

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว (rice)

ข้าวเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญของเอเชีย จึงทำให้ข้าวเป็นอาหารที่สำคัญที่สุดของคนในเอเชีย ผลิตภัณฑ์หลักจากการสีข้าวคือเมล็ดข้าว (endosperm) ซึ่งมีประมาณ 70% และผลพลอยได้จากการสีข้าวประกอบด้วย แกลบข้าว (rice husk) 20% ซึ่งเป็นเปลือกของข้าวสาร รำข้าว (rice bran) 8% และจมูกข้าว (rice germ) 2% รำข้าวเป็นแหล่งผลิตน้ำมันรำข้าวหรือนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ (Hoed *et al.*, 2006)

ข้าว เป็นคำทั่วไปที่ใช้เรียก เมล็ดข้าว (rice fruit, rice grain, หรือ rice seed) ซึ่งทางพฤกษศาสตร์จะหมายถึง ผล (fruit) ที่มีลักษณะเป็นผลเดี่ยว (single fruit) เกิดจากรังไข่อันเดียวชนิดลอย (superior ovary) ของดอกเดี่ยวในแต่ละดอกย่อย ที่เกิดรวมกันอยู่เป็นช่อดอก ผลเดี่ยวนี้จะติดแน่นอยู่กับผนังของรังไข่ หรือเยื่อหุ้มผล (pericarp) ซึ่งเมื่อผลสุกหรือแก่จะเป็นผลแห้ง (dry fruit) ที่ไม่แตก (indehiscent fruit) เรียกว่า เมล็ด (caryopsis grain) ที่มีเยื่อหุ้มผล และเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat หรือ testa) เชื่อมรวมกันอยู่อย่างแน่น โดยตลอดผลหรือเมล็ดข้าวจะมีลักษณะแตกต่างตามสายพันธุ์ ในด้านขนาด รูปร่าง สี การมีหาง (awn) หรือไม่มีหาง และขน (pubescence) หรือไม่มีขนบนเปลือกแข็ง (hull หรือ husk) (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547) เมล็ดข้าว (รูป 2.1) ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ (1) ส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าว (หรือผล) เรียกว่า แกลบ (hull หรือ husk) และ (2) ส่วนเนื้อผล หรือ ผลแท้ (true fruit หรือ caryopsis grain) หรือ ข้าวกล้อง (caryopsis หรือ brown rice) (Zhou *et al.*, 2002)

องค์ประกอบของเมล็ดข้าว
Rice Paddy Composition



รูป 2.1 องค์ประกอบของเมล็ดข้าว

ที่มา : บริษัทน้ำมันบริโภคไทย จำกัด (2011)

2.2 รำข้าว (rice bran)

รำ หมายถึง ส่วนเยื่อหุ้มผล เยื่อหุ้มเมล็ด นิเวเซลล์ ชั้นแอลิวโรน และชั้นชั้นแอลิวโรน และมักจะรวมส่วนของคัพพะเข้าเอาไว้ด้วย เนื่องจากในกระบวนการขัดสีข้าวกล้องให้เป็นข้าวสาร ส่วนใหญ่ต้องการข้าวสารที่ขาวจึงขัดผิวข้าวกล้องจนถึงชั้นชั้นแอลิวโรน ทำให้คัพพะหลุดจากเนื้อเมล็ด รวมอยู่ด้วย ดังนั้นปริมาณชนิดของโครงสร้าง และองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวที่ได้จากกระบวนการสีข้าว นับจากการกะเทาะเปลือกหุ้มแข็ง (เกลบ) ออกไปแล้ว จะขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว และสภาวะแวดล้อมที่ปลูกจนถึงกรรมวิธีในการขัดผิวเมล็ดข้าวกล้อง การขัดขาว และการขัดมันเพื่อให้ข้าวสารขาว และมันวาว ทำให้องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว ขึ้นอยู่กับส่วนของรำที่ได้จากกระบวนการสีข้าว (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

รำข้าวได้จากการสีข้าว ซึ่งจะได้ประมาณ 8-10% ของน้ำหนักข้าวเปลือกทั้งหมด (นัยนา บุญทวีวัฒน์ และเรวดี จงสุวัฒน์, 2545) องค์ประกอบของรำข้าวขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของข้าว เทคนิคการสีข้าว และวิธีการทำให้เกิดความเสถียร (stabilization) ของข้าว รำข้าวเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (natural antioxidant) ที่สำคัญ ได้แก่ โทโคเฟอรอล โทโคไตรอีนอล และโอริซานอล (oryzanols) รำข้าวสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้โดยเฉพาะในส่วนของ low-density lipoprotein (LDL) ทำให้ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจ นอกจากนี้ยังสามารถลดการเกิดของนิ่วในร่างกายได้ (Iqbal *et al.*, 2005)

ประเทศไทยสามารถผลิตน้ำมันรำข้าวได้เฉลี่ย 15% ของน้ำหนักรำข้าวทั้งหมด ซึ่งจะได้น้ำมันรำข้าวมากถึง 0.3 ล้านตัน/ปี (นัยนา บุญทวีวัฒน์ และเรวดี จงสุวัฒน์, 2545) การผลิตน้ำมันรำข้าว จะมุ่งผลิตเพื่อเป็นน้ำมันบริโภคเป็นหลัก ส่วนผลพลอยได้จากการแปรรูปน้ำมัน ได้แก่ สเตียร์น (stearin) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) กัม (gum) และดิสทิลเลต (distillate) ได้ถูกนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าไม่มากนัก เช่น สเตียร์นนำไปผลิตเนยขาว และจาระบี กรดไขมันอิสระนำไปผลิตอาหารสัตว์ และสบู่ ดิสทิลเลตนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ เป็นต้น

2.2.1 องค์ประกอบของน้ำมันรำข้าว

น้ำมันรำข้าวเป็นผลิตภัณฑ์จากรำข้าวดิบซึ่งหมายถึง ส่วนผสมของรำละเอียด และคัพพะ และจากกรรมวิธีการทำน้ำมันรำข้าว จะได้รำที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ซึ่งนำไปทำผลิตภัณฑ์อื่นได้ต่อไป (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

น้ำมันรำข้าวดิบ (crude rice bran oil) ประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์ ประมาณ 80% ของน้ำมัน โดยน้ำมันรำข้าวมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ (Nicolosi *et al.*, 1994) แสดงดังตาราง 2.1

ตาราง 2.1 องค์ประกอบของน้ำมันรำข้าว

กรดไขมัน	จำนวนคาร์บอน:จำนวนพันธะคู่	ปริมาณ (%)
กรดไมริสติก	14:0	0.1-1.0
กรดปาล์มมิติก	16:0	12.0-18.0
กรดปาล์มมิโตเลอิก	16:1	0.2-0.6
กรดสเตียริก	18:0	1.0-3.0
กรดโอเลอิก	18:1	40.0-50.0
กรดลิโนเลอิก	18:2	20.0-42.0
กรดลิโนเลนิก	18:3	0.0-1.0
กรดอะราซิดิก	20:0	0.0-1.0

ที่มา : Nicolosi *et al.* (1994)

จากตาราง 2.1 พบว่า น้ำมันรำข้าว มีกรดโอเลอิก เป็นองค์ประกอบสูงถึง 40-50% รองลงมา คือ กรดลิโนเลอิก มีประมาณ 20-42% เป็นต้น

นอกจากนี้ Rodrigues and Oliveira (2010) ได้ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้จาก รำข้าว ด้วยกระบวนการสกัดที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าน้ำมันรำข้าวมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ แสดงดังตาราง 2.2

ตาราง 2.2 องค์ประกอบของน้ำมันรำข้าวที่สกัดจากรำข้าวด้วยตัวทำละลายเอทานอล

กรดไขมัน	จำนวนคาร์บอน: จำนวนพันธะคู่	มวลโมเลกุล (g/mol)	มวล (%)	โมล (%)
กรดไมริสติก (miristic)	C14:0	228.38	1.44	1.74
กรดปาล์มมิติก (palmitic)	C16:0	256.43	17.73	19.14
กรดสเตียริก (stearic)	C18:0	284.49	2.30	2.23
กรดโอเลอิก (oleic)	C18:1	282.47	35.20	34.51
กรดลิโนเลอิก (linoleic)	C18:2	280.45	37.98	37.50
กรดลิโนเลนิก (linolenic)	C18:3	278.44	2.62	2.61
กรดอะราซิดิก (arachidic)	C20:0	312.54	0.57	0.51
กรดกาโดเลอิก (gadoleic)	C20:1	310.52	0.34	0.30
กรดเบฮินิก (behenic)	C22:0	340.59	0.72	0.59
กรดอีรูซิก (erucic)	C22:1	338.58	0.35	0.28
กรดโดโคซาไดอีนอิก (docosadienoic)	C22:2	336.56	0.33	0.27
กรดลิคโนเซอร์ริก (lignoceric)	C24:0	368.65	0.42	0.32

ปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ขึ้นอยู่กับปริมาณของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่เกิดขึ้นก่อนการ stabilize รำข้าว ซึ่งองค์ประกอบของน้ำมันรำข้าวดิบ (Nicolosi *et al.*, 1994) แสดงดังตาราง 2.3

ตาราง 2.3 องค์ประกอบของน้ำมันรำข้าวดิบ

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
ไตรกลีเซอไรด์	80
ฟอสโฟลิพิด	2
ไกลโคลิพิด	1
สเตอรอล	5
แวกซ์	2-5

ที่มา : Nicolosi *et al.* (1994)

นอกจากนี้ น้ำมันรำข้าวดิบ ยังประกอบด้วย fatty acid steryl ester และ wax ester โดย Gunawan *et al.* (2006) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์ (purification) และการหาเอกลักษณ์ (identification) ของ fatty acid steryl ester (FASE) และ wax ester (WE) ของน้ำมันรำข้าวดิบ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง อาหารเสริม และยารักษาโรค

ส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของน้ำมันรำข้าว นอกจากจะอุดมไปด้วยวิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลแล้วยังพบแกมมา-โอริซานอลซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญอีกด้วย โดยความเข้มข้นของวิตามินอีรวมและแกมมา-โอริซานอลของน้ำมันรำข้าวมีค่าเท่ากับ 0.10-0.14% และ 0.9-2.9% ตามลำดับ (Lerma-García, 2009) นอกจากนี้ Zullaikah *et al.* (2009) ทำการแยกโอริซานอลจากน้ำมันรำข้าวดิบโดยใช้กระบวนการทำให้เกิดผลึก (crystallization) 2 ขั้นตอนซึ่งในกระบวนการตกผลึกครั้งแรกที่อุณหภูมิ -60°C พบว่าโอริซานอลอยู่ในส่วนที่ละลายน้ำได้ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันอิสระ โมโนกลีเซอรอล (monoglycerol) สควออริน โทคอลและไฟโตสเตอรอลรวมอยู่ด้วย ขณะที่ส่วนที่เป็นของแข็งซึ่งไม่ละลายน้ำจะประกอบด้วยไตรกลีเซอรอล และสเตอริลเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่แยกโอริซานอลในกระบวนการตกผลึกครั้งแรกไปตกผลึกครั้งที่ 2 ที่อุณหภูมิห้อง ($20.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมเฮกเซนลงไปพร้อมกับเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลาอีก 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าในสภาวะการแยกโอริซานอลที่เหมาะสม โอริซานอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ และค่า recovery เท่ากับ 93-95% และ 59% ตามลำดับ

สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของน้ำมันรำข้าว แสดงดังตาราง 2.4 และจุดหลอมเหลวของกรดไขมันชนิดต่างๆ แสดงดังตาราง 2.5

ตาราง 2.4 สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของน้ำมันรำข้าว

สมบัติทางเคมีและทางกายภาพ	น้ำมันรำข้าว
ความถ่วงจำเพาะ (25°C)	0.910-0.921
ค่าการหักเหของแสง (25°C)	1.470-1.473
ค่าไอโอดีน (wijs method) (mg/g)	99-108
ค่าซาฟอนิฟิเคชัน (mg/g)	181-189
สารที่ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยด่าง (%)	3-5
ไต่เตอร์ ($^{\circ}\text{C}$)	24-28
ค่าความเป็นกรด (mg/g)	4-120

ที่มา: นิธิยา รัตนานนท์, 2548

ตาราง 2.5 จุดหลอมเหลวของกรดไขมันชนิดต่างๆ

ชนิดกรดไขมัน	จุดหลอมเหลว (°C)
กรดไขมันชนิดอิ่มตัว	
กรดบิวทีริก	-7.9
กรดคาโปรอิก	-3.4
กรดคาไพโรอิก	16.7
กรดคาพริก	31.3-31.6
กรดลอริก	44.0-44.2
กรดไมริสติค	53.9-54.4
กรดปาล์มมิติก	62.7-63.1
กรดสเตียริก	69.6
กรดอะราคิติก	75.4-76.5
กรดบีฮีนิก	80.0-81.5
กรดลิโนซีริก	84.2-86.0
กรดซีโรติก	87.7-88.5
กรดวาเลอริก	-34.5
กรดอีแนนโทอิก	-7.5
กรดพิลาร์โกนิก	-12.4
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว	
กรดปาล์มมิโตเลอิก	0-0.5
กรดโอเลอิก	10.5-16.0
กรดลิโนเลอิก	-5.0
แอลฟา-กรดลิโนเลนิก	-11.0
กรดอะราคิโดนิก	-49.5

ที่มา: นิธิยา รัตนานนท์, 2548

2.2.2 การสกัดน้ำมันรำข้าว

รำข้าวสกลที่ได้จากการสีข้าว จะมีระดับของกรดไขมันอิสระเริ่มต้นที่ 1.5-2.0% และรำข้าวที่ผ่านการนึ่งจะมีกรดไขมันอิสระ เท่ากับ 2-5% ระดับของกรดไขมันอิสระในรำข้าวสำหรับการสกัดน้ำมันนั้นควร จะต่ำ เพื่อง่ายต่อการสกัด และเพื่อให้มีประสิทธิภาพของการรีไฟน์ของน้ำมันดีตามปริมาณที่ต้องการ กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าว แสดงดังรูป 2.2



รูป 2.2 กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าว
ที่มา : Robert *et al.* (1994)

การสกัดน้ำมันจากรำข้าว ทำได้โดยใช้เครื่องอัดแบบไฮดรอลิก (hydraulic press) ซึ่งจะบีบคั้นน้ำมันออกมา หรือใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย หรือใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน สำหรับการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยใช้เครื่องอัดแบบไฮดรอลิกนั้น จะได้น้ำมันปริมาณจำกัดประมาณ 50% ซึ่งน้ำมันรำข้าวที่ผ่านการบีบคั้นโดยทั่วไปจะต้องผ่านการกรองก่อนทำการรีไฟน์น้ำมันต่อไปด้วยปริมาณ ที่แตกต่างกัน (Nicolosi *et al.*, 1994)

สำหรับการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก และใช้สกัดน้ำมันออกจากเมล็ดพืชที่มีปริมาณน้ำมันต่ำ หรือสกัดน้ำมันออกจากกากที่เหลือจากการบีบด้วยเครื่องอัดตัวทำละลายที่ใช้จะต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ได้แก่ เฮกเซน คาร์บอนไดซัลไฟด์ และไดเอทิลอีเทอร์ เป็นต้น ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุด คือ เฮกเซน (นิธิยา รัตนานนท์, 2548)

รำข้าวสำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลาย ควรจะนึ่งเพื่อทำลาย หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส และเพื่อป้องกันการทำให้เป็นเม็ดหรือแผ่นบาง ๆ ซึ่งจะทำให้ตัวทำละลายไหลซึมผ่านเมล็ดรำข้าวที่

บดละเอียดได้ดีกว่า นอกจากนี้ยังจะทำให้ใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นลงอีกด้วย สำหรับรำข้าวที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ไพลีสโดยการคั้นผ่านเกลียวอัด สามารถเก็บไว้โดยปราศจากการสลายตัวของไขมัน ก่อนที่จะทำการสกัดน้ำมันต่อไปได้ (Nicolosi *et al.*, 1994) วิธีการสกัดทำได้โดย ให้ตัวทำละลายไหลซึมผ่านเมล็ดที่บดละเอียด น้ำมันที่อยู่ในเมล็ดจะละลายออกมาพร้อมกับตัวทำละลาย เมื่อน้ำมันละลายออกมาหมดแล้ว นำไปกลั่นแยกเอาตัวทำละลายออก สารละลายของน้ำมันในตัวทำละลายบางที่เรียกว่า miscella ซึ่งประกอบด้วยตัวทำละลาย น้ำหรือความชื้น น้ำมัน และกาก ซึ่งกากจะแยกออกจากน้ำมันโดยการกรอง ส่วนเฮกเซนและน้ำแยกออกโดยการระเหย (evaporation) ที่ความดันต่ำ และได้น้ำมันออกมาประมาณ 98% และมีความชื้นเหลืออยู่น้อยกว่า 0.15% โดยน้ำหนัก ขั้นตอนการระเหยเอาตัวทำละลายออกต้องใช้ความร้อนอุณหภูมิต่ำที่สุด เพราะหากใช้อุณหภูมิสูงเกินไป จะเร่งให้เกิดออกซิเดชัน ทำลายสารต้านออกซิเดชันและทำให้น้ำมันที่ได้มีสีเข้มขึ้น การใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายจะได้ปริมาณน้ำมันสูงกว่าวิธีอื่น เมล็ดพืชบางชนิดใช้วิธีการบีบร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย อย่างไรก็ตาม การสกัดด้วยตัวทำละลายจะเสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีอื่นๆ เพราะตัวทำละลายมีราคาแพง ถึงแม้จะกลั่นแยกเอาตัวทำละลายกลับมาใช้ได้อีกก็ตาม แต่ก็มีบางส่วนที่ระเหยหายไปด้วย น้ำมันที่ได้ออกมาเป็นน้ำมันที่ไม่บริสุทธิ์ เรียกว่า น้ำมันดิบ มักมีสารประกอบต่างๆอยู่มากมาย ต้องนำไปผ่านกระบวนการทำให้น้ำมันบริสุทธิ์ต่อไป (นิธิยา รัตนานนท์, 2548)

ไขมันและน้ำมันที่สกัดออกมาด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลาย จะมีสารประกอบชนิดอื่นละลายเจือปนออกมาด้วย ซึ่งสารต่างๆเหล่านี้ มีผลต่อ สี กลิ่น และรสชาติ ของไขมันและน้ำมัน สารเจือปนบางชนิดมีสมบัติคล้ายไขมัน ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด สารประกอบเชิงซ้อนของไขมัน และโปรตีน (fat-protein complex) คาร์โบไฮเดรต กรดไขมันอิสระ สารสีต่างๆ ไซหรือ แวกซ์ กลิเซอไรด์ที่มีจุดหลอมเหลวสูง และสารที่ทำให้กลิ่นต่างๆ เช่น แอลดีไฮด์ คีโตน และไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นสารต่างๆ เหล่านี้จำเป็นต้องกำจัดออกให้หมดโดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การกำจัดแว็กซ์ (dewaxing)

การกำจัดแว็กซ์ของน้ำมันรำข้าว ขณะที่น้ำมันรำข้าวอยู่ในรูป miscella ซึ่งก็คือ สารละลายของน้ำมันอยู่ในตัวทำละลาย จะเป็นวิธีการกำจัดแว็กซ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยวิธีการกำจัดแว็กซ์ สามารถทำได้ โดยการทำให้ miscella เย็นตัวลงที่อุณหภูมิประมาณ 15°C และปล่อยให้แว็กซ์แข็งตัว จากนั้นแยกแว็กซ์ออกโดยการกรอง หรือ การปั่นเหวี่ยง (centrifugation) (Nicolosi *et al.*, 1994)

2. การกำจัดกัม (degumming)

กัม (gums) ประกอบด้วย ฟอสโฟลิพิด และ โพลาร์ลิพิดอื่นๆ ซึ่งละลายได้ในน้ำ กัมจะมีอยู่ในน้ำมันประมาณ 0.03-3.0%

วิธีการกำจัดกัมของน้ำมันรำข้าวโดยทั่วไป เป็นการล้างน้ำมันด้วยน้ำ หรือ การใช้สารสำหรับการกำจัดกัมเช่น กรดฟอสฟอริก หรือ กรดซิตริก (Nicolosi *et al.*, 1994) สำหรับการกำจัดกัม โดยการล้างน้ำมัน

ด้วยน้ำ ซึ่งมีทั้งแบบเป็นชุด (batch process) และ แบบต่อเนื่อง (continuous process) สำหรับแบบเป็นชุดทำได้โดยการเติมน้ำอ่อน หรือ ใส่น้ำ ลงในน้ำมันประมาณ 1-2% ขึ้นอยู่กับปริมาณของฟอสฟอไรด์ที่อุณหภูมิ 70°C ผสมให้เข้ากันนาน 30-60 นาที แล้วปล่อยทิ้งไว้ สารประกอบฟอสโฟลิพิดที่ละลายได้ในน้ำ แต่ไม่ละลายในน้ำมัน จะแยกตัวออกไปละลายอยู่ในน้ำ หลังจากนั้นแยกออกจากน้ำมันได้โดยวิธีการกรอง หรือใช้เครื่องเหวี่ยง หรือ ปล่อยทิ้งไว้ สำหรับแบบต่อเนื่อง น้ำมันจะถูกทำให้ร้อนถึงอุณหภูมิ 70-80°C แล้วจึงเติมน้ำลงไปให้ผสมกับน้ำมันนานประมาณ 15-30 นาที แล้วจึงส่งต่อไปยังเครื่องเหวี่ยง ประสิทธิภาพของการกำจัดกัมขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ปล่อยให้ น้ำละลายเอาฟอสฟอไรด์ออกมา กระบวนการกำจัดกัมไม่ได้ล้างน้ำเพียงครั้งเดียวอาจล้าง 2 หรือ 3 ครั้งก็ได้ นอกจากนี้อาจเติมกรดฟอสฟอริก หรือ กรดซิตริก ลงไปในน้ำที่ใช้ล้างจะช่วยลดปริมาณเหล็กให้น้อยลง โดยกรดจะช่วยเปลี่ยนเหล็กให้อยู่ในรูปที่แยกออกได้ง่าย การใช้น้ำเพียงอย่างเดียว จะกำจัดเหล็กได้ประมาณ 14-64% หากเติมกรดฟอสฟอริกลงไปในน้ำล้างด้วยจะสามารถกำจัดเหล็กออกได้มากถึง 93% การกำจัดกัมที่ดีต้องควบคุมปริมาณของน้ำ กรด อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ล้าง เพื่อแยกกัมออกให้มากที่สุด มีการสูญเสียน้ำมันน้อยที่สุด และน้ำมันจะต้องสัมผัสกับอากาศน้อยที่สุด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดออกซิเดชัน และหากใช้น้ำมากเกินไประหว่างการล้างก็จะทำให้เกิดไฮโดรไลซิสได้ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2548)

Indira *et al.* (2000) ได้ศึกษาการกำจัดกัม น้ำมันรำข้าวที่มีฟอสโฟลิพิดเป็นองค์ประกอบ 1.8% โดยใช้น้ำ ซึ่งสภาวะของการกำจัดกัมที่ได้ทำการศึกษา ได้แก่ ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ เวลาและความเร็วในการกวน โดยประสิทธิภาพของการกำจัดกัม จะวัดค่าของกัมแห้ง ฟอสโฟลิพิด และอะซีไตนที่ไม่ละลายในกัม ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ผลของปริมาณน้ำที่ถูกเติมลงไป และอุณหภูมิ จะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการกำจัดกัม โดยสภาวะที่เหมาะสม ที่ทำให้ได้ปริมาณฟอสโฟลิพิดในกัมสูงสุด (> 17.5%) คือ อุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 68-73°C และปริมาณน้ำที่ถูกเติมลงไป เท่ากับ 3.9-4.0%

3. การทำให้มีสมบัติเป็นกลาง (neutralization)

การทำให้มีสมบัติเป็นกลาง หรือการรีไฟน์น้ำมันรำข้าวที่มีกรดไขมันอิสระปนอยู่เพียงเล็กน้อย โดยทั่วไปจะใช้ caustic soda (NaOH) สำหรับการทำให้มีสมบัติเป็นกลาง ปฏิกิริยาของกรดไขมันอิสระ กับ สารละลายด่าง จะได้สบู่เกิดขึ้น ซึ่งสบู่ไม่ละลายในน้ำมัน และจะถูกกำจัดออกโดยการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน การใช้ด่างมากเกินไปเล็กน้อย ประมาณ 0.5% ที่เกินจาก 18% ของสารละลายด่าง จะทำให้การทำให้มีสมบัติเป็นกลาง ของทั้งกรดไขมันอิสระ และสารที่ทำการกำจัดกัมที่มีสมบัติเป็นกรด เกิด Neutralization อย่างสมบูรณ์ แต่ถ้าใช้ด่างมากเกินไป จะทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสที่โมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล ทำให้มีกรดไขมันอิสระถูกแยกออกมาอยู่ในรูปสบู่มากขึ้น ทำให้ได้ปริมาณน้ำมันบริสุทธิ์ (refined oil) ลดน้อยลง โดยอุณหภูมิของน้ำมันควรน้อยกว่า 65°C สำหรับน้ำมันรำข้าว เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จะเกิดสีเข้มขึ้นอย่างมาก (Nicolosi *et al.*, 1994)

4. การฟอกสี (bleaching)

เป็นกระบวนการที่ใช้แยกเอาสารประกอบที่เป็นสารสีต่างๆ ลิพิดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และองค์ประกอบที่มีขี้จากน้ำมัน การฟอกสีทำได้ง่ายโดยใช้ acid-activated bleaching clays เติมน้ำมัน 1-3% จากนั้นของผสมจะถูกกวน และทำให้ร้อนภายใต้สุญญากาศ ซึ่ง bleaching agent จะดูดซับ (adsorb) พวกลีพิดสีไว้ แล้วกรองเพื่อแยกเอา acid-activated bleaching clays ออก (Nicolosi *et al.*, 1994)

การทำ vacuum bleaching สามารถทำได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 170-190°C และจะช่วยลดการเกิดออกซิเดชันได้ แต่จำเป็นต้องใช้ acid-activated clay ปริมาณมาก และกรดไขมัน จะเกิด positional และ geometric isomers มากขึ้นด้วย เช่น มีกรดไขมันชนิด ทรานส์-ไอโซเมอร์ (trans-fatty acid) เกิดขึ้น (นิธิยา รัตนานนท์, 2548)

น้ำมันที่จะนำมาฟอกสีจะต้องมีฟอสฟอไรด์ และสบู่เหลืออยู่น้อยที่สุด ควรมีฟอสฟอรัสประมาณ 5-10 mg/kg และมีสบู่ 10-30 mg/kg เพราะสารประกอบทั้ง 2 ชนิด นี้จะดูดซับ bleaching agent ทำให้ต้องใช้ bleaching agent เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น การกรองเอา bleaching agent ออก ใช้เวลานานขึ้น และน้ำมันที่ได้มีปริมาณลดน้อยลงด้วย

5. การกำจัดกลิ่น (deodorization)

การกำจัดกลิ่น เป็นกระบวนการกำจัดสารที่ให้กลิ่น และรสชาติออกจากไขมันและน้ำมัน สารประกอบที่ถูกกำจัดออกไปจะเป็นพวกที่ระเหยได้ เช่น กรดไขมันอิสระ แอลดีไฮด์ คีโตน เปอร้ออกไซด์ รวมทั้งพวกสเตอรอล แวกซ์ โมโนกลีเซอไรด์ สารสีบางชนิด และสารประกอบที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน สารที่ให้กลิ่นเหล่านี้ จะมีอยู่ในน้ำมันประมาณ 0.2-0.5% น้ำมันที่ผ่านกระบวนการนี้แล้วไม่ควรมีส่วนเหลืออยู่เกิน 1% ของที่มีอยู่เดิม กระบวนการนี้ยังช่วยกำจัดสารพิษตกค้างจากยาปราบศัตรูพืช และสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) ที่อาจปนเปื้อนออกไปได้ด้วย (นิธิยา รัตนานนท์, 2548)

วิธีการกำจัดสารที่ให้กลิ่นในน้ำมันรำข้าว ทำได้โดยการเป่าไอน้ำร้อนลงไปบนน้ำมันร้อน ที่อุณหภูมิประมาณ 220-250°C ในภาชนะปิด ภายใต้สุญญากาศที่มีความดัน 4-8 mmHg โดยใช้ไอน้ำร้อน 3-5% อุณหภูมิที่ใช้ต้องไม่สูงเกินไป เพราะจะทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นสารพอลิเมอร์ได้ (Nicolosi *et al.*, 1994)

ภายหลังการกำจัดกลิ่น การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีนั้นทำโดยการวัดค่าเปอร์ออกไซด์ ซึ่งน้ำมันที่ผ่านกระบวนการกำจัดกลิ่นแล้วจะต้องมีค่าเปอร์ออกไซด์ เป็นศูนย์ มีกรดไขมันอิสระเหลืออยู่ประมาณ 0.02-0.04% และมีโมโนกลีเซอไรด์เหลืออยู่ประมาณ 0.3-0.5% ปริมาณวิตามินอีจะลดลงประมาณ 1 ใน 3 ของที่มีอยู่เดิม การกำจัดกลิ่นที่อุณหภูมิสูงเกินไป อาจทำให้เกิดไอโซเมอร์ชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวระหว่าง cis-trans configuration ในโมเลกุลของกรดลิโนเลอิก และกรดลิโนเลนิก (นิธิยา รัตนานนท์,

2548) นอกจากนี้ ยังพบว่าในระหว่างขั้นตอนการกำจัดกลิ่นมีการสูญเสียโทโคเฟอรอลในปริมาณระดับปานกลาง (Rossi et al., 2007) หรือ 25-35% (Verhé et al., 2006)

6. การกำจัดไขมัน (winterization)

การกำจัดไขมัน เป็นกระบวนการกำจัดสารพวกไตรกลีเซอไรด์ของกรดไขมันอิ่มตัวที่มีจุดหลอมเหลวสูง โดยทำให้ไขมันและน้ำมันมีอุณหภูมิลดต่ำลงอย่างช้าๆ จนถึงอุณหภูมิต่ำกว่า 5°C จากนั้นสารพวกไตรกลีเซอไรด์ของกรดไขมันอิ่มตัวก็จะเกิดการแข็งตัวแล้วตกผลึกแยกออกมา ทำการแยกผลึกดังกล่าวโดยการกรอง ทำให้ได้ไตรเอซิลกลีเซอรอลของกรดสเตียริก (stearine) (ส่วนที่มีจุดหลอมเหลวสูง) และน้ำมัน (ส่วนที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ) น้ำมันที่ได้ภายหลังจากการทำ winterization จะเป็นน้ำมันที่มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมาก มีค่าไอโอดีนสูง จึงมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่มีโอกาสเกิด oxidative rancidity ได้ง่าย หากไม่มีการเติมสารต้านออกซิเดชันอย่างเพียงพอ (Nicolosi et al., 1994) ขั้นตอนการทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ แสดงดังรูป 2.3



รูป 2.3 ขั้นตอนการทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์

ที่มา : Nicolosi et al. (1994)

โดยทั่วไป น้ำมันจะประกอบด้วยสารที่เกิดปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชัน หรือการไฮโดรไลซิสด้วยด่างไม่ได้ ประมาณ 0.5-2.0% แต่ในน้ำมันรำข้าว จะมีสารที่เกิดปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชันไม่ได้ 3-7% (Rossell *et al.*, 1999) หรือ 3-5% (Sarmiento *et al.*, 2006)

นอกจากนี้ในน้ำมันรำข้าว ยังพบโอริซานอล ในปริมาณ 0.96-2.9% โดยโอริซานอล คือ เอสเทอร์ของกรดเฟอรูลิก และ ไตรเทอพีนอยด์ แอลกอฮอล์ และพบในส่วนของสเตอรอล ที่ถูกกำจัดออกก่อนในช่วงการทำรีไฟน์ของน้ำมัน ซึ่งโอริซานอลจะมีคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

น้ำมันรำข้าวที่ผ่านกระบวนการรีไฟน์แล้วสามารถพบสเตอรอล โอริซานอล และโทโคไตรอีนอลมากกว่าน้ำมันพืชที่ผ่านการทำรีไฟน์แล้วชนิดอื่น (Ausman *et al.*, 2005) ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันรำข้าวที่ผ่านการทำรีไฟน์ ดังตาราง 2.6

ตาราง 2.6 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันรำข้าวที่ผ่านการทำรีไฟน์

กรดไขมัน	ปริมาณในน้ำมันรำข้าวที่ผ่านการทำรีไฟน์ (%)
กรดไขมันอิ่มตัว	19.7
กรดไมริสติก	0.7
กรดปาล์มมิติก	16.9
กรดสเตียริก	11.6
กรดอะราซิก	0
กรดไขมันไม่อิ่มตัว	39.3
กรดปาล์มมิโตเลอิก	0.2
กรดโอเลอิก	39.1
กรดลิโนเลอิก	33.4
กรดลิโนเลนิก	1.6
สเตอรอล	2.58±0.36

ที่มา : Ausman *et al.* (2005)

กระบวนการต่างๆ ที่ทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ สามารถส่งผลให้เกิดการสูญเสียของสารที่ซาฟอนิฟิเคชันไม่ได้ ซึ่งมีค่าสูงถึง 50% สำหรับการสูญเสียของสารที่ซาฟอนิฟิเคชันไม่ได้ จาก น้ำมันรำข้าวดิบที่ผ่านการทำรีไฟน์ การฟอกสีให้จางลง การกำจัดกลิ่น และ winterization แสดงดังตาราง 2.7

ตาราง 2.7 ปริมาณสารที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของน้ำมันรำข้าว

ประเภทน้ำมัน	ปริมาณสารที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ (%)
น้ำมันรำข้าวดิบ	
น้ำมันรำข้าวดิบที่ผ่านการรีไฟน์ และการฟอกสีให้จางลง	3.98
น้ำมันรำข้าวดิบที่ผ่านการรีไฟน์ การฟอกสีให้จางลง และ	2.85
การกำจัดกลิ่น	2.51
น้ำมันรำข้าวดิบที่ผ่านการรีไฟน์ การฟอกสีให้จางลง	1.99
การกำจัดกลิ่น และ winterization	

ที่มา : Nicolosi *et al.* (1994)

นอกจากนี้ ในระหว่างกระบวนการต่างๆ ที่ทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ จะส่งผลกระทบต่อสูญเสียโอรีซานอล และโทโคไตรอีนอล สูงถึง 90% โดยน้ำมันรำข้าวดิบมีปริมาณโอรีซานอลเท่ากับ 12,221 mg/kg เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า 4 ปีห่อ มีปริมาณโอรีซานอลเท่ากับ 1000, 2000, 720 และ 200 mg/kg และมีการสูญเสียโทโคไตรอีนอล แสดงดังตาราง 2.8

ตาราง 2.8 ปริมาณโทโคไตรอีนอลของน้ำมันรำข้าว

ประเภทน้ำมัน	ปริมาณโทโคไตรอีนอล (mg/kg)
น้ำมันรำข้าวดิบ	713
น้ำมันรำข้าวดิบที่ผ่านการรีไฟน์ และการฟอกสีให้จางลง	683
น้ำมันรำข้าวดิบที่ผ่านการรีไฟน์ การฟอกสีให้จางลง และ	87
การกำจัดกลิ่น	
น้ำมันรำข้าวดิบที่ผ่านการรีไฟน์ การฟอกสีให้จางลง	70
การกำจัดกลิ่น และ winterization	

ที่มา : Nicolosi *et al.* (1994)

วราพร พงศ์ธรกุลพานิช (2543) ได้ศึกษาเรื่องการวิเคราะห์เอกลักษณ์ และปริมาณโทโคเฟอรอล และโอรีซานอลในกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว โดยทำการทดลองหาปริมาณของสารที่เหลืออยู่ในแต่ละขั้นตอนการผลิตน้ำมันรำข้าว ผลการศึกษาแสดงดังตาราง 2.9

ตาราง 2.9 การเปรียบเทียบปริมาณของแอลฟา- และแกมมา-โทโคเฟอรอล และโอรีซานอลที่
เหลืออยู่ในแต่ละขั้นตอนการผลิตน้ำมันรำข้าว

ประเภทของ น้ำมันรำข้าว	แอลฟา-โทโค- เฟอรอล เปรียบเทียบ กับ น้ำมันรำข้าวดิบ (%)	แกมมา-โทโค- เฟอรอล เปรียบเทียบ กับ น้ำมันรำข้าวดิบ (%)	โอรีซานอล เปรียบเทียบกับ น้ำมันรำข้าวดิบ (%)
น้ำมันรำข้าวดิบ	100	100	100
น้ำมันที่ผ่านการ กำจัดกัมและการทำให้ เป็นกลาง	35.5	42.6	16.7
น้ำมันที่ผ่านการล้างด้วย น้ำ	37.4	43.1	14.3
น้ำมันที่ผ่านการอบแห้ง	34.6	34.4	12.4
น้ำมันที่ผ่านการฟอกสี	36.4	46.6	10.1
น้ำมันที่ผ่านการกำจัด ไขมัน	35.1	41.9	11.1
น้ำมันบริสุทธิ์	9.7	16.4	2.3
น้ำมันที่ผ่านการกำจัด กลิ่น	2001	3414	0.3
สูญ	447	-	310

ที่มา : วราพร พงศ์ธรกุลพานิช (2543)

จากตาราง 2.9 สรุปได้ดังนี้ (วราพร พงศ์ธรกุลพานิช, 2543)

- ในแต่ละขั้นตอนการผลิตพบว่า ปริมาณโทโคเฟอรอล และ โอรีซานอลลดลงตามลำดับ
- ในช่วงขั้นตอนการกำจัดกัม และการทำให้เป็นกลาง และขั้นตอนการกำจัดกลิ่น พบว่า โทโคเฟอรอล และ โอรีซานอลลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียโทโคเฟอรอล และ โอรีซานอล
- ในช่วงขั้นตอนการกำจัดกัม และการทำให้เป็นกลาง เกิดการสูญเสียโอรีซานอล และ โทโคเฟอรอลอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากหมุ่ฟีนอลของโอรีซานอล และ โทโคเฟอรอล เกิดการแตกตัว (สูญเสียโปรตอน) จึงมีความเป็นขั้วเพิ่มขึ้น และสามารถละลายน้ำได้มากขึ้น ดังนั้นจึงพบโอรีซานอล และ โทโคเฟอรอลปริมาณมากในส่วนของสูญ เมื่อเปรียบเทียบการสูญเสีย

โอริซานอล และโทโคเฟอรอล พบว่า โอริซานอลมีอัตราการสูญเสียมากกว่า สังกัดจาก โอริซานอลเหลือเพียง 16.7% ในขณะที่แอลฟา-โทโคเฟอรอล และแกมมาโทโคเฟอรอลเหลือ 35.5% และ 42.6% ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากโอริซานอลแตกตัวที่ pH ต่ำ จึงมีความเป็นขี้สูง กว่าโทโคเฟอรอลและสามารถละลายน้ำได้มากกว่า

- ขั้นตอนการล้างน้ำ การอบแห้ง การฟอกสี และการกำจัดไขมัน ซึ่งมีการสูญเสียโทโคเฟอรอล และโอริซานอลในอัตราต่ำ
- สำหรับขั้นตอนการอบแห้ง ถึงแม้ว่าจะมีการให้ความร้อนแก่น้ำมันซึ่งน่าจะทำให้โทโคเฟอรอล เกิดการสูญเสียเนื่องจาก thermal oxidative มาก แต่ในความเป็นจริงของกระบวนการอบแห้ง ได้ควบคุมสภาวะการอบให้เป็นแบบสูญญากาศ ซึ่งทำให้ปริมาณออกซิเจนในระบบลดลงมาก ดังนั้นการสลายของโทโคเฟอรอลและโอริซานอลจึงเกิดขึ้นน้อย
- ในขั้นตอนการกำจัดสี การสูญเสียโทโคเฟอรอล และโอริซานอล เกิดจากการดูดซับ (adsorption) โดยสารดูดซับที่ใช้
- สำหรับขั้นตอนการกำจัดไขมัน ซึ่งเกิดการสูญเสียโทโคเฟอรอล และโอริซานอลเช่นเดียวกัน กลไกการสูญเสียเกิดจากโทโคเฟอรอล และโอริซานอลเกิดการตกผลึกไปพร้อมกับโมเลกุล ไขมัน แต่โอริซานอลซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าโทโคเฟอรอลจะเกิดการตกผลึกมากกว่า
- ในช่วงขั้นตอนการกำจัดกลิ่น ทำให้เกิดการสูญเสียโทโคเฟอรอลอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงค้นพบ โทโคเฟอรอลในปริมาณมากในดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลของโทโคเฟ อรอลเกิดการระเหยไปพร้อมๆกับการกำจัดกรดไขมันอิสระ ในขณะที่โมเลกุลของโอริซานอล ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า และระเหยได้น้อยกว่า จึงไม่ค่อยพบโอริซานอลในดิสทิลเลตของน้ำมันรำ ข้าว

Hoed *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลกระทบของกระบวนการรีไฟน์ทางเคมีต่อองค์ประกอบหลักและ องค์ประกอบย่อยของน้ำมันรำข้าว พบว่าน้ำมันรำข้าวที่ผ่านกระบวนการรีไฟน์ คือการทำให้มีสมบัติ เป็นกลาง (neutralization) การฟอกสี (bleaching) การกำจัดแว็กซ์ (dewaxing) และการกำจัดกลิ่น (deodorization) พบว่ามีองค์ประกอบของสารที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของน้ำมันรำข้าวของกระบวนการรีไฟน์ ทุกขั้นตอนแสดงดังตาราง 2.10

ตาราง 2.10 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารที่ซาฟอนิไฟน์ไม่ได้ช่วงกระบวนการรีไฟน์ทางเคมีของน้ำมันรำข้าว

สาร (g/100g)	น้ำมัน รำข้าวดิบ (crude)	น้ำมันที่ผ่าน กระบวนการ ทำให้มีสมบัติ เป็นกลาง (neutralized oil)	น้ำมันที่ผ่าน กระบวนการ ฟอกสี (bleached oil)	น้ำมันที่ผ่าน กระบวนการ กำจัดแว็กซ์ (dewaxed oil)	น้ำมันที่ผ่าน กระบวนการ กำจัดกลิ่น (deodorized oil)
สารที่ซาฟอนิไฟน์ ไม่ได้	5.4	4.2	3.8	3.6	2.7
สควอลีน (squalene)	0.028	0.022	0.021	0.019	0.008
สเตอรอลรวม	2.94	2.15	1.92	1.91	1.83
โทโคเฟอรอลและ โทโคไตรอีนอลรวม	0.078	0.080	0.078	0.078	0.062
รวม	2.3	2.0	1.8	1.6	0.8

ที่มา : Hoed *et al.* (2006)

นอกจากนี้ Hoed *et al.* (2006) ยังพบว่ากระบวนการรีไฟน์ทางเคมีของน้ำมันรำข้าวทำให้ปริมาณของแกมมา-และเดลตา-โทโคไตรอีนอลลดลงขณะที่แอลฟา-โทโคเฟอรอลและแอลฟา-โทโคไตรอีนอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นและแกมมา-โทโคเฟอรอลมีปริมาณคงที่ แสดงองค์ประกอบ (%) ของโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอีนอลในช่วงกระบวนการรีไฟน์ทางเคมีของน้ำมันรำข้าวดังตาราง 2.11

ตาราง 2.11 องค์ประกอบ (%) ของโทโคเฟอร์รอลและโทโคไตรอีนอลในช่วงกระบวนการรีไฟน์ทางเคมีของน้ำมันรำข้าว

โทคอล (%)	น้ำมัน รำข้าวดิบ (crude)	น้ำมันที่ผ่าน กระบวนการ การทำให้มี สมบัติเป็น กลาง (neutralized oil)	น้ำมันที่ผ่าน กระบวนการ ฟอกสี (bleached oil)	น้ำมันที่ผ่าน กระบวนการ การ กำจัดแว็กซ์ (dewaxed oil)	น้ำมันที่ผ่าน กระบวนการ การกำจัดกลิ่น (deodorized oil)
แอลฟา-โทโคเฟอร์รอล	11.7	12.9	16.6	17.0	17.2
แกมมา-โทโคเฟอร์รอล	15.6	15.5	15.1	15.2	15.2
แอลฟา-โทโคไตรอีนอล	3.7	4.2	4.4	4.5	5.3
แกมมา-โทโคไตรอีนอล	66.7	65.4	62.6	62.5	61.8
เดลตา-โทโคไตรอีนอล	2.2	2.0	1.3	0.9	0.5

ที่มา : Hoed *et al.* (2006)

Rodrigues and Oliveira (2010) ศึกษาการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยศึกษาผลของกระบวนการการสกัดน้ำมันรำข้าว solvent hydration และอุณหภูมิการสกัด ด้วยวิธี response surface methodology เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ละลายได้ และแกมมา-โอริซานอล และลดปริมาณกรดไขมันอิสระที่สกัดออกมาได้ จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำมีผลกระทบอย่างมากต่อสภาพการละลายได้ของน้ำมันในเอทานอล สำหรับการสกัดกรดไขมันอิสระสามารถแก้ไขโดยการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของตัวทำละลายทำให้ปริมาณของกรดไขมันอิสระที่สกัดได้น้อยลงหรือมีการสูญเสียจากการสกัดน้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของแกมมา-โอริซานอลที่สกัดได้ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิเมื่อระดับของน้ำในเอทานอลต่ำ ซึ่งผลกระทบของอุณหภูมิสามารถลดลงได้โดยการเพิ่มปริมาณน้ำในเอทานอลที่ใช้ในการสกัด

2.2.3 ประโยชน์ของรำข้าวและน้ำมันรำข้าว

รำข้าวถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมายในอาหารเพื่อสุขภาพ เพราะในรำข้าวมีใยอาหารสูง และไขมันอิ่มตัวต่ำ ซึ่งรำข้าวจะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับผู้ที่ไม่ได้ดื่มน้ำที่เพียงพอซึ่งมีงานวิจัยพบว่า การบริโภครำข้าวมีประโยชน์ในการลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

น้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการลดคอเลสเตอรอล โดยน้ำมันรำข้าวมีสารที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชันได้ในปริมาณสูง ซึ่งประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระคือ วิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอีนอล 100-1000 mg/kg และ แกมมา-โอริซานอล 0.9-2.9% โดยแกมมา-โอริซานอลเป็นสารประกอบเชิงซ้อนชนิดเอสเทอร์ของ triterpene alcohols และ phytosterols กับ ferulic acid (Rodrigues and Oliveira, 2010)

น้ำมันรำข้าวลดความเสี่ยงของโรคหัวใจ และหลอดเลือด เพราะรำข้าวมีกรดไขมันอิ่มตัวน้อย มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนไม่มาก แต่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวปริมาณมาก นอกจากนี้ในรำข้าวมีสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันหลายชนิด ได้แก่ วิตามินอี (โทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอล) และโอริซานอล โดยสารประกอบทั้งสามชนิดนี้จะลดการเกิด oxidized LDL ลดการเกิดหลอดเลือดแข็งตัว และลดการเกิดคอเลสเตอรอลออกไซด์ ซึ่งโทโคไตรอีนอลและโอริซานอลจะมีผลในการลดระดับของคอเลสเตอรอลโดยตรง โดยที่โทโคไตรอีนอลจะขัดขวางการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย ส่วนโอริซานอลจะลดการดูดซึมของคอเลสเตอรอลจากอาหาร ซึ่งตรวจพบอาการของกลุ่มคนที่ได้รับโอริซานอล จะมีคอเลสเตอรอลมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโอริซานอล นอกจากนี้ รำข้าวมีสารประกอบกลุ่มไฟโตสเตียรอลและกลุ่มไตรเทอปีนแอลกอฮอล์ ไฟโตสเตียรอลหลายชนิด จะสามารถลดการดูดซึมของคอเลสเตอรอลได้ (นัยนา บุญทวีวัฒน์ และเรวดี จงสุวรรณ, 2545)

Ausman *et al.* (2005) ได้ศึกษาผลการลดคอเลสเตอรอลของน้ำมันรำข้าวรีไฟน์ โดยศึกษาเมตาบอลิซึมของคอเลสเตอรอล และไขมันอุดตันในเส้นเลือดระยะเริ่มต้นในหนูแฮมเตอร์ที่มีปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดสูงพบว่า น้ำมันรำข้าวรีไฟน์สามารถลดคอเลสเตอรอล และ low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ในเลือดได้ การดูดซึมของคอเลสเตอรอลในเลือดมีปริมาณ 15-17% และการหลั่ง neutral sterol (NS) ในเลือดมีค่าเพิ่มขึ้นถึง 30% โดยไม่มีผลต่อการหลั่งน้ำดีที่มีสถานะเป็นกรด (Bile Acid: BA) นอกจากนี้ น้ำมันรำข้าวรีไฟน์ยังสามารถเพิ่ม 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase ในลำไส้เล็กได้ 300-500% และทำให้ภาวะไขมันอุดตันในเส้นเลือดระยะเริ่มต้นลดลง 48% ดังนั้นจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าน้ำมันรำข้าวรีไฟน์สามารถทำให้ไขมันในเลือดลดลงได้ โดยการดูดซึมคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง แต่การสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับไม่ลดลง และยังสามารถลดการเกิดภาวะไขมันอุดตันในเส้นเลือดระยะเริ่มต้นได้

นอกจากนี้ รำข้าว และน้ำมันรำข้าวช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจ โดยลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย เนื่องจากในรำข้าว และน้ำมันรำข้าวสกัดมีสารประกอบที่มีผลต่อการยับยั้ง

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ Hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG CO A) reductase (ดวงจันทร์ เสงส์วัตต์, 2538)

จากงานวิจัยทั้งในคน และสัตว์ทดลอง พบว่าองค์ประกอบบางอย่างในข้าวมีผลต่อการลดลงของคอเลสเตอรอลในเลือด นั่นก็คือ รำข้าว เศษรำข้าว (bran fractions) (ซึ่งทั้งสองเป็นใยอาหารประเภท neutral detergent fiber, acid detergent fiber และ hemicellulose) น้ำมันรำข้าว (rice bran oil) น้ำมันเศษข้าว (bran oil fractions: ซึ่งประกอบด้วย oryzanol wax sitosterol และ unsaponifiable matter) และโปรตีนข้าว (rice protein) ทั้งรำข้าว และเศษรำข้าว สามารถลดคอเลสเตอรอล โดยจะช่วยเพิ่มการหลั่งของ bile acid ส่วนน้ำมันรำข้าว และน้ำมันเศษรำข้าว มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase ในตับ และจะยับยั้ง mevalonate pathway ทำให้ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลงได้ (เนตรนภิส วัฒนสุชาติ, 2538)

2.2.4 คิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

คิสทิลเลต เป็นผลพลอยได้ (by-product) ที่ได้จากระบวนการกำจัดกลิ่น ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัดสารที่ให้กลิ่น และรสชาติออกจากไขมันและน้ำมัน สารประกอบที่ถูกกำจัดออกไปจะเป็นพวกที่ระเหยได้ เช่น กรดไขมันอิสระ แอลดีไฮด์ คีโตน เพอร์ออกไซด์ รวมทั้งพวกสเตอรอล แวกซ์ โมโนกลีเซอไรด์ สารสีบางชนิด และสารประกอบที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน สารที่ให้กลิ่นเหล่านี้ จะมีอยู่ในน้ำมันประมาณ 0.2-0.5% น้ำมันที่ผ่านกระบวนการนี้แล้วไม่ควรมีส่วนที่เหลืออยู่เกิน 1% ของที่มีอยู่เดิม กระบวนการนี้ยังช่วยกำจัดสารพิษตกค้างจากยาปราบศัตรูพืช และสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) ที่อาจปนเปื้อนออกไปได้ด้วย (นิธิยา รัตนานนท์, 2548)

Hoed *et al.* (2006) พบว่าองค์ประกอบหลักของคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวคือกรดไขมันอิสระและสารที่ซาพอนิไฟน์ไม่ได้ ส่วนไฟโตสเตอรอล (phytosterols) พบค่อนข้างสูงประมาณ 14.8% และองค์ประกอบของสเตอรอลที่พบในคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวนี้แตกต่างจากที่พบในน้ำมันรำข้าว เช่น δ^5 -unsaturated 4-desmethylsterols (campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol) พบในคิสทิลเลตสูงมากประมาณ 70% ของสเตอรอลทั้งหมด แสดงองค์ประกอบของคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวดังตาราง 2.12

ตาราง 2.12 องค์ประกอบของคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

องค์ประกอบของคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว	(g/100 g)	(%)
กรดไขมัน (fatty acid: FFA)		32.9
โมนอกลิเซอไรด์ (mono glyceride: MG)		5.8
ไดกลีเซอไรด์ (di glyceride: DG)		6.1
สารที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ (unsaponifiable)		37.9
สควอลีน (squalene)		1.9
ส่วนประกอบของ โทคอลรวม		
แอลฟา-โทโคเฟอรอล (α -tocopherol)	0.6	17.5
แกมมา-โทโคเฟอรอล (γ -tocopherol)	0.5	16.8
แอลฟา-โทโคไตรอีนอล (α -tocotrienol)	3.2	4.2
แกมมา-โทโคไตรอีนอล (γ -tocotrienol)	1.9	60.4
เดลตา-โทโคไตรอีนอล (δ -tocotrienol)	0.0	1.2
โทคอลรวม (total tocols)	3.2	100.0
ส่วนประกอบของสเตอรอล		
แคมเปสเตอร์และแคมเปสทานอล (campesterol and campestanol)	2.11	14.3
สติกมาสเตอร์ (stigmasterol)	1.80	12.1
เบตา-ซิโตสเตอร์ (β-sitosterol)	6.16	41.5
ซิโตสทานอล และ เดลตา-5-อะเวนาสเตอร์ (sitostanol and δ-5-avenasterol)	0.48	3.3
เดลตา-5-24-สติกมาสเตอร์ไดอีนอล (δ-5-(24)-stigmastadienol)	0.51	3.4
กรามิสเตอร์ (gramisterol)	0.12	0.8
เดลตา-7-ซิโตสเตอร์ และไซโคลอาร์ทานอล (δ-7-sitosterol and cycloartenol)	0.65	4.4
เดลตา-7-อะเวนาสเตอร์ (δ-7-avenasterol)	0.06	0.4
ไอโซเมอร์ 24-เมทิลซีนไซโคลอาร์ทานอล (isomer 24-methylenecycloartanol)	0.51	3.4
24-เมทิลซีนไซโคลอาร์ทานอล (24-methylenecycloartanol)	1.31	8.9
ซิโตรสตาไดอีนอล (cistrostadienol)	0.56	3.8
24-เมทิลซีนไซโคลอาร์ทานอล (24-methylenecycloartanol)	0.54	3.7
สเตอรอลรวม (total sterols)	14.83	100.0

ที่มา: Hoed *et al.* (2006)

Ko et al. (2008) พบว่าคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวมีความเข้มข้นของวิตามินอีรวมโทโคเฟอรอลรวม และโทโคไตรอินอลรวม เท่ากับ 31.5, 14.9 และ 16.6 mg/g ตามลำดับ นอกจากนี้ชิคารัตน์ หน่อสุวรรณ (2550) พบว่าคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวมีความเข้มข้นของวิตามินอีรวมเท่ากับ 19.4 mg/g และ วราพร พงศ์กรกุลพานิช (2543) พบแอลฟา-โทโคเฟอรอล (alpha-tocopherol) และแกมมา-โทโคเฟอรอล (gamma-tocopherol) ในคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวประมาณ 2,001 และ 3,414% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณในน้ำมันรำข้าวดิบ (crude rice bran oil) 100%

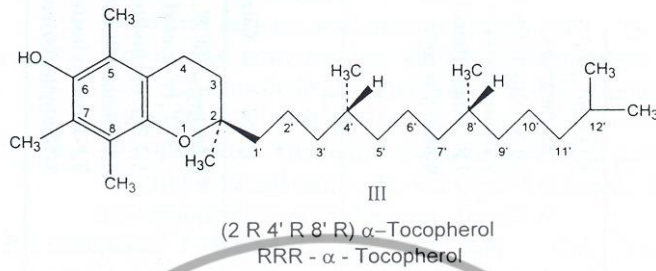
2.3 วิตามินอี (vitamin E)

วิตามินอี ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1922 โดย Evans และ Bishop ซึ่งทำการทดลองกับหนูเพศเมียพบว่าสารสำคัญชนิดหนึ่งซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นสารอะไร มีผลควบคุมการตั้งครรภ์ในหนูให้เป็นที่ไปตามปกติ ถ้าหนูไม่ได้รับสารนี้อย่างเพียงพอ หนูนั่น ๆ จะตั้งครรภ์ได้แต่จะแท้งลูก หลังจากการค้นพบจึงตั้งชื่อสารดังกล่าวว่า วิตามินที่ป้องกันการเป็นหมัน (antisterility vitamin) (วราพร พงศ์กรกุลพานิช, 2543) ต่อจากนั้น ในปี ค.ศ. 1936 Evans และคณะ สามารถสกัดและแยกวิตามินได้จากน้ำมันจมูกข้าวสาลี (wheat germ oil) และตั้งชื่อว่า โทโคเฟอรอล (tocopherol) ซึ่งมีรากศัพท์มาจากภาษากรีกคำว่า tocos ซึ่งแปลว่าบุตร และ phero ซึ่งแปลว่า ให้กำเนิด จากนั้นไม่นาน Fernholz ได้ศึกษาลักษณะโครงสร้างของแอลฟา-โทโคเฟอรอล (α -tocopherol) สำเร็จ โดยต่อมาได้มีผู้ศึกษาวิจัยจำนวนมากทำการศึกษาเกี่ยวกับการแยกและ ลักษณะสำคัญของวิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอล (tocopherol) และ โทโคไตรอินอล (tocotrienol) (Sheppard et al., 1993)

ในปัจจุบันสามารถพบสารอนุพันธ์ของวิตามินอีได้ทั้งหมด 8 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ชนิด กลุ่มแรกเป็น โทโคเฟอรอล โดยมีอนุพันธ์แบ่งเป็น แอลฟา-โทโคเฟอรอล (alpha-tocopherol; α -T) เบตา-โทโคเฟอรอล (beta-tocopherol; β -T) แกมมา-โทโคเฟอรอล (gamma-tocopherol; γ -T) และเดลตา-โทโคเฟอรอล (delta-tocopherol; δ -T) อีกกลุ่มเป็น โทโคไตรอินอล (tocotrienol) แตกต่างจากโทโคเฟอรอลตรงหมู่แทนที่ด้านข้าง ซึ่งเป็นหมู่ไฟทอล (phytol group) จะมีพันธะคู่เพิ่มขึ้นมาอีก 3 แห่งที่ตำแหน่ง 3', 7' และ 11' โดยมีอนุพันธ์แบ่งเป็นแอลฟา-โทโคไตรอินอล (alpha-tocotrienol; α -T3) เบตา-โทโคไตรอินอล (beta-tocotrienol; β -T3) แกมมา-โทโคไตรอินอล (gamma-tocotrienol; γ -T3) และเดลตา-โทโคไตรอินอล (delta-tocotrienol; δ -T3) (ชิคารัตน์ หน่อสุวรรณ, 2550)

2.3.1 โครงสร้างของวิตามินอี (structure of vitamin E)

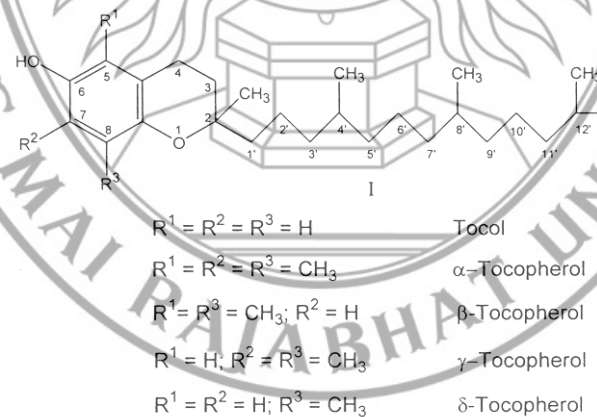
วิตามินอีจัดอยู่ในรูปของสารประกอบ 6-hydroxychroman ที่ละลายได้ในไขมัน โดยแสดงกิจกรรมด้านชีวภาพ (biological activity) ของแอลฟา-โทโคเฟอรอล ซึ่งถูกวัดโดย resorption-gestation assay ในหนูโทคอล (tocol) หรือ 2-methyl-2 (4', 8', 12'-trimethyltridecyl) chroman-6-ol คือ สารประกอบที่เป็นต้นกำเนิดของโทโคเฟอรอล (Eitenmiller and Lee, 2004) ดังรูป 2.4



รูป 2.4 (2 R 4' R 8' R) แอลฟา-โทโคเฟอรอล

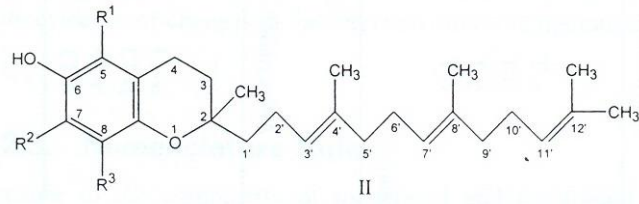
ที่มา : Eitenmiller and Lee (2004)

วิตามินที่พบในธรรมชาติประกอบด้วย 8 อนุพันธ์คือ แอลฟา- เบตา- แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล (α -, β -, γ - และ δ -tocopherol) และแอลฟา- เบตา- แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล (α -, β -, γ - และ δ -tocotrienol) ดังรูป 2.5 และ 2.6 ตามลำดับ และตาราง 2.12 และ 2.13 ตามลำดับ ซึ่งในโครงสร้างของวงแหวน 6-chromanol ของกลุ่มโทโคเฟอรอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล (methyl group) ที่ตำแหน่ง 5, 7 และ 8 โดยที่ตำแหน่งที่ 2 เป็น C16 saturated side chain ส่วนกลุ่มโทโคไตรอีนอลนั้นจะมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 3', 7' และ 11' ของ side chain ซึ่งโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอีนอลในรูปแบบเฉพาะต่าง ๆ นั้นจะแตกต่างกันที่จำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิลบนวงแหวน 6-chromanol โดยแอลฟา-โทโคเฟอรอลและแอลฟา-โทโคไตรอีนอลนั้นจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 3 หมู่ เบตา-โทโคเฟอรอล เบตา-โทโคไตรอีนอล แกมมา-โทโคเฟอรอล และแกมมา-โทโคไตรอีนอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 2 หมู่ และเดลตา-โทโคเฟอรอล และเดลตา-โทโคไตรอีนอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 1 หมู่ (Eitenmiller and Lee, 2004)



รูป 2.5 แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล

ที่มา : Eitenmiller and Lee (2004)



$R^1 = R^2 = R^3 = H$	Tocotrienol
$R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$	α -Tocotrienol
$R^1 = R^3 = CH_3; R^2 = H$	β -Tocotrienol
$R^1 = H; R^2 = R^3 = CH_3$	γ -Tocotrienol
$R^1 = R^2 = H; R^3 = CH_3$	δ -Tocotrienol

รูป 2.6 แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล
ที่มา : Eitenmiller and Lee (2004)



ตารางที่ 2.13 ชื่อสามัญ ชื่อทางเคมี ตัวย่อ และตำแหน่งในวงแหวนของโทโคเฟอรอลฟอร์ม์ต่างๆ

ชื่อสามัญ	ชื่อทางเคมี	โทโคเฟอรอล	ตัวย่อ	ตำแหน่งในวงแหวน
โทคอล	2-เมทิล-2-(4',8',12'-ไตรเมทิลไทรเซซิล)โครแมน-6-อล (2-Methyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecy)chroman-6-ol)		—	R ¹ R ² R ³ H H H
แอลฟา-โทโคเฟอรอล	5,7,8-ไตรเมทิลโทคอล (5,7,8-Trimethyltocol)		α-T	CH ₃ CH ₃ CH ₃
เบตา-โทโคเฟอรอล	5,8-ไดเมทิลโทคอล (5,8-Dimethyltocol)		β-T	CH ₃ H CH ₃
แกมมา-โทโคเฟอรอล	7,8-ไดเมทิลโทคอล (7,8-Dimethyltocol)		γ-T	H CH ₃ CH ₃
เดลตา-โทโคเฟอรอล	8-เมทิลโทคอล (8-Methyltocol)		δ-T	H H CH ₃ CH ₃

ที่มา : Eitenmiller and Lee, 2004

ตารางที่ 2.14 ชื่อสามัญ ชื่อทางเคมี ด้วย่อ และตำแหน่งในวงแหวนของโทโคไตรอีนอลฟอร์มต่างๆ

ชื่อสามัญ	ชื่อทางเคมี	ด้วย่อ	ตำแหน่งในวงแหวน
โทคอคอล	2-เมทิล-2-(4',8',12'-ไตรเมทิลไตรเดคา-3',7',11'-ไตรีนิล)โครแมน-6-ออล (2-Methyl-2-(4',8',12'-trimethyltrideca-3',7',11'-trienyl)chroman-6-ol)	—	R ¹ H R ² H R ³ H
แอลฟา-โทโคไตรอีนอล	5,7,8-ไตรเมทิลโทโคไตรอีนอล (5,7,8-Trimethyltocotrienol)	α-T3	CH ₃ CH ₃ CH ₃
เบตา-โทโคไตรอีนอล	5,8-ไดเมทิลโทโคไตรอีนอล (5,8-Dimethyltocotrienol)	β-T3	CH ₃ H CH ₃
แกมมา-โทโคไตรอีนอล	7,8-ไดเมทิลโทโคไตรอีนอล (7,8-Dimethyltocotrienol)	γ-T3	H CH ₃ CH ₃
เดลตา-โทโคไตรอีนอล	8-เมทิลโทโคไตรอีนอล (8-Methyltocotrienol)	δ-T3	H H CH ₃

ที่มา : Eitenmiller และ Lee, 2004

2.3.2 ประโยชน์ของวิตามินอี (advantage of vitamin E)

วิตามินอีจะทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ทำให้สารพลังงานสูงชนิดนี้หมดความว่องไวในการทำอันตรายกับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ หลังจากนั้นตัววิตามินอีเองจะเกิดเป็นวิตามินอีเรดิคัล (vitamin E radical) ที่เสถียรมากกว่า การที่โมเลกุลวิตามินอีเรดิคัลมีความเสถียร ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของปรากฏการณ์เรโซแนนซ์ (resonance effect) อิเล็กตรอนอิสระที่เกิดขึ้นที่หมู่ ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) สามารถเคลื่อนที่ (localization) เข้าไปในวงแหวนเบนซีน (ซึ่งปรากฏการณ์นี้คล้ายกับที่เกิดขึ้นกับหมู่ฟีนอล) ได้รูปแบบของวิตามินอีเรดิคัลที่เป็นเรโซแนนซ์กันทั้งหมด 4 รูปแบบซึ่งเปลี่ยนรูปแบบกลับไปกลับมาตลอดเวลา ทำให้พลังงานของโมเลกุลลดลงวิตามินอีเรดิคัล จึงมีความเสถียร (วราพร พงศ์ธรกุลพานิช, 2543)

สารต้านอนุมูลอิสระถูกใช้อย่างมากในการเป็นสารที่เติมลงไปในการอาหาร เพื่อป้องกันจากการเสื่อมเสียของอาหาร และน้ำมันเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระ ถูกใช้เพื่อรักษาคุณภาพของอาหารเป็นหลัก โดยการป้องกันการเสื่อมเสียเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขององค์ประกอบของไขมัน (Senevirathne *et al.*, 2006)

Kim *et al.* (2001) ได้ศึกษาการยับยั้งการเกิด autoxidation ของคอเลสเตอรอลโดยส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของน้ำมันรำข้าว (700, 1400 และ 2100 mg/kg) ซึ่งศึกษาใน aqueous model system เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง ที่ pH 5.5 และอุณหภูมิ 80°C ผลของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถวัดค่าโดยการสลายตัวของคอเลสเตอรอล และการเกิดของ 7-คีโตคอเลสเตอรอล (7-ketocholesterol) นอกจากนี้ยังวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ วิตามินอี และแกมมา-โอริซานอลในระบบในช่วงการเกิด autoxidation ของคอเลสเตอรอลอีกด้วย จากผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นของส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของน้ำมันรำข้าวเท่ากับ 2100, 1400 และ 700 mg/kg สามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 7-คีโตคอเลสเตอรอลได้ 92, 82 และ 64% ตามลำดับ หลังจากปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 16 ชั่วโมง ขณะที่เมื่อสารตัวอย่างที่ไม่มีส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้เป็นองค์ประกอบ ทำให้มีการสลายตัวของคอเลสเตอรอลเกือบสมบูรณ์ วิตามินอีลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในทุกๆ การทดลอง แต่แกมมา-โอริซานอลลดลงในการทดลองที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2100 mg/kg ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

Therriault *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาทดลองแล้วพบว่าแอลฟา-โทโคไตรอีนอลมีผลในการลดลงของ cellular adhesion molecule expression และ monocytic cell adherence ซึ่งอาจจะป้องกันการเกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือดได้ นอกจากนี้ยังพบว่า โทโคไตรอีนอลสามารถยับยั้งแอกติวิตีของ hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CO A) reductase ในไก่ที่มีระดับไขมันในเลือดสูงได้ และยังสามารถการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลโดยยับยั้งแอกติวิตีของ HMG-CO A reductase ของ post-transcriptional mechanism ใน HepG2 cells (Minhajuddin *et al.*, 2005)

Azlina *et al.* (2005) ได้ศึกษาผลของโทโคไตรอีนอลต่อ lipid peroxidation ในการทดลองโรคกระเพาะอักเสบที่เกิดขึ้นโดย restraint stress สามารถสรุปได้ว่าโทโคไตรอีนอลอาจจะสามารถลดหรือ

ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ นอกจากนี้ Feng *et al.*, (2010). พบว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอล คือ Phase II enzyme inducer ที่มีประสิทธิภาพ ในการปกป้อง acrolein-induced oxidative stress และ mitochondrial dysfunction ใน retinal pigment epithelial cell ของมนุษย์

อาหาร และน้ำมันประเภทต่างๆ ที่อุดมไปด้วยวิตามินอี เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันตับปลา น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันฝ้าย น้ำมันมะกอก น้ำมันหมู เนยเทียม ข้าว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง กะหล่ำปลี หัวแครอท หัวผักกาด หอมหัวใหญ่ มันฝรั่ง มะเขือเทศ ข้าวโพด ข้าวสาลี ผักใบเขียว ไข่ และเนื้อ เป็นต้น (แสดงดังตาราง 2.15-2.16) น้ำมันที่มี แอลฟา-โทโคเฟอรอลสูง เช่น น้ำมันรำข้าว น้ำมันจมูกข้าวสาลี น้ำมันดอกคำฝอย และน้ำมันดอกทานตะวัน (ศิริวรรณ สุทธิจิตต์, 2550) วิตามินอีมีความสำคัญต่อร่างกายคือ ช่วยลดการช่วยขยายหลอดเลือดให้ผนังหลอดเลือดแข็งแรง ป้องกันไม่ให้เลือดไหลซึมออกมาได้ง่าย ช่วยเร่งให้มีการสร้างผิวหนังขึ้นใหม่ ช่วยเพิ่มสมรรถภาพของกล้ามเนื้อ มีฤทธิ์ขับปัสสาวะอย่างอ่อน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของอินซูลิน ทำให้ระบบประสาททำงานได้ตามปกติ ป้องกันการเกิดต่อกระดูกในเลนส์ตา (เปรมจิตต์และสุทิน, 2542) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย (Zigoneanu *et al.*, 2008) ลดคอเลสเตอรอลในเลือด และป้องกันไม่ให้เกิดการรวมตัวของเกล็ดเลือด (Bonvehi *et al.*, 2000) โทโคเฟอรอล ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดคือ เดลตา-โทโคเฟอรอล รองลงมาคือ แกมมา-โทโคเฟอรอล เบตา-โทโคเฟอรอล และ แอลฟา-โทโคเฟอรอล ตามลำดับ ส่วนโทโคไทรอินอล มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยเฉพาะ แกมมา-โทโคไทรอินอล และ เดลตา-โทโคไทรอินอล จะมีฤทธิ์สูงมากในการลดคอเลสเตอรอลในเลือด (ศิริวรรณ สุทธิจิตต์, 2550)

ตาราง 2.15 ปริมาณวิตามินอีทั้งหมด ในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

แหล่งที่พบ	วิตามินอี (mg %)
น้ำมันหัวแครอท	1,620
น้ำนมมารดาหลังคลอด (colostrum)	1,480
น้ำนมมารดา	240
น้ำมันรำข้าว	192
น้ำมันจมูกข้าวสาลี (wheat germ)	189
น้ำมันถั่วเหลือง	86
น้ำมันดอกคำฝอย	80
น้ำมันปาล์ม	79
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	78
น้ำมันข้าวโพด	72
น้ำมันดอกทานตะวัน	55

ที่มา: ศิริวรรณ สุทธิจิตต์ (2550)

ตาราง 2.16 ปริมาณวิตามินอีรวม และแอลฟา-โทโคเฟอรอลในอาหาร (mg/kg)

แหล่งที่พบ	วิตามินอีรวม	แอลฟา-โทโคเฟอรอล
ไขมัน		
น้ำมันหมู	6-13	
เนย	10-50	
น้ำมันพืช		
ถั่วลิสง	560-1600	
ข้าวโพด	530-1620	
ปาล์ม	330-730	
ทานตะวัน	250-490	
มะกอก	50-150	
อาหารประจำวัน		
เนื้อสัตว์		0.5-1.6
สัตว์ปีก		1.6-4.0
ปลา		6-10
ผลไม้		2.3-72
ผัก		0.5-7.2
นมไอศกรีม		0.4-10.0
มาการีน		280

ที่มา: สมทรง (2543)

2.3.3 การสกัดและการทำให้วิตามินอีบริสุทธิ์

Ko *et al.* (2008) ได้ศึกษาการสกัดวิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile) อะซิโตน (acetone) คลอโรฟอร์ม (chloroform) ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) เอทานอล (ethanol) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) เฮกเซน (hexane) เมทานอล (methanol) และเมทิล เอทิล คีโตน (methyl ethyl ketone) และอุณหภูมิต่ำ พบว่าการสกัดวิตามินอี โดยใช้อะซิโตนไนไตรล์เป็นตัวทำละลายในการสกัด อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ -40°C และเวลาในการสกัดเท่ากับ 24 ชั่วโมง ได้วิตามินอีรวม (แอลฟา-, เบตา-, แกมมา-, และเดลตา-โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอล) เท่ากับ 89.9 mg/g

ชิคาร์ตัน หน่อสุวรรณ (2550) ได้ศึกษาการสกัดวิตามินอีจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำด้วย เครื่องสกัดดันแบบ (พัชรินทร์ ระวียัน และคณะ, 2548) (ใช้สำหรับการสกัด

แคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบและวิตามินอีจากคิสทิลเลตของน้ำมันปาล์ม) โดยได้ศึกษาสภาวะการสกัดคือ สัดส่วนของคิสทิลเลตต่อเฮกเซน เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 (w/v) ที่อุณหภูมิ -10 และ -15°C และใช้อัตราการกวน 250 และ 500 รอบต่อนาที สารสกัดที่ได้นำมาวิเคราะห์ ความเข้มข้นของวิตามินอีโดยใช้ Normal-phase HPLC พบว่า สภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการสกัดคือ การใช้อัตราส่วนของคิสทิลเลตต่อเฮกเซน เท่ากับ 1:4 (w/v) อุณหภูมิ -10°C และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นของโทโคเฟอรอลอนุพันธ์แอลฟา เบตา แกมมา และเดลตา และโทโคไตรอีนอลอนุพันธ์แอลฟา แกมมา และเดลตา ตลอดจนวิตามินอีรวม เท่ากับ 2843.74, 149.28, 2039.59, 215.37, 622.03, 8079.52, 668.98 และ 14618.51 mg/kg ตามลำดับ และมีค่า relative recovery เท่ากับ 81.8, 89.7, 83.2, 92.6, 81.1, 82.4, 91.4 และ 82.9% ตามลำดับ วิตามินอีที่สกัดได้จากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวเข้มข้น 10 mg/kg มีค่า DPPH scavenging effect สูงที่สุดเท่ากับ 99% และที่ความเข้มข้น 1.25 mg/kg สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้มากกว่า 80% ในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี reducing power และวิธี ferric thiocyanate และมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ดีกว่า BHA, แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์, BHT, TBHQ และ PG ตามลำดับ ส่วนการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน พบว่ายับยั้งได้ 89.8% ซึ่งเป็นรองเฉพาะ BHA วิตามินอีที่สกัดได้มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 95 และ 180°C เป็นระยะเวลา 72 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 120 วัน จะมีความเข้มข้นลดลง 26.7%

2.3.4 การวิเคราะห์เอกลักษณ์ และปริมาณของวิตามินอีโดยใช้วิธี HPLC

วิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลสามารถวิเคราะห์เอกลักษณ์ และปริมาณได้ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ normal phase high performance liquid chromatography (NP-HPLC), reversed phase high performance thin layer chromatography (C_{18} RP-HPLC), reversed phase high performance liquid chromatography (C_{18} RP-HPLC), gas chromatography (GC) (Slover *et al.*, 1983; Meijboom and Jongenotep, 1978) nano liquid chromatography และ capillary electrophoresis (CE) ซึ่ง CE ได้รับความนิยมมากขึ้นในการวิเคราะห์สารที่เกี่ยวข้องกับการผลิตยา เนื่องจาก CE มีความสามารถในการแยกสารได้สูง ใช้สารตัวอย่าง และตัวทำละลายในปริมาณต่ำ การวิเคราะห์องค์ประกอบที่แตกต่างกันของ โทโคเฟอรอล นั้นสามารถใช้เทคนิคการแยกด้วย electrokinetic ได้ เช่น capillary electrochromatography (CEC) และ micellar electrokinetic chromatography (MEKC) (Chang *et al.*, 2006)

Lopez Ortiz *et al.* (2006) ได้ศึกษาวิธีการอย่างง่ายสำหรับการหาปริมาณของโทโคเฟอรอลในน้ำมันอัลมอนท์ และน้ำมันมะกอก โดยใช้วิธี Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ซึ่งมีอะซิโตนไนไตร และน้ำอัตราส่วน 95:5 (v/v) เป็น mobile phase อัตราการไหลที่ใช้คือ 0.4 mL/min และใช้ Fluorescence เป็นดีเทคเตอร์ ($\text{Ex} = 290 \text{ nm}$, $\text{Em} = 325 \text{ nm}$) จากผลการทดลองพบว่า น้ำมันอัลมอนท์มีความเข้มข้นของ แอลฟา-, แกมมา- และ เดลตา- โทโคเฟอรอล อยู่ในช่วง 23.5–44.9,

2.93–6.15 และ 1.27–8.06 mg/100 g ของน้ำมัน ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้นของ แอลฟา-, แกมมา- และ เดลตา-โทโคเฟอรอลในน้ำมันมะกอกจะมีค่าอยู่ในช่วง 14.8–26.5, 0–3.49 และ 0–0.95 mg/100 g ของน้ำมัน ตามลำดับ

Abidi (2003) ได้ศึกษาปริมาณของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลจากน้ำมันคาโนลารีไฟน์ น้ำมันข้าวโพดดิบ น้ำมันดิบจาก milkweed น้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันรำข้าวดิบ และรีไฟน์ น้ำมันถั่วเหลืองดิบและรีไฟน์ น้ำมันดอกทานตะวันดิบและรีไฟน์ และน้ำมันพืชตัดแปลงชนิดอื่นๆ ด้วย RP-HPLC ที่มี fluorescence เป็นดีเทคเตอร์บน pentaffluorophenylsilica (PFPS) column และ mobile phase ที่ใช้คือ เมทานอลและน้ำ ซึ่งพบว่า วิธี reversed-phase PFPS-HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอีนอลในน้ำมันรำข้าว และน้ำมันจาก milkweed ใช้ตัวทำละลายที่เป็นอันตรายน้อยกว่าวิธี NP-HPLC สำหรับวิธีดั้งเดิมที่ใช้ octadecylsilica phase ชนิดที่ไม่มีขั้วไม่สามารถแยกเบตา-โทโคเฟอรอล และแกมมา-โทโคไตรอีนอลออกจากกันได้ แต่ PFPS column สามารถแยกสารประกอบทั้งสองตัวได้ นอกจากนี้ น้ำมันดิบทุกชนิดที่ทดลองยังพบเบตา- และแกมมา-โทโคเฟอรอลยกเว้นน้ำมันปาล์มดิบ แม้ว่า น้ำมันจาก milkweed ส่วนใหญ่มีเบตา-โทโคเฟอรอลในระดับปานกลาง แต่จะพบเบตา-โทโคเฟอรอลปริมาณต่ำและแกมมา-โทโคเฟอรอลในปริมาณสูงในน้ำมันบริโกล สำหรับเบตา- และแกมมา-โทโคไตรอีนอลนั้นสามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกับแอลฟา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล ซึ่งสามารถพบได้ในน้ำมันรำข้าวและน้ำมันปาล์มเท่านั้น

Edison (2009) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณโทโคเฟอรอลด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ 5 μm LiChrosorb RP18 (120 \times 4.6mm) ด้วย mobile phase คือ เมทานอล/น้ำ (98/2) อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 mL/min ที่ 292 nm UV-detection (detection limit = 15-30 ng) และ ที่ fluorescence detection (excitation : 292 nm, emission : 327 nm, detection limit = 0.5 ng)

Jimeno *et al.*, (2000). ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ แอลฟา-, เบตา-และแกมมา- และ เดลตา-โทโคเฟอรอล (α , $\beta+\gamma$, δ -tocopherol) ในน้ำมันพืชโดยเทคนิค RP-HPLC ด้วย UV-detection คอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่ใช้คือ ODS-2 ที่มีเมทานอล-น้ำเป็น mobile phase พบว่าโทโคเฟอรอลสามารถแยกออกมาได้ที่ 292 nm ในเวลาน้อยกว่า 5 นาที วิธีนี้ มีค่า RSD=2.69% และ ค่า recovery เท่ากับ 98.14%

2.4 อนุมูลอิสระ (free radical) (โอภา วัชรคุปต์, 2549)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง ซึ่งสัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ จะแสดงอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล A \cdot อนุมูล A \cdot^- และ อนุมูล A \cdot^+ โดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียร และพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวตัวอื่น ดังนั้น อนุมูลอิสระจึงมีสมบัติเฉพาะ คือ

มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ โดยอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) อนุมูลไฮดรอกซี ($\cdot OH$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO\cdot$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี ($HO_2\cdot$) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก ขณะที่ไนตริกออกไซด์ (NO) หรืออนุมูลไนตริกออกไซด์ ($\cdot NO$) อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซี เป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงรองลงมา

การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน (โอภา วัชรคุปต์, 2549) ดังนี้

ก. การแตกของพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส



ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอมที่เป็นกลาง (ทางไฟฟ้า)



ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลาง (ทางไฟฟ้า)



สาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (โอภา วัชรคุปต์, 2549) คือ

(1) สาเหตุจากภายนอกร่างกาย เช่น รังสีเอ็กซ์ (x-ray) รังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) แกมมาเรดิโอแอกติวิตี (radioactivity) และสารพิษต่างๆ เช่น แก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) แก๊สไฮโดรคาร์บอน จากท่อไอเสียรถยนต์ ควันทนุหรี ยาฆ่าแมลง การติดเชื้อทั้งจากแบคทีเรียและไวรัส โลหะบางชนิด เช่น ตะกั่ว (Pb) แคดเมียม (Cd) ปรอท (Hg) รวมทั้งการทำงาน หรือการออกกำลังกายอย่างหักโหม

(2) สาเหตุจากภายในร่างกาย เช่น การเผาผลาญ (metabolism) ซึ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระ เนื่องจากเซลล์ภายในร่างกายมีการทำปฏิกิริยากับออกซิเจนตลอดเวลา ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา ซึ่งร่างกายจะผลิตสารขึ้นมาเพื่อต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน เช่น ร่างกายผลิตอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ($superoxide\ free\ radical, O_2^-$) ขึ้นมา ในขณะที่เดียวกันร่างกายจะผลิตสารต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ($superoxide\ dismutase$) ขึ้นมาด้วย ซึ่งสารซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ดังกล่าว เมื่อคนเรามีอายุเพิ่มมากขึ้น การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจะลดน้อยลง ทำให้ร่างกายของคนเราถูกทำลายเนื้อเยื่อ และส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ด้วยอนุมูลอิสระ จึงทำให้เกิดโรคต่างๆ ตามมามากมาย

อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเผาผลาญของร่างกาย และในสภาวะที่ร่างกายผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายถูกแวดล้อมด้วยมลพิษ ซึ่งจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นร่างกายจำเป็นต้องป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อป้องกัน คือ สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน ไขมันคาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ และเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถชะลอหรือป้องกันการปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) (โอภา วัชรคุปต์, 2549)

สารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

2.5.1 สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ (natural antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ พบมากในพืช และราเกือบทุกชนิด และยังพบในเนื้อเยื่อของสัตว์อีกด้วย โดยกลุ่มหลักของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ คือ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) แต่กลุ่มที่สำคัญที่สุดของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ คือ โทโคเฟอรอล ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และกรดฟีนอลิก (phenolic acids) (Pokorny *et al.*, 2001)

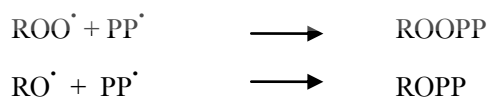
สารประกอบฟีนอล (phenolic compound) เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในกระบวนการเติบโต และการเจริญพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด ดังนั้น รูปแบบของสารประกอบฟีนอลในพืชแต่ละชนิด จึงมีความแตกต่างกันไป ในปัจจุบันพบว่ามีการประกอบฟีนอลที่ทราบโครงสร้างแน่นอนแล้วมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติ ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ฟีนิลโพรพานอล (phenylpropanol) และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน (lignins) เมลานิน (melanins) และแทนนิน (tannins) เป็นต้น

สมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอล คือ การเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชัน สารต้านการกลายพันธุ์ (antimutagens) ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ และการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และโรคมะเร็งต่างๆ โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



เมื่อ ROO^\bullet และ RO^\bullet คือ free radicals, PPH คือ polyphenolic compound

เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีความเสถียร ดังนั้น จึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิด ยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

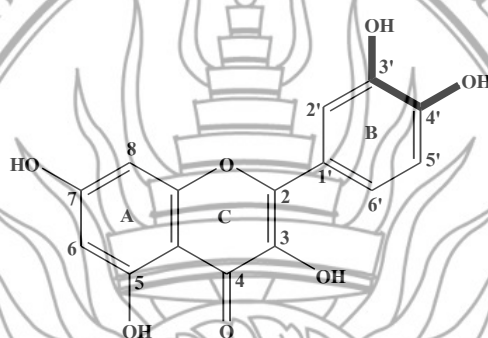


สารประกอบฟีนอลที่ถูกพบว่ามีความเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันนั้น สามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด ผล ใบ และส่วนอื่นๆ และหนึ่งในสารประกอบฟีนอลที่เป็นที่รู้จัก คือ

ฟลาโวนอยด์ โดยสามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืช แต่จะมีความแตกต่างกันออกไปในด้านของชนิดและปริมาณ

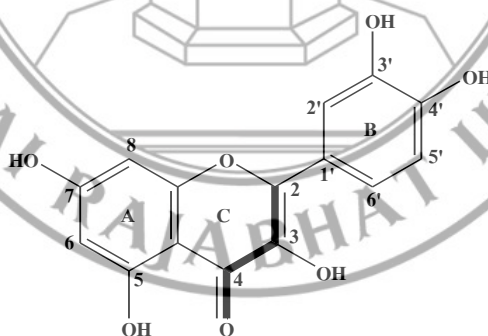
ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เช่น เควอซิทิน ซึ่งมีโครงสร้างที่สำคัญพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ 3 ตำแหน่ง ดังนี้ (โอภา วัชรกุลป์, 2549)

(1) โครงสร้าง *catechol ortho-diphenolic group* ในวง B ถือเป็นโครงสร้างที่สำคัญที่สุดสำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งนอกจากจะมีบทบาทสำคัญสำหรับการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็น hydrogen donating แล้ว ยังสามารถจับหรือคีเลตโลหะหนัก โดยเฉพาะทองแดง (Cu) และเหล็ก (Fe) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้าง และเกิดปฏิกิริยาออกซิเจนของอนุมูลอิสระในร่างกาย แสดงดังรูป 2.7



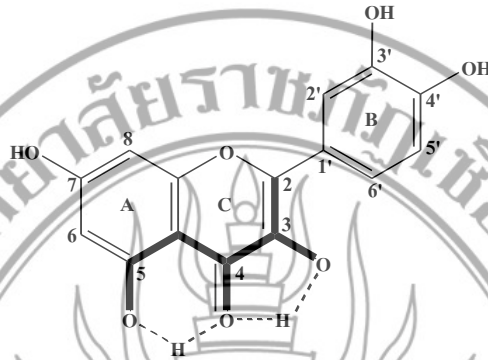
รูป 2.7 โครงสร้าง *catechol ortho-diphenolic group* ในวง B ของเควอซิทิน
ที่มา : โอภา วัชรกุลป์ (2549)

(2) พันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2-3 คอนจูเกต (conjugate) กับหมู่ 4-oxo ในวง C ซึ่งจะเพิ่มความเสถียรของอนุมูล flavonoid phenoxyl แสดงดังรูป 2.8



รูป 2.8 พันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2-3 คอนจูเกต (conjugate) กับหมู่ 4-oxo ในวง C ของเควอซิทิน
ที่มา : โอภา วัชรกุลป์ (2549)

(3) หมู่ $-OH$ ที่ตำแหน่ง 3 และ 5 พบว่า สารกลุ่มฟลาโวน และฟลาโวนอน ซึ่งไม่มีหมู่ $-OH$ ที่ C_3 จะมีโครงสร้างที่บิดเบี้ยว ในขณะที่สารกลุ่มฟลาโวนอล และฟลาวานอล ซึ่งมีหมู่แทนที่ $-OH$ ที่ตำแหน่งดังกล่าว จะทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล โครงสร้างจะมีลักษณะแบนราบในระนาบเดียวกัน ส่งผลให้การ delocalization ของอิเล็กตรอนผ่านพันธะคู่เกิดได้ดีขึ้น แสดงดังรูป 2.9



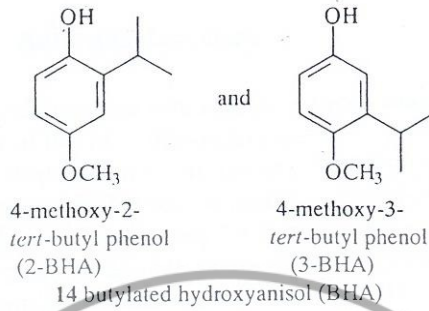
รูป 2.9 หมู่ $-OH$ ที่ตำแหน่ง 3 และ 5 ของควอซีทิน
ที่มา: โอภา วัชรกุลต์ (2549)

2.5.2 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ซึ่งสามารถทนต่อสถานะของกระบวนการผลิต เช่น การทอด หรือการอบได้ดี (German, 2002) ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์นั้นมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด แต่ชนิดที่นิยมใช้เติมลงในอาหารกันอย่างแพร่หลาย และได้รับการรับรองจาก Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2005) มี 4 ชนิด ได้แก่

1. Butylated Hydroxyanisole (BHA)

BHA มีลักษณะเป็นขี้ผึ้ง สีขาว สามารถละลายได้ดีในน้ำมันและไขมัน แต่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 180.24 จุดเดือด $264-270^{\circ}C$ และหลอมเหลว $48-55^{\circ}C$ BHA เป็นส่วนผสมของ 2-tert-butyl-4-methoxyphenol และ 3-tert-butyl-4-methoxyphenol ซึ่งมากกว่า 90% จะอยู่ในรูป 3-isomer (รูป 2.10) ด้วยโครงสร้างที่เป็นหมู่ tert-butyl ซึ่งเชื่อมต่อกับหมู่ไฮดรอกซิลนั้นทำให้ BHA มีความคงตัวดีและไม่สลายตัวเมื่อผ่านกระบวนการผลิต โดยเฉพาะกระบวนการอบ แม้ว่าจะทำให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของ BHA ลดลงบ้าง นอกจากนี้ BHA ยังอาจให้กลิ่นฟีนอลิกเมื่อได้รับอุณหภูมิสูง เช่น ผ่านกระบวนการทอด หรือ อบ โดยทั่วไปมักใช้ BHA ร่วมกับสารแอนติออกซิเดนต์ตัวอื่นๆ เช่น BHT, propyl gallate, lecithin, hydroquinone หรือ methionine เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชัน (JECFA, 2005)

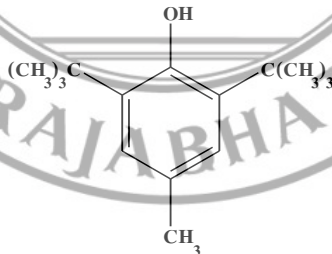


รูป 2.10 Butylated Hydroxyanisole (BHA)

ที่มา : Pokorny *et al.* (2001)

2. Butylated Hydroxytoluene (BHT)

BHT (2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol หรือ 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol, รูป 2.11) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ แต่สามารถละลายในน้ำมันและไขมันได้ดีกว่า BHA มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 220.34 g/mol จุดเดือด และจุดหลอมเหลวเป็น 265 และ 70°C ตามลำดับ ทั้งนี้ BHT ยังสามารถละลายได้ในตัวทำละลายโทลูอีน เมทานอล เอทานอล ไอโซโพรพานอล อะซีโตน เบนซีน และตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอนอื่นๆด้วย นอกจากนี้ BHT ยังสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง และไม่สลายตัวเมื่อผ่านกระบวนการอบ อย่างไรก็ตาม BHT จะให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันได้ต่ำกว่า BHA เนื่องจากมีหมู่ *tert*-butyl อยู่รอบหมู่ไฮดรอกซิลถึง 2 หมู่ อีกทั้งในสภาวะที่มีเหล็กอยู่ด้วย BHT ก็อาจจะทำให้เกิดสีเหลืองในผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องจากเกิดการสร้างสาร Stilbenequinone ขึ้น โดยทั่วไปมักใช้ BHT ร่วมกับสารแอนติออกซิเดนต์ตัวอื่นๆ เช่น BHA เป็นต้น (JECFA, 2005) BHT ทำหน้าที่เป็นสาร ต้านปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งสารดังกล่าวจะให้อนุมูลไฮโดรเจนได้ง่าย และเมื่อให้อนุมูลไฮโดรเจนแล้ว อนุมูลอิสระที่เหลือมีปฏิกิริยาต่ำจึงไม่ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอีก ทำให้ลดอัตราการเกิดออกซิเดชันได้ (ปราณี วราสวัสดิ์, 2550)

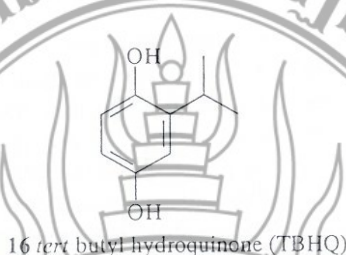


รูป 2.11 Butylated Hydroxytoluene (BHT)

ที่มา : Pokorny *et al.* (2001)

3. Tertiary Butylhydroquinone (TBHQ)

TBHQ (2-(1,1-dimethylethyl)-1,4-benzenediol, รูป 2.12) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ถึงสีน้ำตาลอ่อน มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 166.22 จุดเดือด 300°C และจุดหลอมเหลว $126.5\text{-}128.5^{\circ}\text{C}$ สามารถละลายในน้ำมันและไขมันได้ปานกลาง (5-10%) และสามารถละลายในน้ำได้เล็กน้อย (1%) ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้ TBHQ เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ที่นิยมนำไปใช้กันมาก นอกจากนี้ TBHQ ยังมีความคงตัวไม่สลายตัวเมื่อผ่านกระบวนการผลิต และให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีกว่าสารอื่นๆด้วยทั้งนี้อาจมีการใช้กรดซิตริก ร่วมด้วยเพื่อเพิ่มความคงตัวแต่ห้ามใช้ TBHQ ร่วมกับ propyl gallate (JECFA, 2005)

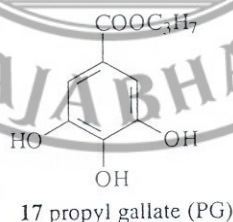


รูป 2.12 Tertiary Butylhydroquinone (TBHQ)

ที่มา : Pokorny et al. (2001)

4. Propyl Gallate (PG)

PG (3,4,5-trihydroxybenzoic acid propyl ester, รูป 2.13) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวถึงสีเทาอ่อน มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 212.20 จุดหลอมเหลว 150°C และสลายตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 148°C สามารถละลายได้บางส่วนในน้ำ แอลกอฮอล์ อีเทอร์ และสามารถละลายในน้ำมันได้ดี ทั้งนี้เนื่องจาก PG มีจุดหลอมเหลวต่ำ จึงทำให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันต่ำ เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 190°C นอกจากนี้ PG ยังไวต่อความร้อนทำให้สลายตัวไปเมื่อผ่านกระบวนการทางความร้อนอีกด้วย โดยทั่วไปจึงมักใช้ PG ร่วมกับ BHA หรือ BHT เพื่อเพิ่มความคงตัวและประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชัน (JECFA, 2005)

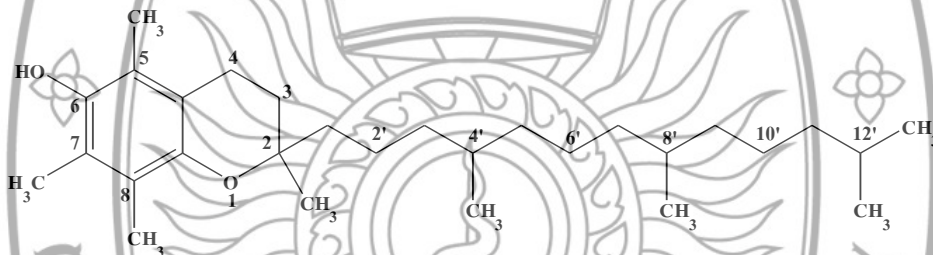


รูป 2.13 Propyl Gallate (PG)

ที่มา : Pokorny et al. (2001)

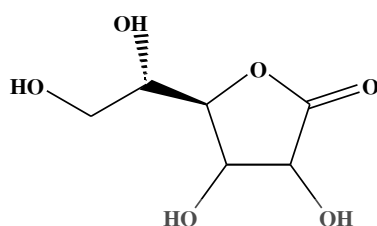
นอกจากนี้ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินอี และวิตามินซี

วิตามินอี (tocopherols) มีลักษณะเป็นน้ำมันชั้นหนืด สีเหลือง ละลายได้ดีในน้ำมัน มีสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O_2$ มวลโมเลกุล 430 g/mol พบได้ 4 ชนิดในธรรมชาติ คือ แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล แต่ชนิดที่มีความสำคัญมากที่สุด คือ แอลฟา-โทโคเฟอรอล (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2549) แสดงดังรูป 2.14 ซึ่งมีคุณสมบัติทนต่อกรดและความร้อนสูง แต่ไม่ทนต่อด่าง แสงแดดและออกซิเจน โดยจะถูกออกซิไดซ์อย่างช้าๆ ถ้าสัมผัสกับอากาศ และจะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็ว ถ้าละลายในไขมันที่เหม็นหืน หรือมีเกลือของเหล็กอยู่ด้วย แหล่งอาหารที่พบมากคือ ในน้ำมันพืชต่างๆ เช่น น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดทานตะวัน และน้ำมันสกัดจากจมูกข้าวสาลี หน้าที่สำคัญของวิตามินอี คือ เป็นสารต้านออกซิเดชัน ป้องกันไม่ให้เพอร็อกไซด์ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ที่อยู่ในโมเลกุลของลิพิดที่ผนังเมมเบรนของเซลล์ และวิตามินอียังทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ เป็นการกำจัดอนุมูลอิสระให้น้อยลง ปัจจุบันมีผู้ใช้วิตามินอีจำนวนมาก ในการรักษาโรคหัวใจและโรคหลอดเลือดบางชนิด ทำลายสารก่อมะเร็ง ใช้เติมในผลิตภัณฑ์รักษาฝ้า และผลิตภัณฑ์ชะลอความแก่ (ปราณี วราสวัสดิ์, 2550)



รูป 2.14 โครงสร้างแอลฟา-โทโคเฟอรอล
ที่มา : นธิยา รัตนาปนนท์ (2549)

วิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลเอกโซส มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ละลายได้ดีในน้ำ มีสูตรโมเลกุล $C_6H_8O_6$ มีมวลโมเลกุล 176.1256 g/mol จุดหลอมเหลว $190^{\circ}C$ แสดงดังรูป 2.15 พบมากในผักและผลไม้สด ซึ่งเป็นสารรีดิวซิงเอเจนต์อย่างแรง (strong reducing agent) ที่มีความคงตัวต่ำ สลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสง อากาศ และความร้อน ส่วนโลหะหนัก เช่น ทองแดงไอออน และเหล็กไอออน จะเร่งการสลายตัวของวิตามินซีให้เร็วขึ้น โดยวิตามินซี ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน และเกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างโปรตีนคอลลาเจน ดังนั้นถ้าร่างกายได้รับวิตามินซีไม่เพียงพอ จะทำให้การสังเคราะห์โปรตีนคอลลาเจนผิดปกติ มีผลต่อความแข็งแรงของหลอดเลือดต่างๆ ทั่วร่างกาย โดยเฉพาะเส้นเลือดฝอยจะเปราะและแตกได้ง่าย ดังนั้นเมื่อขาดวิตามินซีจึงเป็นโรคเลือดออกตามไรฟัน ถ้าอาการรุนแรงจะเป็นโรคลักปิดลักเปิด (scurvy) (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2549)



รูป 2.15 โครงสร้างวิตามินซี

ที่มา : นิธิยา รัตนานนท์ (2549)

ข้อดีและข้อเสียของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติและสังเคราะห์ คือสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติมีราคาแพง และมีข้อจำกัดต่อการใช้ในผลิตภัณฑ์บางประเภทมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ซึ่งสามารถใช้ได้ในวงกว้างกว่า แต่มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) อยู่ในระดับกลางถึงสูง ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาตินั้นมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงกว้าง และได้รับการยอมรับว่าเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายมีแนวโน้มที่จะมีการใช้เพิ่มมากขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ สารแอนติออกซิแดนซ์ธรรมชาติยังมีความสามารถในการละลายได้ในช่วงกว้าง และได้รับความสนใจมากขึ้นที่นำมาใช้ แต่สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์นั้นมีความห่วงใยในด้านความปลอดภัยในการนำมาใช้ และต้องมีการใช้สัญลักษณ์สำหรับสารแอนติออกซิแดนซ์บางชนิด นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ยังมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ปัจจุบันจึงได้รับความสนใจที่นำมาใช้ลดลง (Pokorny *et al.*, 2001)

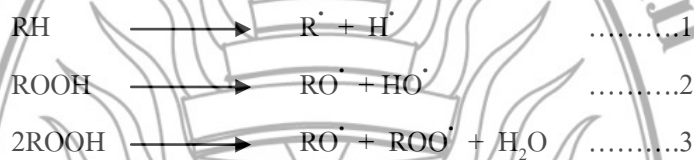
นอกจากนี้ Bera *et al.* (2006) พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติมีประโยชน์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ คือ สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคที่มีความปลอดภัย ซึ่งในทางกฎหมายแล้วไม่ต้องมีการทดสอบด้านความปลอดภัยถือว่าเป็นอาหารที่มนุษย์บริโภคมากกว่า 100 ปี หรือใช้ผสมกับอาหาร นอกจากนี้ยังทำให้น้ำมันบริโภคมีความคงตัวและเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับน้ำมันบริโภคอีกด้วย

Senevirathne *et al.* (2006) กล่าวว่า สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ BHT และ BHA มีฤทธิ์ทำลายตับ และเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจึงมีบทบาทสำคัญในการทำลาย reactive oxygen species และอนุมูลอิสระอื่น ๆ ส่งผลให้โรคต่างๆ และการหืนของอาหารเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันนั้นเกิดขึ้นได้ช้าลง

2.1.6 กลไกการเกิดออกซิเดชัน (mechanism of oxidation) (นิริยา รัตนาปนนท์, 2549)

การเกิดออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างออกซิเจน กับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวอิสระ หรือที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ที่อยู่ในลิพิดหรืออาหารที่มีลิพิด ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ (deterioration) ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเป็นไปอย่างต่อเนื่องเมื่อลิพิดหรืออาหารสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ อัตราเร็วของปฏิกิริยาออกซิเดชันจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระ (free-radical chain reaction) ซึ่งมีกลไกการเกิดได้เป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

(1) ขั้นเริ่มต้น (initiation) เป็นขั้นตอนการเกิดอนุมูลอิสระ โดยเมื่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจะได้อนุมูลอิสระ ดังสมการ 1 โดยมีการสูญเสียไฮโดรเจนอะตอมของคาร์บอนที่อยู่ติดกับคาร์บอนที่มีพันธะอยู่ ซึ่งขั้นตอนนี้จะถูกเร่งให้เร็วขึ้น โดยแสง ความร้อน และไอออนของโลหะหนักที่มีวาเลนซ์ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป การเกิดอนุมูลอิสระในขั้นเริ่มต้นนี้ ยังเกิดจากไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของลิพิดที่มีอยู่ในปริมาณน้อยมาก (trace quantity) และมีการแตกตัวให้อนุมูลอิสระ ดังสมการ 2 และสมการ 3



(2) ขั้นเกิดปฏิกิริยาแบบพิกวน (propagation) ขั้นตอนนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนแรกจะ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และไฮโดรเปอร์ออกไซด์ขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังสมการ 4 และสมการ 5 จึงทำให้มีการเพิ่มปริมาณไฮโดรเปอร์ออกไซด์อย่างรวดเร็วในขั้นตอนนี้



เปอร์ออกไซด์หรือไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น เป็นผลิตภัณฑ์ขั้นต้นที่ไม่เสถียร หรือ รสชาติ แต่จะแตกตัวต่อไปได้แอสดีไฮด์ คีโตน กรดอินทรีย์ และแอลกอฮอล์หลากหลายชนิด ผสมผสานกัน ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์แก่อาหาร

(3) ขั้นสิ้นสุดปฏิกิริยา (termination) เมื่อไม่มีกรดไขมันที่จะก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องอีก อนุมูลอิสระที่เหลืออยู่จะจับกันเอง ดังสมการ 6, 7 และ 8 ทำให้การเกิดเปอร์ออกไซด์สิ้นสุดลง



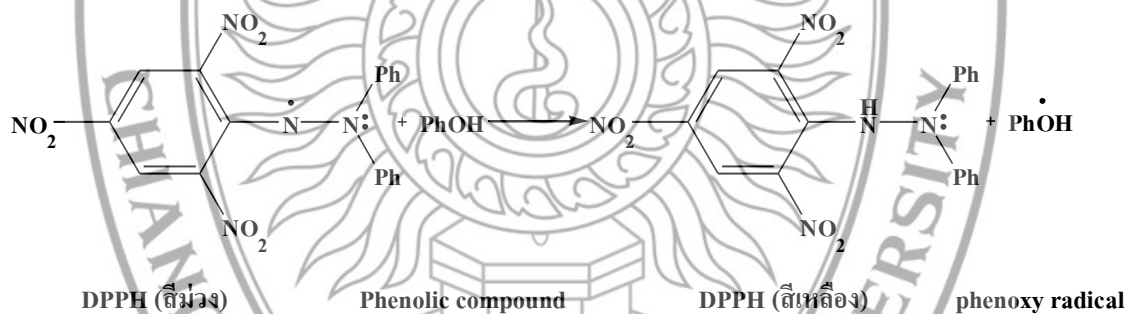
2.1.7 วิธีการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1.7.1 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity

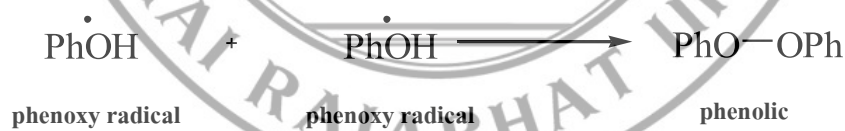
ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ ในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรในสารละลาย (นิยมใช้ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระมาก เพราะใช้งานง่าย) โดยในการทดสอบนี้จะใช้ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนด ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีความยาวคลื่น 517 nm จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้น การลดลงของความเข้มข้นของ DPPH บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (โอภา วัชรคุปต์, 2549)

สำหรับกลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบฟีนอล แสดงดังรูป 2.16 เกิดจากการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบฟีนอล โดยที่อนุมูลอิสระ DPPH ในสารละลายจะมีสีม่วง เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH จะได้เป็นสาร DPPH ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระต่อไป ซึ่งจะเห็นมีสีเหลืองนวล (ขั้นที่ 1) ส่วน phenoxy radical ที่เกิดขึ้นจะจับกัน ทำให้ปฏิกิริยาถูกชะของการเกิดอนุมูลอิสระหมดไป (ขั้นที่ 2) (Amic *et al*, 2003)

ขั้นที่ 1



ขั้นที่ 2



รูป 2.16 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบฟีนอล
ที่มา : Amic *et al*, (2003)

IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง 50% ซึ่งคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ ที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ 50% (Choavanalikit, 2004)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถทำได้ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน ข้อด้อยของวิธีนี้ คือ อนุมูลอิสระของ DPPH มีความคงตัว ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้น วิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลอิสระที่ความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH ที่แสดงจะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่ฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลอิสระ หรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริงต่างๆ ที่สารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซิ นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH จางลงได้อีกด้วย (โอภา วัชรคุปต์, 2549)

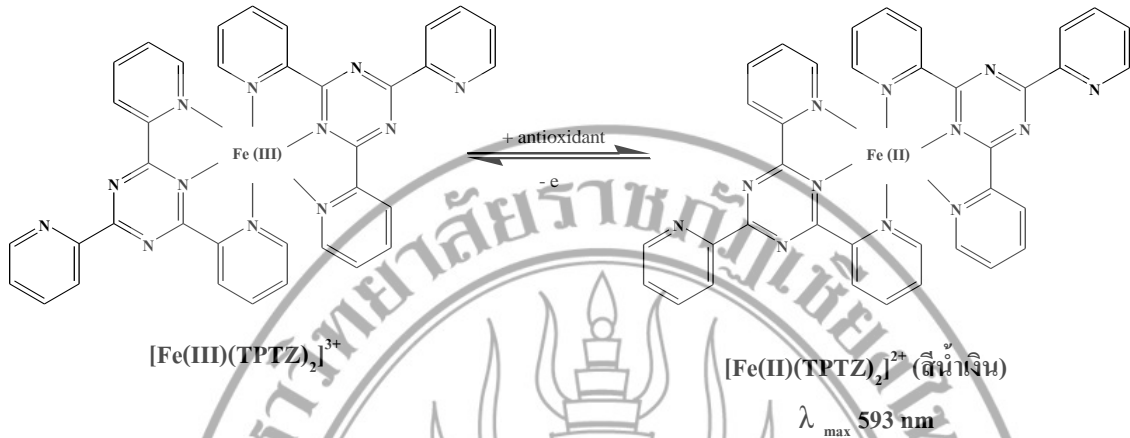
2.1.7.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (reducing power assay)

สารที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ สามารถถ่ายอิเล็กตรอนให้กับอะตอมหรือโมเลกุลในตระกูลของโลหะที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ เช่น เหล็ก ทองแดง เป็นต้น เหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆ ได้ดี ในด้านชีวเคมี อนุมูลอิสระที่พบมากที่สุดเป็นสารที่มีออกซิเจนและไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species, ROS) ไอออนอิสระของเหล็กสามารถเป็นตัวเร่งการเกิด ROS เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (HO_2^{\cdot}) และอนุมูลไฮดรอกซิล (HO^{\cdot}) เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของแต่ละสารที่สกัดได้ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเฟอร์ริกไอออนกับสารสกัดแต่ละชนิดมีค่าคงที่ และค่าของการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีความยาวคลื่น 700 nm จากเครื่องมือวิเคราะห์สาร โดยใช้หลักการทางสเปกโทรสโกปี (UV-Vis spectroscopy) จะมีค่าแปรผันตามความเข้มข้นของเฟอร์รัสไอออนที่เกิดขึ้น ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงจึงบ่งบอกได้ถึงความสามารถของการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์

2.1.7.3 วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เป็นวิธีวิเคราะห์หาค่า total antioxidant capacity (TAC) โดยตรง มีหลักการว่าสารต้านออกซิเดชันในร่างกาย ทำหน้าที่ในการให้อิเล็กตรอนจึงจัดเป็นสารรีดิวซ์ ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่า TAC เป็นความสามารถรวมในการรีดิวซ์ วิธีนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์ริก Fe^{3+} -TPTZ (ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบอะตอมเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านออกซิเดชันได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ

เหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+} -TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm แสดงดังรูป 2.17 (โอภา วัชรคุปต์, 2549)



รูป 2.17 การรีดิวซ์จากเหล็กเฟอร์ริก Fe^{3+} -TPTZ เป็นเหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+} -TPTZ ที่มา : โอภา วัชรคุปต์ (2549)

วิธี FRAP จะทำในสภาวะกรดที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.6 เพื่อให้เหล็กละลายได้ เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดที่พีเอชต่ำ หรือเป็นกรดจะลดค่าความต่างศักย์ ในการแตกตัวเป็นไอออน ทำให้เร่งการส่งผ่านอิเล็กตรอน และเพิ่มค่าความต่างศักย์รีดอกซ์ โดยค่าจากวิธี FRAP ส่วนใหญ่จะไม่สัมพันธ์กับค่าที่หาโดยวิธีอื่น ซึ่งเกิดได้อย่างรวดเร็วภายใน 4-6 นาที แต่ในการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันจากพืชจำพวกพอลิฟีนอล จะพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm จะเพิ่มขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ ดังนั้น การวัดครั้งเดียวตามเวลาที่กำหนด อาจไม่ใช่ค่าที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ วิธี FRAP มีข้อดี คือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ แต่มีข้อเสีย คือ กลไกของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกในร่างกาย (โอภา วัชรคุปต์, 2549)

2.1.7.4 การศึกษาสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ด้วยวิธี ferric thiocyanate (FTC) method

สำหรับกรดลิโนเลอิกและกรดลิโนเลนิกเป็นกรดไขมัน ที่มีคาร์บอนไม่อิ่มตัวมากกว่า 1 ตำแหน่ง มีโครงสร้างพันธะคู่แบบ 1, 4 เพนตะไดอิน ไฮโดรเจนที่สูญเสียได้ง่าย จึงเป็นไฮโดรเจนของคาร์บอนที่อยู่กึ่งกลางระหว่างพันธะคู่ เนื่องจากถูกกระตุ้นจากพันธะคู่ทั้ง 2 ด้าน การสูญเสียไฮโดรเจนดังกล่าว ทำให้ระบบโครงสร้างมีการจัดเรียงโมเลกุลใหม่ ทำให้พันธะคู่จัดเรียงใหม่เป็นระบบคอนจูเกต ซึ่งมีเสถียรภาพดีขึ้น ดังนั้นคาร์บอนที่ตำแหน่งที่มีพันธะคู่แบบคอนจูเกตจึงไม่เกิดอนุมูลอิสระ แต่จะเกิดอนุมูลอิสระขึ้นที่คาร์บอนที่อยู่ติดกับคาร์บอนที่มีพันธะคู่ บริเวณที่ไม่ใช่ระบบคอนจูเกต กรดลิโนเลอิกจึงเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 13 แสดงดังรูป 2.18 ส่วนกรดลิโนเลนิกเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์

ที่คาร์บอนตำแหน่ง 9, 12, 13 และ 16 แสดงดังรูป 2.19 โดยไฮโดรเปอร์ออกไซด์เหล่านี้แตกสลายตัวไปได้ แอลดีไฮด์และกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ (ปราณี วราสวัสดิ์, 2550)

การเกิดเปอร์ออกไซด์หรือไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาขั้นตอนแรกของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถวัดได้จากปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ หรือวัดค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value, PV) ซึ่งจะพบว่าในขั้นตอนแรกปฏิกิริยาจะเกิดอย่างช้าๆ ในอัตราเร็วที่สม่ำเสมอ เรียกว่า ระยะเหนี่ยวนำ (induction period) หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่สองซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดอัตราเร่งอย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดกลิ่นรสแก่อาหารไขมันนั้นๆ (ปราณี วราสวัสดิ์, 2550)



รูป 2.18 การเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของกรดลิโนเลอิก
ที่มา : ปราณี วราสวัสดิ์ (2550)

รูป 2.19 การเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของกรดลิโนเลนิก
ที่มา : ปราณี วราสวัสดิ์ (2550)

การตรวจสอบโดยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี เป็นการตรวจหาปริมาณไอออนของเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ที่ได้จากการออกซิไดซ์ของไอออนเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ด้วยเปอร์ออกไซด์ โดยมี xylinol orange ซึ่งจะรวมตัวกับไอออนของเฟอร์ริกเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีชมพูจนถึงสีม่วง เมื่อมีปริมาณเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm เมื่อมีสีเปลี่ยนเป็นสีม่วง ดังนั้นจึงควรเตรียมสารละลายตัวอย่าง และสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นของไอออนเฟอร์ริกอยู่ในช่วง 5 ถึง 20 μg เพื่อลดความคลาดเคลื่อน วิธีนี้สามารถวัดได้ละเอียดกว่าวิธีการไทเทรตกับไอโอดีน คือ สามารถตรวจสอบปริมาณเปอร์ออกไซด์ได้ถึงระดับ 0.1 mg ต่อตัวอย่าง 1 Kg (ปราณี วราสวัสดิ์, 2550)

เนื่องจากเปอร์ออกไซด์ เป็นสารที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงมีปริมาณเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในช่วงเริ่มต้นที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้น แต่เมื่อมีปริมาณและเวลานานขึ้น เปอร์ออกไซด์จะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องได้สารต่างๆ เกิดขึ้นหลายชนิด จึงมีปริมาณเปอร์ออกไซด์ลดลง ดังนั้นการตรวจหาปริมาณเปอร์ออกไซด์เพียงชนิดเดียว จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการสรุประดับการเกิดออกซิเดชันของลิพิดได้จึงต้องมีการตรวจหาปริมาณสารที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องจากเปอร์ออกไซด์ ซึ่งส่วนใหญ่ คือ แอลดีไฮด์ การประเมินหาปริมาณแอลดีไฮด์ทำได้โดยวิธีหาค่าแอนนิซิดิน (anisidine value) หรือหาค่า thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) หรือหาปริมาณสารคาร์บอนิลซึ่งเป็นปริมาณโดยรวมของทั้งแอลดีไฮด์ คีโตน และกรดอินทรีย์ เป็นต้น หรืออาจใช้วิธีโครมาโทกราฟีในการหาปริมาณแอลดีไฮด์ (ปราณี วราสวัสดิ์, 2550)

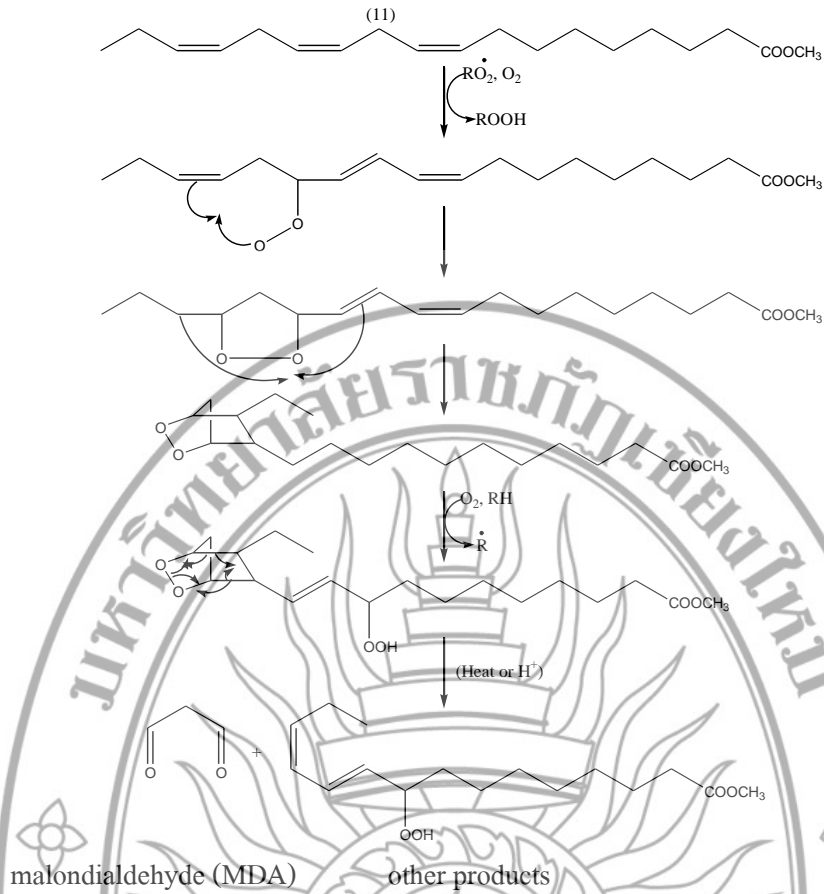
Ko *et al.* (2010) ได้ศึกษาผลของแอลฟา-, เบตา-, แกมมา-, และเดลตา-โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลต่อการยับยั้งการเกิด autoxidation ของ conjugated linoleic acid (CLA) ปฏิกิริยา autoxidation ของ CLA เกิดขึ้นในที่มืด ณ อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 21 วัน ทำการวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value : PV) และค่า thiobarbituric acid (thiobarbituric acid value : TBA value) นอกจากนี้ในช่วง 21 วันของการเกิดปฏิกิริยา วิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีอนุพันธ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค HPLC จากการทดลองพบว่า แกมมา-โทโคเฟอรอล มีสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกสูงที่สุด เนื่องจากมีปริมาณเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอนุพันธ์อื่นๆ ของโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอีนอล โดยลำดับของสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก คือ แกมมา-โทโคเฟอรอล > เดลตา-โทโคเฟอรอล = เดลตา-โทโคไตรอีนอล \geq แกมมา-โทโคไตรอีนอล > เบตา-โทโคเฟอรอล = เบตา-โทโคไตรอีนอล > แอลฟา-โทโคเฟอรอล = แอลฟา-โทโคไตรอีนอล ซึ่งแอลฟา-โทโคเฟอรอล และ แอลฟา-โทโคไตรอีนอล มีอัตราการลดลงเร็วกว่า วิตามินอีอนุพันธ์อื่นๆ ขณะที่ เดลตา-โทโคเฟอรอลมีความคงตัวสูงที่สุดในช่วงระยะเวลาของการเกิดปฏิกิริยา autoxidation ของ CLA นอกจากนี้ยังพบว่า วิตามินอีทั้ง 8 อนุพันธ์ มีสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกโดยยับยั้งการเกิดมาลอนไดแอลดีไฮด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกซิเดชันอันดับที่สอง โดยที่แอลฟา- และเบตา- โทโคไตรอีนอล มีสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกซิเดชันอันดับที่สอง ของกรดลิโนเลอิกสูงกว่า แอลฟา- และเบตา- โทโคเฟอรอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ขณะที่วิตามินอีอนุพันธ์อื่นๆ

ได้แก่ แกมมา-โทโคเฟอรอล, แกมมา-โทโคไตรอินอล, เดลตา-โทโคเฟอรอล และเดลตา-โทโคไตรอินอลมีสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันอันดับที่สองของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

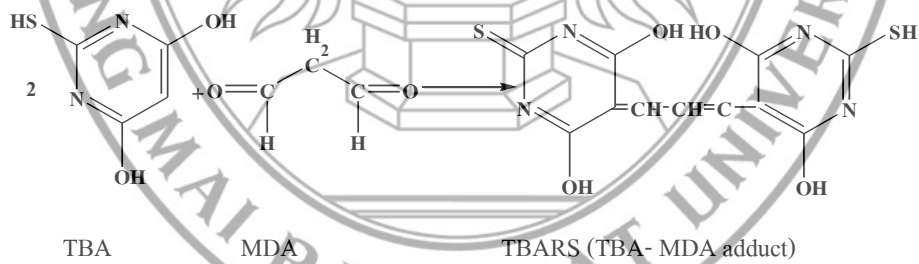
conjugated linoleic acid (CLA) เป็นกรดไขมันอีกรูปแบบหนึ่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน แต่มีโครงสร้างแตกต่างกันที่ตำแหน่งพันธะคู่ในโครงสร้างหลัก CLA เป็นกรดไขมันจำเป็น ซึ่งร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ ต้องได้รับจากการรับประทานเพียงอย่างเดียวเท่านั้น CLA พบได้ในเนื้อสัตว์สีแดง นม น้ำมันเมล็ดทานตะวัน น้ำมันดอกคำฝอย เป็นต้น การศึกษาพบว่า CLA ช่วยลดไขมันส่วนเกินได้โดยการ เร่งการเผาผลาญพลังงานในร่างกาย ช่วยเสริมสร้างมวลกล้ามเนื้อขึ้นมาแทนที่เซลล์ไขมัน ทำให้รูปร่างกระชับได้สัดส่วนมากขึ้น โดย CLA ที่ให้ผลในการลดไขมันส่วนเกินจะต้องอยู่ในรูป active form 2 รูปแบบ คือ 9c,11t-CLA (rumenic acid) และ 10c,12t-CLA ซึ่ง 9c,11t-CLA ยังมีสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งอีกด้วย นอกจากนี้ CLA ยังมีสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน โดยเป็น prooxidant

2.1.7.5 การวิเคราะห์ปริมาณการเกิดมาลอนไดแอลดีไฮด์ โดยวิธี 2-thiobarbituric acid (TBA) assay

เป็นวิธีวิเคราะห์โดยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรี ในการตรวจวัดสารที่เกิดขึ้น จากการแตกตัวเปอร์ออกไซด์ โดยเน้นแอลดีไฮด์ที่ได้จากกรดไขมัน ที่มีคาร์บอนไม่อิ่มตัวมากกว่า 2 ตำแหน่ง คือ มาลอนไดแอลดีไฮด์ (MDA) เป็นหลัก ปฏิกิริยาการเกิดมาลอนไดแอลดีไฮด์ แสดงดังรูป 2.20 เป็นการตรวจวัดสารมีสีชมพูถึงแดงที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดแอลดีไฮด์จำนวน 1 M กับ 2-thiobarbituric acid (TBA) จำนวน 2 M แสดงดังรูป 2.21 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่เกิดขึ้นที่ 532 nm และสามารถทำได้หลายวิธี คือ วิธีที่ 1 เป็นการทำให้ปฏิกิริยาระหว่าง TBA กับแอลดีไฮด์ที่ได้จากอาหาร โดยการใช้กรดไตรคลอโรอะซิติก หรือกรดอะซิติกเป็นสารสกัด วิธีที่ 2 เป็นการทำให้ปฏิกิริยาระหว่างแอลดีไฮด์ที่ได้จากส่วนหนึ่งของสารที่สกัดจากตัวอย่าง โดยการกลั่นด้วยน้ำภายใต้สภาวะที่เป็นกรดกับ TBA วิธีที่ 3 เป็นวิธีวิเคราะห์โดยใช้ไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหาร สำหรับการเตรียมสารละลาย TBA ในอดีตเตรียมในกรดน้ำส้มเข้มข้น (glacial acetic acid) แต่ปัจจุบันใช้วิธีละลายในน้ำ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในอดีตเรียกว่า thiobarbituric acid number (TBA) โดยระบุเป็นจำนวน mg หรือ μM ของมาลอนไดแอลดีไฮด์ต่อ Kg ของตัวอย่าง หรือต่อ 1 g ของน้ำมันหรือไขมัน แต่เนื่องจากแอลดีไฮด์ที่เกิดขึ้น และสกัดได้ไม่ใช่เฉพาะมาลอนไดแอลดีไฮด์ชนิดเดียว ยังมีแอลดีไฮด์ชนิดอื่นที่ทำปฏิกิริยากับ TBA แล้วให้สีเช่นเดียวกับมาลอนไดแอลดีไฮด์ ปัจจุบันจึงระบุเป็นค่า TBARS และมีหน่วยเทียบเท่ากับ mg ของมาลอนไดแอลดีไฮด์ต่อ Kg ตัวอย่าง แต่ละวิธีอาจตรวจสอบได้ค่า TBA ที่แตกต่างกัน รวมทั้งอาจจะมีสารอื่นที่ไม่เกี่ยวกับปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดเกิดปฏิกิริยา เช่นเดียวกันจึงควรวิเคราะห์ และทำกราฟมาตรฐาน และหาร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ด้วย (ปราณี วราสวัสดิ์, 2550)



รูป 2.20 การเกิดมาลอนไดไฮดรอลดีไฮด์
ที่มา : ปราณี วราสวัสดิ์ (2550)



รูป 2.21 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดไฮดรอลดีไฮด์กับ TBA
ที่มา : โอภา วัชรกุลป์ (2549)

การหาปริมาณการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยใช้ปริมาณ MDA เป็นดัชนีชี้วัด มีข้อด้อย คือ ความไม่เฉพาะเจาะจง โดย MDA ไม่เป็นสารเฉพาะที่ได้จากการเกิดลิพิดเปอร์-ออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ สาร TBARS ที่เกิดจากกรดไทโอบาร์บิทูริกเป็นปฏิกิริยาที่ไม่เฉพาะเจาะจงกับ

MDA เพราะสารหลายชนิด เช่น น้ำตาล สามารถทำปฏิกิริยากับกรดโทไอบารบีบูริก เกิดเป็นสารมีสีได้ เช่นเดียวกัน ดังนั้น MDA จึงเป็นวิธีที่ไม่เฉพาะเจาะจง เนื่องจากวิธีนี้ทำได้ง่าย สะดวก และไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาสูง MDA จึงยังคงเป็นที่นิยมใช้เป็นดัชนีวัดภาวะออกซิเดชันของร่างกาย และมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้มีความเฉพาะเจาะจงโดยการวัดแสงฟลูออ-เรสเซนส์ หรือการใช้เครื่อง LC หรือ LC-MS (โสภา วัชรคุปต์, 2549)

Kim (2005) ได้ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และแอนติออกซิแดนท์แอคติวิตีของวิตามินอีในรำข้าว โดยวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีต่ออนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ที่ความเข้มข้นของวิตามินในช่วง 2.5-640 mg/kg และศึกษาสมบัติความเป็นแอนติออกซิแดนท์ โดยการใช้ reducing power method และ ferric thiocyanate method (FTC) ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 10, 40 และ 160 mg/kg จากผลการทดลองพบว่าค่าการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของวิตามินอีเพิ่มสูงขึ้น และมีค่าคงที่ตั้งแต่ความเข้มข้นของวิตามินอีที่ 160 mg/kg ขึ้นไป นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นของวิตามินอีที่ 160 mg/kg ยังมีค่าการยับยั้งการเกิด peroxidation ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง และเมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินอีที่สกัดจากรำข้าวที่ความเข้มข้น 160 mg/kg กับสารประกอบฟีนอลสังเคราะห์ทั้ง butylated hydroxytoluene (BHT, 160 mg/kg) และ butylated hydroxyanisole (BHA, 160 mg/kg) พบว่าค่า Superoxide radical scavenging activity และ antioxidant activity ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

Ahmed *et al.* (2005) ศึกษาเอกลักษณ์และปริมาณของโทโคเฟอรอล โทโคไตรอีนอล และพลาสโตโครมานอล-8 (plastochromanol-8) ในน้ำมันคาโนลา (canola oil) น้ำมันโซลีน (solin oil) เมล็ดแฟลกซ์ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันดอกทานตะวัน โดยวิธี Fourier transform infra-red (FT-IR) และหาปริมาณด้วย HPLC บน silica column ด้วย t-บิวทิลเมทิล อีเทอร์ (t-butylmethyl ether) ในเฮกเซน (5% v/v) เป็น mobile phase ที่อุณหภูมิ 30°C อัตราการไหล 0.7 mL/min จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณโครมานอล (chromanol) รวม (แอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล พลาสโตโครมานอล-8 และแอลฟา-โทโคไตรอีนอล) ในน้ำมันคาโนลา 4 ตัวอย่าง เท่ากับ 436, 598, 557 และ 681 mg/kg ตามลำดับ โดยน้ำมันคาโนลามีแอลฟา- และแกมมา-โทโคเฟอรอลสูง แต่ไม่พบแอลฟา-โทโคไตรอีนอล สำหรับน้ำมัน โซลีน 5 ตัวอย่าง มีปริมาณโครมานอลรวม เท่ากับ 375, 259, 375, 338 และ 287 mg/kg ตามลำดับ โดยพบแกมมา-โทโคเฟอรอล และพลาสโตโครมานอล-8 ในปริมาณสูง สำหรับน้ำมันถั่วเหลือง 4 ตัวอย่างนั้น มีปริมาณโครมานอลรวม เท่ากับ 933, 1181, 1098 และ 686 mg/kg ตามลำดับ โดยมีแกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอลสูง แต่ไม่พบพลาสโตโครมานอล-8 และแอลฟา-โทโคไตรอีนอล สำหรับน้ำมัน ดอกทานตะวัน 4 ตัวอย่าง มีปริมาณโครมานอล เท่ากับ 1006, 1108, 811 และ 648 mg/kg ตามลำดับ โดยพบแอลฟา-โทโคเฟอรอลสูงที่สุด แต่ไม่พบเดลตา-โทโคเฟอรอล พลาสโตโครมานอล-8 และแอลฟา-โทโคไตรอีนอล

Che Man *et al.* (2005) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-โทโคเฟอรอลในน้ำมันปาล์มโอเลอินที่ผ่านกระบวนการรีไฟน์ การฟอกสี และการกำจัดกลิ่น โดยวิธี Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ซึ่งวิธีนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้นในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความรวดเร็วสามารถทำได้โดยอัตโนมัติ และลดความจำเป็นในการใช้ตัวทำละลาย และสารพิษที่มีในน้ำมันปาล์มโอเลอินที่ถูกออกซิไดส์ด้วยความร้อน มากกว่านั้น FTIR ยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์ iodine value, peroxide value, ปริมาณความชื้นในน้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มผ่านการรีไฟน์ และสารอัลฟาทอกซินใน groundnut และ groundnut cake เป็นต้น การวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-โทโคเฟอรอลในน้ำมันปาล์มโอเลอินด้วย FTIR สามารถทำได้โดยเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการทำ calibration และ validation ด้วยการ spiking แอลฟา-โทโคเฟอรอลที่ทราบปริมาณเพื่อเตรียมความเข้มข้นของแอลฟา-โทโคเฟอรอลให้สูงถึง 2000 mg/kg FTIR ทำบน sodium chloride (NaCl) windows และ transmission path ที่ 50 μm ณ อุณหภูมิห้อง ใช้ partial least squares (PLS) calibration models สำหรับทำนายแอลฟา-โทโคเฟอรอลที่เกิดขึ้นโดยใช้ FTIR spectral ในช่วง $3100\text{-}2750\text{ cm}^{-1}$ วิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ FTIR ด้วยการเปรียบเทียบกับ HPLC ที่มีสัมประสิทธิ์ของการวิเคราะห์ (R^2) จากตัวอย่างสำหรับการ calibration เท่ากับ 0.9922

