การวิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

QUANTITATIVE ANALYSIS OF MALONDIALDEHYDE IN SOYBEAN MILK SAMPLE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

อำนาจ กะฐินเทศ พรพิมล ม่วงไทย

Amnaj Katintet, *Pornpimon Muangthai*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

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

Corresponding author, E-mail: *amnai_1981@hotmail.com*

บทคัดย่อ

มาลอนไดอัลดีไฮด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน สารนี้เป็นสารก่อมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง และโรคพาร์กินสัน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยการทำสารอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมรวมทั้งประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ สารอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์เกิดได้ดีที่สภาวะเป็นกรดและอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและหัววัดไดโอดแอเรย์ พบว่าเฟสเคลื่อนที่เป็น 50 มิลลิโมลาร์โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและเมธานอล อัตราส่วน 60:40 ค่าพีเอช 6.8 จะให้ค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (LOD) 0.01 ไมโครโมลาร์ ร้อยละของการกลับคืน (% recovery) อยู่ในช่วง 100-105 จากการตรวจวัดในน้ำนมถั่วเหลืองจากตลาดและซุปเปอร์มาร์เก็ตมีปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ 47.89-95.87 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

คำสำคัญ: มาลอนไดอัลดีไฮด์ ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน กรดไทโอบาร์บิทูริก

Abstract

Malondialdehyde, produced by lipid peroxidation reaxtion, has been proven to be a mutagenic substance and related to many diseases such as diabetes, cancer and parkinson's disease. In this work, malondialdehyde was assayed by derivatising with 2-thiobarbituric acid at 80°C in acid medium. The derivative was chromatographic quantified using a 50 mM KH_2PO_4-methanol (60:40) elution (pH 6.8) and diode array detector. The analysis gave limit of detection (LOD) at 0.01 μM with recovery 100-105%. The amount of malondialdehyde in soybean milks from local market and supermarket was found at 47.89-95.87 μg/kg.

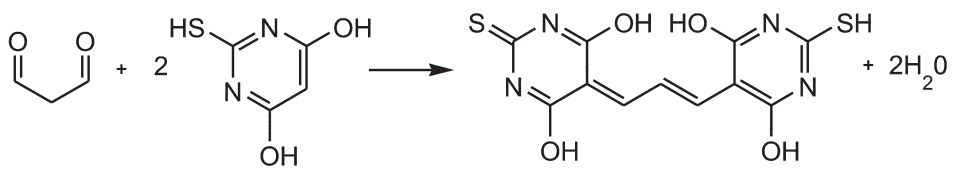
Keywords: malondialdehyde lipid peroxidation 2-thiobarbuturic acid

บทนำ

การเกิดออโตออกซิเดชัน (auto oxidation) เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพของอาหารหลายประเภท โดยเฉพาะประเภทที่อุดมไปด้วยไขมันหรือน้ำมัน โดยกรดไขมันประเภทไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids, PUFA) สามารถเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid- peroxidation) ได้ง่าย [1] การเสื่อมลงของอาหารประเภทนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารนี้จะไม่เสถียร และเป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (primary product) ของปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน เมื่อเปอร์ออกไซด์เกิดการสลายตัวจะทำให้เกิดผลิตผล 2 ชนิด ได้แก่ อัลดีไฮด์ และ คีโตน ซึ่งสารสองชนิดนี้จะส่งผลต่อการเสื่อมลงของรสชาติอาหาร และการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ แต่โดยส่วนใหญ่สารที่เป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ (secondary product) ของกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชันจะเป็นมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde หรือ MDA)

มาลอนไดอัลดีไฮด์จะใช้เป็นสารต้นแบบ (model) หรือตัวชี้บอกทางชีววิทยา (biomarker) สำหรับศึกษากระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในสิ่งมีชีวิต ซึ่งถ้าสารนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้น จะแสดงถึงความผิดปกติหรือเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง และโรคพาร์กินสัน [2] และในอุตสาหกรรมอาหารมาลอนไดอัลดีไฮด์จะเป็นตัวบ่งบอกถึงการเสื่อมของรสชาติ คุณค่าทางโภชนาการของอาหารในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาอาหาร เนื่องจากมาลอนไดอัลดีไฮด์เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก มีความเป็นขั้วสูง สามารถละลายน้ำได้ดี และไม่เสถียร จึงทำให้ยากในการสกัด และมาลอนไดอัลดีไฮด์เองไม่มีโครโมฟอร์ (chromophore) อิเลกโตรฟอร์ (electrophore) หรือฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ที่จะสามารถตรวจวัดได้ ดังนั้นการวิเคราะห์โดยการสร้างอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก (2-thiobarbituric acid หรือ TBA) เกิดเป็น (MDA-TBA complex) จะง่ายกว่า มีหลายเทคนิคที่นำมาใช้วัด MDA-TBA complex ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ทั้งทางตรง ได้แก่ การใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และทางอ้อม ได้แก่ การใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี [3]

อนุพันธ์ของสารมาลอนไดอัลดีไฮด์กับกรดไทโอบาร์บิทูริกเกิดจากปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation) ของกรดไทโอบาร์บิทูริกและมาลอนไดอัลดีไฮด์ได้เป็นสารมีสีเรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) แสดงดังสมการที่ 1



malondialdehyde 2-thiobarbituric acid (colored condensation product) 1

สมการที่ 1 ปฏิกิริยาของ malondialdehye กับ 2- thiobarbituric acid

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

ในการศึกษาหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์จากการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้มีการศึกษาและมีรายงานผลงานวิจัยค่อนข้างมาก โดยมีผลการศึกษาในตัวอย่างทางชีวภาพ (biological sample) และตัวอย่างอาหารต่างๆ [4-5] ฟรานโคอีส และคณะ [6] ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคเพื่อใช้ในการศึกษาหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างนมผง โดยการวิเคราะห์ด้วย 2 เทคนิค คือ เทคนิคโครมาโทราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าการวิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดิไฮด์ในตัวอย่างนมผง 4 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค HPLC MDA-TBA ปริมาณที่พบ คือ809, 848, 516 และ 385 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม HPLC MDA-DNPH ปริมาณที่พบ คือ 92, 414, 99 และ 113 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ GC-MS MDA-PH ปริมาณที่พบ คือ 51, 266, 65 และ 93 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมพบว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS MDA-PH จะมีความจำเพาะ และถูกต้องมากกว่าการใช้เทคนิค HPLC-UV เนื่องจากสามารถกำจัดสารรบกวนตัวอื่นๆ ออกจากระบบได้

สเตฟาเนีย ซีซา [7] ศึกษาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในนมทารก โดยสกัดด้วยวิธี aquouse acid extracton ร่วมกับวิธีกรดไทโอบาร์บิทูริก (TBA test) ซึ่งในนมทารก จะมีการเติมน้ำมันพืช ที่มีปริมาณของกรดไขมันประเภทไม่อิ่มตัว (PUFA) เข้าไปในกระบวนการผลิตนม จากการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในตัวอย่างนม 20 ชนิด และตัวอย่างนมวัวบางชนิด เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลกันพบว่า ระดับปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในนมทารก อยู่ในช่วง 200-1200 ppb ซึ่งค่าทั้งหมดจะสูงกว่าในนมวัวถึง 5 เท่า

จากข้อมูลเบื้องต้น พบว่า วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทั่วไปนิยมใช้วิธีทางสเปกโทรเมทรีบ [8] ส่วนวิธีทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนิยมใช้วิธีการเตรียมสารอนุพันธ์กับกรดไทโอบาร์บิทูริก ยังไม่พบรายงานในการนำไปตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง จึงเป็นที่น่าสนใจจะทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยนมเป็นอาหารที่คุณค่าทางโภชนาการนิยมบริโภคกันทุกเพศทุกวัย เนื่องจากนมมีไขมันเป็นส่วนประกอบ โดยเฉพาะในนมวัวมีปริมาณไขมันค่อนข้างสูงสามารถเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังมีน้ำนมพร้อมดื่มจำนวนมากที่ผลิตจากถั่วเหลือง ซึ่งอาจเกิดลิปิดออกซิเดชันได้เช่นกัน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการเกิดมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่าง น้ำนมถั่วเหลืองแปรรูป โดยศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่าง ด้วยวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการในการวิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยการเตรียมอนุพันธ์

2. เพื่อศึกษาวิธีการตรวจหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในน้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่ม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและตัวตรวจวัดแบบ diode array จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100

2. คอลัมน์ C18 (SphereClone 5 μm ODS, ขนาด 250 x 4.60 mm) จากบริษัท Phenomenex

3. Hydrochloric acid (AR grade)

4. Potassium dihydrogen phosphate (AR grade)

5. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP)

6. 2-Thiobarbituric acid (HPLC grade)

7. Trichloroacetic acid (AR grade)

ตอนที่ 1 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการในการวิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์

1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ (10 mM)

นำสารละลายมาตรฐานเตตระ-เอทธอกซีโพรเพนปริมาณ 23.0 มิลลิกรัม และกรดไฮโดรคลอริก (0.1 N) ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่อ่างน้ำร้อน 40 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที สารละลายที่ได้เก็บได้นาน 1 เดือน ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียมอนุพันธ์สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์และกราฟมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก (5% w/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร ดังนี้ 0.00, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออนเติมลงไปปริมาตร 1,000, 990, 975, 950, 900 และ 750 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของมาลอนไดอัลดีไฮด์คือ 0.0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ปิเปตสารละลายกรดไทโอบาร์บิทูริก (25 mM) 1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที เป็นเวลานาน 10 นาที กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ฉีดสารละลายที่ได้ 25 ไมโครลิตร เข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอเรย์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 531 นาโนเมตร

1.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

ศึกษาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์และอัตราส่วนของโมบายเฟส (Mobile phase) ที่มีผลต่อการแยกสารอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์ ดังนี้

ก. KH_2PO_4 (50 mM) และอัตราส่วนระหว่าง KH_2PO_4 กับเมธานอล มีดังนี้ 50:50, 55:45, 60:40, 65:35 และ 70:30 (pH 6.0)

ข. KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 มิลลิโมลาร์

ค. pH ของสารละลาย KH_2PO_4 เป็น 5.40, 5.60, 5.80, 6.00, 6.20, 6.40, 6.60, 6.80 และ 7.00

ง. อัตราการไหลของโมบายเฟส (Flow rate) ได้แก่ 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

1.4 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

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

ทำการทดลองโดย spike สารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0.10 ไมโครโมลาร์ ในแบลงก์ (น้ำปราศจากไอออน) แล้วทำการเตรียมอนุพันธ์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์ ทำการทดลอง 10 ซ้ำ

1.4.2 ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืน (% recovery)

ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ร้อยละกลับคืนโดยเติมสารมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ ลงไปในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง และทำการทดลองเหมือนหัวข้อการเตรียมตัวอย่างในตอนที่ 2

ตอนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง

ตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองที่นำมาทดลองได้แก่ น้ำนมถั่วเหลืองชนิด home made จัดซื้อจากตลาดสดในเขตกรุงเทพ น้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่มชนิดสูตรเจ สูตรผสมน้ำตาล สูตรผสมนมผง

และอื่นๆ จัดซื้อจากซุปเปอร์มาร์เกต จำนวน 14 ตัวอย่าง

2.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง

ตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง 12.50 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนเพื่อละลายน้ำนมถั่วเหลือง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้เป็น 25 มิลลิลิตร นำตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายไตรคลอโรอะซีติก 3 มิลลิลิตร ผสมกับตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดไทโอบาร์บิทูริก 1 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 วินาที นำตัวอย่างดังกล่าวไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสของตัวอย่างไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำสารละลายไปแช่ในน้ำเย็นทันที เป็นเวลานาน 10 นาที เก็บตัวอย่างเพื่อไว้ทดลองต่อไป

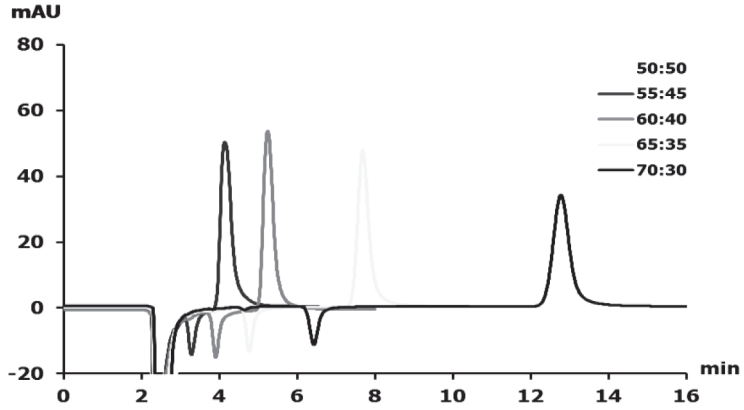
2.2 การทดลองวิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง

นำตัวอย่างจากข้อ 2.1 กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองตอนที่ 1 บันทึกพื้นที่พีคของพีคสารอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์ เพื่อนำไปเทียบกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ คำนวณหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์

จากการศึกษาการแยกสารอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่าสารละลาย KH_2PO_4 เข้มข้น 50 mM ที่อัตราส่วนของ KH_2PO_4 และเมธานอลเป็น 60:40 (pH 6.0) จะให้พีคที่สมมาตร ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงโครมาโทแกรมของสารอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น KH_2PO_4 กับเมธานอลในอัตราส่วนต่างๆ

KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ อัตราส่วน 60:40 pH 6.0 จะให้พื้นที่ใต้พีคที่สูงสุด พีคสมมาตร ฐานพีคแคบ เวลา 5.243 นาที ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลของความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

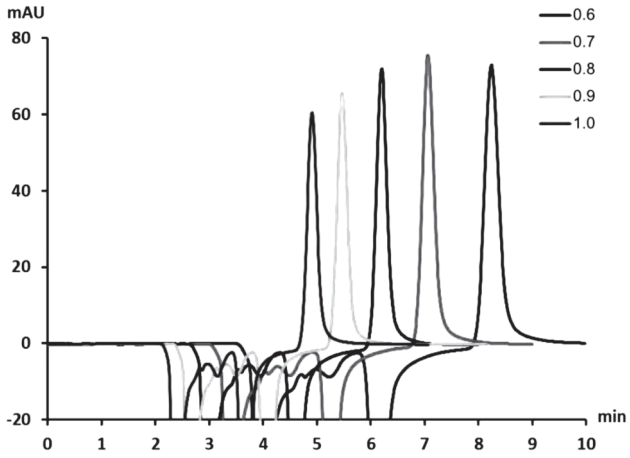
KH_2PO_4 (mM)	Retention time, t_R (min)	Peak area
20	4.807	1099.928
30	5.061	1114.887
40	5.120	1110.786
50	5.243	1150.899
60	5.338	1105.666
70	5.428	1124.902

pH ที่มีผลต่อการแยกสารอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์ ทำการศึกษาที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 5.40 5.60 5.80 6.00 6.20 6.40 6.60 6.80 และ 7.00 ที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ 50 mM KH_2PO_4 ต่อเมธานอล เป็น 60:40 จากผลการศึกษาพบว่าที่ pH 6.8 ให้พื้นที่ใต้พีคที่สูงสุด เวลา 4.997 นาที และเมื่อ pH ของบัฟเฟอร์ลดลงทำให้สารอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์ถูก retained ในคอลัมน์ได้นานมากขึ้น ทำให้ใช้เวลาในการแยกมากขึ้น และทำให้พื้นที่ใต้พีคลดลงตามลำดับ ดังตารางที่ 2

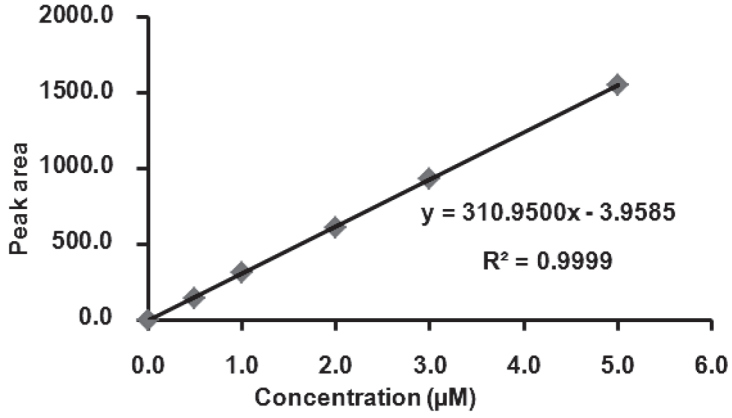
ตารางที่ 2 แสดงผลของ pH ที่มีผลต่อค่า retention time

pH	Retention time, t_R (min)	Peak area
5.4	5.628	902.787
5.6	5.528	922.030
5.8	5.358	950.908
6.0	5.288	954.275
6.2	5.188	974.110
6.4	5.103	951.695
6.6	5.044	968.314
6.8	4.997	996.111
7.0	4.850	963.427

ศึกษาผลของอัตราการไหลโมบายเฟสที่มีผลต่อการแยกสารอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยปรับอัตราการไหลของโมบายเฟสที่ 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าที่อัตราการไหลของโมบายเฟสที่ 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที จะให้ค่าพีคที่มีความเข้มสูงที่สุด เวลา 7.071 นาที ดังภาพที่ 2



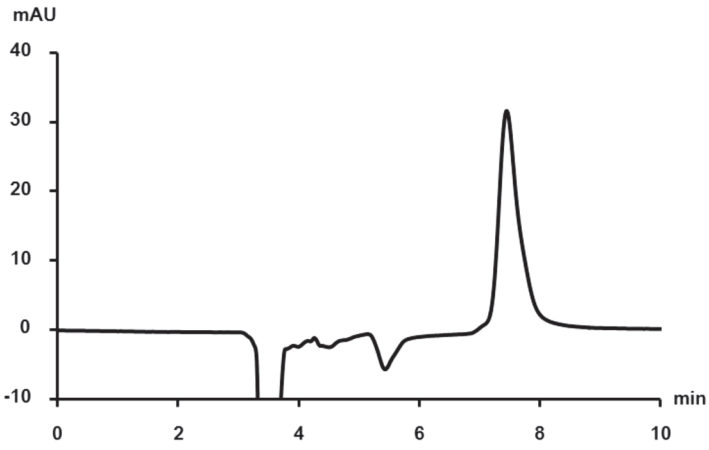
ภาพที่ 2 ผลของการแปรผันอัตราการไหลโมบายเฟส



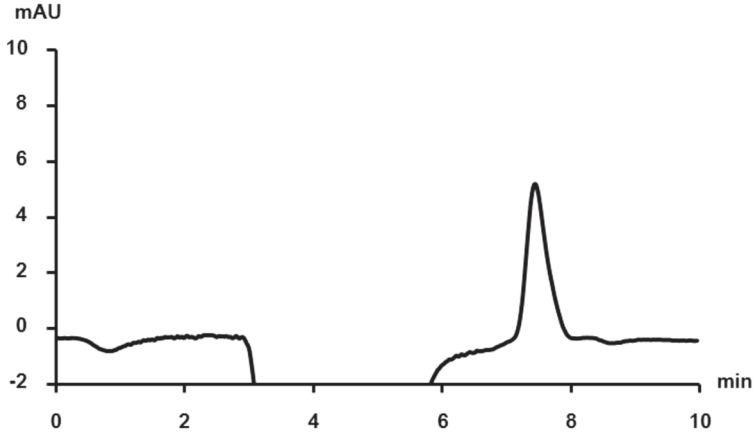
ภาพที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์

2. ปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในน้ำนมถั่วเหลือง

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองชนิด home made น้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่มชนิดสูตรเจ สูตรผสมน้ำตาล สูตรผสมนมผง และอื่นๆ ที่จัดซื้อในซุปเปอร์มาร์เกต ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวอย่างแสดงในภาพที่ 5 และตารางที่ 3 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ตรวจพบจะมีค่าที่กระจายมาก และอยู่ในระดับที่ต่ำ



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นมาลอนไดอัลดีไฮด์ 5.0 ไมโครโมลาร์



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองพร้อมดื่ม (n=14)

ลำดับตัวอย่าง	ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (µg/kg) ± SD
1	70.68±4.76
2	92.90±5.86
3	47.89±1.62
4	86.07±4.23
5	59.30±3.37
6	72.95±3.64
7	68.25±1.74
8	58.17±1.05
9	58.44±1.92
10	75.86±4.02
11	92.36±5.28
12	95.87±3.63
13	80.02±3.64
14	80.61±3.29

หมายเหตุ:

ตัวอย่างที่ 1-3 น้ำนมถั่วเหลืองสูตรน้ำตาลน้อย (3 ยี่ห้อ)
ตัวอย่างที่ 4-6 น้ำนมถั่วเหลืองสูตรหวาน (3 ยี่ห้อ)
ตัวอย่างที่ 7-10 น้ำนมถั่วเหลืองสูตรเจ (4 ยี่ห้อ)
ตัวอย่างที่ 11-13 น้ำนมถั่วเหลืองสูตรหวานผสมนมผง (3 ยี่ห้อ)
ตัวอย่างที่ 14 น้ำนมถั่วเหลือง home made จัดซื้อจากตลาดสดในเขตกรุงเทพ

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกมาลอนไดอัลดีไฮด์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิโม-ลาร์ โปแตสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต pH 6.80 อัตราการไหลโมบายเฟส 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราส่วนบัฟเฟอร์กับเมธานอล 60:40 คือสภาวะที่เหมาะสมใช้วิเคราะห์หาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลือง Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.01 และ 0.04 ไมโครโมลาร์ [5] และร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 100-105 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่าปริมาณที่ตรวจพบจะอยู่ในช่วง 47.89-95.87 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งปริมาณที่พบยังอยู่ในระดับที่ต่ำ ซึ่งตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองที่ตรวจพบปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ไม่แตกต่างกันทั้งสูตรหวาน สูตรหวานน้อย และสูตรหวานผสมนมผง จากผลดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ตรวจพบในน้ำนมถั่วเหลืองและนมผง ด้วยเทคนิค และทำอนุพันธ์ด้วยกรดไทโอบาร์บิทูริกชนิดเดียวกัน ปริมาณที่ตรวจพบในน้ำนมถั่วเหลืองอยู่ในช่วง 47.89-95.87

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนในนมผงอยู่ในช่วง 385-848 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม [6] ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่พบในปริมาณที่สูงในนมผงอาจจะเกิดจากเต้านมวัวเกิดการอักเสบ วัวเกิดภาวะเครียดสาเหตุดังกล่าวจะทำให้น้ำนมวัวมีปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น และเมื่อมีไขมันชนิดไม่อิ่มตัว และน้ำตาล อยู่ในน้ำนม ไขมันชนิดไม่อิ่มตัวจะถูกเปลี่ยนให้เป็นอัลดีไฮด์ตัวอื่นๆ และมาลอนไดอัลดีไฮด์ สามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับกรดไทโอบาร์บิทูริก ทำให้ค่าที่ตรวจวัดได้มีความถูกต้องน้อยต่อการหาปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ [5] แต่สำหรับการวิเคราะห์ในน้ำนมถั่วเหลืองจะเห็นว่าโครมาโทแกรมที่ได้ปรากฏพีคของอนุพันธ์มาลอนไดอัลดีไฮด์เท่านั้น แสดงว่าการรบกวนจากสารอื่นๆ น้อยมาก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับบัณฑิตศึกษาจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2556

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

[4] Korchazhkina, O. (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.

[5] 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.

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

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

[8] Mendes, R.; et al. (2009). Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chemistry.* 112: 1038–1045.