

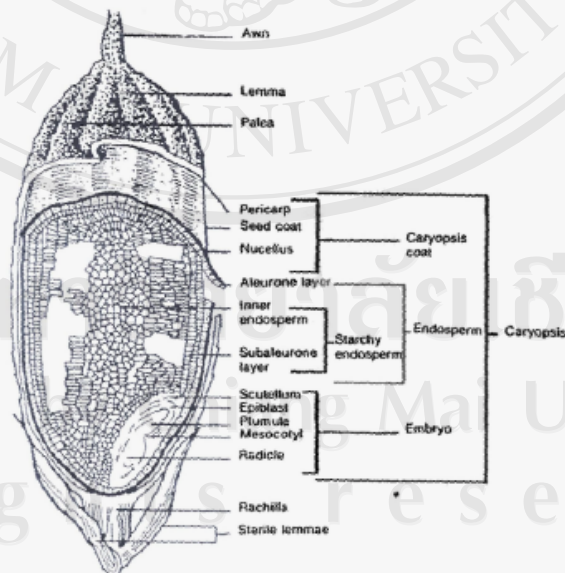
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว (rice)

ข้าว เป็นคำทั่วไปที่ใช้เรียก เมล็ดข้าว (rice fruit, rice grain, หรือ rice seed) ซึ่งทางพฤกษศาสตร์จะหมายถึง ผล (fruit) ที่มีลักษณะเป็นผลเดี่ยว (single fruit) เกิดจากรังไข่อันเดียวชนิดลอย (superior ovary) ของดอกเดี่ยวในแต่ละดอกย่อย ที่เกิดรวมกันอยู่เป็นช่อดอก ผลเดี่ยวนี้อาจติดแน่นอยู่กับผนังของรังไข่ หรือเยื่อหุ้มผล (pericarp) ซึ่งเมื่อผลสุกหรือแก่จะเป็นผลแห้ง (dry fruit) ที่ไม่แตก (indehiscent fruit) เรียกว่า เมล็ด (caryopsis grain) ที่มีเยื่อหุ้มผล และเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat หรือ testa) เชื่อมรวมกันอย่างแนบแน่นโดยตลอดผลหรือเมล็ดข้าวจะมีลักษณะแตกต่างตามพันธุ์ ในด้านขนาด รูปร่าง สี การมีหาง (awn) หรือไม่มีหาง และขน (pubescence) หรือ ไม่มีขนบนเปลือกแข็ง (hull หรือ husk) (อรอนงค์, 2547)

เมล็ดข้าว (รูปที่ 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 และคณะ, 2002)



รูปที่ 1 องค์ประกอบของเมล็ดข้าว

ที่มา : Zhou และคณะ (2002)

2.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของข้าว

องค์ประกอบทางเคมีของข้าวมีผลมาจากพันธุ์ สภาพการปลูก การเก็บเกี่ยว และกระบวนการแปรรูปจากข้าวเปลือกเป็นข้าวกล้อง และข้าวสาร ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของข้าว (อรอนงค์, 2547) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของข้าวเปลือกและส่วนที่ได้จากการขัดสี
ที่ 14% ความชื้น

ส่วนของข้าว	โปรตีน (ก.)	ไขมัน (ก.)	เส้นใย (ก.)	เถ้า (ก.)	คาร์โบไฮเดรต (ก.)	เส้นใยอาหาร (ก.)	พลังงาน	
							(กิโลจูล)	(กิโลแคลอรี)
ข้าวเปลือก	5.8-7.7	1.5-2.3	7.2-10.4	2.9-5.2	64-73	16.4-19.2	1,580	378
ข้าวกล้อง	7.1-8.3	1.6-2.8	0.6-1.0	1.0-1.5	73-87	2.9-3.9	1,520-1,610	363-385
ข้าวสาร	6.3-7.1	0.3-0.5	0.2-0.5	0.3-0.8	77-89	0.7-2.3	1,460-1,560	349-373
รำข้าว	11.3-14.9	15.0-19.7	7.0-11.4	6.6-9.9	34-62	24-29	670-1,990	399-476
แกลบ	2.0-2.8	0.3-0.8	34.5-45.9	13.2-21.0	22-34	66-74	1,110-1,390	265-332

ที่มา : อรอนงค์ (2547)

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามิน ได้แก่ ไทอะมิน (วิตามินบี 1) ไรโบเฟลวิน (วิตามินบี 2) ไนอะซิน (กรดนิโคตินิก) และแอลฟา-โทโคเฟอรอล (วิตามินอี) และแร่ธาตุ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสในไฟทิน เหล็ก และสังกะสี (ตารางที่ 2) ของข้าวเปลือก และส่วนที่ได้จากการแปรรูปข้าว (14% ความชื้น)

ตารางที่ 2 ปริมาณวิตามินและเกลือแร่ของข้าวเปลือก และส่วนที่ได้จากการขัดสีที่ 14% ความชื้น

ส่วนของข้าว	ไทอะ-มิน (มก.)	ไรโบ-เฟลวิน (มก.)	ไนอะ-ซิน (มก.)	แอลฟา-โทโคเฟอรอล (มก.)	แคลเซียม (มก.)	ฟอสฟอรัส (มก.)	ไฟทิน-ฟอสเฟต (ก.)	เหล็ก (มก.)	สังกะสี (มก.)
ข้าวเปลือก	0.26-0.33	0.06-0.11	2.9-5.6	0.90-2.00	10.80	0.17-0.39	0.18-0.21	1.4-6.0	1.7-3.1
ข้าวกล้อง	0.29-0.61	0.04-0.14	3.5-5.3	0.90-2.50	10.50	0.17-0.43	0.13-0.27	0.2-5.2	0.6-2.8
ข้าวสาร	0.02-0.11	0.02-0.06	1.3-2.4	0.3-0.75	10.30	0.08-0.15	0.02-0.07	0.2-2.8	0.6-2.3
รำข้าว	1.20-2.40	0.18-0.43	26.7-49.9	2.60-13.3	30-120	1.1-2.5	0.09-2.2	8.6-43.0	4.3-25.8
แกลบ	0.09-0.21	0.05-0.07	1.6-4.2	0	60-130	0.03-0.07	0	3.9-9.5	0.9-4.0

ที่มา : อรอนงค์ (2547)

2.2 รำข้าว (Rice bran)

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

ในรำข้าวมีเอนไซม์ไลเปสมาก ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจะสลายไขมัน ทำให้ปริมาณไขมันในรำข้าวลดลง และมีกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น ดังนั้นไม่ควรเก็บรำข้าวไว้ก่อนนำไปสกัดน้ำมันนานเกิน 24 ชั่วโมง และควรทำลายเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันรำข้าว โดยปกติน้ำมันรำข้าวที่สกัดได้ใหม่ๆ จะมีปริมาณของกรดไขมันอิสระต่ำ แต่จะสามารถเพิ่มขึ้นเป็น 10% ภายใน 1 ชั่วโมง ถ้าไม่ทำลายเอนไซม์ไลเปสที่มีในรำข้าวก่อนการสกัดเป็นน้ำมัน ซึ่งวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพมากในการทำลายเอนไซม์ไลเปสที่มีในรำข้าว คือ การให้ความร้อนกับรำข้าวที่อุณหภูมิ 85-100°C ประมาณ 3 ชั่วโมง จะทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระลดลง (Bernardini, 1985) นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นๆ อีกมากมาย ที่สามารถทำลายเอนไซม์ไลเปสในรำข้าวได้ เช่น การทำแห้งเพื่อให้มีปริมาณความชื้นต่ำ การอบ การนึ่ง การใช้ไอน้ำ หรือการดันผ่านเกลียวอัด การเก็บภายใต้อุณหภูมิต่ำ การสัมผัสกับเอทานอล หรือไอของเอทานอล และการทำกับรังสีอิเล็กตรอน หรือสารเคมี (Rossell และคณะ, 1999)

ในประเทศสหรัฐอเมริกา การทำลายเอนไซม์ไลเปสในรำข้าว ทำโดยการดันผ่านเกลียวอัดแบบแห้ง โดยใช้แรงเฉือน การเสียดสี และความดัน ในการให้ความร้อนกับรำข้าว โดยอุณหภูมิของรำข้าวอยู่ในช่วง 130-140°C เป็นเวลา 3 นาที ซึ่งสภาวะดังกล่าวจะเพียงพอต่อการทำลายหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส แต่อาจจะไปเปลี่ยนแปลง หรือทำลาย สารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติได้ เช่น โทโคเฟอร์รอล และโทโคไตรอีนอล ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบมาก และเป็นที่ต้องการให้มีในรำข้าว นอกจากนี้ในรำข้าว ยังพบน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลอื่นๆ ในระดับสูง เมื่อได้รับแรงเฉือน และความร้อนมากเกินไป อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (Maillard reactions) และทำให้รำข้าวถูกเผาไหม้เกรียม ส่งผลให้เกิดลักษณะที่ไม่ต้องการ หรือมีกลิ่นรสนิยม เป็นต้น ดังนั้นการทำลายเอนไซม์ไลเปสในรำข้าว โดยการดันผ่านเกลียวอัด ควรทำภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง โดยเติมน้ำหรือไอน้ำเข้าไปโดยตรง และทำการคงอุณหภูมิของรำข้าว ให้

การตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสในรำข้าวที่ผ่านการทำให้เสถียรด้วยความร้อนหรือวิธีอื่นๆ ทำได้โดยการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่เหลืออยู่ในรำข้าว เพราะเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสมีความคงตัวต่อความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปส ดังนั้นหากตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ในรำข้าวที่ผ่านการทำให้เสถียรแล้วไม่พบ แอกติวิตีของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสถูกทำลายหมดแล้ว นอกจากนี้วิธีการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส เป็นวิธีที่ง่าย และน่าเชื่อถือมากกว่าวิธีอื่นๆ ในการทดสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสในรำข้าว (Hargrove และคณะ, 1994)

2.2.1 องค์ประกอบของน้ำมันรำข้าว

น้ำมันรำข้าวเป็นผลิตภัณฑ์จากรำข้าวคิบซึ่งหมายถึง ส่วนผสมของรำละเอียด และคัพพะ และจากกรรมวิธีการทำน้ำมันรำข้าว ก็จะได้รำที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ซึ่งนำไปทำผลิตภัณฑ์อื่นได้ต่อไป (อรอนงค์, 2547)

น้ำมันรำข้าวคิบ (crude rice bran oil) ประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์ ประมาณ 80% ของน้ำมัน โดยน้ำมันรำข้าวมีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ (Nicolosi และคณะ, 1994) แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 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 และคณะ (1994)

จากตารางที่ 3 พบว่า น้ำมันรำข้าว มีกรดโอเลอิก เป็นองค์ประกอบสูงถึง 40-50% รองลงมา คือ กรดลิโนเลอิก มีประมาณ 20-42% เป็นต้น

ปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ขึ้นอยู่กับปริมาณของการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ที่เกิดขึ้นก่อนการ stabilize รำข้าว ซึ่งองค์ประกอบของน้ำมันรำข้าวดิบ (Nicolosi และคณะ, 1994) แสดงดังตารางที่ 4

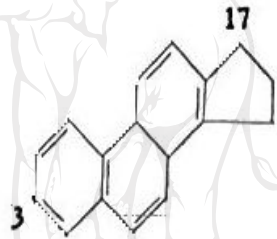
ตารางที่ 4 องค์ประกอบของน้ำมันรำข้าวดิบ

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

ที่มา : Nicolosi และคณะ (1994)

น้ำมันรำข้าว นอกจากประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่แล้ว ยังมีสารประกอบอื่นๆ ปนอยู่อีกด้วย ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด ไกลโคลิพิด สเตอรอล แวกซ์ โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอล โดยฟอสโฟลิพิด จะพบในรูปของ ฟอสฟาทีดิลโคลีน (phosphatidylcholine)

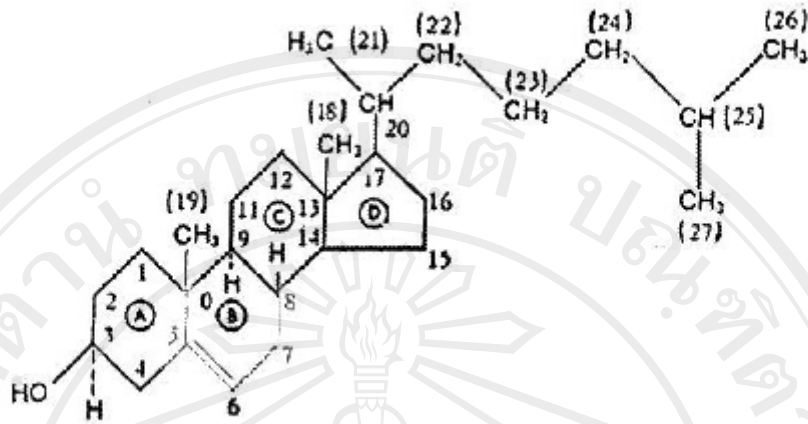
สำหรับไกลโคลิพิด จะประกอบด้วย อนุพันธ์ของกาแลคโตส และกลูโคส นอกจากนี้ น้ำมันรำข้าวยังมีสารที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ ซึ่งประกอบด้วย สเตอรอล ประมาณ 42% อะลิฟาติก และเทอพินิกแอลกอฮอล์ 24% เอสเทอร์ของกรดเฟอร์ูลิก (ferulic acid ester) 20% ไฮโดรคาร์บอน 10% และ อื่นๆ อีก 2% ซึ่งสเตอรอล เป็นส่วนของสารที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ที่มี ปริมาณมากที่สุด โดยประกอบด้วย สเตอรอลอิสระ เอสเทอร์ของสเตอรอล สเตอริลไกลโคไซด์ และเอซิลสเตอริลไกลโคไซด์ ซึ่งสเตอรอล คือ alicyclic alcohol แบบง่ายๆ โดยโครงสร้าง โมเลกุลของ alicyclic alcohol (Bernardini, 1985) แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของ alicyclic alcohol

ที่มา : Bernardini (1985)

โดยตำแหน่งที่ 3 ของ alicyclic alcohol คือ alcoholic oxidril และ สเตอรอล ชนิดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งจะแตกต่างกันตรงที่ธรรมชาติของพันธะคู่ ธรรมชาติของ side chain ที่เชื่อมตรงตำแหน่งของคาร์บอนตำแหน่งที่ 17 และ asymmetry ของโครงสร้าง โมเลกุล ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลของสเตอรอล (Bernardini, 1985) แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของสเตอรอล
ที่มา : Bernardini (1985)

โดยทั่วไป น้ำมันจะประกอบด้วยสารที่เกิดปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชัน หรือการไฮโดรไลซิสด้วยด่างไม่ได้ ประมาณ 0.5-2.0% แต่ในน้ำมันรำข้าว จะมีสารที่เกิดปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชันไม่ได้ 3-7% (Rossell และคณะ, 1999) หรือ 3-5% (Sarmento และคณะ, 2006)

นอกจากนี้ในน้ำมันรำข้าว ยังพบโอริซานอล ในปริมาณ 0.96-2.9% โดยโอริซานอลคือ เอสเทอร์ของกรดเพอรูลิก และไตรเทอทีนอยด์ แอลกอฮอล์ และพบในส่วนของสเตอรอล ที่ถูกกำจัดออกก่อนในช่วงการทำรีไฟน์ของน้ำมัน ซึ่งโอริซานอลจะมีคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

น้ำมันรำข้าวยังประกอบด้วย แวกซ์ ซึ่งความเข้มข้นของแวกซ์ในน้ำมันดิบ ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด และสายพันธุ์ของรำข้าว โดยแวกซ์เป็นองค์ประกอบในน้ำมันรำข้าวประมาณ 3-9% โดยทั่วไปในการสกัดที่ใช้อุณหภูมิสูงขึ้นจะได้แวกซ์ปริมาณมากขึ้น ซึ่งแวกซ์จะถูกกำจัดออกมาจากรำข้าว เมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายในการสกัด แวกซ์จะมีค่า Iodine values ต่ำ (10-12) และมีจุดหลอมเหลวสูง (82-84°C) แวกซ์ถูกจำแนกออกเป็น 2 ส่วน คือ hard fraction และ soft fraction โดย hard fraction จะพบ fatty alcohols ได้แก่ C-24, C-26 และ C-30 นอกจากนี้ยังพบ กรดไขมันอิ่มตัว ได้แก่ C-22, C-24 และ C-26 และยังพบ normal alkanes ได้แก่ C-29 และ C-31 สำหรับ soft wax จะประกอบด้วย C-24 และ C-30 alcohols, C-16 และ C-24 กรดไขมันอิ่มตัว และยังพบ C-21 และ C-29 normal alkanes นอกจากนี้ น้ำมันรำข้าวยังมี

น้ำมันรำข้าวที่ผ่านกระบวนการรีไฟน์แล้วสามารถพบสเตอรอล โอรีซานอล และ โทโคไตรอีนอลมากกว่าน้ำมันพืชที่ผ่านการรีไฟน์แล้วชนิดอื่น (Ausman และคณะ, 2005) ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันรำข้าวที่ผ่านการรีไฟน์ ดังตารางที่ 5

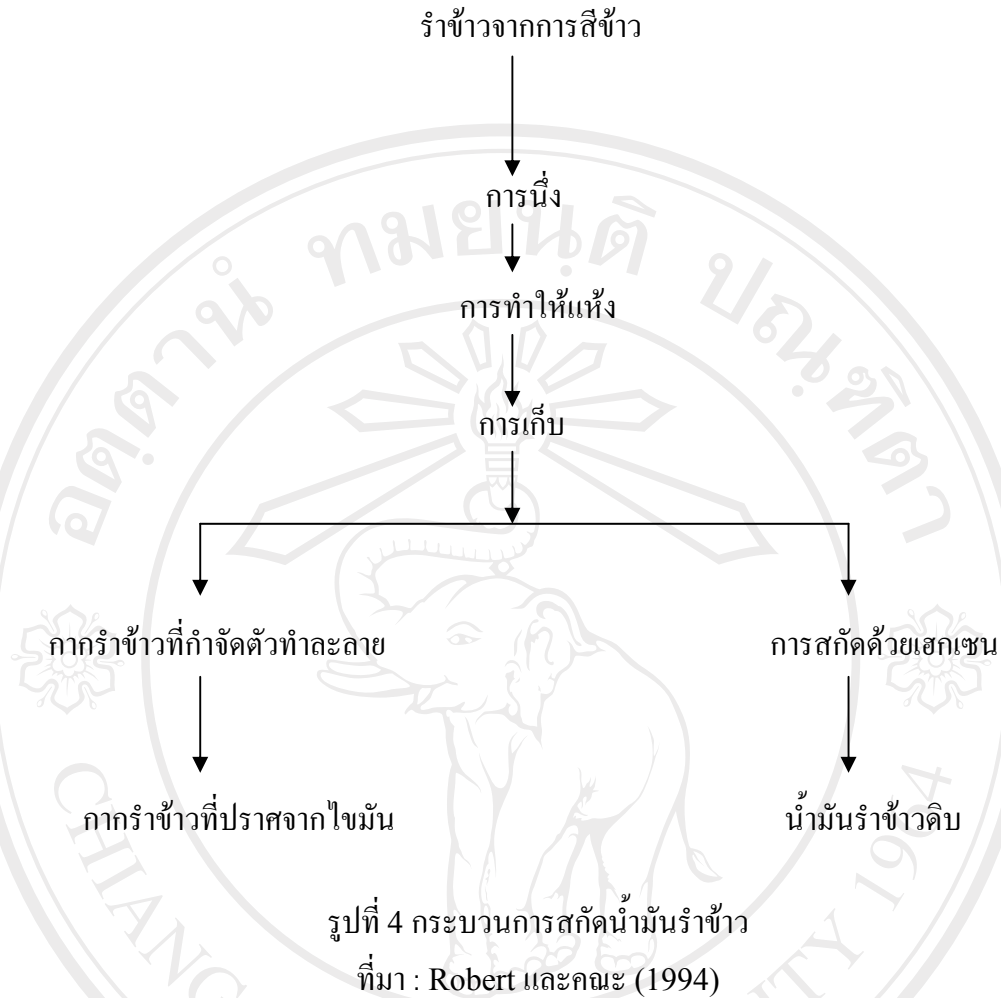
ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันรำข้าวที่ผ่านการรีไฟน์

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

ที่มา : Ausman และคณะ (2005)

2.2.2 การสกัดน้ำมันรำข้าว

รำข้าวสดที่ได้จากการสีข้าว จะมีระดับของกรดไขมันอิสระเริ่มต้นที่ 1.5-2.0% และรำข้าวที่ผ่านการนึ่งจะมีกรดไขมันอิสระ เท่ากับ 2-5% ระดับของกรดไขมันอิสระในรำข้าวสำหรับการสกัดน้ำมันนั้นควรจะต่ำ เพื่อง่ายต่อการสกัด และเพื่อให้มีประสิทธิภาพของการรีไฟน์ของน้ำมันดีตามปริมาณที่ต้องการ กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าว แสดงดังรูปที่ 4



การสกัดน้ำมันจากรำข้าว ทำได้โดยใช้เครื่องอัดแบบไฮดรอลิก (hydraulic press) ซึ่งจะบีบคั้นน้ำมันออกมา หรือใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย หรือใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน สำหรับการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยใช้เครื่องอัดแบบไฮดรอลิกนั้น จะได้น้ำมันปริมาณจำกัดประมาณ 50% ซึ่งน้ำมันรำข้าวที่ผ่านการบีบคั้น โดยทั่วไปจะต้องผ่านการกรองก่อนทำการรีไฟน์น้ำมันต่อไปด้วยปริมาณที่แตกต่างกัน (Nicolosi และคณะ, 1994)

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

รำข้าวสำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลาย ควรจะนึ่งเพื่อทำลาย หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส และเพื่อง่ายต่อการทำให้เป็นเม็ดหรือแผ่นบาง ๆ ซึ่งจะช่วยให้ตัวทำละลายไหลซึม



ไขมันและน้ำมันที่สกัดออกมาด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลาย จะมีสารประกอบชนิดอื่นละลายเจือปนออกมามาก ซึ่งสารต่างๆเหล่านี้ มีผลต่อ สี กลิ่น และรสชาติ ของไขมันและน้ำมัน สารเจือปนบางชนิดมีสมบัติคล้ายไขมัน ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด สารประกอบเชิงซ้อนของไขมัน และ โปรตีน (fat-protein complex) คาร์โบไฮเดรต กรดไขมันอิสระ สารสีต่างๆ ไซหรือ แวกซ์ กลีเซอไรด์ที่มีจุดหลอมเหลวสูง และสารที่ให้กลิ่นต่างๆ เช่น แอลดีไฮด์ คีโตน และไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นสารต่างๆ เหล่านี้จำเป็นต้องกำจัดออกให้หมด โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การกำจัดแว็กซ์ (Dewaxing)

การกำจัดแว็กซ์ของน้ำมันรำข้าว ขณะที่น้ำมันรำข้าวอยู่ในรูป micella ซึ่งก็คือ สารละลายของน้ำมันอยู่ในตัวทำละลาย จะเป็นวิธีการกำจัดแว็กซ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยวิธีการกำจัดแว็กซ์ สามารถทำได้โดย การทำให้ micella เย็นตัวลงที่อุณหภูมิประมาณ 15°C และปล่อยให้แว็กซ์แข็งตัว จากนั้นแยกแว็กซ์ออกโดยการกรอง หรือ การปั่นเหวี่ยง (centrifugation) (Nicolosi และคณะ, 1994)

2. การกำจัดกัม (Degumming)

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

วิธีการกำจัดกัมของน้ำมันรำข้าวโดยทั่วไป เป็นการล้างน้ำมันด้วยน้ำ หรือ การใช้สารสำหรับการกำจัดกัมเช่น กรดฟอสฟอริก หรือ กรดซิตริก (Nicolosi และคณะ, 1994) สำหรับการกำจัดกัม โดยการล้างน้ำมันด้วยน้ำ ซึ่งมีทั้งแบบเป็นชุด (batch process) และแบบต่อเนื่อง (continuous process) สำหรับแบบเป็นชุดทำได้โดยการเติมน้ำอ่อน หรือ ใอน้ำลงในน้ำมันประมาณ 1-2% ขึ้นอยู่กับปริมาณของฟอสฟาไต์ที่อุณหภูมิ 70°C ผสมให้เข้ากันนาน 30-60 นาที แล้วปล่อยทิ้งไว้ สารประกอบฟอสโฟลิพิดที่ละลายได้ในน้ำ แต่ไม่ละลายในน้ำมัน จะแยกตัวออกไปละลายอยู่ในน้ำ หลังจากนั้นแยกออกจากน้ำมันได้โดยวิธีการกรอง หรือใช้เครื่องเหวี่ยง หรือ ปล่อยทิ้งไว้ สำหรับแบบต่อเนื่อง น้ำมันจะถูกทำให้ร้อนถึงอุณหภูมิ 70-80°C แล้วจึงเติมน้ำลงไปให้ผสมกับน้ำมันนานประมาณ 15-30 นาที แล้วจึงส่งต่อไปยังเครื่องเหวี่ยง ประสิทธิภาพของการกำจัดกัมขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ปล่อยให้น้ำละลายเอาฟอสฟาไต์ออกมา กระบวนการกำจัดกัมไม่ได้ล้างน้ำเพียงครั้งเดียวอาจล้าง 2 หรือ 3 ครั้งก็ได้ นอกจากนี้อาจเติมกรดฟอสฟอริก หรือ กรดซิตริก ลงไปในน้ำที่ใช้ล้างจะช่วยลดปริมาณเหลือให้น้อยลง โดยกรดจะช่วยเปลี่ยนเหลือให้อยู่ในรูปที่แยกออกได้ง่าย การใช้น้ำเพียงอย่างเดียว จะกำจัดเหลือได้ประมาณ 14-64% หากเติมกรดฟอสฟอริกลงไปในน้ำล้างด้วยจะสามารถกำจัดเหลือออกได้มากถึง 93% การกำจัดกัมที่ดีต้องควบคุมปริมาณของน้ำ กรด อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ล้าง เพื่อแยกกัมออกให้มากที่สุด มีการสูญเสียน้ำมันน้อยที่สุด และน้ำมันจะต้องสัมผัสกับอากาศน้อยที่สุด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดออกซิเดชัน และหากใช้น้ำมากเกินไประหว่างการล้างก็จะทำให้เกิดไฮโดรไลซิสได้ (นิธิยา, 2548)

Indira และคณะ (2000) ได้ศึกษาการกำจัดกัม น้ำมันรำข้าวที่มีฟอสโฟลิพิดเป็นองค์ประกอบ 1.8% โดยใช้น้ำ ซึ่งสภาวะของการกำจัดกัมที่ได้ทำการศึกษา ได้แก่ ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ เวลา และความเร็วในการกวน โดยประสิทธิภาพของการกำจัดกัม จะวัดค่าของกัมแห้ง ฟอสโฟลิพิด และอะซิโตนที่ไม่ละลายในกัม 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 กับสารละลายต่าง จะได้สบู่เกิดขึ้น ซึ่งสบู่ไม่ละลายในน้ำมัน และจะถูกกำจัดออกโดยการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน การใช้ด่างมากเกินไปประมาณ 0.5% ที่เกินจาก 18% ของสารละลายต่าง จะทำให้การทำให้มีสมบัติเป็นกลาง ของทั้งกรดไขมันอิสระ และสารที่ทำการกำจัดกัมที่มีสมบัติเป็นกรด เกิด Neutralization อย่างสมบูรณ์ แต่ถ้าใช้ด่างมากเกินไป จะทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสที่โมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล ทำให้มีกรดไขมันอิสระถูกแยกออกมาอยู่ในรูปสบู่มากขึ้น ทำให้ได้ปริมาณน้ำมันบริสุทธิ์ (refined oil) ลดน้อยลง โดยอุณหภูมิของน้ำมันควรน้อยกว่า 65°C สำหรับน้ำมันรำข้าว เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จะเกิดสีเข้มขึ้นอย่างมาก (Nicolosi และคณะ, 1994)

4. การฟอกสี (Bleaching)

เป็นกระบวนการที่ใช้แยกเอาสารประกอบที่เป็นสารสีต่างๆ ลิพิดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และองค์ประกอบที่มีขี้จากน้ำมัน การฟอกสีทำได้ง่ายโดยใช้ acid-activated bleaching clays เติมน้ำมันในน้ำมัน 1-3% จากนั้นของผสมจะถูกกวน และทำให้ร้อนภายใต้สูญญากาศ ซึ่ง bleaching agent จะดูดซับ (adsorb) พวกสารสีไว้ แล้วกรองเพื่อแยกเอา acid-activated bleaching clays ออก (Nicolosi และคณะ, 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 (tran-fatty acid) เกิดขึ้น (นิธิยา, 2548)

น้ำมันที่จะนำมาฟอกสีจะต้องมีฟอสฟอไรต์ และสบู่เหลืออยู่น้อยที่สุด ควรมีฟอสฟอไรต์ประมาณ 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 เปอร์ออกไซด์ รวมทั้งพวกสเตอรอล แวกซ์ โมโนกลีเซอไรด์ สารสีบางชนิด และสารประกอบที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน สารที่ให้กลิ่นเหล่านี้ จะมีอยู่ในน้ำมันประมาณ 0.2-0.5%

วิธีการกำจัดสารที่หักกลืนในน้ำมันรำข้าว ทำได้โดยการเป่าไอน้ำร้อนลงไป ในน้ำมันร้อน ที่อุณหภูมิประมาณ 220-250°C ในภาชนะปิด ภายใต้สุญญากาศที่มีความดัน 4-8 mmHg โดยใช้ไอน้ำร้อน 3-5% อุณหภูมิที่ใช้ต้องไม่สูงเกินไป เพราะจะทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็นสารพอลิเมอร์ได้ (Nicolosi และคณะ, 1994)

ภายหลังการกำจัดกลิ่น การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีนั้นทำโดยการวัดค่าเปอร์ออกไซด์ ซึ่งน้ำมันที่ผ่านกระบวนการกำจัดกลิ่นแล้วจะต้องมีค่าเปอร์ออกไซด์ เป็นศูนย์ มีกรดไขมันอิสระเหลืออยู่ประมาณ 0.02-0.04% และมีโมนอกลิเซอไรด์เหลืออยู่ประมาณ 0.3-0.5% ปริมาณวิตามินอีจะลดลงประมาณ 1 ใน 3 ของที่มีอยู่เดิม การกำจัดกลิ่นที่อุณหภูมิสูงเกินไป อาจทำให้เกิดไอโซเมอร์ชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ระหว่าง cis-trans configuration ในโมเลกุลของกรดลิโนเลอิก และกรดลิโนเลนิก (นิธิยา, 2548) นอกจากนี้ ยังพบว่าในระหว่างขั้นตอนการกำจัดกลิ่นมีการสูญเสียโทโคเฟอรอลในปริมาณระดับปานกลาง (Rossi และคณะ, 2007) หรือ 25-35% (Verhé และคณะ, 2006)

6. การกำจัดไขมัน (Winterization)

การกำจัดไขมัน เป็นกระบวนการกำจัดสารพวกไตรกลีเซอไรด์ของกรดไขมันอิ่มตัวที่มีจุดหลอมเหลวสูง โดยทำให้ไขมันและน้ำมันมีอุณหภูมิลดต่ำลงอย่างช้าๆ จนถึงอุณหภูมิ เท่ากับ 5°C จากนั้นสารพวกไตรกลีเซอไรด์ของกรดไขมันอิ่มตัวก็จะเกิดการแข็งตัวแล้วตกผลึกแยกออกมา ทำการแยกผลึกดังกล่าวโดยการกรอง ทำให้ได้ไตรเอซิลกลีเซอรอลของกรดสเตียริก (stearine) (ส่วนที่มีจุดหลอมเหลวสูง) และน้ำมัน (ส่วนที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ) น้ำมันที่ได้ภายหลังจากการทำ winterization จะเป็นน้ำมันที่มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมาก มีค่าไอโอดีนสูงขึ้น จึงมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่มีโอกาสเกิด oxidative rancidity ได้ง่าย หากไม่มีการเติมสารต้านออกซิเดชันอย่างเพียงพอ (Nicolosi และคณะ, 1994)

ขั้นตอนการทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ขั้นตอนการทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์

ที่มา : Nicolosi และคณะ (1994)

ผลของกระบวนการต่างๆ ที่ทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ ต่อการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบในน้ำมันรำข้าว

สภาวะในการทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ แสดงดังตารางที่ 6 (Nicolosi และคณะ, 1994)

ตารางที่ 6 สภาวะของการทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ในระดับ pilot plant

กระบวนการ	สภาวะที่ใช้
การทำให้รำข้าวเกิดความคงตัว (Stabilisation)	การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดย bubble test Anderson VOX 88 Expander โดยใช้น้ำ 25-28% เป่าด้วยไอน้ำ อุณหภูมิ 130°C
การอบแห้ง (Drying)	Forced-air, gas-fired dryer ความชื้นสุดท้าย 8-10%
การสกัดและการแยกตัวทำละลาย	Crown extractor คล้ายกับสภาวะสำหรับน้ำมันถั่วเหลือง
การรีไฟน์ (Refining)	Pretreat: 0.25% ฟอสโฟริก Neutralization: 0.5% excess, 18% NaOH อุณหภูมิ: 49°C
การฟอกสีให้จางลง (Bleaching)	acid-activated bleaching earth 1.5-2%
การกำจัดไขมัน (Winterization)	5°C, 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ: 254-260°C
การกำจัดกลิ่น (Deodorization)	ความดัน: 7 mmHg ไอน้ำ: 2-3%

ที่มา : Nicolosi และคณะ (1994)

กระบวนการต่างๆ ที่ทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ สามารถส่งผลให้เกิดการสูญเสียของสารที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ ซึ่งมีค่าสูงถึง 50% สำหรับการสูญเสียของสารที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ จากน้ำมันรำข้าวดิบที่ผ่านการทำรีไฟน์ การฟอกสีให้จางลง การกำจัดกลิ่น และ Winterization แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณสารที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของน้ำมันรำข้าว

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

ที่มา : Nicolosi และคณะ (1994)

นอกจากนี้ ในระหว่างกระบวนการต่างๆ ที่ทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ จะส่งผลต่อการสูญเสียโอรีซานอล และโทโคไตรอีนอล สูงถึง 90% โดยน้ำมันรำข้าวดิบมีปริมาณโอรีซานอลเท่ากับ 12221 mg/kg เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า 4 ยี่ห้อ มีปริมาณโอรีซานอลเท่ากับ 1000, 2000, 720 และ 200 mg/kg และมีการสูญเสียโทโคไตรอีนอล แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณโทโคไตรอีนอลของน้ำมันรำข้าว

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

ที่มา : Nicolosi และคณะ (1994)

วราพร (2543) ได้ศึกษาเรื่องการวิเคราะห์เอกลักษณ์ และปริมาณโทโคเฟอรอล และโอรีซานอลในกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว โดยทำการทดลองหาปริมาณของสารที่เหลืออยู่ในแต่ละขั้นตอนการผลิตน้ำมันรำข้าว ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบปริมาณของแอลฟา- และแกมมา-โทโคเฟอรอล และโอรีซานอลที่เหลืออยู่ในแต่ละขั้นตอนการผลิตน้ำมันรำข้าว

ประเภทของน้ำมันรำข้าว	แอลฟา-โทโคเฟอรอล เปรียบเทียบกับ น้ำมันรำข้าวดิบ (%)	แกมมา-โทโคเฟอรอล เปรียบเทียบกับ น้ำมันรำข้าวดิบ (%)	โอรีซานอล เปรียบเทียบกับ น้ำมันรำข้าวดิบ (%)
น้ำมันรำข้าวดิบ	100	100	100
น้ำมันที่ผ่านการกำจัดกัมและการทำให้เป็นกลาง	35.5	42.6	16.7
น้ำมันที่ผ่านการล้างด้วยน้ำ	37.4	43.1	14.3
น้ำมันที่ผ่านการอบแห้ง	34.6	34.4	12.4
น้ำมันที่ผ่านการฟอกสี	36.4	46.6	10.1
น้ำมันที่ผ่านการกำจัดไขมัน	35.1	41.9	11.1
น้ำมันบริโภคน	9.7	16.4	2.3
น้ำมันที่ผ่านการกำจัดกลิ่น	2001	3414	0.3
สูญ	447	-	310

ที่มา : วราพร (2543)

จากตารางที่ 9 สรุปได้ดังนี้ (วราพร, 2543)

- ในแต่ละขั้นตอนการผลิตพบว่า ปริมาณโทโคเฟอรอล และโอรีซานอลลดลงตามลำดับ

- ในช่วงขั้นตอนการกำจัดกัม และการทำให้เป็นกลาง และขั้นตอนการกำจัดกลิ่น พบว่า โทโคเฟอร์อล และ โอรีซานอลลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียโทโคเฟอร์อล และ โอรีซานอล
- ในช่วงขั้นตอนการกำจัดกัม และการทำให้เป็นกลาง เกิดการสูญเสียโอรีซานอล และ โทโคเฟอร์อลอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากอนุมูลของโอรีซานอล และ โทโคเฟอร์อล เกิดการแตกตัว (สูญเสียโปรตอน) จึงมีความเป็นขั้วเพิ่มขึ้น และสามารถละลายน้ำได้มากขึ้น ดังนั้นจึงพบ โอรีซานอล และ โทโคเฟอร์อลปริมาณมากในส่วนของสบู่ เมื่อเปรียบเทียบการสูญเสียโอรีซานอล และ โทโคเฟอร์อล พบว่า โอรีซานอลมีอัตราการสูญเสียมากกว่า สังกะจากโอรีซานอลเหลือเพียง 16.7% ในขณะที่แอลฟา-โทโคเฟอร์อล และแกมมาโทโคเฟอร์อลเหลือ 35.5% และ 42.6% ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากโอรีซานอลแตกตัวที่ pH ต่ำ จึงมีความเป็นขั้วสูงกว่าโทโคเฟอร์อลและสามารถละลายน้ำได้มากกว่า
- ขั้นตอนการล้างน้ำ การอบแห้ง การฟอกสี และการกำจัดไขมัน ซึ่งมีการสูญเสียโทโคเฟอร์อล และ โอรีซานอลในอัตราต่ำ
- สำหรับขั้นตอนการอบแห้ง ถึงแม้ว่าจะมีการให้ความร้อนแก่น้ำมันซึ่งน่าจะทำให้โทโคเฟอร์อลเกิดการสูญเสียเนื่องจาก thermal oxidative มากแต่ในความเป็นจริงของกระบวนการอบแห้งได้ควบคุมสภาวะการอบให้เป็นแบบสูญญากาศ ซึ่งทำให้ปริมาณออกซิเจนในระบบลดลงมาก ดังนั้นการสลายของโทโคเฟอร์อลและโอรีซานอลจึงเกิดขึ้นน้อย
- ในขั้นตอนการกำจัดสี การสูญเสียโทโคเฟอร์อล และ โอรีซานอล เกิดจากการดูดซับ (adsorption) โดยสารดูดซับที่ใช้
- สำหรับขั้นตอนการกำจัดไขมัน ซึ่งเกิดการสูญเสียโทโคเฟอร์อล และ โอรีซานอล เช่นเดียวกัน กลไกการสูญเสียเกิดจากโทโคเฟอร์อล และ โอรีซานอลเกิดการตกผลึกไปพร้อมกับ โมเลกุลไขมัน แต่โอรีซานอลซึ่งเป็น โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่า โทโคเฟอร์อลจะเกิดการตกผลึกมากกว่า
- ในช่วงขั้นตอนการกำจัดกลิ่น ทำให้เกิดการสูญเสียโทโคเฟอร์อลอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงค้นพบโทโคเฟอร์อลในปริมาณมากในคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว ทั้งนี้เนื่องจาก โมเลกุลของโทโคเฟอร์อลเกิดการระเหยไปพร้อมๆกับการกำจัดกรดไขมันอิสระ ในขณะที่โมเลกุลของโอรีซานอลซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า และระเหยได้น้อยกว่า จึงไม่ค่อยพบโอรีซานอลในคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

2.2.3 ประโยชน์ของรำข้าวและน้ำมันรำข้าว

รำข้าวถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมายในอาหารเพื่อสุขภาพ เพราะในรำข้าวมีใยอาหารสูง และไขมันอิ่มตัวต่ำ ซึ่งรำข้าวจะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับผู้ที่แพ้เมล็ดธัญพืชชนิดอื่น มีงานวิจัยพบว่า การบริโภครำข้าวมีประโยชน์ในการลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (อรอนงค์, 2547)

น้ำมันรำข้าวลดความเสี่ยงของโรคหัวใจ และหลอดเลือด เพราะรำข้าวมีกรดไขมันอิ่มตัวน้อย มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนไม่มาก แต่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวปริมาณมาก นอกจากนี้ในรำข้าวมีสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันหลายชนิด ได้แก่ วิตามินอี (โทโคไตรอีนอล และโทโคเฟอร์รอล) และโอรีซานอล โดยสารประกอบทั้งสามชนิดนี้จะลดการเกิด oxidized LDL ลดการเกิดหลอดเลือดแข็งตัว และลดการเกิดคอเลสเตอรอลออกไซด์ ซึ่งโทโคไตรอีนอล และโอรีซานอลจะมีผลในการลดระดับของคอเลสเตอรอลโดยตรง โดยที่โทโคไตรอีนอลจะขัดขวางการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย ส่วนโอรีซานอลจะลดการดูดซึมของคอเลสเตอรอลจากอาหาร ซึ่งตรวจพบอุจจาระของกลุ่มคนที่ได้รับโอรีซานอล จะมีคอเลสเตอรอลมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโอรีซานอล นอกจากนี้ รำข้าวมีสารประกอบกลุ่มไฟโตสเตียรอล และกลุ่มไตรเทอปีนแอลกอฮอล์ ไฟโตสเตียรอลหลายชนิด จะสามารถลดการดูดซึมของคอเลสเตอรอลได้ (นัยนา และเรวดี, 2545)

Kahlon และคณะ (1989) พบว่า รำข้าวสามารถลด serum cholesterol ในหนูพันธุ์แฮมเตอร์ที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง ได้เหมือนกับรำข้าวโอ๊ต โดย Wilson และคณะ (2007) พบว่าน้ำมันรำข้าว และโอรีซานอลสามารถลดไขมัน และลิโปโปรตีน คอเลสเตอรอลในเลือดได้ และยังสามารถสะสมของออร์ทิกคอเลสเตอรอล เอสเทอร์ (aortic cholesterol ester) ได้ปริมาณมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกรดเฟอูลูริกในหนูพันธุ์แฮมเตอร์ที่มีปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดสูง

Ausman และคณะ (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% ดังนั้นจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าน้ำมันรำข้าวรีไฟน์สามารถทำให้ไขมันในเลือด

นอกจากนี้ รำข้าว และน้ำมันรำข้าวช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจ โดยลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย เนื่องจากในรำข้าว และน้ำมันรำข้าวสกัดมีสารประกอบที่มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG CO A) reductase (ดวงจันทร์, 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 และเศษรำข้าวสามารถลดคอเลสเตอรอล โดยจะช่วยเพิ่มการหลั่งของ bile acid ส่วนน้ำมันรำข้าว และน้ำมันเศษรำข้าว มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase ในตับและจะยับยั้ง mevalonate pathway ทำให้ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลงได้ (เนตรนภิส, 2538)

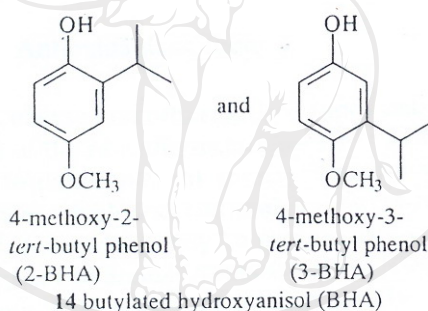
Taylor และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษา การใช้รำข้าวเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันในน้ำมันบริโภคที่มีกรดไขมันสูง เช่น น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเรพซิด ซึ่งน้ำมันบริโภคที่ถูก stabilize ด้วยรำข้าว จะถูกนำมาใช้เป็นน้ำมันสำหรับคนที่ใช้กับขนมปังกรอบ ถั่ว มันเทศแผ่น และอาหารว่างอื่นๆ โดยน้ำมันบริโภคดังกล่าวจะถูก stabilize ด้วยการเติมน้ำมันรำข้าวที่ผ่านกระบวนการต่างๆ ในการทำบริสุทธิ์ และยังคงรักษาสารที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ไว้ โดยเติมลงไปประมาณ 2-5% (w/w)

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ประเภทแรกคือ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) ซึ่งสามารถทนต่อสภาวะของกระบวนการผลิต เช่น การทอด หรือ การอบได้ดี (German, 2002) ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์นั้นมียู้อยู่ด้วยกันหลายชนิด 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°C และหลอมเหลว 48-55°C BHA เป็นส่วนผสมของ 2-tert-butyl-4-methoxyphenol และ 3-tert-butyl-4-methoxyphenol ซึ่งมากกว่า 90% จะอยู่ในรูป 3-isomer (รูปที่ 6) ด้วยโครงสร้างที่เป็นหมู่ tert-butyl ซึ่งเชื่อมต่อกับหมู่ไฮดรอกซิลนั้นทำให้ BHA มีความคงตัวดี และไม่สลายตัวเมื่อผ่านกระบวนการผลิตโดยเฉพาะกระบวนการอบ แม้ว่าจะทำให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของ BHA ลดลงบ้าง นอกจากนี้ BHA ยังอาจให้กลิ่นฟินอลิกเมื่อได้รับอุณหภูมิสูง เช่น ผ่านกระบวนการทอด หรือ อบ โดยทั่วไปมักใช้ BHA ร่วมกับสารแอนติออกซิแดนท์ตัวอื่นๆ เช่น BHT, propyl gallate, lecithin, hydroquinone หรือ methionine เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชัน (JECFA, 2005)

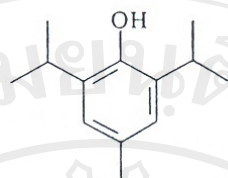


รูปที่ 6 Butylated Hydroxyanisole (BHA)

ที่มา : Pokorny และคณะ (2001)

2. Butylated Hydroxytoluene (BHT)

BHT (2,6-di-tert-butyl-p-cresol หรือ 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol, รูปที่ 7) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ แต่สามารถละลายในน้ำมันและไขมันได้ดีกว่า BHA มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 220.34 จุดเดือด และจุดหลอมเหลวเป็น 265 และ 70°C ตามลำดับ ทั้งนี้ BHT ยังสามารถละลายได้ในโทลูอีน เมทานอล เอทานอล ไอโซโพรพานอล อะซิโตน เบนซีน และตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ ด้วย นอกจากนี้ BHT ยังสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง และไม่สลายตัวเมื่อผ่านกระบวนการอบ อย่างไรก็ตาม BHT จะให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันได้ต่ำกว่า BHA เนื่องจากมีหมู่ tert-butyl อยู่รอบหมู่ไฮดรอกซิลถึง 2 หมู่ อีกทั้งในสภาวะที่มีเหล็กอยู่ด้วย BHT ก็อาจจะทำให้เกิดสีเหลืองใน



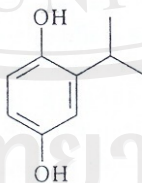
15 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-hydroxytoluene (BHT)

รูปที่ 7 Butylated Hydroxytoluene (BHT)

ที่มา : Pokorny และคณะ (2001)

3. Tertiary Butylhydroquinone (TBHQ)

TBHQ (2-(1,1-dimethylethyl)-1,4-benzenediol, รูปที่ 8) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวถึงสีน้ำตาลอ่อน มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 166.22 จุดเดือด 300°C และจุดหลอมเหลว 126.5-128.5°C สามารถละลายในน้ำมันและไขมันได้ปานกลาง (5-10%) และสามารถละลายในน้ำได้เล็กน้อย (1%) ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้ TBHQ เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ที่นิยมนำไปใช้กันมาก นอกจากนี้ TBHQ ยังมีความคงตัว ไม่สลายตัวเมื่อผ่านกระบวนการผลิตและให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีกว่าสารอื่นๆด้วย ทั้งนี้อาจมีการใช้กรดซิตริกร่วมด้วยเพื่อเพิ่มความคงตัว แต่ห้ามใช้ TBHQ ร่วมกับ propyl gallate (JECFA, 2005)



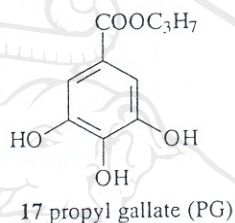
16 *tert* butyl hydroquinone (TBHQ)

รูปที่ 8 Tertiary Butylhydroquinone (TBHQ)

ที่มา : Pokorny และคณะ (2001)

4. Propyl Gallate (PG)

PG (3,4,5-trihydroxybenzoic acid propyl ester, รูปที่ 9) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวถึงสีเทาอ่อน มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 212.20 จุดหลอมเหลว 150°C และสลายตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 148°C สามารถละลายได้บางส่วนในน้ำ แอลกอฮอล์ อีเทอร์ และสามารถละลายในน้ำมันได้ต่ำ ทั้งนี้เนื่องจาก PG มีจุดหลอมเหลวต่ำ จึงทำให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันต่ำ เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 190°C นอกจากนี้ PG ยังไวต่อความร้อนทำให้สลายตัวไปเมื่อผ่านกระบวนการทางความร้อนอีกด้วย โดยทั่วไปจึงมักใช้ PG ร่วมกับ BHA หรือ BHT เพื่อเพิ่มความคงตัวและประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชัน (JECFA, 2005)



รูปที่ 9 Propyl Gallate (PG)

ที่มา : Pokorny และคณะ (2001)

สารต้านอนุมูลอิสระอีกประเภท คือ สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (Nature antioxidants) พบมากในพืช และราเกือบทุกชนิด และยังพบในเนื้อเยื่อของสัตว์อีกด้วย โดยกลุ่มหลักของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ คือ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) แต่กลุ่มที่สำคัญที่สุดของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ คือ โทโคเฟอรอล ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และกรดฟีนอลิก (phenolic acids) (Pokorny และคณะ, 2001)

ข้อดีและข้อเสียของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติและสังเคราะห์ คือสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติมีราคาแพง และมีข้อจำกัดต่อการใช้ในผลิตภัณฑ์บางประเภทมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ซึ่งสามารถใช้ได้ในวงกว้างกว่า แต่มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) อยู่ในระดับกลางถึงสูง ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาตินั้นมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงกว้าง และได้รับการยอมรับว่าเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายมีแนวโน้มที่จะมีการใช้เพิ่มมากขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้สารแอนติออกซิแดนท์ธรรมชาติยังมีความสามารถในการละลายได้ในวงกว้าง และได้รับความสนใจมากขึ้นที่นำมาใช้ แต่สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์นั้นมีความห่วงใยในด้านความปลอดภัยในการนำมาใช้ และต้องมีการใช้สัญลักษณ์สำหรับสารแอนติออกซิแดนท์บางชนิด

นอกจากนี้ Bera และคณะ (2006) พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติมีประโยชน์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ คือ สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคว่ามีความปลอดภัย ซึ่งในทางกฎหมายแล้วไม่ต้องมีการทดสอบด้านความปลอดภัยถือว่าเป็นอาหารที่มนุษย์บริโภคมากกว่า 100 ปี หรือใช้ผสมกับอาหาร นอกจากนี้ยังทำให้น้ำมันบริโภคมีความคงตัว และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับน้ำมันบริโภคอีกด้วย

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

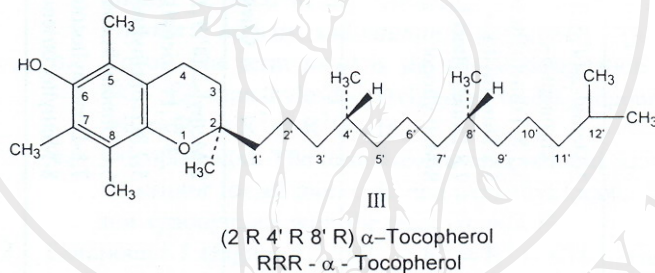
2.4 วิตามินอี (Vitamin E)

วิตามินอี ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1922 โดย Evans และ Bishop ซึ่งทำการทดลองกับหนูเพศเมีย พบว่าสารสำคัญชนิดหนึ่งซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นสารอะไร มีผลควบคุมการตั้งครรภ์ในหนูให้ขึ้นไปตามปกติ ถ้าหนูไม่ได้รับสารนี้เพียงพอ หนูนั่น ๆ จะตั้งครรภ์ได้แต่จะแท้งลูก หลังจากการค้นพบจึงตั้งชื่อสารดังกล่าวว่า วิตามินที่ป้องกันการเป็นหมัน (antisterility vitamin) (วราพร, 2543) ต่อจากนั้น ในปี ค.ศ. 1936 Evans และคณะ สามารถสกัดและแยกวิตามินได้จากน้ำมันจมูกข้าวสาลี (wheat germ oil) และตั้งชื่อว่า โทโคเฟอรอล (tocopherol) ซึ่งมีรากศัพท์มาจากภาษากรีกคำว่า tocos ซึ่งแปลว่า บุตร และ phero ซึ่งแปลว่า ให้กำเนิด จากนั้นไม่นาน Fernholz ได้ศึกษาลักษณะโครงสร้างของแอลฟา-โทโคเฟอรอล (α -tocopherol) สำเร็จ โดยต่อมาได้มีผู้ศึกษาวิจัยจำนวนมากทำการศึกษาเกี่ยวกับการแยกและลักษณะสำคัญของวิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอล (tocopherol) และโทโคไตรอีนอล (tocotrienol) (Sheppard และคณะ, 1993)

ในปัจจุบันสามารถพบสารอนุพันธ์ของวิตามินอีได้ทั้งหมด 8 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ชนิด กลุ่มแรกเป็น โทโคเฟอรอล โดยมีอนุพันธ์แบ่งเป็น แอลฟา-โทโคเฟอรอล (α -tocopherol; α -T) เบตา-โทโคเฟอรอล (beta-tocopherol; β -T) แกมมา-โทโคเฟอรอล (gamma-tocopherol; γ -T) และเดลตา-โทโคเฟอรอล (delta-tocopherol; δ -T) อีกกลุ่มเป็น โทโคไตรอีนอล (tocotrienol) แตกต่างจากโทโคเฟอรอลตรงหมู่แทนที่ด้านข้าง ซึ่งเป็น

2.4.1 โครงสร้างของวิตามินอี

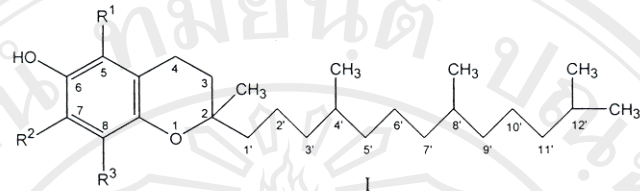
วิตามินอีจัดอยู่ในรูปของสารประกอบ 6-hydroxychroman ที่ละลายได้ในไขมัน โดยแสดงกิจกรรมด้านชีวภาพ (biological activity) ของแอลฟา-โทโคเฟอรอล ซึ่งถูกวัดโดย resorptionestation assay ในหนู โทคอล (tocol) หรือ 2-methyl-2 (4', 8', 12'-trimethyltridecyl) chroman-6-ol คือ สารประกอบที่เป็นต้นกำเนิดของโทโคเฟอรอล (Eitenmiller, 2004) ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 (2 R 4' R 8' R) แอลฟา-โทโคเฟอรอล

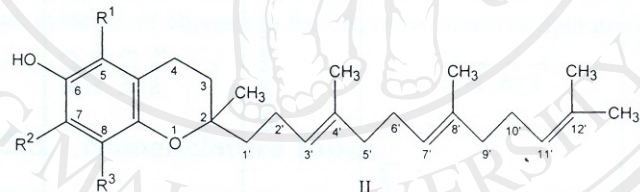
ที่มา : Eitenmiller และ Lee (2004)

วิตามินที่พบในธรรมชาติประกอบด้วย 8 อนุพันธ์คือ แอลฟา- เบตา- แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล (α -, β -, γ - และ δ -tocopherol) และแอลฟา- เบตา- แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอินอล (α -, β -, γ - และ δ -tocotrienol) ดังรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ และตารางที่ 10 และ 11 ตามลำดับ ซึ่งในโครงสร้างของวงแหวน 6-chromanol ของกลุ่มโทโคเฟอรอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล (methyl group) ที่ตำแหน่ง 5, 7 และ 8 โดยที่ตำแหน่งที่ 2 เป็น C16 saturated side chain ส่วนกลุ่มโทโคไตรอินอลนั้นจะมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 3', 7' และ 11' ของ side chain ซึ่งโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอินอลในรูปแบบเฉพาะต่าง ๆ นั้นจะแตกต่างกันที่จำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิลบนวงแหวน 6-chromanol โดยแอลฟา-โทโคเฟอรอลและแอลฟา-โทโคไตรอินอลนั้นจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 3 หมู่ เบตา-โทโคเฟอรอล เบตา-



- I
- $R^1 = R^2 = R^3 = H$ Tocol
 - $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$ α -Tocopherol
 - $R^1 = R^3 = CH_3; R^2 = H$ β -Tocopherol
 - $R^1 = H; R^2 = R^3 = CH_3$ γ -Tocopherol
 - $R^1 = R^2 = H; R^3 = CH_3$ δ -Tocopherol

รูปที่ 11 แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล
ที่มา : Eitenmiller และ Lee (2004)



- II
- $R^1 = R^2 = R^3 = H$ 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

รูปที่ 12 แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล
ที่มา : Eitenmiller และ Lee (2004)

ตารางที่ 10 ชื่อสามัญ ชื่อทางเคมี ตัวย่อ และตำแหน่งในวงแหวนของโทโคเฟอรอลชนิดต่างๆ

ชื่อสามัญ	ชื่อทางเคมี	ตัวย่อ	ตำแหน่งในวงแหวน		
			R ¹	R ²	R ³
โทคอล	2-เมทิล-2-(4',8',12'-ไตรเมทิลไตรเซทิล)โครแมน-6-ออล (2-Methyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)chroman-6-ol)	—	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

ที่มา : Eitenmiller และ Lee (2004)

ตารางที่ 11 ชื่อสามัญ ชื่อทางเคมี ตัวอย่าง และตำแหน่งในวงแหวนโทโคไตรอีนอลที่แตกต่างกัน

ชื่อสามัญ	ชื่อทางเคมี	ตัวอย่าง	ตำแหน่งในวงแหวน		
			R ¹	R ²	R ³
โทคอด	2-เมทิล-2-(4',8',12'-ไตรเมทิล โทโคไตรอีนอล-3',7',11'-ไตรอีนิล)	—	H	H	H
แอลฟา-โทโคไตรอีนอล	โทริแมน-6-ออล (2-Methyl-2-(4',8',12'-trimethyltrideca-3',7',11'-trienyl)chroman-6-ol)	α -T3	CH ₃	CH ₃	CH ₃
เบตา-โทโคไตรอีนอล	5,7,8-ไตรเมทิลโทโคไตรอีนอล (5,7,8-Trimethyltocotrienol)	β -T3	CH ₃	H	CH ₃
แกมมา-โทโคไตรอีนอล	5,8-ไดเมทิลโทโคไตรอีนอล (5,8-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)

2.4.2 บทบาททางชีวภาพของวิตามินอี (Biological role of vitamin E)

วิตามินอีทำหน้าที่ร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ ทั้งที่ละลายได้ในไขมัน และในน้ำ ซึ่งทำให้สิ่งมีชีวิตมีระบบการป้องกันอย่างมีประสิทธิภาพในการต่อสู้กับอนุมูลอิสระ และการถูกทำลายของเซลล์ด้วยอนุมูลอิสระดังกล่าว อนุมูลอิสระนั้นถูกให้คำนิยามว่าเป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่สามารถมีอยู่ได้อย่างอิสระ ซึ่งประกอบด้วยอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electrons) 1 อัน หรือมากกว่า (Eitenmiller และ Lee, 2004)

Reactive oxygen species (ROS) แบ่งเป็น 2 ประเภท โดยประเภทแรกคือ อนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide anion radicals (O_2^-), hydroxyl radicals ($OH\cdot$), alkoxy radicals ($LO\cdot$), hydroperoxyl radicals ($HO_2\cdot$) และ peroxy radicals ($LO_2\cdot$) ประเภทที่สองคือ ชนิดที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non free-radical species) ได้แก่ Iron-oxygen complex, hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (1O_2), ozone (O_3) และ hypochlorous acid ($HOCl$) (Eitenmiller และ Lee, 2004; Gülcin และคณะ, 2003)

ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต ROS จะถูกผลิตขึ้นครั้งแรกใน mitochondria, phagocytes และ peroxisomes และจากนั้นจะถูกสร้างขึ้นโดย cytochrome P-450 enzymes การผลิต ROS ได้ถูกแบ่งกลุ่มได้ดังนี้ (Eitenmiller และ Lee, 2004) คือ

1. Mitochondria : ผลิต superoxide และ hydrogen peroxide โดยการหายใจปกติ
2. Phagocytes : ผลิต $O_2\cdot^-$, H_2O_2 , nitric oxide ($NO\cdot$) และ hypochlorite (ClO^-) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ respiratory burst
3. Peroxisomes : การสลายตัวของสารต่างๆ เช่น กรดไขมันอิสระเพื่อผลิต H_2O_2
4. Cytochrome P-450 enzymes : เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของปฏิกิริยาออกซิเดชันต่างๆ
5. Low-wavelength irradiation : สร้าง hydroxyl radicals ($OH\cdot$) จากน้ำ
6. Ultraviolet irradiation : การแยกของพันธะ โอวาเลนซ์ของ O-O ใน H_2O_2 เพื่อผลิต $OH\cdot$ radical 2 โมเลกุล

สำหรับ ROS ที่สร้างจากแหล่งภายนอกสิ่งมีชีวิตนั้น ได้แก่ คิวบิกจากยาสูบ มลภาวะ ตัวทำละลายอินทรีย์ และยาฆ่าแมลง เป็นต้น ROS เป็นสาเหตุของการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมันในอาหาร ซึ่งทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้ นอกจากนี้ ROS ยังทำลายโมเลกุลชีวภาพ ได้แก่ ไขมัน กรดนิวคลีอิก (nucleic acids) โปรตีน ลิโปโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ได้แก่ ทำให้เกิดการแก่ของเซลล์ (aging) โรคมาลาเรีย (malaria) ภูมิคุ้มกันบกพร่อง (acquired immunodeficiency syndrome) หัวใจวาย (stroke) ไขมันอุดตันในเส้น

e แ

นมากใน

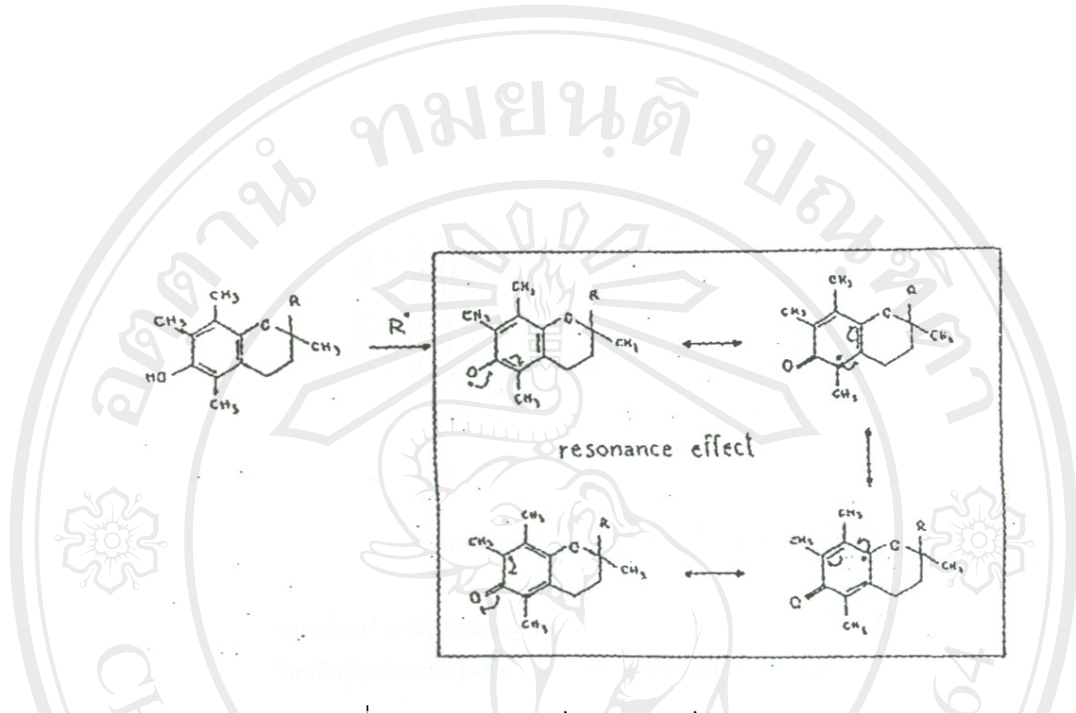
ปฏิกิริยา autooxidation และเกิดขึ้นโดยตัวเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนที่ไม่อาศัยเอนไซม์ (nonenzymatic electron transfers) ซึ่งทำหน้าที่ univalently reduce ออกซิเจน นอกจากนี้ยังสามารถลดสารประกอบเชิงซ้อน iron เช่น cytochrome c H_2O_2 นั้นไม่ใช่เรดิคัล และสามารถเกิดขึ้นภายในสิ่งมีชีวิตโดย oxidize enzyme มากมายหลายชนิด เช่น superoxide dismutase H_2O_2 สามารถ cross ผันงเซลล์ และออกซิไดส์ (oxidize) โมเลกุลของสารประกอบต่างๆอย่างช้าๆ (Gülcin และคณะ, 2003)

$OH\cdot$ คือ Oxygen-centered radical ที่มีแอกติวิตีสูง ซึ่งสามารถทำลายโปรตีน deoxyribonucleic acid (DNA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว นอกจากนี้ ROS ยังเกิดได้อย่างต่อเนื่องระหว่าง normal physiologic events และถูกกำจัดโดยกลไกการทำลายของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีความสมดุลระหว่างการเกิดของ ROS และการถูกทำลายของ ROS โดยระบบสารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิต ภายใต้ pathological conditions ROS จะถูกผลิตออกมาเกินและส่งผลให้เกิด peroxidation ของไขมันและ oxidative stress ROS จะถูกทำให้เกิดขึ้นเมื่อกลไกการทำลายอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิด oxidative modification ขึ้นภายในผนังเซลล์ หรือ ภายในเซลล์ (Gülcin และคณะ, 2003)

วิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลสามารถทำปฏิกิริยากับ ROS ในระบบของสิ่งมีชีวิต เช่น พลาสมา ผนังเซลล์ และเนื้อเยื่อ โดยในอดีตที่ผ่านมาแอลฟา-โทโคเฟอรอลเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่มีการศึกษาวิจัยมากที่สุด เนื่องจากสามารถยับยั้งกิจกรรมทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตได้สูงที่สุด และวิธีการวิเคราะห์ต่างๆ ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาใช้เฉพาะสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของแอลฟา-โทโคเฟอรอล แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยในปัจจุบันพบว่า อนุพันธ์อื่นๆ ของวิตามินอียังมีบทบาทสำคัญในสิ่งมีชีวิตต่างๆอีกด้วย (Cunha และคณะ, 2006)

2.4.3 หน้าที่ทางชีวภาพของวิตามินอี

วิตามินอีจะทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ทำให้สารพลังงานสูงชนิดนี้หมดความว่องไวในการทำอันตรายกับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ หลังจากนั้นตัววิตามินอีเองจะเกิดเป็นวิตามินอีเรดิคัล (vitamin E radical) ที่เสถียรมากกว่า การที่โมเลกุลวิตามินอีเรดิคัลมีความเสถียร



รูปที่ 13 ปฏิกิริยาเรโซแนนซ์ของวิตามินอี
ที่มา : วราพร (2543)

RRR- α -tocopherol คือ รูปแบบของวิตามินอีที่มีความไวต่อการจับอนุมูลอิสระมากที่สุด ซึ่งถูกดูดซึมได้ในร่างกายมนุษย์อย่างมีประสิทธิภาพเท่ากับรูปแบบเดลตา- และแกมมา-ของวิตามินอี แต่หลังจาก 24 ชั่วโมงในพลาสมาอุดมไปด้วยวิตามินอีในรูปแบบแอลฟา- ซึ่งวิตามินในรูปแบบแอลฟา- นั้นมีกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตสูงที่สุดบน fetal resorption assays และมีความไวต่อการสลายตัวต่ำกว่ารูปแบบอื่นๆของวิตามินอี นอกจากนี้การขนส่งโทโคเฟอรอลและโปรตีนที่เกี่ยวข้องนั้นมีกลไกเช่นเดียวกันกับการขนส่งหรือควบคุมโปรตีนระหว่างช่องว่างของเซลล์ แต่กลไกของโทโคเฟอรอลเมื่อเข้าสู่ร่างกาย การเก็บรักษาและการขนส่งยังคงไม่ชัดเจนนัก (Gianello และคณะ, 2005)

แอลฟา-โทโคไตรอีนอลเป็นตัวจับอนุมูลอิสระ (radical scavenger) ที่ดีกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอล โดยแอลฟา-โทโคไตรอีนอลสามารถจับกับ peroxy radicals อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลในไลโปโซม (liposomes) นอกจากนี้แอลฟา-โทโคไตรอีนอลยังปกป้อง Cytochrome P-450 จากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอล และ α -tocotrienoxyl radical ถูกนำมาใช้ใหม่ในผนังเซลล์ และ

ค้นพบแอลฟา-โทโคเฟอริลฟอสเฟต (α -tocophryl phosphate) ซึ่งเป็นวิตามินอีจากธรรมชาติชนิดใหม่ที่พบในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ ตับและเนื้อเยื่อที่มีเซลล์สำหรับเก็บไขมัน (adipose tissue) ซึ่งสามารถพบอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อสัตว์ และพืช โดยวิตามินอีจากธรรมชาติชนิดใหม่นี้มีประสิทธิภาพดีเท่ากับวิตามินอีที่ค้นพบในแหล่งอาหารต่างๆทั่วไป โดยแอลฟา-โทโคเฟอริลฟอสเฟต เป็นโมเลกุลที่ละลายในน้ำได้ มีความคงตัวต่อกรไฮโดรไลซิสด้วยกรด และด่าง แต่ไม่สามารถวิเคราะห์โดยใช้วิธีทดสอบมาตรฐานสำหรับวิตามินอีได้ ดังนั้นจึงพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการสกัดทั้งแอลฟา-โทโคเฟอริลฟอสเฟต และแอลฟา-โทโคเฟอรอลจากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตเดียวกัน นั่นคือ electrospray mass spectrometry (ESMS) สำหรับใช้วิเคราะห์แอลฟา-โทโคเฟอริลฟอสเฟตในตัวอย่างสิ่งมีชีวิตซึ่งมีแอลฟา-โทโคเฟอรอลอยู่ด้วย จากนั้นพิสูจน์ผลการทดลองอีกครั้งโดยการวิเคราะห์แอลฟา-โทโคเฟอริลฟอสเฟตที่พบในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตด้วย HPLC, LCMS (liquid chromatography mass spectrometry), LCMA/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry) และ GCMS (gas chromatography mass spectrometry) โดยเปรียบเทียบระหว่างแอลฟา-โทโคเฟอริลฟอสเฟตมาตรฐาน และสารที่สกัดจากเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแอลฟา-โทโคเฟอริลฟอสเฟตจากเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตนั้นนำมาซึ่งความรู้ที่กว้างขวางมากขึ้นในบทบาทของแอลฟา-โทโคเฟอรอลในระบบสิ่งมีชีวิต

2.4.4 บทบาทของวิตามินอีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร

สารต้านอนุมูลอิสระถูกใช้อย่างมากในการเป็นสารที่เติมลงไปในการป้องกันการเสื่อมเสียของอาหาร และน้ำมันเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระถูกใช้เพื่อรักษาคุณภาพของอาหารเป็นหลัก โดยการป้องกันการเสื่อมเสียเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขององค์ประกอบของไขมัน (Senevirathne และคณะ, 2006)

ฉนวน

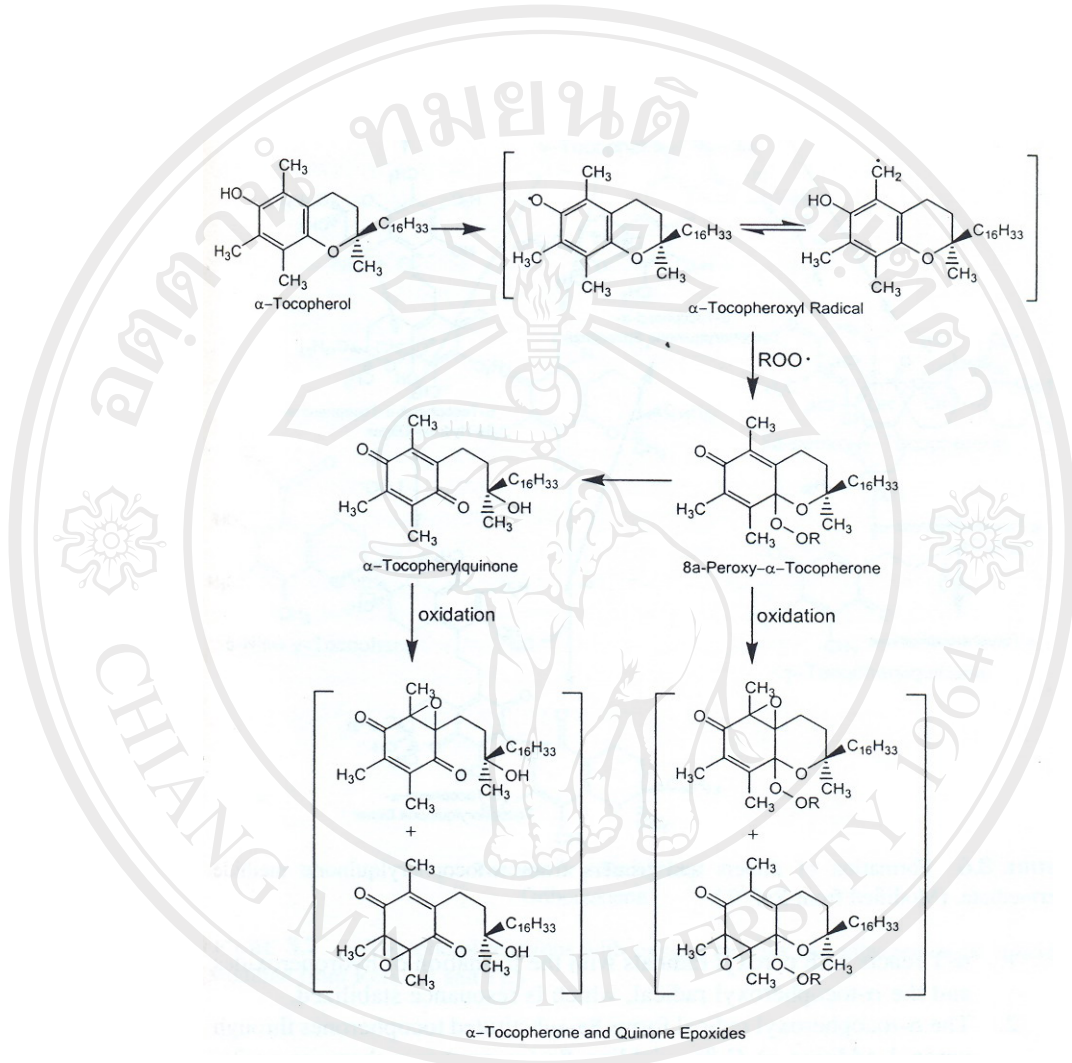
ที่ โดยมี

ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในไขมันและอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ เพราะโทโคเฟอรอลสามารถจับกับ peroxy radicals ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวซึ่งยับยั้ง propagation stage ของปฏิกิริยาออกซิเดชันวิตามินอีโดยเฉพาะอย่างยิ่งแอลฟา-โทโคเฟอรอลมีหน้าที่ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงภายในผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและมีหน้าที่ทางชีวภาพสูงที่สุด โดยแอลฟา-โทโคเฟอรอลสามารถจับกับ peroxy radicals ได้รวดเร็วกว่าแกมมา-โทโคเฟอรอล และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ในปฏิกิริยา autooxidation และยังมีประสิทธิภาพมากกว่าในการเพิ่มความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชันและสามารถลดอัตราการเกิดออกซิเดชันเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นได้ ในทางตรงกันข้ามแอลฟา-โทโคเฟอรอลสามารถทำหน้าที่เป็น pro-oxidant ได้ดีกว่าแอนติออกซิแดนซ์เมื่อมีความเข้มข้นสูง แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการวิจัยพบว่า ไม่พบผลของ pro-oxidant สำหรับแอลฟา-โทโคเฟอรอล เมื่อมีความเข้มข้นระหว่าง 500-2000 mg/kg ในน้ำมันที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (Che Man และคณะ, 2005)

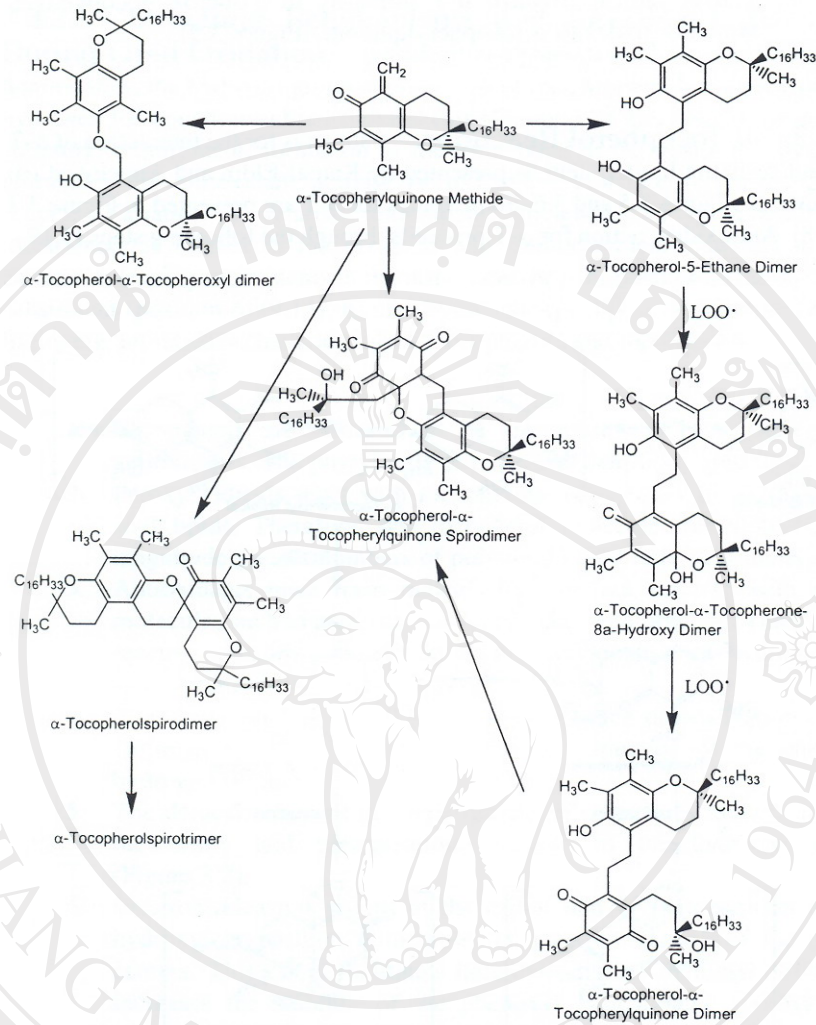
โทโคไตรอีนอล และพลาสโตโครมานอล-8 (plastochromanol-8) คือสารแอนติออกซิแดนซ์ธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญในน้ำมันพืช โดยทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในน้ำมัน มีผลกระทบต่อคุณภาพด้านคุณค่าทางโภชนาการ ลักษณะทางกายภาพ กลิ่น และความปลอดภัยของน้ำมันพืช (Ahmed และคณะ, 2005)

Rossi และคณะ (2007) ได้ศึกษากิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ DPPH ของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลรวมในน้ำมันพืชที่ผ่านการรีไฟน์ พบว่า กิจกรรมการจับอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.001$) โดยปริมาณของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลนั้นมีบทบาทสำคัญในการวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ของน้ำมันพืชที่ผ่านการรีไฟน์ได้ในปริมาณมากกว่า สารแอนติออกซิแดนซ์ธรรมชาติชนิดอื่นๆ เช่น โพลีฟีนอล (polyphenols) และแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งได้ถูกกำจัดออก หรือทำลายโดยกระบวนการรีไฟน์ของน้ำมันพืช นอกจากนี้ยังพบว่า กิจกรรมการจับอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณของแกมมา-โทโคไตรอีนอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.001$) และแอลฟา-โทโคไตรอีนอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระกับแอลฟา-โทโคเฟอรอล และเดลตา-โทโคไตรอีนอล

รูปที่ 14



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 รูปที่ 14 ปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของแอลฟา-โทโคเฟอรอล
 ที่มา : Eitenmiller และ Lee (2004)
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved



รูปที่ 14 ปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของแอลฟา-โทโคเฟอรอล (ต่อ)

ที่มา : Eitenmiller และ Lee (2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กลไกการต้านอนุมูลอิสระของแอลฟา-โทโคเฟอรอล (Eitenmiller และ Lee, 2004) มีรายละเอียดดังนี้ คือ

1. แอลฟา-โทโคเฟอรอลทำปฏิกิริยากับ peroxy radicals ได้เป็น hydroperoxides และ α -tocopheroxyl radical ซึ่งเป็นเรโซแนนซ์ที่มีความเสถียร
2. α -tocopheroxyl radical กลายเป็น 8a-substituted tocopherones โดยการเติม peroxy ที่ C-8a จากนั้นเกิดการเคลื่อนย้ายของอิเล็กตรอน และไฮโดรลิซิสทำให้ได้ 8a-(peroxy)-tocopherones หรือ 8a-(hydroxyl)-tocopherones ดังรูป 14

3. Tocopherones เกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส และการจัดเรียงตัวใหม่ได้เป็น α -tocopherylquinone
4. Tocopheroxyl radical เกิดการ dimerize ด้วย tocopherol-5-ethane dimer ดังรูป 14
5. เกิดปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องได้เป็น dimers, trimers, spirodimers, spirotrimers และ epoxides
6. โทโคไตรอินอลนั้นจะได้ radicals และ polymers คล้ายกับโทโคเฟอร์อล

2.4.5 ประโยชน์ของวิตามินอี

เนื่องจากมนุษย์ และสัตว์ ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินอีได้เอง ดังนั้นจึงต้องได้รับวิตามินอีจากอาหารที่รับประทานเข้าไป ซึ่งพืชเป็นแหล่งของวิตามินอีที่สำคัญทั้งโทโคเฟอร์อล และโทโคไตรอินอล เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี และถั่วเหลือง จะมีโทโคเฟอร์อลเป็นองค์ประกอบอยู่มาก ส่วนในข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ปาล์ม และรำข้าว จะประกอบด้วย โทโคไตรอินอล มากกว่า 70% (Minhajuddin และคณะ, 2005)

โทโคไตรอินอล และโทโคเฟอร์อล เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ที่สำคัญที่ละลายได้ในไขมัน สามารถปกป้องไขมัน น้ำมัน และผนังเซลล์ ต่อการทำลายของอนุมูลอิสระต่างๆ ได้ เช่น สารประกอบของออกซิเจนที่ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้อีก ซึ่งถูกผลิตโดยกระบวนการทางชีววิทยาโดยทั่วไปของมนุษย์ และการสัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเลต มลภาวะ คิวบุนทรีย์ และปัจจัยอื่นๆ เป็นต้น ซึ่งถ้าระดับของอนุมูลอิสระต่างๆ สูงจะทำให้เกิดความเสียหายกับผนังเซลล์ และทำลายดีเอ็นเอของเซลล์ได้ ดังนั้นวิตามินอีทั้งในรูปของโทโคไตรอินอล และโทโคเฟอร์อล สามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และปกป้องโมเลกุลและเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตจากการทำลายโดยอนุมูลอิสระต่างๆ นอกจากนี้ oxidative stress อาจจะเป็นสาเหตุของความแก่ เช่นเดียวกับการเป็นต้นกำเนิดของโรคจำนวนมากที่เกิดจากความเสื่อมโทรมของร่างกายมนุษย์ ได้แก่ ความผิดปกติของหัวใจ และโรคมะเร็ง และยิ่งไปกว่านั้น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ methionine จะส่งผลให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งเป็นผลมาจาก oxidative stress เช่นกัน ประมาณ 5% ของออกซิเจนที่ร่างกายหายใจเข้าไปที่สามารถเล็ดลอดจากปฏิกิริยา redox ในเมตาบอลิซึมของร่างกาย ซึ่ง by-product เหล่านี้ ได้แก่ superoxide anion (O_2^-) hydroperoxyl radical ($OOH\cdot$) hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radical ($OH\cdot$) ยังคงสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้อีก และพบอยู่ในร่างกายในช่วงระยะเวลาอันสั้น โดยปกติร่างกายจะมีกลไกธรรมชาติที่คอยต่อสู้กับอนุมูลอิสระต่างๆ เหล่านี้ ซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์ หรือไม่ใช่เอนไซม์ก็ได้ แต่



ในกลุ่มของวิตามินอี พบว่า แอลฟา-โทโคเฟอรอลมีแอกติวิตีสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยพบว่า โทโคไตรอีนอลนั้นมีแอกติวิตีในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่า และ โทโคไตรอีนอลยังมีผลต่อการลดระดับของคอเลสเตอรอลในเลือดร่วมกับความสามารถในการลดระดับของ atherogenic apolipoprotein B และ lipoprotein (a) ในเลือด นอกจากนี้ โทโคไตรอีนอลยังมี anti-thrombotic และ anti-tumor effect ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโทโคไตรอีนอล อาจจะเป็นสารที่มีผลต่อการป้องกัน และการรักษาโรคหัวใจ และ โรคมะเร็งได้ (Theriault และ คณะ, 1999)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า แอลฟา-โทโคไตรอีนอลมีแอกติวิตีในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอล 40-60 เท่า ในการทำลาย ferrous iron/ascorbate และ ferrous iron/NADPH ที่เกิดจาก lipid peroxidation ใน microsomes ของตับหนู และยังพบว่า แอลฟา-โทโคไตรอีนอล สามารถกำจัด peroxy radical ได้มากกว่า แอลฟา-โทโคเฟอรอล ใน liposomal membranes อีกด้วย (Yoshida และคณะ, 2003) และยังพบว่า แอลฟา-โทโคไตรอีนอลมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ภายในสิ่งมีชีวิตสูงกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลถึง 3 เท่า (Chen และ Bergman, 2005)

Azlina และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของโทโคไตรอินอลต่อ lipid peroxidation ในการทดลองโรคกระเพาะอักเสบที่เกิดขึ้นโดย Restraint stress สามารถสรุปได้ว่าโทโคไตรอินอลอาจจะสามารถลดหรือยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้

Theriault และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาทดลองแล้วพบว่าแอลฟา-โทโคไตรอินอลมีผลในการลดลงของ cellular adhesion molecule expression และ monocytic cell adherence ซึ่งอาจจะป้องกันการเกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือดได้ นอกจากนี้ยังพบว่า โทโคไตรอินอลสามารถยับยั้งแอกติวิตีของ hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CO A) reductase ในไก่ที่มีระดับไขมันในเลือดสูงได้ และยังสามารถการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลโดยยับยั้งแอกติวิตีของ HMG-CO A reductase ของ post-transcriptional mechanism ใน HepG2 cells (Minhajuddin และคณะ, 2005)

Kim และคณะ (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) นอกจากนี้ยังวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของระดับวิตามินอี 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 ($P > 0.05$)

Weber และคณะ (1996) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอล ในการปกป้องผิวหนังจาก oxidative stress ที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดโรคมะเร็งผิวหนัง และความแก่ได้ โดยพบว่า ผลาสมามีความชอบที่จะดูดซึมแอลฟา-โทโคเฟอรอล ได้มากกว่าแอลฟา-โทโคไตรอินอล ทำให้เนื้อเยื่อในร่างกายไม่สามารถดูดซึมแอลฟา-โทโคไตรอินอลจากอาหารได้ในปริมาณมาก ถึงแม้แอลฟา-โทโคไตรอินอลจะมีแอกติวิตีของการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอล ก็ตาม

อย่างไรก็ตามมีการศึกษาวิจัยพบว่า อนุพันธ์อื่นๆ ของวิตามินอีนอกจากแอลฟา-โทโคเฟอรอล มีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์ เช่น แกมมา-โทโคเฟอรอล เป็นสารที่สามารถป้องกันมะเร็งได้ และยังเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันความผิดปกติเกี่ยวกับสมองที่เกิดขึ้นจากการอุดตันของเส้นเลือดในสมองส่วนกลาง สำหรับโทโคไตรอีนอลนั้นสามารถยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และลดปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรคหัวใจ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Cunha และคณะ, 2006)

วิตามินอีจากธรรมชาติ ร่างกายสามารถดูดซึมได้ดีกว่า และมีแอกติวิตีสูงกว่าวิตามินอีที่ได้จากการสังเคราะห์ (Gast และคณะ, 2005; Eitenmiller, 2004) ดังนั้นการแยก และการทำให้วิตามินอีจากน้ำมันที่ได้จากพืช เมล็ดพืช ถั่ว และจากแหล่งอื่นๆ เข้มข้นขึ้น จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ และน่าศึกษาเป็นอย่างยิ่ง

2.4.6 การสกัดและการทำให้วิตามินอีบริสุทธิ์

วิตามินอีสามารถแยกได้จากวัตถุดิบหลายชนิด และแยกโดยใช้วิธีการต่างๆ หลายวิธีดังนี้

1. การกลั่นระดับโมเลกุล (Molecular distillation)

Qureshi และคณะ (1997) ได้ศึกษาการแยกสารสกัดที่อุดมไปด้วยโทโคไตรอีนอล (tocotrienol-rich fraction) จากน้ำมันรำข้าว โดยวิธีการกลั่นระดับโมเลกุล พบว่ามีแอลฟา-โทโคไตรอีนอล 12.5%, แกมมา-โทโคไตรอีนอล 21%, เดลตา-โทโคไตรอีนอล 10%, d-โทโคไตรอีนอล 4.5%, P₂₅-โทโคไตรอีนอล (d-di-desmethyl tocotrienol; 3,4-dihydro-2-(4,8,12)-trimethyltrideca-3' (E), 7' (E)-1-trienyl-2-H-1-benzopyran-6-ol) 17%, โทโคไตรอีนอลที่พิสูจน์เอกลักษณ์ไม่ได้ 18% และอื่นๆ ได้แก่ แอลฟา-โทโคเฟอรอล 6% และ สเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ 10%

2. การไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)

Chu และคณะ (2003) ได้พัฒนาวิธีการทำให้โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลจาก คิสทิลเลตของน้ำมันปาล์มเข้มข้นขึ้น โดยใช้ *Candida antarctica* lipase (Novozyme 435) ซึ่งพบว่า สภาวะที่ทำให้ได้ความเข้มข้นของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลสูงที่สุด คือ ใช้ปริมาณ *Candida antarctica* lipase เท่ากับ 2.5% (w/w) และใช้น้ำ 45.2-47.3% (v/w) ทำปฏิกิริยากัน เป็นเวลา 5.5-5.7 ชั่วโมง

Chu และคณะ (2002) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำให้โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลจากคิสทิลเลตของน้ำมันปาล์มเข้มข้นขึ้น โดยใช้วิธี enzymatic hydrolysis-neutralization ซึ่งเอซิลกลีเซอรอล (acylglycerols) ในคิสทิลเลตของน้ำมันปาล์มจะถูก

3. การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Solvent extraction)

Chen และ Bergman (2005) ได้ศึกษาการสกัดโทโคเฟอร์รอล โทโคไตรอีนอล และแกมมา-โอริซานอล จากรำข้าว โดยใช้อัตราส่วนของรำข้าวต่อเมทานอลเท่ากับ 1:60 (w/v) ซึ่งจะได้อัตราการสกัดโทโคเฟอร์รอล โทโคไตรอีนอล และแกมมา-โอริซานอล 92-102% นอกจากนี้พบว่าไอโซ-โพรพานอล และเมทานอล เป็นตัวทำละลายที่ดีกว่าเฮกเซน สำหรับการสกัดโทโคเฟอร์รอล โทโคไตรอีนอล และแกมมา-โอริซานอล

Delgado-Zamarreno และคณะ (2004) ได้ศึกษาการแยก แอลฟา-, เบตาและแกมมา-และเดลตา-โทโคเฟอร์รอล จากอัลมอนต์ เมล็ดทานตะวัน ฮาเซลนัท และวอลนัท โดยวิธี Pressurized Liquid Extraction (PLE) ซึ่งเป็นเทคนิคการสกัดสารที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์หรือตัวทำละลายผสมที่มีความดันสูง และอุณหภูมิเหนือจุดเดือด เพื่อทำการสกัดสารจากวัสดุที่เป็นของแข็ง จากนั้นวิเคราะห์ แอลฟา-, เบตาและแกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอร์รอล ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสกัดแอลฟา-, เบตาและแกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอร์รอลด้วยตัวทำละลายอะซิโตนไนไตร(acetonitrile) ที่อุณหภูมิ 50°C และความดัน 1600 psi เป็นเวลา 5 นาที สามารถแยก แอลฟา-, เบตาและแกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอร์รอล ได้ 82-110%

Chu และคณะ (2004) ได้ศึกษาการแยกวิตามินอีจาก palm fatty acid distillate (PFAD) โดยใช้ silica ซึ่งวิตามินอีใน PFAD จะถูกทำให้เข้มข้นก่อนที่จะถูกดูดซับบน silica โดยใช้วิธี Neutralization (Chu และคณะ, 2002) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 N แล้วแยกวิตามินอีโดยใช้เฮกเซน

Ye และคณะ (2001) ได้ศึกษาวิธีที่ง่าย และรวดเร็วสำหรับการสกัดโทโคเฟอร์รอลจาก reduced-fat Mayonnaise โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดโดยตรงคือ hexane-ethyl acetate ที่ผสม BHT 0.003% จากนั้นทำการวิเคราะห์เอกลักษณ์ และปริมาณโทโคเฟอร์รอล โดยใช้ HPLC (90:10) ซึ่งใช้ fluorescence เป็น detector จากผลการศึกษาพบว่า ค่า recovery (%) (mean±S.D.)(N=5) ของ แอลฟา-, (เบตา และแกมมา)- และเดลตา-โทโคเฟอร์รอล คือ 102.0±3.6, 101.3±4.4 และ 101.9±6.2 ตามลำดับ

Cherukuri และคณะ (1999) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณของสารแอนติออกซิแดนซ์ของน้ำมันรำข้าวจากน้ำมันรำข้าวดิบ โดยทำการสกัดสารแอนติออกซิแดนซ์จากน้ำมันรำข้าวดิบด้วยแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 25-77°C ซึ่งทำให้ได้น้ำมันรำข้าวที่อุดมด้วยสารแอนติออกซิแดนซ์สูง

Hu และคณะ (1996) ศึกษาเปรียบเทียบตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ ไอโซโพรพานอล และเฮกเซนสำหรับการสกัดวิตามินอี และโอรีซานอลจากรำข้าว โดยอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อรำข้าวคือ 2:1 และ 3:1 (w/w) ใช้อุณหภูมิในการสกัดคือ 40 และ 60°C และเวลาในการสกัดคือ 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลาย (ไอโซโพรพานอล และเฮกเซน) ต่อรำข้าว และอุณหภูมิในการสกัดส่งผลให้ปริมาณของน้ำมันรำข้าวดิบ วิตามินอี และโอรีซานอลเพิ่มขึ้น โดยเวลาที่มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดน้ำมันรำข้าวดิบ วิตามินอี และโอรีซานอล คือ 15 นาที นอกจากนี้ ในการทดลองที่อัตราส่วนระหว่างไอโซโพรพานอลที่ผ่านการให้ความร้อนกับรำข้าว เท่ากับ 3:1 และอุณหภูมิในการสกัดเท่ากับ 60°C ทำให้ได้น้ำมันรำข้าวดิบ ปริมาณน้อยกว่าแต่ได้ปริมาณวิตามินอีสูงกว่า และมีค่าใกล้เคียงกับโอรีซานอล

4. การไฮโดรไลซิสโดยใช้ด่าง (Saponification)

Chun และคณะ (2006) ได้ศึกษาปริมาณโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลในผลไม้สด และผลไม้ที่ผ่านกระบวนการผลิตจำนวน 32 ชนิด ผักสด 22 ชนิด และผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศ ถั่วอบ มันฝรั่งต้มสุก บรอกโคลีแช่แข็ง และถั่วเขียวแช่แข็ง โดยการไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 60% ปริมาตร 5 mL ต่อสารตัวอย่าง 5 g ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 30 นาที โดยของผสมจะถูกเขย่าตลอดเวลา จากนั้นสกัดโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลโดยใช้เฮกเซน:เอทิลแอลกอฮอล์ เท่ากับ 85:15 (v/v) ปริมาตร 10 mL และวิเคราะห์ปริมาณโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลโดยใช้ HPLC จากผลการทดลองพบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณแอลฟา-โทโคเฟอรอลสูง และในแคนตาลูป มะเดื่อ ราสเบอร์รี่แดง ดอกกะหล่ำ เห็ด ผักกาดหอม และถั่วเขียว มีแกมมา-โทโคเฟอรอลในปริมาณที่สูงกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอล นอกจากนี้ ยังพบแอลฟา- และแกมมา-โทโคไตรอีนอลในผลไม้ และผักที่ศึกษาหลายชนิด แต่พบในปริมาณที่น้อยกว่า 0.1 mg/100g

López Ortiz และคณะ (2006) ได้ศึกษาการแยกโทโคเฟอรอลจากน้ำมันอัลมอนด์ และน้ำมันมะกอก โดยการไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 2 M ปริมาตร 20 mL ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 45 นาที โดยของผสมจะถูกเขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วรอบ 125

Kim (2005) สกัดวิตามินอีจากรำข้าว โดยการไฮโดรไลซิสด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 80% ปริมาตร 0.15 ml ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาที และสกัดวิตามินอีโดยใช้เฮกเซน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอล โดยใช้ HPLC จากผลการทดลองพบว่า ค่า recovery (%) ของ แอลฟา-แกมมา-และ เดลตา-โทโคเฟอรอล คือ 100, 98 และ 99% ตามลำดับ ขณะที่ ค่า recovery (%) ของ แอลฟา-, เบตาและแกมมา- และ เดลตา-โทโคไตรอินอล คือ 96, 98 และ 99% ตามลำดับ

Park และคณะ (2004) ได้ศึกษาการสกัดโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลจากส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของน้ำมันรำข้าวคืบ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดร่วมกับการใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 80% ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลโดยใช้ HPLC จากผลการศึกษาพบว่า ส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของน้ำมันรำข้าวคืบมีปริมาณ แอลฟา-โทโคเฟอรอล แอลฟา-โทโคไตรอินอล แกมมา-โทโคเฟอรอล และแกมมา-โทโคไตรอินอล เท่ากับ 14.0, 11.0, 2.5 และ 12.0 mg/ml ตามลำดับ (www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/5/1/1/654_park.htm)

Fernandez และคณะ (2000) ศึกษาหาความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์รวมในน้ำมันปาล์มคืบด้วยการไฮโดรไลซิสด้วยด่าง โดยนำน้ำมันปาล์มคืบ 3 g ละลายใน methylene chloride 20 mL เติม BHT ในเมทานอล (1% v/v) 3 mL และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล (17% w/v) 45 mL คนของผสมให้เข้ากันภายใต้สภาวะไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นสกัดของผสมด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 50 mL 4 ครั้ง กรองสบู่ออกด้วยการกรองภายใต้สุญญากาศด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 54 และล้างส่วนสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (8% w/v) 4 ครั้ง กวนผสมเบาๆ เพื่อป้องกันการเกิดอิมัลชัน จากนั้นล้างสารสกัดด้วยน้ำกำจัดไอออน 50 mL 4 ครั้ง เพื่อกำจัดค่าที่เหลือก้างอยู่ จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิ 30°C โดยใช้ rotary evaporation และละลายส่วนที่ได้ด้วยเฮกเซนปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 mL จากนั้นปิเปตสารมา 2 mL เจือจางด้วยเฮกเซนและปรับปริมาตรเป็น 25 mL กรองผ่าน polytetrafluoroethylene (PTFE) syringeless filter ขนาด 0.45 μ m เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นต่อไปด้วย spectrophotometry ซึ่งพบในปริมาณ 272 mg/kg

Khor และคณะ (1995) ได้ศึกษาการแยกโทโคไตรอีนอลจากดิสทิลเลตของน้ำมันปาล์ม โดยทำปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชันด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในแอลกอฮอล์ และสกัด ส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ด้วยอะซีโตน 5% ในไดเอทิลอีเทอร์ จากนั้นนำส่วนที่ละลายในอะซีโตน และอีเทอร์ล้างด้วยโซเดียมซัลเฟต และระเหยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดด้วย rotary evaporation นำส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ละลายในเมทานอล อัตราส่วน 1:10 (w/v) หลังจากผสม ให้เข้ากันแล้วนำของผสมมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 40 นำส่วนที่กรองได้ไป ระเหยให้แห้ง และนำมาละลายด้วยเฮกเซนอีกครั้งด้วยอัตราส่วน 1:10 (w/v) จากนั้นนำสารละลาย เฮกเซนดังกล่าวมาแช่เย็นที่อุณหภูมิ -18°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วกรองของผสมในห้องเย็น นำส่วนที่ตกตะกอนทิ้งไป และเอาส่วนที่กรองได้นำไประเหยให้แห้ง นำส่วนที่มีลักษณะเป็น น้ำมันมาละลายอีกครั้งด้วยเฮกเซนด้วยอัตราส่วน 1:5 (w/v) ทำซ้ำอีกครั้งในกระบวนการแช่เย็น และการกรองผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้มีปริมาณโทโคเฟอร์รอล และโทโคไตรอีนอลสูง นำไปแยก บริสุทธิ์โดยใช้ acid-treated florisil column ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ 0.4% ใน เฮกเซน ปริมาตร 400 mL เพื่อชะไฮโดรคาร์บอนที่ยังเหลืออยู่ออกไป 0.8% ของ ไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน ปริมาตร 300 mL เพื่อชะโทโคเฟอร์รอล และ 2% ของไดเอทิลอีเทอร์ในเฮกเซน ปริมาตร 600 mL เพื่อชะโทโคไตรอีนอล จากนั้นแยกบริสุทธิ์ของโทโคไตรอีนอลที่ได้ด้วย capillary GLC

Feeter (1973) ศึกษาการสกัดโทโคเฟอร์รอล สเตอรอล และsteryl esters ในดิสทิลเลต และของเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืช โดยการไฮโดรไลซิสด้วยด่าง และวิเคราะห์ปริมาณ โทโคเฟอร์รอล สเตอรอล และsteryl esters ด้วย Gas Liquid Chromatography (GLC) โดยนำ น้ำมันที่ผ่านการทำให้แห้งแล้ว 0.5 g (± 0.1 mg) ใส่เข้าไปใน saponification flask ขนาด 250 mL และเติม 3A alcohol (แอลกอฮอล์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นจากโพแทสเซียมเปอร์-แมงกานेट และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์) ปริมาตร 50 mL จากนั้นนำ flask ไปต่อกับ air condenser และ reflux สารละลายบน hot plate 5 นาที ขณะ reflux เติมโพแทสเซียม-ไฮดรอกไซด์ 1 g ลงไปใน condenser และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที โดยขณะที่ reflux ให้ เติมกรดไฮโดรคลอริก:น้ำกลั่น (1:1) 4 mL ลงไปใน condenser จากนั้นนำ flask ไปทำให้เย็น ลงโดยใช้น้ำแล้วนำสารใน flask เทลงใน separatory funnel ขนาด 500 mL พร้อมกับเติม peroxide-free diethyl ether 200 mL จากนั้นล้างส่วนที่เป็นสารละลายอีเทอร์ด้วยน้ำกลั่น 75 mL จำนวน 5 ครั้ง นำส่วนที่ละลายในอีเทอร์เทลงใน volumetric flask ขนาด 250 mL และปรับปริมาตรด้วย peroxide-free ether จนมีปริมาตรเท่ากับ 250 mL ปริมาณโทโคเฟอร์รอล ได้ถูกวิเคราะห์ในดิสทิลเลต และของเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืช ทั้งที่ผ่าน และไม่ผ่าน การไฮโดรไลซิสด้วยด่าง พบว่า α -tocopheryl propionate ถูกרבกวนด้วย glyceryl ester

5. การสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤต (Supercritical fluid extraction)

Sarmento และคณะ (2006) ได้ศึกษาการสกัดโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลจากน้ำมันรำข้าวด้วย supercritical CO₂ extraction โดยในขั้นตอนแรกทำการสกัดน้ำมันรำข้าวจากรำข้าว (ผ่านการ stabilize ด้วยความร้อน) ด้วย supercritical CO₂ ที่อุณหภูมิและความดันในช่วง 25-60°C และ 150-250 bar ตามลำดับ เพื่อหาสภาวะที่ได้ปริมาณโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลในน้ำมันรำข้าวสูงที่สุด โดยการวิเคราะห์ปริมาณ โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลด้วย HPLC พบว่า ที่อุณหภูมิ 40°C และความดัน 200 bar ได้โทโคเฟอรอลรวม และโทโคไตรอินอลรวมเท่ากับ 234.96 และ 704.16 mg/100 g ตามลำดับ สำหรับขั้นตอนที่ 2 ทำการแยกโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลด้วยการแยก 2 ครั้ง โดยการแยกครั้งแรกทำที่อุณหภูมิ 25 และ 40°C และความดันที่ 100 และ 150 bar ส่วนการแยกครั้งที่ 2 นั้นทำการแยกที่อุณหภูมิ 2°C และความดัน 25 bar จากผลการทดลองพบว่า ในการแยกครั้งแรกที่อุณหภูมิ 25°C และความดัน 150°C ให้ปริมาณโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลสูงที่สุดคือ 7.40 mg/100 g และ 24.10 mg/100 g ตามลำดับ

Gast และคณะ (2005) ศึกษาการทำ tocochromanols จากน้ำมันปาล์มดิบ (Crude palm oil: CPO) และดิสทิลเลตของน้ำมันถั่วเหลือง (Soy oil deodorizer distillate: SODD) ให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธี supercritical fluid extraction ซึ่งวิธีนี้มีประโยชน์มากกว่าเทคนิคธรรมดาในการสกัดสารเช่น vacuum distillation จากผลการศึกษาพบว่า CPO มีความเข้มข้นของ tocochromanols ประมาณ 500 mg/kg และ SODD มี tocochromanols ประมาณ 50% (w/w) ซึ่งสรุปได้ว่าเทคนิคการสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤตนั้นสามารถสกัดสารที่อุดมไปด้วยวิตามินอีสูงได้ดี

Mendes และคณะ (2005) ได้พัฒนากระบวนการทำให้โทโคเฟอรอลจากดิสทิลเลตของน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้นขึ้น โดยใช้วิธี Supercritical carbon dioxide โดยศึกษาสภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80°C และความดัน 90, 100, 150 และ 200 bar พบว่าที่อุณหภูมิ 40°C และความดัน 150 bar มีประสิทธิภาพในการแยกโทโคเฟอรอลจาก สควอลีน และกรดลิโนเลอิกได้ดีที่สุด

Mendes และคณะ (2005) ได้พัฒนากระบวนการทำให้โทโคเฟอรอลจากดิสทิลเลตของน้ำมันพืชได้แก่ น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันคาโนลา และน้ำมันถั่วเหลือง

Ibáñez และคณะ (2002) ศึกษาการสกัด และการทำให้สเตอรอล และโทโคเฟอรอลจาก น้ำมันมะกอกเข้มข้นขึ้นด้วยวิธี semicontinuous countercurrent supercritical fluid extraction โดยอัตราส่วนระหว่างอัตราการไหล CO₂ และอัตราการไหลสารตัวอย่างอยู่ระหว่าง 23.1 และ 41.7 kg CO₂/kg oil และอัตราการไหลของน้ำมันมะกอกคงที่ที่ 0.1 L/h และอัตราการไหลของ CO₂ เท่ากับ 2.0-3.6 L/h ความดันในการสกัดเท่ากับ 200 bar และความดันของการแยก 2 ครั้ง ในถังแยก (separator) ทั้ง 2 มีค่าเท่ากับ 100 และ 30 bar ตามลำดับ ใช้อุณหภูมิในการสกัดคงที่ที่ 40°C ขณะที่อุณหภูมิในการแยกในถังแยก 1 และ 2 เท่ากับ 40 และ 0°C ตามลำดับ ระยะเวลาในการสกัดสำหรับแต่ละการทดลองเท่ากับ 60 นาที แล้วทำการศึกษาผลของการใช้ packing materials ที่แตกต่างกัน (Raschig rings, Dixon rings, Fenske rings และ glass beads) ต่อการแยกสเตอรอล และโทโคเฟอรอลจากน้ำมันมะกอก จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณโทโคเฟอรอลในน้ำมันมะกอกเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 190 mg/kg โดยการแยกครั้งที่ 2 นั้นจะให้ความเข้มข้นของวิตามินอีสูงกว่าการแยกครั้งที่ 1 สำหรับทุกๆ packing materials ที่ศึกษา ยกเว้น Fenske rings และ glass beads จะมีความแตกต่างระหว่างการสกัดที่ได้จากการแยกครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มากกว่าการใช้ Raschig rings และ Dixon rings

Mendes และคณะ (2002) ได้ศึกษาการทำให้วิตามินอีจากคิสทิลเลตของน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้นขึ้น โดยใช้วิธี Supercritical carbon dioxide โดยทดลองที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80°C ที่ความดัน 90 และ 170 bar พบว่าวิตามินอีมีความเข้มข้นขึ้นอย่างน้อย 40% จากแหล่งธรรมชาติ และประสิทธิภาพของกระบวนการดังกล่าวจะสูงขึ้น ถ้าทำที่สภาวะอุณหภูมิ และความดันที่ต่ำกว่า

Carlucci และคณะ (2001) ได้ศึกษาการสกัดโทโคเฟอรอลจาก malt sprouts ด้วยวิธี Supercritical fluid extraction ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ ความดัน 250 bar อุณหภูมิ 80°C อัตราเร็วของคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 1 mL/min ระยะเวลาในการสกัดคือ 180 นาที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโทโคเฟอรอลโดยใช้ HPLC จากผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณโทโคเฟอรอลรวมเท่ากับ 21 ug/g

Hadolin และคณะ (2001) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดด้วยความดันสูงในการผลิตน้ำมันที่มีความเข้มข้นของ แอลฟา-โทโคเฟอรอลจากเมล็ดของ *Silybum marianum* โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือ Supercritical carbon dioxide และ liquid propane ที่ความดัน

Ibáñez และคณะ (2000) ได้ศึกษาการแยกโทโคเฟอรอลจากของเหลือทิ้งกึ่งแข็งที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันมะกอก โดยการสกัดด้วย Supercritical carbon dioxide ใน packed capillary column ที่เคลือบด้วย polyethylene glycol และ CO₂ ในสัดส่วนที่เหมาะสม โดยสภาวะที่ใช้คือ ใช้ความร้อนคงที่ที่อุณหภูมิ 50°C และความดันคงที่ที่ 350 bar จากนั้นวิเคราะห์โทโคเฟอรอลที่แยกได้โดยใช้ Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) จากผลการทดลองพบว่า องค์ประกอบหลักที่พบในของเหลือทิ้งกึ่งแข็งที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันมะกอกคือ แกมมา-โทโคเฟอรอล รองลงมาคือ เบตา- และแอลฟา-โทโคเฟอรอล ตามลำดับ

Scalia และคณะ (1995) ได้ศึกษาการใช้ supercritical fluid extraction เป็นทางเลือกใหม่แทนการสกัดโดยใช้ของเหลว สำหรับการแยกวิตามินเอปาล์มมิเตต (vitamin A palmitate) และวิตามินอีอะซิเตต (vitamin E acetate) จากครีม และโลชั่น โดยปัจจัยหลักที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤตคือ ความดันในการสกัด และระดับการกระจายตัวของสารตัวอย่าง จากนั้นวิเคราะห์วิตามินที่แยกได้ด้วย HPLC หลังจากทำการสกัดด้วย supercritical carbon dioxide ที่อุณหภูมิ 40°C และความดัน 250 bar เป็นเวลา 30 นาทีของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางทั้งรูปแบบครีม และ โลชั่น จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยของเหลวธรรมดา พบว่าการสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤตจะให้ร้อยละผลผลิตของวิตามินที่ต่ำกว่าเล็กน้อย (>91.6%) แต่ให้ประสิทธิภาพการทำบริสุทธิ์ของเครื่องสำอางมากกว่า นอกจากนี้ วิธีนี้ยังสามารถลดระยะเวลาในการสัมผัสกับสารตัวอย่าง และลดการใช้ตัวทำละลายที่เป็นอันตราย และยังให้สภาวะในการสกัดที่ไม่รุนแรงสำหรับการวิเคราะห์วิตามิน ดังนั้นเทคนิคการสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤต สามารถวิเคราะห์วิตามินอีอะซิเตต และวิตามินเอปาล์มมิเตตในครีม และ โลชั่นทางการค้าได้

Sarmento และคณะ (2006) กล่าวว่า ข้อดีของการสกัดด้วยของไหลเหนือวิกฤต คือ เป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างรวดเร็ว บรรจุสารได้ครั้งละมากๆ สามารถปกป้องสารจากการสลายตัวด้วยแสง ความร้อน และออกซิเจน สามารถวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยได้ และลดการใช้

2.4.7 การวิเคราะห์เอกลักษณ์ และปริมาณของวิตามินอี

วิตามินอีทั้งโทโคเฟอร์อล และโทโคไตรอีนอลสามารถวิเคราะห์เอกลักษณ์ และปริมาณได้ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ normal phase high performance liquid chromatography (NP-HPLC), reversed phase high performance thin layer chromatography (C₁₈RP-HPLC), reversed phase high performance liquid chromatography (C₁₈RP-HPLC), gas chromatography (GC) (Slover และคณะ, 1983; Meijboom และ Jongenotep, 1978) nano liquid chromatography และ capillary electrophoresis (CE) ซึ่ง CE ได้รับความนิยมมากขึ้นในการวิเคราะห์สารที่เกี่ยวข้องกับการผลิตยา เนื่องจาก CE มีความสามารถในการแยกสารได้สูง ใช้สารตัวอย่าง และตัวทำละลายในปริมาณต่ำ การวิเคราะห์ห่อหุ้มประกอบที่แตกต่างกันของโทโคเฟอร์อลนั้นสามารถใช้เทคนิคการแยกด้วย electrokinetic ได้ เช่น capillary electrochromatography (CEC) และ micellar electrokinetic chromatography (MEKC) (Chang และคณะ, 2006)

การสกัดโทโคเฟอร์อล และโทโคไตรอีนอลด้วยการไฮโดรไลซิสด้วยด่าง หรือ ทำปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชัน เพื่อกำจัดกรดไขมันที่มีปริมาณมากเกินไป ก่อนการวิเคราะห์ด้วย HPLC หรือ วิเคราะห์อื่นๆ มีความสำคัญสำหรับตัวอย่างที่มีไขมันสูง แต่ในทางตรงกันข้าม การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วจะมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่มีไขมันต่ำ นอกจากนี้การสลายตัวของแอลฟา-โทโคเฟอร์อลอาจจะเกิดขึ้นได้เสมอ เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อมีการสัมผัสกับอากาศ หรือ แสงในระหว่างวิธีการสกัด (Aoun และคณะ, 2005)

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของโทโคเฟอร์อล และโทโคไตรอีนอลในน้ำมันพืชสามารถทำได้โดยการสกัดโดยใช้ของเหลว(liquid-liquid extraction) โดยปราศจากการไฮโดรไลซิสด้วยด่างหรือปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชันหรือการสกัดด้วยตัวทำละลายหลังจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยด่างแล้ว ซึ่งการวิเคราะห์นั้นสามารถใช้วิธี HPLC หรือ GC อย่างไรก็ตาม GC ไม่นิยมนำมาใช้โดยทั่วไป เนื่องจากธรรมชาติของสารที่ไม่ระเหยเป็นไอของวิตามินอีซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการทำให้เกิด derivative ของโทโคเฟอร์อล และโทโคไตรอีนอลก่อนที่จะหาปริมาณโดยใช้ GC นอกจากนี้มีรายงานว่า NP-HPLC และ RP-HPLC เป็นวิธีที่นิยมใช้มาก สำหรับการวิเคราะห์โทโคเฟอร์อล และโทโคไตรอีนอลโดย

HPLC ถูกใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเม็คคิลอโรฟิลด์ แครโทีนอยด์ โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลในน้ำมันพืช โดยโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลนั้นจะถูกดูดกลืนได้ดีโดยแสง fluorescence เนื่องจากมีโครงสร้างที่เป็นวงแหวนโครแมน (chroman ring) ทำให้การวิเคราะห์โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลด้วย fluorescence มีความไวและความจำเพาะมากกว่าการวิเคราะห์ด้วยอัลตราไวโอเล็ต (Seppanen และคณะ, 2003)

2.4.7.1 การวิเคราะห์เอกลักษณ์ และปริมาณของวิตามินอีโดยใช้วิธี HPLC

Nystrom และคณะ (2007) ศึกษาวิธีวิเคราะห์ sitostanyl ferulate และแอลฟา-โทโคเฟอรอลในตัวอย่างน้ำมันดอกทานตะวัน โดยใช้วิธี Normal phase high performance liquid chromatography (NP-HPLC) แบบ isocratic system ด้วย diol column โดย mobile phase ที่ใช้คือ เฮกเซน:ไอโซโพรพานอล:กรดอะซิติก (99:1:0.1) ที่อัตราการไหล 0.5 mL/min โดย sitostanyl ferulate วิเคราะห์ด้วย diode array detector ที่ความยาวคลื่น 315 nm และ แอลฟา-โทโคเฟอรอล วิเคราะห์ด้วย fluorescence detector ที่ excitation wavelength เท่ากับ 290 nm และ emission wavelength เท่ากับ 325 nm โดยหาค่า linear range of response limit of detection และ limit of determination เพื่อ validate วิธีโครมาโทกราฟี

วิธีวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว ง่าย และมีความน่าเชื่อถือ คือใช้ NP-HPLC ที่ใช้ diode array เป็นดีเทคเตอร์ สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของวิตามินเอ (retinol acetate และ retinol palmitate) และวิตามินอี (แอลฟา-โทโคเฟอรอล อะซีเตต แอลฟา-, แกมมา- และ เดลตา-โทโคเฟอรอล) ในนมสูตรสำหรับเด็กทารก โดยการเตรียมตัวอย่างนั้นจะมีการตกตะกอน โปรตีน และสารสกัดวิตามินด้วยเอทานอล ตามด้วยการสกัดอีกครั้งด้วยเฮกเซน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณด้วย NP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ที่สั้นแคบ และมีรูพรุน ซึ่งใช้ตัวทำละลายน้อยกว่า ลดปริมาณของเฟสคงที่ (stationary phase) และมีความไวต่อมวลสูงกว่า โดยการแยกที่อุณหภูมิ 30°C mobile phase ที่ใช้คือ เฮกเซน:ไอโซโพรพานอล 0.5% ในเฮกเซน โดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 0.4 mL/min ซึ่งพบว่า วิธีการวิเคราะห์วิธีนี้ให้ค่าที่ยอมรับได้ และเป็นวิธีที่ง่ายสำหรับงานในการวิเคราะห์ที่ทำเป็นประจำ (Chávez-Servín และคณะ, 2006)

Chun และคณะ (2006) ได้ศึกษาปริมาณของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลในผัก ผลไม้สด และผัก ผลไม้ที่ผ่านกระบวนการผลิต โดยใช้ NP-HPLC ซึ่งมี ไอโซโพรพานอล และ

ที่น้อยกว่า 0.1 mg/100g

Cunha และคณะ (2006) ได้ศึกษาปริมาณของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลในน้ำมันมะกอก โดยใช้ NP-HPLC ด้วยดีเทคเตอร์ 3 ชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ fluorescence ต่อกับ diode array ultraviolet และ evaporative light scattering โดย mobile phase ที่ใช้คือ 1,4-dioxane/n-hexane (3.5:96.5, v/v) ที่อัตราการไหล 0.7 mL/min จากผลการทดลองพบว่า ดีเทคเตอร์ชนิด fluorescence ให้ผลดีที่สุด ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอล ในน้ำมันมะกอก 18 ตัวอย่าง พบว่า ทั้ง 18 ตัวอย่างประกอบไปด้วยสารประกอบ 6 ชนิด คือ แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล แอลฟา- และแกมมา-โทโคไตรอินอล โดยพบว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลเป็นองค์ประกอบหลักของวิตามินอีในทุกตัวอย่าง ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 93-260 mg/kg โทโคเฟอรอลรวม และโทโคไตรอินอลรวมมีค่าอยู่ในช่วง 100-270 mg/kg โดยแหล่งกำเนิดของผลมะกอกไม่มีผลต่อองค์ประกอบของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลในน้ำมันมะกอก

Lopez Ortiz และคณะ (2006) ได้ศึกษาวิธีการอย่างง่ายสำหรับการหาปริมาณของโทโคเฟอรอลในน้ำมันอัลมอนท์ และน้ำมันมะกอก โดยใช้วิธี Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ซึ่งมีอะซีโทไนไตร และน้ำอัตราส่วน 95:5 (v/v) เป็น mobile phase อัตราการไหลที่ใช้คือ 0.4 mL/min และใช้ Fluorescence เป็นดีเทคเตอร์ (Ex = 290 nm, Em = 325 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

Aoun และคณะ (2005) ได้ศึกษาปริมาณแอลฟา-โทโคเฟอรอลใน Ferula hermonis (Zalooch root) โดยใช้ HPLC และ Spectrofluorometer พบว่าปริมาณแอลฟา-โทโคเฟอรอลที่วิเคราะห์ด้วยทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันคือ ประมาณ 5 ± 0.5 mg/g และ 4.9 ± 0.5 mg/g ตามลำดับ ซึ่งศึกษาโดยใช้ดีเทคเตอร์ 2 แบบ คือ Fluorescence detector โดย mobile phase คือ เมทานอล-

Sivakumar และคณะ (2005) ได้ศึกษาการสกัดวิตามินอีธรรมชาติด้วยวิธี pressurized liquid extraction (PLE) ในถั่ว *Corylus avellana* 12 ตัวอย่าง ถั่วถูกนำไปทำให้เป็นผงด้วยการบดด้วยความเร็วสูงโดยใช้ Waring blender เป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นนำไปสกัดแอลฟา-โทโคเฟอรอล โดยใช้เฮกเซนที่ถูกกำจัดน้ำออกไปแล้วผสมกับ butylated hydroxytoluene (BHT, co-antioxidant) 0.01% และวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-โทโคเฟอรอล โดย NP-HPLC ที่มี UV-visible เป็นดีเทคเตอร์ mobile phase ที่ใช้คือ ไอโซโพรพานอล 0.5% ในเฮกเซน ด้วยอัตราการไหล 1 mL/min จากผลการทดลองพบว่า อัตราการสะสมของแอลฟา-โทโคเฟอรอลมีค่าแตกต่างกันในตัวอย่างถั่วทั้งหมดที่เก็บเกี่ยวในพื้นที่ที่แตกต่างกันของประเทศอิตาลี โดยพบว่า Sarda Piccola nut มีแอลฟา-โทโคเฟอรอล (81.17 ug/g d.w) มากกว่าถั่วสายพันธุ์อื่นๆ

Abidi (2003) ได้ศึกษาปริมาณของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลจากน้ำมันคาโนลารีไฟน์ น้ำมันข้าวโพดดิบ น้ำมันดิบจาก milkweed น้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันรำข้าวดิบ และรีไฟน์ น้ำมันถั่วเหลืองดิบและรีไฟน์ น้ำมันดอกทานตะวันดิบและรีไฟน์ และน้ำมันพืชตัดแปลงชนิดอื่นๆ ด้วย RP-HPLC ที่มี fluorescence เป็นดีเทคเตอร์บน pentafluorophenylsilica (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 แม้ว่าน้ำมันจาก milkweed ส่วนใหญ่มีเบตา-โทโคเฟอรอลในระดับปานกลาง แต่จะพบเบตา-โทโคเฟอรอลปริมาณต่ำและแกมมา-โทโคเฟอรอลในปริมาณสูงในน้ำมันบริโกล สำหรับเบตา- และแกมมา-โทโคไตรอีนอลนั้นสามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกับแอลฟา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล ซึ่งสามารถพบได้ในน้ำมันรำข้าวและน้ำมันปาล์มเท่านั้น

Bereau และคณะ (2003) ได้ศึกษาปริมาณโทโคเฟอร์รอล และโทโคไตรอีนอลใน Amazonian Palm Kernel oil 5 ชนิด ได้แก่ *Acrocomia lasiospatha* Wall., *Astrocaryum vulgare* C. Mart., *Bactric gasipaes* H.B.K., *Elaeis oleifera* (kunth) Cortés และ *Maximiliana maripa* Drude โดยนำส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของน้ำมันปาล์มปริมาณ 5 g เจือจางด้วยเฮกเซน 2 mL และฉีดเข้าไปใน Spherisorb® 80 A° column วิเคราะห์ด้วย Waters 486 Tunable Absorbance detector ที่มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min และ mobile phase ที่ใช้คือ เฮกเซน:2-โพรพานอล ในอัตราส่วน 99:1 (v/v) พบว่า ปริมาณโทโคเฟอร์รอลรวมของ น้ำมันปาล์มทั้ง 5 ชนิด มีค่าอยู่ในช่วง 5-115 mg/kg และมีแอลฟา-โทโคไตรอีนอลสูงถึง 60-84% ยกเว้น *E. oleifera* มีแอลฟา-โทโคเฟอร์รอลเป็นองค์ประกอบหลักและในส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ นั้น พบว่าโทโคเฟอร์รอลรวม เท่ากับ 0.1-1.6% เท่านั้น

Matthaus และคณะ (2003) ได้ศึกษาปริมาณกรดไขมันอิสระ และโทโคเฟอร์รอลที่เป็น องค์ประกอบของเมล็ดพีชน้ำมัน 40 สายพันธุ์จากประเทศเวียดนามด้วย HPLC ที่มี fluorescence spectrophotometer เป็นดีเทคเตอร์ ที่อัตราการไหล 1.3 mL/min โดย mobile phase ที่ใช้คือ เฮกเซน:tert-บิวทิล เมทิลอีเทอร์ (99:1, v/v) จากผลการทดลองพบว่า เมล็ดพีชน้ำมันสายพันธุ์ *Mangifera indica* และ สายพันธุ์ *Calophyllum inophyllum* มีปริมาณน้ำมัน 0.2 และ 75.7 g/100 g ตามลำดับ ขณะที่เมล็ดพีชน้ำมันเพียง 9 สายพันธุ์เท่านั้นที่ให้ปริมาณน้ำมันมากกว่า 40% นอกจากนี้ยังพบปริมาณโทโคเฟอร์รอล 26 mg/kg (*Sapindus mukorossi*) ถึง 9361 mg/kg (*Litchi chinensis*) และในเมล็ดพีชน้ำมัน 9 สายพันธุ์ยังพบกรดไขมันอิสระที่เป็น conjugated, cyclopropenoic และ epoxy fatty acid

Seppanen และคณะ (2003) ศึกษาปริมาณของคลอโรฟิลล์ฟีโอฟิติน (pheophytins) เบตา-แคโรทีน โทโคเฟอร์รอล และโทโคไตรอีนอล ในน้ำมันมะกอก และน้ำมันถั่วเหลืองด้วย HPLC โดยใช้ UV/vis spectrophotometer ในการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และบี ฟีโอฟิตินเอและบี และเบตา-แคโรทีน ที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (430, 452, 409, 433 และ 452 nm ตามลำดับ) สำหรับแอลฟา-แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอร์รอล และโทโคไตรอีนอลนั้น วิเคราะห์โดย fluorescence (295-nm excitation และ 330-nm emission) และ mobile phase ที่ใช้คือ ไอโซโพรพานอล:เฮกเซน (1.5:98.5 v/v) ที่อัตราการไหล 1 mL/min จากการทดลอง พบว่า ในน้ำมันมะกอกมีค่าผลผลิตของคลอโรฟิลล์เอและบี ฟีโอฟิตินเอและบี เท่ากับ 99.1, 97.9, 99.4 และ 98.3% ตามลำดับ และในน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการฟอกสีมีค่าผลผลิตของ แอลฟา-แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอร์รอล แอลฟา-โทโคไตรอีนอล และเบตา-แคโรทีน เท่ากับ 96.5, 97.4, 95.2, 97.3 และ 99.2% ตามลำดับ

Zadernowski และคณะ (2003) ศึกษาปริมาณโทโคเฟอร์อลในน้ำมันที่สกัดจาก Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) และเบอร์รี่ 6 ชนิด ด้วย HPLC ที่มีเฮกเซน: ไดเอทิลอีเทอร์ (95:5, v/v) เป็น mobile phase ที่มีอัตราการไหล 2 mL/min พบว่า ปริมาณโทโคเฟอร์อลรวมในน้ำมันจากเบอร์รี่ทั้งหมดทุกชนิดมีค่าเท่ากับ 101.4-128.3 mg/100 g ของน้ำมัน โดยพบแอลฟา-โทโคเฟอร์อลมากที่สุด และพบแกมมา-โทโคเฟอร์อลในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น โดยมีแอลฟา-และเดลตา-โทโคเฟอร์อลในโทโคเฟอร์อลรวมเท่ากับ 62.3-67.9% และ 32.1-37.5% ตามลำดับ ซึ่งเบอร์รี่ชนิด Nadbaltycka จะมีปริมาณโทโคเฟอร์อลรวมเพิ่มขึ้นจาก 40.4 mg/100 g ของน้ำมันไปเป็น 109.8 mg/100 g ของน้ำมันในระหว่างการสุก สำหรับ Green berries นั้นจะมีปริมาณแกมมา-โทโคเฟอร์อลมากที่สุด แต่จะมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วจนเหลือในปริมาณที่น้อยมากเมื่อสีผลเบอร์รี่เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองมะกอก

Borher และคณะ (2002) ศึกษาระดับของแอลฟา-และแกมมา-โทโคเฟอร์อลในพลาสมาของวัว Nelore (*Bos indicus*) อายุ 2 ปี จำนวน 9 ตัว หลังจากการให้อาหารที่มีดิสทิลเลตของน้ำมันถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม โดยดิสทิลเลตของน้ำมันถั่วเหลืองนั้น มีองค์ประกอบของแอลฟา-โทโคเฟอร์อล 1.95% และแกมมา-โทโคเฟอร์อล 8.45% จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณโทโคเฟอร์อลในพลาสมาโดย RP-HPLC ใช้ C18 column และใช้ UV เป็นดีเทคเตอร์ mobile phase ที่ใช้คือ เมทานอล:น้ำ (97:3 v/v) ด้วยอัตราการไหล 1 mL/min จากผลการทดลองพบว่า การให้อาหารที่มีส่วนผสมของดิสทิลเลตของน้ำมันถั่วเหลืองนั้น สามารถเพิ่มระดับของแอลฟา-และแกมมา-โทโคเฟอร์อลในพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.5$)

Puspitasari-Nienaber และคณะ (2002) ศึกษาการวิเคราะห์โทโคเฟอร์อล แคลโรทีนอยด์ และคลอโรฟิลล์ในน้ำมันพืช โดยการฉีดสารตัวอย่างโดยตรงที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยค่าหรือซาฟอนิฟิเคชันเข้าไปใน C₃₀ RP-HPLC ที่ใช้ Coulometric electrochemical array เป็นดีเทคเตอร์ พบว่าปริมาณต่ำสุดที่จะวิเคราะห์ได้ (detection limit) สำหรับแคลโรทีนอยด์ โทโคเฟอร์อล และคลอโรฟิลล์ มีค่าเท่ากับ 1 fmol, 0.15 pmol และ 0.5 pmol ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้น 1000, 25 และ 5 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ UV-vis เป็นดีเทคเตอร์ โดยค่าการตอบสนองของดีเทคเตอร์มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง 0.01 และ 2.00 ug/mL สำหรับสารทั้ง 3 ตัว โดยการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันมีค่าความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 2.0 และ 6.3% ขณะที่การวิเคราะห์ระหว่างวันมีค่าความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 2.7 และ 7.4% ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้สามารถประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ที่ต้องการความเร็วในการศึกษาคุณภาพและสิ่งเจือปนของน้ำมัน

Carlucci และคณะ (2001) ได้ศึกษาการแยกโทโคเฟอร์รอลจากข้าวหมอลำที่กำลังงอก โดยใช้วิธี supercritical fluid extraction (SFE) จากนั้นหาปริมาณโทโคเฟอร์รอลที่แยกได้โดยใช้วิธี HPLC ซึ่งโทโคเฟอร์รอลจะถูกแยกใน Zorbax reverse-phase column โดยใช้เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 98:2 v/v เป็น mobile phase อัตราการไหลที่ใช้คือ 2.0 mL/min ที่อุณหภูมิห้อง และใช้ Fluorescence เป็นดีเทคเตอร์ ($E_m = 328$ nm และ $E_x = 303$ nm) ผลที่ได้จากการศึกษา คือ ปริมาณต่ำสุดที่จะวิเคราะห์ได้ สำหรับ แอลฟา-, แกมมา- และ เดลตา-โทโคเฟอร์รอล คือ 0.04, 0.05 และ 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และ Calibration graphs ของวิธีนี้สำหรับแอลฟา-, แกมมา- และ เดลตา-โทโคเฟอร์รอล เป็นเส้นตรงเมื่อความเข้มข้นของสารอยู่ในช่วง 0.1 – 1.5, 0.2 – 2.5 และ 0.2 – 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

Tasioula-Margari และ Okogeri (2001) ศึกษาวิธีการอย่างง่ายสำหรับการสกัดและการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ของฟีนอล และโทโคเฟอร์รอลในน้ำมันมะกอก โดยทำการสกัดสารดังกล่าวด้วยเมทานอล เปรียบเทียบกับการใช้ของผสมระหว่างไอโซโพรพานอล และเมทานอล ซึ่งสามารถแยกฟีนอล และโทโคเฟอร์รอลได้โดยใช้ Reverse phase C_{18} column ด้วยของผสมระหว่างกรดอะซิติก และน้ำผสมกับเมทานอล อะซิโพรโนไตร และไอโซโพรพานอล (acetic acid / water-methanol-acetonitrile-isopropanol mixture) ด้วยการชะแบบ gradient โดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 nm พบว่าฟีนอลที่มีโครงสร้างอย่างง่าย และซับซ้อนสามารถสกัดได้ 100% และแอลฟา-โทโคเฟอร์รอลสามารถสกัดได้ 80%

Kamal-Eldin และคณะ (2000) ได้ศึกษาการหา Universal HPLC column สำหรับการแยกองค์ประกอบของวิตามินอี คือ แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอร์รอล และ แอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอินอล ในตัวอย่างของผสมที่เตรียมจากสารสกัดจากข้าวโอ๊ต น้ำมันปาล์ม และสารมาตรฐานโทโคเฟอร์รอล โดยใช้ NP-HPLC ใน silica column 6 ชนิด amino column 3 ชนิด และ diol column 1 ชนิด โดยวิเคราะห์ค่า retention factor (k), separation factor (α), number of theoretical plates (N) และ resolution (R_s) พบว่าวิตามินอีสามารถแยกได้ดีที่สุดใน silica column 3 ชนิดและ amino column 2 ชนิด โดยใช้ dioxane 4% หรือ 5% ในเฮกเซนเป็น mobile phase ซึ่งมีความสามารถในการแยกวิตามินอีดีเท่ากับ diol column โดยใช้ tert-butyl methyl ether 4% ในเฮกเซนเป็น mobile phase

Dionisi และคณะ (1995) ได้ศึกษาวิธี RP-HPLC ด้วย amperometric detection สำหรับการวิเคราะห์โทโคเฟอร์รอล และโทโคไตรอินอลในน้ำมันมะกอกผสมที่ไม่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยด่าง พบว่าในน้ำมันมะกอกที่มีความบริสุทธิ์พิเศษ (extra virgin olive oil) มีแอลฟา-และแกมมา-โทโคไตรอินอลเท่ากับ 97.0 และ 102.0% ตามลำดับ แต่ไม่พบ

Chase และคณะ (1994) ศึกษาปริมาณโทโคเฟอรอลในน้ำมันพืชโดยวิธี HPLC ด้วย fluorescence detector เปรียบเทียบกับ Evaporative Light-Scattering Detector (ELSD) โดยทำการแยกโทโคเฟอรอลจาก acylglycerols ด้วย gel-permeation chromatography (GPC) ซึ่งจะเก็บส่วนที่มีโทโคเฟอรอลจาก GPC column 4 อัน โดยการชะด้วย methylene chloride จากนั้นนำไปผ่านการแยกบน normal-phase silica column ที่มีเฮกเซน: ไอโซโพรพานอล (99.7:0.3 v/v) เป็น mobile phase และมีอัตราการไหลเท่ากับ 1.0 mL/min ใช้ 5,7 demethyltolcol เป็น internal standard ซึ่งวิเคราะห์โดยทั้ง ELSD และ fluorescence detector จากผลการทดลองพบว่า fluorescence detector มีความไวต่อการวิเคราะห์โทโคเฟอรอลมากกว่า ELSD 10 เท่า และ แกมมา-โทโคเฟอรอล คือ องค์ประกอบหลักของโทโคเฟอรอลในน้ำมันพืช โดยมีค่าเท่ากับ 24.1-93.3 mg/100 g

Rogers และคณะ (1993) ได้ศึกษาการแยกและปริมาณของโทโคเฟอรอลโทโคไตรอินอลและโอริซานอลในน้ำมันรำข้าวโดย RP-HPLC โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณของโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอินอลด้วย fluorescence detection และโอริซานอล (ferulic acid esters of sterols และ triterpene alcohols) ด้วย photodiode array detection ส่วน Chemical ionization mass spectrometry ถูกใช้สำหรับการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของ cycloartenyl ferulate, 24-methylene cycloartenyl ferulate, campesteryl ferulate, β -sitosteroyl ferulate และ cycloartenyl ferulate ซึ่งเป็นโอริซานอลหลักที่ถูกแยกได้โดยวิธีนี้ จากผลการทดลองพบว่า น้ำมันรำข้าวบริโภคนอกจากแหล่งผลิตที่แตกต่างกันมีระดับของโทโคเฟอรอลโทโคไตรอินอลและโอริซานอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.5$)

Carpenter (1979) ศึกษาปริมาณของโทโคเฟอรอลในน้ำมันพืชโดยใช้ HPLC ด้วย 4 mm x 30 cm u-Porasil column โดย mobile phase ที่ใช้คือ iso-propyl alcohol 1.5% ในเฮกเซนที่อัตราการไหล 1.8-2.0 mL/min และใช้อัตราไหลไอโอสเต เป็นดีเทคเตอร์ พบว่า วิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีความน่าเชื่อถือมากกว่าในการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีระดับโทโคเฟอรอลสูงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโทโคเฟอรอลรวมที่วิเคราะห์โดยวิธีการวัดสีมาตรฐาน (standard colorimetric procedure) และสามารถใช่วิธีนี้กับการวิเคราะห์ปริมาณโทโคเฟอรอลในน้ำมัน

2.4.7.2 การวิเคราะห์เอกลักษณ์ และปริมาณของวิตามินอีโดยใช้วิธีอื่นๆ

Graciano-Verdugo และคณะ (2006) ศึกษาปริมาณของแอลฟา-โทโคเฟอรอลในฟิล์มโพลีเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (low-density polyethylene:LDPE) โดยวิธี diffuse reflectance Fourier transform infrared (DRIFT-IR) spectroscopy เปรียบเทียบกับ HPLC โดยฟิล์มมาตรฐานที่ใช้มีความเข้มข้นของแอลฟา-โทโคเฟอรอล เท่ากับ 0.13-1.74% ซึ่งถูกวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี HPLC ด้วย C₁₈ column ที่มีการชะแบบ isocratic ด้วยเมทานอล:น้ำ (98:2 v/v) และใช้ fluorescence เป็นคิเทคเตอร์ โดยก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC ต้องทำการสกัดแอลฟา-โทโคเฟอรอลจากฟิล์มด้วย tetrahydrofuran (THF) และเติมสารเพิ่มความคงตัวคือ BHT ปล่อยให้ทำปฏิกิริยากันภายใต้สภาวะห้อง ปรอทจากแสงและใช้ตัวทำละลายอุณหภูมิต่ำ ซึ่ง DRIFT-IR spectra ได้จากฟิล์มมาตรฐานและการสั่นของหมู่ฟีนอลิก (C-OH) ที่ 1209 cm⁻¹ ถูกใช้หาปริมาณของแอลฟา-โทโคเฟอรอลและกราฟของ LDPE ที่ 2019 cm⁻¹ ถูกใช้เป็น internal standard จากนั้นคำนวณอัตราความสูงของกราฟหรือพื้นที่ใต้กราฟที่ 1209 cm⁻¹/2019 cm⁻¹ โดยค่าสัมประสิทธิ์ของกราฟมาตรฐาน ความสูงของกราฟและพื้นที่ใต้กราฟมีค่าเท่ากับ 0.9997 และ 0.9988 ตามลำดับ ดังนั้น DRIFT-IR เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ระยะเวลาสั้น สารที่ถูกวิเคราะห์ไม่ถูกทำลาย ไม่ใช่ตัวทำละลาย และไม่จำเป็นต้องควบคุมให้อยู่ในสภาวะห้องทดลอง

Ahmed และคณะ (2005) ศึกษาเอกลักษณ์และปริมาณของโทโคเฟอรอลโทโคไตรอินอล และพลาสโตโครมานอล-8 (plastochromanol-8) ในน้ำมันคาโนลา (canola oil) น้ำมันโซลิน (solin oil) เมล็ดแฟลกซ์ที่มีกรดลิโนเลอิกต่ำ 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-โทโคไตรอินอล) ในน้ำมันคาโนลา 4 ตัวอย่าง เท่ากับ 436, 598, 557 และ 681 mg/kg ตามลำดับ โดยน้ำมันคาโนลามีแอลฟา- และแกมมา-โทโคเฟอรอลสูง แต่ไม่พบแอลฟา- โทโคไตรอินอล สำหรับน้ำมันโซลิน 5 ตัวอย่าง มีปริมาณโครมานอลรวม เท่ากับ 375, 259, 375, 338 และ 287 mg/kg ตามลำดับ โดยพบแกมมา-โทโคเฟอรอล และพลาสโตโครมานอล-8 ในปริมาณสูง สำหรับน้ำมันถั่วเหลือง 4 ตัวอย่างนั้น มีปริมาณโครมานอล

Che Man และคณะ (2005) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-โทโคเฟอรอลในน้ำมันปาล์มโอเลอินที่ผ่านกระบวนการรีไฟน์ การฟอกสี และการกำจัดกลิ่นโดยวิธี 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 สำหรับทำนาย แอลฟา-โทโคเฟอรอลที่เกิดขึ้นโดยใช้ FTIR spectral ในช่วง 3100-2750 cm^{-1} วิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ FTIR ด้วยการเปรียบเทียบกับ HPLC ที่มีสัมประสิทธิ์ของการวิเคราะห์ (R^2) จากตัวอย่างสำหรับ calibration เท่ากับ 0.9922

Bonvehi และคณะ (2000) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลในน้ำมันพืช Formular preparations และ Biscuits โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลว เพื่อให้ได้วิธีการในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีที่มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีมาตรฐานคือการไฮโดรไลซิสด้วยด่าง (saponification) โดยทำการสกัดโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลจากน้ำมันพืชด้วยเฮกเซน และผ่านเข้าไปใน silica sep-pak และ μ -Bondapak C_{18} column mobile phase ที่ใช้คือ เมทานอลกับน้ำ (95:5, v/v) วิเคราะห์โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลที่ 292 nm และใช้ fluorescence detector (excitation 296 nm, และ emission 330 nm) พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ของกราฟมาตรฐานในช่วง 0.1-100 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าเท่ากับ 0.9995 ผลผลิตทั้งหมดของวิตามินอีทั้งโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลมีค่าเท่ากับ 93% โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผันสำหรับความแม่นยำในการ

2.4.8 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี

ความเข้มข้นของโทโคเฟอรอลเป็นปัจจัยที่สำคัญของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโทโคเฟอรอลในน้ำมันโดยทั่วไป กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีค่ามากที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำและมีค่าลดลงหรืออาจจะกลายเป็น prooxidant ที่ความเข้มข้นสูง ตัวอย่างเช่น แอลฟา-โทโคเฟอรอลสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างเหมาะสมที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-280 mg/kg ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมของแกมมา-โทโคเฟอรอลอยู่ระหว่าง 250-500 mg/kg และความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเดลตา-โทโคเฟอรอลอยู่ระหว่าง 500-1000 mg/kg ที่พบในน้ำมันถั่วเหลืองมีค่าระหว่าง 500-750 mg/kg และความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโทโคเฟอรอลนั้นขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในช่วงการศึกษาวิจัยและจุดสุดท้ายที่ถูกเลือกสำหรับวัดปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชัน (Evans และคณะ, 2002)

Bera และคณะ (2005) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติคือ สารสกัดจาก ajowan (*Carum copticum*) ต่อความคงตัวของน้ำมัน flax seed เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ คือ TBHQ, BHT และ EQ ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 100, 130, 160, 190 และ 220°C เป็นเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ทำการวัดปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันโดยการวัด peroxide value และวัด thiobarbituric acid (TBA) value โดยวัดปฏิกิริยาการเกิดสีของ thiobarbituric acid กับ malondialdehyde พบว่า TBHQ มีความคงตัวต่อความร้อนสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระประเภทอื่นๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบราคาของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์กับสารสกัดจาก ajowan สำหรับการใช้เป็นเครื่องเทศในการเตรียมอาหารแล้วสารสกัดจาก ajowan เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้มากกว่า

Kim (2005) ได้ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และแอนติออกซิแดนซ์แอคทีวิตีของวิตามินอีในรำข้าว โดยวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีต่ออนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ที่ความเข้มข้นของวิตามินในช่วง 2.5-640 mg/kg และศึกษาสมบัติความเป็นแอนติออกซิแดนซ์ โดยใช้ 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 นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นของวิตามินอี

Gulcin และคณะ (2003) ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activities) ของสารสกัดด้วยน้ำ และเอทานอลของเมล็ด anise (*Pimpinella anisum* L.)(PAS) โดยวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งสองแบบของ PAS นั้น ซึ่ง antioxidant ที่แตกต่างกันคือ reducing power, free radical scavenging, superoxide anion radical scavenging, hydrogen peroxide scavenging และ metal chelating activities พบว่าสารสกัดด้วยน้ำ และเอทานอลของเมล็ด anise ปริมาณ 20 ug/mL สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของกรดลิโนเลอิกได้ 99.1 และ 77.5% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลที่ความเข้มข้นร้อยละเท่ากัน (36.1%) เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่ได้แก่ butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ แอลฟา-โทโคเฟอรอล พบว่าสารสกัดจาก PAS ด้วยน้ำให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอล สำหรับกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์ใช้ disc diffusion methods ด้วย 10 microbial species

Yen และคณะ (2003) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตจาก rice koji (Ethyl Acetate Extracted Rice Koji : EAERK) ที่ถูกหมักด้วย *Aspergillus candidus* CCRC 31543 พบว่า EAERK 200 ug/kg สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของกรดลิโนเลอิกได้สูงถึง 90% โดยใช้ thiocyanate method และ EAERK ยังคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอย่างเด่นชัดบนปฏิกิริยาการเกิด oxidation ของ lard ที่วัดโดยใช้ rancimat method นอกจากนี้ EAERK ยังมีคุณสมบัติการจับอนุมูลอิสระ (scavenging activity) ที่แรงมากบน DPPH radical ส่วน silica gel column chromatography ได้ถูกใช้ในการแยก EAERK เป็น 8 ส่วน (A-H) โดยส่วน C-F ที่แยกได้จะมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของกรดลิโนเลอิกได้สูงมากกว่า 88% โดยส่วนของ C นำไปทำให้เป็นผลึกและทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งได้เป็นสารประกอบ 1 สำหรับ D-F นำมาผสมกัน และนำกลับไปแยกใหม่อีกครั้งโดยใช้ column chromatography โดยสิ่งที่แยกได้ พบว่ามีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่สูง จากนั้นนำไปทำให้เป็นผลึกและทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นได้เป็นสารประกอบ 2 จากนั้นนำสารประกอบ 1 และ 2 ไป

Evans และคณะ (2002) ได้ศึกษาความเข้มข้นของโทโคเฟอรอลที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้โทโคเฟอรอล (แอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล) และของผสมโทโคเฟอรอลธรรมชาติ (nature tocopherols mixture) น้ำมันถั่วเหลือง (อัตราส่วนของแอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล เท่ากับ 1:13:5 ตามลำดับ) จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับแอลฟา- และแกมมา-โทโคเฟอรอลในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันถั่วเหลือง คือ ประมาณ 100 และ 300 mg/kg ตามลำดับ ขณะที่เดลตา-โทโคเฟอรอลไม่สามารถแสดงค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในช่วงที่ศึกษา และสำหรับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับของผสมโทโคเฟอรอลธรรมชาติอยู่ในช่วงระหว่าง 340-660 mg/kg นอกจากนี้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโทโคเฟอรอลจะ diminished เมื่อระดับของโทโคเฟอรอลเกินความเข้มข้นที่เหมาะสมของโทโคเฟอรอลนั้นๆ และ ณ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของโทโคเฟอรอล และของผสมโทโคเฟอรอลธรรมชาติสามารถทำหน้าที่เป็น prooxidant ซึ่งมีค่าสูงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 40°C ถึง 60°C เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโทโคเฟอรอลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมของโทโคเฟอรอลชนิดนั้นพบว่า แอลฟา-โทโคเฟอรอล (~100 mg/kg) มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าแกมมา-โทโคเฟอรอล (~300 mg/kg) 3-5 เท่า และมากกว่า เดลตา-โทโคเฟอรอล (~1900 mg/kg) 16-32 เท่า

2.4.9 ความคงตัวของวิตามินอีระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษา (Vitamin E stability during processing and storage)

กระบวนการการผลิตอาหารสามารถทำให้ความคงตัวของวิตามินอีในอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง การใช้วิตามินในรูปแบบที่เสถียรเช่นในรูปแบบ encapsulated form นั้น สามารถรักษาความคงตัวของวิตามินเมื่ออยู่ในสภาวะการผลิต และการเก็บรักษาได้ ซึ่งความเสถียรของวิตามินอีนั้นขึ้นอยู่กับรูปแบบของวิตามินอี โดย DL- α -tocopheryl acetate มีความเสถียรมากที่สุด สำหรับวิตามินอีธรรมชาติที่อยู่ในรูปแบบแอลฟา-โทโคเฟอรอลนั้นจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอย่างช้าๆเมื่ออยู่ในสภาวะที่สัมผัสกับอากาศ แต่อย่างไรก็ตามวิตามินอีที่ถูกเติมในรูปแบบ α -tocopheryl acetate นั้นสามารถคงอยู่ได้ดีในแป้งสาลีที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 9% และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 45°C

ปัจจัยทางกายภาพ และทางเคมี ได้แก่ ความร้อน ความชื้น การสัมผัสกับอากาศหรือแสง และสภาวะที่เป็นกรดหรือด่าง ในระหว่างการผลิต การขนส่ง และการเก็บรักษา อาหารนั้นมีผลต่อความคงตัวของวิตามิน ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ความไวของวิตามินประเภทต่างๆ

ประเภทของวิตามิน	แสง	สารที่ทำให้เกิดการออกซิเดชัน	สารที่ทำให้เกิดการรีดักชัน	ความร้อน	ความชื้น	กรด	ด่าง
วิตามินเอ	+++	+++	+	++	+	++	+
วิตามินบี	+++	+++	+	++	+	++	++
วิตามินอี	++	++	+	++	+	+	++
วิตามินเค	+++	++	+	+	+	+	+++
วิตามินซี	+	+++	+	++	++	++	+++
โทอะมิน	++	+	+	+++	++	+	+++
ไรโบฟลาวิน	+++	+	++	+	+	+	+++
ไนอะซิน	+	+	++	+	+	+	+
วิตามินบี 6	++	+	+	+	+	++	++
วิตามินบี 12	++	+	+++	+	++	+++	+++
กรดแพนโทเทนิค	+	+	+	++	++	+++	+++
กรดโฟลิก	++	+++	+++	+	+	++	++
ไบโอติน	+	+	+	+	+	++	++

หมายเหตุ : + ไม่มีควมไว ++ มีความไว +++ มีความไวมาก

ที่มา : USAID (2007)

จากตารางที่ 12 พบว่า วิตามินอีมีความไวต่อแสง สารที่ทำให้เกิดการออกซิเดชัน ความร้อน และด่าง (Sarmiento และคณะ, 2006; USAID, 2007) และมีความไวน้อยมากหรือไม่มี

การใช้ไขมันบริโภคสำหรับการทอดทำให้เกิดการลดลงอย่างรวดเร็วของวิตามินอี ซึ่งโดยปกติแล้วไขมันบริโภคประกอบด้วย polyunsaturated fatty acid เมื่อนำไปใช้ในการทอดโดยสัมผัสกับอากาศนั้นจะทำให้วิตามินอีในน้ำมันเกิดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และสลายตัวในภายหลัง ไขมันบริโภคที่ผ่านกระบวนการรีไฟน์ทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของวิตามินอี แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันพืชหลังจากที่ผ่านกระบวนการรีไฟน์แล้วจะมีความคงตัวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่า เนื่องจากกระบวนการรีไฟน์ของน้ำมันนั้นจะกำจัดพวก pro-oxidants ออกไป ซึ่งวิตามินอีส่วนใหญ่จะเกิดการสูญเสียในขั้นตอนการกำจัดกลิ่น (deodorization) ของกระบวนการรีไฟน์ ดังนั้นวิธีสำหรับวิเคราะห์วิตามินอีต้องทำภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและ pro-oxidants เนื่องจากวิตามินอีไม่มีความคงตัวต่อปฏิกิริยาออกซิเจน และการเติมสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เข้าไปในสารตัวอย่างขณะทำการวิเคราะห์จะช่วยปกป้องวิตามินอีจากการสลายตัว เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ α -tocopheryl acetate และ α -tocopheryl succinate มีความคงตัวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันเนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-6 นั้น มีความสำคัญต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี (Eitenmiller และ Landen, 1999)

โทโคเฟอรอลสามารถถูกออกซิไดส์ได้ง่าย และเกิดการสลายตัวเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยความร้อน แสง ต่าง pH และอนุมูลอิสระ วิตามินอีสามารถถูกออกซิไดส์ได้ในระหว่างกระบวนการสกัด และ/หรือ ตั้งแต่กระบวนการสกัดจนถึงขั้นตอนการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้าย แต่อย่างไรก็ตามการเติมสารแอนติออกซิเดนต์ที่ไม่มีความจำเป็น ยกเว้นในกรณีของการวิเคราะห์โดยการทำให้ปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชัน นอกจากนี้ เนื่องจากคุณลักษณะเฉพาะของโทโคเฟอรอล และไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณโทโคเฟอรอลในตัวอย่างไม่ได้ภายในวันเดียวกัน ดังนั้นต้องมีการเก็บตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ในภายหลัง ความคงตัวของโทโคเฟอรอลสามารถวิเคราะห์ได้โดยการวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-โทโคเฟอรอลที่เก็บรักษาในตู้เย็น และใน dessicator ที่สภาวะไม่มีแสงเป็นระยะเวลา 12 อาทิตย์ พบว่าปริมาณแอลฟา-โทโคเฟอรอลที่เก็บรักษาไว้ใน

2.4.9.1 ความคงตัวต่อความร้อน (Thermal stability) ของวิตามินอี

Nystrom และคณะ (2007) ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ steryl ferulates กับ โทโคเฟอรอล ที่อุณหภูมิสูง โดยวัดความสามารถของ sitostanyl ferulate, แอลฟา-โทโคเฟอรอล และของผสมของสารทั้งสองต่อการป้องกันการเกิดปฏิกิริยา polymerization ของกรดโอเลอิกของน้ำมันดอกทานตะวันที่อุณหภูมิ 100 และ 180°C โดยนำสารตัวอย่างมาให้ความร้อนในตู้อบลมร้อนที่มีการป้องกันแสงที่อุณหภูมิ 100°C สารตัวอย่างจะถูกให้ความร้อนเป็นเวลา 0, 24, 72 และ 96 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 180°C สารตัวอย่างจะถูกให้ความร้อนเป็นเวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นลงใน desiccator และละลายด้วยเฮกเซน 10 mL และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ โดยแต่ละการทดลองจะทำซ้ำ 3 ซ้ำ พบว่าการเกิดพอลิเมอร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิทั้งสอง และสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ทั้งสองชนิด นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันโดยใช้ Normal phase HPLC พบว่า sitostanyl ferulate มีความเข้มข้นลดลงในอัตราที่ต่ำกว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอล แสดงว่า sitostanyl ferulate สามารถใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง

Rossi และคณะ (2007) ได้ศึกษาความคงตัวของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลรวมในระหว่างกระบวนการทอดมันฝรั่งแบบจุ่มลงในน้ำมันพืชที่มีอุณหภูมิในการทอดอยู่ในช่วง 150-200°C พบว่าความคงตัวของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลในรูปแบบต่างๆ ที่แตกต่างกันที่พบในน้ำมันพืชที่ผ่านการรีไฟน์นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ปัจจัย คือ องค์ประกอบของกรดไขมันอิสระในน้ำมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และชนิดของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลที่พบในน้ำมันแต่ละประเภท โดยในน้ำมันที่ถูกออกซิไดส์ได้มากกว่านั้น โทโคเฟอรอล มีความคงตัวมากกว่า และในบรรดารูปแบบต่างๆ ของโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลนั้น พบว่า แกมมา-โทโคไตรอินอลในน้ำมันปาล์มซูเปอร์โอเลอีนมีความคงตัวในระหว่างกระบวนการทอดน้อยที่สุด ส่งผลให้สามารถรักษาโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอินอลในรูปแบบอื่นๆ ไว้ได้

Park และคณะ (2004) ศึกษาความคงตัวของโทโคเฟอรอลและโทโคไตรอินอล ที่สกัดจากส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของรำข้าว ภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยนำส่วนที่ซาฟอนิไฟด์ไม่ได้ของรำข้าวปริมาณ 1 mL เติลงใน vial ขนาด 1.5 mL และปิดฝาให้แน่น โดยการอัดแก๊สนำไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วย

Rattanathanalerk และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของกระบวนการให้ความร้อนที่มีผลต่อการสูญเสียคุณภาพของน้ำสับประรดโดยใช้ตัวบ่งชี้ 3 อย่าง คือ namely colorimetric hunter parameter (L,a,b และ ΔE), hydroxymethylfurfural (HMF) และการเกิดสีน้ำตาล (brown pigment formation) การตรวจวัดค่าการสูญเสียคุณภาพของน้ำสับประรดโดยนำน้ำสับประรด 8 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองปิดสนิท นำไปวางในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 55, 65, 75, 85 และ 95°C นาน 80 นาที โดยวัดอุณหภูมิที่จุดกึ่งกลางของน้ำสับประรดภายในหลอดทดลองด้วย thermocouple type T ที่มีค่าความแม่นยำอยู่ที่ $\pm 1^\circ\text{C}$ ค่าการเปลี่ยนแปลงของ a และ b จะได้จากจลศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง ในขณะที่ ΔE มีค่าพอดีกับโมเดลผสมซึ่งอธิบายทั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่ใช้เอนไซม์ และการลดลงของรงควัตถุแคโรทีนอยด์สำหรับ HMF และการเกิดสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างเป็นเส้นตรงกับระยะเวลาของการให้ความร้อน ซึ่งสามารถอธิบายด้วยจลศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ จากผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิในกระบวนการให้ความร้อนมีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงสีของน้ำสับประรด อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Santos และคณะ (2002) ศึกษาความคงตัวต่อความร้อน และ kinetic thermal decomposition ของน้ำมันบริโภค โดย non-isothermal thermogravimetryl derivative thermogravimetry (TG/DTG) Kenetic parameters คำนวณโดย intergral และ approximation methods พบว่า Parameter ต่างๆ ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของไขมันซึ่งถูกรบกวนโดยสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติและสังเคราะห์ สำหรับ Thermogravimetric curves พบว่า ลำดับความคงตัวต่อความร้อนของน้ำมันบริโภคต่างๆจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ คือ น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวันผสมน้ำมันมะกอก น้ำมันคาโนลา และน้ำมันมะกอก ตามลำดับ ขณะที่ค่า

ตามลำดับ

Julio และคณะ (2000) ศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ได้แก่ butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), tertiary butylhydroxyquinone (TBHQ) และ ethoxyquin (EQ) ในการผลิตภัณฑ์แปรรูปให้สุก (viscera, blood และ feathers) ในอุตสาหกรรมอาหารเป็ดไก่ โดยนำสารต้านอนุมูลอิสระมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100-200°C เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง และวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหลังจากการให้ความร้อนด้วย Rancimat test ด้วยการวัดการเปลี่ยนแปลงของช่วงเวลาของการเกิดออกซิเดชันของน้ำมัน sardine และเปรียบเทียบกลไกการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันที่ไม่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ oxidation kinetics of the oil without added antioxidants พบว่า BHT และ TBHQ ถูกยับยั้งแอกติวิตีเท่ากับ 25-30% ที่อุณหภูมิ 175°C ขณะที่ BHA และ EQ ถูกยับยั้งแอกติวิตีเท่ากับ 70 และ 60% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 150°C โดยเวลาในการให้ความร้อน (1 และ 2 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิต่างๆไม่ได้เปลี่ยนแปลงผลของการวัดสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants assayed) อย่างมีนัยสำคัญ EQ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นำไปใช้มากที่สุดในการป้องกัน Oxidative rancidity ในการผลิตอาหารเป็ดไก่ปรุงสุกให้กับอุตสาหกรรมเป็ดไก่