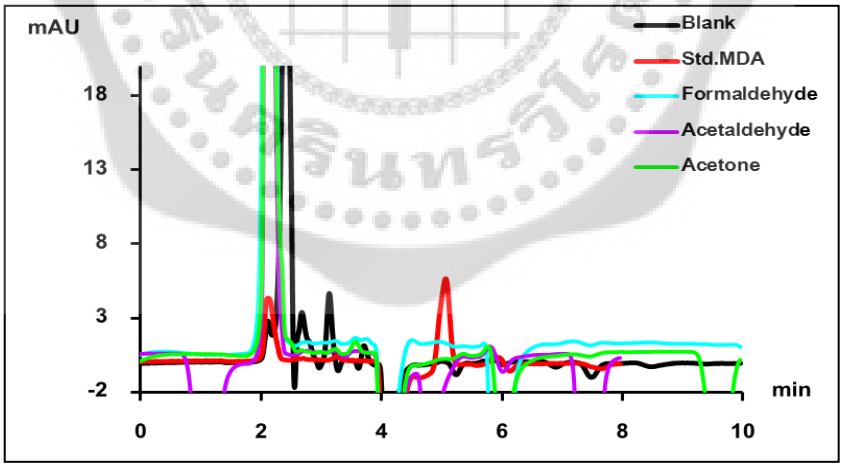
4.2 ศึกษาผลของไขมัน และน้ำตาลที่มีผลต่อการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-DNPH

จากการศึกษาผลของไขมัน และน้ำตาล ได้แก่ กรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส และน้ำตาลซูโครส ที่มีผลต่อการเกิดอนุพันธ์ MDA-DNPH ผลการศึกษาดังภาพประกอบ 25 เมื่อสารผสมระหว่างกรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลซูโครส และสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ จากการทดลองผลของไขมัน และน้ำตาล พบว่าไม่มีผลต่อสัญญาณที่เพิ่มขึ้น (positive peaks)



ภาพประกอบ 25 ผลการศึกษาผลของกรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส และน้ำตาลซูโครส ที่มีผลต่อการเกิดอนุพันธ์ MDA-DNPH

จากภาพประกอบ 26 พบว่า ทั้งกรดไขมันและน้ำตาลจะรบกวนการเกิดอนุพันธ์ MDA-DNPH ไม่มากนัก เพราะอนุพันธ์ MDA-DNPH ยังสามารถตรวจวัดได้ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน MDA และผลของฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตน ความเข้มข้น1,000 ไมโครโมลาร์ ซึ่งจะไม่มีผลต่อ DNPH ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาเป็นอนุพันธ์ MDA-DNPH ได้ ดังภาพประกอบ 26



ภาพประกอบ 26 ผลการศึกษาผลของฟอร์มาลดีไฮด์ อะเซทัลดีไฮด์ และอะซีโตน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อ DNPH

ตอนที่ 5 ผลการศึกษาการหาประสิทธิภาพของระบบที่ทดลอง

5.1 ศึกษาหา Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

ตาราง 6 ผลของ Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

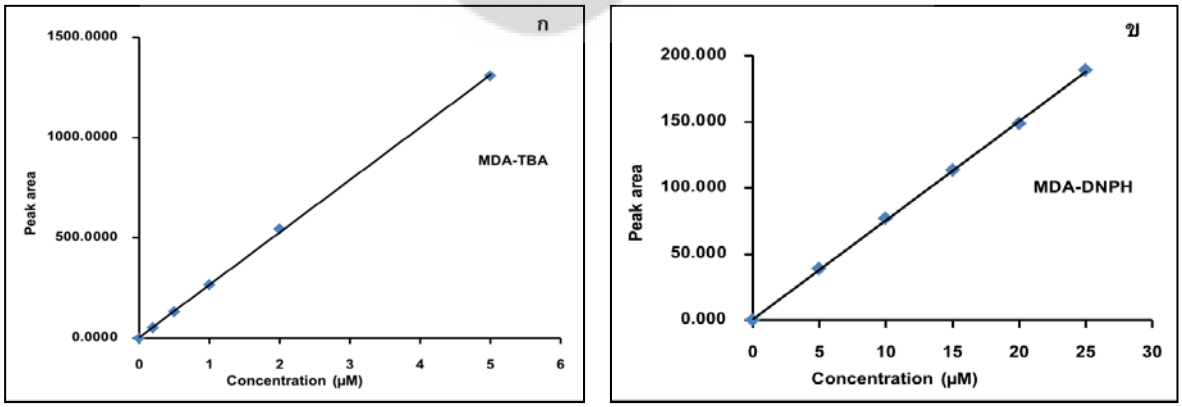
ลำดับ	แบลงก์ของตัวอย่าง		ความเข้มข้นที่ Fortified ลงแบลงก์ตัวอย่าง (μM)		ความเข้มข้นที่คำนวณได้ (μM)	
	MDA-TBA	MDA-DNPH	MDA-TBA	MDA-DNPH	MDA-TBA	MDA-DNPH
1	0	0	0.1	3.0	0.1185	3.1283
2	0	0	0.1	3.0	0.1082	3.1125
3	0	0	0.1	3.0	0.1086	3.1931
4	0	0	0.1	3.0	0.1122	3.0727
5	0	0	0.1	3.0	0.1127	3.1139
6	0	0	0.1	3.0	0.1102	3.2274
7	0	0	0.1	3.0	0.1095	3.1911
8	0	0	0.1	3.0	0.1093	3.2347
9	0	0	0.1	3.0	0.1147	3.1763
10	0	0	0.1	3.0	0.1172	3.3147
Mean					0.1121	3.1765
SD					0.0036	0.0720
%RSD					3.25	2.27
LOD = 3SD					0.01	0.22
LOQ = 10SD					0.04	0.72

จากการศึกษาการหาประสิทธิภาพของระบบที่ทดลองโดยหาค่า LOD และ LOQ ตามตาราง 6 พบว่า ระบบ MDA-TBA ที่ความเข้มข้น 0.1 μM จะให้ค่า %RSD, LOD และ LOQ เท่ากับ 3.25 0.01 และ 0.04 ตามลำดับ และ MDA-DNPH ที่ความเข้มข้น 3.0 μM จะให้ค่า %RSD, LOD และ LOQ เท่ากับ 2.27 0.22 และ 0.72 ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้นี้จะเห็นว่า ประสิทธิภาพของระบบ MDA-TBA และ MDA-DNPH จะไม่แตกต่างกัน

5.2 ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืน (%recovery) และความแม่นยำ (precision)

ตาราง 7 เปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืน (%recovery) และความแม่นยำในวันเดียวกัน (precision) ของระบบที่ทดลอง

ลำดับ	ความเข้มข้นที่Spike (µM)		ผลจากการคำนวณ (µM)		ร้อยละการกลับคืน (%recovery)	
	MDA-TBA	MDA-DNPH	MDA-TBA	MDA-DNPH	MDA-TBA	MDA-DNPH
1	1	15	1.0246	14.9254	102	100
2	1	15	1.0314	15.0281	103	100
3	1	15	1.0127	14.3732	101	96
4	1	15	0.9966	14.7994	100	99
5	1	15	1.0110	15.3429	101	102
6	1	15	1.0063	14.4731	101	96
7	1	15	1.0017	14.8112	100	99
8	1	15	0.9956	14.6686	100	98
9	1	15	1.0450	15.0065	105	100
10	1	15	1.0108	15.1983	101	101
Mean			1.0136	14.8627		
SD			0.0150	0.3038		
%RSD			1.48	2.04		



ภาพประกอบ 27 กราฟมาตรฐาน (ก) MDA-TBA และ (ข) MDA-DNPH

จากการศึกษาการหาเปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืนและความแม่นยำ ของระบบ MDA-TBA และ MDA-DNPH พบว่า เปอร์เซ็นต์ร้อยละก ลับคืนของระบบ MDA-TBA อยู่ในช่วง 100-105 และความแม่นยำให้ค่า %RSD เท่ากับ 1.48 สำหรับระบบ MDA-DNPH ให้เปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืนอยู่ในช่วง 96-102 และความแม่นยำให้ค่า %RSD เท่ากับ 2.04 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลจากการคำนวณความเข้มข้นของ MDA-TBA และ MDA- DNPH ที่เติมลงไปและสกัดได้ โดยเฉลี่ยแล้วจะเห็นได้ว่าระบบ MDA-DNPH ให้ความเข้มข้นที่สกัดได้ใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่เติมลงไปมา กกว่า ดังนั้นจึงมีความน่าเชื่ อถือมากกว่าด้วย ถึงแม้ว่าระบบ MDA-TBA จะให้เปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืนที่สูงกว่าก็ตาม แต่ MDA ที่ตรวจวัดได้อาจจะมาจากสารอัลดีไฮด์อื่นๆ ที่สามารถเกิดปฏิกิ ริยากับ TBA ได้ และค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ r^2 ของ MDA-TBA เท่ากับ 0.9997 ซึ่ง y=261.5966x+3.7334 และ MDA-DNPH เท่ากับ 0.9994 ซึ่ง y=7.6216x+2.4815

ตอนที่ 6 ผลการตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่มจากตลาดที่มีจำหน่ายทั่วไป น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที แบบเจ และแบบผสมนมผง

ตาราง 8 ปริมาณ MDA ที่ได้จากการตรวจวัดตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม

ลำดับ	ตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม	สูตรและรส	ปริมาณ MDA (μM)±SD	
			MDA-TBA	MDA-DNPH
1	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรหวานน้อย	0.4941±0.03	nd
2	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรหวานน้อย	0.6482±0.04	nd
3	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรหวานน้อย	0.3331±0.01	nd
4	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรหวาน รสช็อกโกมอลต์	0.5991±0.03	nd
5	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรหวาน ผสมงาดำ	0.4145±0.02	nd
6	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรหวาน ผสมข้าวบาร์เลย์และมอลต์	05091±0.03	nd
7	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรเจ รสหวาน	0.5086±0.04	nd
8	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรเจ รสหวาน	0.4057±0.01	nd
9	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรเจ รสหวาน	0.4073±0.01	nd
10	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรเจ รสหวาน	0.5307±0.03	nd
11	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรผสมนมผง รสหวาน	0.6448±0.04	nd
12	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรผสมนมผง รสหวาน	0.6754±0.03	nd
13	น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที	สูตรผสมนมผง รสหวาน	0.5583±0.03	nd

ตาราง 8 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่ม	สูตรและรส	ปริมาณ MDA (μM)±SD	
			MDA-TBA	MDA-DNPH
14	น้ำเต้าหู้	รสหวาน	0.5761±0.02	nd

หมายเหตุ nd คือ Not detected

ในตาราง 8 จะพบว่าปริมาณ MDA ในน้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที โดยใช้ระบบ MDA-TBA จะพบได้มากในน้ำนมถั่วเหลืองยูเอชทีสูตรผสมนมผง รสหวาน รองลงมาเป็นสูตรหวานน้อย และ สูตรหวาน รสช็อกโกมอลต์ โดยปริมาณ MDA ที่ตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 0.6754±0.03 0.6482±0.04 และ 0.5991±0.03 (μM) ตามลำดับ ส่วนการ ศึกษาโดยใช้ระบบ MDA-DNPH พบว่าไม่สามารถตรวจวัดปริมาณ MDA ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มได้

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาการเกิดมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองแปรรูป โดยจะศึกษาการหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจวัดสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่าง ด้วยการเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถ นะสูง ตลอดจนศึกษาปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อก ารตรวจปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ เพื่อให้ได้ สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจ ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง และได้ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสมด้วย

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาการวิจัย สรุปผลได้ดังนี้

1. การเตรียมอนุ พันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก และ2,4-ไนโทรฟีนิลไฮดราซีน โดยอาศัยเกิดปฏิกิริยาการควบแน่นของมาลอนไดอัลดีไฮด์ พบว่ามาลอนไดอัลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริกสองโมเลกุลที่ตำแหน่งหมู่คาร์บอกซิล ในสภาวะที่เป็นกรด เกิดอนุพันธ์ MDA-TBA adduct เป็นสารสีแดง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 531 นาโนเมตร (TBARS) และมาลอนไดอัลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับ 2,4-ไนโทรฟีนิลไฮดราซีนเกิดเป็นวงไพราโซล ในสภาวะที่เป็นกรดเช่นกัน เกิดอนุพันธ์ MDA-DNPH มีสีเหลือง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 307 นาโนเมตร (λmax=307 nm)

2. ผลการศึกษาปัจจัยแปรผันได้แก่ ความเข้มข้นของกรดไทโอบาร์บิทูริก อุณหภูมิ และเวลาที่มีผลต่อการทำอนุพันธ์ระหว่างกรดไทโอบาร์บิทูริกกับมาลอนไดอัลดีไฮด์พบว่าการเกิด MDA-TBA ที่ดีใช้สภาวะดังนี้คือ ความเข้มข้นของกรดไทโอบาร์บิทูริกจะอยู่ที่ 25 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และเวลา 60 นาที

3. การแยกมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่า

3.1 การแยกด้วยวิธี MDA-TBA ใช้สภาวะ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ต่อเมธานอล อัตราส่วนร้อยละ 60:40 และ pH เท่ากับ 6.8

3.2 การแยกด้วยวิธี MDA-DNPH จะใช้อะซิโตไนทริลต่อน้ำ อัตราส่วน 55:45 และความเข้มข้นของ2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน คือ 5.0 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเวลา 10 นาที

4. การศึกษาสารรบกวนในการเกิดอนุพันธ์ร่วมที่พบได้ในตัวอย่างพบว่า

4.1 ผลของไขมัน และน้ำตาล ทำการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-TBA โดยใช้กรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลซูโครส พบว่ามีผลทำให้สัญญาณที่ได้ลดลง เนื่องจากกรดปาล์มิติกที่เติมไปในระบบทำให้การละลายลดลง ปฏิกิริยาเกิดได้ ไม่สมบูรณ์ แต่น้ำตาลแลคโทสไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก

4.2 ผลของไขมัน และน้ำตาล ที่มีผลต่อการตรวจวัดด้วยวิธี MDA-DNPH โดยใช้กรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลซูโครส พบว่าไม่มีผลต่อสัญญาณที่ได้

5. ผลการศึกษาการหาประสิทธิภาพของระบบที่ทดลองพบว่า

5.1 ค่า LOD และ LOQ ของระบบ MDA-TBA ที่ความเข้มข้น 0.1 μM จะให้ค่า %RSD, LOD และ LOQ เท่ากับ 3.25 0.01 และ 0.04 ตามลำดับ และ MDA-DNPH ที่ความเข้มข้น 3.0 μM ให้ค่า %RSD, LOD และ LOQ เท่ากับ 2.27 0.22 และ 0.72 ตามลำดับ

5.2 เปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืนและความแม่นยำของระบบ MDA-TBA และ MDA-DNPH พบว่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืนของระบบ MDA-TBA อยู่ในช่วง 100-105 และความแม่นยำให้ค่า %RSD เท่ากับ 1.48 สำหรับระบบ MDA-DNPH ให้เปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืน อยู่ในช่วง 96-102 และความแม่นยำให้ค่า %RSD เท่ากับ 2.04

6. ผลการตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่ม น้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที แบบเจ และแบบผสมนมผง พบว่าปริมาณ MDA ในน้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที โดยใช้ระบบ MDA-TBA จะพบได้มากในน้ำนมถั่วเหลืองยูเอชที สูตรผสมนมผง รสหวาน รองลงมาเป็น สูตรหวานน้อย และสูตรหวาน รสช็อกโกมอลต์ โดยปริมาณ MDA ที่ตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 0.6754±0.03 0.6482±0.04 และ 0.5991±0.03 (μM) ตามลำดับ ส่วนการทดลองโดยใช้ระบบ MDA-DNPH พบว่าไม่สามารถตรวจวัดปริมาณ มาลอนไดอัลดีไฮด์ ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การตรวจวัดด้วยวิธี MDA-DNPH มีความไวน้อยกว่าวิธี MDA-TBA จึงทำให้ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ได้

ข้อเสนอแนะ

1. บัฟเฟอร์ที่เลือกใช้เป็น KH_2PO_4 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่มีค่าความจุของสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer capacity) ที่สูง pH ของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย โดย pH ที่ใช้ในการศึกษาจะอยู่ในช่วง pH ที่เป็นกลาง

2. ไม่ควรเก็บตัวอย่างนมที่ใช้ในการวิเคราะห์นานเพราะจะทำให้เกิดการตกตะกอนและกลิ่นเหม็นหืนของไขมันในนมได้

3. การวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยใช้ระบบ MDA-TBA สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารชนิดอื่นๆได้ และควรมีการทดลองระบบ MDA-DNPH กับตัวอย่างอาหารชนิดอื่นๆ ด้วยเช่นกัน

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำบนพื้นที่พืชไร่ . (2549). *เอกสารวิชาการถั่วเหลือง* . กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สุรีย์ แถวเที่ยง . (2552). *เครื่องดื่มน้ำนมถั่วเหลืองผสมน้ำแครอท* . ปริญญญานิพน ธ์ สาขาวิชาอาหารและโภชนาการ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มห าวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

องค์ประกอบที่สำคัญของเมล็ดถั่วเหลือง . (2012). Retrieved April14, 2012, from http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=34.

Al-Fawaeir, S.; et al. (2011). Comparison of two methods for malondialdehyde measurement. *Journal of Clinical Analytical Medicine*. 2(2): 11-14.

Berdyshev, E.V. (2011). Biochimica et biophysica acta. 1811 : 680-693.

Bohnstedt, K.C. (2005). Determination of biomarker for lipid peroxidation and oxidative stress. Stockholm University. Stockholm.

Cesa, S. (2004). Malondialdehyde contents in infant milk formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 2119-2122.

Fernindez, J.; et al. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*. 59: 345-353.

Fukunaga, K.; Takama, K.; & Suzuki, T. (1995). High-performace liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Analytical Biochemistry*. 230: 20-23.

Fenaille, F.; et al. (2001). Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *Journal of Chromatography A*. 921: 237–245.

Fialova, L. (2010/2011). Lipids (fatty acids,lipoperoxidation, digestion). BIOCHEMIE 1 LF UK. Fukunaga, K.; & et al. (1995). High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Analytical Biochemistry.* 230: 20-35.

Grotto, D.; et al. (2007). Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 43: 619–624.

Grotto, D.; et al. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim. Nova.* 32: 169-174.

Heras, A. D.; et al. (2003). Comparison of methods for determining malondialdehyde in dry sausage by HPLC and the classic TBA test. *Eur Food Res Technol*. 217: 180–184.

Korchazhkina, O.; Exley, C.; & Spencer, S.A. (2003). Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography B.* 794: 353–362.

Marcinčák, S.; et al. (2003). Comparative evaluation of analytical techniques to quantify malondialdehyde in broiler meat. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 47: 491-496.

Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research.* 424: 83-95.

Mendes, R.; Cardoso, C.; & Pestana, C. (2009). Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chemistry.* 112: 1038–1045.

Okawa, H.; Ohishi, N.; & Yagi,K. (1978). Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *University of Nagoya*. 466: 1053-1057.

Pilz, J.; Meineke, I.; & Gleiter, Christoph H. (2000). Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal Chromatograhy B.* 742: 315-325.

Rio D. D.; et al. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases.* 15: 316-328.

Sim, A. S.; et al. (2003). Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performace liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. *Journal of Chromatography B.* 785: 337-344.

Södergren, E. (2000). Lipid peroxidation in vivo. Evaluation and application of methods for measurement. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine.* 949 : 1-78.

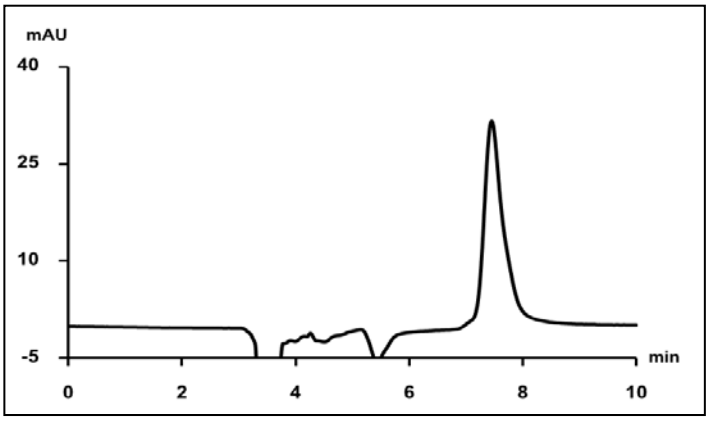
Steghens, J.; et al. (2001). Diaminonaphtalene, A new highly specific reagent for hplc-uv measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Radical Biology & Medicine.* 31: 242-249.

Wheatley, R. A. (2000). Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends in analytical chemistry*. 19: 617-628.

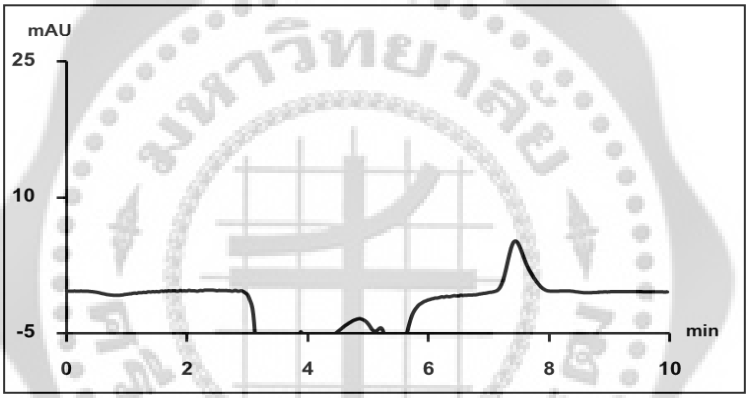
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

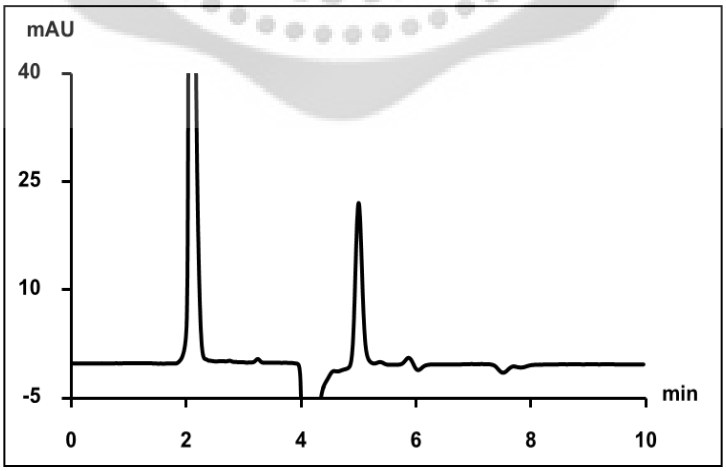
โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง



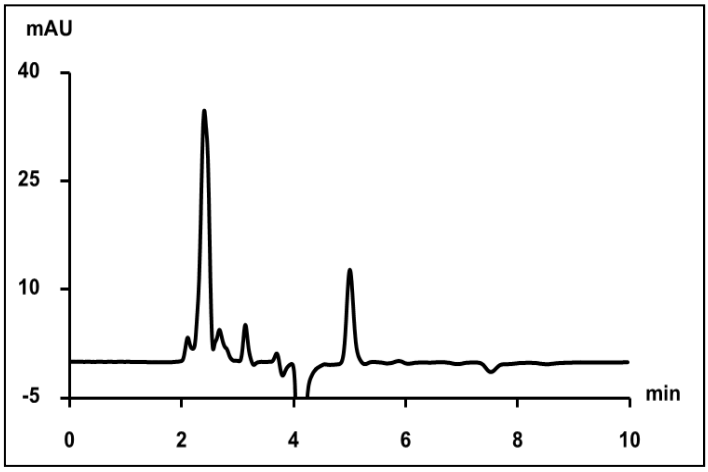
ภาพประกอบ 28 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน MDA-TBA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์



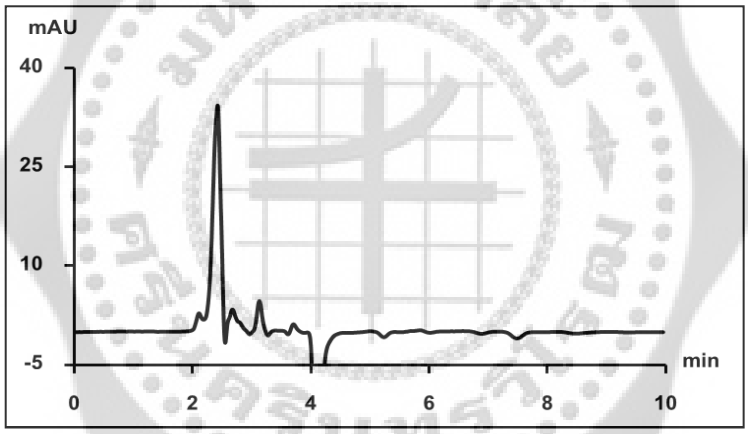
ภาพประกอบ 29 โครมาโทแกรม MDA-TBA ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง



ภาพประกอบ 30 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน MDA-DNPH ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์



ภาพประกอบ 31 โครมาโทแกรมอนุพันธ์ MDA-DNPH โดย Spike สารมาตรฐาน MDA ที่ 15 ไมโครโมลาร์ ลงในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง



ภาพประกอบ 32 โครมาโทแกรมอนุพันธ์ MDA-DNPH ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายต่าง ๆ

1. สารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์จากสารละลายมาตรฐานเตตระ- เอทธอกซีโพรเพน (1,1,3,3-Tetraethoxypropane หรือ TEP) (Fenaille; et al. 2001: 237–245)

1.1 ชั่งสารละลายมาตรฐานเตตระ-เอทธอกซีโพรเพนปริมาณ 0.0230 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

1.2 จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

1.3 นำสารละลายมาตรฐานเตตระ-เอทธอกซีโพรเพนข้างต้นไปบ่มในเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จะได้สารมาตรฐาน มาลอนไดอัลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใช้เป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้น และสามารถเก็บได้ 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลายกรดไทโอบาร์บิทูริก (2-thiobarbituric acid หรือ TBA) ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2.1 ชั่งกรดไทโอบาร์บิทูริก ปริมาณ 0.6 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงไปในบีกเกอร์

2.2 จากนั้นให้นำบีกเกอร์ไปวางไว้ใน hot plate ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายหมด

2.3 วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเทสารละลายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลายดังกล่าว 2-3 ครั้ง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีน (2,4-Dinitrophenylhydrazine หรือ DNPH) ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์

ชั่ง 2,4-ไดไนโทรฟีนิลไฮดราซีนปริมาณ 0.0990 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.0 นอร์มอล จากนั้นเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลายดังกล่าว 2-3 ครั้ง และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.0 นอร์มอล

4. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid หรือ TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4.1 ชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติก ปริมาณ 5.0 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใช้แท่งคนคนสารให้ละลายจนหมด

4.2 เทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลายดังกล่าว 2-3 ครั้ง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้เป็น 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 0.83 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรที่มีน้ำปราศจากไอออนขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

6. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.0 นอร์มอล

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริ กเข้มข้นปริมาตร 1.66 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรที่มีน้ำปราศจากไอออนขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

7. สารละลายกรดซัลฟุริกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร (v/v)

ปิเปตกรดซัลฟุริกปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรที่มีน้ำปราศจากไอออนขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยปริมาตร (v/v)

ปิเปตกรดอะซิติกปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรที่มีน้ำป ราศจากไอออนขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

9. สารละลายกรดปาล์มมิติกความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ชั่งกรดปาล์มมิติกปริมาณ 5.0 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วยโพรพานอล ล้างด้วยสารละลายดังกล่าว 2-3 ครั้ง และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

10. สารละลายกรดลิโนเลอิกความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ชั่งกรดลิโนเลอิกปริมาณ 5.0 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วยโพรพานอล ล้างด้วยสารละลายดังกล่าว 2-3 ครั้ง และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

11 สารละลายแลคโทสความเข้มข้นร้อยละ 50.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ชั่งแลคโทสปริมาณ 50.0 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ล้างด้วยสารละลายดังกล่าว 2-3 ครั้ง ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

12. สารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 50.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ชั่งซูโครสปริมาณ 50.0 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ล้างด้วยสารละลายดังกล่าว 2-3 ครั้ง ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

รูปสารละลายอนุพันธ์ เครื่องมือ และอุปกรณ์

ภาพประกอบ 33 ลักษณะตัวอย่างนมถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง

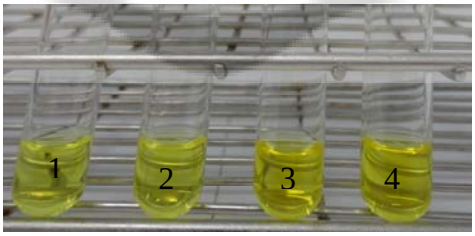
ภาพประกอบ 34 สีของสารอนุพันธ์สารละลาย MDA-TBA

1 แทน สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์

2 แทน สารผสมระหว่างกรดปาล์มมิติก น้ำตาลแลคโทส และสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์

3 แทน สารผสมระหว่างกรดลิโนเลอิก น้ำตาลซูโครส และสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์

4 แทน สารผสมระหว่างกรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลซูโครส และสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์



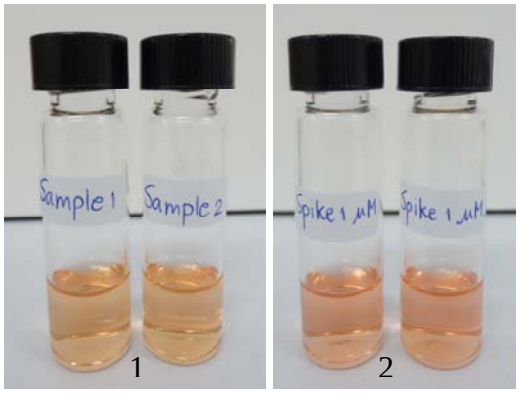
ภาพประกอบ 35 สีของสารอนุพันธ์สารละลาย MDA-DNPH

1 แทน สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์

2 แทน สารผสมระหว่างกรดปาล์มมิติก น้ำตาลแลคโทส และสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์

3 แทน สารผสมระหว่างกรดลิโนเลอิก น้ำตาลซูโครส และสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์

4 แทน สารผสมระหว่างกรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลซูโครส และสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์



ภาพประกอบ 36 สีของสารละลายตัวอย่าง

1 แทน สารละลายสีเหลืองส้มก่อน spike อนุพันธ์ MDA-TBA

2 แทน สารละลายสีส้มอมชมพูเหลืองส้มที่เกิดจากการ spike อนุพันธ์ MDA-TBA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

อภิธานศัพท์

MDA	=	Malondialdehyde
TBA	=	2-Thiobarbituric acid
PUFA	=	Polyunsaturated fatty acid
MSNF	=	Milk-solid -non-fat
LOD	=	Limit of detection
LOQ	=	Limit of quantitation
RSD	=	relative standard deviation
SD	=	standard deviation
DNPH	=	2,4-dinitrophenyl hydrazine
KH_2PO_4	=	Potassium dihydrogen phosphate
TCA	=	Trichloroacetic acid
TEP	=	1,1,3,3-Tetraethoxypropane
HCl	=	Hydrochloric acid
CH_3COOH	=	Acetic acid
H_2SO_4	=	Sufuric acid

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ สกุล	นายอำนาจ กะฐินเทศ
วันเดือนปีเกิด	22 กันยายน 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดศรีสะเกษ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 11 ตำบลหนองหญ้าลาด อำเภอกันทรลักษ์ จังหวัดศรีสะเกษ 33110

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2543	มัธยมปลาย โรงเรียนกันทรลักษ์วิทยา จังหวัดศรีสะเกษ
พ.ศ. 2547	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี
พ.ศ. 2556	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพมหานคร