

การศึกษาการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์จากปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน และปฏิกิริยามเมลลาร์ดในระบบต้นแบบ

STUDY ON THE OCCURRENCE OF HYDROXYMETHYLFURFURALDEHYDE FROM CARAMELLIZATION AND MAILLARD REACTIONS IN MODEL SYSTEMS

พรพิมล ม่วงไทย* ยลรวี วิวัฒน์ชาญกิจ มะยูโซ๊ะ กุโน
Pompimol Muangthai*, Yonrawee Wiwatchankit, Mayuso Kuno

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Thailand.

*Corresponding author, E-mail: pornpi@g.swu.ac.th

บทคัดย่อ

ปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมอาหารเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้อาหารสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพด้านสี กลิ่น และรส และยังส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร ซึ่งอาจส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น สารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ เป็นสารพิษชนิดหนึ่งซึ่งสามารถเกิดได้จาก 2 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน และปฏิกิริยามเมลลาร์ด โดยในงานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์จากปฏิกิริยาทั้งสองในระบบต้นแบบ ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ในระบบต้นแบบ ได้แก่ ชนิดของน้ำตาล ชนิดของกรดอะมิโน อุณหภูมิที่ให้ความร้อน และเวลาที่ให้ความร้อน ทั้งนี้จะได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ คอลัมน์ชนิดรีเวิร์สเฟส C18 ทำการชะสารด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่คือ น้ำ:อะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 90:10 โดยปริมาตร ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วยไดโอดอาร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยจากผลการวิเคราะห์พบว่าปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันมีแนวโน้มที่จะสามารถเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ได้มากกว่าปฏิกิริยามเมลลาร์ดในทุกสถานการณ์ที่จำลองขึ้น

คำสำคัญ: ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ ปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล ปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน ปฏิกิริยามเมลลาร์ด

Abstract

The browning reaction is one of the most commonly studied reactions in food chemical industry. Effect of physical changes in food such as colors, flavours and taste decrease nutritional value which affect on consumers health. Hydroxymethylfurfural (HMF) is a common product in browning reaction and can be caused by two main forms of Caramelization and Maillard reaction. The objective of this study is to study the occurrence of hydroxymethylfurfuraldehyde from Caramelization and Maillard reactions in model systems, the influential factors on HMF in model system are sugars, types of amino acids, storage temperature and heating time. Then HMF was

determined by reversed-phase high performance liquid chromatography using a C18 column coupled with photodiode array (DAD) detector that detected at 280 nm (ABS280). The systems were eluted with the mobile phase solvent of water: acetonitrile as 90:10, v/v with controlled flow rate at 1.5 ml/min. These results indicate that the caramelization of sugars propensity to formation of 5-hydroxymethyl-furaldehyde more than Maillard reaction.

Keywords: Hydroxymethylfurfuraldehyde, Browning Reactions, Caramelization, Maillard Reaction

บทนำ

ในกระบวนการผลิตอาหารผู้ผลิตมักจะใส่ใจในสีของผลิตภัณฑ์เนื่องจากสามารถบ่งบอกถึงคุณภาพของอาหารแล้วยังมีอิทธิพลอย่างมากต่อประสาทการรับรู้ของผู้บริโภคให้รู้สึกว่าการชดสีนั้นชวนน่ารับประทาน โดยส่วนสีน้ำตาลที่พบในอาหารนั้นจะเกิดจากการที่ผู้ปรุงอาหารเจือสีเข้าไป แต่ส่วนมากสีจากอาหารมักจะเกิดขึ้นจากขั้นตอนการปรุงอาหารตามธรรมชาติมากกว่า โดยสีในอาหารที่เกิดขึ้นนั้นมักจะเป็นสีในโทนเหลืองจนถึงน้ำตาลดำ หรือที่เรียกว่าสีในกลุ่มเอิร์ทโทน เช่น สีเหลืองอ่อนของเด็กสีน้ำตาลแดงของไก่ย่าง สีน้ำตาลของคุกกี้ เป็นต้น แต่ในบางครั้งสีน้ำตาลในอาหารมนุษย์ก็ไม่ปรารถนาจะให้เกิดขึ้นนั้น โดยเฉพาะสีจากสารสีน้ำตาลที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีขององค์ประกอบต่างๆ ในอาหาร เช่น สีน้ำตาลเข้มในน้ำผึ้งที่เก็บไว้นาน สีของกล้วยที่เปลือกเปลือกแล้ว เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (Browning Reaction) สามารถแบ่งได้ 2 ระบบ คือ การเกิดสีน้ำตาลแบบมีเอนไซม์เกี่ยวข้อง (Enzymatic Browning Reaction) และการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่มีเอนไซม์ (Nonenzymatic Browning Reaction) ซึ่งสารสีน้ำตาลที่ผู้บริโภคไม่พึงประสงค์มักเกิดขึ้นจากการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่มีเอนไซม์เป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะการเกิดสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของฟูแรน (Furan) ของน้ำตาลเฮกโซสจะได้ อนุพันธ์ของฟูแรน ที่เรียกว่า สารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลดีไฮด์

(hydroxymethylfurfuraldehyde ; HMF) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง [1] สารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลดีไฮด์นี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบไม่มีเอนไซม์ โดยสามารถเกิดได้จาก 2 กลไก คือ เกิดผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard Reaction) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกับกรดอะมิโนของโปรตีน แล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของสารประกอบกลูโคส-เอมีนที่มีสีน้ำตาล [2] และเกิดผ่านปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน (Caramelization) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาของน้ำตาลได้รับความร้อนสูงเกินจุดหลอมเหลว ทำให้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเปลี่ยนรูปไปเป็นพอลิเมอร์ของสารประกอบคาร์บอนได้เป็นสารสีน้ำตาลที่มีกลิ่นและรสเฉพาะตัวเรียกว่าคาราเมล (Caramel) [3] โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการเกิดคาราเมล ถูกนำมาใช้เพื่อแต่งสีและกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารจำพวกลูกกวาดและเครื่องดื่ม เป็นต้น

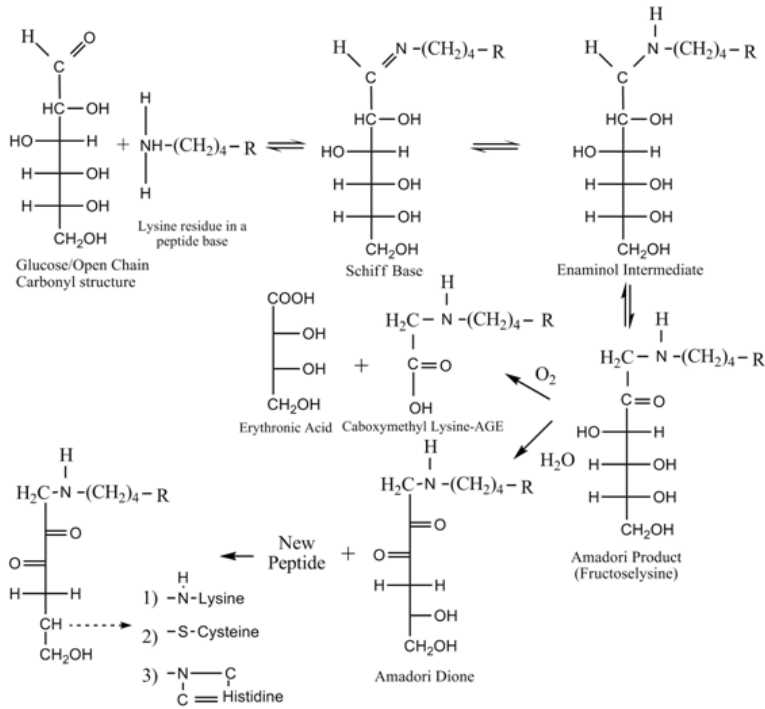
น้ำตาลเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุดของคาร์โบไฮเดรต ที่ให้พลังงานที่สำคัญที่สุดสำหรับร่างกาย น้ำตาลสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เป็นน้ำตาลที่ประกอบด้วยคาร์บอน 3-8 อะตอมสามารถละลายน้ำได้ มีรสหวาน นิยมใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องดื่ม เพื่อเพิ่มพลังงานให้แก่ร่างกาย เนื่องจากร่างกายสามารถดูดซึมน้ำตาลชนิดนี้ไปใช้ได้ทันที เช่น น้ำตาลกลูโคส แมนโนส ฟรักโทส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เป็นน้ำตาล

โมเลกุลเดี่ยว 2 โมเลกุลมารวมกัน เช่น น้ำตาลซูโครส เป็นน้ำตาลที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ซึ่งน้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลทรายนี้นิยมนำไปทำเป็นน้ำเชื่อม ลูกอม และขนมหวาน และน้ำตาลชนิดสุดท้ายคือ น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายๆ โมเลกุลมารวมกัน ไม่ละลายน้ำ และไม่มีรสหวาน เช่น แป้ง ไกลโคเจน และเซลลูโลส อย่างไรก็ตามน้ำตาลก็มีทั้งประโยชน์และโทษต่อผู้บริโภค จึงต้องบริโภคให้พอเหมาะ ไม่มากเกินไป หรือน้อยเกินไป

จะเห็นได้ว่าน้ำตาลมีบทบาทสำคัญสำหรับผู้บริโภค ผู้ผลิตจึงต้องคำนึงถึงปฏิกิริยาทางเคมีของน้ำตาลเนื่องจากน้ำตาลสามารถเป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลดีไฮด์ ในปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันและปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้

การเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลดีไฮด์ในน้ำตาลนั้น เป็นผลมาจากการเกิดสารสีน้ำตาลแบบไมไซเอนไซม์ โดยมีปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาเมลลาร์ด และปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน โดยปฏิกิริยาแรกที่ทำให้เกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัล คือ ปฏิกิริยาเมลลาร์ด เป็นปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนกับหมู่คาร์บอนิลในน้ำตาล ค้นพบขึ้นครั้งแรกโดย Louis Camille Maillard ในปี ค.ศ. 1912 ซึ่งผลิตผลจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดถ้าใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลกลูโคสมาทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนไกลซีน อาจได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมากกว่า 24 ชนิด [4] โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้จะสร้างความเสียหายต่อคุณภาพของอาหารอย่างมาก โดยเฉพาะสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลที่นอกจากจะมีสีน้ำตาลแล้วยังเป็นสารก่อมะเร็งที่อันตราย ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัล ซึ่งสามารถใช้ในการชี้วัดการเกิดสารสีน้ำตาลโดยปฏิกิริยาเมลลาร์ด เนื่องจากเป็นสารมัธยันต์ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนหนึ่งของปฏิกิริยาเมลลาร์ด

การเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลในน้ำตาลของปฏิกิริยาเมลลาร์ดนั้น จะเกิดขึ้น 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 จะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวหรือควบแน่นระหว่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวยกตัวอย่างเช่นน้ำตาลกลูโคสกับกรดอะมิโนไลซีนที่เรียกว่า Sugar Amine Condensation โดยผลที่ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า N-substituted glycosylamine [5] จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 โดยสาร N-substituted glycosylamine จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบอะมาโดริ (Amadori Compound) [6] ดังภาพที่ 1

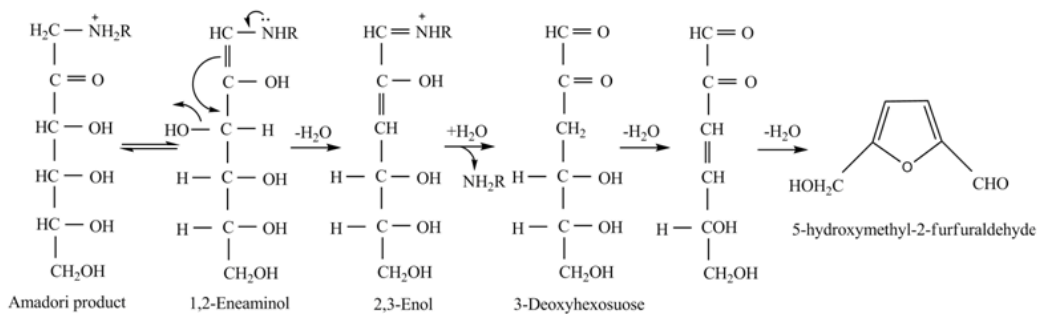


ภาพที่ 1 แผนภาพการเกิด Amadori Compound

ที่มา: H. Nursten (2005).

ขั้นตอนที่ 3 สารประกอบอะมาโดริเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้อย่างต่อเนื่องจึงสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้อีกซึ่งมีการเกิดปฏิกิริยาได้ 4 แบบ ได้แก่ การสูญเสียน้ำจากน้ำตาล (Sugar Dehydration) น้ำตาลเกิดการแตกเป็นส่วนๆ (Sugar Fragmentation) การเสียสภาพของกรดอะมิโน (Amino Acid

Degradation) และการเกิด Strecker Degradation โดยผ่านกลไก 1, 2-enolization หรือการเปลี่ยนแปลงผ่านกลไก 2, 3-enolization โดยการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเมลลาร์ดในขั้นตอนสุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์จำพวกสารเมลานอยด์ดินซึ่งให้น้ำตาลเข้มหนึ่งในนั้นคือ สารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลดีไฮด์ ดังแสดงในภาพที่ 2 [7]

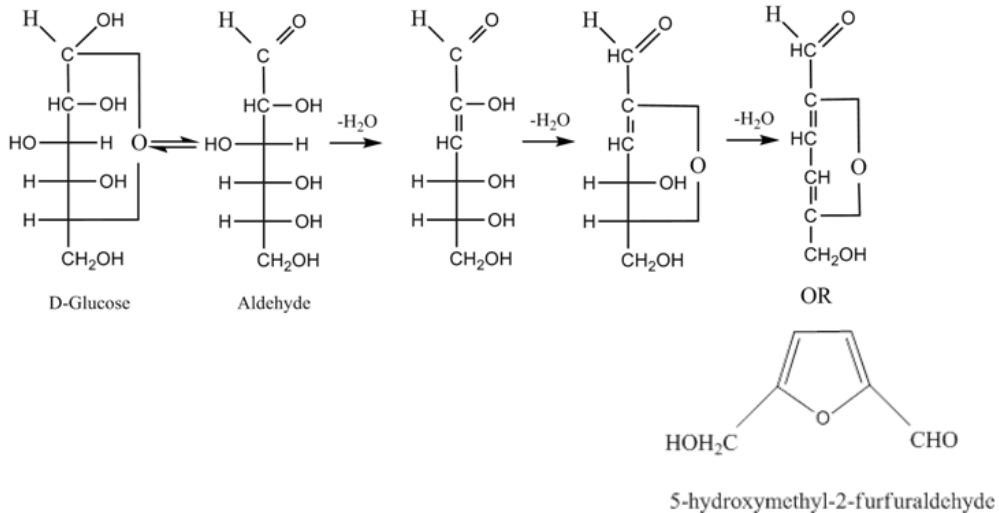


ภาพที่ 2 แผนภาพการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลดีไฮด์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด

ที่มา: S. E. Fayle and J. A. Gerrard (2002).

สำหรับการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัล ในน้ำตาลของปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน (Caramelization Reaction) จะแตกต่างจากปฏิกิริยามอลาร์ด โดยการเกิดสารสีน้ำตาลที่เกิดจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ยกตัวอย่างเช่น น้ำตาลกลูโคส เมื่อน้ำตาลกลูโคสได้รับความร้อนสูงเกินจุดหลอมเหลวจะเกิดการเกิดการสูญเสียน้ำ โดยไม่มีสารประกอบพวกโปรตีนและอะมิโน

ซึ่งน้ำตาลที่บริสุทธิ์จะเกิดปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันได้รวดเร็วที่อุณหภูมิสูง ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยานั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และเวลา โดยปฏิกิริยาขั้นแรกจะเกิด Enolization Dehydration และมีการสูญเสียน้ำอย่างต่อเนื่อง และเกิดแตกตัวเป็นไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ (HMF) [8] ดังแสดงตามภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การเกิดสารสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน
ที่มา: Braverman (1963 : 336)

ซึ่งการศึกษาการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์จากปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันและปฏิกิริยามอลาร์ดในระบบต้นแบบนี้ ยังไม่มีผู้ใดศึกษา มาก่อนมีเพียง Laroque D. และคณะ ในปี ค.ศ. 2008 ได้ทำการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยามอลาร์ดของน้ำตาลโดยใช้น้ำตาลเป็นปัจจัยแปรผัน [9] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่เปรียบเทียบการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ในปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันและปฏิกิริยามอลาร์ดด้วยเทคนิคของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) เพื่อข้อมูลที่นำไปใช้ในการควบคุมและป้องกันการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. เพื่อศึกษาการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์จากปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันและปฏิกิริยามอลาร์ดในระบบต้นแบบ

อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100 โดยใช้คอลัมน์ C18 (Vertisep pHendure 5µm ขนาด 4.6 x 250 mm และใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์

- กระดาษกรอง Whatman No.4
- เยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตต ขนาด 0.45 ไมครอน
- สารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ (จากบริษัท Fuka)
- โปแทสเซียมเฟอรัโรเซยาไนต์ (Carrez I)
- ซิงค์อะซิเตต (Carrez II)
- อะซิโตนไทรล์ (HPLC grade)
- น้ำตาลซูโครส
- น้ำตาลกลูโคส
- น้ำตาลฟรักโทส

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (ดัดแปลงจาก [10-12])

การเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ (HMF)

ชั่งสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ 0.01 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 100 ppm นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4°C ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้น

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 และ 0.1 ppm ตามลำดับ จากนั้นนำไปกรองผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตต ขนาด 0.45 ไมครอน

2. ฉีดสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างๆ ที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมีสภาวะของระบบวิกฤตเคลื่อนที่ 4 สภาวะ ดังนี้

- สภาวะที่ 1 ใช้ น้ำ : อะซิโตนไทรล์ ในอัตราส่วนร้อยละ 97 : 3
- สภาวะที่ 2 ใช้ น้ำ : อะซิโตนไทรล์ ในอัตราส่วนร้อยละ 95 : 5
- สภาวะที่ 3 ใช้ น้ำ : อะซิโตนไทรล์ ในอัตราส่วนร้อยละ 90 : 10
- สภาวะที่ 4 ใช้ น้ำ : อะซิโตนไทรล์ ในอัตราส่วนร้อยละ 80 : 20

ใช้อัตราการไหลของวิกฤตเคลื่อนที่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณด้วย ตัวตรวจจับแบบยูวีวิสิเบิล ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร บันทึกโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและทำการสร้างกราฟมาตรฐาน

ตอนที่ 2 ศึกษาการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาการเมลเลชัน

2.1 การศึกษาผลของชนิดน้ำตาลในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาการเมลเลชัน

2.1.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิด โดยหลอดที่ 1-5 เป็นน้ำตาลซูโครส หลอดที่ 6-10 เป็นน้ำตาลกลูโคส และหลอดที่ 11-15 เป็นน้ำตาลฟรักโทส

2.1.2 นำไปอุ่นด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที

2.1.3 นำหลอดทดลองขึ้นจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นำมาแช่อ่างน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อหยุดปฏิกิริยา

2.1.4 นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านไซรินจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนของเซลลูโลสอะซิเตต ขนาด 0.45 ไมครอน

2.1.5 จากนั้นฉีดสารละลายที่ได้สู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตามสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ ทำการบันทึกโครมาโทแกรม แล้วนำค่าพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณความเข้มข้นของปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อน

2.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1% ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิด โดยหลอดที่ 1-5 เป็นน้ำตาลซูโครส หลอดที่ 6-10 เป็นน้ำตาลกลูโคส และหลอดที่ 11-15 เป็นน้ำตาลฟรักโทส

2.2.2 ทำการควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง 50, 60, 80 และ 100°C ตามลำดับ เป็นเวลา 30 นาที

2.2.3 จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.3-2.1.5

2.3 การศึกษาผลของเวลาในระบบต้นแบบ

2.3.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1% ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิด โดยหลอดที่ 1-5 เป็นน้ำตาลซูโครส หลอดที่ 6-10 เป็นน้ำตาลกลูโคส และหลอดที่ 11-15 เป็นน้ำตาลฟรักโทส

2.3.2 นำไปอุ่นด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 5, 10, 30, 60 และ 80 นาที ตามลำดับ

2.3.3 จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.3-2.1.5

ตอนที่ 3 ศึกษาการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟออร์ฟิวรัลดีไฮด์ในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาเมลลาร์ด

3.1 การศึกษาผลของชนิดของกรดอะมิโนในระบบต้นแบบ

3.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ ไลซีน (Lysine), ทริปโทเฟน (Tryptophan) และโพรลีน (Proline) ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm

3.1.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนแต่ละชนิดมา 1.00 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 1% (W/V) ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร

3.1.3 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที

3.1.4 แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการนำมาแช่อ่างน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4°C

3.1.5 นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านไซริงจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนของเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน

3.1.6 จากนั้นฉีดสารละลายที่ได้สู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตามสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟออร์ฟิวรัลดีไฮด์ทำการบันทึกโครมาโทแกรม แล้วนำค่าพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณความเข้มข้นของปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟออร์ฟิวรัลดีไฮด์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.2 การศึกษาผลของชนิดน้ำตาลในระบบต้นแบบ

3.2.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรักโทสที่ความเข้มข้น 1% (W/V)

3.2.2 ปิเปตสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิดมา 1.00 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายของกรดอะมิโนไลซีนความเข้มข้น 1000 ppm ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร

3.2.3 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที

3.2.4 จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4-3.1.6

3.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิในระบบต้นแบบ

3.3.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรักโทสที่ความเข้มข้น 1%

3.3.2 ปิเปตสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิดมา 1.00 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายของกรดอะมิโนไลซีนความเข้มข้น 1000 ppm ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร

3.3.3 ทำ 5 ชุดการทดลองโดยควบคุมที่อุณหภูมิ 30, 50, 60, 80 และ 100°C ตามลำดับ เป็นเวลา 30 นาที

3.3.4 จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 – 3.1.6

3.3.6 ทำการทดลองตามวิธีข้างต้นแต่เปลี่ยนสารละลายกรดอะมิโนเป็นกรดอะมิโนทริปโทเฟน และกรดอะมิโนโพรลีน

3.4 การศึกษาผลของเวลาในระบบต้นแบบ

3.4.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรักโทสที่ความเข้มข้น 1%

3.4.2 เปิดสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิดมา 1.00 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายของกรดอะมิโนไลซีน ความเข้มข้น 1000 ppm ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร

3.4.3 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลาในช่วง 5 นาทีจนถึง 60 นาที

3.4.4 จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4-3.1.6

3.4.5 ทำการทดลองตามวิธีข้างต้น แต่เปลี่ยนสารละลายกรดอะมิโนเป็นกรดอะมิโนทริปโทเฟน และกรดอะมิโนโพรลีน

ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์หาสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลดีไฮด์

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง มีอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณด้วยตัวตรวจจับแบบอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทำการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคเคลื่อนที่ 4 สภาวะ

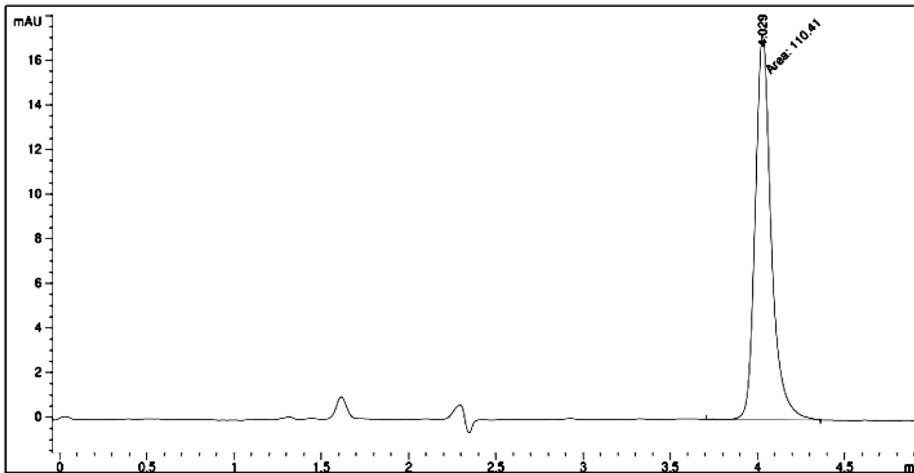
ผลการทดลองแสดงเวลาในการคงอยู่ในคอลัมน์ (Retention Time) ของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลดีไฮด์ในสภาวะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงระยะเวลาการคงอยู่ในคอลัมน์ของสารละลายไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลดีไฮด์มาตรฐาน ณ สภาวะต่างๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่

สภาวะ	เวลาในการคงอยู่ในคอลัมน์ (นาที)
สภาวะที่ 1 (น้ำ : อะซิโตนไไตรล์ ในอัตราส่วน 97 : 3)	9.3 ± 0.01
สภาวะที่ 2 (น้ำ : อะซิโตนไไตรล์ ในอัตราส่วน 95 : 5)	6.6 ± 0.1
สภาวะที่ 3 (น้ำ : อะซิโตนไไตรล์ ในอัตราส่วน 90 : 10)	4.0 ± 0.006
สภาวะที่ 4 (น้ำ : อะซิโตนไไตรล์ ในอัตราส่วน 80 : 20)	2.6 ± 0.002

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่าระยะเวลาในการคงอยู่ในคอลัมน์ของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลดีไฮด์ แตกต่างกัน สภาวะที่ 4 พบพีคของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลดีไฮด์ ให้เวลาในการคงอยู่บนคอลัมน์น้อย แต่พีคของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลดีไฮด์ เกิดการซ้อนทับกับพีคอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกที่สภาวะ

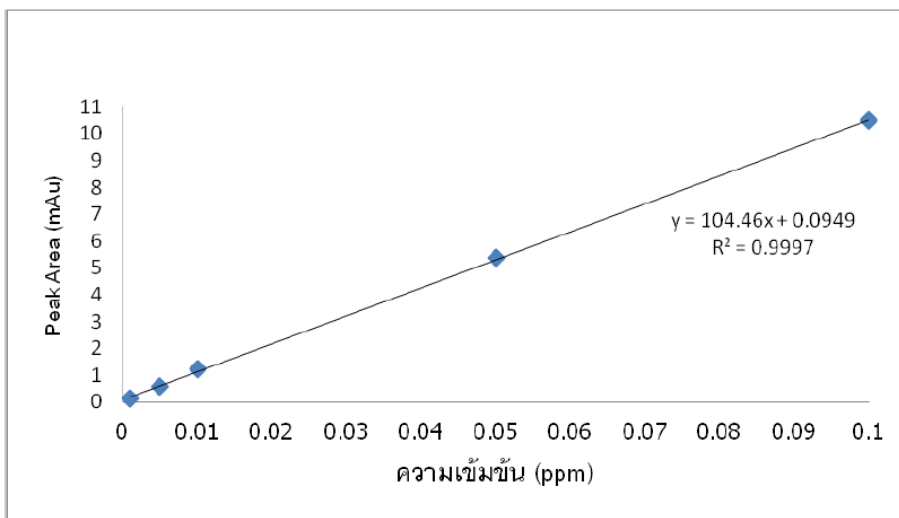
ที่ 3 เป็นสภาวะที่เหมาะสม จะพบพีคของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอริฟิวรัลดีไฮด์ที่เวลาประมาณ 4 นาที โดยโครมาโทแกรมที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจะแสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์

เมื่อนำสภาวะดังกล่าวมาใช้ในการวัดปริมาณสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.001 ppm จนถึง 0.1 ppm แล้วนำข้อมูลของพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรมมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นในรูปแบบของสมการเส้นตรง พบว่าสมการเส้นตรงที่ได้มีค่าเท่ากับ $y = 104.46x + 0.0949$

โดยมีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.9997 ดังแสดงในภาพที่ 5 และเมื่อคำนวณหาค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) และค่าขีดความสามารถต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOQ) ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์ พบว่าได้ค่า LOD เท่ากับ 0.00089 ppm และค่า LOQ เท่ากับ 0.0029 ppm ตามลำดับ



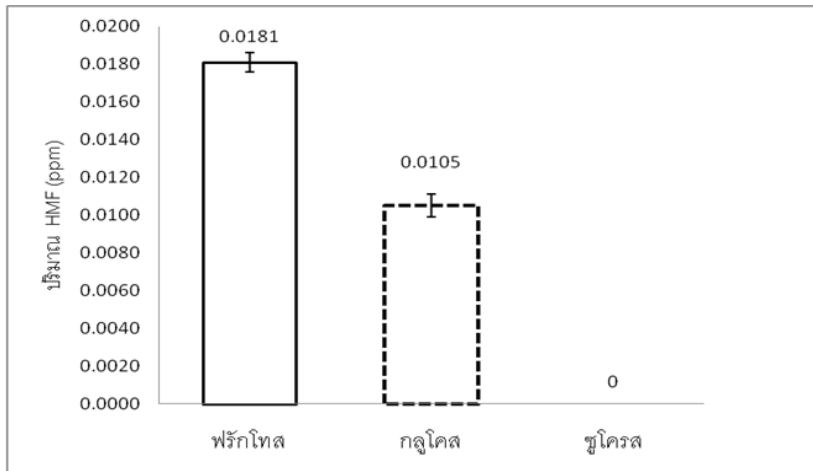
ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์

ตอนที่ 2 ศึกษาการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน

2.1 ผลของชนิดน้ำตาลในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน

ได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมข้างต้นในตอนต้นที่ 1 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

ของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการทดลองกับน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรักโทส โดยมีการให้ความร้อนแก่น้ำตาลที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบการเกิดสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ของน้ำตาล 3 ชนิด ในปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน

จากการศึกษาพบว่า ปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์ที่เกิดจากน้ำตาลฟรักโทสมากกว่าน้ำตาลกลูโคส และไม่สามารถตรวจหาสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในระบบของน้ำตาลซูโครส เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันนี้จึงมีผลทำให้น้ำตาลฟรักโทสที่เป็นน้ำตาลคีโตสเกิดปฏิกิริยาการสูญเสียน้ำได้เร็วกว่าจึงมีผลทำให้น้ำตาลฟรักโทสสามารถเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์ได้มากกว่าน้ำตาลกลูโคสที่เป็นน้ำตาลอัลโดส ส่วนของน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกับน้ำตาลฟรักโทสด้วยพันธะ $\alpha(1-2)$ เป็นน้ำตาลนอนรีดิซเพียงชนิดเดียว และไม่สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ เนื่องจากไม่มีกลุ่มอัลดีไฮด์และกลุ่มคีโตนที่เป็นอิสระ และไม่เกิดมิวตาโรเตชัน (Mutarotation) เมื่ออยู่ในสารละลาย [13] จึงทำให้น้ำตาลซูโครสไม่สามารถเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์ได้

2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนในระบบต้นแบบ

จากข้อมูลของสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ในตอนต้นที่ 1 จึงได้นำสภาวะดังกล่าวมาใช้ในการวัดปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ในน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครสในปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน โดยมีการให้ความร้อนแก่น้ำตาลที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที พบว่าปริมาณการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์มากขึ้นเมื่อมีการให้ความร้อนสูงขึ้น เนื่องจากน้ำตาลเกิดปฏิกิริยาการสูญเสียน้ำออกจากโมเลกุลที่เรียกว่า Enolization Dehydration และเกิดการแตกตัวเป็นไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัลดีไฮด์ ดังแสดงในตารางที่ 2

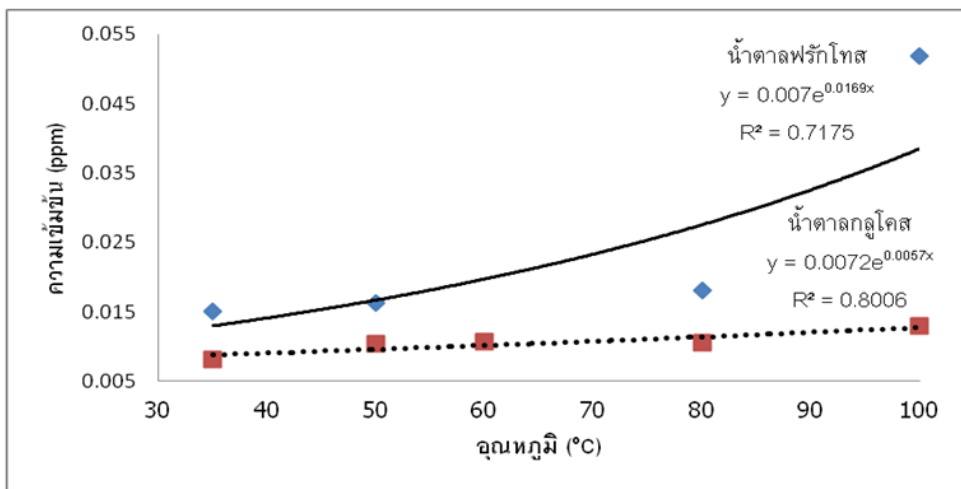
ตารางที่ 2 ผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำตาลของปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรูฟิวรัลดีไฮด์ (ppm)		
	ฟรักโทส	กลูโคส	ซูโครส
35	0.0151 ± 0.0002	0.0082 ± 0.0006	N.D.
50	0.0162 ± 0.0009	0.0104 ± 0.0011	N.D.
60	0.0183 ± 0.0007	0.0106 ± 0.0003	N.D.
80	0.0181 ± 0.0005	0.0105 ± 0.0006	N.D.
100	0.0518 ± 0.0019	0.0129 ± 0.0005	N.D.

หมายเหตุ N.D. หมายถึง มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการที่นำเสนอในงานวิจัยนี้

เมื่อนำค่าความเข้มข้นของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรูฟิวรัลดีไฮด์มาพลอตกราฟ พบว่ามีแนวโน้มการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรูฟิวรัลดีไฮด์ในรูปของสมการเอ็กโพเนนเชียลซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรูฟิวรัลดีไฮด์

มีอัตราการเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ คือที่อุณหภูมิต่ำการเกิดของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรูฟิวรัลดีไฮด์จะเกิดอย่างช้าๆ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพบว่า การเกิดของสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอรูฟิวรัลดีไฮด์เพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรูฟิวรัลดีไฮด์ในน้ำตาล 2 ชนิด ที่อุณหภูมิต่างๆ ในปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน

2.3 การศึกษาผลของเวลาในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน

การเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรูฟิวรัลดีไฮด์ในปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและเวลา ดังนั้นในการทดลองนี้จึงนำน้ำตาลมาให้ความร้อนที่ 80°C เป็นเวลา 5, 10, 30, 60

และ 80 นาที พบว่าปริมาณการของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรูฟิวรัลดีไฮด์ มากขึ้นเมื่อมีการให้ความร้อนที่นานขึ้น เนื่องจากน้ำตาลเกิดการสูญเสียน้ำออกจากโมเลกุลอย่างต่อเนื่องจึงเกิดเป็นสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรูฟิวรัลดีไฮด์มากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3

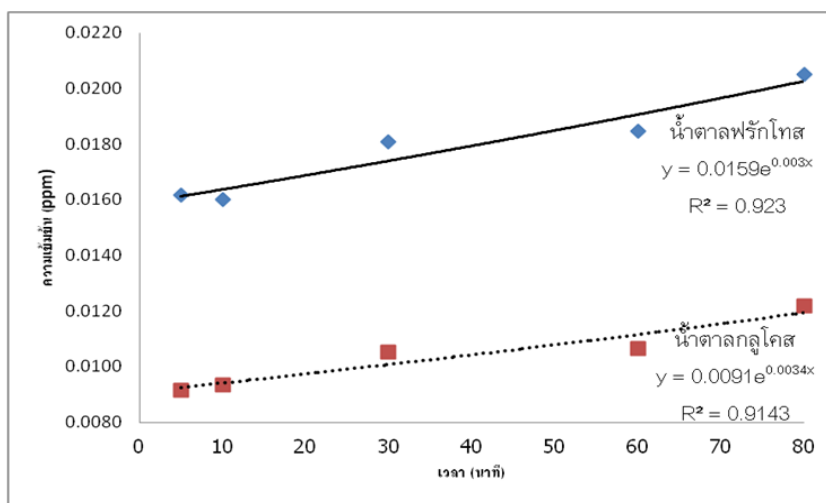
ตารางที่ 3 ผลของเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำตาลของปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน

เวลา (นาที)	ปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลดีไฮด์ (ppm)		
	ฟรักโทส	กลูโคส	ซูโครส
5	0.0162 ± 0.0005	0.0092 ± 0.0002	N.D.
10	0.0160 ± 0.0009	0.0093 ± 0.0003	N.D.
30	0.0181 ± 0.0005	0.0105 ± 0.0006	N.D.
60	0.0184 ± 0.0013	0.0107 ± 0.0007	N.D.
80	0.0205 ± 0.0007	0.0122 ± 0.0018	N.D.

หมายเหตุ N.D. หมายถึง มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการที่นำเสนอในงานวิจัยนี้

เมื่อนำค่าความเข้มข้นของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลดีไฮด์มาพลอตกราฟ พบว่ามีแนวโน้มการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลดีไฮด์ในรูปของสมการเอ็กโพเนนเชียล

ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลดีไฮด์มีอัตราการเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานาน ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลดีไฮด์ในน้ำตาล 2 ชนิดที่เวลาต่างๆ ในปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน

ตอนที่ 3 ศึกษาการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลดีไฮด์ในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาคาราเมลลาร์ด

3.1 การศึกษาผลของชนิดของกรดอะมิโนในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาคาราเมลลาร์ดต่อการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลดีไฮด์

การเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัลดีไฮด์ในปฏิกิริยาคาราเมลลาร์ดเป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนกับหมู่คาร์บอนิลในน้ำตาล ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกใช้กรดอะมิโน 3 ชนิด คือ ไลซีน โพรลีน และทริปโทเฟน มาทำปฏิกิริยากับน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา

30 นาที พบว่าปริมาณของสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนไลซีนกับน้ำตาลฟรักโทส และกลูโคส มีค่ามากกว่า

กรดอะมิโน โพรลีน และทริปโทเฟน เนื่องจากกรดอะมิโนไลซีนมีความไวในการทำปฏิกิริยามากกว่ากรดอะมิโนตัวอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของชนิดของกรดอะมิโนในปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลดีไฮด์

กรดอะมิโน	ปริมาณของสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลดีไฮด์ (ppm)		
	ฟรักโทส	กลูโคส	ซูโครส
ไลซีน	0.0117 ± 0.0008	0.0109 ± 0.0005	N.D.
โพรลีน	0.0107 ± 0.0006	0.0103 ± 0.0005	N.D.
ทริปโทเฟน	0.0080 ± 0.0006	0.0025 ± 0.0006	N.D.

หมายเหตุ N.D. หมายถึง มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการที่นำเสนอในงานวิจัยนี้

จากผลการทดลองตามตารางที่ 4 พบว่ากรดอะมิโนไลซีน สามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลฟรักโทสและกลูโคส ได้ดีกว่ากรดอะมิโนโพรลีน และทริปโทเฟน

3.2 การศึกษาผลของชนิดน้ำตาลในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาเมลลาร์ด

ผลการศึกษาชนิดของน้ำตาล 3 ชนิด คือ น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส กับกรด อะมิโนไลซีน ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าน้ำตาลฟรักโทสและน้ำตาลกลูโคส สามารถรวมตัวกับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนไลซีน เกิดเป็นไกลโคซิลเอมีนซึ่งสามารถเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลดีไฮด์ได้ในปฏิกิริยาเมลลาร์ด ส่วนน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ไม่มีหมู่อัลดีไฮด์ และคีโตนอิสระ ทำให้น้ำตาลซูโครสเป็น Non-Reducing Sugar เพียงชนิดเดียวและไม่เกิดมิวตาโรเตชัน (Mutarotation) เมื่ออยู่ในสารละลาย [13] จึงทำให้น้ำตาลซูโครสไม่สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนในปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้ ดังนั้นน้ำตาลซูโครสไม่สามารถเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลดีไฮด์ได้ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4

3.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลดีไฮด์

จากการทดลองหาปริมาณการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลดีไฮด์ในน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส กับกรดอะมิโนไลซีนในปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยมีการให้ความร้อนแก่น้ำตาลที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที พบว่าปริมาณการเกิดของสารไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวราลดีไฮด์มากขึ้นเมื่อมีการให้ความร้อนสูงขึ้น เช่นเดียวกับปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน ดังแสดงในตารางที่ 5

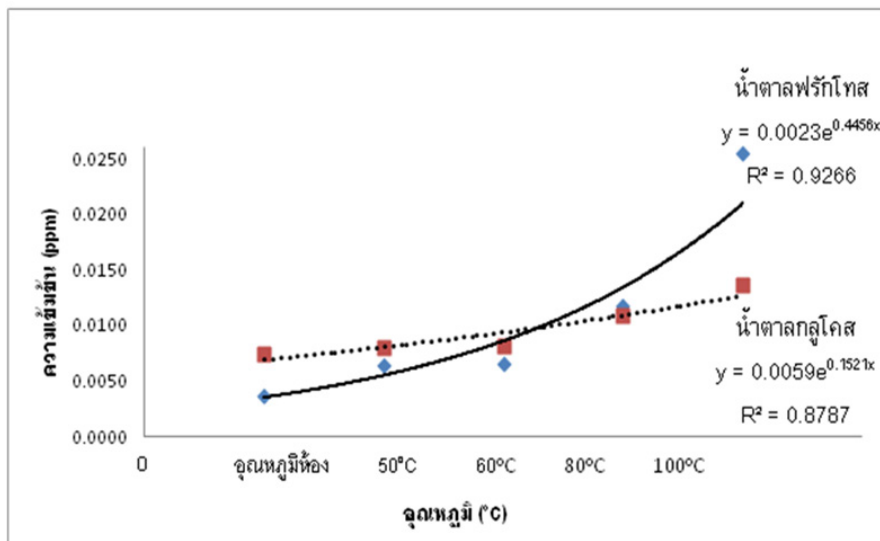
ตารางที่ 5 แสดงผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำตาลของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัวัลดีไฮด์

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัวัลดีไฮด์ (ppm)		
	ฟรักโทส	กลูโคส	ซูโครส
35	0.0037 ± 0.0003	0.0075 ± 0.0001	N.D.
50	0.0065 ± 0.0006	0.0080 ± 0.0008	N.D.
60	0.0066 ± 0.0005	0.0081 ± 0.0002	N.D.
80	0.0117 ± 0.0008	0.0109 ± 0.0005	N.D.
100	0.0255 ± 0.0000	0.0137 ± 0.0008	N.D.

หมายเหตุ N.D. หมายถึง มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการที่นำเสนอในงานวิจัยนี้

เมื่อนำค่าความเข้มข้นของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัวัลดีไฮด์มาพลอตกราฟ พบว่ามีแนวโน้มการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัวัลดีไฮด์ในรูปของสมการเอ็กโพเนนเชียล ซึ่งแสดงให้เห็นว่า

การเกิดของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัวัลดีไฮด์มีอัตราการเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณเมื่อให้ความร้อนสูงขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัวัลดีไฮด์ในน้ำตาล 2 ชนิดที่อุณหภูมิต่างๆ ในปฏิกิริยาเมลลาร์ด

3.4 การศึกษาผลของเวลาในระบบต้นแบบของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัวัลดีไฮด์

การเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัวัลดีไฮด์ในปฏิกิริยาการเมลลาร์ดเพิ่มขึ้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ

และเวลา ซึ่งในการทดลองของปฏิกิริยาเมลลาร์ดนี้จึงได้ทำให้ความร้อนแก่น้ำตาลที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 5, 10, 30, 60 และ 80 นาที พบว่าปริมาณการของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัวัลดีไฮด์มากขึ้น เมื่อมีการให้ความร้อนที่นานขึ้น

เช่นเดียวกับปฏิกิริยาการเมลไลเซชัน ดังแสดงในตารางที่ 6

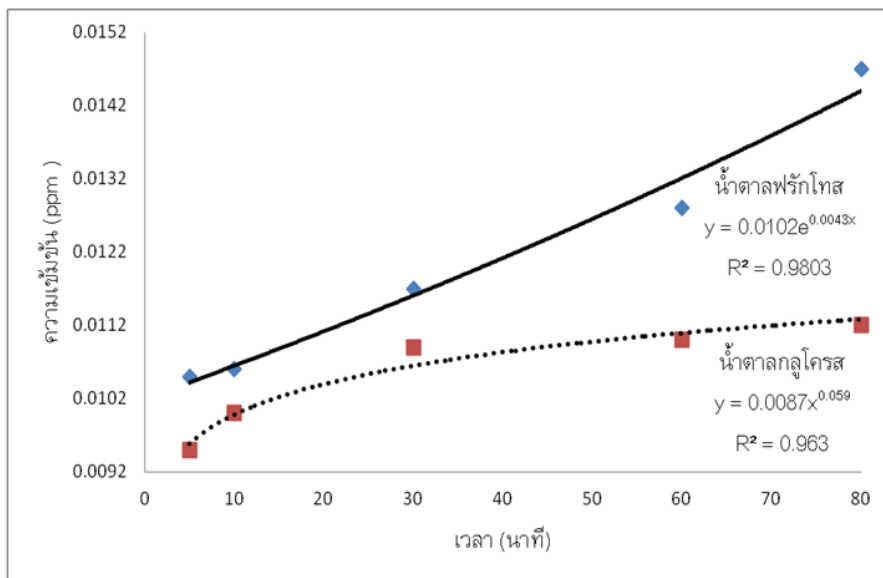
เมื่อนำค่าความเข้มข้นของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์มาพลอตกราฟ พบว่าน้ำตาลฟรักโทส มีแนวโน้มการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในรูปของสมการเอ็กโพเนนเชียล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดของสารไฮดรอกซีเมทิล

เฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์มีอัตราการเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ ส่วนน้ำตาลกลูโคสมีแนวโน้มการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในรูปแบบสมการลอการิทึม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ มีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แล้วอยู่ในระดับคงที่เมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานาน ดังแสดงในภาพที่ 10

ตารางที่ 6 ผลของเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำตาลของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต่อการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์

เวลา (นาที)	ปริมาณของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ (ppm)		
	ฟรักโทส	กลูโคส	ซูโครส
5	0.0105 ± 0.0008	0.0095 ± 0.0006	N.D.
10	0.0106 ± 0.0012	0.0100 ± 0.0008	N.D.
30	0.0117 ± 0.0008	0.0109 ± 0.0005	N.D.
60	0.0127 ± 0.0012	0.0110 ± 0.0004	N.D.
80	0.0146 ± 0.0012	0.0112 ± 0.0005	N.D.

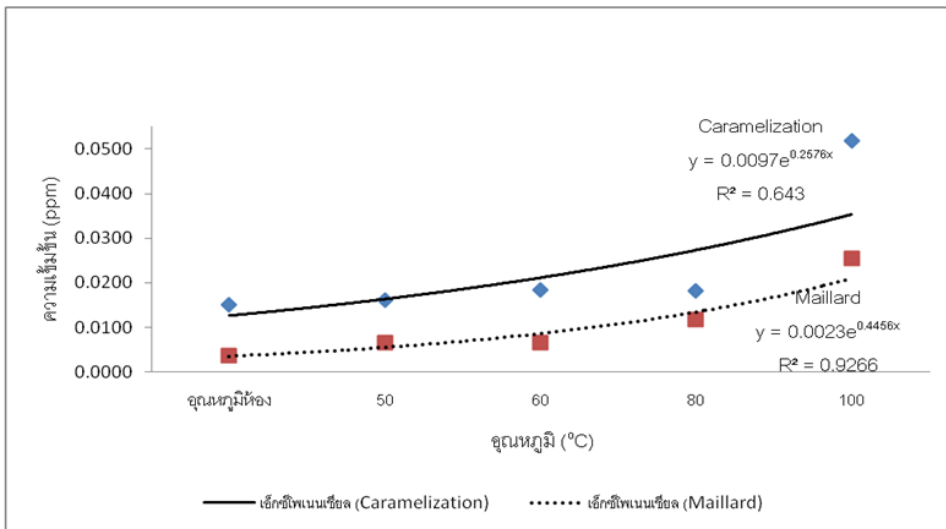
หมายเหตุ N.D. หมายถึง มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีการที่นำเสนอในงานวิจัยนี้



ภาพที่ 10 แสดงปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรัลดีไฮด์ในน้ำตาล 2 ชนิดที่เวลาต่างๆ ในปฏิกิริยาเมลลาร์ด

จากผลการทดลองทั้งหมดผู้วิจัยได้รวบรวมข้อมูลและทำการเปรียบเทียบการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟออร์ฟิวรัลดีไฮด์ในปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันและปฏิกิริยาเมลลาร์ด พบว่าปริมาณการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟออร์ฟิวรัลดีไฮด์ในน้ำตาลฟรักโทสของปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันมีมากกว่าปฏิกิริยาเมลลาร์ด ดังแสดงในภาพที่ 11 เนื่องจากปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันมีสารตั้งต้นเพียงน้ำตาล

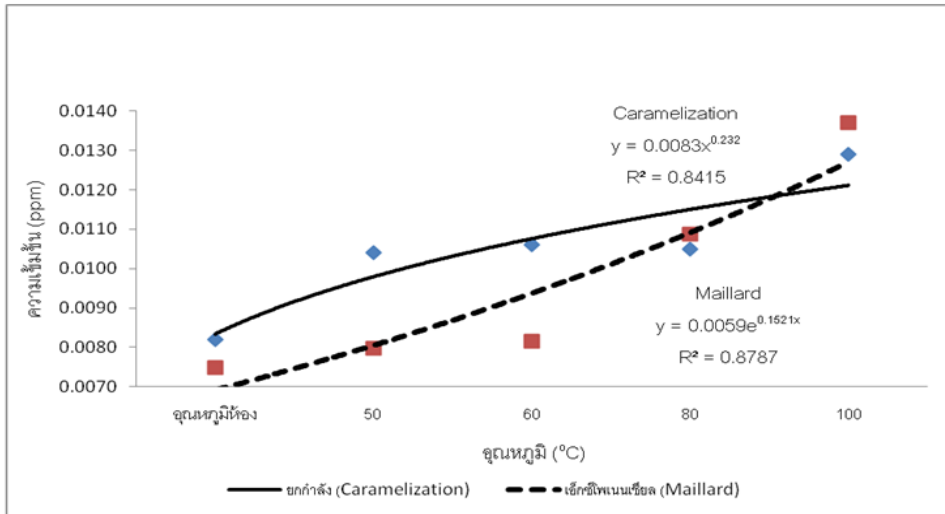
อย่างเดียว และอาศัยอุณหภูมิที่สูงทำให้เกิดสารสีน้ำตาล อย่างเช่นสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟออร์ฟิวรัลดีไฮด์ แต่ในส่วนของปฏิกิริยาเมลลาร์ดต้องประกอบด้วยสารตั้งต้น คือ น้ำตาลรีดิวซ์และกรดอะมิโน เกิดปฏิกิริยาการรวมตัวหรือควบแน่น แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนจนเกิดเป็นสารไฮดรอกซีเมทิลเฟออร์ฟิวรัลดีไฮด์



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟออร์ฟิวรัลดีไฮด์ในน้ำตาลฟรักโทสระหว่างปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันกับปฏิกิริยาเมลลาร์ด

ในส่วนของน้ำตาลกลูโคส พบว่าในช่วงของอุณหภูมิ 35-60°C ปริมาณการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟออร์ฟิวรัลดีไฮด์ของปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันเกิดได้มากกว่าปฏิกิริยาเมลลาร์ด

แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นในช่วงประมาณ 80-100°C ปริมาณการเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟออร์ฟิวรัลดีไฮด์ของปฏิกิริยาเมลลาร์ด สามารถเกิดได้มากกว่าปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 เปรียบเทียบปริมาณสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ในน้ำตาลกลูโคสระหว่างปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันกับปฏิกิริยามิลลาร์ด

สรุปและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแนวโน้มการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาลโดยผ่านกลไก 2 ชนิด คือ ปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันและปฏิกิริยามิลลาร์ด ซึ่งจะทำให้การตรวจวัดปริมาณสารเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกลไกทั้งสองในสภาวะที่จำลองขึ้น โดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมาใช้ในการวิเคราะห์จากผลการวิจัยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารเกิดไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัล ดีไฮด์ในงานวิจัยนี้คือการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ เป็น น้ำ: อะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 90:10 โดยปริมาตร เนื่องจากเป็นสภาวะที่เกิดการแยกของสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ออกจากพีคอื่นๆ ได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับในการเปรียบเทียบแนวโน้มการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันพบว่า น้ำตาลฟรักโทสมิแนวโน้มที่จะเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส และกรณีของปฏิกิริยามิลลาร์ดพบว่า กรดอะมิโนไลซีนและน้ำตาล

ฟรักโทสมิแนวโน้มที่จะเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าสารตั้งต้นชนิดอื่นๆ และนอกจากนี้ความร้อนและระยะเวลาส่งผลต่อ การเกิดปฏิกิริยาที่มากขึ้นทั้งปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันและปฏิกิริยามิลลาร์ด และเมื่อเปรียบเทียบการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ในปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันและปฏิกิริยามิลลาร์ดพบว่าปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันมีแนวโน้มในการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ได้ดีกว่าปฏิกิริยามิลลาร์ด เนื่องจากปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชันมีสารตั้งต้นเพียงน้ำตาลอย่างเดียวและอาศัยอุณหภูมิที่สูงทำให้เกิดสารสีน้ำตาลอย่างเช่นสารประกอบไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ แต่ในส่วนของปฏิกิริยามิลลาร์ด ต้องประกอบด้วยสารตั้งต้น คือ น้ำตาลรีดิวซ์ และกรดอะมิโนเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวหรือควบแน่น แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน จนเกิดเป็นสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ ดังนั้นผู้ผลิตอาหารจึงต้องคำนึงถึงขั้นตอนการผลิตและการเก็บรักษาอาหารเพื่อป้องกันและหลีกเลี่ยงการเกิดสารไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ฝ่ายวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2556

เอกสารอ้างอิง

- [1] Hodge, J. E. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 1: 928-943.
- [2] Fyale, S. E. and Gerrard, J. A. (2002). *The Maillard Reaction*. Royal society of Chemistry, Cambridge.
- [3] Villamiel, M.; Del Castillo, M.D.; Corzo, N. (2006). Browning Reactions. In *Food biochemistry and food processing*. Wiley-Blackwell. pp. 83-85. USA : Ames, Iowa.
- [4] Reilly, R. O. (1982). *The nature of the chemical grouping responsible for the colour of products of the Maillard reaction*. The University of Reading.
- [5] Hodge, J. E. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 1: 928-943.
- [6] Nursten, H. (2005). *The Maillard Reaction*. Chemistry, Biochemistry and Implication. The Royal society of Chemistry. Cambridge. pp. 2-4.
- [7] Fyale, E. and Gerrard, J. A. (2002). *The Maillard Reaction*. Royal society of Chemistry, Cambridge.
- [8] Braverman, J.B.S. (1963). *Introduction to the biochemistry of food*. Elsevier Publishing Company. New York. p. 336.
- [9] Laroque, D.; et al. (2008). Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Journal of Food Chemistry*. 111: 1032-1042.
- [10] Ferrer, E.; et al. (2002). High-performance Liquid Chromatographic Determination of Furfural Compounds in Infant Formulas Changes During Heat Treatment and Storage. *Journal of Chromatography. A.* (947): 85-95.
- [11] Gokmen Vural.; & Acar Jale. (1999). Simultaneous Determination of 5-hydroxymethylfurfural and Patulin in Apple Juice by Reversed-phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography. A.* (847): 69-74.
- [12] Nozal, M. J.; et al. (2001). High-performance Liquid Chromatographic Determination of Methyl Anthranilate, Hydroxymethylfurfural and Related Compounds in Honey. *Journal of Chromatography. A.* (917): 95-103.
- [13] นธิยา รัตนานนท์. (2539). *คาร์โบไฮเดรตในเคมีอาหาร*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การอาหารคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.