ระบบหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

วท/ร 79770
ก145

การศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนจากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Quantitative Study of Isoflavone from Soybean Product by High Performance Liquid Chromatography

สุทิน สมมิตร
สุปราณี พลสอน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

หอสมุดสถาบันราชภัฏมหาสารคาม
วันที่ 3 ธ.ค. 2550
เลขทะเบียน 3 76361
เลขเรียกหนังสือ 543.089 ส443ก 2550

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
ปี พ.ศ. 2550

โครมาโตกราฟี
ถั่วเหลือง -- ไอโซฟลาโวน

คณะกรรมการสอบได้พิจารณาโครงงานวิจัยฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามได้

คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน

(อาจารย์เมตตา เฉาว์ชาลี)

.....กรรมการ

(ดร. เนตรชนก จันทร์สว่าง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศรินทร์ ทองธรรมชาติ)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี อนุมัติให้รับโครงการวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

.....

(รองศาสตราจารย์นิตยา แซ่ซิ้ม)

หัวหน้า สาขาวิชาเคมี

.....

(อาจารย์สมาน ศรีสะอาด)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วันที่ เดือน มีนาคม พ.ศ. 2550

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความกรุณา ของอาจารย์เมตตา เถาว์ชาลี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยและคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือให้แนวคิดต่าง ๆ ตลอดจนคำแนะนำจนการศึกษาวิจัยเสร็จสมบูรณ์ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีที่คอยช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับการทดลอง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม เจ้าหน้าที่หอสมุดกลางมหาวิทยาลัยมหาสารคาม และเจ้าหน้าที่หอสมุดกลางมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวก ในการค้นคว้าข้อมูล

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดาที่เมตตาให้ความอุปการะกำลังทรัพย์สนับสนุนการศึกษาและคอยให้กำลังใจตลอดมา

คุณค่าและเกียรติใด ๆ อันพึงมีในโครงการวิจัยนี้ คณะวิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตา แด่คุณบิดา มารดา บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุทิน สมมิตร
สุปราณี พลสอน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ชื่อเรื่อง การศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนจากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ชื่อผู้วิจัย นายสุทิน สมมิตร
นางสาวสุปราณี พลสอน
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์เมตตา เถาว์ชาลี

โปรแกรม วิชาเคมี
คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ระดับ ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
ปีที่พิมพ์ 2550

บทคัดย่อ

การศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนจากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง จำนวน 3 ชนิด 27 ตัวอย่าง โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และใช้ตัวตรวจวัดชนิดยูวี ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 259 นาโนเมตร การวิเคราะห์ใช้คอลัมน์ชนิดรีเวิร์สเฟส C18 (4.6x250 มิลลิเมตร) และเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลและน้ำ ในอัตราส่วน 70: 30 โดยปริมาตร พบว่าตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชที น้ำเต้าหู้ และเต้าหู้ถั่วเหลือง มีปริมาณไอโซฟลาโวน (จีนีสติน) 3.1347, 7.2723 และ 3.7228 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษานี้พบว่าปริมาณในน้ำเต้าหู้มีมากกว่าในเต้าหู้ถั่วเหลืองและเต้าหู้ถั่วเหลืองมีมากกว่าในนมถั่วเหลืองยูเอชที นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไอโซฟลาโวนที่มีกระบวนการผลิตที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

คำสำคัญ : โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, ไอโวฟลาโวน, จีนีสติน, ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Research Title	Quantitative Study of Isoflavone from Soybean Products by High Performance Liquid Chromatography
Authors	Mr Sutin Sommitr Miss Supranee Ponsorn
Advisor	Mrs Metta Thaochalee
Department	Chemistry
Faculty	Science and Technology
Degree	Bachelor's Degree of Science (Chemistry)
University	Rajabhat Maha Sarakham University
Year	2007

Abstract

This research aims to quantity study from soybean products 3 kind amounts are 27 examples. By High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and use UV detector at wave lengths 259 nm, column reverses phase C 18 (4.6 x 250 mm) and mobile phase methanol and water ratios 70: 30 (v/v). It was found that example UHT soymilk, fresh soymilk and soybean tofu there are quantities Isoflavone (genistien) 3.1347, 7.2723 and 3.7228 mg/L respectively. This study found that the quantity in the fresh soymilk abounds more in soybean tofu and soybean tofu abound more in UHT soymilk. Furthermore, the research was also found that the quantities of Isoflavone produced with different process were statistically different at the 0.01 level.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Key words: High Performance Liquid Chromatography, Isoflavone, Genistien, Soybean products

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 สมมติฐานงานวิจัย	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.6 ระเวลาในการทำวิจัย	3
1.7 สถานที่ทำโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ฟลาโวนอยด์	4
2.2 ประโยชน์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์	6
2.3 แหล่งที่พบฟลาโวนอยด์	7
2.4 ไอโวฟลาโวน	8
2.5 ไฟโตเอสโตรเจน	9
2.5.1 บทบาทของไฟโตเอสโตรเจน	12
2.5.2 แหล่งของไฟโตรเอสโตรเจนในอาหาร	13
2.5.3 การออกฤทธิ์ของไฟโตรเอสโตรเจน	14

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.4 ปริมาณไฟโตรเอสโตรเจนที่ควรได้รับ	14
2.5.5 ประโยชน์ของไฟโตรเอสโตรเจน	14
2.6 ถั่วเหลือง	15
2.6.1 ถั่วเหลืองกับการต้านมะเร็ง	16
2.6.2 ผลของถั่วเหลืองต่อโรคมะเร็งชนิดต่างๆ	16
2.6.5 สารสำคัญในถั่วเหลืองที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็ง	18
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	22
3.1 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	22
3.2 สารเคมีและสารตัวอย่าง	23
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 ผลการทดลอง	28
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปราย และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	36
5.2 อภิปรายผลการทดลอง	36
5.3 ข้อเสนอแนะ	37
บรรณานุกรม	38
ภาคผนวก	40
ประวัติผู้วิจัย	54

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 หมู่ฟังก์ชันแนลของไอโซฟลาโวนคอนจูเกท	8
ตารางที่ 2.2 ปริมาณของไอโซฟลาโวนต่ออาหารเหล่านี้ปริมาณ 100 กรัม	10
ตารางที่ 2.3 สารที่ได้จากลิกแนน (lignans)ในแหล่งอาหารต่าง ๆ	11
ตารางที่ 3.1 ระบบของโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(HPLC) ที่ใช้	26
ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง	33
ตารางที่ 4.4 ผลร้อยละการกลับคืน	34

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์..... 5

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน(Aglycone)..... 8

ภาพที่ 2.3 ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง..... 15

ภาพที่ 4.1 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร..... 28

ภาพที่ 4.2 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนที่ความเข้มข้น 4, 8 และ 16 มิลลิกรัม/ลิตร..... 29

ภาพที่ 4.3 กราฟมาตรฐานไอโซฟลาโวน..... 30

ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของตัวอย่างเต้าหู้ถั่วเหลือง..... 31

ภาพที่ 4.5 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของนมถั่วเหลืองยูเอชที..... 31

ภาพที่ 4.6 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของตัวอย่างน้ำเต้าหู้..... 32

ภาพที่ 4.7 ตัวอย่างโครมาโตแกรมร้อยละการได้คืนกลับ (%Recovery)..... 34

ภาพที่ ก-1 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu..... 41

ภาพที่ ก-2 ส่วนประกอบสำคัญของเครื่อง HPLC..... 44

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ไอโซฟลาโวน (Isoflavone) เป็นไฟโตเอสโตรเจน(phytoestrogen) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งที่มีในพืช มีโครงสร้างของเคมีคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ร่างกายผลิตขึ้น ดังนั้น สารไฟโตเอสโตรเจนจึงทำหน้าที่ทดแทนฮอร์โมนเอสโตรเจนให้แก่ร่างกายได้โดยไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองนี้มีอยู่ 2 รูปแบบใหญ่ๆ คือเจนีสติน (genistein) และเดอิดซิน(daidzein) ซึ่งจะช่วยลดอาการต่างๆ ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้ เช่น เหงื่อออกเวลากลางคืน ลดอาการวูบวาบตามตัว เป็นต้น นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการสูญเสียเนื้อกระดูกในสตรีวัยหมดประจำเดือน และช่วยลดภาวะของโรคกระดูกพรุน ทั้งนี้มีการศึกษาวิจัยในสตรีชาวญี่ปุ่นที่รับประทานอาหารจากถั่วเหลืองเป็นประจำแสดงอาการของสตรีวัยหมดประจำเดือนน้อยกว่าชาวอเมริกันถึงหนึ่งในสาม นอกจากตัวของไอโซฟลาโวนแล้ว ยังพบว่า การบริโภคโปรตีนจากเนื้อสัตว์สูงจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลเสียต่อความแข็งแรงของกระดูก เนื่องจากมีผลทำให้แคลเซียมถูกขับออกมาในปัสสาวะมากขึ้น กรดอะมิโนที่มีกำมะถันในโมเลกุลคือเมทไทโอนีน และซีสติน เมื่อถูกเมตาโบไลส์จะให้ซัลเฟตและไฮโดรเจน ทำให้ปัสสาวะมากขึ้น กรดมากขึ้นแคลเซียมจึงถูกขับออกมาในปัสสาวะมากขึ้น จากผลการศึกษาพบว่า การบริโภคโปรตีนจากถั่วเหลืองจะช่วยลดการขับแคลเซียมออกมาในปัสสาวะ ซึ่งเป็นปัจจัยอีกประการหนึ่งที่ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน (สุวลี โล่วิรกรณ์ : 2548)

ไอโซฟลาโวนนั้น นอกจากทำหน้าที่เป็นไฟโตเอสโตรเจนแล้ว จากการศึกษาพบว่า ยังเป็นสาร ต้านฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยป้องกันการทำลายของดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งและป้องกันการเจริญเติบโตของเนื้องอก ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งได้ เช่น มะเร็งเต้านม นอกจากนี้ยังลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งในบางอวัยวะ เช่น มะเร็งต่อมลูกหมากในผู้ชาย มะเร็งปอด ลำไส้ และกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ไอโซฟลาโวนยังสามารถยับยั้งกระบวนการสร้างเส้นเลือด ซึ่งเป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับมะเร็งที่จะโตขึ้น และในด้านโรคหัวใจนั้น ไอโซฟลาโวนยังช่วยลดปฏิกิริยาการออกซิเดชั่น ของแอลดีแอล(LDL)และยังยั้งการจับตัวของเกล็ดเลือดที่จะนำไปสู่การลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ (สุวลี โล่วิรกรณ์ : 2548)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารสกัดจากถั่วเหลืองที่มีสารชื่อไอโซฟลาโวน (isoflavone) ซึ่งเป็นสารที่เป็นประโยชน์ในสตรีวัยทอง เพราะออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (phytoestrogen) แต่อ่อนกว่ามาก จะช่วยเพิ่มมวลกระดูก (bone mass) ให้หนาแน่นขึ้นโดยลดการละลายแคลเซียมออกจากกระดูก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ทำให้สหรัฐอเมริกาที่รายงานว่าผู้ชายที่รับประทานอาหารที่ทำจากถั่วเหลือง จะสามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเป็น มะเร็งต่อมลูกหมาก และลดการเกิดภาวะหัวล้านได้อีกด้วย คณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นประโยชน์ในการบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง ที่มีคุณค่าสูง ราคาถูก ทำเองได้ สามารถใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับเด็กที่มีปัญหาการขาดโปรตีนและพลังงานได้ จึงได้มีการศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่มีกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นประโยชน์ในการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองให้ได้คุณค่าสูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง
2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารไอโซฟลาโวนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองที่มีกระบวนการผลิตแตกต่างกัน

1.2 สมมติฐาน

การแปรรูปผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองด้วยกระบวนการที่ต่างกัน ดังนั้นปริมาณไอโซฟลาโวน (isoflavone) มีความแตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

1. การสกัดสารไอโซฟลาโวนน้ำเต้าหู้ นมถั่วเหลืองยูเอชที (UHT) และเต้าหู้ถั่วเหลืองในอำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม
2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารไอโซฟลาโวนโดยใช้โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบปริมาณสารไอโซฟลาโวนที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง
2. เป็นแนวทางให้ผู้บริโภคได้เลือกบริโภคสิ่งที่มีประโยชน์
3. เป็นแนวทางในการศึกษาสรรพคุณของพืชที่มีอยู่ในประเทศไทย

1.6 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ใช้เวลา 8 เดือน (มีนาคม 2549- ตุลาคม 2549)

1.7 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเคมี ชั้น 3 อาคารศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

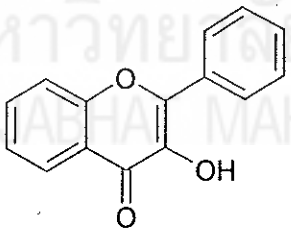
2.1 ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารจำพวกโพลีฟีโนลิก (polyphenolic compounds) ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีสีในส่วนต่างๆของพืชโดยเฉพาะในดอกและใบ สีที่พบแตกต่างกันไป เช่น สีแดง สีเหลือง สีม่วง และสีน้ำเงิน เป็นต้น สารกลุ่มนี้เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบได้ในพืชทั่วไป พบได้ทั้งในรูปไกลโคไซด์และอะไกลโคน ถ้าอยู่ในรูปไกลโคไซด์มักเป็นสารสีซึ่งละลายน้ำได้ดี พบในน้ำเลี้ยงเซลล์ (cell sap) ส่วนใหญ่เป็น O – glycosides สำหรับ C – glycosides พบเป็นจำนวนน้อย ถ้าอยู่ในรูป อะไกลโคน มักพบในเนื้อไม้

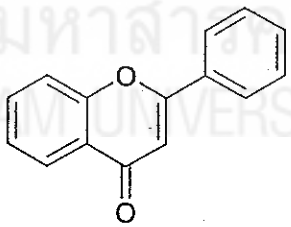
โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม มีการจัดเรียงตัวแบบ C_6-C_3-C_6 โดยคาร์บอนที่เป็น C_6 ทั้งสองจะเป็นวงแหวนเบนซีน

สามารถจำแนกชนิดต่างๆของฟลาโวนอยด์ได้กว้างๆเป็น 12 ชนิด คือ ฟลาโวนอล(flavonol) ฟลาโวน (flavone) แอนโธไซยานิน (anthocyanin) ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ฟลาวาโนน (flavanone) ชาลโคน (chalcone) ไดไฮโดรชาลโคน (dihydrochalcone) ฟลาวาโนนอล (flavanonol) ลิวโคแอนโธไซยานิดิน (leucoanthocyanidin) ออโรน (aurone) คาทิซิน (catechin) และ แซนโทน (xanthone)

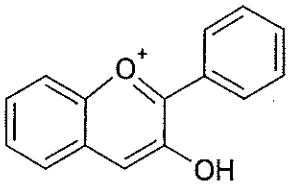
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



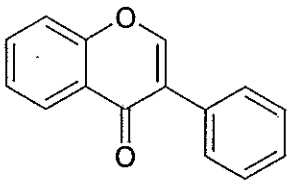
ฟลาโวนอล



ฟลาโวน



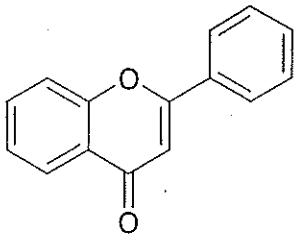
แอนไซยานิน



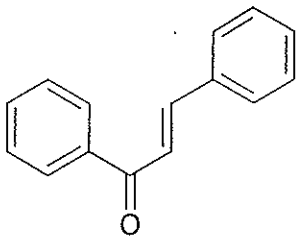
ไอโซฟลาโวน

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์

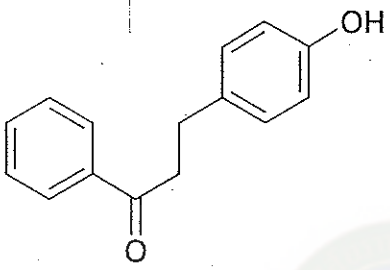
ที่มา : ขวัญใจ กนกเมธากุล, 2535 : 73



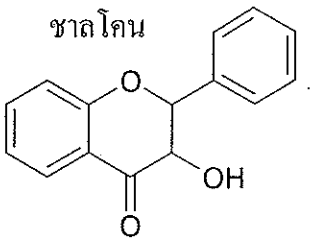
ฟลาวาโนน



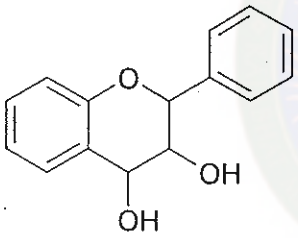
ชาลโคน



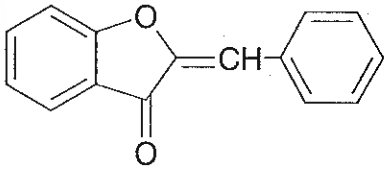
ไดไฮโดรชาลโคน



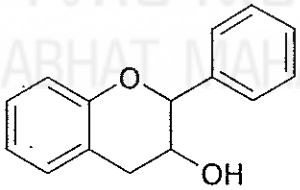
ฟลาวาโนนอล



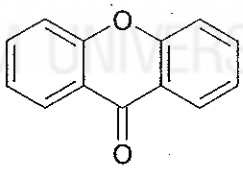
ลิวโคแอนโธไซยานิดิน



ออโรน



คาทิซิน



แซนโทน

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์

ที่มา : ขวัญใจ กนกเมธากุล, 2535 : 73

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.2 ประโยชน์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ มีบทบาทสำคัญในสิ่งมีชีวิต ดังนี้

(1) เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ซึ่งจำเป็นมากในเซลล์สิ่งมีชีวิต

(2) เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ และเป็นสารตั้งต้นของสารพิษต่างๆ เช่น โฟริดซีน สลายตัวให้พาราคูมาริกแอซิด (p-coumaric acid) และ โฟลโรกลูซินอล (phoroglucinol) เบตากลูโคไซด์ (ß -glucoside) ซึ่งสามารถเป็นตัวยับยั้งต่อการหายใจได้เช่นเดียวกับ โฟริดซีน

(3) เป็นสารที่ก่อให้เกิดสีต่างๆในพืช

(4) เป็นตัวกั้นแสง เพราะฟลาโวนอยด์ค่อนข้างคงตัวในช่วงของความยาวคลื่นของวิสิเบิล และ อัลตราไวโอเลต

(5) ป้องกันพืชจากสารพิษโดยเฉพาะพวก เมทอกซีเลสฟลาโวนอยด์ (methoxylated flavonoid) สามารถฆ่าโปรโตซัวได้

(6) ฟลาโวนอยด์มีส่วนควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

(7) ใช้ในแง่เภสัช เช่น ลิวโคแอนโธไซยานิน บางตัวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ Salmonella, Shigella, Aerobacter aerogenes พวกแซนโคน มีฤทธิ์ฆ่าพยาธิ ยับยั้งไวรัส

(8) ฟลาโวนอยด์บางชนิดช่วยเพิ่มความต้านทานให้กับเส้นเลือดฝอย ได้แก่ ฟลาวาโนน ฟลาโวนอล ไอโซฟลาโวน คาทิชิน ฟลาวาไดออล

(9) ฟลาโวนอยด์บางชนิดช่วยบำรุงตับ เช่น ซาลโคน และ คาทิชิน

(คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล, 2533 : 122)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.3 แหล่งที่พบฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์พบในพืช เป็นอนุพันธ์ของไกลโคไซด์ ช่วยให้เกิดสีน้ำเงิน สีแดงสด และสีส้ม ในใบ ดอกและผล เราสามารถพบฟลาโวนอยด์ได้ทั้งในพืชผักและผลไม้ ดังนี้

(1) ฟลาโวน (flavone) เช่นแอพิจีนิน (apigenin) และ ลูทีโอนิน (luteolin) พบในเมล็ดธัญพืช และสมุนไพรที่มีกลิ่นหอมอย่าง พาร์สลีย์ โรสแมรีย์ และไธม์ ส่วนรูติน (rutin) พบมากในไวน์แดง พืชตระกูลส้ม และผิวของมะเขือเทศ

(2) ฟลาโวนอล (flavonol) เช่น เควอซิติน (quercetin) พบมากในหัวหอมใหญ่ ผักกาดหอม บรอคโคลี มะเขือเทศ ชาไวน์แดง เบอร์รี่ น้ำมันมะกอก และผิวแอปเปิล เคมป์เฟอรอล (kaempferol) พบมากในกระเทียม บรอคโคลี องุ่น และชาดำ ส่วนไมริซิติน (myricetin) พบมากในแครนเบอร์รี่ และไวน์แดง

(3) ฟลาวาโนน (flavanone) เช่นเฮสเปอเรติน (hesperetin) และ เนรินจิน (naringin) พบมากในพืชตระกูลส้ม

(4) ไอโซฟลาโวน (isoflavone) พบมากในพืชตระกูลถั่วที่มีลักษณะเป็นฝัก (legume) เช่น ถั่วเหลือง ถั่วดำ ถั่วเขียว และยังพบในเมล็ดทานตะวันด้วย การรับประทานไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองยังมีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งที่มีสาเหตุจากฮอร์โมนต่างๆ เช่น มะเร็งเต้านมและมะเร็งต่อมลูกหมาก (วาริณ, 2543)

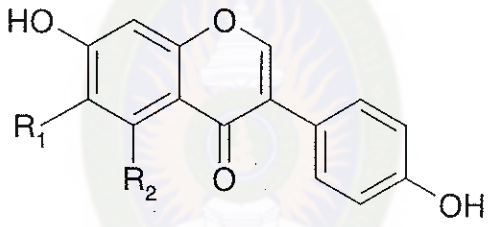
(5) ฟลาวานอล (flavanol) เช่นเคทีซิน (catechin),อีพิเคทีซิน (epicatechin) และอีพิแกลโลเคทีซิน (epigallocatechin)พบในใบชา

(6) แอนโทรไซยานิดิน (antrocyanidin) พบมากในแอปเปิล องุ่น เบอร์รี่ พลัม แบล็คเดอร์เรนท์ ข้าวฟ่างและข้าวบาร์เลย์ (Heim *et al.*: 2002)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.4 ไอโซฟลาโวน

ไอโซฟลาโวนคอนจูเกทคือไอโซฟลาโวนที่มีหมู่ฟังก์ชันแนล R_1, R_2 และR_3 แตกต่างกัน (Anon, 2001) แสดงใน ตารางที่ 1 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารไอโซฟลาโวนคอนจูเกทเหล่านี้ ได้แก่ จีนิสติน (genistin) เดดซิน (diadzin) และไกลซิติน(glycitin) สามารถนำไปใช้เป็นอาหารเสริม เพื่อช่วยในการลดระดับคอเลสเตอรอล (Setchell *et al*:1985) ยับยั้งการเสื่อมของกระดูกและช่วยรักษา อาการของผู้ที่อยู่ในวัยหมดประจำเดือน สารจีนิสติน(genistein) เดดซิน (diadzein) และไกลซิติน (glycitein) สามารถยับยั้งการเกิดของเซลล์มะเร็ง(DeMan, J.M. *et al*: 1990) จากการศึกษาพบว่าการ บริโภคโปรตีนถั่วเหลือง 47 กรัมต่อวันจะสามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ได้ อย่างชัดเจน (Wang, C. *et al*: 1996) ในถั่วเหลือง 1 กรัมมีสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยู่ในปริมาณ 0.1 ถึง 5 มิลลิกรัม (Aldercreutz. *Et al*: 1995)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน (Aglycone)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 2.1 หมู่ฟังก์ชันแนลของไอโซฟลาโวนคอนจูเกท

ชื่อ	R_1	R_2
เดดซิน (Daidzein)	H	H
จีนีสติน (Genistein)	OH	H
ไกลซิติน (Glycitein)	H	OCH_3

ที่มา : ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ และคณะ, 2542 : 55

ไอโซฟลาโวน (isoflavones) เป็นสารฟลาโวนอยด์ที่ไม่มีสี พบในพืชวงศ์ *Leguminosae* และวงศ์ *Iridaceae* ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 พวกตามการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ

(1) เป็นไฟโตอะเลกซิน (phytoalexin) เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเมื่อถูกรุกรานด้วยเชื้อโรคและแมลง เช่น ไพซาติน (pisatin)

(2) ออกฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลง (insecticides) เช่น โรทิโนน (rotenone)

(3) มีฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิงแบบฮอร์โมนเอสโทรเจน (phytoestrogen) ได้แก่ เดดซิน (daidzein) พบในถั่วหัวช้าง และ หญ้าแพรก จีนิสติน (genistein) พบในถั่วเหลือง หญ้าแพรก พืชตระกูลข้าวสาลี และนางพญาเสือโคร่ง ไบโอซามิน เอ (biochamin A) พบในถั่วหัวช้าง ประดู่แขก และกระพี้ ฟอร์โมนโนนิติน (formonnonetin) พบในถั่วหัวช้างและชะเอมเทศ

2.5 ไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen)

ไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen) คือ สารธรรมชาติที่ได้มาจากพืช ซึ่งมีโครงสร้าง และการออกฤทธิ์คล้ายคลึงเอสตราไดออล (estradiol) โดยเมื่อเข้าสู่ลำไส้แล้วจึงมีฤทธิ์ของเอสตราไดออล (estradiol) ปรากฏออกมา ปัจจุบันกล่าวถึงไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen) อย่างกว้างขวาง เนื่องจากโครงสร้างและการออกฤทธิ์คล้าย Estrogen การที่ได้รับสารอาหารธรรมชาติชนิดนี้ มีบทบาทในการรักษาอาการที่เกิดขึ้นในช่วงวัยหมดระดู รวมถึงการป้องกันการเกิดโรคหัวใจ และโรคกระดูกพรุน นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรที่มีวิถีชีวิตในการกินอยู่ ที่สัมพันธ์กับไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen) เช่น กลุ่มที่รับประทานมังสวิรัติ พบว่ามีอัตราการเกิดโรคหัวใจและมะเร็งต่ำ ไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen) พบในพืช 3 ประเภทดังนี้

(1) เลกัม (legume) : พืชชนิดที่เป็นฝัก เช่น ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลันเตา ถั่วลิสง ทองหลาง กระถิน

(2) ซีเรียล (cereal) : พืชชนิดที่เป็นเมล็ด เช่น ข้าว , เมล็ดของต้นแฟลกซ์ซึ่งใช้ทำผ้าลินิน (Flaxseed หรือ Linseed)

(3) กราสเสส (grasses) : พืชจำพวกหญ้า ซึ่ง ไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen) ประกอบด้วยสารสำคัญดังนี้

1. ไอโซฟลาโวน (isoflavone)
2. ลิกแนน (lignan)
3. คิวเมสแทน (coumestan)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

โดยลิกแนน (lignan) และไอโซฟลาโวน (isoflavone) ออกฤทธิ์ทางชีววิทยาได้ทั้งในคนและสัตว์ ส่วนคิวเมสแทน (coumestan) ออกฤทธิ์ได้เฉพาะในสัตว์เท่านั้น ดังนั้นไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen) · ที่จะกล่าวถึงเป็นพิเศษนี้ก็คือไอโซฟลาโวน (isoflavone) และ ลิกแนน (lignan)ซึ่งทั้งสองชนิดออกฤทธิ์แบบ weak estrogenic activity แต่ในขณะเดียวกันก็มี anti estrogenic activity ด้วย หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Tamoxifen like activity

แหล่งที่พบไอโซฟลาโวน (isoflavones) พบมากในเลกัม (legume) เช่น ถั่วเขียว ถั่วลันเตา แต่ที่พบอุดมสมบูรณ์ที่สุด คือ ถั่วเหลือง สารหลักที่ได้จากไอโซฟลาโวน (isoflavones) คือ จีนิสติน (genistein) และเดดซิน (daidzein) ดังรายละเอียดในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณของไอโซฟลาโวนต่ออาหารเหล่านี้ปริมาณ 100 กรัม

ชนิดอาหาร	ปริมาณไอโซฟลาโวน
แป้งถั่วเหลือง (Soy flours)	178- 305
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (Soy protein isolate)	103- 145
โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (Soy protein concentrate)	21- 317
เครื่องดื่มถั่วเหลือง (Soy drink)	26- 31.3

ที่มา : http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/unit/fp/phyto.htm

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ลิกแนน (lignans) พบมากในซีเรียล (cereal) โดยเฉพาะเมล็ดของต้นแฟลกซ์ (flaxseed) แต่ก็สามารถพบได้ในซีเรียล (cereal) อื่น ๆ และพืชประเภทผัก สารหลักที่ได้จากลิกแนน (lignans) คือเอนเทอร์โรแลกโทน (enterolactone) และเอนเทอร์โรไดออล (enterodiol) ซึ่งได้แสดงรายละเอียดที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารที่ได้จากลิกแนน (lignans)ในแหล่งอาหารต่าง ๆ

ชนิดอาหาร	เอนเทอร์โรไดออล (มก./100 ก.)	เอนเทอร์โรแลกโทน (มก./100 ก.)	รวมทั้งหมด (มก./100 ก.)
Flaxseed meal	59.02	8.52	67.51
Flaxseed flour	40.86	11.82	52.68
ถั่วแขก (Lentil)	1.00	0.78	1.78
สาหร่ายทะเลแห้ง (dried seaweed)	0.98	0.16	0.14
ถั่วเหลือง (soybeans)	0.17	0.69	0.86
รำข้าวโอต (oat bran)	0.39	0.26	0.65
ข้าวสาลี (wheat)	0.08	0.41	0.46
กระเทียม (garlic)	0.33	0.08	0.41
แตง , น้ำเต้า (squash)	0.11	0.27	0.38
หน่อไม้ฝรั่ง (asparagus)	0.24	0.14	0.38
ลูกแพร์ (pears)	0.07	0.11	0.18
ข้าวไร (rye)	0.09	0.07	0.16
ผลพลัม (plums)	0.10	0.05	0.15

ที่มา : http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/unit/fp/phyto.htm

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.5.1 บทบาทของไฟโตเอสโตรเจน

(1) ไฟโตเอสโตรเจนและอาการร้อนวูบวาบ (hot flush)

อาการร้อนวูบวาบ (hot flush) ในแต่ละแห่งมีความแปรปรวนมาก ซึ่งทางเอเชียพบน้อยกว่าทางยุโรปมาก โดยเฉพาะในสตรีญี่ปุ่น พบน้อยมากน่าจะมีบทบาทของอาหารที่มีไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง ฤทธิ์ของเอสโตรเจน (estrogen) มีผลต่อความถี่และความรุนแรงของอาการ vasomotor symptom และการที่เสริมอาหารแป้งถั่วเหลือง (soy flour) และเมล็ดของต้นแฟลกซ์ (flaxseed) เข้าไปซึ่งจะให้ไอโซฟลาโวน (isoflavone) และลิกแนน (lignan) ซึ่งจากมีคนศึกษาพบว่าทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิวช่องคลอด (vaginal epithelium) ได้ หรือเมื่อมีการสังเคราะห์ไฟโตเอโตรเจน (phytoestrogen) ซึ่งมีฤทธิ์เอสโตรเจน (estrogen) เหมือนกับคอนจุเกตเอสโตรเจน (conjugated estrogen) สามารถใช้รักษาอาการร้อนวูบวาบ (hot flush)ได้ และแตกต่างจากการใช้ยาซึ่งไม่มีฤทธิ์ทางยา (placebo)

(2) ไฟโตเอสโตรเจนและโรคมะเร็ง

ประชากรในภูมิภาคเอเชียและยุโรปตะวันออก พบการเกิดมะเร็งที่หน้าอก (CA breast) มะเร็งที่ปลายลำไส้ใหญ่ (CA colon) มะเร็งที่ต่อมลูกหมาก (CA prostate gland) มะเร็งที่รังไข่ (CA ovary) และรวมถึงภาวการณ์อุดตันของหลอดเลือดหัวใจ (coronary heart disease) น้อยกว่าทางประเทศแถบตะวันตกมาก ทางระบาดวิทยาพบว่าไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) มีความสำคัญอย่างยิ่งยวดในการป้องกันภาวะเหล่านี้ในคนเอเชียโดย เฉพาะอย่างยิ่งการบริโภคถั่วเหลือง รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากถั่วเหลือง เป็นประจำซึ่งเป็นแหล่งหลักของไอโซฟลาโวน (isoflavone) คนญี่ปุ่นซึ่งรับประทานอาหารประเภทนี้มาก พบว่าพบอุบัติการณ์ของมะเร็งที่สัมพันธ์กับฮอร์โมน (hormone) น้อยที่สุดในขณะที่คนญี่ปุ่น ซึ่งอพยพออกจากประเทศแล้วดำเนินวิถีชีวิตแบบชาวตะวันตก พบว่าความเสี่ยงเพิ่มขึ้น

(3) ไฟโตเอสโตรเจนและภาวะกระดูกพรุน (Osteoporosis)

ปัจจัยที่มีผลต่อการแข็งแรงของกระดูกมีหลายประการ เช่น รูปร่าง , เชื้อชาติ , เพศ , การออกกำลังกาย และอาหาร ซึ่งอาหารที่มีบทบาทสำคัญคือแคลเซียมและไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen) คนเอเชียพบภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) น้อย และสตรีญี่ปุ่นพบการแตกบริเวณสะโพก (hip fracture) น้อยกว่าคนผิวขาวซึ่งแสดงว่าไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen) เป็นปัจจัยที่สำคัญมากประการหนึ่งในรูป ของอาหารที่มีในชีวิตประจำวัน มีการศึกษาหลาย ๆ อันที่สนับสนุนผลในการป้องกันของไฟโตเอสโทรเจน (phytoestrogen)นี้ เช่นจีนิสติน (genistein) ในขนาดต่ำ ๆ มีฤทธิ์

RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เท่ากับ conjugated equine estrogen และสามารถป้องกัน ภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) ในหนูที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง อิพริฟลาโวน (Ipriflavone) ซึ่งให้เมนเมตาบอไลท์(main metabolite) คือเดดซิน (daidzein) ใช้ป้องกันภาวะกระดูกพรุน(osteoporosis)ในผู้ป่วยที่ได้รับ GnRH agonist รักษาเนื้อกระดูก รวมถึงเพิ่มเนื้อกระดูกได้ ในสตรีที่หมดระดูโดยขนาดที่ใช้คือ 600 มก./วัน ของ อิพริฟลาโวน (Ipriflavone) ซึ่งเท่ากับ 60 มก./วันของเดดซิน (daidzein)

(4) ไฟโตเอสโตรเจนและโรคหัวใจ (Cardiovascular Disease)

เป็นที่ทราบอย่างชัดเจนว่าโรคนี้เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเพศหญิง โดยในผู้หญิงช่วงก่อนหมดระดู พบโรคนี้น้อยกว่าผู้ชาย และจะเพิ่มอย่างชัดเจนเมื่อหมดระดู แต่เมื่อใช้ฮอร์โมนทดแทนก็สามารถลดความเสี่ยง การเกิดโรคนี้ได้ถึง 50 % โดยการออกฤทธิ์เป็นไปในหลายกลไก ดังนั้นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) ที่ออกฤทธิ์เหมือนเอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งมีความสามารถเช่นเดียวกับ การใช้ฮอร์โมน ทดแทน การรับประทานอาหารถั่วเหลืองมีหลักฐานว่าช่วยเปลี่ยนแปลงไขมันในร่างกายได้ โดยช่วยลดคอเลสเตอรอล (total cholesterol) ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) โดยมีการเปลี่ยนแปลงได้ถึง 60-70 % ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคหัวใจอีกประการหนึ่งคือ ระดับของลิโพโปรตีนเอ (lipoprotein (a)) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกรรมพันธุ์ แต่เอสโตรเจนหรือฮอร์โมน เพศอื่น ๆ ก็สามารถช่วยลดระดับลิโพโปรตีนเอ (lipoprotein (a)) ได้ประมาณ 35 % ในขณะที่ยาที่ใช้รักษาเกี่ยวกับโรคหัวใจทั้งหลาย ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่านี้ได้ เนื่องจากโครงสร้างของไอโซฟลาโวน (isoflavone) ที่คล้ายเอสตราไดออล (estradiol) และมีความสามารถในการจับตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ที่ดี ดังนั้นอาหารที่มีไอโซฟลาโวน (isoflavone) จึงลดระดับของ ลิโพโปรตีนเอ (lipoprotein (a)) ได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.5.2 แหล่งของไฟโตรเอสโตรเจนในอาหาร

ไฟโตเอสโตรเจน มี 3 ชนิดหลัก คือ ไอโซฟลาโวน (isoflavone), ลิกแนน (lignan), และคิวเมสแทน (coumestan)

(1) ไอโซฟลาโวน – พบมากในไม้จำพวกที่มีฝัก ถั่ว (ถั่ว ชนิดเมล็ดแบน เช่น ถั่วเหลือง ถั่วเล็กรูปกลมคล้ายไต ถั่วแขกชนิดเมล็ดแดง และเหลือง) และในผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง (รวมทั้งนมเต้าหู้)

(2) ลิกแนน - พบในผลไม้ ผัก ถั่ว และ เมล็ดข้าว แต่พบมากที่สุดใน oilseeds โดยเฉพาะอย่างยิ่ง linseed (เมล็ดต้นFlax ที่ปอใช้ทำผ้าลินิน).

(3) คิวเมสแทน - พบได้ในอาหารจำพวกเดียวกับลิกแนน แต่พบมากที่สุดในเมล็ดอ่อน (sprouting seeds)ถั่วเหลือง และผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง พบว่าเป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ที่สุดของไฟโตเอสโตรเจน

2.5.3 การออกฤทธิ์ของไฟโตรเอสโตรเจน

ไฟโตรเอสโตรเจนออกฤทธิ์ได้ทั้งเสริมและต้านเอสโตรเจน ในกรณีที่มีเอสโตรเจนในร่างกายมากเกินไป ไฟโตรเอสโตรเจนจะไปจับกับตัวรับของเซลล์ (receptor)ของเอสโตรเจน เกิดการยับยั้ง การทำงานและต้านการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจน (anti-estrogenic effect) ในขณะที่เมื่อร่างก่ายเกิด การขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน เช่น ในหญิงวัยหมดประจำเดือน ไฟโตรเอสโตรเจนจะไปจับกับตัวรับของเซลล์เอสโตรเจน และออกฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงเชื่อว่า ไฟโตเอสโตรเจนอาจจะช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งที่สัมพันธ์กับฮอร์โมน และโรคหัวใจและหลอดเลือด ได้พอๆกับการลดอาการหลังการหมดประจำเดือน

2.5.4 ปริมาณไฟโตรเอสโตรเจนที่ควรได้รับ

ปริมาณไฟโตรเอสโตรเจนที่ควรได้รับจากอาหาร คือ 30 – 50 มิลลิกรัม ประมาณได้อย่างคร่าวๆ ดังนี้

(1) นมถั่วเหลือง 250 ซีซี – 15-60 มิลลิกรัม

(2) เต้าหู้ 1 ก้อน (115 กรัม) – 13-43 มิลลิกรัม

(3) โยเกิรต์เต้าหู้ (200 กรัม) – 26 มิลลิกรัม

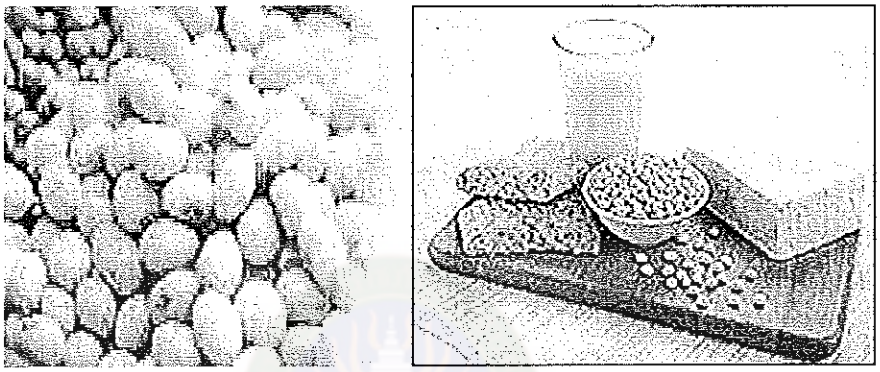
2.5.5 ประโยชน์ของไฟโตรเอสโตรเจน

มีการศึกษาทางระบาดวิทยาอย่างกว้างขวาง ถึงประโยชน์ของไฟโตรเอสโตรเจนในอาหารสำหรับหญิงวัยหมดประจำเดือน โดยการเปรียบเทียบประสบการณ์ของหญิงชาวเอเชีย (ปกติจะบริโภคอาหารกลุ่มที่มีไฟโตรเอสโตรเจนสูง) กับหญิงชาวตะวันตก (ปกติจะบริโภคอาหารกลุ่มที่มีไฟโตรเอสโตรเจนต่ำ) มีรายงานว่าหญิงชาวเอเชียมีอาการหลังการหมดประจำเดือน และมีอุบัติการณ์ของมะเร็งเต้านมต่ำกว่า แต่อย่างไรก็ตาม คงไม่ใช่เฉพาะการได้รับไฟโตรเอสโตรเจนในอาหารที่แตกต่างกันเพียงอย่างเดียว อาจเป็นไปได้ที่ความแตกต่างทางวัฒนธรรมทำให้การแสดงออกของหญิงทั้งสองกลุ่มต่ออาการหมดประจำเดือนแตกต่างกัน ในประเทศญี่ปุ่นซึ่งมีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเต้านมและต่อมลูกหมากต่ำ คาดว่าเนื่องมาจากการที่คนญี่ปุ่นได้รับไฟโตเอสโตรเจน จากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองอยู่เป็นประจำ เมื่อเปรียบเทียบการบริโภคและการขับสารไฟโตเอสโตรเจน ออกทางปัสสาวะ รวมทั้งอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งที่สัมพันธ์กับฮอร์โมนระหว่างชาวฟินแลนด์ อเมริกัน และญี่ปุ่น พบว่าคนญี่ปุ่นซึ่งมีการขับถ่ายไฟโตเอสโตรเจน ออกมาในปริมาณมากที่สุดนั้นมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งต่ำสุด อาหารของคนทางตะวันตกไม่ค่อยจะมีส่วนประกอบที่เป็นไฟโตเอสโตรเจน และก็ดูเหมือนว่าประเทศเหล่านี้จะมีอุบัติการณ์หรือความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเต้านมลำไส้และต่อมลูกหมากสูงกว่าด้วย การศึกษาทางวิทยาศาสตร์เสนอไว้ว่าไฟโตรเอสโตรเจนมีผลลดอาการร้อนวูบวาบ แต่อย่างไรก็

RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตามยังไม่มีหลักฐานเพียงพอที่จะบอกได้ว่าไฟโตรเอสโตรเจนจากอาหารเพียงอย่างเดียว จะรักษาอาการหลังหมดประจำเดือน เช่น กระดูกพรุนได้ บทบาทของไฟโตรเอสโตรเจนจากอาหารในการป้องกันมะเร็งและโรคหลอดเลือดและหัวใจแม้ว่าดูเหมือนจะได้ผลดี อย่างไรก็ตามยังต้องการการศึกษาทางคลินิกเพิ่มเติมต่อไป

2.6 ถั่วเหลือง



ภาพที่ 2.3 ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Glycin max (L) Merr* ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Leguminosae มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Soja Bean หรือ Soybean เป็นตระกูลถั่วที่รู้จักกันดี โดยเฉพาะเป็นพืชดั้ง เดิมของคนในแถบเอเชียโดยได้มีการปลูก และนำมาใช้บริโภคเป็นอาหารพื้นเมืองนานาชนิด ถั่วเหลืองของไทยส่วนมากปลูกแถบภาคเหนือ และภาคกลางตอนบน นิยมเรียกในภาษาไทย โดยทั่ว ๆ ไป หลายชื่อ เช่น ถั่วพระเหลือง ถั่วแระ ถั่วเหลือง มะถั่วเน่า ถั่วหนัง (เหนือ) เป็นต้น ลักษณะของต้นถั่วเหลืองเป็นพืชล้มลุก สูงประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นสี่เหลี่ยมปกคลุมด้วยขนสี เทาขาว ใบเป็นใบประกอบแบบนิ้วมือ ใบประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบ รูปร่างคล้ายรูปไข่ปลาย แหลมใบค่อนข้างหนาผิวมันทั้งด้านบนและด้านล่าง ดอกเป็นช่อสีขาวหรือม่วงแดง ออกดอก เมื่ออายุประมาณ 25-30 วัน เก็บเกี่ยวอายุประมาณ 90-100 วัน ฝักแบนขาวติดเป็นกระจุกที่ข้อ ของต้นและกิ่งในฝักมีเมล็ด 3-5 เมล็ดรูปไข่ เมล็ดกลม ผิวสีเหลืองมันตาค่อนข้างเล็ก สีน้ำตาลอ่อน

การนำถั่วเหลืองมาใช้ประโยชน์นั้น จะเลือกเมล็ดที่แก่จัด ทั้งนี้เพราะในเมล็ดถั่วเหลืองแก่จะมีสารอาหารต่างๆ ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรท 35% โปรตีน 50% ไขมัน 20% และในไขมันประ กอบด้วยกรดไขมันต่างๆ เช่น ลิโนเลอิก (Linoleic) 50% โอเลอิก (Oleic) 30% ลิโนเลนิก (Linolenic) 7% และปาล์มมิติก (Palmitic) กับ สเตียริก (Stearic) 14% (คำนวณจากน้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ยัง ประกอบไปด้วยแคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามิน A, B, B_1, B_2, B_6, B_{12} ไนอาซีน วิตามิน C, D, E อีกด้วย

2.6.1 ถั่วเหลืองกับการต้านมะเร็ง

ถั่วเหลืองถูกนำมาใช้เป็นอาหารและยาโดยคนเอเชียมาเป็นเวลานานแล้ว ส่วนชาวตะวันตกเองใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นอาหารอย่างแพร่หลายเช่นเดียวกัน ถั่วเหลืองถูกนำมาเป็นส่วนประกอบของอาหารหลายรูปแบบเช่น มิโสะ (miso) เต้าหู้ นมถั่วเหลือง โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง และแป้งถั่วเหลืองเป็นต้น การที่ถั่วเหลืองเป็นที่น่ารับประทานเนื่องจากประกอบด้วย กรดอะมิโน (amino acid) และไนโตรเจนตามความต้องการของร่างกาย เป็นอาหารโปรตีนที่ราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบการใช้พื้นที่เท่าๆ กัน การปลูกถั่วเหลืองจะให้โปรตีน 5-25 เท่าของโปรตีนจากการเลี้ยงวัวผลิตนมหรือปลูกข้าวสาลี นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวน้อยและไม่มีคลเรสเตอรอล (cholesterol) โปรตีนจากถั่วเหลืองทำให้มีการขับทิ้ง แคลเซียม ในปัสสาวะน้อยกว่าโปรตีนจากสัตว์ จากการศึกษาเกี่ยวกับสุขภาพของผู้ที่รับประทานถั่วเหลืองเป็นประจำ กับการทดลองพบว่าถั่วเหลืองมีแนวโน้มที่จะมีผลป้องกันและรักษาโรคเรื้องรังต่างๆ โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคกระดูกผุ และโรคไตได้ ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะผลของถั่วเหลืองต่อโรคมะเร็ง

2.6.2 ผลของถั่วเหลืองต่อโรคมะเร็งชนิดต่างๆ

จากการรวบรวมข้อมูลและหาความสัมพันธ์ระหว่างการรับประทานอาหารประเภทถั่วเหลืองกับความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง พบว่าประชากรที่บริโภคอาหารประเภทถั่วเหลืองหรือผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองเป็นหลักจะมีโอกาสเป็นโรคมะเร็งน้อยกว่าประชากรที่รับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์เป็นหลัก ทำให้มีการศึกษาทดลองผลของโปรตีนจากถั่วเหลืองต่อการป้องกันและยับยั้งโรคมะเร็งต่างๆ ดังนี้

(1) ผลต่อโรคมะเร็งที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับฮอร์โมนเพศ การทดลองให้โปรตีนจากถั่วเหลืองหรือโปรตีน casein จากนมกับหนูขาวซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย n -methylnitrosourea หรือ 7,12-dimethylbenz (a)-anthracene ให้หนูตัวเมียเป็นมะเร็งที่เต้านมหรือทำให้หนูตัวผู้เป็นมะเร็งที่ต่อมลูกหมาก พบว่า โปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถป้องกันและลดการเกิดมะเร็งเต้านมในหนูตัวเมีย และมะเร็งต่อมลูกหมากในหนูตัวผู้ เมื่อเทียบกับหนูขาวที่ได้รับ casein ในหนูที่ตัดมะเร็งเต้านมออกแล้ว การให้โปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอกใหม่ และทำให้การกลับมาเป็นมะเร็งใหม่ช้ากว่าหนูที่ได้รับ casein นอกจากนี้การทดลองในหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งที่เต้านม ด้วยรังสี x-ray ก็สามารถยับยั้งได้โดยการป้อนถั่วเหลืองดิบในขณะที่เคซิน (casein) และอาหารหนู(purina) ไม่มีผล ถึงแม้ว่าจะมีการทดลองที่แสดงว่าถั่วเหลืองมีผลยับยั้ง และลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเต้านม และมะเร็งต่อมลูกหมาก แต่การทดลองของ Grinley และคณะ กลับพบว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองไม่มีผลลดการเกิดมะเร็งในเต้านม

RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

(2) ผลต่อมะเร็งในระบบทางเดินอาหาร

(2.1) มะเร็งในช่องปาก มีรายงานเกี่ยวกับ soybean extract ซึ่งมี Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) [หรือที่เรียกกันว่า BBI concentrate (BBIC)], purified BBI (PBBI) ต่อการยับยั้งการเกิดมะเร็งในช่องปากในหนูแฮมสเตอร์ ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดย 7,12-dimethyl-benz(a) anthracene (DMBA) ใช้ได้ผลในขนาดความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01%-1% ระยะเวลา 1-5 ครั้ง/สัปดาห์ สามารถเริ่มใช้การยับยั้งนี้ได้ช้าถึง 45 วัน หลังจากสัมผัสกับสารก่อมะเร็ง และผลการยับยั้งที่ได้เป็นชนิด irriversible อีกด้วย

(2.2) มะเร็งในกระเพาะอาหาร จากการศึกษาผลของจีนิสติน (genistein) ต่อการเจริญของ HGC-27 cells ซึ่งได้มาจากมะเร็งกระเพาะอาหารของคน พบว่าจีนิสติน (genistein) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารได้เกือบสมบูรณ์ใน cell cycle progression ที่ G2-M การทดสอบผลของโปรตีนจากถั่วเหลือง จีนิสติน (genistein)และไฟเตต (phytate) เปรียบเทียบกับ casein ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งในลำไส้ใหญ่ด้วย dimethylhydrazine หรือ azoxymethane พบว่าโปรตีนจากถั่วเหลือง genistein และ phytate สามารถป้องกันและลดการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ และลดจำนวน aberrant crypts ซึ่งเป็นลักษณะของมะเร็งในลำไส้ใหญ่ แต่ Reddy และคณะ, Clinton และคณะพบว่าโปรตีนจากถั่วเหลือง และโปรตีนจากเนื้อวัวไม่มีผลต่อการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งด้วย dimethylhydrazine และยังมีผู้พบว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองทำให้เยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่เกิดการแบ่งตัวและถูกทำลาย อย่างไรก็ตามมีรายงานโต้แย้งการทดลองที่ไม่ได้ผลว่าอาจเนื่องมาจากการให้อาหารในสัดส่วนที่ไม่เหมาะสม หรือสูญเสียสารสำคัญไประหว่างการเตรียมโปรตีนจากถั่วเหลือง สำหรับการทดลองทางคลินิก ได้เริ่มมีการทดสอบในผู้ป่วยที่ตรวจพบว่าจะเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยให้ผู้ป่วยรับประทานโปรตีนจากถั่วเหลืองเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ casein เพื่อดูว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองจะลดการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้หรือไม่ แต่ยังไม่มีการสรุปผล

(2.3) ผลต่อมะเร็งชนิดอื่นๆการทดสอบในสัตว์ทดลองพบว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองและสาร isoflavones (genistein และ diadzein) สามารถยับยั้งการเจริญของมะเร็งที่ตับ ผิวหนัง กระเพาะอาหาร กระเพาะปัสสาวะ เม็ดเลือดขาว และตับอ่อน ในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็งหลายชนิด เช่น aflatoxin, 7,12-dimethylbenze [a]-anthracene, N-methyl-N-nitrosourea เป็นต้น

1) มะเร็งของตับอ่อน มีรายงานว่า soybean agglutinin (SBA) จะจับกับ pancreatic carcinoma cell lines ของคน ทั้ง 2 ชนิด คือ HuP-T3 และ HuP-T4 แต่ไม่จับกับเซลล์ปกติ นอกจากนี้ยังมีการศึกษา soybean trypsin inhibitor (SBTI) เมื่อให้กับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับการฉีด N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) โดยให้ในช่วง promotion phase ของการเกิดมะเร็งของตับอ่อน พบว่าใช้ได้ผลในการยับยั้งการเกิดมะเร็งตับอ่อนได้

2) ผลต่อ thymic lymphosarcoma พบว่า Bowman-Birk inhibitor มีผลในการ

ป้องกันการเกิด thymic lymphosarcoma ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการฉายแสง ในหนู mice C57B1/ 6NCr1 BR นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารในถั่วเหลืองที่ทนต่อการ autoclave อีกชนิดที่มีคุณสมบัติในการลดการแพร่กระจายของ lymphosarcoma และการสูญเสียน้ำหนัก โดยป้องกันการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

2.6.3 สารสำคัญในถั่วเหลืองที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็ง

(1) ไอโวฟลาโวน

ไอโซฟลาโวน (isoflavones) ได้แก่ จีนิสติน (genistein) เดดซิน (diadzein) และ ไกลซิติน (glycitein) การทดสอบผลของจีนิสติน (genistein) ในหลอดทดลองพบว่าจีนิสติน (genistein) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากคน และเซลล์มะเร็งจากหนูถีบจักรด้วยค่า IC50 (ความเข้มข้นที่ให้ผลยับยั้ง 50%) 2.6-7.9 ไมโครโมลต่อลิตร หรือ 1-30 ไมโครโมลต่อลิตร การทดสอบในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วย 7,12-dimethylbenze [a]-anthracene พบว่าจีนิสติน (genistein) ทำให้เป็นมะเร็งเต้านมช้า และยับยั้งการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ ไอโซฟลาโวน (isoflavones) ถูกแบคทีเรียในลำไส้เล็ก เปลี่ยนเป็นสารที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (estrogen) อ่อนๆ และเป็นแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant)ซึ่งอาจมีส่วนต่อการยับยั้งมะเร็งเต้านมของถั่วเหลือง

นอกจากไอโซฟลาโวน (isoflavones) แล้วถั่วเหลืองยังมีลิกแนน (lignan)ซึ่งมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (estrogen)อ่อนๆ ทำให้เรียก ไอโซฟลาโวน (isoflavones) และ ลิกแนน (lignan) ว่าไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) และเชื่อว่าสารทั้ง 2 มีผลต่อการต้านมะเร็งที่เกี่ยวกับฮอร์โมนเพศ กลไกของถั่วเหลืองที่มีผลต้านการเกิดมะเร็ง อาจเนื่องมาจากการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) และการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โปรตีนถั่วเหลืองและจีนิสติน (genistein) มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase, topoisomerase I,II ซึ่งจำเป็นสำหรับการแบ่งเซลล์และมีการศึกษาผลของโปรตีนจากถั่วเหลืองต่อการทำงานของฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตในคนด้วย นอกจากนี้ ไอโซฟลาโวน (isoflavones) ยังมีผลต่อการทำงานของเซลล์ตับหนูหลายชนิด เช่น cytochrome P4503A ,quinone reductase และ glutathione-s-transferase เป็นต้น ถั่วเหลืองทำให้ผนังเซลล์มีความคงตัว และลดการสร้าง lipid peroxidation ของเซลล์ตับ ผลเหล่านี้อาจเป็นกลไกที่ทำให้ถั่วเหลืองมีผลยับยั้งการเกิดมะเร็งตับ

(2) ซาโปนิน

ซาโปนิน (saponin) จากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 150-600 ppm มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของคน (HCT-15) และผลการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามขนาดของซาโปนิน (saponin)โดยที่ไม่มีผลต่อการยอมให้ซึมผ่านของผนังเซลล์ (membrane permeability) ผลของซาโปนิน (saponin) ต่อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เซลล์มะเร็งอาจเนื่องมาจากผลโดยตรงต่อเซลล์มะเร็ง ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immune modulatory effects) ผลต่อการจับกรดน้ำดี และการทำลายฤทธิ์ของสารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลการต้านมะเร็งของ ซาโปนิน (saponin) จากพืชที่เป็นอาหารประเภทอื่นๆ ทำให้ต้องมีการศึกษาผลของซาโปนิน (saponin) เพิ่มเติม

ซาโปนิน (saponin) ในถั่วเหลืองถูกจัดเป็น antinutritional factors เพียงเพราะบังเอิญเป็น ซาโปนิน (saponin) เท่านั้น ทั้งๆ ที่มีรายงานในการศึกษาในสัตว์ทดลองว่า ซาโปนิน (saponin) จากถั่วเหลืองไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโต (Ishaaya ,et al :1969) เร็วๆ นี้พบว่า ซาโพนิน (saponin) จากถั่วเหลืองมีส่วนในการลดคอเรสเตอรอล (cholesterol)และ anticarcingenic effects ด้วย (Messina and Barnes 1991) ดังนั้นจึงได้รับการยกเว้นจากรายชื่อ antinutritional factors ในถั่วเหลือง (Liener :1981) เชื่อว่าปัจจุบันมีอะไกลโคน (aglycones) ในซาโปนิน (saponin) เพียง 3 ชนิด คือ soyasapogenol A,B และ E (Price ,et. al :1987) เชื่อมต่อกับโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) เป็นโมเลกุลของซาโปนิน (saponin) พบว่ามีซาโปนิน (saponin) หลักๆ 5 ชนิด ที่แยกออกมาได้และหาสูตรโครงสร้างได้แล้ว (Kitagawa, et .al :1985 a , Kitagawa, et. al :1988 b) ถั่วเหลืองจะมีปริมาณซาโปนิน (saponin) 0.1-0.5% น้ำหนักแห้ง (Ircland, et. al :1986, Shiraiwa, et. al :1991) และพบในปริมาณสูงเช่นกันในแป้งถั่วเหลือง (0.5%) isolates (0.8%) แต่ไม่พบเลยใน โปรตีนเข้มข้น (protein concentrate) (Ircland et al 1986)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นพมาศ โรจนเสถียร และคณะ (บทคัดย่อ : 2547) การศึกษาหาปริมาณของไอโซฟลาโวนในเครื่องดื่มถั่วเหลืองทั้งสองประเภท(คือน้ำเต้าหู้และ นมถั่วเหลือง UHT) มีค่าประมาณ 10-70 มิลลิกรัมต่อหนึ่งหน่วยบริโภค และไอโซ ฟลาโวนส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไกลโคไซด์ ค่ามัธยฐานของความเข้มข้นของอะไกลโคนในน้ำเต้าหู้มีค่าสูงกว่าในน้ำนมถั่วเหลืองยูเอชทีอย่างมีนัยสำคัญส่วนน้ำนมถั่วเหลืองยูเอชทีมีค่า มัธยฐานของความเข้มข้นของไกลโคไซด์, ความเข้มข้นของ ไอโซฟลาโวนรวม และปริมาณของไอโซฟลาโวนรวมต่อหนึ่งหน่วยบริโภค (มิลลิกรัม) สูงกว่าในน้ำเต้าหู้อย่างมีนัยสำคัญ ค่ามัธยฐานของปริมาณของไอโซฟลาโวนรวมต่อหนึ่งหน่วยบริโภค (ในหน่วยไมโครโมล) ในเครื่องดื่มทั้งสองประเภทไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณของไอโซ ฟลาโวนในเครื่องดื่ม ถั่วเหลืองทั้งสองประเภทมีความผันผวนค่อนข้างมากและ แม้ว่าเครื่องดื่มทั้งสองประเภทมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในด้านสัดส่วน และความเข้มข้นของอะไกลโคนกับไกลโคไซด์ ตลอดจนปริมาณของไอโซฟลาโวนรวมต่อหนึ่งหน่วยบริโภค แต่ปริมาณของ ไอโซฟลาโวนรวมที่ถูกดูดซึมได้ต่อหนึ่งหน่วยบริโภค (ไมโครโมล) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ณัฐดา จูงหัตถการสาธิต (บทคัดย่อ : 2542) พัฒนาแบบจำลองสำหรับการแยกสารไอโซฟลาโวนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองในระบบโครมาโต กราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และเพื่อได้รับข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการแยกไอโซฟลาโวนในระบบโครมาโตกราฟี จากการทดลองพบว่าเฟสของไหลที่เหมาะสมที่สุดในการแยกไอโซฟลาโวนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลือง คือ สารละลายเมทานอล 33 % ในน้ำ ในการสร้างแบบจำลองสำหรับการแยกสารไอโซฟลาโวนนั้นต้องอาศัยสมการการดุลมวลสารและสมการการดูดซับ โดยสมการการดูดซับที่ใช้เป็นกรณีไอโซเทอมแบบเชิงเส้น ค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่ต้องใช้ในแบบจำลองได้แก่ ความพรุนของเฟสหยุดนิ่ง ความพรุนของเบส การกระจายตัวในแนวแกน ค่าคงที่ของการดูดซับ และค่าคงที่ของการถ่ายโอนมวลสาร หาได้จากการทดลองและสมการความสัมพันธ์ต่างๆ พบว่าแบบจำลองที่ไม่รวมเทอมการกระจายตัวในแนวแกน สมารถทำนายได้ดีเช่นเดียวกับกรณีที่รวมเทอมนี้ แต่ใช้เวลาในการคำนวณน้อยกว่า 8 ถึง 9 เท่า และแบบจำลองนี้ยังสามารถทำนายในกรณีที่ความเข้มข้นของไอโซฟลาโวนที่ฉีดเปลี่ยนแปลง และ ในกรณีที่ความเร็วของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนแปลงได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้งานวิจัยยังหาความสัมพันธ์ของค่าคงที่ของการดูดซับกับ ค่าความเข้มข้นของเมทานอลในน้ำของเฟสเคลื่อนที่ในช่วง 25% ถึง 40% ปริมาตรต่อปริมาตร จากการทดลองพบว่า ความสัมพันธ์ที่ได้มีลักษณะเป็นเชิงเส้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ (บทคัดย่อ : 2542) ศึกษาการใช้วิธีซิมเพล็กซ์หาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารไอโซฟลาโวนจากกากถั่วเหลืองด้วยเอทานอล การผลิตโมลาสถั่วเหลืองโดยนำครูดแอกซ์แทรคที่ได้จากการสกัดไปทำการระเหยเอทานอลด้วยเครื่องระเหยต่อเนื่องแบบ Double effect และแบบ Single effect ภายใต้ความดันสุญญากาศ ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือสกัดกากถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม ด้วยเอทานอล 64 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 15 ลิตร ใช้ความร้อนที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 110 นาที การวิเคราะห์ไอโซฟลาโวนในครูดแอกซ์แทรคและ โมลาสถั่วเหลืองและกรดอะมิโนทั้งหมดในโมลาสถั่วเหลืองด้วยเครื่อง HPLC มีค่าเท่ากับ 62.2340 มก./ล. 219.3004 มก./ล. และ 299.81 มก./ดล. ตามลำดับ สำหรับการศึกษานี้ค่าดำเนินการของการผลิตไอโซฟลาโวนในโมลาสถั่วเหลืองเมื่อไม่รวมต้นทุนคงที่เท่ากับ 554.39 บาท/กรัมของไอโซฟลาโวน การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โลหะหนักและอัลฟาทอกซินบี 1 ในโมลาสถั่วเหลืองพบไนโตรเจนทั้งหมด 95.00 มก./ดล. ครูดโปรตีน 593.75 มก./ดล. ของแข็งแห้ง 5.44 เปอร์เซ็นต์ ทองแดง 0.4230 มกะ/ล. อาร์ซินิก 0.0005 มก./ล. ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่เป็นพิษ ไม่พบตะกั่วและไม่พบอัลฟาทอกซินบี 1

Tongtong Song (บทคัดย่อ : 2006) การพัฒนาของฐานข้อมูลของปริมาณ isoflavone ในถั่วเหลือง เพื่อที่จะหาค่าที่ถูกต้องและแม่นยำของเมตริกซ์ที่แตกต่างของอาหาร การหาค่าความแม่นยำเราประมาณการกลับคืนของ internal และ external standards ทั้งสอง ใน 5 ความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองต่อสัปดาห์สารมาตรฐานถูกประเมินค่าประจำวันสำหรับการรับรองคุณภาพระบบ เพื่อประเมินค่าความแม่นยำของตัวอย่าง, เราวิเคราะห์ถั่วเหลืองและนมถั่วเหลือง สิ่งตีพิมพ์เกิดขึ้นทุกสองเดือนเป็นเวลาภายใน-ความแม่นยำวันและเหนือกว่า4dเป็นเวลาความแม่นยำวันแล้ววันเล่า CVs ควรจะ £8% เรามีความถูกต้องของวิธีของเราสำหรับความเข้มข้นการกลับคืนเดี่ยวและหลายอันโดยการใช้ internal standardsใหม่ของเรา, 2,4,49 -trihydroxydeoxybenzoin, และ external standards daidzein, genistein, และgenistin ความเข้มข้น 12 isoflavone isomers, 3 aglycones (daidzein, genistein, และ glycitein),และ 9 glucosides (daidzin, genistin, glycitin, acetyldaidzin, acetylgenistin, acetylglycitin, malonyldaidzin, malonylgenistin, และ malonylglycitin)ได้จากการวัดในความหลากหลายของถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองวิธีการสกัดที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง สภาวะ HPLC สำหรับการวิเคราะห์isoflavone ในถั่วเหลือง ถูกปรับปรุงให้ดีขึ้น, มีหลักในการแยกดีกับเวลาการวิเคราะห์ที่สั้น(60 นาที/ตัวอย่าง).ข้อมูลของความเข้มข้นและการกระจายของ isoflavones ในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน ระยะกว้างของความเข้มข้นของ isoflavone จาก < 50 mg /g ถึง > 20000 mg /g คือถูกค้นพบในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่แตกต่าง ในรูปแบบ glucoside เกือบสองเท่าของน้ำหนักโมเลกุลของ aglycones ; ความเข้มข้น isoflavone ที่รายงานควรจะถูกทำให้เป็นมาตรฐาน aglycone ส่วนมาก (หรือ isoflavonoid สมมูล) มากกว่าผลรวมของ isomers ทั้งหมด

BAJAPHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวน ในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง ได้แก่ น้ำเต้าหู้ เต้าหู้ถั่วเหลือง และ นมถั่วเหลืองยูเอชที โดยใช้เครื่องมือ, อุปกรณ์ และสารเคมี มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)
2. เครื่องเครื่องทำให้แห้งที่จุดเยือกแข็ง (freeze-dried)
3. เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (rotary)
4. เครื่องคนสารละลาย (magnetic stirrer)
5. เครื่องเขย่า (shaker)
6. เครื่องกรองสุญญากาศ
7. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. กระดาษกรองเบอร์ 42
9. กระดาษอะลูมิเนียมฟอล์ย
10. กรวยแก้ว
11. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25, 50, 100 มิลลิลิตร
12. ขวดวัดปริมาตรสีชา ขนาด 10 มิลลิลิตร
13. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250 มิลลิลิตร
14. ขวดไวแอลสีชา
15. ขวดไอโอดีน ขนาด 125 มิลลิลิตร
16. บีกเกอร์ ขนาด 25, 50, 100 มิลลิลิตร
17. พาราฟิน
18. ไมโครปิเปต
19. เยื่อกรองโพลีเตตระฟลูออโรเอทิลีน (polytetrafluoroethelene) 0.45 ไมครอน
20. อ่างน้ำร้อน (water bath)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2 สารเคมีและสารตัวอย่าง

1. สารมาตรฐานจีนีสติน (genistein)
2. อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile)
3. เมทานอล (methanol)
4. กรดแอซีติก (glacial acetic acid)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
6. กรอไฮโดรคลอริก (HCl)
7. น้ำกลั่น
8. เต้าหู้ถั่วเหลือง
9. น้ำเต้าหู้
10. นมถั่วเหลืองยูเอชที

3.3 วิธีการดำเนินงาน

1. ตัวอย่างเต้าหู้ถั่วเหลือง

1.1. เต้าหู้ถั่วเหลืองสับเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 วัน แล้วบดให้ละเอียด

1.2. ชั่งเต้าหู้ถั่วเหลืองที่บดละเอียดประมาณ 2.0000 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 80% เมทานอลในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปิดขวดรูปชมพู่นี้ด้วยพาราฟินและอะลูมิเนียมฟอล์ย นำไปใส่ในเครื่องเขย่า (shaker) และทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

1.3. ทำให้สารละลายตัวอย่างเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 2 โมลต่อลิตรจำนวน 3 มิลลิลิตรนำไปเขย่าอีกครั้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

1.4. เติมกรดแอซีติก (glacial acetic acid) เข้มข้น 1% จำนวน1 มิลลิลิตร แล้วนำผลที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 ใส่ในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.5. นำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร 80% เมทานอล ในน้ำกลั่นจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปกรองด้วยเยื่อกรองโพลีเตตระฟลูออโรเอทิลีน (polytetrafluoroethelene) ขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2. ตัวอย่างน้ำเต้าหู้และนมถั่วเหลืองยูเอชที

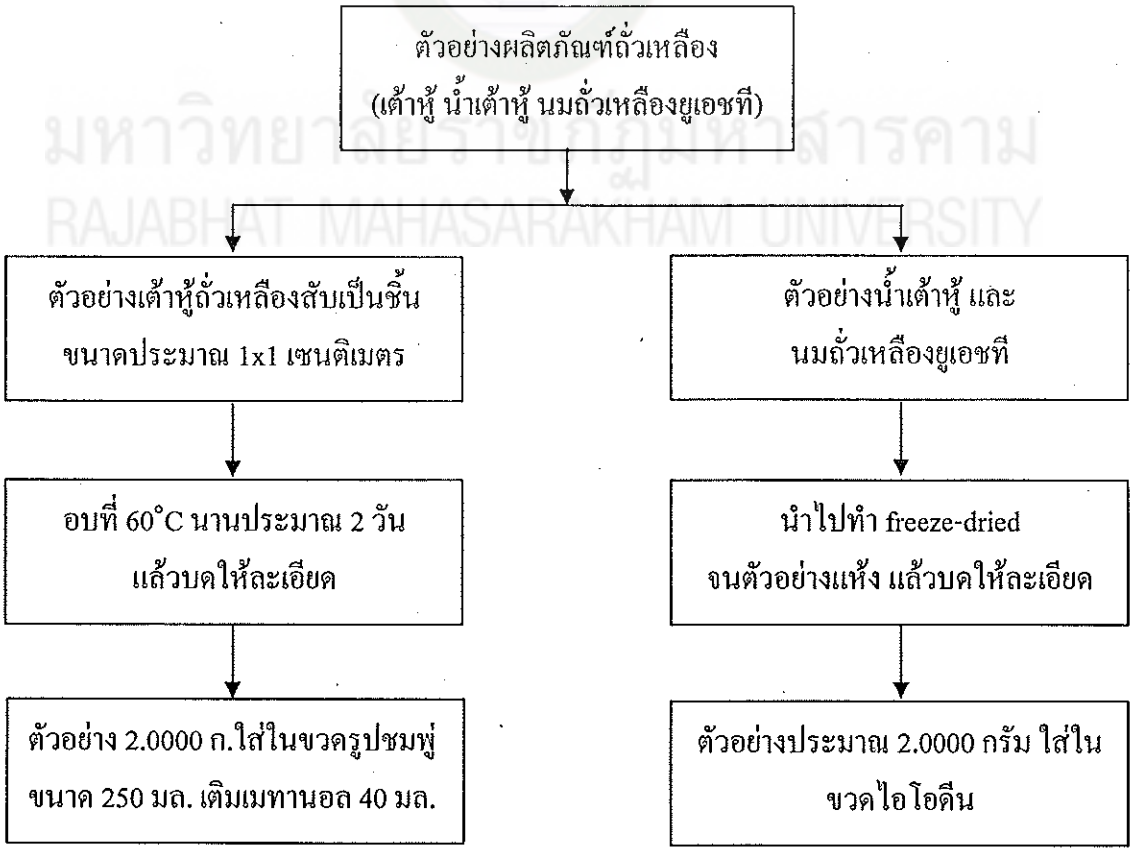
2.1. นำตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ใส่ในเครื่องทำให้แห้งที่จุดเยือกแข็ง (freeze-dried) จนตัวอย่างแห้ง แล้วบดให้ละเอียด

2.2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 2.0000 กรัม ใส่ในขวดไอโอดีน ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมอะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) 10 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนสารละลายผสมด้วย เครื่องคนสารละลาย (magnetic stirrer) นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

2.3. นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วนำของเหลวผลกรองที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (rotary) ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30°C ประมาณ 10 นาที ปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

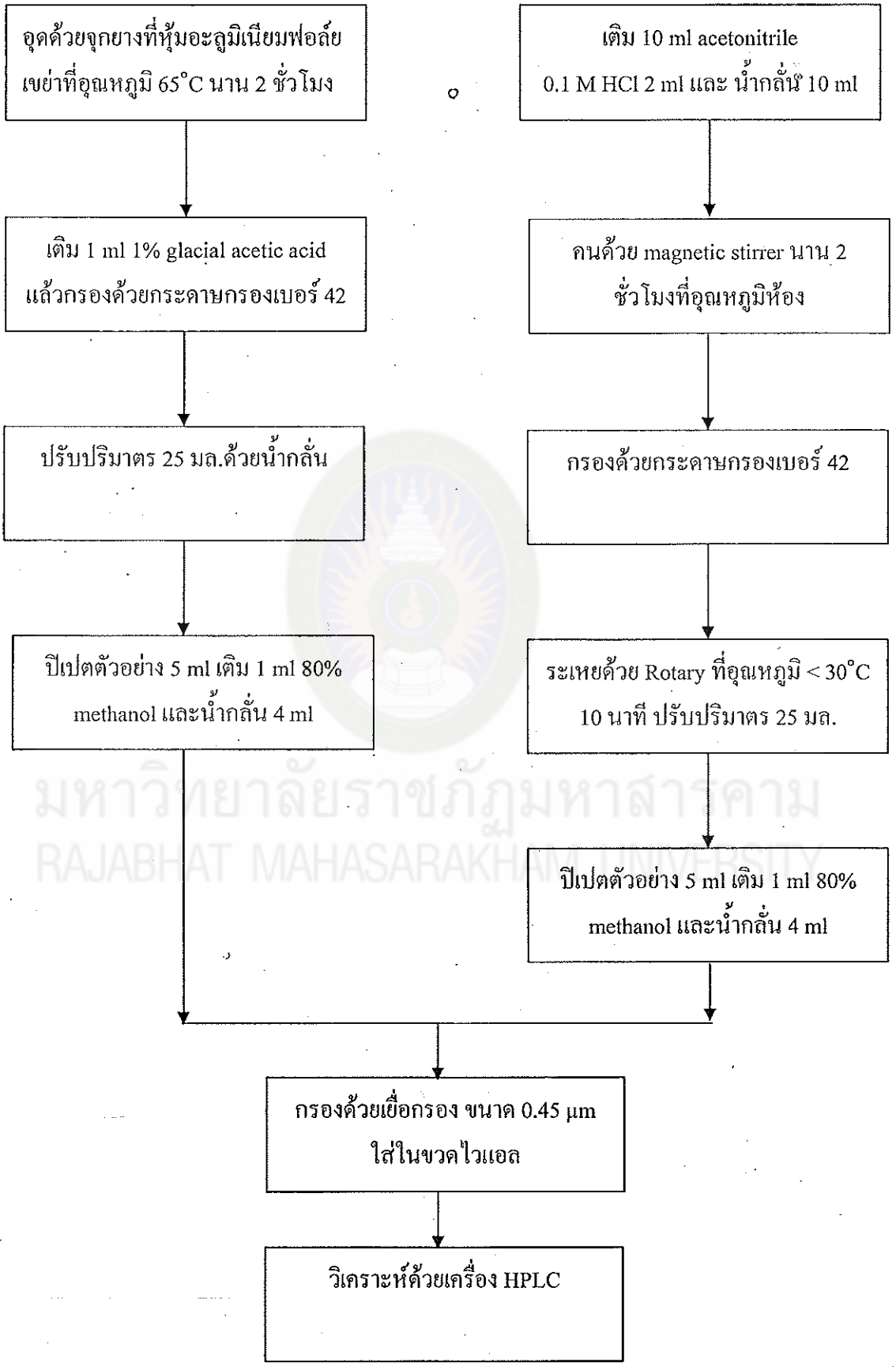
2.4. นำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติม 1 มิลลิลิตร 80% เมทานอลในน้ำ และน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยเยื่อกรองโพลีเตตระฟลูออโรเอทิลีน (polytetrafluoroethelene) ขนาด 0.45 ไมครอนและนำไปวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

แผนผังการตรวจหาปริมาณไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

แผนผังการตรวจหาปริมาณไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง (ต่อ)



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.4 วิธีการหาปริมาณสารไอโซฟลาโวน ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

การเตรียมมาตรฐานไอโวฟลาโวน โดยใช้สารมาตรฐานจีนีสติน (genistein) ชนิดที่เป็นอะไกลโคน (aglycone) เตรียมที่ความเข้มข้นที่ 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร (ศุภนิมิต ทีฆชุณหเถียร และคณะ :2547) เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน (calibration curves) เตรียมโดยละลายสารมาตรฐานด้วย 80% เมทานอล เตรียมที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยละลายสารมาตรฐานจีนีสติน (genistien) 25 มิลลิกรัม ด้วย 80% เมทานอล 25 มิลลิลิตร จากนั้นก็ปรับปริมาตรลงเรื่อยๆจนถึงความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปหาปริมาณไอโซฟลาโวนด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ;HPLC)

ตารางที่ 3.1 ระบบของโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(HPLC)ที่ใช้

Column	Reverses Phase C 18 (4.6 x 250 mm).
Detector	UV-Detector: 259 nm.
Solvent A	methanol
Solvent B	water
Inject	20 µl
Flow rate	1.0 ml/min

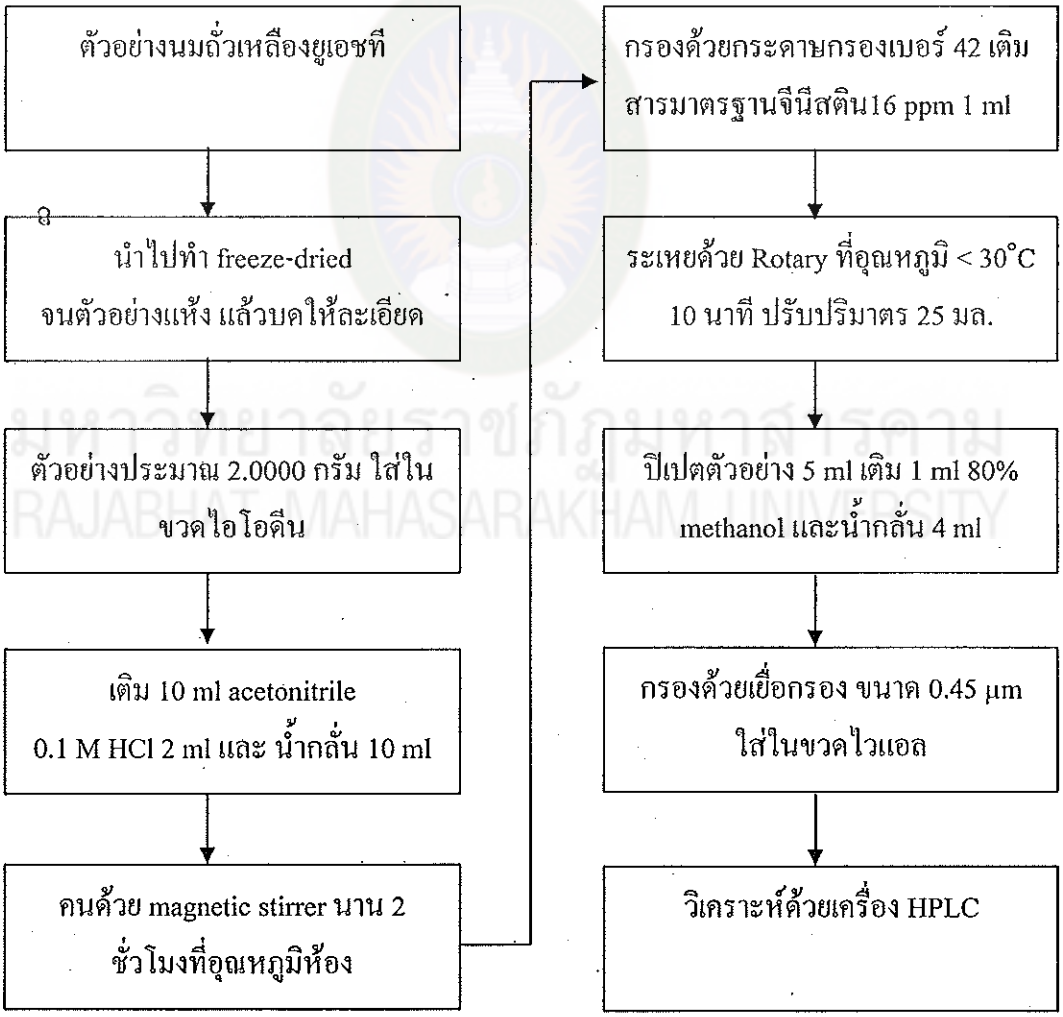
(ที่มา : ศุภนิมิต ทีฆชุณหเถียร และคณะ: 2547)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.5 การหาร้อยละการกลับคืน

นำตัวอย่างจากการชั่งตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชที 2.0130 กรัม เติมอะซีโตไนไตร 10 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร 2 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร คนสารละลายผสมด้วยเครื่องคนสารละลาย (magnetic stirrer) นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 เติมสารมาตรฐานจีนีสตินเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตรแล้วนำของเหลวผลกรองที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (rotary)ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30°C ปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน นำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติม 80% เมทานอล 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตรแล้วกรองด้วยเยื่อกรองโพลีเตตระฟลูออโรเอทิลีน(polytetrafluoroethelene) ขนาด 0.45 ไมครอนและนำไปวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

แผนผังการหาร้อยละการกลับคืน



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

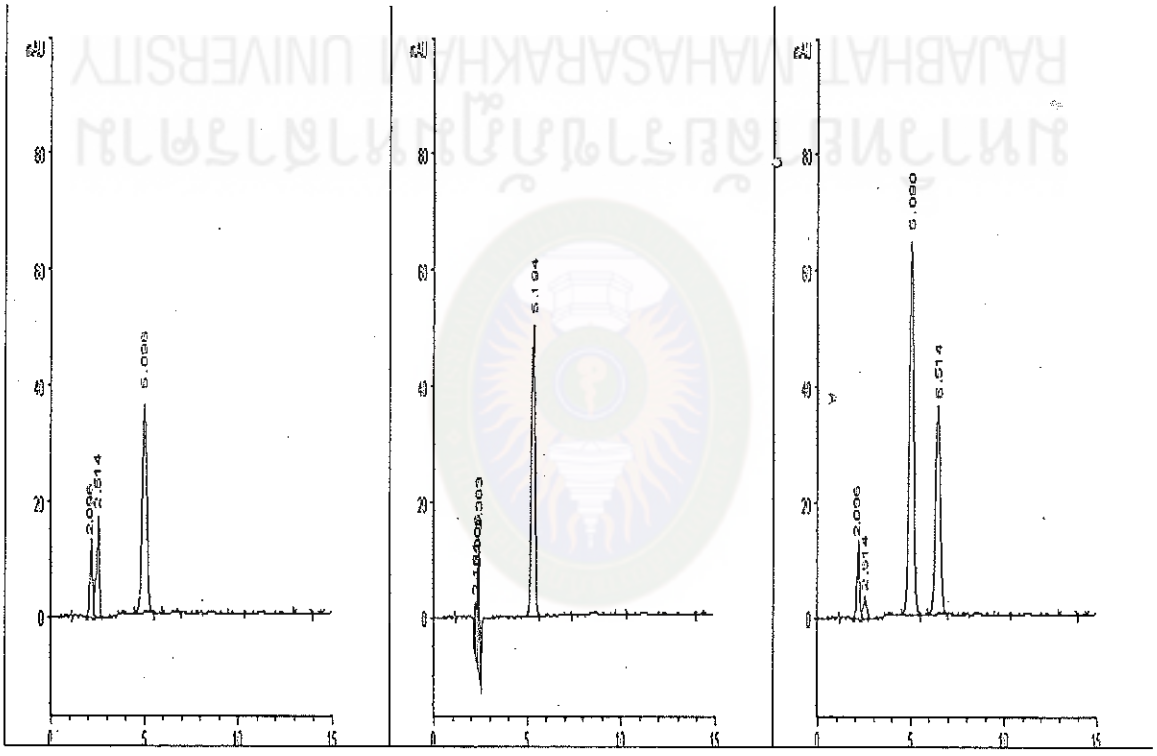
บทที่ 4

ผลการทดลอง

ในการตรวจหาปริมาณสารไอโซฟลาโวนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance Liquid Chronatography; HPLC) ได้ผลดังต่อไปนี้

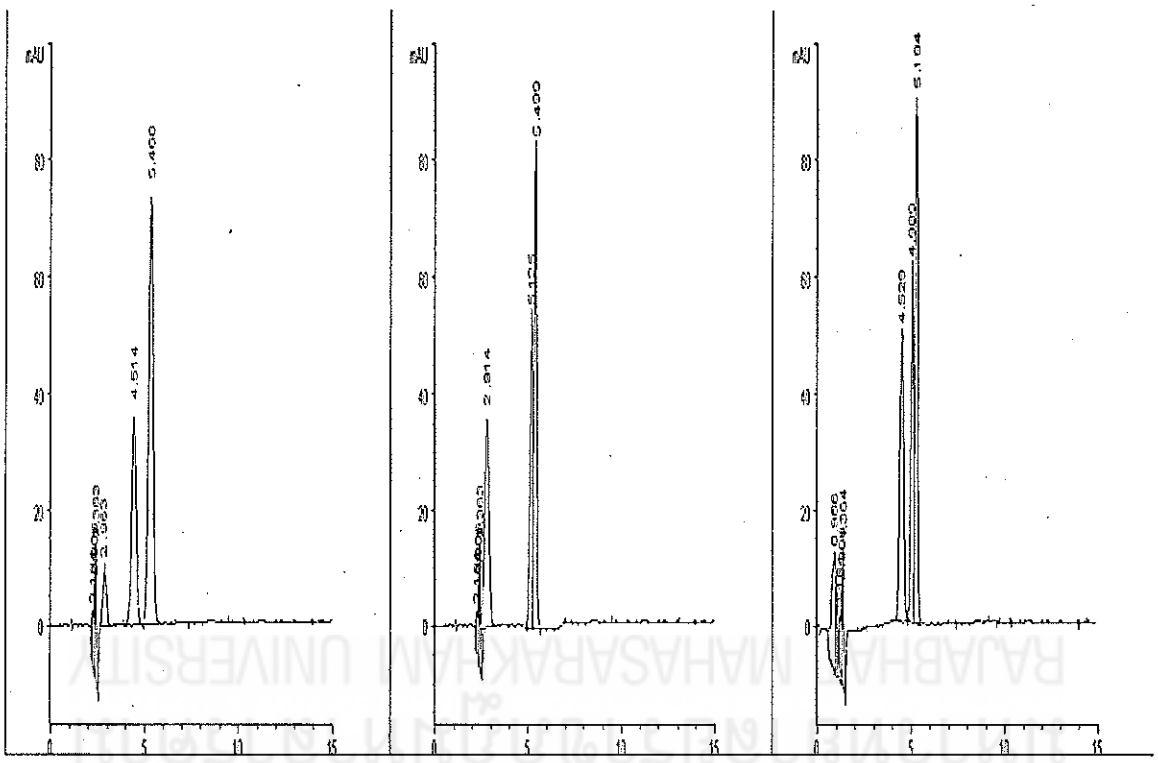
4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

จากการนำสารมาตรฐานจีนีสตินที่มีความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิกรัม/ลิตร มาหาค่า Retention time ที่ความยาวคลื่น 259 นาโนเมตร คอลัมน์ C 18 , อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ เมทานอล : น้ำ (70 : 30 V/V) ได้โครมาโทแกรมสารมาตรฐานจีนีสติน ดังนี้



ภาพที่ 4.1

โครมาโตแกรมสารมาตรฐานจีนีสตินที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร

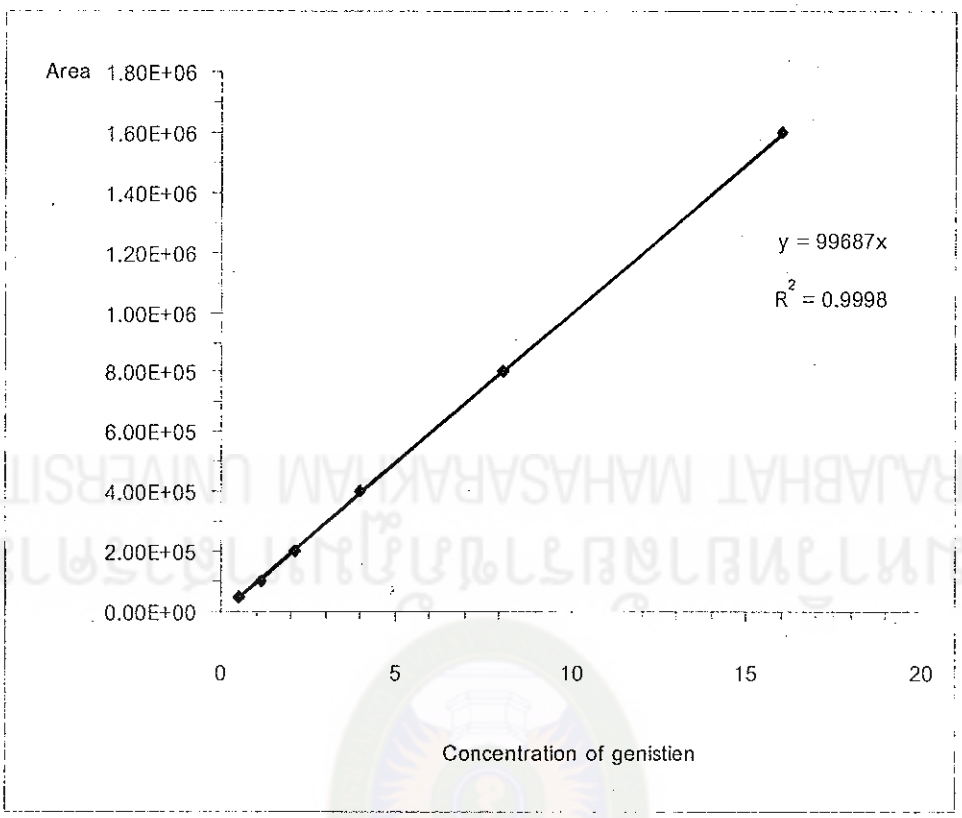


ภาพที่ 4.2

โครมาโตแกรมสารมาตรฐานจีนีสตินที่ความเข้มข้น 4, 8 และ 16 มิลลิกรัม/ลิตร

จากภาพโครมาโตแกรมสารมาตรฐานจีนีสตินมีค่า retention time เท่ากับ 5.096,5.194, 5.090, 5.468, 5.499 และ 5.194 นาที ตามลำดับ ความเข้มข้นเท่ากับ 0.4974, 1.1237, 2.0972, 4.0021, 8.1037 และ 15.9927 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

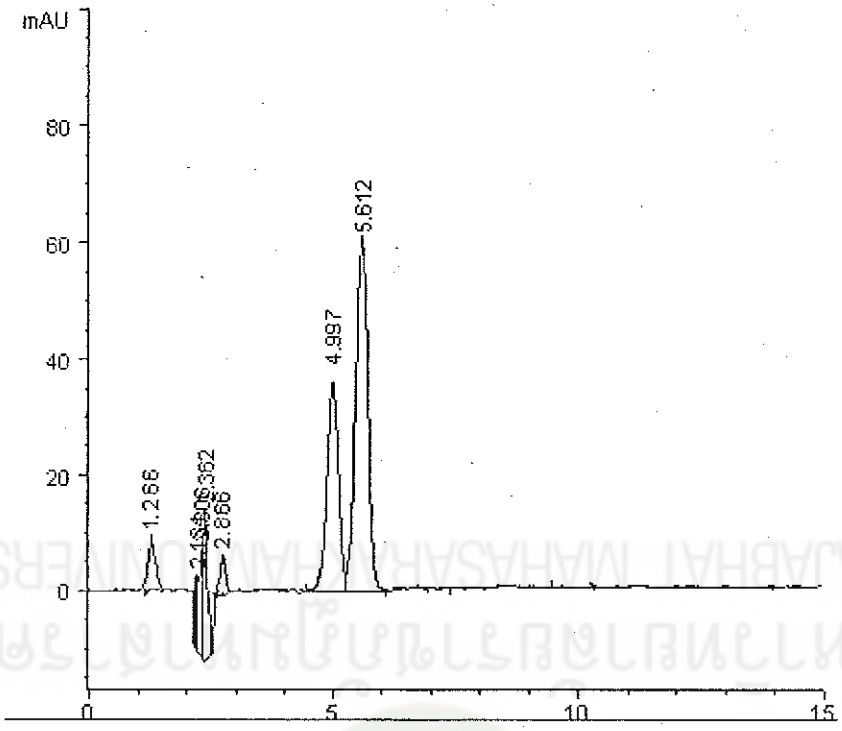
จากโครมาโตแกรมสารละลายมาตรฐานจีนีสตินที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4, 8และ 16 มิลลิกรัม/ลิตร นำมาสร้างกราฟมาตรฐานจีนีสตินได้กราฟมาตรฐานดังนี้



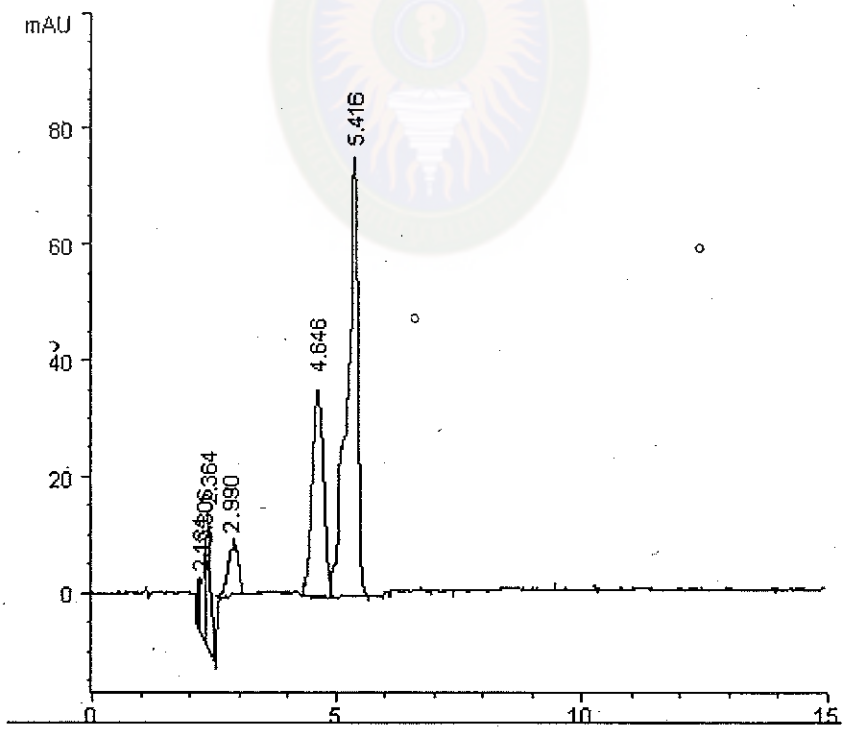
ภาพที่ 4.3 กราฟมาตรฐานจีนีสติน

จากรูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานจีนีสตินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานจีนีสตินเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟ สัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรงสัมพัทธ์เท่ากับ 0.9998 (R^2=0.9998)

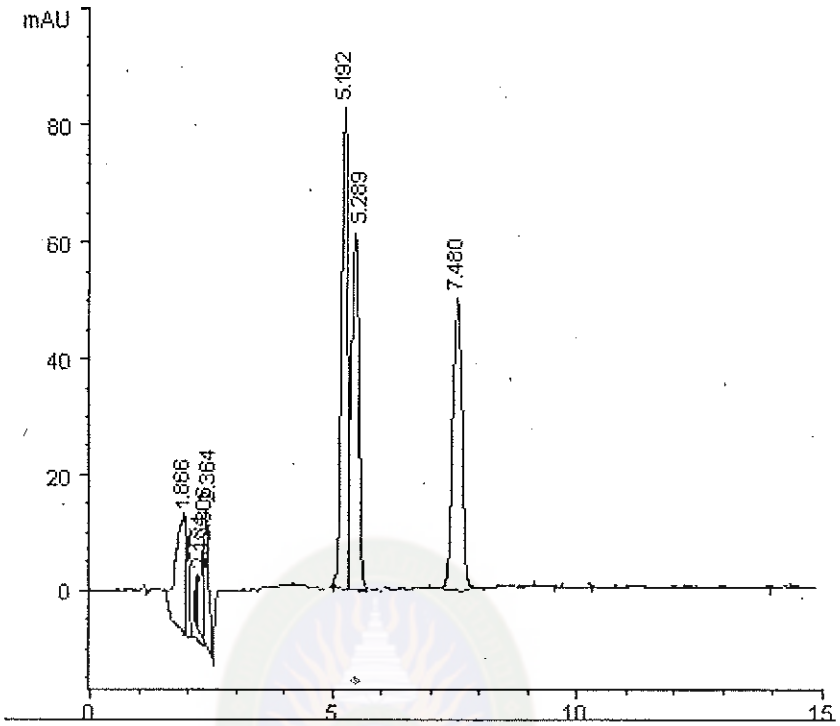
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง



ภาพที่ 4.5 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของนมถั่วเหลืองยูเอชที



ภาพที่ 4.6 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของตัวอย่างเต้าหู้ถั่วเหลือง



ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของตัวอย่างน้ำเต้าหู้

จากภาพโครมาโตแกรมของตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชที เต้าหู้ถั่วเหลือง และ น้ำเต้าหู้ มีค่า retention time เท่ากับ 5.612, 5.416 และ 5.192 นาที ตามลำดับ และความเข้มข้นเท่ากับ 3.0728 3.6601 และ7.1227 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ นำไปคำนวณปริมาณไอโซฟลาโวน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.1

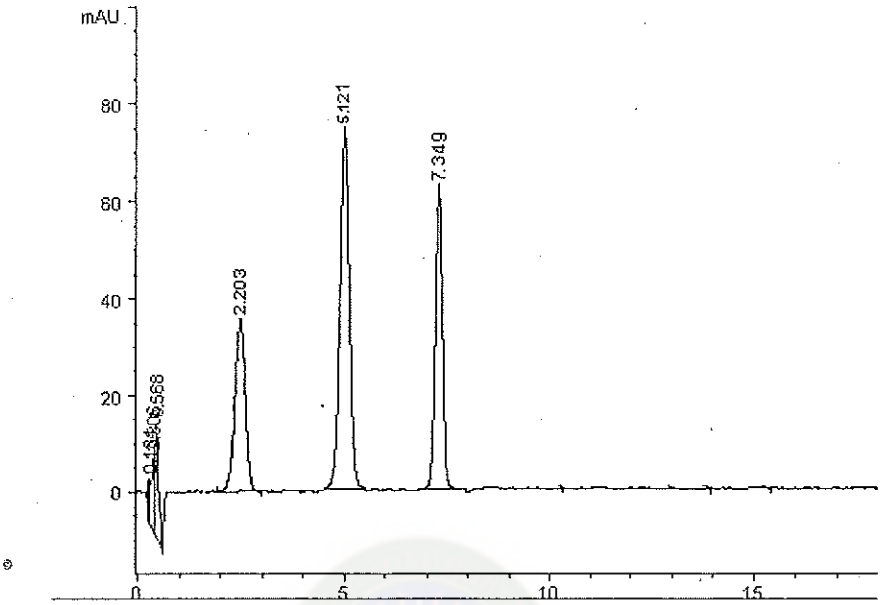
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง

ชนิดผลิตภัณฑ์	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (มก. / ล.)	ปริมาณที่คำนวณได้ (มก. /1 ก.)	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ($\times 10^{-4}$)	เฉลี่ยเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
นมUHT	1	2.0024	2.9821	0.0074	7.4463	7.8850
		2.0156	3.1615	0.0078	7.8426	
		2.0106	3.0728	0.0076	7.6415	
	2	2.0115	3.2567	0.0081	8.0952	
		2.0207	3.2737	0.0081	8.1004	
		2.0236	3.2901	0.0081	8.1293	
	3	2.0113	3.2114	0.0080	7.9834	
		2.0108	3.1818	0.0079	7.9118	
		2.0105	3.1423	0.0078	7.8147	
เต้าหู้ถั่วเหลือง	1	2.0033	3.6601	0.0091	9.1352	9.2758
		2.0064	3.6728	0.0092	9.1527	
		2.0082	3.7031	0.0092	9.2199	
	2	2.0128	3.8482	0.0096	9.5593	
		2.0118	3.8812	0.0096	9.6461	
		2.0112	3.8217	0.0095	9.5010	
	3	2.0028	3.6536	0.0091	9.1212	
		2.0024	3.6193	0.0090	9.0374	
		2.0026	3.6448	0.0091	9.1002	
น้ำเต้าหู้	1	2.0145	7.0902	0.0176	17.5979	18.0710
		2.0121	7.0356	0.0175	17.4832	
		2.0157	7.1227	0.0177	17.6681	
	2	2.0132	7.3647	0.0183	18.2910	
		2.0126	7.3125	0.0182	18.1668	
		2.0119	7.4629	0.0185	18.5469	
	3	2.0095	7.2412	0.0180	18.0174	
		2.0067	7.3803	0.0184	18.3891	
		2.0133	7.4407	0.0185	18.4789	

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.4 ผลการคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% Recovery)



ภาพที่ 4.7 ตัวอย่างโครมาโตแกรมร้อยละการได้คืนกลับ (%Recovery)

ตารางที่ 4.4 ผลร้อยละการกลับคืน

ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)	ความเข้มข้นของไอโซฟลาโวนในสารละลายตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของไอโซฟลาโวนในสารละลายตัวอย่างรวมกับสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการกลับคืน
1	2.0157	7.1227	7.4258	94.73 %
2	2.0119	7.4629	7.7681	95.37 %
3	2.0133	7.4407	7.7484	96.15 %
			ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน	95.42 %

จากค่าร้อยละการกลับคืนของสารละลายมาตรฐานไอโซฟลาโวน เท่ากับ 95.42 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวน ด้วยวิธีนี้ มีค่าความแม่น (accuracy) ที่ดีซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้คือ 95 – 105

4.5 การทดสอบทางสถิติ

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	UHT	7.867E-03	9	2.449E-04	8.165E-05
	TOFU	9.267E-03	9	2.345E-04	7.817E-05
Pair 2	UHT	7.867E-03	9	2.449E-04	8.165E-05
	FRESH	1.808E-02	9	3.930E-04	1.310E-04
Pair 3	TOFU	9.267E-03	9	2.345E-04	7.817E-05
	FRESH	1.808E-02	9	3.930E-04	1.310E-04

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	UHT & TOFU	9	.631	.068
Pair 2	UHT & FRESH	9	.667	.050
Pair 3	TOFU & FRESH	9	.289	.450

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	99% Confidence Interval of the Difference Lower	Upper			
Pair 1	UHT - TOFU	-1.40E-03	2.062E-04	6.872E-05	-1.63E-03	-1.17E-03	-20.373	8	.000
Pair 2	UHT - FRESH	-1.02E-02	2.934E-04	9.782E-05	-1.05E-02	-9.88E-03	-104.391	8	.000
Pair 3	TOFU - FRESH	-8.81E-03	3.951E-04	1.317E-04	-9.25E-03	-8.37E-03	-66.901	8	.000

RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

จากตารางการทดสอบทางสถิติ (t-test) ของข้อมูลปริมาณไอโซฟลาโวนที่คำนวณได้ (มิลลิกรัม /1 กรัม) จะเห็นว่ามีค่า t =20.373, 104.391 และ 66.901(ไม่คิดเครื่องหมาย) ตามลำดับ และมีค่า sig ที่น้อยกว่า 0.01 แสดงว่าตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชที เต้าหู้ถั่วเหลือง และ น้ำเต้าหู้ มีปริมาณไอโซฟลาโวนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

บทที่ 5
สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง 3 ชนิด ที่มีจำหน่ายในเขต อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารไอโซฟลาโวน โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) สามารถสรุปผลได้ดังนี้

การตรวจหาปริมาณสารไอโซฟลาโวนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง 3 ชนิดคือน้ำเต้าหู้ นมถั่วเหลือง UHT และเต้าหู้ถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ละ 3 ตัวอย่าง และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำรวมทั้งหมด 27 ตัวอย่าง ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) พบว่าน้ำเต้าหู้ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 มีปริมาณไอโซฟลาโวนเฉลี่ยเท่ากับ 7.0828, 7.3800 และ 7.3541 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ นมถั่วเหลืองยูเอชที ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 เฉลี่ยเท่ากับ 3.0721, 3.2735 และ3.1785 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และในเต้าหู้ถั่วเหลืองตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 มีปริมาณไอโซฟลาโวนเฉลี่ยเท่ากับ 3.6787, 3.8504 และ 3.6392 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเทียบเป็นปริมาณต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้งจะได้ว่า น้ำเต้าหู้ นมถั่วเหลืองยูเอชที และ เต้าหู้ถั่วเหลือง มีปริมาณไอโซฟลาโวนเท่ากับ 0.0180, 0.0093 และ 0.0079 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

5.2 อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง 3 ชนิด ที่มีจำหน่ายในเขต อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม คือ น้ำเต้าหู้ นมถั่วเหลืองยูเอชที และ เต้าหู้ถั่วเหลือง พบว่ามีปริมาณไอโซฟลาโวนที่แตกต่างกัน โดยน้ำเต้าหู้มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือเต้าหู้ถั่วเหลือง และนมถั่วเหลืองยูเอชที ตามลำดับ โดยคิดเป็นร้อยละคือ 18.0710, 9.2758 และ 7.8860 ($\times 10^{-1}$) ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. โครงการวิจัยนี้เป็นการหาปริมาณสารไอโซฟลาโวนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง โดยใช้สารจีนีสตินเป็นสารมาตรฐานในการชี้วัดปริมาณ ซึ่งในการทดลองอาจมีสารไอโซฟลาโวนที่เป็นประเภทอื่นปรากฏออกมา

2. การเตรียมสารมาตรฐาน เนื่องจากสารมาตรฐานเป็นสารที่มีราคาแพงจะต้องใช้ความระมัดระวังในการเตรียมและศึกษาข้อมูลให้ละเอียด

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

ณัฐดา จูงหัตถการสาธิต. 2545. **การแยกไอโซฟลาโวนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองโดยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.** ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์. 2546. เคล็ดลับแห่งสุขภาพอาหาร. **อาหาร.** 33(1) : 1-3.

นพมาศ โรจนเสถียร และคณะ. 2547. **ปริมาณของไอโซฟลาโวนในน้ำนมถั่วเหลืองยูเอชทีและน้ำเต้าหู้ที่มีจำหน่ายใน อ.เมือง จ.เชียงใหม่.** ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ และคณะ. 2542. **การศึกษาความเป็นไปได้ในการสกัดไอโซฟลาโวนจากกากถั่วเหลืองด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์.** โครงงานนักศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, ปทุมธานี.

สายพิณ พงษธา. 2548. **Phytoestrogen.** [ออนไลน์] [อ้างเมื่อ 5 มิถุนายน 2548]. เข้าถึงได้จาก http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/unit/fp/phyto.htm.

สุวลี โล่วิรกรณ์. 2548. วารสารบริการวิชาการ. **ถั่วเหลืองกับสุขภาพ** . 13 (1) : 21-24.

ศักดิ์ บวร. 2543. **ถั่วเหลืองกับสุขภาพ.** กรุงเทพฯ : โอเอ็นจี การพิมพ์.

อรอนงค์ กังสดาลอำไพ. 2543. **อาหารเสริมสุขภาพ : ถั่วเหลือง.** [ออนไลน์] [อ้างเมื่อ 6 กันยายน 2547]. เข้าถึงได้จาก http://www.pharm.chula.ac.th/clinic101_5/article/soy.html.

Anon. 1995. **Novasoy Isoflavone Compound 152-400 Technical Data Sheet.** American Journal of ClinicalNutrition. 62:645-649.

Gugger, Eric T. and Daniel, G. Dueppen. 1998. **Production of Isoflavone Enriched Fractions from Soy Protein Extracts.** U.S.Pat.No.5,792,503.

Tongtong Song. 1998. **Soy Isoflavone Analysis: Quality Control and a New Internal Standard.** [Online][Cited April 8, 2006]. Available from : www.ajcn.org.

Waggle, Doyle, H. Bryan, and Barbara A. 1998. **Recovery of Isoflavones from Soy Molasses.** Pat.No 5,821,361.

Y.C.Zhang. 2002. **Isoflavones Content and Anti-Cancer Activity of Soy Bread and Its Components.** Ohio State University : USA.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

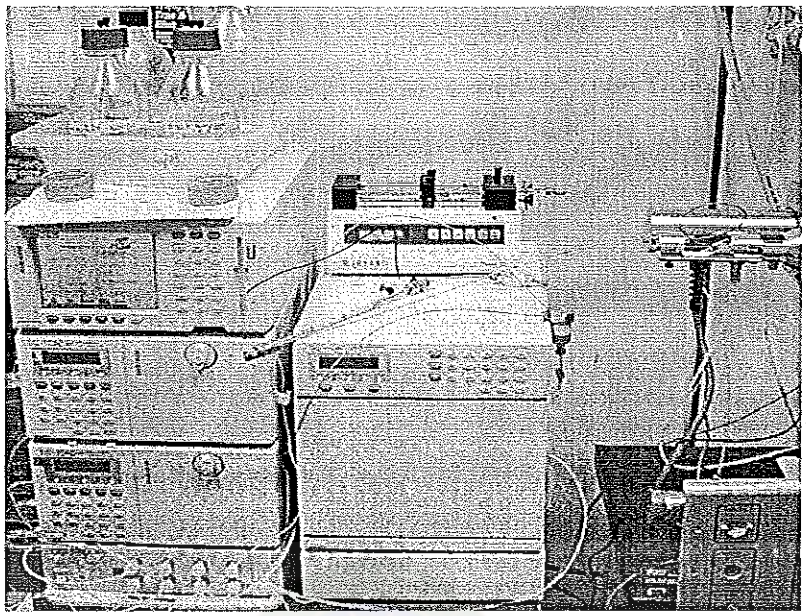
ภาคผนวก ก

โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

High Performance Liquid Chromatography

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



ภาพที่ ก-1 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu
(ที่มา: http://images.google.co.th)

หลักการ

เป็นเทคนิคการแยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่างไประหว่างสองเฟส คือเฟสอยู่กับที่ (Stationnary phase) อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว กับเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นแก๊สหรือของเหลว เฟสอยู่กับที่ที่ทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่ทำหน้าที่ในการชะล้างหรือพาสารเคลื่อนที่ผ่านเฟสที่อยู่กับที่ ขณะที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ผ่านเฟสที่อยู่กับที่ องค์ประกอบหรืออารชนิดต่างๆในสารตัวอย่างจะมีการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกระหว่างเฟสทั้งสองเฟสหลายๆครั้ง หรือมีการหน่วงเหนี่ยว ไว้ในเฟสอยู่กับที่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีขององค์ประกอบหรือสารแต่ละชนิดที่อยู่ในสารตัวอย่างที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเฟสทั้งสอง จากความแตกต่างนี้ ทำให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านเฟสที่อยู่กับที่ในอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ทำให้มีการแยกเกิดขึ้น ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านเฟสที่อยู่กับที่ หรือตำแหน่งของพีคที่ปรากฏบนโครมาโทแกรมสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และพื้นที่ใต้พีคหรือความสูงของพีคมีประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

1.Stationary phase(เฟสคงที่)

Stationary phase ใน HPLC หมายถึง ของแข็งที่บรรจุอยู่ใน Column ซึ่ง Mobile phase จะไหลผ่านอย่างต่อเนื่อง สารละลายตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าไปยัง Mobile phase ที่ไหลผ่าน injector port สารละลายตัวอย่างจะไหลไปพร้อม Mobile phase องค์ประกอบสารละลายที่แพร่ไป จะเกิดปฏิกิริยากับ Stationary phase แบบ non- covalent ปฏิกิริยาของ Stationary phase และตัวอย่าง + Mobile phase จะทำให้เกิดการแพร่หรือการแยกตัวขององค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ Stationary phase มากกว่า ทำปฏิกิริยากับ Mobile phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกมาจาก Column ได้ช้ากว่า และมี retention time นานกว่า ตรงกันข้ามกับตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ Mobile phase มากกว่า Stationary phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกจาก Column ได้เร็วกว่า และมี retention time น้อยกว่า Stationary phase มีหลายชนิด ได้แก่

2.Mobile phase (เฟสเคลื่อนที่)

Mobile phase ใน HPLC หมายถึง ตัวทำละลายที่จะใช้กับ Column หรือ Stationary phase อย่างต่อเนื่อง Mobile เปรียบเสมือนตัวพาสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสารละลายตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปยัง Mobile phase ผ่านไปยัง injector port สารละลายตัวอย่างจะไหลผ่าน Column ไปพร้อม ๆ กันกับ Mobile phase องค์ประกอบของสารละลายที่แพร่ผ่านไปจะทำปฏิกิริยากันแบบ non-covalent กับ Column ปฏิกิริยาทางเคมีของ Mobile phase + ตัวอย่าง กับ Column เป็นการควบคุมการแพร่และการแยกตัวขององค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างที่มีปฏิกิริยาที่รุนแรงกับ Mobile phase มากกว่า Stationary phase ตัวอย่างนั้นจะหลุดออกมาจาก Column เร็วกว่าและมี retention time สั้นกว่า แต่ถ้าตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงกับ Stationary phase มากกว่า Mobile phase จะทำให้ตัวอย่างหลุดออกาจาก Column ได้ช้ากว่า และมี retention time นานกว่า Mobile phase สามารถเปลี่ยนได้เพื่อควบคุมการเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่าง และ Stationary phase ซึ่ง Mobile phase มีหลายชนิดได้แก่ Isocratic , gradient และ polytypic

เทคนิคการแยกโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แบ่งออกเป็น 4 เทคนิค

1. Liquid – Solid Chromatography

หรือเรียก Normal phase เป็นเทคนิคในการแยกสารที่มีสภาพขั้วต่างกัน คือ สารที่มีสภาพขั้วต่ำจนถึงปานกลาง หรือที่มีตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชั่นต่างกัน ที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ไม่เหมาะสำหรับการแยกสารพวก homologous series เช่น alipatic substitution ต่างกันเฟสอยู่กับที่ส่วนใหญ่คือ ซิลิกาเจล และอะลูมินา แต่นิยมใช้ซิลิกาเจล ส่วนพวกเฟสเคลื่อนที่จะเป็นพวกไม่มีขั้ว

2. Liquid-Liquid Chromatography

ใช้เฟสอยู่กับที่เป็นของเหลว และเฟสเคลื่อนที่จะต้องไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน เทคนิคนี้ไม่สามารถวิเคราะห์แบบ gradient elution จึงนิยมแบบ bond phase chromatography มากกว่า bond phase chromatography แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ

2.1 Normal Bond Phase Chromatography

เฟสอยู่กับที่ที่มีหมู่ฟังก์ชั่นที่มีสภาพขั้วมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ การแยกอาศัยความแตกต่างของสภาพขั้วของสารสารที่มีสภาพขั้วมากที่สุจะถูกหน่วงเหนี่ยวให้อยู่ในคอลัมน์นานและถูกชะออกมาทีหลัง ส่วนเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์มีสภาพขั้วต่ำ ได้แก่ hexane methylene chroride chloroform

2.2 Reversed Phase Chromatography

เฟสอยู่กับที่ที่มีหมู่ฟังก์ชั่นไม่มีขั้ว ซึ่งมีสภาพขั้วน้อยกว่าเฟสที่อยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่คือ น้ำ เมทานอล acetonitrile tetrahydrofuran การแยกขึ้นอยู่กับความมีขั้วของสาร เนื่องจากเฟสอยู่กับที่เป็น ไฮโดรคาร์บอน เช่น octadetyl หรือ octyl ดังนั้นสารที่ไม่มีขั้วจะถูกหน่วงเหนี่ยวได้ดีบนคอลัมน์และจะถูกชะออกมาช้ากว่าสารที่มีขั้ว

3. Ion Exchange Chromatography

เป็นเทคนิคในการแยกสาร โดยอาศัยความแตกต่างของความแรงของประจุ ของสารตัวอย่างที่จับกับ ion group ที่อยู่บนพื้นผิวของเฟสอยู่กับที่ซึ่งมีประจุต่างจากสารตัวอย่าง สารใดจับได้ดีหรือแรงกว่าจะถูกชะออกมาทีหลัง เฟสอยู่กับที่เห็น resin ที่ประกอบด้วย synthetic cross-linked polymer หรือ silica ส่วนเฟสเคลื่อนที่ปกติใช้สารละลาย buffer มี counter ion ที่มีประจุตรงข้ามกับ ion change ของอนุภาค แต่ประจุเหมือนกับไอออนสารตัวอย่าง

4.Size Exclusion Chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสาร โดยอาศัยความแตกต่างของโมเลกุล และรูปร่าง และแยกในสารละลายอินทรีย์ใช้แยกสารที่มีขนาดเล็กได้และใช้ตรวจสอบสารที่มีโมเลกุลสูงๆ ใช้ cleam up สารโมเลกุลเล็กก่อนการวิเคราะห์ เทคนิค Size Exclusion Chromatography แบ่งออกเป็น 2 เทคนิค คือ

4.1 Gel Permeation Chromatography (GPC)

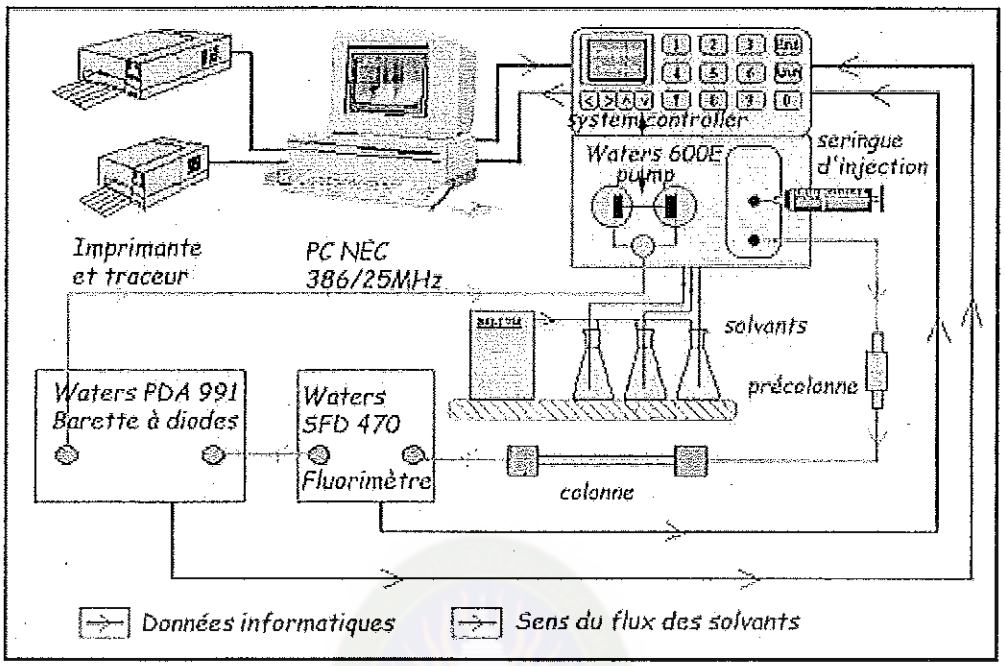
เกิดในตังทำละลายอินทรีย์ เช่น tetrahydrofuran กับ polystyrene matrix นิยมใช้หาการกระจายของ olymer ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ เป็นการแยก polymer mixture ออกเป็น polymer oligomer monomer และสาร additive เช่น ในอุตสาหกรรมพลาสติก

4.2 Gel Filtration Chromatography (GFC)

เป็นการแยกใน aqueous solution polymer และ protein เพื่อวิเคราะห์ complex protein mixture และหาน้ำหนักของโมเลกุลพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ส่วนประกอบหลักสำคัญของเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



ภาพที่ ก-2 ส่วนประกอบสำคัญของเครื่อง HPLC

(ที่มา: http://images.google.co.th)

1.เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) การเลือกเฟสเคลื่อนที่ต้องคำนึงถึง

1.1system compatibility คือความสามารถละลายซึ่งกันและกันระหว่าง เฟสเคลื่อนที่เก่ากับใหม่ ถ้าเข้ากันไม่ได้ต้องล้างคอลัมน์ด้วย intermediate solvent ก่อนเพื่อป้องกันการเกิดคอลอยด์ในเซลดีเทคเตอร์ ซึ่งทำให้เกิด drift หรือ noise

1.2ความแรงของเฟสเคลื่อนที่ เฟสเคลื่อนที่เป็นสารชนิดเดียว หรือสารละลายผสม ควรให้ค่า k ของสารตัวอย่างในช่อง 2-5

1.3Columการเลือกเฟสเคลื่อนที่ ขึ้นอยู่กับสารที่อยู่กับที่ ถ้าเฟสเคลื่อนที่เป็น bond phase ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี polarityสูงกว่า

2.Pump (solvent derivery system)

ใช้ดูดสารละลายจาก mobile phase reservoir มีลักษณะสำคัญดังนี้

2.1เปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ได้ง่าย

2.2อัตราการไหลคงที่

2.3ทำง่ายที่ความดันสูงๆประมาณ 3000-6000 psi

2.4ดูดสารละลายด้วยอัตราการไหลต่ำ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.5ทนต่อสารเคมี

2.6ใช้เฟสเคลื่อนที่ปริมาณน้อยๆได้

ชนิดของ Pump แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

1.Costant flow pump แบ่งเป็น 2 ชนิด

1.1Reciprocating pump นิยมใช้มากที่สุด เป็นปั้มชนิดลูกสูบชักเข้าออก ทำงาน 2 จังหวะ

จังหวะดูดเป็นจังหวะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ จังหวะผลักเป็นจังหวะผลักเฟสเคลื่อนที่ เข้าสู่ระบบ HPLC

1.2Positive-displacement pump มี 2 แบบ คือ Screw-driven syring กับ hydraulic amplifier Screw-driven syring คล้ายเข้มฉีดยาขนาดใหญ่ที่มีเฟสเคลื่อนที่บรรจุอยู่ในกระบอกมอร์เตอร์

จะทำให้กล่องเกียร์ผลักลูกสูบดันเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์

ข้อเสียคือ เฟสเคลื่อนที่จะหยุดไหลชั่วคราวเมื่อเฟสเคลื่อนที่ในกระบอกสูบหมดจึงไม่นิยมใช้

2.Costant pressure pump เป็นปั้มที่มีความดันคงที่ ไม่นิยมใช้ เพราะว่าใช้ความดันไม่เกิน 2000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3. Injector

Injector มี 2 แบบ

3.1 Syring injector เป็นการฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ ที่มีแรงดันน้อยกว่า 1000 psi โดยใช้เข็มแทงทะลุผ่าน septum ที่ทำด้วย silicon

ข้อเสียคือ เศษ septum อาจไปอุดตันคอลัมน์ได้

3.2 Sampling values นิยมใช้มากเพราะวาทนต่อแรงดัน 2000-6000 psi จะมี loop ทำหน้าที่ปิดเปิด 6 ทาง โดยใช้เข็มฉีดตัวอย่างเข้าไปเก็บไว้ใน loop เมื่อฉีดสารแล้วจึงทำการปิดลิ้นด้านหนึ่ง ก็จะทำหั้วอย่างเข้าสู่ระบบได้

4.Column

เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุด สารที่ใช้บรรจุส่วนใหญ่เป็นซิลิกาเจล ซึ่งทำหน้าท่เป็น adsorp หรือ partition หรือทั้งสองอย่างพร้อมกัน คอลัมน์ที่ใช้ packing ขนาดเล็ก sensitivity ดีแต่ต้องระวังความดันภายในระบบสูบ Guard column จะต่อระหว่างเครื่องฉีดตัวอย่าง และคอลัมน์ สามารถยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ได้ โดยจะช่วยขจัดสิ่งสกปรกก่อนเข้าสู่คอลัมน์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

5.Detector แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

Detector สำหรับ HPLC คือ องค์ประกอบหนึ่งที่ตอบสนองต่อสารประกอบตัวอย่างที่หลุดออกมาและให้ peak ปรากฏบน Chromatograph ในภายหลัง detector จะอยู่ตรงตำแหน่งที่ถัดจาก Stationary phase เพื่อคอยตรวจสอบสารประกอบที่หลุดออกมาจาก Column ความกว้างและความสูงของ peak โดยทั่วไปสามารถปรับให้มีความหยาบ ละเอียดได้ และพารามิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบก็สามารถควบคุมได้ detector มีหลายชนิดได้แก่

5.1) Refractive Index (RI) detector

ใช้หลักกการตรวจวัดการ เลี้ยวเบนหรือการหักเหของแสงของโมเลกุลของสารตัวอย่างเป็นคุณสมบัติของแต่ละโมเลกุลหรือของแต่ละสารประกอบ ซึ่งเรียกว่า ดัชนีการหักเหของแสง RI detector จะให้กำเนิดแสงส่องทะลุผ่าน Bi-modula flow - cell ผ่านไปยัง photodetector ช่องหนึ่งของ flow-cell จะตรงกับ Mobile phase ที่กำลังผ่าน Column ส่วนอีกช่องหนึ่งจะตรงกับ Mobile phase เท่านั้น การตรวจวัดจะเกิดขึ้นได้เมื่อแสงที่ถูกกำหนดขึ้นโค้งเข้าหาตัวอย่างมรากำลังหลุดออกจาก Column และอ่านค่าความแตกต่างระหว่าง 2 ช่อง

5.2) Ultra - Violet (UV) detector

เป็นการวัดการดูดกลืนแสงของ ตัวอย่าง โดยการใช้ความคลื่นหนึ่งช่วงคลื่น หรือ หลาย ๆ ช่วงคลื่น เช่น

1. Fixe wavelength เป็นการตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่นเพียงคลื่นเดียว โดยทั่วไปนิยมใช้ 254 นาโนเมตร

2. Variable wavelength เป็นการตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่นเดียวต่อการวัดหนึ่งครั้ง แต่สามารถเปลี่ยนยาวคลื่นได้

3. Diode Aray เป็นการตรวจวัด spectrum ของความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน UV detector ตอบสนองได้ดีต่อตัวอย่างที่มีปริมาณ 10-8 หรือ 10-9 กรัมต่อมิลลิลิตร

5.3) Fluorescent detector

เป็นการตรวสจวัดความสามารถของสาร ประกอบที่จะดูดกลืนแสงและปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นที่เฉพาะออกมา ซึ่งสารประกอบแต่ละตัวจะมี Fluorescent เฉพาะตัว เมื่อสารประกอบที่อยู่ในภาวะถูกกระตุ้นผ่าน Flow - cell กับ photodetector ขณะนั้น monochromator จะตรวจวัดการแพร่กระจายความยาวคลื่น เครื่องตรวจวัดนี้ตอบสนองได้ดีต่อสารตัวอย่างที่มีปริมาณ 10-9 ถึง 10-11 กรัมต่อมิลลิลิตร

5.4) Radiochemical detector

เป็นการตรวจวัดที่เกี่ยวข้องกับการใช้ อุปกรณ์ที่สามารถแผ่รังสี ซึ่งมักจะใช้ tritium (3H) หรือ carbon-14 (14C) ทำการได้โดย ตรวจวัด Fluorescent ร่วมกับ beta-particle ionization และเป็น

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

วิธีที่นิยมใช้ในการวิจัยเกี่ยวกับ สารถูกเปลี่ยนแปลงโดยขบวนการภายในร่างกาย เครื่องตรวจวัดมี 2 ชนิดคือ

1. Homogeneous มีการเพิ่ม scintillation fluid เข้าไปใน Column เพื่อให้เกิด Fluorescent

2. Heterogeneous มี Lithium silicate และ Fluorescent เกิด ขึ้นโดย beta-particle ทำปฏิกิริยากับ detector cell

detector ชนิดนี้ตอบสนองได้ดีกับตัวอย่างที่ปริมาณ 10-9 ถึง 10-10 กรัมต่อมิลลิลิตร

5.5) Electrochemical detector

เป็นการตรวจวัดสารประกอบจากการ เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ มักตรวจวัดปริมาณที่เพิ่มหรือหายไปของ electron จากการที่ตัวอย่างแพร่ผ่าน electrode

เครื่องวัดชนิดนี้ตอบสนองได้ดีกับตัวอย่างที่มีปริมาณ 10-12 ถึง 10-13 กรัมต่อมิลลิลิตร

5.6) Mass spectroscopy (MS) detector

สารประกอบหรือโมเลกุล ของสารประกอบถูกทำให้เป็นไอออน เมื่อแพร่ผ่าน mass analyzer และ ไอออนที่เกิดขึ้นก็จะถูกตรวจสอบ มีวิธีการมากมายสำหรับการทำให้เกิดไอออน เช่น

1.Electron Impact (EI) เป็นการทำให้เกิด electron โดยการใช้ไฟฟ้าแรงสูงกับสารตัวอย่างที่หลุดอกมาจาก Column

2. Fast Atom Bombarbment (FAB) เป็นการใช้อะตอม Xenon วิ่งด้วยความเร็วสูง เพื่อให้เกิดการแตกตัวของไอออนของตัวอย่างที่หลุดออกมาจาก Column detector ชนิดนี้ตอบสนองได้ดีต่อตัวอย่างที่มีปริมาณ 10-8 ถึง 10-10 กรัมต่อมิลลิลิตร

5.7) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) detector

รู้กันอยู่ว่า nuclei กับ odd-nubered mass เช่น 3H และ 13C มีการ spin ของแกนแบบสุ่ม เมื่อนำไปวางไว้ระหว่างขั้วแม่เหล็กที่แรง มีการ spin ของแกนเป็นทั้งแบบ parallel และ anti-parallel กับสนามแม่เหล็ก การ spin แบบ parallel ทำให้มันมีพลังงานต่ำ nuclei จึงแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่ดูดกลืนไว้ แล้วทำให้ตัวมันเองอยู่ในสถานะที่มีพลังงานสูงกว่า เนื่องจากเป็น resonance ส่วน H หรือ C จะผลิต spectra แตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งหรือการอยู่ใกล้ชิดกันของโมเลกุลหรือธาตุที่เป็นองค์ประกอบ เพราะว่า nuclei ทั้งหมดในโมเลกุลถูกล้อมรอบด้วยหมอกอิเล็กตรอนที่เปลี่ยนแปลงสนามแม่เหล็กที่ล้อมรอบและเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนพลังงาน

5.8) Light-Scattering (LS) detector

เมื่อแหล่งกำเนิดปล่อยเป็นลำแสง ออกไปพุ่งเข้าหาอนุภาคที่อยู่ในสารละลาย แสงบางส่วนจะสะท้อนกลับ บางส่วนถูกดูดกลืน บางส่วนทะลุผ่าน หรือบางส่วนก็กระจัดกระจายไป การตรวจวัดด้วยวิธีนี้ใช้ 2 ลักษณะ ที่เกิดขึ้น คือ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1. Nephelometry เป็นการตรวจวัดหาแสงที่กระจัดกระจายไปโดยสารละลาย ซึ่งสามารถตรวจวัดได้หลายมุม การตรวจวัดวิธีนี้ขึ้นอยู่กับการที่ไม่มีแสงปกติ หรือที่กระจัดกระจายของแสงที่ทำการตรวจสอบนั้นเกิดขึ้นที่ความมืดหรือไม่มีแสงปกติ

2. Turbidimetry เป็นการตรวจหาปริมาณของแสงที่ลดลงขณะผ่านเข้าไปในสารละลายที่กำหนด เพราะฉะนั้นจึงเป็นการตรวจวัดหาปริมาณของแสงที่เหลืออยู่

5.9) Near - Infrared detector เป็นการตรวจวัดหาสารประกอบใน spectrum จาก 700 - 1100 นาโนเมตร

5.10) Degaser เป็นอุปกรณ์ที่สำคัญสำหรับทำลายแก๊สที่เกิดขึ้นใน Mobile phase เพราะ แก๊สที่เกิดขึ้นมีผลต่อการ Detect และทำให้ Column เสียหาย

Detector แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

5.1Solute specific detector

-UV Detector

-Fluoresence Detector

-Electrochemical Detector

5.2 Mass specific Detector

-Refractive Index Detector

-Conductivity Detector

6.Recorder

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การประยุกต์ใช้ HPLC

1) Preparative HPLC

การใช้ HPLC ในการทำสารประกอบให้บริสุทธิ์ แยกเป็นสารเดี่ยว ๆ ที่สำคัญคือระดับความบริสุทธิ์ของสารละลาย ซึ่งเป็นจำนวนของสารประกอบที่ถูกผลิตขึ้นต่อหน่วยเวลา สิ่งที่จะได้จากการวิเคราะห์ HPLC คือ ข้อมูลเกี่ยวกับ สารประกอบตัวอย่าง ซึ่งข้อมูลเหล่านั้นได้แก่ ชนิด ปริมาณ และการแยกออกจากกันของสารประกอบ

2) Chemical Separations

ในการแยกสารเคมีสามารถใช้ HPLC ทำได้ โดยอาศัยประโยชน์จากคุณสมบัติของสารประกอบที่มีอัตราการแพร่ภายใน Column และ Mobile phase ที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแยกสารประกอบเคมีหลาย ๆ ชนิดออกจากกันได้ และในการใช้ HPLC ในการแยกสารประกอบเคมีนี้ สิ่งที่เป็นตัวควบคุมหรือมีอิทธิพลต่อการแยกของสารเคมี คือ การเลือกใช้ Stationary phase และ Mobile phase

3) Purification

ขบวนการแยกหรือขบวนการสกัดสารประกอบเคมีที่เราต้องการออกจากสารประกอบอื่นหรือสิ่งเจือปนต่าง ๆ สารประกอบแต่ละตัวจะมีลักษณะของ peak ภายใต้เงื่อนไขของ Chromatographic ที่จะสามารถรับรู้ได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับว่าสารประกอบที่จะทำการแยกคืออะไร และสัมพันธ์กับสารตัวอย่างอย่างไร Chromatographer อาจต้องเลือกเงื่อนไข เลือกคุณสมบัติของ Mobile phase ติดตามกระบวนการแยก ตลอดจนกระทั่งสารประกอบที่ต้องการมีการรวมกันและหลุดออกจาก Stationary phase การแพร่ของสารประกอบและสารปนเปื้อนอื่น ๆ จะแพร่ผ่าน Column แตกต่างกันพอที่จะได้สารประกอบที่ต้องการมีความบริสุทธิ์ได้

4) Identification

การจำแนกชนิดของสารประกอบโดยใช้ HPLC นั้น เป็นขั้นตอนหนึ่งของการตรวจสอบด้วย HPLC ในการจำแนกสารประกอบใด ๆ ก็ตาม สิ่งที่ควรเลือกเป็นอันดับแรกคือ Detector เมื่อเลือกมาแล้วก็มาติดตั้งไว้ในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะทำการตรวจสอบ พารามิเตอร์ของขบวนการตรวจสอบนี้ จะให้ peak ของสารประกอบตัวอย่างอย่างชัดเจน ซึ่งสังเกตได้จาก peak ที่ปรากฏบน Chromatograph การจำแนก peak จะใช้ retention time และใช้ peak ที่แยกออกจาก peak ที่ไม่ต้องการ ซึ่งขบวนการตรวจสอบจะแสดงออกมา การเปลี่ยนแปลง retention time ของสารประกอบพารามิเตอร์หลาย ๆ ตัวสามารถตรวจจับได้

การจำแนกชนิดของสารประกอบโดยใช้ HPLC กระทำได้โดยการค้นคว้าจากหนังสือ, วารสาร และการลองผิดลองถูก ตัวอย่างของสารประกอบที่เราทราบแล้วว่าเป็นอะไรจะเป็นประโยชน์ต่อการจำแนกชนิดของสารประกอบที่เรายังไม่ทราบได้ การจำแนกชนิดของสารประกอบเพื่อยืนยันความถูกต้องนั้นควรใช้วิธีการตรวจสอบตั้งแต่ 2 วิธีขึ้นไปประกอบกัน

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

5) Quantification

การหาปริมาณของสารประกอบโดยใช้ HPLC เป็นกระบวนการเปรียบเทียบสารประกอบที่ไม่ทราบความเข้มข้นกับสารละลายที่ทราบความเข้มข้น มีวิธีทำคือ ฉีดชุดของสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนเข้าไปใน HPLC เพื่อทำการตรวจสอบ Chromatograph จะแสดง peak ของชุดของข้อมูลที่สำพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลายที่ฉีดเข้าไป

ใช้สูตรการหาพื้นที่รูปสามเหลี่ยม คำนวณหาพื้นที่ใต้ peak แต่ละ peak นำข้อมูลมาทำเป็น calibration curve โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง พื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทำได้ เช่น โปรแกรม Excel หรือ Cricket graph จากโปแกรมสร้างกราฟจะได้กราฟเส้นตรง พร้อมสมการเส้นตรง $y=mx + b$ เรียกว่าสมการ calibration curve

สมการเส้นตรงนี้สามารถนำมาใช้ในการหาตัวอย่างที่นักวิทยาศาสตร์ฉีดตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้นเข้าไปใน HPLC ให้เป็น แกน X แล้ว peak ที่ปรากฏบน chromatograph ให้เป็นแกน Y ค่า Y นี้ได้มาจากสมการเส้นตรง calibration ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างได้โดยการแก้สมการ หาค่า X

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

วิธีคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไอโซฟลาโวน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การคำนวณ

1. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไอโซฟลาโวนในสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง

เมื่อนำตัวอย่างจากนมถั่วเหลืองยูเอชที 2.0130 กรัม เติมอะซีโตไนไตร 10 มิลลิลิตรกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร 2 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร คนสารละลายผสมด้วยเครื่องคนสารละลาย (magnetic stirrer) นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วนำของเหลวผลกรองที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (rotary)ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30°C ปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติม 80% เมทานอล 1 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตรแล้วกรองด้วยเยื่อกรองโพลีเตตระฟลูออโรเอทิลีน (polytetrafluoroethelene) ขนาด 0.45 ไมครอนและนำไปวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าได้ความเข้มข้นของสารไอโซฟลาโวนเฉลี่ยเท่า 3.1747 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลาย 1000 มิลลิลิตรมีปริมาณไอโซฟลาโวน = 3.1747 มิลลิกรัม

ถ้าสารละลาย 10 มิลลิลิตร มีปริมาณไอโซฟลาโวน $= \frac{3.1747 \times 10}{1000}$ มิลลิกรัม

สารละลาย 5 มิลลิลิตร มีปริมาณไอโซฟลาโวน $= \frac{3.1747 \times 10 \times 5}{1000 \times 10}$ มิลลิกรัม

∴สารละลาย 25 มิลลิลิตร มีปริมาณไอโซฟลาโวน $= \frac{3.1747 \times 10 \times 5}{1000 \times 10}$ มิลลิกรัม

$= 0.0159$ มิลลิกรัม

ตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชที 2013.0 มิลลิกรัม มีปริมาณไอโซฟลาโวน = 0.0159 มิลลิกรัม

ถ้าตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชที 1000 มิลลิกรัม จะมีปริมาณไอโซฟลาโวน $= \frac{0.0159 \times 1000}{2013.0}$

$= 0.007886$ มิลลิกรัม

∴ตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชที 1 กรัม จะมีปริมาณไอโซฟลาโวน = 0.007886 มิลลิกรัม

หรือ ตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชที มีปริมาณไอโซฟลาโวน = 0.007886 มิลลิกรัม / 1 กรัม

คิดเป็นร้อยละ

จะได้ตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชที 1 กรัม จะมีปริมาณไอโซฟลาโวน $= 7.886 \times 10^{-6}$ กรัม

ถ้าตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชที 100 กรัม จะมีปริมาณไอโซฟลาโวน $= \frac{7.886 \times 10^{-6} \times 100}{1}$

$= 7.886 \times 10^{-4}$ %โดยน้ำหนัก

ดังนั้น ปริมาณไอโซฟลาโวนในตัวอย่างนมถั่วเหลืองยูเอชทีมีค่า $= 7.886 \times 10^{-4}$ % โดยน้ำหนัก

*** ตัวอย่างอื่นๆ คำนวณในทำนองเดียวกัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2. การคำนวณหาร้อยละการกลับคืน

คำนวณปริมาณสารละลายมาตรฐานไอโซฟลาโวน เมื่อเติมลงในตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จาก Stock solution เข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนี้ คือ

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_2 = \frac{1\,\text{ml} \times 16\,\text{ppm}}{25\,\text{ml}}$$

$$= 0.64\,\text{ppm}$$

$$C_2 V_2 = C_3 V_3$$

$$V_3 = \frac{5\,\text{ml} \times 0.64\,\text{ppm}}{10\,\text{ml}}$$

$$= 0.32\,\text{ppm}$$

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไปในตัวอย่างมีความเข้มข้น 0.32 ppm

การคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืนดังนี้

จากการใช้ตัวอย่างน้ำเต้าหู้ที่มีน้ำหนักแห้ง 2.0157 กรัม มีปริมาณไอโซฟลาโวนที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 7.1227 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานไอโซฟลาโวนไปวิเคราะห์พบว่าได้ความเข้มข้นมีค่าเท่ากับ 7.4258 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้น เมื่อ นำไปคำนวณหาร้อยละการกลับคืนได้ผลดังนี้

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{7.4258 - 7.1227}{0.32} \times 100$$

$$= 94.73$$

ดังนั้นร้อยละการกลับคืนมีค่าเท่ากับ 94.73 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างอื่นๆในทำนองเดียวกัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY