# การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ และ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ พร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

# DEVELOPMENT METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MALONDIALDEHYDE AND5-HYDROXYMETHYL-2-FURFURALDEHYDE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

*จตุรงค์ จงเจริญ, พรพิมล ม่วงไทย, ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ*

***Jaturong Chongcharoen**, Pornpimol Muangthai, Piyada Jittangprasert*

*ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.*

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารก่อมะเร็ง 2 ชนิด คือ สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) และ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ (HMF) พร้อมกัน โดยในงานวิจัยนี้จะอาศัยการทำอนุพันธ์ระหว่าง MDA และ HMF กับ สารละลายกรดไทโอบาร์บิทูริก (TBA) แล้วจึงวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ระบบรีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟี ซึ่งได้ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ ในการแยก ได้แก่ องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ pH ในการแยกอุณหภูมิและระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ และความเข้มข้นของ TBA ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ ทั้งนี้ได้ตรวจวัดสารทั้งสองโดยไดโอดแอเรย์ที่ความยาว 530 nm และ 448 nm ตามลำดับ พบว่าสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 40:60 (v/v) อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ที่ 1.0 mL/min และ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 6.5 โดยใช้ 40 mM TBA ในการเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิ 25˚C เป็นเวลา 150 นาที ซึ่งสภาวะดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์ HMF และ MDA ได้ที่เวลา 2.6 และ 3.4 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์สารทั้งสองในตัวอย่างนมโดยการหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) ขีดจำกัดต่ำสุดในที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) และร้อยละการคืนกลับ ซึ่งวิธีการที่พัฒนาขึ้นมีค่าของ LOD ของ MDA และ HMF อยู่ที่ (S/N = 3) 0.01 nmol/ml และ 0.30 nmol/mL ตามลำดับ ค่า LOQ ของ MDA และ HMF อยู่ที่ (S/N = 10) 0.07 nmol/mL และ 2.38 nmol/mL ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ MDA

และ HMF ในตัวอย่างนมพร้อมดื่มพบว่า ค่าเฉลี่ยของร้อยล่ะการคืนกลับของวิธีการซึ่งทดสอบมีค่า 75.71% และ 107.51%, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RDS) เฉลี่ยอยู่ที่ 8.5% และ 6.2% ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ MDA และ HMF พร้อมกันได้ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อื่นๆ ต่อไป

**คำสำคัญ:** มาลอนไดอัลดีไฮด์ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ กรดไทโอบาร์บิทูริก

## Abstract

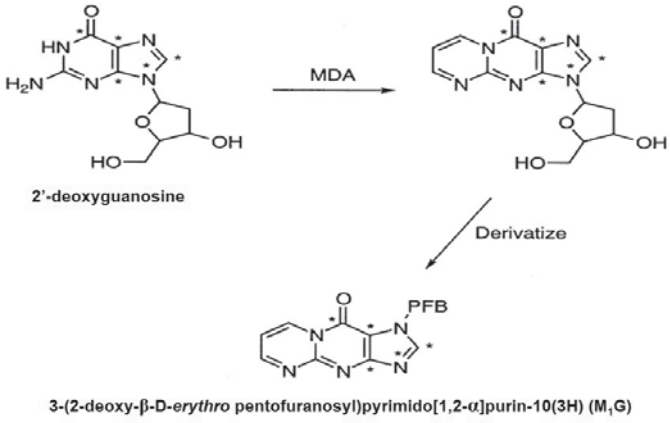
The optimal conditions for simultaneous analysis of malondialdehyde and hydroxymethylfurfuraldehyde contents were investigated. Both substance are claimed to be carcinogenic substances in several foods. In this research, the derivertized substances of malondialdehyde and hydroxymethylfurfuraldehyde were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

**Keywords:** malondialdehyde, hydroxymethylfurfuraldehyde, Thiobarbituric acid

## บทนำ

ปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน เป็นปฏิกิริยาสำคัญที่สามารถเกิดขึ้นได้ในอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ซึ่งผลของปฏิกิริยานี้จะทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ หลายชนิดที่เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดโรคและพัฒนาการของโรค เช่น โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน ในปี ค.ศ. 1998 กลุ่มวิจัยของ Lawrence ได้ทำการศึกษาผลของการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันแล้วอาจทำเกิดสารก่อมะเร็ง คือ มาลอนไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA) โดยเมื่อร่างกายได้รับ MDA เข้าไปจะส่งผลให้ไปทำให้เกิดการทำลาย

โครงสร้างของสารประกอบทางพันธุกรรม อย่างเช่น 2′-deoxyguanosine จนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นสารประกอบใหม่ที่เรียกว่า $M_1G$ (3-(2-deoxy-β-D-erythro pentofuranosyl) pyrimido[1,2-∝]purin-10(3H)) [1] ดังแสดงในภาพที่ 1




**ภาพที่ 1** แสดงผลของมาลอนไดแอลดีไฮด์ ที่เข้าไปทำลายสารประกอบพันธุกรรมในร่างกาย

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

ซึ่งผลของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบพันธุกรรมจึงนำมาซึ่งความผิดปกติทางพันธุกรรมต่างๆ ที่เกิดขึ้นมากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง และโรคเบาหวาน ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันจึงใช้เป็นดัชนีชี้วัดผลของการถูกออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระได้ เนื่องจาก MDA นั้นเป็นผลิตผลหนึ่งที่เกิดจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณของ MDA จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจวัดผลของการเกิดออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้มาลอนไดแอลดีไฮด์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบจำพวกเอมีนปฐมภูมิในองค์ประกอบของ apoprotein B-100 ซึ่งทำหน้าที่ลำเลียงไขมันไปยังอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ ทำให้ apoprotein B-100 ถูกเปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถลำเลียงไขมันได้ เกิดการสะสมของไขมันในเส้นเลือดจนเกิดเป็นภาวะหลอดเลือดแดงแข็งแบบ atherosclerosis [2] ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด อย่างเช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary heart disease) โรคของหลอดเลือดแดงส่วนปลาย (peripheral arterial disease) โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease)

ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) เป็นปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์ที่สามารถเกิดขึ้นได้ในอาหาร ซึ่งปฏิกิริยาเมลลาร์ดมีขั้นตอนเกิดขึ้นหลายขั้นตอน โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้เป็นสารสีน้ำตาลที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเรียกว่า “เมลานอยดิน” (melanoidins) [3] ปฏิกิริยานี้มีความสำคัญต่ออาหารบางประเภท เช่นขนมอบ คาราเมล ทอฟฟี่ เป็นต้น ทั้งนี้เพราะทำให้เกิดสีน้ำตาลในอาหารดังกล่าวและน่าบริโภค ยกตัวอย่างเช่น การผลิตขนมปัง ชา กาแฟ

และอาหารอบย่าง [4] แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยานี้ก็มีข้อเสียคือทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง หรือถ้าอาหารนั้นเกิดสีน้ำตาลมากเกินไปก็ไม่น่าบริโภค ซึ่งสีน้ำตาลในอาหารที่มากเกินไปก็อาจบ่งบอกได้ถึงว่าอาหารนั้นได้เสื่อมคุณภาพอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์อาหารจำพวก น้ำผลไม้ แป้ง นมผง ไข่ผง แยม และเยลลี่ [5] ซึ่งถ้าอาหารนั้นมีโปรตีนสูงและได้รับความร้อนสูงด้วยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก็อาจเป็นสารก่อมะเร็ง โดยสารผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งของปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่สำคัญและเป็นสารก่อมะเร็ง คือ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัล (5-hydroxymethyl-2-furfural; HMF) [6] โดย HMF สามารถพบได้ในอาหารหลายชนิด ดังนั้นการตรวจวัด HMF จึงสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดการเสื่อมสภาพของอาหารได้เช่นกัน อย่างเช่น น้ำผึ้ง ซึ่งในประเทศแถบทวีปยุโรป เช่น ประเทศเยอรมัน เบลเยียม อิตารี ออสเตรีย สเปน จะมีกฎหมายควบคุมโดยมีเกณฑ์กำหนดให้น้ำผึ้งมีปริมาณของ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัล ได้ไม่เกิน 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม [7] (AOAC. 2000: 44) ส่วนในประเทศไทยนั้นจะมีการกำหนดให้น้ำผึ้งมีสารนี้ได้ไม่เกิน 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

จะเห็นได้ว่า ทั้งปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและปฏิกิริยาเมลลาร์ด สามารถเกิดขึ้นเองได้ในผลิตภัณฑ์อาหาร จึงมีความเป็นได้ที่จะมีโอกาสตรวจพบสาร มาลอนไดแอลดีไฮด์ และ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัล ได้พร้อมกัน ซึ่งสารดังกล่าวนอกจากจะทำให้ลักษณะของสีและกลิ่นของอาหารที่ไม่น่าชวนให้บริโภคแล้ว ยังมีผลทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นอันตรายต่อร่างกายของผู้บริโภคได้ [8] ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารมาลอนไดแอลดีไฮด์ และ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัล พร้อมกัน โดยอาศัยการทำอนุพันธ์กับกรด 2-ไทโอบาร์บิทุริก (2-thiobarbituric acids; TBA) กับตัวอย่างที่ตกตะกอนโปรตีนออกไปแล้ว ซึ่งเป็นที่รู้จักในชื่อที่เรียกว่า “TBA reaction substance” (TBARS) หรือ TBA [9] แล้วทำการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารประกอบทั้งสองด้วยเทคนิคของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) ซึ่งจะทำให้ช่วยลดปริมาณของตัวทำละลาย ลดเวลาในการวิเคราะห์ ลดค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งเมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ได้แล้วจึงนำวิธีการที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบหา มาลอนไดแอลดีไฮด์ และ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟิวรัลในตัวอย่างนม พบว่าสามารถให้ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าพึงพอใจ

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์ของสารประกอบ MDA และ HMF ด้วยเทคนิคของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่

1.2 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

1.3 pH ที่ใช้ในการแยก

1.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

1.5 ระยะเวลาใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

1.6 ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

**อุปกรณ์ในการวิจัย**

**สารเคมี**

สารมาตรฐาน 5-hydroxymethyl-2-furfural, 5-thiobarbituric acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (ละลายใน 1%HCl จะได้สารละลาย MDA), di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous และ trichloroacetic acid จากบริษัท Fluka (AR เกรด) disodium hydrogen phosphate และ sodium dihydrogen phosphate จากบริษัท Sigma (AR เกรด) ตัวทำละลาย methanol จากบริษัท Merck (HPLC เกรด)

**อุปกรณ์และเครื่องมือ**

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100 โดยใช้คอลัมน์ C18 (Eclipse XDB 5 μm ขนาด 4.6 150 mm) และใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอะเรย์ (diode array), เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนจาก บริษัท Siemens รุ่น LaboStar, เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-2401 PC จากบริษัท Shimadzu, เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง จากบริษัท Mettier Toledo รุ่น AB104-S, เครื่องเขย่า รุ่น Vortex-genie 2 จากบริษัท Scientific Industries, เครื่อง Centrifuge รุ่น Zentrifugen EBA 8S จากบริษัท Ilettich, เครื่อง Water bath จากบริษัท Memmert, Syringe Filters PTFE membrane ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท International scientific

## วิธีดำเนินการวิจัย

**ตอนที่ 1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ (ดัดแปลงจาก [10] และ [11])**

การหาสภาวะที่เหมาะสมนี้จะทำการทดสอบโดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน HMF ความเข้มข้น 198 nmol/ml ที่ผสมรวมกับสารละลายมาตรฐาน MDA ความเข้มข้น 25 nmol/ml แล้วนำไปทำกับสารละลาย TBA เมื่อเตรียมอนุพันธ์ได้แล้วจะนำสารละลายที่ได้ไปทำการเซนติฟิวจ์ที่ 4000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงทำการกรองด้วย Syringe Filters PTFE membrane ขนาด 0.45 ไมครอน อีกครั้งก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบทั้งสองด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอะเรย์ที่ความยาวคลื่น 448 nm และ 530 nm บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อใช้ในการทดสอบหาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ HMF รวมกับ MDA ดังนี้ องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ pH ที่ใช้ในการแยก อุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ ระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์

**ตอนที่ 2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น**

เตรียมสารละลายมาตรฐาน HMF ที่ช่วงความเข้มข้น 0.00 - 6.34 nmol/mL ที่ผสมรวมกับสารละลายมาตรฐาน MDA ที่ช่วงความเข้มข้น 0.00 - 0.80 nmol/mL แล้วทำการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารทั้งสองด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและบันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับค่าของพื้นที่ใต้พีคสัญญาณที่ได้ เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรงของความสัมพันธ์ดังกล่าว พร้อมทั้งหาค่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (LOD; S/N =3) และค่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOD; S/N =5) ซึ่งจะทำการบันทึกผลของสัญญาณ (S/N) ที่ได้จากการวัดของสารละลาย Blank จำนวน 5 ครั้ง

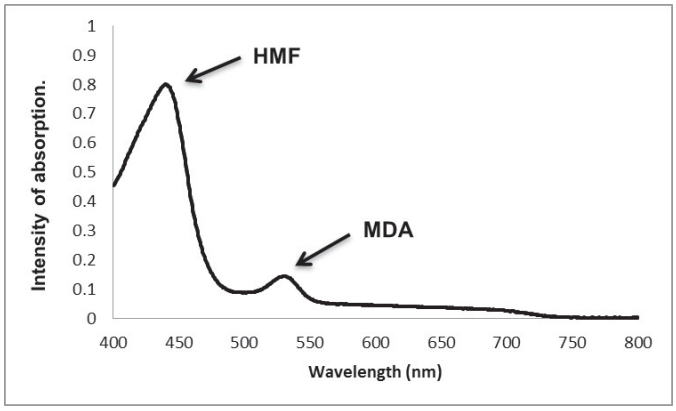
ต่อมาก็จะทำการหาค่าของร้อยละการคืนกลับ, %RSD และ %CV ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดยทดสอบกับตัวอย่างนมพร้อมดื่มในท้องตลอด โดยปิเปตตัวอย่างนมพร้อมดื่มที่ได้ทำการเติมสารมาตรฐาน HMF และสารมาตรฐาน MDA จำนวน 5 ตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นความเข้มข้น 80 nmol/mL และ 10 nmol/mL ตามลำดับ ปริมาตร 2 ml ลงในหลอดทดลองแล้วจะเติม 1% trichloroacetic acid ลงไปอีก 2 mL จากนั้นจะนำสารละลายตัวอย่างไปทำการเซนติฟิวจ์ที่ 4000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออก แล้วจึงนำสารละลายใสด้านบนมาทำการกรองด้วย Syringe Filters PTFE membrane ขนาด 0.45 ไมครอน อีกครั้งก่อนที่จะนำไปเตรียมอนุพันธ์และวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบทั้งสองด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อคำนวณหาค่าของร้อยละ

การคืนกลับ (%Recovery) , %RSD ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น

## ผลการวิจัย

**ตอนที่ 1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์**

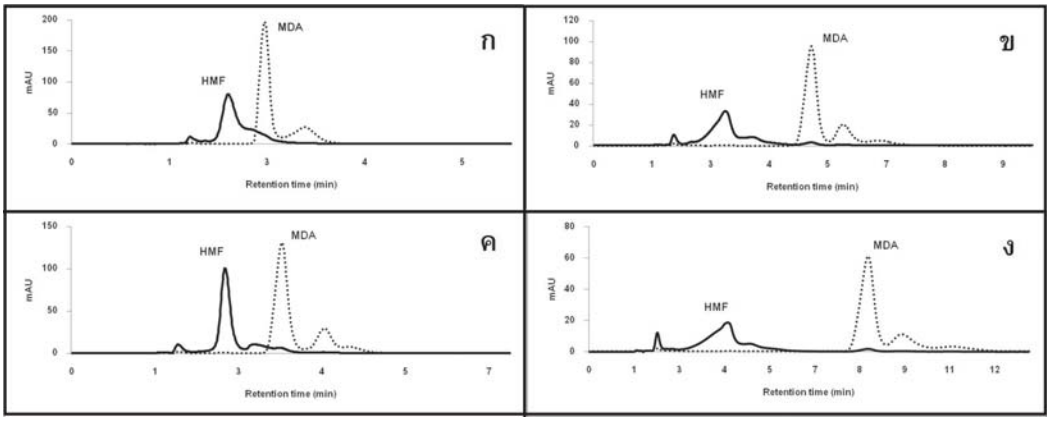
การทดสอบสารประกอบจำพวกแอลดีไฮด์ด้วยสารละลายของ TBA หรือที่นิยมเรียกกันว่า TBA-assay นั้น มักใช้ทั่วไปในการระบุถึงปฏิกิริยาลิปิดออกซิเดชันในอาหาร ซึ่งทำให้เกิด MDA ขึ้นจากผลของการสลายตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หรือพันธะสามในองค์ประกอบ โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับ MDA แล้วจะให้ chromophore ที่เป็นสีชมพูและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 532 nm ($\lambda_{max}$ = 532, $TBARS_{532}$) [11] นอกจากนี้ 2-ไทโอบาร์บิทุริก ยังสามารถเกิดปฏิกิริยากับแอลดีไฮด์ชนิดอื่นๆ แล้วให้ chromophore ที่เป็นสีเหลืองและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 455 nm ($\lambda_{max}$ = 455, $TBARS_{448}$) [12] อย่างเช่นที่เกิดกับ HMF โดยสเปกตรัมที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตโฟโตมิเตอร์ ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยพบว่าอนุพันธ์ของ MDA จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 nm และ HMF จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 448 nm




**ภาพที่ 2** สเปกตรัมของอนุพันธ์ของ MDA และ HMF ที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ 2-ไทโอบาร์บิทุริก

**1.1 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่**

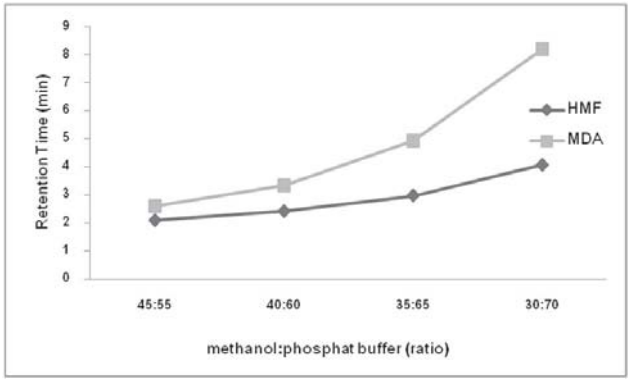
การศึกษาผลขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อผลรูปร่างหน้าตาของพีคสัญญาณของอนุพันธ์ และระยะเวลารีเทนชันของอนุพันธ์ นั้นจะทำการทดสอบโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนของเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 10 mM ที่ช่วงตั้งแต่ 45:55, 40:50 35:75 และ 30:70 (methanol:phosphate buffer, v/v) และทำการศึกษาที่อัตราส่วนแบบ isocratic elution ซึ่งใช้สภาวะเบื้องต้นในการทดสอบ (20mM TBA, อุณหภูมิ 50 ˚C นาน 60 นาที, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5, และใช้อัตราการไหลที่ 1.0 mL/min) จากผลการศึกษาพบว่า องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่มีผลต่อรูปร่างของพีคที่เกิดขึ้นจากกระบวนการแยกอย่างชัดเจน โดยเมื่อกำหนดให้องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มีเปอร์เซนต์ของเมทานอลที่สูง จะพบว่าพีคสัญญาณของสารมาตรฐานของทั้ง MDA และ HMF ยังไม่สามารถแยกตัวออกจากสารรบกวนได้ชัดเจน แต่เมื่อลดองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มีเปอร์เซนต์ของเมทานอลลดลงจะทำให้พีคสัญญาณของสารมาตรฐานของทั้งสามารถแยกตัวออกจากสารรบกวนได้ โดยโครมาโทแกรมที่ทำการศึกษาแสดงในภาพที่ 3




**ภาพที่ 3** โครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

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

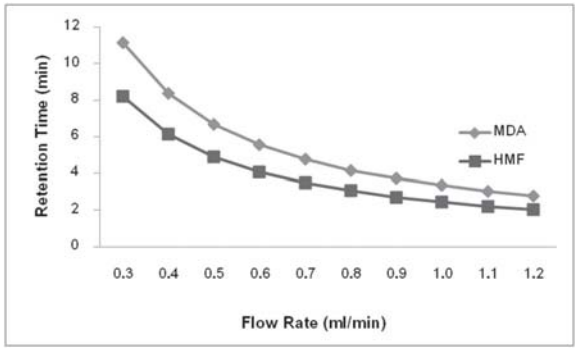
จากภาพประกอบ 3 พบว่า โครมาโทแกรมที่สามารถแยกพีคสัญญาณสารรบกวนออกจากพีคสัญญาณของอนุพันธ์จากสารมาตรฐานทั้งสองได้ดีที่สุด เมื่อเลือกใช้องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ในอัตราส่วนตัวทำละลายของเมทานอลต่อฟอสเฟตบัพเฟอร์เท่ากับ 40:60 (ข) และเมื่อทำการศึกษาผลจากองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อค่าระยะเวลารีเทนชัน (retention time) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 4 พบว่าเมื่อทำการลดองค์ประกอบของเมทานอลที่ใช้เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ให้ต่ำลงค่าของระยะเวลารีเทนชันจากอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ และทำให้เวลาที่ใช้ในกระบวนการวิเคราะห์มากขึ้น ซึ่งที่องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ของเมทานอลต่อฟอสเฟตบัพเฟอร์เท่ากับ 40:60 ให้ค่าระยะเวลารีเทนชันของอนุพันธ์ทั้งสองอยู่ในช่วงเหมาะสม




**ภาพที่ 4** ผลของการศึกษาผลจากองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อค่าระยะเวลารีเทนชัน

**1.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่**

การศึกษาอัตราส่วนการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งโดยจะทำการศึกษาในช่วงอัตราการไหลที่ 0.3 mL/min จนถึง 1.2 mL/min ที่มีผลต่อระยะเวลารีเทนชันของอนุพันธ์ ดังแสดงในภาพที่ 5



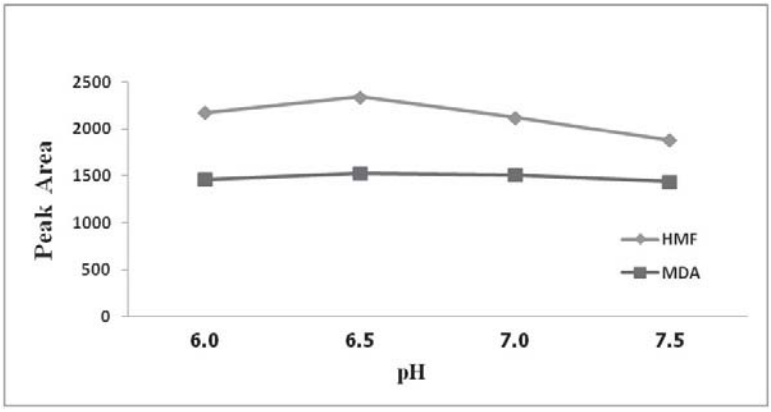

**ภาพที่ 5** ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อ ระยะเวลารีเทนชัน ของสารอนุพันธ์ทั้งสอง

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

จากผลการทดลองนี้พบว่า การเพิ่มอัตราการไหลส่งผลให้อนุพันธ์ทั้งสองถูกชะออกมาเร็วยิ่งขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 5 แต่การเพิ่มอัตราการไหลสูงของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้สูงขึ้น จะทำให้พีคสัญญาณจากโครมาโทแกรมของสารทั้งชนิดมีโอกาสการซ้อนทับกันได้ นอกจากนี้ยังส่งผลให้แรงดันในระบบสูงขึ้นจนเกินไปในระบบที่ใช้อัตราการไหลสูงๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 1.0 mL/min เป็นสภาวะที่เหมาะสมของระบบ

**1.3 pH ที่ใช้ในการแยก**

การศึกษาผลของ pH ที่ใช้ในการแยกจะทดสอบจากการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ทำการเตรียมให้มีช่วงของ pH ที่ 6.0 – 7.5 แล้วจึงนำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ที่ต้องการทดสอบมาใช้เป็นส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ในกระบวนการวิเคราะห์และติดตามและติดตามค่าของพื้นที่ใต้พีคของสัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 6

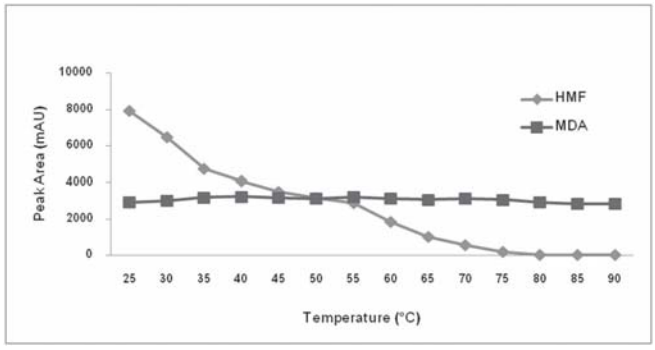



**ภาพที่ 6** ผล pH ที่มีต่อการวิเคราะห์สารอนุพันธ์จาก MDA และสารอนุพันธ์จาก HMF

ผลการศึกษาพบว่าค่าของ pH ที่ 6.5 เป็นสภาวะของ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เนื่องจากให้ค่าพื้นที่ใต้พีคของสัญญาณการวิเคราะห์ของอนุพันธ์ของ HMF มีมากที่สุด ในขณะที่ค่าพื้นที่ใต้พีคของสัญญาณการวิเคราะห์ของอนุพันธ์ของมาลอนไดแอลดีไฮด์ เห็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ของ MDA มีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงค่าของ pH มากกว่า อนุพันธ์ของ HMF ดังนั้นค่าของ pH ที่เหมาะสมจึงควรอยู่ที่ประมาณ 6.5

**1.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์**

เนื่องจากการเตรียมอนุพันธ์ส่วนมากต้องอาศัยพลังงานความร้อนเข้าช่วยในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงได้ช่วงของอุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ โดยจะทำการศึกษาที่ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 25 ˚C – 90 ˚C และเมื่อเตรียมอนุพันธ์ได้แล้วจำนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ MDA และ HMF ตามแสดงในภาพที่ 7



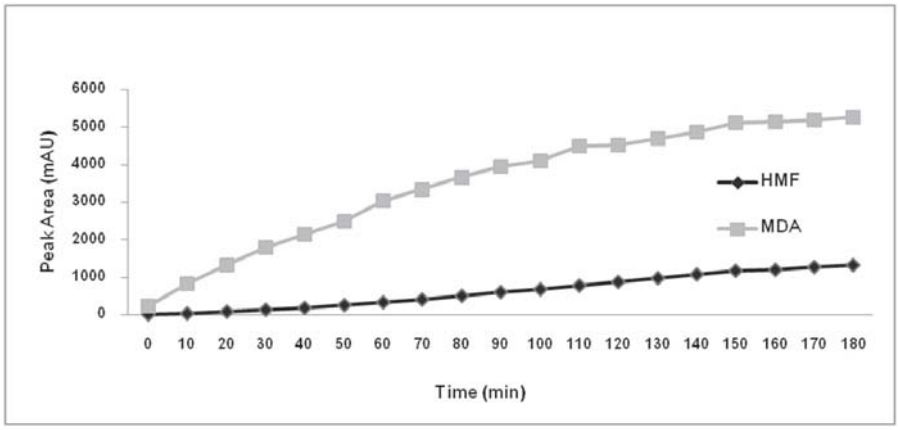

**ภาพที่ 7** การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อสัญญาณของการวิเคราะห์สารอนุพันธ์ทั้งสอง

ผลการศึกษาพบว่าสัญญาณของ HMF มีแนวโน้มลดลงอย่างมากตามอุณหภูมิที่เพิ่มมากขึ้น อาจเป็นผลมาจากการที่ HMF เกิดการสลายตัวเนื่องจากความร้อน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Girisuta และคณะในปี ค.ศ. 2006 ที่ศึกษาจลนศาสตร์การเปลี่ยนแปลงของ HMF ไปเป็นกรดลิวูลินิก โดยใช้ TBA-Assay ทดสอบ [13] โดยปริมาณ HMF ลงลดไปเรื่อยๆ เมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิ

จึงเป็นสาเหตุการลดลงของสัญญาณ ในขณะที่สัญญาณของ MDA มีแนวโน้มคงที่ ดังนั้นสภาวะของอุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์ที่เหมาะสมจึงอยู่ที่ 25 ˚C

**1.5 ระยะเวลาใช้ในการเตรียมอนุพันธ์**

ในการเตรียมอนุพันธ์ จะทำการหาระยะเวลาที่ MDA และ HMF ทำปฏิกิริยากับ TBA เสร็จสิ้น โดยในการศึกษาผลของระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์จะทำการเก็บสารละลายสีของอนุพันธ์ที่กำลังทำการเตรียมอยู่ทุกๆ 10 นาที แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบทั้งสอง โดยผลการศึกษาดังแสดงในภาพที่ 8

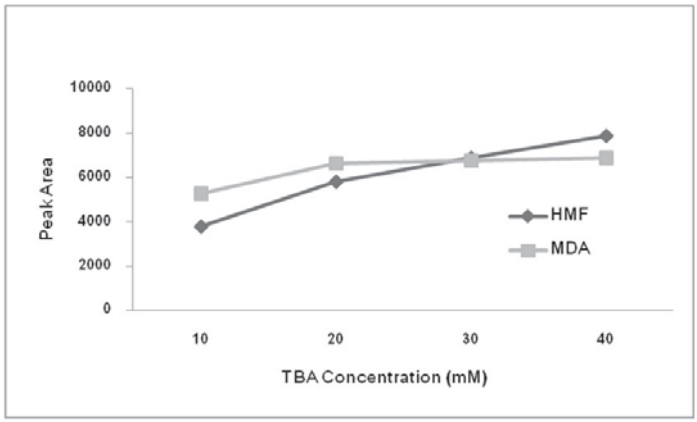



**ภาพที่ 8** การศึกษาผลของระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ที่มีผลต่อสัญญาณของการวิเคราะห์สารอนุพันธ์ทั้งสอง

จากภาพพบว่าเมื่อเวลาในการเตรียมอนุพันธ์เพิ่มมากขึ้นสัญญาณการวิเคราะห์ก็เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งแสดงว่ามีการเกิดอนุพันธ์จากสารตั้งต้นอย่างต่อเนื่อง แต่เมื่อเวลาผ่านไปที่ช่วงเวลาประมาณ 150 นาที อัตราการเพิ่มขึ้นของสัญญาณการวิเคราะห์มีแนวโน้มลดลงจนเกือบคงที่ ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอนุพันธ์ของของ MDA และ HMF จึงอยู่ที่เวลาตั้งแต่ 150 นาที เป็นต้นไป

**1.6 ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์**

ความเข้มข้นของปริมาณสารละลาย TBA ซึ่งใช้เป็นรีเอเจนต์ในการเตรียมอนุพันธ์ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญเนื่องจากส่งผลต่ออัตราการเกิดอนุพันธ์ในแง่ของสารกำหนดปริมาณ ซึ่งจะทำการศึกษาโดยเตรียมสารละลาย TBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 10 mM 20 mM 30 mM และ 40 mM แล้วจึงนำไปใช้ในการเตรียมอนุพันธ์กับสารประกอบ MDA และ HMF แล้วจึงศึกษาสัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าค่าของพื้นที่ใต้พีคสัญญาณมีการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ TBA โดยจะขึ้น 40mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่อิ่มตัว (ไม่สามารถเตรียมละลายให้มีความเข้มข้นได้มากกว่านี้) ดังแสดงในภาพที่ 9



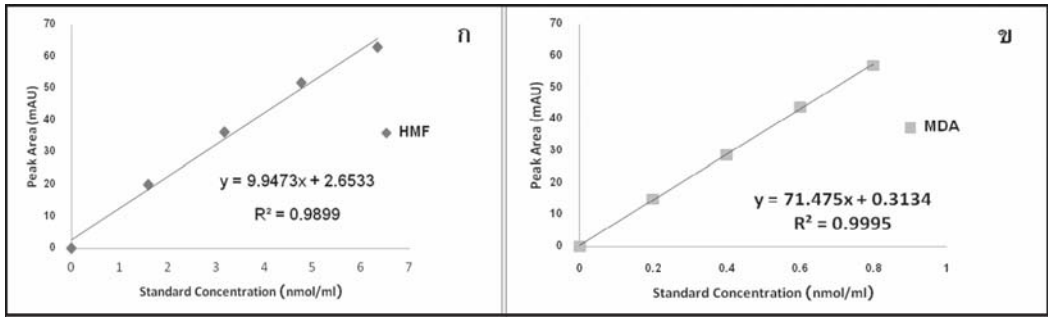

**ภาพที่ 9** การศึกษาผลของความเข้มข้น TBA ที่มีผลต่อสัญญาณของการวิเคราะห์สารอนุพันธ์ทั้งสอง

ดังนั้นเมื่อกำหนดอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 40:60 และ -1.0 ml/min ค่า pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่า 6.5 ใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ที่ 25 ˚C เป็นเวลา 180 นาที และใช้ความเข้มข้นของรีเอเจนต์ที่ 40mM จะทำให้สามารถทำการแยกอนุพันธ์ของ HMF และ TBA ออกจากสารรบกวนได้ที่เวลาประมาณ 2.6 และ 3.4 นาทีตามลำดับ โครมาโทรแกรมที่ทดลองได้ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 6 นาที ต่อหนึ่งตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

**ตอนที่ 2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น**

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

ซึ่งหลังจากทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้งสองด้วยเทคนิคเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแล้ว จึงได้นำโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานในช่วงดังกล่าวไปคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความเข้มข้นกับสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์เพื่อนำไปสร้างสมการกราฟของสารมาตรฐานทั้งสอง ดังแสดงในภาพประกอบที่ 10



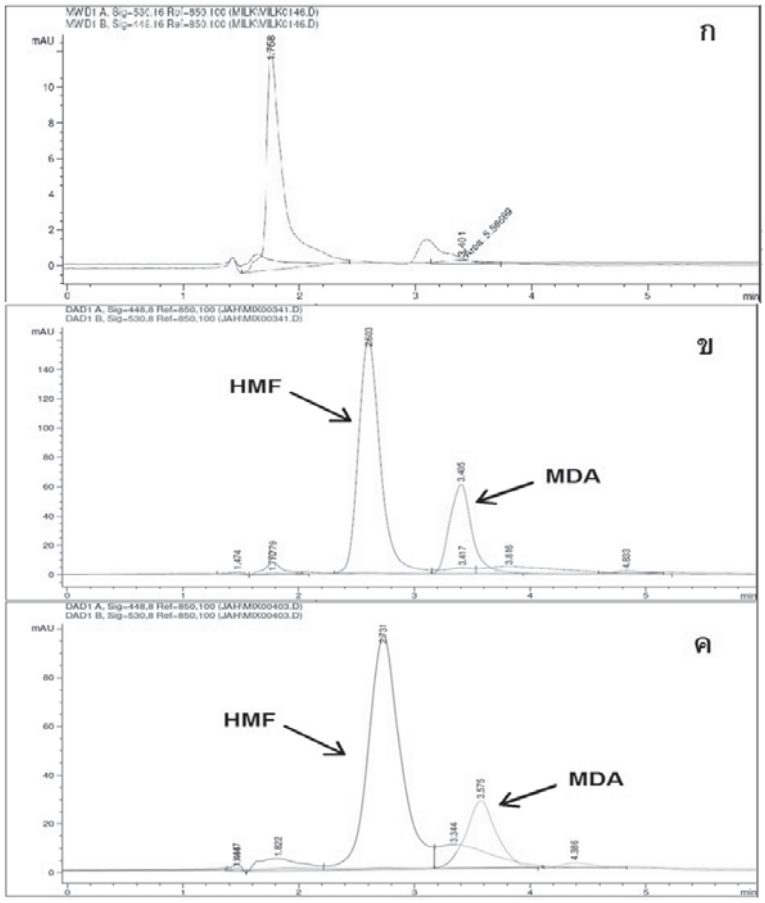

**ภาพที่ 10** กราฟความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความเข้มข้นกับสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเครื่อง โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ก แทน กราฟมาตรฐานของอนุพันธ์ของสารประกอบ HMF

ข แทน กราฟมาตรฐานของอนุพันธ์ของสารประกอบ MDA

จากภาพประกอบ 20 จะเห็นว่า จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความเข้มข้นกับสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์ มีสมการเส้นตรง Y = 9.9473X + 2.6533 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $R^2$ = 0.9899 ส่วนสารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ มีสมการเส้นตรงคือ Y = 71.475X + 0.3134 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $R^2$ = 0.9995 และเมื่อนำไปหาค่าของขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) พบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ค่า LOD ของอนุพันธ์จาก MDA และ HMF เท่ากับ 0.01 nmol/ml และ 0.30 nmol/ml ตามลำดับ และให้ค่า LOQ ของอนพันธ์จาก MDA และ HMF เท่ากับ 0.07 nmol/ml และ 2.38 nmol/ml ตามลำดับ

การคำนวณหาค่าของร้อยละการคืนกลับ โดยจะทำการทดสอบโดยอาศัยการวัดสัญญาณการวิเคราะห์ของตัวอย่างนมที่มีการเติมสารมาตรฐานลงไปเทียบสัญญาณที่ได้จากสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่เติมลงไปดังกล่าว หรือเรียกว่าการทำ spike จากผลการทดลองพบว่าค่าของร้อยละการคืนกลับของอนุพันธ์จาก MDA และ HMF อยู่ที่ 75.71% และ 107.51% ตามลำดับ โดยตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ใช้ในการศึกษาค่าของร้อยละการคืนกลับ จะแสดงดังภาพประกอบที่ 11 สำหรับการศึกษาความแม่นยำของวิธี จะอาศัยการวัดตัวอย่างนมซ้ำกันจำนวน 5 ครั้ง โดยผลการทดสอบพบว่า วิธีการนี้มีค่าความแม่นยำโดยแสดงผลในรูปของ %RSD โดยของอนุพันธ์จาก MDA อยู่ที่ 8.5 และอนุพันธ์จาก HMF อยู่ที่ 6.2




**ภาพที่ 11** แผนภาพแสดงโครมาโทแกรมแสดงโครมาโทแกรม ดังนี้

ก แทน โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างนมพร้อมดื่มชนิดพาสเจอร์ไรท์ รสจืด

ข แทน โครมาโทแกรมสารละลายผสมของสารมาตรฐาน MDA และสารมาตรฐาน HMF

ค แทน โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างนมพร้อมดื่มชนิดพาสเจอร์ไรท์รสจืดที่มีการเติมสารละลายผสมของสารมาตรฐาน MDA และสารมาตรฐาน HMF ลงไป

## สรุปและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้เป็นการนำเสนอวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบสองชนิดได้แก่ MDA และ HMF ซึ่งเป็นสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเสื่อมสภาพของอาหาร นอกจากนี้สารประกอบดังกล่าวยังมีพิษต่อระบบร่างกายของมนุษย์ในการเป็นสารก่อมะเร็ง ซึ่งหลังจากทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมแล้วพบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้วิเคราะห์สารประกอบ MDA และ HMF ได้อย่างมีประสิทธิภาพมีความถูกต้องและแม่นยำสูง อีกทั้งยังลดค่าใช้จ่ายจากการวิเคราะห์ที่มากกว่าหนึ่งประบวนการ และใช้เวลาสั้นในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพียง 6 นาที โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับตัวอย่างอาหารและตัวอย่างทางชีวภาพได้ เพื่อประโยชน์ในการควบคุมและบ่งบอกถึงคุณภาพของอาหารในอุตสาหกรรมได้ด้วย

## เอกสารอ้างอิง


[1] Lawrence, J. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*. 181-182; 219-222.

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

[3] Hodge, J. E. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem*. 1: 928-943.

[4] Guyomacrch, F. (2000). Lactosylation of milk proteins during manufacture and storage of skim milk powers. *Int. Dariry. J*. 10: 863-872.

[5] Finot, P. (1990). *The Maillard Reaction in food Processing*. Humam Nutrition and Physiology, Birkhauser Verlag, Basel.

[6] Fayle, S. E. and Gerrard, J. A. (2002). *The Maillard Reaction*, Royal society of Chemistry. Cambridge.

[7] AOAC. (1984). *Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists*. Washington DC.

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

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

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

[11] Rosmini, M. and Perez-Alvarez, J. (1996). TBA test by an extractive method applied to 'pate', *Meat Science*. 42: 103-110.

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

[13] Girisuta, B. and Heeres, H. J. (2006). A kinetic study on the decomposition of hydroxymethylfurfural into levulinic acid. *Green Chemistry*. 8: 701-709.