วารสารวิจัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีที่ 13 ฉบับที่ 3 (พฤษภาคม - สิงหาคม 2553) ISSN 1686-8420

สารบัญ

หน้า

★ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไวน์ไทย 1
นิทรา เนืองจำนงค์ นงคราญ เรืองประพันธ์ สุภาภรณ์ คณิตวิทยา สุดชฎา ศรประสิทธิ์
ประภาพรรณ พรหมหิรัญกุล ภาวดี น้อยอาษา บุษบง สุจเร

★ การวิเคราะห์หาสารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ในอาหารทอดโดยวิธี HPLC 10
วาสิย ทองทา นิทรา เนืองจำนงค์

★ จลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์และเคลเลอร์ ด้วยวิธีการหมักแบบกะ 19
ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ กนกทิพย์ เลิศประเสริฐรัตน์

★ การเปรียบเทียบวิธีประมาณค่าพารามิเตอร์ของตัวแบบอัตตสหสัมพันธ์อันดับที่หนึ่ง เมื่อข้อมูลมีค่าผิดปกติและค่าสูญหาย 33
วราฤทธิ์ พานิชกิจโกศลกุล

★ การเปรียบเทียบพฤติกรรมการสึกหรอของแม่พิมพ์ตัดที่ได้จากกรรมวิธีการอบชุบ 42
มาโนช ริทินโย

★ การเจริญเติบโต การงอกและปริมาณน้ำมันของเมล็ดสบู่ดำในระยะพัฒนาของผล 57
อุดมลักษณ์ มัจฉาชีพ สุรชัย มัจฉาชีพ

★ การผลิตสบู่ดำในสภาพดินเหนียวจังหวัดพระนครศรีอยุธยา 65
สุรชัย มัจฉาชีพ อุดมลักษณ์ มัจฉาชีพ

★ การศึกษาความสามารถในการอ่านภาษาอังกฤษและอัตลักษณ์ของนักศึกษา ระดับปริญญาตรีผ่านกระบวนการแก้ปัญหาในไฮไฟว์ 73
กิจจาณัฏฐ์ ตั้งจิตนุสรณ์ จารุณี มณีกุล

★ การประเมินผลการดำเนินงานกองทุนหมู่บ้านและชุมชนเมือง จังหวัดปทุมธานี 85
สัญจิดา อรชุนเลิศไมตรี รุทาทิพย์ สองเมือง สันติ เกษมวัฒนปัญญา

★ ผลกระทบของการขยายตัวร้านค้าปลีกสมัยใหม่ที่มีต่อการดำเนินงานของร้านค้าปลีกแบบดั้งเดิม (โชว์ห่วย) ความคิดเห็นของผู้ประกอบการร้านค้าปลีกแบบดั้งเดิม 101
เกยูร ไขบัวกลิ่น

★ ผลกระทบของการขยายตัวร้านค้าปลีกสมัยใหม่ที่มีต่อการดำเนินงานของร้านค้าปลีกแบบดั้งเดิม (ร้านโชว์ห่วย) : ความคิดเห็นของผู้บริโภคมีต่อร้านค้าปลีกสมัยใหม่และร้านค้าปลีกแบบดั้งเดิม 114
เกยูร ไขบัวกลิ่น

★ ปัญหาที่มีผลต่อการฝึกยกระดับฝีมือแรงงาน กรณีศึกษาเปรียบเทียบ แรงงานในเขตกรุงเทพมหานคร ปริมณฑล และเขตนิคมอุตสาหกรรมภาคตะวันออก 124
เนตรพ ชยมงคล สุภาพร ทินประภา สมชาย หิรัญกิตติ เกยูร ไขบัวกลิ่น

วารสารวิจัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

คณะกรรมการที่ปรึกษาวารสาร ฯ

รองศาสตราจารย์ ดร.นำยุทธ	สงค์ธนาพิทักษ์	Prof. Susumu	Yoshikawa	(Japan)
รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์	ดวงเดือน	Prof. Kiyoshi	Yoshikawa	(Japan)
ศาสตราจารย์ ดร.ปิยวัติ	บุญ-หลง	Prof. Seichi	Aiba	(Japan)
นายชอบวิทย์	ลับไพรี	Prof. Hans E.	Hummel	(Germany)

คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

ศาสตราจารย์ ดร.สิริวัฒน์	วงษ์ศิริ	ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์	เจริญชัย
ศาสตราจารย์ ดร.เกตุ	กรุดพันธ์	ศาสตราจารย์ ประยูร	จินดาประดิษฐ์
ศาสตราจารย์ ดร.ยงค์วิมล	เลณบุรี	ศาสตราจารย์ ปรีชา	เถาทอง
ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.ชำนาญ	ฉัตรแก้ว	รองศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี	พีรพรพิศาล
ศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.อรรณพ	คุณาวงศ์กฤต	รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง
ศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์	วัชรพุกก์	รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยณรงค์	คันธพนิต
ศาสตราจารย์ ดร.เมธา	วรรณพัฒน์	รองศาสตราจารย์ ดร.พีรเดช	ทองอำไพ
ศาสตราจารย์ ดร.ปรารถนา	พฤกษศรี	รองศาสตราจารย์ ดร.กาวี	ศรีกูลกิจ
ศาสตราจารย์ ดร.วัลลภ	สุระกัมพลธร	รองศาสตราจารย์ เกษม	เพชรเกตุ
ศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ฤทธิ์	สมบัติสมภพ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสูตร	หวังวรวุฒิ
ศาสตราจารย์ ดร.สมชาติ	โสภณรณฤทธิ์	นางดาวรัตน์	ว่องวิกย์การ
ศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนูญ	โสภารัตน์	นายรณฤทธิ์	ธนโกเศศ

บรรณาธิการวิชาการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมพร เจนคุณาวัฒน์

บรรณาธิการบริหาร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวรรณ คุปพิทยานันท์

กองบรรณาธิการ

รองศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี	สงวนพงษ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ บุญเรือง	สมประจบ
รองศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์	พันธ์ลำเจียก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุธีรา	เผ่าโภคสถิตย์
รองศาสตราจารย์ ดร.อุษาพร	เสวกวิ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รุ่งฤดี	อภิวัฒนศร
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมหมาย	ผิวสอาด	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรวงค์	ศรีสุวัจฉรีย์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี	สวาสดิ์ธรรม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปวีณ์ณัส	ศิริจารุวงศ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุฑารัตน์	ศริดารา	ดร.สรพงษ์	ภวสุปรีย์
รองศาสตราจารย์ วัชระ	รอดสัมฤทธิ์	ดร.ปาริชาต	คลื่นสุวรรณ
รองศาสตราจารย์ ฐาปนีย์	สุทธ์สนั่น	นางสาวพัชรี	ศรีสังข์

ฝ่ายทะเบียน

นางสาวกชกร ดาราพาณิชย์

ฝ่ายศิลป์ รูปเล่ม จัดพิมพ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วาสนา	เจริญวิเชียรฉาย	นางสาวจันทร์ประภา	พ่วงสุวรรณ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประทุมทอง	ไตรรัตน์	นางสาวกชกร	ดาราพาณิชย์
นายเอกชัย	โถเหลือง	นางสาวคณธวัลย์	ศุภรัตนาภิรักษ์

สถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

เลขที่ 39 หมู่ 1 ตำบลคลองหก อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110
โทรศัพท์ (02) 549-4682-4 โทรสาร (02) 577-5038 และ (02) 549-4680
http://www.ird.rmutt.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

บรรณาธิการแถลง

การวิจัยนั้นยังไม่อาจเสร็จสมบูรณ์ได้หากยังไม่มีการนำไปใช้ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จึงได้จัดทำวารสารวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี เพื่อเป็นสื่อกลางในการเผยแพร่ผลงานวิจัย สิ่งประดิษฐ์ความรู้หรือแนวความคิดใหม่ ๆ แก่นักวิชาการ และผู้สนใจทั่วไป เพื่อส่งเสริมให้นำผลงานวิจัยไปใช้ให้เกิดประโยชน์ ซึ่งก็ได้รับความร่วมมือจากนักวิจัยหลากหลายสถาบันที่ส่งผลงานมาตีพิมพ์เผยแพร่ ในฉบับนี้ ได้นำเสนอผลงานของนักวิจัยที่ได้ศึกษาถึงคุณประโยชน์ของไวน์ไทย ในเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการศึกษาเกี่ยวกับพลังงานทดแทน โดยการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่าง การศึกษาการเจริญเติบโตและผลิตสบู่ดำ ข้อคิดเห็นของผู้บริโภคและผู้ค้าปลีกแบบดั้งเดิมต่อการขยายตัวของร้านค้าปลีกสมัยใหม่ และอีกหลาย ๆ ผลงานที่น่าสนใจเช่นกัน

เนื่องจากปัจจุบันวารสารได้จัดพิมพ์ล่าช้ากว่ากำหนด และเพื่อให้การจัดพิมพ์วารสารเป็นไปตามวันเวลาที่จัดพิมพ์จริง กองบรรณาธิการจึงขอยกเลิกการจัดทำวารสาร ปีที่ 11 ฉบับที่ 3-ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 โดยวารสารฉบับที่ท่านอ่านอยู่นี้จะเป็น ปีที่ 13 ฉบับที่ 3 (พฤษภาคม-สิงหาคม 2553)

สมพร เจนคุณาวัฒน์
บรรณาธิการ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไวน์ไทย

Antioxidant Activity in Thai Wines

นิทรา เนื่องจำนงค์[1] นงคราญ เรืองประพันธ์[2] สุภาภรณ์ คณิตวิทยา[3] สุดชฎา ศรประสิทธิ์[4]
ประภาพรรณ พรหมหิรัญกุล[5] ภาวดี น้อยอาษา[6] บุษบง สุจเร[7]
Nitra Nuengchamnong[1], Nongkran Ruengprapun[2], Supaporn Kanitvittaya[3], Sudchada Somprasit[4],
Prapapan Promhirangul[5], Pawadee Noiarsa[6], Busabong Sucharay[7]

บทคัดย่อ

สำรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นในไวน์ที่ผลิตในประเทศไทยในช่วงเดือน พฤศจิกายน 2548 ถึง เมษายน 2549 โดยใช้วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay เก็บตัวอย่างจากสถานที่ผลิตและจำหน่ายในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้จำนวนทั้งสิ้น 98 ตัวอย่าง จำแนกเป็นไวน์ผลไม้และสมุนไพรจำนวนทั้งสิ้น 32 ชนิด ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านอนุมูลอิสระพบว่า ตัวอย่างไวน์ 51 ตัวอย่าง (ร้อยละ 52) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงมากกว่าร้อยละ 80 เป็นไวน์ที่ผลิตจากผลไม้และสมุนไพรแตกต่างกันจำนวน 20 ชนิด ได้แก่ ลูกหว้า มะขามป้อม กระเจี๊ยบ ลำไย กระชายดำ ผลไม้รวม มะเกี๋ยง กระท้อน โด่ไม่รู้ล้ม มังคุด ลูกไหน สตรอเบอรี่ มะเม่า ลิ้นจี่ ตะขบ พลัม ท้อ ลูกจันทน์เทศ ลูกหม่อน และองุ่น นอกจากนี้พบว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระขึ้นกับชนิด ความเข้มข้นของผลไม้ และสมุนไพรที่นำมาใช้

คำสำคัญ : สารต้านอนุมูลอิสระ, ไวน์, DPPH assay
Keywords : antioxidant, fruit wines, DPPH assay

[1-7] ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก[1] เชียงใหม่[2] เชียงราย[3] สงขลา[4] นครราชสีมา[5] ขอนแก่น[6] ชลบุรี[7], กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

[1-7] Regional Medical Sciences Phitsanulok[1], Chiang mai[2], Chiang rai[3], Songkla[4], Nakornratchasima[5], Korn kaen[6], Chonburi[7], Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

Abstract

The screening of antioxidant activity of Thai wines was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Samples were collected from the North, Northeast and Southern parts of Thailand during November 2005-April 2006. The results showed that 51 from 98 samples (52%) had high activity higher than 80%. These Thai wines were made from 32 kinds of fruits, and the following 20 species were good sources of antioxidant compounds: Java plum, Phyllanthus, Roselle, Longan, Black galingale, mixed berry fruit, Makieng, Santol, *Elephantopus scaber* Linn., Mangosteen, Nectarine, Mao, Strawberry, Lychee, Manila cherry, Plum, Peach, Nutmeg, Mulberry and Grape. The antioxidant activity of fruit wines was not only influenced by the species but also by the concentration of the raw materials .

บทนำ

จากรายงานการวิจัยในต่างประเทศพบว่าการดื่มไวน์แดงมีผลดีต่อสุขภาพ ลดการเกิดโรคหัวใจ โรคความดัน และโรคอื่น ๆ [1] ประกอบกับการเปิดเสรีของรัฐบาลไทยในเรื่องการผลิตและจำหน่ายสุราในปี พ.ศ. 2543 และการส่งเสริมการใช้สมุนไพรของรัฐบาล ทำให้คนไทยหันมาผลิตไวน์จากผลไม้และสมุนไพรกันจำนวนมาก มีผลไม้ไทยหลายชนิดที่นำมาใช้ทำไวน์ นอกจากองุ่นที่นิยมนำมาผลิตเป็นไวน์ที่รู้จักกันดี การผลิตไวน์ในประเทศไทยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ ชะลอความแก่และป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากความเสื่อมของเซลล์ ความเสื่อมของเซลล์เกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระ (Free Radical) อนุมูลอิสระคือ โมเลกุลที่มีธาตุที่ไม่มั่นคงเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ไป 1 ตัวปกติโมเลกุลทั้งหลายในร่างกายของเราจะมีอิเล็กตรอนอยู่วงรอบเป็นจำนวนคู่ ซึ่งทำให้โมเลกุลนั้นคงตัวในกรณีที่มีการสูญเสียอิเล็กตรอน หรือรับอิเล็กตรอนมาเพิ่มอีกเพียง 1 ตัวจะทำให้โมเลกุลนั้นไม่เสถียรจะไปแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงมาทำให้ตัวมันเสถียร การแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงกระทำต่อเนื่องอย่างรวดเร็วเป็นกระบวนการที่เรียกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่ มีผลทำให้เซลล์ถูกทำลายจำนวนมาก อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการสันดาปของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค [2] หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ [3] การออกกำลังกายที่หักโหม [4] การบริโภคอาหารที่มากเกินควร[2] โดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระเชื่อว่า มีผลต่อการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อในระยะสั้น ในระยะยาวอาจมีผลต่อ ความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์ และอาจเป็นสาเหตุของโรคมะเร็ง โรคหัวใจ ต้อกระจก หลอดเลือดหัวใจ ฯลฯ [5,6] ในภาวะปกติร่างกายมีระบบป้องกันที่เรียกว่าระบบแอนตี้ออกซิแดนท์ (antioxidants) บางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบแอนตี้ออกซิแดนท์จะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลกระทบต่าง ๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต ดังนั้นร่างกายต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอก เช่น จากอาหารพวก ผัก ผลไม้ และสมุนไพร [7] เป็นต้น

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของตัวกำเนิดอนุมูลอิสระและชนิดของตัวตรวจวัดอนุมูลอิสระ โดยทั่วไป

อาศัยหลักการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาก่อน แล้วจึงเติมสารแอนตี้ออกซิแดนท์ลงไป จากนั้นทำการตรวจวัดหาอนุมูลอิสระที่เหลือหลังจากการเกิดปฏิกิริยา วิธีที่นิยมใช้ได้แก่การใช้อนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) [8,9] หรือใช้ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) [10] การแสดงค่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะรายงานในรูปของร้อยละ หรือจะเทียบความแรงว่าเป็นกี่เท่าของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เช่น Trolox (วิตามินอีในรูปที่ละลายน้ำ) วิตามินซี หรือในรูป IC^{50} (ปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้การเปลี่ยนแปลงสีลดลงร้อยละ 50) สารที่มีค่า IC^{50} ต่ำจะมีฤทธิ์สูง

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไวน์ไทย 10 ชนิด พบว่าไวน์ลูกหว้า และไวน์องุ่นผสมมังคุดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าไวน์ที่ทำจากข้าว หรือสมุนไพรชนิดอื่น [9] นอกจากนี้มีรายงานว่าไวน์ที่ทำจากผลมะหวด และผลลำดวน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ[11] การประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในไวน์ที่ผลิตในประเทศไทยยังไม่ค่อยมีผู้ศึกษา ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระใน ตัวอย่างไวน์ที่ผลิตในประเทศไทยโดยใช้ DPPH assay ในการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาคุณภาพของไวน์ไทย และส่งเสริมการบริโภคไวน์ในรูปอาหารเสริมสุขภาพ

วิธีการวิจัย

สารเคมี

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) (Sigma, St. Louis, MO) เมทานอล (methanol) HPLC grade (Labscan, Bangkok, Thailand)

เครื่องมือ

UV-Vis Spectrophotometer (Perkin Elmer, Lamda II, USA)

ตัวอย่างไวน์

ตัวอย่างไวน์ผลไม้และสมุนไพรจำนวน 98 ตัวอย่าง สุ่มเก็บตัวอย่างจากแหล่งผลิตและจำหน่ายในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ โดยเก็บตัวอย่างและตรวจประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ เชียงราย พิษณุโลก นครราชสีมา ขอนแก่น และสงขลา ในช่วงเดือน พฤศจิกายน 2548 – เมษายน 2549

วิธีประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

นำตัวอย่างไวน์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 0.1mM DPPH ที่ละลายใน เมทานอล จำนวน 2.9 มิลลิลิตรในหลอดทดสอบ เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และวัดค่าตัวควบคุมที่ใช้สารละลายเมทานอลจำนวน 0.1 มิลลิลิตรแทนตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ประเมินฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละ ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$\text{ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุม-ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงตัวควบคุม}} \times 100$$

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ประเทศไทยมีความหลากหลายในเรื่องของผลไม้และพืชสมุนไพร จากการสุ่มเก็บตัวอย่างไวน์ทั่วประเทศ จำนวน 98 ตัวอย่าง พบว่ามีไวน์ที่ทำจากผลไม้และสมุนไพรต่าง ๆ ถึง 32 ชนิด เมื่อนำมาประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระพบว่าไวน์จำนวน 51 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 52 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมากกว่าร้อยละ 80 เป็นไวน์ที่ทำจากผลไม้และสมุนไพรต่าง ๆ จำนวน 20 ชนิด ได้แก่ ไวน์ที่ผลิตมาจาก ลูกหว้า มะขามป้อม กระเจี๊ยบ ลำไย กระชายดำ ผลไม้รวม มะเกี๋ยง กระท้อน โด่ไม่รู้ล้ม มังคุด สตรอเบอรี่ มะเม่า ลิ้นจี่ ลูกไหน ตะขบ พลัม ท้อ ลูกจันทร์เทศ ลูกหม่อน และองุ่น ข้อมูลตามตารางที่1-3 จากข้อมูลตารางที่1จะเห็นว่า ในภาคเหนือมีตัวอย่างไวน์จำนวน 54 ตัวอย่าง มีการนำผลไม้และสมุนไพรมาผลิตไวน์ถึง 23 ชนิด โดยกระชายดำนิยมนำมาผลิตเป็นไวน์มากที่สุด รองลงมาได้แก่ ลิ้นจี่ และลูกหม่อน ส่วนภาคใต้ตัวอย่างไวน์จำนวน 34 ตัวอย่าง มีผลไม้และสมุนไพรที่ใช้จำนวน 17 ชนิด มะเม่า และกระเจี๊ยบแดงนิยมนำมาผลิตเป็นไวน์มากที่สุด (ตารางที่ 2) สำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีตัวอย่างไวน์จำนวน 11 ตัวอย่าง เป็นผลไม้และสมุนไพร 9 ชนิด ในภาคนี้จะใช้องุ่นในการผลิตไวน์ เหมือนกับการผลิตไวน์ในต่างประเทศ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างไวน์ที่ผลิตในภาคเหนือ

ผลิตภัณฑ์ไวน์	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)			
1. มะขามป้อม	1) 94.34±0.12	2) 94.25±0.32	3) 94.08±0.02	
2. ลูกหว้า	1) 94.06±0.10	2) 93.35±0.06	3) 89.48±0.08	
3. กระเจี๊ยบ	1) 92.63±0.10	2) 90.27±0.13	3) 80.56±1.86	4) 57.99±0.53
4. ลำไย	1) 92.57±0.10	2) 32.32±0.89		
5. กระชายดำ	1) 92.52±0.10	2) 66.63±1.25	3) 56.97±1.85	4) 48.02±1.30
	5) 48.75±0.04	6) 37.54±1.16	7) 36.19±0.47	8) 35.17±0.76
	9) 33.58±0.61	10) 29.10±0.02	11) 27.34±0.83	
6. ผลไม้รวม	1) 91.59±0.27			
7. มะเกี๋ยง	1) 90.50±0.07	2) 87.34±0.13		
8. ลูกไหน	1) 89.66±0.08	2) 88.93±0.38		
9. สตรอเบอรี่	1) 89.21±0.14	2) 88.79±3.05	3) 85.25±0.96	
10. มังคุด	1) 88.91±0.45			
11. ลิ้นจี่	1) 86.68±0.17	2) 86.10±0.10	3) 49.77±0.66	4) 40.99±0.77
	5) 37.27±1.75	6) 14.11±1.60		
12. พลับ	1) 86.16±0.10			
13. องุ่นผสมมังคุด	1) 85.90±0.91			
14. ลูกท้อ	1) 85.55±0.11			
15. ลูกหม่อน	1) 84.54±0.20	2) 83.94±1.17	3) 80.53±1.30	4) 71.24±0.22

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์ไวน์	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)	
16. มะเม่า	1) 81.27±0.14	2) 79.97±0.15
17. ไวน์แดง	1) 64.37±0.36	
18. แอปเปิ้ล	1) 56.34±0.67	
19. เถาวัลย์เปรียง	1) 43.29±2.08	
20. ไวน์ขาว	1) 32.81±0.60	
21. สับปะรด	1) 28.80±0.99	
22. มะนาวผสมน้ำผึ้ง	1) 20.14±1.09	
23. มะขาม	1) 15.65±0.63	

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างไวน์ที่ผลิตในภาคใต้

ผลิตภัณฑ์ไวน์	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)			
1. กระท้อน	1) 91.15±0.31			
2. กระเจี๊ยบ	1) 90.31±0.22	2) 86.72±0.23	3) 84.81±1.01	4) 62.10±0.86
	5) 40.13±0.87			
3. มังคุด	1) 89.92±0.17	2) 83.79±1.09	3) 62.42±0.12	4) 53.87±0.77
4. มะเม่า	1) 88.82±0.32	2) 87.65±0.18	3) 86.21±0.62	4) 76.38±0.86
	5) 70.27±0.23	6) 64.41±0.51		
5. ลูกหว้า	1) 86.69±0.37	2) 79.38±0.40		
6. ตะขบ	1) 86.24±0.04	2) 46.35±0.63		
7. ลูกจันทน์เทศ	1) 84.92±0.72			
8. กระชายดำผสมมะเม่า	1) 79.38±0.46			
9. ระกำ	1) 55.97±0.98	2) 36.06±0.56		
10. เถาว์คัน	1) 55.02±0.33			
11. สับปะรด	1) 35.60±0.45	2) 20.49±0.33		
12. กระชายดำ	1) 29.10±0.02			
13. ลิ้นจี่	1) 16.32±0.03			
14. ไวน์แดงผสมส้มแขก	1) 15.43±0.21			
15. เงาะ	1) 15.14±0.26			
16. พฤกษา	1) 12.81±0.09			
17. ส้มแขก	1) 5.55±0.77			

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างไวน์ที่ผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผลิตภัณฑ์ไวน์	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)	
1. ลูกหว้า	1) 95.91±0.09	
2. มะขามป้อม	1) 3.79±0.09	
3. โด่ไม่รู้ล้ม	1) 89.95±0.22	
4. มังคุด	1) 88.37±0.36	
5. กระท้อน	1) 87.32±0.34	
6. มะเม่า	1) 86.85±0.21	
7. องุ่น	1) 83.68±0.50	2) 82.23±0.24
8. กระเจี๊ยบ	1) 82.23±0.24	2) 75.31±0.08
9. มะยม	1) 14.84±0.46	

ไวน์ที่ทำจากพืชชนิดเดียวกันอาจจะมีฤทธิ์ที่ต่างกัน จากตารางที่1 ไวน์กระชายดำจำนวน 11 ตัวอย่าง จะพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันโดยมีฤทธิ์ตั้งแต่ ร้อยละ 92.52-27.34 ไวน์ลิ้นจี่ จำนวน 6 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระตั้งแต่ร้อยละ 86.68-14.11 ไวน์มะเม่าจำนวน 6 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระตั้งแต่ร้อยละ 88.82-64.41 (ตารางที่ 2) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันมีสาเหตุมาจาก ความเข้มข้นของน้ำผลไม้หรือสมุนไพรที่ใช้ กรรมวิธีการผลิต อายุของพืช ส่วนของพืชที่นำมาใช้ อายุของผลิตภัณฑ์ การเก็บรักษาและความคงตัวของสารออกฤทธิ์ เป็นต้น ผลไม้ที่นิยมนำมาใช้ผลิตไวน์ในทุกภาค ได้แก่ ลูกหว้า มะเม่า กระเจี๊ยบ และมังคุด สำหรับแหล่งผลิตไวน์ในภาคเหนือมีที่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน พิษณุโลก เชียงใหม่ เชียงราย และเพชรบูรณ์ ภาคใต้ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร ยะลา นครศรีธรรมราช สงขลา ตรัง และกระบี่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จังหวัดขอนแก่นและนครราชสีมา จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไวน์ไทยเปรียบเทียบกับไวน์ที่ผลิตในต่างประเทศของนพมาศและทรงศรี [12] พบว่าไวน์มะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าไวน์ขาวที่ผลิตจากองุ่นพันธุ์ Chardonnay ถึง 50 เท่า ในขณะที่ไวน์กระท้อนมีฤทธิ์มากกว่าเพียง 9-13 เท่า นอกจากนี้ไวน์มะขามป้อมยังมีฤทธิ์สูงกว่าไวน์แดงที่ผลิตจากองุ่นพันธุ์ Merlot ถึง 4 เท่า

ในงานวิจัยนี้กำหนดค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 80 ซึ่งเป็นค่าที่สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในผลไม้และสมุนไพรต่างๆ สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระDPPH ได้อย่างสมบูรณ์ กลไกการเกิดปฏิกิริยาของวิธีนี้คือ สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนกับ DPPH และ DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วง (รูปอนุมูลอิสระ) เป็นสีเหลือง การวัดค่าจะวัดสีม่วงที่เหลืออยู่ และวัดเทียบกับตัวควบคุมซึ่งใช้เมทานอล เมทานอลเป็นสารไม่มีสี ดังนั้นการประเมินฤทธิ์ด้วยวิธีนี้ไม่สามารถรายงานฤทธิ์ที่ค่า 100 เปอร์เซนต์ได้ เพราะจะมีค่าการดูดกลืนแสงของสีเหลืองที่เกิดจากปฏิกิริยาอยู่ค่าหนึ่ง ดังนั้นในที่นี้จึงกำหนดว่าไวน์ชนิดใดมีฤทธิ์มากกว่าร้อยละ 80 ถือว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมามีการรายงานถึงสารสำคัญที่พบในผลไม้และสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงนั้นจะเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิค เช่น ฟลาโวนอยด์ โปรแอนโธไซยาดิน แอนโทไซยานิน แทนนิน (ตารางที่ 4) [13-21] ซึ่งสารเหล่านี้มีรายงานว่าสามารถป้องกันโรคที่เกิด

จากความเสื่อมของเซลล์ที่จะเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ เช่น ความดัน มะเร็ง หัวใจ และสามารถชะลอความเหี่ยวย่นของผิวหนังได้ ชะลอความแก่ เพิ่มความจำ เพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน [22] ในปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดถึงปริมาณที่เหมาะสมในการบริโภคอาหารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งนี้ ขึ้นกับสภาวะของแต่ละบุคคล

ตารางที่ 4 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบที่มีรายงานในพืชชนิดที่ศึกษา

ชนิดพืช	สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบ	เอกสารอ้างอิง
ลูกหว้า	hydrolysable tannins, anthocyanins, tartaric acid, citric acid	13
มะขามป้อม	ascorbic acid, trigalloyl, ellagic acid, glucoseterchebin, corilagin etc.	14
กระเจี๊ยบ	acetic acid, anthocyanin, gallic acid, malic, stearic, β-sitosterol, tannic and tartaric acids	15
ลำไย	corilagin, gallic acid, ellagic acid	16
กระชายดำ	flavonoids, chalcone	15
มะเกี๋ยง	malic acid, chlorogenic acid, gallic acid, ellagic acid, methoxymethylgallate	13
สตรอเบอรี่	ellagic acid, ellaginic, tannins, pelargonidin -3-glucoside	17
มะเม่า	gallic acid, cyanidin-3-sophoroside, monogalloyl glucose, delphinin-3-xylosyl-glucoside, caffeic acid, pelargonidin(malonyl) glucose	18
ลิ้นจี่	proanthocyanidin B4, B2, epicatechin, anthocyanin	19
พลัม	chlorogenic acid, caffeic acid, quinic acid, rutin, feruloyl quinic acid, anthocyanidin, etc.	20
ท้อ	quercetin glycosides, catechins	21
ลูกหม่อน	rutin, anthocyanins, carotene, vitamin B1, B2, C, tannin, cyanidin	15

สรุป

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามีไวน์ไทยหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระขึ้นกับชนิด ความเข้มข้นของผลไม้และสมุนไพรที่นำมาใช้ และจากผลการศึกษาวิจัยที่มีรายงานแล้วพบว่าผลไม้และสมุนไพรเหล่านี้มีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการป้องกันโรคต่าง ๆ การนำผลไม้หรือสมุนไพรไทยมาผลิตเป็นไวน์และมีการควบคุมปริมาณสารสำคัญให้มีมากพอ ตลอดจนควบคุมคุณภาพให้ได้ตามมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข และของกรมสรรพสามิตร ก็จะเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ ลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และที่สำคัญเป็นการเพิ่มรายได้ให้แก่ เกษตรกรผู้ปลูกและผู้แปรรูป อีกทั้งยังใช้เป็นข้อมูลที่จะนำพืชนั้นไปสกัดเพื่อเอาสารออกฤทธิ์มาผลิตในเชิงการค้าต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] Watkins,T.R., Ed. 1997. Wine-Nutritional and therapeutic Benefits. ACS Symposium Series661; American Chemical Society: Washington, DC.

[2] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E. 1992. Free Radicals antioxidants and human disease. Where are we now? Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 6:598-620.

[3] Jacobson, H.N. 1987. Dietary standard and future developments. Free Radical Biology and Medicine.3:209-213.

[4] Dekkers, J.C., van Doornen, L.J., Kemper, H.C. 1996. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise induced muscle damage. Sport Medicine. 21(3):213-238.

[5] Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences. 9: 7915-7922.

[6] Aruoma, O.I. 1998. Free radicals,oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75:199-212.

[7] Block, G., Patterson, B. and Subar, A. 1992. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. Nutrition and cancer. 18:1-29.

[8] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss u Technol. 28: 25-30.

[9] นิทรา เนื่องจำนงค์ กรกนก อิงคนินันท์. 2548. การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มสมุนไพรและไวน์ไทย วารสารอาหารและยา 12(2):65-70.

[10] Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan,V., Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science. 84:407-412.

[11] บัวใส ศรไชย และ มัลลิกา จันทรังษี. 2552. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของไวน์จากผลมะหวด และผลลำดวน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่35 ม. บูรพา.

[12] นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และ ทรงศรี แก้วสุวรรณ. 2544. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรไทยและไวน์ไทย วารสารสมุนไพร 8(2): 8-13.

[13] Nuengchamnong, N, Ingkaninanม K. 2009. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from Myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. LWT Food science and technology. 42: 297-302.

[14] กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2546. ประมวลผลงานวิจัยด้านพิษวิทยาของสถาบันวิจัยสมุนไพร เล่ม 2 โรงพิมพ์การศาสนา.

[15] สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 2548. สมุนไพรไทยก้าวไกลสู่สากล โรงพิมพ์ รสพ.กรุงเทพ.

[16] Rangkadilok, N., Warasuttayangkurn, L., Bennett , RN. , Satayavivad , J. 2005. Identification and quantification of polyphenolic compounds in Longan (Euphoria Longana Lam.) fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53:1387-1392.

[17] Seeram, N.P., Lee, R., Scheuller, H.S., Heber, D. 2006. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. Food Chemistry. 97:1-11.

[18] Nuengchamnong , N, Ingkaninan , K. 2010. On-line HPLC-MS-DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine: Antidesma thwaitesianum Muell. Food Chemistry. 118:147-152.

[19] Zhao, M., Yang, B., Wang, J., Li, B. Jiang, Y. 2006. Identification of the major flavonoids from pericarp tissues of lychee fruit in relation to their antioxidant activities. Food Chemistry. 98: 539-54.

[20] Fang, N., Ya, S., Prior, R.L. 2002. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50:3579-3585.

[21] Tomas-Barberan, F.A., Gill, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Hess-Pierce, B., Kader, A. 2001. A HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in Nectarines peaches and plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49:4748-4760.

[22] Ng, T.B., Liu, F., Wang, Z.T. 2000. Antioxidant activity of natural products from plant. Life Sciences. 66:709-723.

การวิเคราะห์หาสารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ในอาหารทอดโดยวิธี HPLC

Determination of Synthetic Antioxidants in Fried Foods Using High Performance Liquid Chromatography

วาลีย์ ทองทา [1] นิทรา เนื่องจำนงค์ [1]

Walee Thongta[1] Nitra Nuengchamnong[1]

บทคัดย่อ

จากการศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ Tertiary Butyl Hydroquinone (TBHQ), Butylated Hydroxyanisole (BHA) และ Butylated Hydroxytoluene (BHT) ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Zorbax C_8 คอลัมน์ (ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร อนุภาค 5 ไมโครเมตร) ตรวจวัดด้วย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สารละลายตัวพาประกอบด้วย เมทานอลและ 1% กรดอะซิติก ในระบบ gradient elution อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าช่วงการวิเคราะห์ของ TBHQ และ BHT มีความเป็นเส้นตรงและพิสัย (Linearity และ Range) ที่ความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน BHA ที่ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9994, 0.9996 และ 0.9998 ตามลำดับ ผลการทดสอบความแม่นของวิธีวิเคราะห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (%Recovery ± SD) ของ TBHQ, BHA และ BHT ที่ความเข้มข้น 70 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 88.61±2.30 ถึง 100.15±3.51, 82.74±5.47 ถึง 100.14±1.93 และ 86.67±3.58 ถึง 107.73±3.97 ตามลำดับ การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน และแต่ละวันที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต่ำกว่าร้อยละ 5 ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ของ TBHQ, BHA และ BHT เท่ากับ 3,3 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของ TBHQ, BHA และ BHT เท่ากับ10 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ TBHQ, BHA และ BHT ในตัวอย่าง 9 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบ 6 ตัวอย่าง และตรวจพบ 3 ตัวอย่าง แบ่งเป็นพบ TBHQ ในข้าวอบกรอบ 1 ตัวอย่าง พบ BHA ในมันทอด 2 ตัวอย่าง วิธีวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ที่พัฒนานี้เป็นวิธีที่ง่าย มีความแม่น และความเที่ยง สามารถนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารทอดของกลุ่มแม่บ้านในโครงการผลิตภัณฑ์ชุมชนหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์

คำสำคัญ : สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เอชพีแอลซี อาหารทอด

Key words : synthetic antioxidant, HPLC, fried food

---

[1] ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

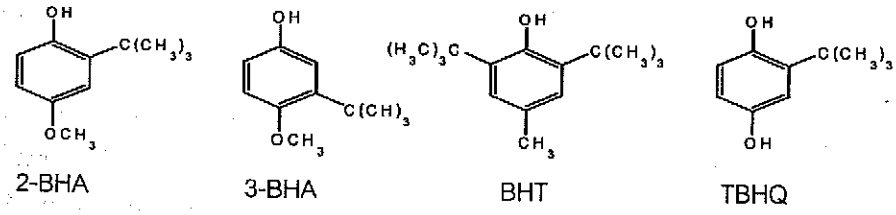
[1] Regional Medical Sciences Center Phitsanulok, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

Abstract

A reversed phase high performance liquid chromatography was used for determination of the following synthetic antioxidants: Tertiary Butyl Hydroquinone (TBHQ), Butylated Hydroxy anisole (BHA) and Butylated Hydroxytoluene (BHT). A Zorbax C_8 column (4.6x150 mm, 5 μm) was used to separate the three compounds with gradient elution of methanol and 1% (v/v) glacial acetic acid at the flow rate of 1 ml/min. The UV detector was set at 280 nm. The validation method was evaluated with a linearity of TBHQ and BHT in the range of 10-100 μg/ml with correlation coefficient (r^2) 0.9994 and 0.9996, respectively. For BHA, the linearity was in the range of 20-100 μg/ml with r^2 0.9998.The recovery of TBHQ, BHA and BHT at concentration of 70 and 100 μg/ml was 88.61±2.30 to100.15±3.51, 82.74±5.47 to100.14±1.93 and 86.67±3.58 to 107.73±3.97, respectively. The within day and between day precision at concentration of 50 μg/ml was good with RSD lower than 5%. The detection limit (LOD) of TBHQ, BHA, BHT was 3, 3 and 5 μg/ml. The limit of quantitation (LOQ) was 10, 20 and 10 μg/ml. The method was applied to determine synthetic antioxidants in fried food. Three from nine samples were found to contain TBHQ and BHA. THBQ was found in a one sample of rice cracker while BHA was found in two samples of fried sweet potato. This newly developed method is easy to perform and reliable. Because of the success this method is used for quality control of products from the "One Tambon One Product" (OTOP) project.

บทนำ

สารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการเกิดกลิ่นหืนในอาหารประเภททอด เช่น มันฝรั่งทอด กล้วยทอด คุกกี้ โดยได้นำมาใช้ในระหว่างกระบวนการผลิตรวมถึงการเก็บรักษา สารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ ได้แก่ Butylated Hydroxyanisole (BHA) Butylated Hydroxytoluene (BHT) และ Tertiary Butyl Hydroquinone (TBHQ) โดย BHA มีโครงสร้าง 2 แบบ ประกอบด้วย 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (3-BHA) เป็นส่วนใหญ่ และมี 2-tert-butyl-hydoxyanisole (2-BHA) อยู่ด้วยในปริมาณต่างๆ กัน โครงสร้างของสารที่ศึกษา ตามภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของสาร BHA, BHT และ TBHQ

ในสหภาพยุโรป (EU) ได้มีรายงานว่า มักพบ BHA ปนอยู่ในอาหารประเภทซุปก้อน เนื้อแห้ง ซึ่งอาจจะพบเดี่ยว ๆ หรือพบร่วมกับ propyl gallate (PG) หรือ octyl gallate (OG) หรือ dodecyl gallate (DG) ซึ่งอนุญาตให้ใช้ได้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วน BHT และ TBHQ มักพบในไขมันและน้ำมัน ซึ่งในสหรัฐอเมริกาได้มีรายงานว่ามักพบ TBHQ เดี่ยว ๆ หรือพบร่วมกับ BHA หรือ BHT และอนุญาตให้ใช้ได้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [1,2] ในประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 (พ.ศ. 2547) เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร อนุญาตให้ใช้ BHT, BHA และ TBHQ ได้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [3] ส่วนตามประกาศของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.) อนุญาตให้ใช้ BHT,BHA ในอาหารทอดกรอบ เช่น กล้วยทอด มันทอด ได้ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือทั้งสองชนิดรวมกันได้ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [4]

สำหรับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของสารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์นั้น ตามวิธีมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC) วิธีที่ 983.15 เป็นวิธีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทน้ำมันและไขมัน [5] สำหรับวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหารทอดยังไม่มีรายงาน ในที่นี้จะนำวิธีวิเคราะห์ของตัวอย่างน้ำมันและไขมันมาดัดแปลง พร้อมกับแสดงการทดสอบวิธีสำหรับนำไปใช้วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ในตัวอย่างอาหารทอด ซึ่งเป็นข้อกำหนดหนึ่งที่ต้องวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์ชุมชนหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์

วิธีการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC Agilent 1100 Series ประกอบด้วย Degasser, Quaternary pump, Autosampler, UV-Visible Detector, Column zorbax C_8 (4.6 x 150 mm, 5 μm) (Agilent Technologies, U.S.A.) เครื่องระเหยสูญญากาศ (Heidolph Instruments, Germany)

สารเคมีและสารมาตรฐาน

อะซีโทรไนไทล์ (acetonitrile) เมทานอล (methanol) ชนิด HPLC grade (LAB-SCAN, Thailand) กรดอะซิติก (glacial acetic acid) 2-โพรพานอล (2-propanol) และ นอร์มัลเฮกเซน (n-hexane) ชนิด analytical reagent grade (Merck, Germany) สารมาตรฐาน Butylated Hydroxyanisole (BHA; Sigma,Germany) สาร Butylated Hydroxytoluene (BHT;Fluka, Switzerland) และสารTertiary Butyl Hydroquinone (TBHQ ; Fluka, Switzerland)

วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารมาตรฐานเข้มข้น (Stock standard solution) ของ TBHQ, BHA และ BHT ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละตัวน้ำหนัก 5 มิลลิกรัม ละลายใน 1:1 (v/v) 2-โพรพานอล กับ อะซีโทรไนไทล์ ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้ 1 อาทิตย์

สารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง TBHQ, BHA และ BHT เตรียมโดยปิเปต สารมาตรฐานเข้มข้นของ BHT และ TBHQ ปริมาตร 10 20 30 50 70 และ100 ไมโครลิตร ส่วน BHA ปริมาตร 20 30 50 70 และ100 ไมโครลิตร ลงใน vial ขนาด1.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย 1:1(v/v) 2- โพรพานอล กับ

อะซีโทรไนไทล์ จนครบ 1,000 ไมโครลิตร จะได้สารละลาย BHT และ TBHQ เข้มข้น 10 20 30 50 70 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และได้สารละลาย BHA เข้มข้น 20 30 50 70 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

วิธีเตรียมสารละลายตัวพา (Mobile phase)

เตรียมสารละลายตัวพาเมทานอล โดยนำมากรองด้วยชุดกรองสารละลายผ่านแผ่นเยื่อกรอง (membrane filter) ชนิด Nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร

เตรียมสารละลายตัวพา 1% กรดอะซีติก โดยปิเปต กรดอะซีติก 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากประจุ (Deionized water) จนครบ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยชุดกรองสารละลายผ่านแผ่นเยื่อกรอง (membrane filter) ชนิด Nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร

ชนิดตัวอย่าง

ตัวอย่างกล้วยทอด 3 ตัวอย่าง มันทอด 2 ตัวอย่าง คุกกี้ 1 ตัวอย่าง มันฝรั่งทอด 2 ตัวอย่าง ข้าวอบกรอบ 1 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ ของ จ.พิษณุโลก และ จ.อุทัยธานี

วิธีเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหารทอด น้ำหนักประมาณ 100 กรัม นำมาปั่นให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างตัวอย่างด้วย นอร์มัลเฮกเซน ที่อิ่มตัวด้วย อะซีโทรไนไทล์ (n-hexane saturated with acetronitrile) 5 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองใส่ในกรวยแยก (separator funnel) ขนาด 250 มิลลิลิตร สกัดด้วย 15 มิลลิลิตร อะซีโทรไนไทล์ ที่อิ่มตัวด้วยนอร์มัลเฮกเซน (acetronitrile saturated with n-hexane) 3 ครั้ง ระเหยสารละลายที่สกัดได้ให้แห้งด้วย เครื่องระเหยสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วละลายสารที่เหลืออยู่ออกด้วย 1 มิลลิลิตรของ 1:1 (v/v) 2-โพรพานอล กับอะซีโทรไนไทล์ จะได้ตัวอย่างที่สามารถนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะของเครื่อง HPLC

คอลัมน์ : Zorbax C8 (4.6 x 150 mm, 5 μm) ปริมาตรของสารที่ฉีด 20 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มิลลิลิตรต่อนาที การแยกสารใช้การเปลี่ยนสัดส่วนของสารละลายตัวพา ที่เวลาต่าง ๆ (gradient elution) ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Gradient elution ของการแยกสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ด้วยสัดส่วนของสารละลายตัวพาที่ระยะเวลาต่าง ๆ

Time (min)	Methanol (%)	Glacial acetic acid (%)
0	10	90
5	90	10
10	90	10
12	10	90
15	10	90

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ทดสอบโดยใช้สารมาตรฐานผสมของ TBHQ, BHA และ BHT ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อทดสอบความแตกต่างของ retention time และการแยกสารทั้ง 3 ชนิด โดยทำการทดสอบ 7 ซ้ำ

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและพิสัย (Linearity และ Range)

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง BHT และ TBHQ ที่ความเข้มข้น 10 20 30 50 70 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน BHA ที่ความเข้มข้น 20 30 50 70 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ และสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละชนิดกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง

การทดสอบความแม่น (Accuracy)

ทดสอบโดยเติมสารละลายมาตรฐานของ TBHQ, BHA และ BHT ลงในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 70 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านขั้นตอนวิธีการเตรียมตัวอย่าง แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทดสอบ 7 ซ้ำ คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (Recovery) ซึ่งควรอยู่ในช่วงร้อยละ 80 -110 [6]

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

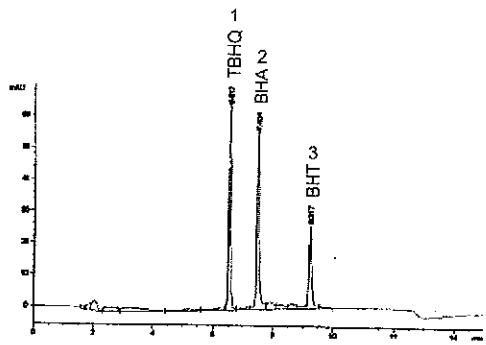
ทดสอบโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง TBHQ, BHA และ BHT ที่ความเข้มข้น 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบ 7 ซ้ำ เพื่อศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (within day precision) และทำการศึกษาต่างกันเป็นเวลา 5 วัน (between day precision) รายงานผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, %RSD)

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) **และการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ** (Limit of Quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง BHT และ TBHQ ที่ความเข้มข้น 10 20 30 50 70 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน BHA ที่ความเข้มข้น 20 30 50 70 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน X) กับพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด จะได้สมการเส้นตรง ($y = mx + c$) ทำการคำนวณหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณจากสมการเส้นตรง(regression line) [7] นำค่าที่คำนวณได้มาเตรียมเป็นความเข้มข้น ทำการฉีดทดสอบเพื่อยืนยันขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณจากค่าที่คำนวณได้ ขีดจำกัดการตรวจวัด สัญญาณที่วัดได้จะต้องมีค่าเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise) ทดสอบ 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ สัญญาณที่วัดได้จะต้องมีค่าเป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน ค่าความเข้มข้นที่วัดได้จะต้องใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่แท้จริงและเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, %RSD) ไม่เกิน 5% ทดสอบ 7 ซ้ำ

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การศึกษาความจำเพาะของวิธี จากการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมของ TBHQ, BHA และ BHT พบว่าคอลัมน์ Zorbax C_8 สามารถแยกสาร TBHQ, BHA และ BHT ออกมาที่เวลา 6.5 7.4 และ 9.1 นาที ตามลำดับระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ 15 นาที โครมาโทแกรม ตามภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรม ของ (1) TBHQ (2) BHA และ (3) BHT

วิธีที่ศึกษามีช่วงการวิเคราะห์ที่มีความเป็นเส้นตรงของสาร BHT และ TBHQ ในช่วงความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร BHT; y=10.76x-19.43 และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9996, TBHQ; y=15.28x-31.58, r^2=0.9994 ส่วน BHA ในช่วงความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร y=15.73x-57.36 และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9998

การทดสอบความแม่นของวิธีวิเคราะห์โดยการเติมสารมาตรฐานของ TBHQ, BHA และ BHT ลงในตัวอย่างกล้วยทอดที่ไม่พบการใช้สารแอนติ-ออกซิแดนท์สังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 70 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของ TBHQ, BHA และ BHT ที่ความเข้มข้น 70 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 88.61±2.30 ถึง 100.15±3.51 82.74±5.47 ถึง 100.14±1.93 และ 86.67±3.58 ถึง 107.73±3.97 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นของวิธีวิเคราะห์ TBHQ, BHA และ BHT ที่เติมลงไปในตัวอย่าง

Spiked level (μg/ml)	%Recovery (n=7)			Mean ± SD (n=7) (μg/ml)		
	TBHQ	BHA	BHT	TBHQ	BHA	BHT
70	88.61-94.37	82.74-96.87	96.80-107.73	64.68±2.30	61.53±5.47	70.98±3.97
100	91.30-100.15	95.54-100.14	86.67-96.29	75.76±3.51	97.78±1.93	90.96±3.58

ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบ 7 ซ้ำใน 1 วัน พบว่ามีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ TBHQ, BHA และ BHT เท่ากับ 1.28 0.86 และ 1.35 ตามลำดับ ส่วนผลการวิเคราะห์ระหว่างวันเป็นเวลา 5 วัน วันละ 7 ซ้ำ พบว่ามีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ TBHQ, BHA และ BHT เท่ากับ 0.20 2.51 และ 3.29 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ TBHQ, BHA และ BHT

Concentration (μg/ml)	Within-day (n=7) Mean±SD (μg/ml)	%RSD	Between-day (n=7) Mean±SD (μg/ml)	%RSD
TBHQ				
20	20.83±0.29	1.35	-	
50	50.24±0.64	1.28	49.99±0.10	0.20
BHA				
20	19.75±0.05	0.25	-	
50	48.89±0.42	0.86	49.72±1.25	2.51
BHT				
20	20.57±0.41	1.97	-	
50	48.27±0.25	0.01	49.56±1.63	3.29

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ที่คำนวณได้จากสมการ regression ของ TBHQ, BHA และ BHT และจากการทดสอบจริงพบว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด เท่ากับ 3 3 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ10 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และ 5)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ที่คำนวณจากสมการเส้นตรง

สารแอนติออกซิแดนซ์สังเคราะห์	LOD (μg/ml)	LOQ (μg/ml)
TBHQ	6.35	21.22
BHA	4.24	14.13
BHT	8.62	28.73

สรุป

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณของสารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ TBHQ, BHA และ BHT ในอาหารทอด โดยวิธี HPLC ในระบบ gradient elution ในการศึกษาครั้งนี้ จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหารทอดที่แสดง จะเห็นได้ว่าวิธีนี้มีความแม่นและความเที่ยงสูง รวมทั้งการเตรียมตัวอย่างก็สามารถสกัดสารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีนี้จะเป็นวิธีหนึ่งที่จะนำไปใช้วิเคราะห์สารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ในอาหารทอด ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของชุมชนเพิ่มเติมจากวิธีตาม AOAC [5] ที่ใช้วิเคราะห์เฉพาะตัวอย่างที่เป็นน้ำมันและไขมัน

เอกสารอ้างอิง

[1] Perrin, C. and Meyer, L. 2002. "Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed phase HPLC with photodiode array detection". **Food chemistry** 77, 93-100.

[2] Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, M. A. 2000. "Quantification of synthetic phenolic antioxidants in liver pates". **Food chemistry** 68, 353-357

[3] "พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 (พ.ศ. 2547) เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร" **ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 121 ตอนพิเศษ 97ง** ลงวันที่ 6 กันยายน พ.ศ. 2547

[4] "มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.) 2546", สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กระทรวงอุตสาหกรรม, **ราชกิจจานุเบกษา ฉบับพิเศษ เล่ม 102**

[5] Association Official Analytical Chemists . 1999. "AOAC Official method 983.15. Phenolic antioxidants in oils fats and butter oil. Liquid chromatographic method". **Official Methods of Analysis of AOAC International 16th ed Arlington**, VA, Ch47,p 2-5.

[6] ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. **แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยนนทบุรี ห้องปฏิบัติการเดียว** กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

[7] Miller, J.C., Miller, J.N. 1993. "Statistics for analytical chemistry". 3rd ed., **Ellis Horwood**, PTR Prentice Hall, London, p106-117.