รายงานการวิจัย

การศึกษาองค์ประกอบไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

(Identification of Phytosterols in Young Coconut Juice by High Performance Liquid Chromatography)

จัดทำโดย

ดร. ฐิติมา รุจิราลัย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

ได้รับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินกองทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์
ประเภทพัฒนานักวิจัย ปีงบประมาณ 2551

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง การศึกษาองค์ประกอบไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อนโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Identification of Phytosterols in Young Coconut Juice by High Performance Liquid Chromatography) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินกองทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ประเภทพัฒนานักวิจัย ปีงบประมาณ 2551 ดังนั้นผู้วิจัยจึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

และขอขอบคุณ

- ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ สารเคมีและอุปกรณ์การทำวิจัย
- สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพมหานคร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์
- ผศ.คร กานดา ปานทอง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือระเหยสารให้แห้งและคำแนะนำในการเตรียมสารเคมี
- คุณสุจิตรา แก้วสระ ที่ให้ความแนะนำ ความรู้ในการใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีชนิดที่มียูวี/วิสิเบิลเป็นตัวตรวจวัด
- คุณประพาส ชัยเทพ ที่ให้ความช่วยเหลือในการดูแลและซ่อมเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีชนิดที่มียูวี/วิสิเบิลเป็นตัวตรวจวัด
- ลูกศิษย์ นางสาว นฤมล สิตะรุโณ ที่ทุ่มเทช่วยเหลือในงานวิจัยนี้
- เจ้าหน้าที่ทุกคนในภาควิชา ที่ให้ความอนุเคราะห์ ความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

บทคัดย่อ

ได้ทำการพัฒนาการวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอล ได้แก่ คอเลสเทอรอล สทิกมาสเทอรอล แคมเพสเทอรอล และสิโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อนด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอะเรย์ วิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำมะพร้าวอ่อนอาศัยการสกัดแบบของเหลว-ของเหลว โดยใช้เฮกเซนและไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายในการสกัดไฟโทสเทอรอลทั้งในส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่เป็นอนุภาค สภาวะที่เหมาะสมของการแยกไฟโทสเทอรอลด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี จะใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 99:1 โดยปริมาตรและอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ประสิทธิภาพของการสกัดไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอยู่ในเกณฑ์ดีโดยให้ร้อยละของการได้กลับคืนมากกว่า 78

วิธีการที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอลในช่วงความเข้มข้น 2.5-30.0 พีพีเอ็มโดยให้ความเป็นเส้นตรงมากกว่า 0.9970 และให้ LOD และ LOQ อยู่ในช่วง 1.9-5.6 และ 6.4-18.6 พีพีเอ็ม ตามลำดับ และพบว่า สิโทสเทอรอลสามารถตรวจพบได้เกือบทุกตัวอย่างที่ศึกษา และปริมาณไฟโทสเทอรอลที่ตรวจพบในส่วนที่เป็นของเหลวจะมีความเข้มข้นตั้งแต่ไม่สามารถตรวจวัดได้จนถึง 59.3 พีพีเอ็ม และในส่วนที่เป็นอนุภาคจะมีความเข้มข้นตั้งแต่ไม่สามารถตรวจพบได้จนถึง 60.5 พีพีเอ็ม งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า น้ำมะพร้าวอ่อนจัดเป็นแหล่งอาหารที่มีไฟโทสเทอรอล ซึ่งมีคุณค่าต่อการบริโภค

Abstract

Analysis of phytosterols, namely, cholesterol, stigmasterol, campesterol and sitosterol, in young coconut juice was developed by high performance liquid chromatography with diode array detection. Both dissolved and particulate associated phytosterols in young coconut juice were liquid-liquid extracted with hexane and dichloromethane. Methanol and water in the ratio of 90 and 1 (v/v) was used as the mobile phase, with the flow rate of 1 mL min^{-1}, for liquid chromatography system. The recoveries of phytosterols were over 78%.

The calibration curve for each of the interested phytosterols were in the range of from 2.5 to 30.0 ppm, giving r^2 values of >0.9970. The limit of detection (LOD, S/N = 3) and the limit of quantification (LOQ, S/N = 10) were found to be in the range 1.9-5.6 and 6.4-18.6 ppm, respectively. Analyses revealed varying concentrations of phytosterols, with sitosterol being the dominant. Concentrations of phytosterols ranged from undetectable to 59.3 ppm in the dissolved fraction and from undetectable to 60.5 ppm in the particulate fraction. This study proves that young coconut juice is a good source of phytosterols for humans.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
สัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
1.2 บททบทวนเอกสารวิชาการ	2
1.2.1 ไฟโทสเทอรอล	2
1.2.1.1 โครงสร้างของไฟโทสเทอรอล	2
1.2.1.2 แหล่งของไฟโทสเทอรอล	2
1.2.1.3 ประโยชน์ของไฟโทสเทอรอล	3
1.2.1.4 การวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอล	4
1.2.2 มะพร้าว	5
1.2.2.1 ลักษณะทั่วไปของมะพร้าว	5
1.2.2.2 พันธุ์มะพร้าว	6
1.2.2.3 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมะพร้าว	7
1.2.2.4 ประโยชน์ของน้ำมะพร้าว	7
1.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
1.3 วัตถุประสงค์	12
1.4 ขอบเขตการวิจัย	12
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	12
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	13
2.1 วัสดุและสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ	13
2.1.1 วัสดุและสารเคมี	13
2.1.2 อุปกรณ์	14
2.1.3 เครื่องมือ	14

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไฟโทสเทอรอล	14
2.3 การเก็บตัวอย่างน้ำมะพร้าวอ่อน	15
2.4 การศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน	15
2.5 การศึกษาการแยกไฟโทสเทอรอลด้วยเครื่อง HPLC-DAD	16
2.5.1 การศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม	16
2.5.2 การศึกษาอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม	16
2.6 การสกัดน้ำมะพร้าวอ่อน	17
2.7 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์	18
2.8 การทำอนุพันธ์ (Derivatisation)	18
2.9 สภาวะของเครื่องมือที่ใช้	18
บทที่ 3 ผลการทดลองและอธิบายผลการทดลอง	20
3.1 ผลการศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน	20
3.2 ผลการศึกษาการแยกไฟโทสเทอรอลด้วยเครื่อง HPLC-DAD	20
3.2.1 ผลของอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม	20
3.2.2 ผลของอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่	21
3.3 ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์	25
3.4 ปริมาณของไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน	26
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ	29
4.1 สรุปผลการทดลอง	29
4.2 ข้อเสนอแนะและเรื่องที่ควรทำวิจัยต่อไป	29
บทที่ 5 เอกสารอ้างอิง	30

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1.1 ความเข้มข้นของไฟโทสเทอรอลในอาหาร (Verger and Leblanc, 2003)	4
ตารางที่ 1.2 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมะพร้าว	8
ตารางที่ 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	13
ตารางที่ 3.1 ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์	25
ตารางที่ 3.2 ร้อยละของการได้กลับคืน	25
ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นของไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน	28

สารบัญภาพ

เรื่อง		หน้า
รูปที่ 1.1	โครงสร้างพื้นฐานของสเทอรอล	2
รูปที่ 1.2	โครงสร้างของไฟโทสเทอรอลบางตัว	3
รูปที่ 3.1	โครมาแกรมของสารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอลความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เมทานอลและน้ำอัตราส่วน (ก) 90:10 และ (ข) 99:1 โดยปริมาตร	22
รูปที่ 3.2	Partial โครมาแกรมของการสารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอล ความเข้มข้น 8 พีพีเอ็มเมื่อใช้อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เมทานอลและน้ำ (ก) 1.0 (ข) 1.2 และ (ค) 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที	23
รูปที่ 3.3	ผลของอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ต่อ (ก) ความสมมาตรของพีค (ข) capacity factor และ (ค) พื้นที่พีค ในการแยกสารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอลความเข้มข้น 8 พีพีเอ็ม	24
รูปที่ 3.4	Partial โครมาแกรมของ (ก) สารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอล ความเข้มข้น 6 พีพีเอ็ม (ข) ไฟโทสเทอรอลส่วนที่เป็นของเหลวในน้ำมะพร้าวอ่อนกระป๋อง 1 และ (ค) ไฟโทสเทอรอลส่วนที่เป็นอนุภาคในน้ำมะพร้าวอ่อนกระป๋อง 2	27

สัญลักษณ์และคำย่อ

BSTFA	*N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
DAD	Diode array detector
FID	Flame ionization detector
GC	Gas chromatography
GC/MS	Gas chromatography with mass spectrometry
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC/DAD	High performance liquid chromatography with diode array detection
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MS	Mass spectrometry
ND	Undetectable
n	Number
r^2	Correlation coefficient
SD	Standard deviation
S/N	Signal to noise ratio
TLC	Thin layer chromatography
พีพีเอ็ม	หน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ไฟโทสเทอรอล (Phytosterol) เป็นกลุ่มของสารประกอบสเทอรอยด์ที่พบในพืช เช่น น้ำมันพืช (Vegetable oils) ถั่ว (Nuts) และเมล็ดพืช (Seeds) มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับคอเลสเทอรอล (Cholesterol) ชนิดที่พบมาก ได้แก่ เบตา-สิโทสเทอรอล (β-Sitosterol) แคมเพสเทอรอล (Campesterol) และสทิกมาสเทอรอล (Stigmasterol) (Ostlund Jr., 2002) แต่ละชนิดก็จะใช้เป็น chemical fingerprint ในการบอกที่มาของผลิตภัณฑ์อาหารได้ ไฟโทสเทอรอลในอาหารสามารถจำแนกได้ 4 กลุ่ม คือ free sterols, esterified sterols, glycosides และ acylated glycosides (Phillips *et al.*, 2002) อาหารที่เป็นแหล่งของไฟโทสเทอรอลมากที่สุดคือ น้ำมันพืช โดยเฉพาะ rice bran oil ซึ่งพบมากถึง 1190 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของ edible portion รองลงมาเช่น น้ำมันข้าวโพด น้ำมันงา (Sesame oil) น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะกอก (Olive oil) พบในปริมาณน้อยกว่าในถั่ว ขนมปัง และพืช เช่น มันฝรั่ง ผักกาดแก้ว (Abidi, 2001; Ostlund Jr., 2002)

ไฟโทสเทอรอลสามารถลดระดับคอเลสเทอรอลในซีรั่มหรือพลาสมา (Serum or plasma total cholesterol; Ling and Jones, 1995) ซึ่งอาจจะมีส่วนช่วยยับยั้งการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือด (Coronary heart disease) หรือป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ (Colon cancer; Awad and Fink, 2000) นอกจากนั้นมีการตรวจพบสารสิโทสเทอรอล เป็นองค์ประกอบในน้ำมะพร้าวอ่อน และมีคุณสมบัติทางชีววิทยาคล้ายกับฮอร์โมนเพศ โดยสามารถทำให้น้ำหนักมดลูกของหนูที่ยังเติบโตไม่เต็มที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Punghmatharith, 1988) รวมทั้งมีการคาดว่า ไฟโทสเทอรอลและสารอื่นที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนเพศในน้ำมะพร้าวอ่อนมีส่วนทำให้แผลของหนูหายเร็วขึ้น (Radenahmad *et al.*, 2006) ค่าปริมาณการบริโภคไฟโทสเทอรอลมาตรฐานที่กำหนดโดย U.S. National Cholesterol Education Program ซึ่งมีผลช่วยลดระดับคอเลสเทอรอลในซีรั่มอยู่ที่ 2 กรัมต่อวัน (Ostlund Jr., 2002) อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่า เมื่อให้หนูได้รับสารสิโทสเทอรอลที่ระดับ 0.5-5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ทำให้อสุจิและน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของหนูลดลงโดยสัมพันธ์แบบ time-dependent manner (Ling and Jones, 1995)

มีการศึกษาไฟโทสเทอรอลในถั่ว เมล็ดพืช น้ำผลไม้ น้ำมันพืชต่าง ๆ รวมทั้ง fatty foods เช่น baking fats, coconut fat, cooking fat และ margarine เป็นต้น (Abidi, 2001; Kalo and Kuuranne, 2001; Phillips *et al.*, 2002; Normén *et al.*, 2007) ซึ่งส่วนใหญ่ไม่มีการรายงานชนิดของไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน มีเพียงรายงานเดียวที่พบสิโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน

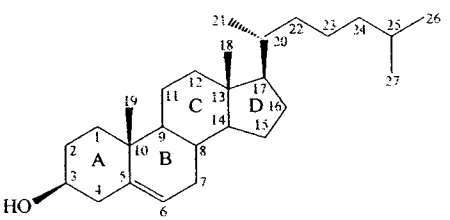
(Punghmatharith, 1988) และเนื่องจากการดื่มน้ำมะพร้าวอ่อนเป็นที่นิยมในหมู่คนไทย ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาว่า ในน้ำมะพร้าวอ่อนมีส่วนประกอบไฟโทสเทอรอลที่สำคัญชนิดใดบ้าง

1.2 บททบทวนเอกสารวิชาการ

1.2.1 ไฟโทสเทอรอล

1.2.1.1 โครงสร้างของไฟโทสเทอรอล

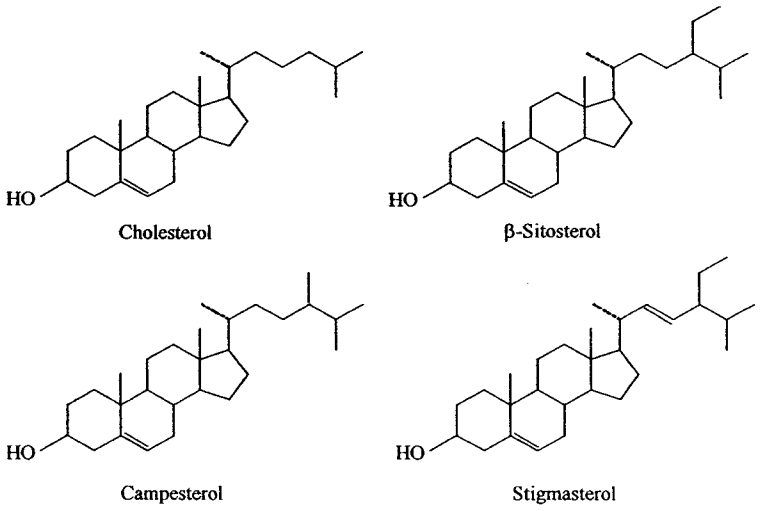
สเทอรอล (Sterols) ในพืช หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ไฟโทสเทอรอล จัดเป็นสารกลุ่มไฟโตฮอร์โมนซึ่งมีมากในพืชและน้ำมันพืช ไฟโทสเทอรอลมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น 1,2-cyclopentanophenanthrene ซึ่งมีวงแหวน 4 วง (A, B, C, D) ดังแสดงในรูปที่ 1.1 มีคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 เป็นพันธะคู่และมีสายโซ่ (Side chain) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 (C-17) มีหมู่เมธิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 18 และ 19 (C-18, C-19) และมีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) สเทอรอลที่พบมากในพืช คือ สิโทสเทอรอล และสทิกมาสเทอรอล แต่คอเลสเทอรอลซึ่งพบน้อยในพืชก็จัดเป็นไฟโทสเทอรอลที่สำคัญที่สุด โครงสร้างไฟโทสเทอรอลที่สำคัญแสดงในรูปที่ 1.2 ส่วนสเทอรอลที่พบมากในยีสต์และรา (Fungus) คือ เออโกสเทอรอล (Ergosterol) (Parish *et al.*, 2008) และโครงสร้างที่คล้ายกับสเทอรอลแต่เป็น Δ-5 double bond ซึ่งทำให้ตำแหน่งของไฮโดรเจนเป็น 5-α ก็เรียกว่าสารกลุ่มสแทนอล (Stanol)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างพื้นฐานของสเทอรอล

1.2.1.2 แหล่งของไฟโทสเทอรอล

ไฟโทสเทอรอลจัดเป็นกลุ่มสเทอรอลที่ได้จากสารสกัดที่เป็นไขมันที่ละลายในเมมเบรนของพืช (Fat-soluble membrane extracts) หรือสาหร่าย ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์ได้ในร่างกายคน ดังนั้นจึงพบมากในพืช น้ำมันพืชและไม้ (Wood) ไฟโทสเทอรอลในอาหารสามารถจำแนกได้ 4 กลุ่ม คือ free sterols, esterified sterols, glycosides และ acylated glycosides (Phillips *et al.*, 2002)



รูปที่ 1.2 โครงสร้างของไฟโทสเทอรอลบางตัว

และไฟโทสเทอรอลที่พบมากในธรรมชาติและอาหาร (Diet) ของคน ได้แก่ สิโทสเทอรอล สทิก-มาสเทอรอล แคมเพสเทอรอล และไดไฮโดรบลาซิแคสเทอรอล (Dihydrobrassicasterol) (Ostlund Jr., 2002; Verger and Leblanc, 2003) ความเข้มข้นของไฟโทสเทอรอลที่เจอในอาหารและอาหารที่มีการเติมไฟโทสเทอรอล (Fortified food) แสดงในตารางที่ 1.1 ซึ่งพบมากในน้ำมันที่กินได้ (Edible oils) spreads และ margarines

1.2.1.3 ประโยชน์ของไฟโทสเทอรอล

ไฟโทสเทอรอลในอาหารเป็นสารธรรมชาติที่ช่วยลดคอเลสเทอรอลในซีรั่มหรือพลาสมา (Ling and Jones, 1995) หรือมีส่วนช่วยยับยั้งการเกิดโรคหัวใจหลอดเลือดหรือป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ได้ (Awad and Fink, 2000) นอกจากนั้นสิโทสเทอรอลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมะพร้าวอ่อนและมีสมบัติคล้ายกับฮอร์โมนเพศ ทำให้น้ำหนักมดลูกของหนูที่ยังเติบโตไม่เต็มที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Punghmatharith, 1988) รวมทั้งมีการคาดว่า ไฟโทสเทอรอลและสารอื่นที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนเพศในน้ำมะพร้าวอ่อนช่วยทำให้แผลของหนูหายเร็วขึ้น (Radenahmad *et al.*, 2006) ไฟโทสเทอรอลจะถูกดูดซับในร่างกายคนได้ไม่ดี ซึ่งประมาณได้ว่า สิโทสเทอรอล 5% และแคมเพสเทอรอล 15% เท่านั้นที่ร่างกายจะนำไปใช้ได้ (Verger and Leblanc, 2003) จึงมีการรณรงค์ให้มีการเติมไฟโทสเทอรอลในอาหารเพิ่มขึ้น ค่าปริมาณการบริโภคไฟโทสเทอรอลมาตรฐานที่กำหนดโดย U.S. National Cholesterol Education Program อยู่ที่ 2-3 กรัมต่อวัน ซึ่งมีผลช่วยลดระดับคอเลสเทอรอลรวมและชนิด LDL ในซีรั่มได้ถึง 10 และ 20% ตามลำดับ (Ostlund Jr., 2002; Verger and Leblanc, 2003) อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่า เมื่อให้หนูได้รับสารสิโทสเทอรอล

ตารางที่ 1.1 ความเข้มข้นของไฟโทสเทอรอลในอาหาร (Verger and Leblanc, 2003)

ชนิดของอาหาร	ความเข้มข้นเฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	ความเข้มข้นสูงสุด (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)
น้ำมันที่กินได้ (Edible oils)	500 (n = 56)	5400
พืช (Vegetables)	20 (n = 51)	200
ผลไม้	15 (n = 22)	60
ซีเรียล (Cereals)	250 (n = 9)	1325
Pulses	100 (n = 10)	220
Spreads และ margarines	8000	8000
ขนมปังชิ้นเล็ก (Biscuits)	2300	2300
นม	320	320
โยเกิรต์ (Yogurt)	570	570
เนย (Cheese)	1600	1600
ขนมปัง (Bread)	1300	1300
ซีเรียลอาหารเช้า (Breakfast cereals)	1600	1600

n เป็นจำนวนตัวอย่าง

ที่ระดับ 0.5-5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน มีผลทำให้อสุจิและน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของหนูลดลงโดยสัมพันธ์แบบ time-dependent manner (Ling and Jones, 1995)

1.2.1.4 การวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอล (Parish *et al.*, 2008)

1) การสกัดไฟโทสเทอรอล

วิธีการสกัดไฟโทสเทอรอลขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างและรูปของไฟโทสเทอรอลที่ต้องการในสารสกัด ซึ่งมีอยู่ถึง 4 รูป คือ free sterols, esterified sterols, glycosides และ acylated glycosides การเตรียมตัวอย่างการสกัดไฟโทสเทอรอลมีหลายวิธี เช่น การทำให้แห้ง (Drying) การทำให้อยู่ในรูปผงละเอียด (Powdering) หรือการแช่แข็งตัวอย่าง (Freezing) แล้วทำให้อยู่ในรูปของแข็งอยู่ในรูปผงละเอียด ส่วนตัวทำละลายที่นิยมในการสกัด เช่น ตัวทำละลายผสมคลอโรฟอร์มและเมทานอล หรือตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทนและอะซิโตน เวลาที่ใช้ในการสกัดขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด ซึ่งหากเป็นวิธีการอย่างง่ายที่ใช้ในการเติมตัวทำละลายผสมดังกล่าว อาจใช้เวลาสั้นประมาณครึ่งชั่วโมงหรือหนึ่งชั่วโมง แล้วทำการแยกชั้นตัวทำละลายโดยการหมุนเหวี่ยง

หรือใช้วิธีการสกัดแบบรีฟลักซ์ในชุดสกัดแบบ Soxhlet เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ้าต้องการที่สกัดเพื่อให้ได้ total lipid ก็ทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชัน (Sponification) ในสภาวะเบส เช่น 10 % โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอล หรือสภาวะกรดก่อนที่จะสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยทั่วไปแล้วความผิดพลาดของขั้นตอนการสกัดไฟโทสเทอรอลจะส่งผลต่อการวิเคราะห์ในตัวอย่าง ดังนั้นหากมีการเติมไฟโทสเทอรอลที่มีไอโซโทปปนอยู่ด้วย เช่น ดิวเทอเรียมหรือคาร์บอน 14 ในการสกัดก็จะทำให้ลดความผิดพลาดได้

2) วิธีการแยกและการตรวจวัดไฟโทสเทอรอล

วิธีการแยกนิยมใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี ซึ่งอาจใช้เป็นแบบคอลัมน์ขนาดใหญ่ (Preparative column) ที่มีเฟสอยู่กับที่ ได้แก่ซิลิกาเจลหรืออะลูมินาออกไซด์ หรือเป็นแบบรีเวอร์สเฟสที่ใช้ lipophilic dextran เช่น Sephadex LH-20 หรือ Lipidex 5000 เป็นเฟสอยู่กับที่ หรือเฟสอยู่กับที่แบบผสมระหว่างสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดและซิลิกาเจลหรืออะลูมินาออกไซด์ ซึ่งเรียกว่า argentation stationary phase ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะ (Elution) ขึ้นอยู่กับเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งถ้าเป็นแบบรีเวอร์สเฟสนิยมใช้ตัวทำละลายผสมเมทานอลและเฮกเซน หลังจากทำการชะสารออกจากคอลัมน์ก็ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC) หรือธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography, TLC) นอกจากนั้นการแยกอาจใช้แบบคอลัมน์ขนาดเล็ก (Analytical column) ซึ่งมีลักษณะเป็นคาพิลลารีที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กมาก และยาวถึง 60 เมตรในการแยกและนิยมใช้ในเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีตัวตรวจวัดชนิดต่าง ๆ เช่น เฟลมไอออไนเซชั่น (Flame ionization detector, FID) หรือแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer, MS) หรือเป็นคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 0.45 มิลลิเมตรและยาวถึงประมาณ 25 เซนติเมตร ซึ่งนิยมใช้ในเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid chromatography, LC) ซึ่งมีตัวตรวจวัดชนิดยูวี-วิสิเบิล (UV-Vis variable wavelength detector) หรือแมสสเปกโตรมิเตอร์

1.2.2 มะพร้าว

1.2.2.1 ลักษณะทั่วไปของมะพร้าว (กลุ่มเกษตรสัญจรและภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์และศูนย์สมุนไพรทักษิณ)

มะพร้าวจัดอยู่ในพืชตระกูลปาล์ม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cocos nucifera* Linn. ซึ่งอาจมีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่บริเวณแหลมมลายูจนถึงปาปัวนิวกินี ในปัจจุบันการปลูกมะพร้าวเพื่อการค้าจะนิยมปลูกในประเทศริมฝั่งทะเลในแถบเอเชียและหมู่เกาะต่าง ๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิก มะพร้าวมีชื่อเรียกหลายชื่อตามถิ่นที่ปลูก เช่น ดุง (จันทบุรี) โพล (กาญจนบุรี) คอส่า (แม่ฮ่องสอน) หมากอุ๋น หมากอูน (ทั่วไป)

มะพร้าวเป็นไม้ยืนต้นที่มีลำต้นสูงตั้งแต่ 3-25 เมตรซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ต้นเตี้ยหรือต้นสูง ลำต้นเป็นปล้อง ไม่มีกิ่งก้าน ซึ่งในช่วงแรกลำต้นจะเติบโตในทางกว้างหรือหนาจนได้ขนาดแล้ว ขยายทางความสูง ตาที่เจริญเป็นยอดมะพร้าวมีเพียงตาเดียวเฉพาะที่ยอด ดังนั้นหากตานี้ตายหรือยอดถูกทำลาย ก็แสดงว่า มะพร้าวนั้นจะต้องตายไปด้วยนั่นเอง ต้นมะพร้าวแต่ละต้นมีรากอยู่ประมาณ 2,000 ถึง 3,000 เส้น มีใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยเรียงสลับเป็นรูปขนนก เป็นแผ่นแคบยาว ปลายใบแหลม ผิวใบเรียบเป็นมันสีเขียวยาวประมาณ 50-100 เซนติเมตรและกว้างประมาณ 2.5 เซนติเมตร และแต่ละต้นจะมีดอกเป็นช่อ ออกบริเวณกาบที่หุ้มดอกฝอย มีขนาดเล็ก กลีบดอก 6 กลีบ ดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่บนช่อดอกหรือจั่นเดียวกัน ซึ่งดอกตัวผู้อยู่ที่ปลายช่อ ส่วนดอกตัวเมียอยู่ที่โคนช่อ การผสมพันธุ์ของมะพร้าวในจั่นเดียวกันจะไม่ค่อยมี ดังนั้นจึงมีการผสมข้ามต้นเป็นส่วนมาก ยกเว้นมะพร้าวต้นเตี้ยที่มีดอกตัวเมียจะบานขณะที่ดอกตัวผู้ยังโรยไม่หมด จึงมีโอกาสผสมภายในต้นเดียวหรือผสมตัวเองได้ ผลเป็นทรงกลม เปลือกนอกเรียบ กาบหนา ซึ่งผลที่แก่จะมีสีเขียว และเป็นสีน้ำตาลเทาเมื่อสุก เปลือกชั้นกลางมีเส้นใย ส่วนชั้นในแข็ง มีเนื้อผลสีขาวและมีน้ำใส

1.2.2.2 พันธุ์มะพร้าว (กลุ่มเกษตรสัญจร)

มะพร้าวถูกแบ่งเป็นพันธุ์ใหญ่ ๆ ได้ 2 พันธุ์ตามการเจริญเติบโตของลำต้น อายุที่เริ่มให้ผลการบานของดอก ดังนี้

1. มะพร้าวพันธุ์ต้นสูง

เป็นมะพร้าวที่ปลูกกันเป็นส่วนใหญ่เพื่อขายผลแก่หรือทำเป็นมะพร้าวแห้ง มีลักษณะลำต้นขนาดใหญ่สูง มีทางยาว มีอายุให้ผลถึง 70-90 ปี ระยะที่ให้ผลประมาณ 5 ปีหลังปลูก ผลจะมีขนาดต่าง ๆ กัน ลักษณะเด่นของมะพร้าวพันธุ์ต้นสูง คือ ดอกตัวผู้และตัวเมียบานไม่พร้อมกัน ทำให้มีการผสมแบบข้ามต้น จึงเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย มีหลายพันธุ์ เช่น มะพร้าวกะโหลก มะพร้าวใหญ่ มะพร้าวกลาง มะพร้าวปากจก มะพร้าวทะลายร้อย มะพร้าวเปลือกหวาน มะพร้าวน้ำตาล มะพร้าวกะทิ และมะแพร้ว

2. มะพร้าวพันธุ์ต้นเตี้ย

เป็นมะพร้าวพันธุ์ที่มีต้นเล็ก มีทางสั้น และต้นโตเต็มที่สูงไม่เกิน 12 เมตร ให้ผลค่อนข้างดกแต่จะมีขนาดเล็ก และตกผลเร็วกว่าพันธุ์ต้นสูง คือประมาณ 3-4 ปีหลังปลูก มีอายุให้ผลประมาณ 35-40 ปี พันธุ์ต้นเตี้ยจะมีดอกตัวผู้และตัวเมียบานในระยะเวลาเดียวกัน จึงเกิดการผสมภายในต้นเดียวกันได้มาก มีหลายพันธุ์เช่น มะพร้าวนกคุ่ม มะพร้าวน้ำหอม และมะพร้าวหมูสี ได้แก่ หมูสีเหลืองหรือมะพร้าวนาพิกา หมูสีเขียวทุ่งเคล็ด หมูสีเขียวปะทิว หมูสีแดง

ในส่วนของมะพร้าวน้ำหอมนั้น นิยมปลูกเป็นพืชการค้า ซึ่งเป็นที่นิยมของคนไทยและต่างประเทศ เนื่องจากความหอมหวานของน้ำมะพร้าว หากมีอายุ 6-7 ปีก็จะให้ผลที่ดกเต็มที่สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดได้แก่

- ชนิดผลยาวหรือผลเล็ก มีขนาดค่อนข้างเล็ก แต่ยาวรี ผลภายในหัวแหลมท้ายแหลม ทรงผลไม่สวยงาม
- ชนิดผลกลม มีขนาดผลใหญ่ที่สุดทั้งขนาดภายนอกและภายใน มะพร้าวชนิดนี้มีผลกลมและเปลือกบางกว่าชนิดอื่น
- ชนิดผลก้นจีบ มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างชนิดผลยาวกับผลกลม และมีขนาดผลใหญ่พอสมควร ถึงขนาดผลไม่ใหญ่เท่าชนิดผลกลม

1.2.2.3 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวประกอบด้วยสารหลายกลุ่ม เช่น น้ำตาล เกลือแร่ ไฟเบอร์ กรดอะมิโน วิตามิน กรดไขมันต่าง ๆ และสารที่ระเหยได้ในกลุ่มไฮโดรคาร์บอนและอนุพันธ์ของสารหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1.2 นอกจากนี้น้ำมะพร้าวมีสารในกลุ่มไฟโตฮอร์โมนที่ช่วยทำให้เซลล์พืชเจริญเติบโตได้ คือ สารในกลุ่มไซโตคินิน (Cytokinins) และกิบเบอเลลริน (Gibberellins) และมีสารที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนเอสทราไดออล (17β-Estradiol) อิสโทรน (Estrone) และสิโทสเทอรอล (Punthmatharith, 1988)

1.2.2.4 ประโยชน์ของน้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าว จัดเป็นเครื่องดื่มเกลือแร่จากธรรมชาติ มีรสหวาน ช่วยบำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย ทำให้จิตใจสดใส และบำรุงครรภ์ (ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์และศูนย์สมุนไพรทักษิณ) ใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพ (Biocatalyst) ในปฏิกิริยารีดักชันและไฮโดรไลซิส (Fonseca *et al.*, 2008) นอกจากนั้นทำให้หนู (Rat) ที่ได้รับน้ำมะพร้าวมีน้ำหนักมดลูกเพิ่มขึ้นและช่วยสมานแผลทำให้แผลของหนูหายเร็วขึ้นกว่าปกติ (Punthmatharith, 1988; Radenahmad *et al.*, 2006) ซึ่งการดื่มน้ำมะพร้าวทุกวันจะช่วยลดอาการอัลไซเมอร์หรือความจำเสื่อมในสตรีวัยทอง เนื่องจากมีฮอร์โมนคล้ายฮอร์โมนเพศหญิงหรือเอสโตรเจนสูง (Radenahmad *et al.*, 2006)

ตารางที่ 1.2 องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมะพร้าว

กลุ่มสาร	ชนิดสาร	เอกสารอ้างอิง
น้ำตาล	Glucose, sucrose, fructose	Santoso *et al.* (1996)
เกลือแร่	Ca, Mg, K, Na, P, S, Mn, Fe, Zn, Cu, B, Al	Santoso *et al.* (1996)
กรดอะมิโน	Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, C-C, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, His, Lys, Arg	Santoso *et al.* (1996)
วิตามิน	Vitamin B1, vitamin B2, vitamin C, vitamin E	
สารที่ระเหยได้	Dodecane, tetradecane, pentadecane, hexadecane, methyl tetrahydrofuran, hydroxypentanone, tridecanone, tetradecanone, hexadecanone, isoamynalcohol, hexanol, nerolidol, farnesol, phenyl ethyl alcohol, hexanoic acid, nonanoic acid, dodecanoic acid, tetradecanoic acid, palmitoleic acid, palmitic acid, ethyl lactate, ethyl caprylate, ethyl caprate, ethyl dodecanoate, tartaric acid, citric acid, malic acid, acetic acid,	Borse *et al.* (2007), Santoso *et al.* (1996)
ไซโตคินิน (Cytokinins)	Isopentenyladenine, dihydrozeatin, kinetin, kinetin riboside, *trans*-zeatin, *trans*-zeatin riboside, *trans*-zeatin-*O*-glucoside, dihydrozeatin-*O*-glucoside, *o*-topolin, *trans*-zeatin-riboside-5′-monophosphate	Ge *et al.* (2006), Ge *et al.* (2006)
กิบเบอเลลริน (Gibberellins)	Gibberellin A1, Gibberellin A3,	Ge *et al.* (2008)
ไฟโทฮอร์โมนอื่น ๆ (Phytohormone)	Abscisic acid, indole-3-acetic acid, glycitein, biochanin A, secoisolariciresinol, matairesinol,	Ma *et al.* (2008), Kuhnle *et al.* (2009)

1.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอลในอาหารแต่ละชนิด แต่มีเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอล ได้แก่ แก๊สโครมาโทกราฟีและลิควิดโครมาโทกราฟี

Phillips และคณะ (1999) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไฟโทสเทอรอลและกรดไขมัน (Fatty acid) ในอาหาร (Diet samples) ไฟโทสเทอรอลที่ศึกษาได้แก่ สิโทสเทอรอล แคมเพสเทอรอล สทิกมาสเทอรอล สิโทสแทนอล (Sitostanol) แคมเพสแทนอล (Campestanol) เอแวเนสเทอรอล (Avenasterol) และบลาซิแคสเทอรอล (Brassicasterol) วิธีการเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายผสมของคลอโรฟอร์ม เมทานอลและน้ำ หลังจากนั้นทำการระเหยสารสกัดให้แห้ง แล้วนำไปทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันด้วยสารละลายผสมของโพแทสเซียมไฮดรอก

ไซด์และไพโรการอล (Pyrogallol) ในเอทานอลที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันซึ่งมีไฟโทสเทอรอลเป็นส่วนประกอบนำไปสกัดด้วยไซโคลเอกเซน และนำไปทำอนุพันธ์ด้วย *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) สารสกัดที่ได้ทั้งหมดนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ผลการทดลองพบว่า diet sample ประกอบด้วยสิโทสเทอรอล แคมเพสเทอรอล สทิกมาสเทอรอลเป็นส่วนใหญ่ และปริมาณของสเทอรอลทั้งหมด (Total sterols) มีค่าลดลงตามปริมาณของไขมันอิ่มตัว (Saturated fat) ที่เพิ่มขึ้นและมีค่าเพิ่มตามปริมาณของไขมันชนิด Polyunsaturated fat ที่เพิ่มขึ้นด้วย

Parceria และคณะ (2000) ทำการศึกษาไตรกลีเซอไรด์ โทโคฟีรอล (Tocopherol) และ-สทอรอลในน้ำมันจาก hazel nut, olive oil และส่วนผสมน้ำมันของ hazel nut และ olive oil วิธีการเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการเติมน้ำมันประมาณ 200 มิลลิกรัมด้วยไพโรการอลในเอทานอลและสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ตามลำดับ เพื่อทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายไปสกัดด้วยไซโคลเฮกเซนและน้ำ นำชั้นของไซโคลเฮกเซนไปทำอนุพันธ์ด้วยสารละลายผสมของ BSTFA-trimethylsilychlorosilane-trimethylsilylimidazole (3:2:3 โดยปริมาตร) สารอนุพันธ์นี้นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID และ GC-MS ผลทดลองพบว่า สิโทสเทอรอลและเอแวเนสเทอรอล เป็นส่วนประกอบหลักและแคมเพสเทอรอลและสทิกมาสเทอรอลเป็นองค์ประกอบรองในตัวอย่างทุกชนิด และโอปทุสิโฟลิออล (Obtusifoliol) เป็นสเทอรอลที่พบเฉพาะใน olive oil และส่วนผสมน้ำมันของ hazel nut และ olive oil

Laaksо (2005) ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สัดส่วนของสแทนอล (Stanols)/สเทอรอลในตัวอย่างประเภท sterol enriched food หรือ stanyl/steryl fatty acid ester enriched food ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่างอาศัยการทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัดสารละลายด้วยเฮปเทนและน้ำ แยกชั้นเฮปเทนออกจากชั้นน้ำและสกัดชั้นน้ำอีกครั้งด้วยเฮปเทน นำชั้นของเฮปเทนมารวมกันแล้วนำไปทำอนุพันธ์ด้วย BSTFA ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในส่วนของตัวอย่างที่เป็นพวก stanyl fatty acid ester จะมีการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริกในเอทานอลที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที แล้วสกัดชั้น lipid ด้วยตัวทำละลายผสมไดเอธิลอีเทอร์และปิโตรเลียมอีเทอร์ สกัดชั้นน้ำอีกสองครั้งด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ นำสารสกัดด้วยตัวทำละลายมารวมกันแล้วนำไปทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันต่อไปอีกครั้ง วิเคราะห์สารสกัดที่ทำอนุพันธ์แล้วด้วยเครื่อง GC-FID ผลการทดลองพบว่า ปริมาณสแทนอล/สเทอรอลขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารซึ่งอยู่ในช่วง 0.3-8 เปอร์เซ็นต์

Han และคณะ (2008) ทำการวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอลและไฟโทสแทนอล ได้แก่ สิโท-สเทอรอล แคมเพสเทอรอล สทิกมาสเทอรอล สิโทสแทนอลและแคมเพสแทนอลในพืช 34 ชนิด

และผลไม้ 33 ชนิด ด้วยเทคนิค GC วิธีการเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการนำตัวอย่างมาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมในเอทานอล 6 โมลาร์ เป็นเวลา40 นาที แล้วเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันเป็นเวลา 30 นาที ทำการสกัด lipid ด้วยคลอโรฟอร์ม สารสกัดที่ได้นำไปทำอนุพันธ์ด้วย BSTFA ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นระเหยสารสกัดที่ทำอนุพันธ์แล้วด้วยแก๊สไนโตรเจนและเติมคลอโคฟอร์มก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ผลการทดลองพบว่า ปริมาณสเทอรอลทั้งหมดในพืชมีอยู่ในช่วง 1.1-53.7 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งพบมากในถั่ว กะหล่ำดอก บลอกโคลี่ ผักกาดขาว (Romaine lettuce) และในผลไม้มีอยู่ในช่วง 1.6-32.6 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งพบมากในส้มไร้เมล็ด (Navel orange) ส้ม Tangerine และมะม่วง

Careri และคณะ (2001) ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สิโทสเทอรอลและสทิกมาสเทอรอลในน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งมีการเตรียมตัวอย่าง คือ นำน้ำมันถั่วเหลือง 200 มิลลิกรัมไปเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลเพื่อทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส แป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการสกัด lipid ด้วยเอธิลอะซิเตตและน้ำ สกัดชั้นน้ำอีก 3 ครั้งด้วยไดเอธิลอีเทอร์ สารสกัดด้วยตัวทำละลายนำไป clean up ด้วยซิลิกาเจลก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High performance liquid chromatography, HPLC) ที่มียูวี-วิสิเบิลและ MS เป็นตัวตรวจวัด และมีการใช้อะซิโตไนไตรล์และน้ำ ในอัตราส่วน 86 ต่อ 14 โดยปริมาตร เป็นเฟสเคลื่อนที่ ผลการทดลองพบว่า ร้อยละของการได้กลับคืนมาของสิโทสเทอรอลและสทิกมาสเทอรอลเท่ากับ 101 ± 9 และ 106 ± 7 ตามลำดับ และตรวจพบสิโทสเทอรอลและสทิกมาสเทอรอลเท่ากับ 61 ± 5 และ 118 ± 4 มิลลิกรัมในน้ำมันถั่วเหลือง 100 กรัม

López Ortíz และคณะ (2006) ทำการวิเคราะห์สิโทสเทอรอลและโทโคฟีรอลพร้อมกันในน้ำมันพืชตระกูลโอลีฟและถั่วหลายชนิด เช่น Almond, Hazelnut และ Walnut ด้วยเทคนิค HPLC วิธีสกัดน้ำมันมีสองวิธี คือ การกดด้วยความดันที่อุณหภูมิห้อง (Pressing) และการรีฟลักซ์ (Refluxing) ด้วยเฮกเซน ซึ่งวิธีการรีฟลักซ์ให้ร้อยละการได้กลับคืนมาดีกว่าวิธีการกด วิธีการเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการนำน้ำมัน 0.2-0.3 กรัมมาเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์และกรดแอสคอบิกเพื่อทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที ทำการกรองและสกัดด้วยโซเดียมคลอไรด์ เฮกเซนและ BHT (Butylated hydroxytoluene) นำสารสกัดไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งมีการใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตไนไตรล์และน้ำในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 โดยปริมาตร และมีตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอะเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ ผลการวิเคราะห์พบปริมาณสิโทสเทอรอลในน้ำมันโอลีฟและถั่วอยู่ในช่วง 81-184 และ 52-249 มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม ตามลำดับและปริมาณโทโคฟีรอลในน้ำมันโอลีฟและถั่วอยู่ในช่วงตั้งแต่ปริมาณที่ตรวจไม่พบจนถึง 44.9 มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม

Cañabate-Díaz และคณะ (2007) ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอลได้แก่ คอเลสเทอรอล สทิกมาสเทอรอล สิโทสเทอรอล สิโทสแทนอล ฟิวโคสเทอรอล (Fucosterol) อิริทโทรไดออล (Erythrodiol) และอูวาออล (Uvaol) ใน virgin olive oil, refined olive oil, olive-pomace oil และ crude olive-pomace oil ด้วยเทคนิค HPLC/MS ซึ่งมีการใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตไนไตรล์และน้ำที่มีกรดอะซิติก 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนแบบเกรเดียน (Gradient elution) มีการเตรียมตัวอย่างโดยนำ olive oil หนัก 5 กรัมไปทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมน้ำลงไปในสารละลายแล้วสกัดด้วยไดเอธิลอีเทอร์ นำสารสกัดไประเหยให้แห้งแล้วเติมคลอโรฟอร์มลงไปเพื่อที่จะนำไป clean up ด้วยเทคนิค TLC ที่มีซิลิกาเป็นเฟสอยู่กับที่ ซึ่งสามารถแยกแถบสเทอรอลออกจากส่วนประกอบอื่น ๆ ได้ หลังจากนั้นแถบสเทอรอลไปสกัดด้วยเมทานอลก่อนที่จะวิเคราะห์ด้วย HPLC/MS ผลการทดลองพบว่า ขีดจำกัดต่ำสุด (Detection limit) ของสเทอรอลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีค่าอยู่ในช่วง 123-677 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 4-5.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของสิโทสเทอรอลที่วิเคราะห์ได้มีค่ามากที่สุดในทุกตัวอย่างซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 667-2972 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Lu และคณะ (2007) พัฒนาวิธีการแยกและวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอล 7 ชนิดเช่น คอเลสเทอรอล สทิกมาสเทอรอล สิโทสเทอรอล เป็นต้น และไฟโทสแทนอล 2 ชนิด คือ คอเลสแทนอล และสทิกมาสแทนอลในอาหารเช่น ข้าวโพด งา ข้าวโอ๊ต และถั่ว มีการสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค supercritical carbon dioxide fluid extraction และนำสารสกัดไปเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอลเพื่อทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากนั้นเติมน้ำลงไปในสารละลายแล้วสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ นำสารสกัดไประเหยให้แห้งแล้วเติมตัวทำละลายผสมเฮกเซนและเอธิลอะซิเตดลงไปเพื่อที่จะนำไป clean up ด้วยเทคนิคการสกัดแบบของแข็ง (Solid phase extraction) สารสกัดนี้นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC/MS ซึ่งมีการใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและน้ำที่มีอะซิโตไนไตรล์ 1 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนแบบเกรเดียน ผลการทดลองพบว่า ขีดจำกัดของปริมาณต่ำสุด (Limit of quantification) ของสเทอรอลและสแทนอลมีค่าอยู่ในช่วง 0.0076-0.3674 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 5-6 เปอร์เซนต์ และร้อยละของการได้กลับคืนมาอยู่ในช่วง 94-107

ข้อดีของเทคนิค LC คือ สามารถใช้สภาวะของคอลัมน์ที่อุณหภูมิต่ำกว่าเทคนิค GC และไม่ทำลายสารตัวอย่าง (Abidi, 2001; Lagarda *et al.*, 2006) มีเพียงรายงานเดียวที่ใช้ TLC ในการแยกสารที่อยู่ในสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อน (Punghmatharith, 1988) ซึ่งเทคนิคนี้มีข้อเสียคือประสิทธิภาพในการแยกสารน้อยกว่าเทคนิค LC (Abidi, 2001) ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะพัฒนาการวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อนด้วยเทคนิค HPLC

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเตรียมตัวอย่างของน้ำมะพร้าวอ่อน
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อนโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์-ลิควิดโครมาโทกราฟี

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาการเตรียมตัวอย่างน้ำมะพร้าวอ่อน โดยเลือกใช้วิธีการสกัดแบบของเหลวในขั้นต้น ซึ่งจะใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว ๆ ต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน ส่วนผสมระหว่างเฮกเซนและไดคลอโรบิวเทน ไดคลอโรบิวเทน และบิวทานอล จะศึกษาความสำคัญของส่วนที่เป็นของเหลวและที่เป็นอนุภาคของน้ำมะพร้าวอ่อน จะใช้ SPE และศึกษาวิธีการกำจัดสารอื่นที่ไม่ใช่สารไฟโทสเทอรอล
2. ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อนโดยวิธีไฮ-เพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี โดยใช้สารสังเคราะห์และศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม อัตราเร็วที่เหมาะสมของการแยกสาร รวมทั้งทำกราฟคาลิเบรชัน ศึกษาสภาพไวความถูกต้องและความแม่นยำ
3. วิเคราะห์ส่วนประกอบไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อนโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด-โครมาโทกราฟีร่วมกับแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมตรี เพื่อให้ได้ความถูกต้องของการวิเคราะห์มากขึ้น

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นพื้นฐานการวิจัยสำหรับการวิเคราะห์และหาปริมาณไฟโทสเทอรอลโดยวิธีไฮเพอร์-ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี
2. เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้า อ้างอิงสำหรับนักศึกษา เภสัชกร นักเคมี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุและสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

2.1.1 วัสดุและสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อสารเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
เฮกเซน (Hexane)	Analytical Reagent	Merck	Germany
ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)	Analytical Reagent	LAB-SCAN	Bangkok
เมทานอล (Methanol)	Analytical Reagent	LAB-SCAN	Bangkok
บิวทานอล (*n*-Butanol)	Analytical Reagent	LAB-SCAN	Bangkok
คลอโรฟอร์ม (Chloroform)	Analytical Reagent	LAB-SCAN	Bangkok
โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate anhydrous)	Analytical Reagent	Fisher Scientific	UK
เอทานอล (Ethanol)	Analytical Reagent	BAKER	USA
อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)	HPLC	BAKER	USA
เมทานอล	HPLC	BAKER	USA
สิโทสเทอรอล (β-sitosterol; purity 65%)	Analytical Reagent	Sigma-Aldrich	Germany
คอเลสเทอรอล (Cholesterol; purity 95%)	Analytical Reagent	Sigma-Aldrich	Germany
สทิกมาสเทอรอล (Stigmasterol; purity 65%)	Analytical Reagent	Sigma-Aldrich	Germany
คอเลสเทน (Cholestane; purity 95%)	Analytical Reagent	Sigma-Aldrich	Germany
N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroaceta-mide (BSTFA plus 1% trimethylchlorosiloxane)	Analytical Reagent	Sigma-Aldrich	Germany
แก๊สไนโตรเจน (99.99% Purity)			

2.1.2 อุปกรณ์

1) ขวดบรรจุสาร (Vial)
2) บีกเกอร์
3) หลอดหยด
4) กรวยแยก
5) ขาตั้ง (Stand)
6) ปิเปต
7) ช้อนตักสาร
8) ขวดวัดปริมาตร
9) ขวดก้นกลม
10) เข็มสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC ขนาด 20 ไมโครลิตร
11) ไมโครปิเปตขนาด 100 และ 1000 ไมโครลิตร

2.1.3 เครื่องมือ

1) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น Mixer UZUSIO VTX-3000L
2) ชุดกรองเฟสเคลื่อนที่สำหรับ HPLC ประกอบด้วย กรวย (Funnel) ที่จับกรวย (Clamp) ที่ใส่แผ่นกรองชนิดไนลอนเมมเบรน (Nylon membrane filter) แผ่นกรองชนิดไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน และภาชนะบรรจุสารละลาย (Vacuum flask) และปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
3) เครื่องระเหยสารให้แห้ง (Rotary evaporator) รุ่น Buchi Rotavapor R-200
4) เครื่องให้ความร้อน (Block heater) รุ่น FDB03DD (UK)
5) อ่างน้ำอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) รุ่น AS7240AT (China)
6) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น MTTLER AE 200

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไฟโทสเทอรอล

เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานไฟโทสเทอรอลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการชั่งสาร 1.5 มิลลิกรัมแล้วละลายด้วยเมทานอล 3 มิลลิลิตร ส่วนสารละลายมาตรฐานไฟโทสเทอรอลผสมที่ความเข้มข้น 2.5, 4, 6, 10 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำได้โดยการปิเปต stock solution ด้วยปริมาตรที่เหมาะสมแล้วเจือจางด้วยเมทานอลให้มีปริมาตรตามที่ต้องการ

2.3 การเก็บตัวอย่างน้ำมะพร้าวอ่อน

เก็บมะพร้าวอ่อนอายุ 3 เดือน จากสวนมะพร้าวอ่อน ตำบลทุ่งงาย อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ในพื้นที่ 100 ตารางวา ในช่วงกรกฎาคม หลังจากที่เก็บแล้วให้แยกน้ำมะพร้าวอ่อนและเนื้อโดยเทน้ำมะพร้าวอ่อนใส่ในขวดก้นแบนขนาด 1 ลิตร และนำน้ำมะพร้าวอ่อนไปแช่ในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) เพื่อทำการสกัดในช่วง 1-2 วันหลังจากเก็บเพื่อป้องกันการสลายตัวของไฟโทสเทอรอล ส่วนน้ำมะพร้าวอ่อนกระป๋องเก็บจากห้างสรรพสินค้าในหาดใหญ่

2.4 การศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน

1) กรองน้ำมะพร้าวอ่อนทั้งลูกแบบสุญญากาศ ครั้งละ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ตัวกรองชนิด glass microfibre เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 45 มิลลิเมตร (GF/C Whatman, UK) ซึ่งจะได้ส่วนที่เป็นของเหลว (Filtrate) และส่วนที่เป็นอนุภาค (Particulates) ซึ่งประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กที่อยู่ในน้ำมะพร้าวและเนื้อมะพร้าวบางส่วน ให้แยกส่วนของเนื้อมะพร้าวออกจากอนุภาคขนาดเล็กโดยใช้คีบขนาดเล็ก
2) ทำการสกัดส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่เป็นอนุภาคดังนี้

ก. ส่วนที่เป็นของเหลว

1) สกัดด้วยเฮกเซน 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งให้ใส่สารสกัดในขวดก้นกลมใบที่ 1
2) สกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งให้ใส่สารสกัดในขวดก้นกลมใบที่ 2
3) สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งให้ใส่สารสกัดในขวดก้นกลมใบที่ 3
4) สกัดด้วยบิวทานอล 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งให้ใส่สารสกัดในขวดก้นกลมใบที่ 4
5) ระเหยสารสกัดในขวดก้นกลมแต่ละใบให้เหลือปริมาตรน้อยที่สุดด้วยเครื่องระเหยสารให้แห้ง
6) เติมโซเดียมซัลเฟตลงไปในขวดก้นกลมแต่ละใบ เพื่อกำจัดความชื้น แล้วดูดสารละลายในขวดก้นกลมแต่ละใบใส่ในขวดก้นกลมใบใหม่ แล้วระเหยต่อให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสารให้แห้ง
7) เติมเมทานอลลงในสารสกัดที่แห้ง ก่อนการวิเคราะห์โดยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์

ข. ส่วนที่เป็นอนุภาค

1) สกัดด้วยเฮกเซน 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งให้ใส่สารสกัดในขวดก้นกลมใบที่ 1
2) สกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งให้ใส่สารสกัดในขวดก้นกลมใบที่ 2
3) สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งให้ใส่สารสกัดในขวดก้นกลมใบที่ 3
4) สกัดด้วยบิวทานอล 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งให้ใส่สารสกัดในขวดก้นกลมใบที่ 4
5) ระเหยสารสกัดในขวดก้นกลมแต่ละใบให้เหลือปริมาตรน้อยที่สุดด้วยเครื่องระเหยสารให้แห้ง
6) เติมโซเดียมซัลเฟตลงไปในขวดก้นกลมแต่ละใบ เพื่อกำจัดความชื้น แล้วดูดสารละลายในขวดก้นกลมแต่ละใบใส่ในขวดก้นกลมใบใหม่ แล้วระเหยต่อให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสารให้แห้ง
7) เติมเมทานอลลงในสารสกัดที่แห้ง ก่อนการวิเคราะห์โดยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์

2.5 การศึกษาการแยกไฟโทสเทอรอลด้วยเครื่อง HPLC-DAD

2.5.1 การศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและน้ำ ได้แก่ 90:10 และ 99:1 โดยปริมาตร โดยใช้สารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอลที่ความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเปรียบเทียบพื้นที่พีคของสารแต่ละตัวในเฟสเคลื่อนที่แต่ละอัตราส่วน

2.5.2 การศึกษาอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 99:1 โดยปริมาตร ได้แก่ 1.0, 1.2 และ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยการใช้สารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอลที่ความเข้มข้น 8 พีพีเอ็ม และเปรียบเทียบพื้นที่พีคของสารแต่ละตัวในแต่ละอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่

2.6 การสกัดน้ำมะพร้าวอ่อน

1) ทำการกรองเช่นเดียวกับข้อ 2.4

2) ทำการสกัดส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่เป็นอนุภาคดังนี้

ก. ส่วนที่เป็นของเหลว

1) สกัดด้วยเฮกเซน 100 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง ใส่สารสกัดในขวดก้นกลม

2) สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งให้ใส่สารสกัดในขวดก้นกลมใบเดิม

3) ระเหยสารสกัดในขวดก้นกลมให้เหลือปริมาตรน้อยที่สุดด้วยเครื่องระเหยสารให้แห้ง

4) เติมโซเดียมซัลเฟตลงไปในขวดก้นกลม เพื่อกำจัดความชื้นแล้วดูดสารละลายในขวดก้นกลมใส่ในขวดก้นกลมใบใหม่ แล้วระเหยต่อให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสารให้แห้ง

5) เติมเมทานอลลงในสารสกัดที่แห้ง แล้วนำไปวางไว้ในอ่างน้ำอัลตราโซนิกเป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography-Diode array detector (HPLC-DAD)

ข. ส่วนที่เป็นอนุภาค

1) สกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง ใส่สารสกัดในขวดก้นกลม

2) สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งให้ใส่สารสกัดในขวดก้นกลมใบเดิม

3) ระเหยสารสกัดในขวดก้นกลมให้เหลือปริมาตรน้อยที่สุดด้วยเครื่องระเหยสารให้แห้ง

4) เติมโซเดียมซัลเฟตลงไปในขวดก้นกลม เพื่อกำจัดความชื้นแล้วดูดสารละลายในขวดก้นกลมใส่ในขวดก้นกลมใบใหม่ แล้วระเหยต่อให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสารให้แห้ง

5) เติมเมทานอลลงในสารสกัดที่แห้ง แล้วนำไปวางไว้ในอ่างน้ำอัลตราโซนิกเป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-DAD

2.7 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 และการสกัดจาก 2.6

2.7.1 กราฟคาลิเบรชัน (Calibration graph) โดยการใช้สารมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 2.5, 4.0, 6.0, 10.0 และ 30.0 พีพีเอ็ม

2.7.2 ความเข้มข้นต่ำสุดที่จะตรวจวัดได้ คำนวณทั้งในกรณี Limit of Detection (LOD, S/N = 3) และ Limit of Quantification (LOQ, S/N = 10) (Miller and Miller, 1993)

2.7.3 ร้อยละของการได้กลับคืน (Percentage of recovery) ดังนี้

1) ทำการกรองเช่นเดียวกับข้อ 2.4

2) เติมสารมาตรฐานผสมก่อนการสกัดส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่เป็นอนุภาค แล้วทำการสกัดเช่นเดียวกับข้อ 2.6 ซึ่งหลังจากสกัดแล้วสารมาตรฐานผสมมีความเข้มข้น 5 และ 20 พีพีเอ็ม

2.8 การทำอนุพันธ์ (Derivatisation)

เป็นการทำอนุพันธ์ไฟโทสเทอรอลเพื่อใช้ในการตรวจวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS) โดยดัดแปลงจาก Han *et al.* (2008) ซึ่งมีขั้นตอนอย่างย่อ คือ

1. ระเหยสารสกัดไฟโทสเทอรอล 50 ไมโครลิตรให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
2. เติม BSTFA 50 ไมโครลิตรลงไปในสารสกัดที่แห้ง เพื่อทำอนุพันธ์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที
3. ระเหยสารสกัดที่ทำอนุพันธ์แล้วด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
4. เติมคลอโรฟอร์ม 50 ไมโครลิตรลงไปในสารสกัดที่ทำอนุพันธ์ที่แห้งก่อนที่จะวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

2.9 สภาวะของเครื่องมือที่ใช้

ก. High-performance liquid chromatography-Diode array detector (HPLC-DAD)

1) เครื่อง HPLC-DAD (ยี่ห้อ Agilent series 1200)

- คอลัมน์ : Zorbex C_{18} (4.6 x 150 mm x 5 µm)
- ปริมาตรที่ฉีด : 20 มิลลิลิตร
- เฟสเคลื่อนที่ : เมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 99 ต่อ 1 โดยปริมาตร

- อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- อุณหภูมิของคอลัมน์ : 29 องศาเซลเซียส
- ความยาวคลื่นของไฟโทสเทอรอล : 208 นาโนเมตร
- เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ : 18 นาที

ข. Gas chromatograph-Mass selective detector (GC-MS)

1) เครื่อง GC (ยี่ห้อ HEWLETT PACKARD รุ่น 5900 Series 2)

- คอลัมน์ : DB1 (30 m x 0.32 mm i.d. x 0.1 μm film thickness, 100% dimethylpolysiloxane phase, Agilent G&W)
- แก๊สตัวพา : ฮีเลียม
- อัตราการไหลของแก๊สตัวพา : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- การตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ : เริ่มต้นที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 10 องศาเซลเซียสต่อนาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 280 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 3 องศาเซลเซียสต่อนาที
- Inlet mode : Splitless
- ปริมาตรที่ฉีด : 2 ไมโครลิตร

2) MS (ยี่ห้อ HEWLETT PACKARD รุ่น 5972)

- Ionisation : EI (Electron Impact) 70 eV
- Interface and source temperature heater : 305 และ 250 องศาเซลเซียส
- Data acquisition : Chemstation software
- Full scan mode : *m/z* 35-500
- Selected ion monitoring (SIM) mode :

  คอเลสเทน : *m/z* 149, 167 (Internal standard); คอเลสเทอรอล : *m/z* 329, 353, 368; แคมเพสเทอรอล : *m/z* 343, 367, 382; สทิกมาสเทอรอล : *m/z* 355, 379, 394; สิโทสเทอรอล : *m/z* 357, 381, 396

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

บทที่ 3
ผลการทดลองและอธิบายผลการทดลอง

3.1 ผลการศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน

การสกัดไฟโทสเทอรอลที่สนใจในน้ำมะพร้าวอ่อนได้แก่ คอเลสเทอรอล แคมเพสเทอรอล สทิกมาสเทอรอลและสิโทสเทอรอล อาศัยการสกัดแบบของเหลว-ของเหลว (Liquid-liquid extraction) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายโดยตัวทำละลายที่เลือกใช้พิจารณาจากความเป็นขั้วของตัวทำละลายและไฟโทสเทอรอล โดยตัวทำละลายที่เลือกใช้ ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอล มีความเป็นขั้วเป็น 0.0, 3.1, 4.0 ตามลำดับ (Sadex, 1996) และเมื่อใช้วิธีการสกัดแบบของเหลว-ของเหลวจะได้ไฟโทสเทอรอลในส่วนที่เป็นของเหลว (Filtrate) และส่วนที่เป็นอนุภาค (Particulates) ซึ่งยังไม่มีรายงานวิจัยใดที่ศึกษาไฟโทสเทอรอลในส่วนที่เป็นอนุภาคด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิค-วิดโครมาโทกราฟี จากการศึกษาเบื้องต้นในการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดไฟโทสเทอรอลด้วยแมสสเปกโตรเมตรี พบว่า เฮกเซน ตัวทำละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน และไดคลอโรมีเทนสามารถสกัดสิโทสเทอรอลและคอเลสเทอรอลได้ โดยสิโทสเทอรอลในส่วนที่เป็นของเหลวเมื่อใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนและไดคลอโรมีเทนจะให้ความเข้ม (Intensity) ของแมสสเปกตรัมเทียบกับความเข้มแมสสเปกตรัมทั้งหมดเท่ากับ 2.07, 0.24 และ 1.1% ตามลำดับ และสิโทสเทอรอลในส่วนที่เป็นอนุภาคเมื่อใช้ตัวทำละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนและไดคลอโรมีเทนจะให้ความเข้มของแมสสเปกตรัมเท่ากับ 0.74 และ 0.86% ตามลำดับ นอกจากนั้นคอเลสเทอรอลในส่วนที่เป็นของเหลวเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนมีความเข้มเท่ากับ 0.81% ดังนั้นเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนจึงใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน

3.2 ผลการศึกษาการแยกไฟโทสเทอรอลด้วยเครื่อง HPLC-DAD

ได้ทำการศึกษาการแยกไฟโทสเทอรอลทั้งสี่ชนิดด้วยเครื่อง HPLC-DAD โดยมีตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่และอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่

3.2.1 ผลของอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่นิยมในการศึกษาไฟโทสเทอรอลในน้ำมันพืช และอาหาร คือ อะซิโตไนไตรล์ และเมทานอล (Careri *et al.*, 2001; López Ortíz *et al.*, 2006; Cañabate-Díaz *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2007) จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เมื่อใช้ทั้งอะซิโตไนไตรล์และเมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ก็ไม่สามารถแยกแคมเพสเทอรอลและสทิกมาสเทอรอลออกจากกันได้ ซึ่งอาจเกิดจากผลโครงสร้างของสทิกมาสเทอรอลที่เป็นพันธะคู่และมีหมู่เมธิลตรงสายโซ่ทำให้สมบัติความเป็นขั้ว

และการละลายน้ำของสทิกมาสเทอรอลมีค่าใกล้เคียงกับแคมเพสเทอรอล จึงทำให้ไม่สามารถแยกสารทั้งสองตัวออกจากกันได้ด้วยเทคนิค HPLC (Abidi, 2004) และเมื่อพิจารณาเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ พบว่า อะซิโตไนไตรล์ทำให้การวิเคราะห์นานกว่าเมทานอลที่อัตราการเร็วของเฟสเคลื่อนที่เดียวกัน และในปัจจุบันอะซิโตไนไตรล์มีราคาแพงขึ้นมากเท่าตัวเมื่อเปรียบเทียบกับเมทานอล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาการแยกไฟโทสเทอรอลโดยใช้เมทานอลและน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ในระบบรีเวอร์สเฟสลิควิดโครมาโทกราฟี (Reversed phase liquid chromatography) ซึ่งนิยมใช้ในการแยกไฟโทสเทอรอลในอาหาร (Warner and Mounts, 1990; Lu *et al.*, 2007)

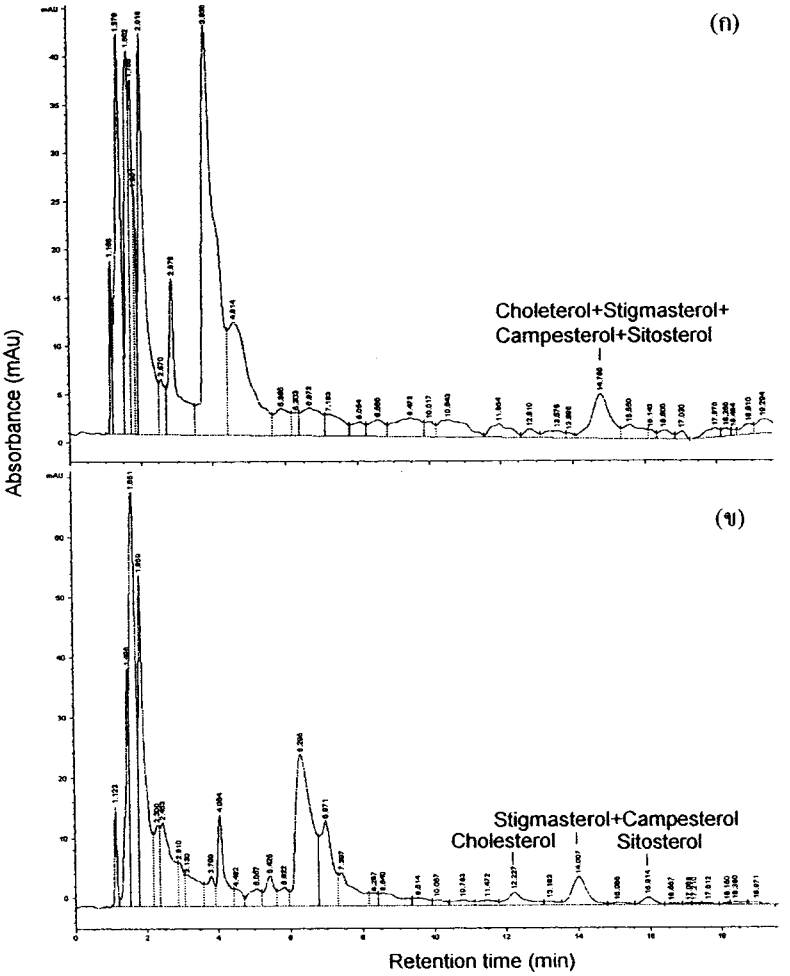
เมื่อทำการศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เมทานอลและน้ำสองอัตราส่วน คือ 90:10 และ 99:1 โดยปริมาตร พบว่า เมื่อใช้เมทานอลเป็น 90% ไม่สามารถแยกไฟโทสเทอรอลแต่ละตัวได้ แต่เมื่อมีปริมาณเมทานอลมากถึง 99% ก็สามารถแยกไฟโทสเทอรอลได้ดีขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ดังนั้นเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วน 99:1 โดยปริมาตร จึงเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่จะใช้ในศึกษาไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน

เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะการแยกของไฟโทสเทอรอลด้วยเทคนิค GC/MS และ HPLC/DAD พบว่า เทคนิค GC/MS สามารถแยกไฟโทสเทอรอลทั้งสี่ตัวได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม เทคนิค GC/MS จำเป็นต้องอาศัยการทำอนุพันธ์ซึ่งจะทำให้เกิดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างมากขึ้น และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูงกว่า ดังนั้นเทคนิค HPLC/DAD ในงานวิจัยนี้จึงเป็นทางเลือกในการวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อนได้

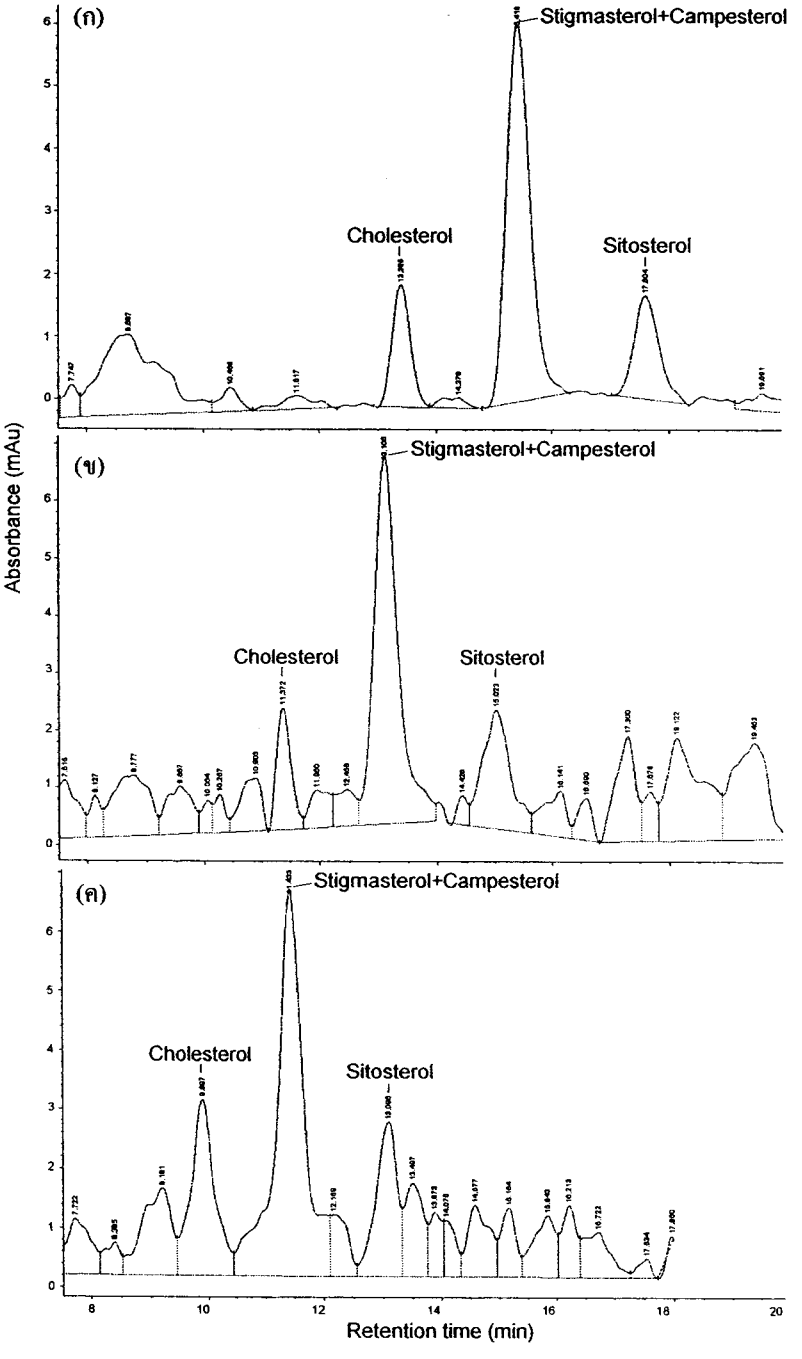
3.2.2 ผลของอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่

อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อลักษณะโครมาโทแกรมของสารและเวลาที่ใช้การวิเคราะห์ กล่าวคือ เมื่ออัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้มีความแหลม (Sharp) มากขึ้นและทำให้เวลาในการวิเคราะห์ในแต่ละครั้งเร็วขึ้น เนื่องจากสภาวะสมดุลของการแลกเปลี่ยนสารกับเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์มีน้อยลง โครมาโทแกรมของการศึกษาอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เมทานอลและน้ำอัตราส่วน 99:1 โดยปริมาตรได้แก่ 1.0, 1.2 และ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที แสดงในรูปที่ 3.2 และเมื่อทำการเปรียบเทียบในเทอมทางโครมาโทกราฟีในด้านความสมมาตรของพีค ค่า capacity factor และพื้นที่พีค (รูปที่ 3.3) พบว่า พีคของคอเลสเทอรอลและแคมเพสเทอรอลและสทิกมาสเทอรอลมีความสมมาตรใกล้เคียงกัน แต่พีคของสิโทสเทอรอลเกิดความไม่สมมาตรที่อัตราเร็ว 1.2 และ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที และเมื่อพิจารณาค่า capacity factor ซึ่งแสดงถึงความแรง (Strength) ในการเกิดอันตรกิริยา (Interaction) ระหว่างสารที่วิเคราะห์กับวัสดุที่ใช้ในการบรรจุ (Packing material) พบว่า สารทุกตัวมีค่า capacity factor ที่ใกล้เคียงกันในทุกอัตราเร็ว อย่างไรก็ตามพื้นที่พีคของคอเลสเทอรอลที่อัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีมีค่าสูงกว่า

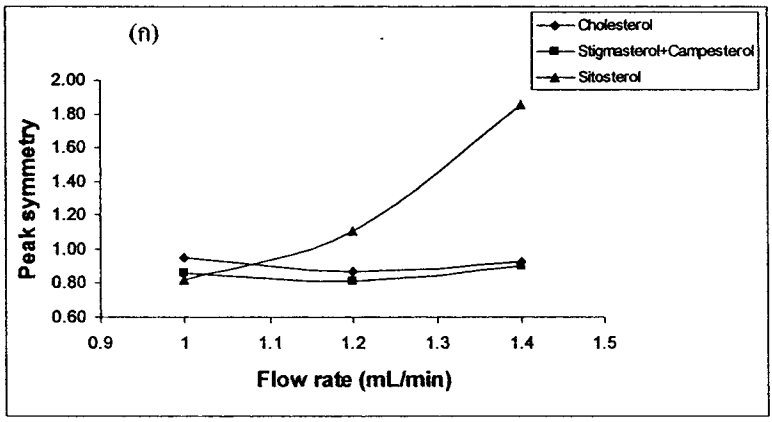
อัตราเร็วอื่น ๆ ดังนั้นอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีจึงเป็นอัตราเร็วที่เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาไฟโทสเทอรอลต่อไป ซึ่งจะใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 18 นาที

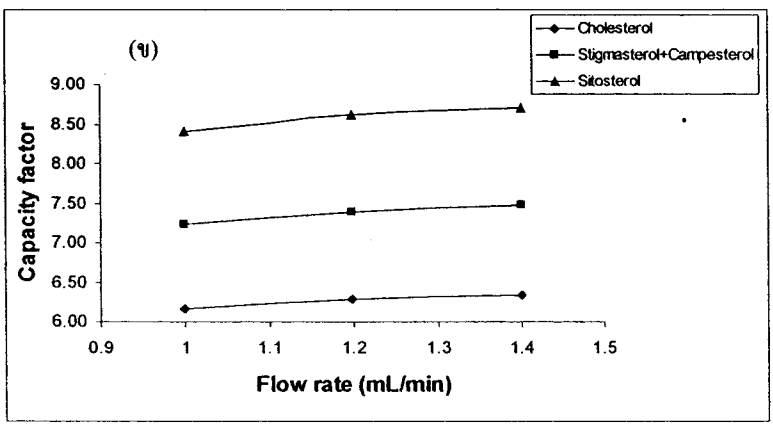


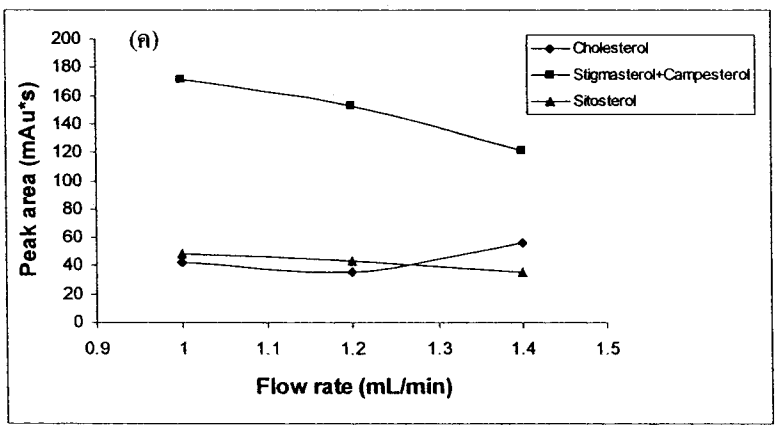
รูปที่ 3.1 โครมาแกรมของสารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอลความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เมทานอลและน้ำอัตราส่วน (ก) 90:10 และ (ข) 99:1 โดยปริมาตร



รูปที่ 3.2 Partial โครมาแกรมของสารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอลความเข้มข้น 8 พี-พีเอ็มเมื่อใช้อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เมทานอลและน้ำ (ก) 1.0 (ข) 1.2 และ (ค) 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที







รูปที่ 3.3 ผลของอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ต่อ (ก) ความสมมาตรของพีค (ข) capacity factor และ (ค) พื้นที่พีค ในการแยกสารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอลความเข้มข้น 8 พีพีเอ็ม

3.3 ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์

ตารางที่ 3.1 แสดงสมการของกราฟคาลิเบรชันของไฟโทสเทอรอลแต่ละตัว ซึ่งเป็นการพล็อตระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานไฟโทสเทอรอลในช่วง 2.5-30.0 พีพีเอ็ม (แกน x) และพื้นที่พีค (แกน y) โดยให้ค่า r^2 มากกว่า 0.9970 และให้ LOD และ LOQ อยู่ในช่วง 1.9-2.5 และ 6.4-18.6 พีพีเอ็ม ตามลำดับ และตารางที่ 3.2 แสดงร้อยละของการได้กลับคืนในส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่เป็นอนุภาค ซึ่งอยู่ในช่วง 78-119 และ 80-100 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์

สาร	สมการของกราฟคาลิเบรชัน	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
คอเลสเทอรอล	$6.3269x - 0.5749$, $r^2 = 0.9988$	1.9	6.4
สทิกมาสเทอรอลและแคมเพสเทอรอล	$7.2870x + 1.1863$, $r^2 = 0.9970$	5.6	18.6
สิโทสเทอรอล	$3.8596x + 11.642$, $r^2 = 0.9974$	2.5	8.4

LOD = Limit of Detection, S/N = 3

LOQ = Limit of Quantification, S/N = 10

ตารางที่ 3.2 ร้อยละของการได้กลับคืน

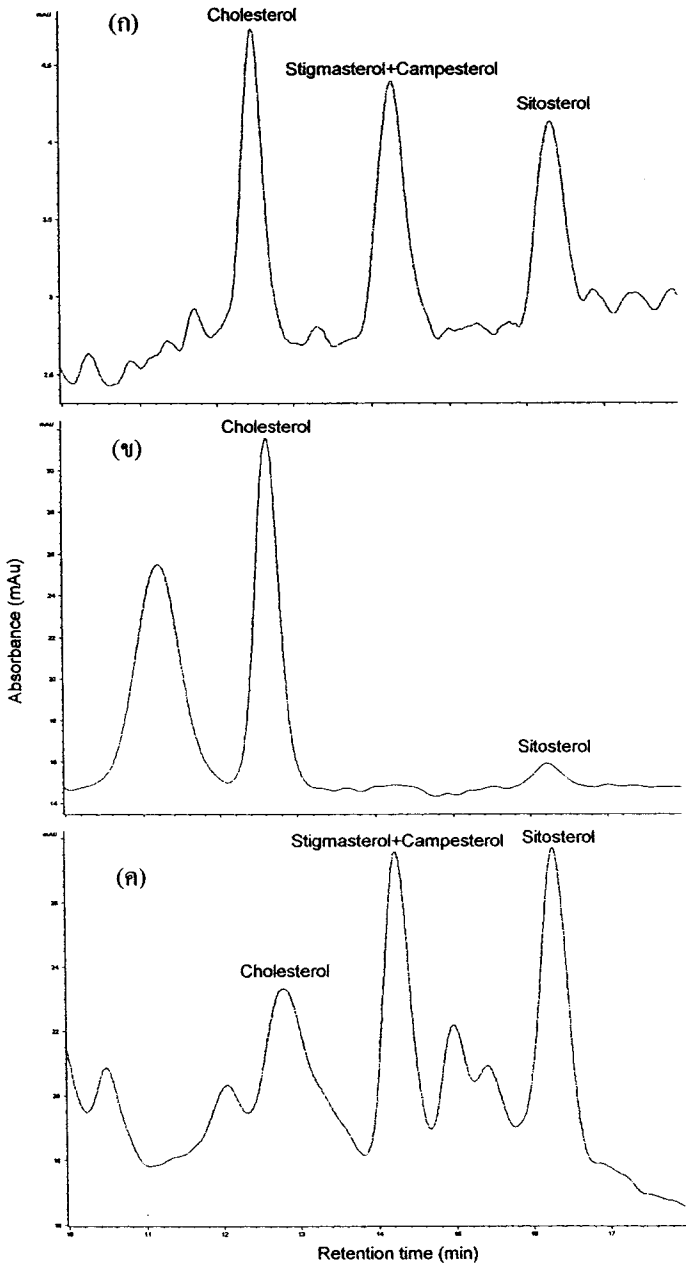
สาร	ร้อยละของการได้กลับคืน (±SD, n = 3)			
	ที่ความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม		ที่ความเข้มข้น 20 พีพีเอ็ม	
	ส่วนที่เป็นของเหลว	ส่วนที่เป็นอนุภาค	ส่วนที่เป็นของเหลว	ส่วนที่เป็นอนุภาค
คอเลสเทอรอล	78 (10)	99 (3)	110 (13)	83 (12)
สทิกมาสเทอรอลและแคมเพสเทอรอล	91 (16)	91 (13)	90 (17)	100 (11)
สิโทสเทอรอล	109 (8)	80 (11)	119 (5)	92 (10)

3.4 ปริมาณไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน

ได้ประยุกต์วิธีการที่พัฒนาขึ้นเพื่อหาปริมาณไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน ซึ่งจากการสกัดน้ำมะพร้าวอ่อนจะได้สารสกัดสองส่วนคือ ส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่เป็นอนุภาค ลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดทั้งสองส่วนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอลแสดงในรูปที่ 3.4 การหาปริมาณไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อนด้วยเทคนิคเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอะเรย์ (ตารางที่ 3.3) พบว่า สิโท-สเทอรอลตรวจพบได้เกือบทุกตัวอย่างและให้ความเข้มข้นที่มีแนวโน้มมากกว่าไฟโทสเทอรอลตัวอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาไฟโทสเทอรอลในตัวอย่างน้ำมันพืช ไขมัน (Fats) และน้ำมะพร้าวอ่อน (Phillips *et al.*, 2002; Normén *et al.*, 2007; Rujiralai and Sitaruno, 2010) โดยมีความเข้มข้นในส่วนที่เป็นของเหลวสูงถึง 12.5 พีพีเอ็ม และในส่วนที่เป็นอนุภาคมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงต่ำกว่า LOQ -60.5 พีพีเอ็ม ความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล และสทิกมาสเทอรอลและแคมเพสเทอรอลในส่วนที่เป็นของเหลวพบได้ตั้งแต่ไม่สามารถตรวจพบได้ (Undetectable) ถึง 59.3 พีพีเอ็มและไม่สามารถตรวจพบได้ ตามลำดับ และในส่วนที่เป็นอนุภาคพบได้สูงถึง 20.2 และ 30.9 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

ปริมาณไฟโทสเทอรอลในตัวอย่างงานวิจัยนี้พบในส่วนที่เป็นอนุภาคมากกว่าในส่วนที่เป็นของเหลว เนื่องจากไฟโทสเทอรอลไม่ละลายน้ำและละลายได้น้อยในไขมัน หากอยู่ในรูปเอส-เทอร์ก็จะละลายได้ดีในไขมัน (Shahidi, 2010) ดังนั้นไฟโทสเทอรอลชอบที่จะอยู่ในส่วนที่เป็นอนุภาคมากกว่าที่จะละลายอยู่ในน้ำมะพร้าว

นอกจากนั้นปริมาณไฟโทสเทอรอลที่พบในตัวอย่างน้ำมะพร้าวแต่ละตัวอย่างนั้นมีความหลากหลายอาจเนื่องจากปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิด อายุและความสดของน้ำมะพร้าวอ่อน (Varieties and maturities) และกระบวนการเก็บ (Packing process) เป็นต้น ดังตัวอย่างเช่นอายุของน้ำมะพร้าวอ่อน 6, 8 และ 10 เดือนจะมีส่วนประกอบในน้ำมะพร้าวเช่น น้ำตาลรีดิวซิง (Reducing sugar) ความเป็นกรด (Acidity) และสีของน้ำมะพร้าวอ่อนที่แตกต่างกัน (Puchakawimol, 2003) ซึ่งน่าจะทำให้ปริมาณของไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวที่อายุต่างกันไม่เท่ากัน



รูปที่ 3.4 Partial โครมาแกรมของ (ก) สารมาตรฐานผสมไฟโทสเทอรอลความเข้มข้น 6 พีพีเอ็ม (ข) ไฟโทสเทอรอลส่วนที่เป็นของเหลวในน้ำมะพร้าวอ่อนกระป๋อง 1 และ (ค) ไฟโทสเทอรอลส่วนที่เป็นอนุภาคในน้ำมะพร้าวอ่อนกระป๋อง 2

ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นของไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวอ่อน

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นเฉลี่ยของไฟโทสเทอรอล ในส่วนที่เป็นของเหลว (±SD, n= 3)			ความเข้มข้นเฉลี่ยของไฟโทสเทอรอล ในส่วนที่เป็นอนุภาค (±SD, n= 3)		
	คอเลสเทอรอล	สทิกมาสเทอรอล+ แคมแพสเทอรอล	สิโทสเทอรอล	คอเลสเทอรอล	สทิกมาสเทอรอล+ แคมแพสเทอรอล	สิโทสเทอรอล
น้ำมะพร้าวอ่อนสด 1	ND	ND	ND	20.2 (1.4)	20.7 (5.5)	60.5 (13.8)
น้ำมะพร้าวอ่อนสด 2	ND	ND	ND	< LOQ (0.2)	< LOQ (0.6)	< LOQ (0.5)
น้ำมะพร้าวอ่อนกระป๋อง 1	59.3 (5.4)	ND	8.9 (0.4)	ND	< LOQ (2.0)	19.2 (2.1)
น้ำมะพร้าวอ่อนกระป๋อง 2	6.8 (1.1)	< LOQ (2.2)	12.5 (6.3)	8.8 (2.0)	30.9 (9.4)	36.6 (7.0)

ND = Undetectable

บทที่ 4
สรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง

1) ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำมะพร้าวอ่อนโดยอาศัยการสกัดแบบของเหลว-ของเหลว ซึ่งมีเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายในการสกัดไฟโทสเทอรอลทั้งในส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่เป็นอนุภาค
2) สภาวะที่เหมาะสมของการแยกไฟโทสเทอรอลด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอะเรย์ คือ มีเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 99:1 โดยปริมาตรและอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที
3) ประสิทธิภาพของการสกัดน้ำมะพร้าวด้วยการสกัดแบบของเหลว-ของเหลวอยู่ในเกณฑ์ดีโดยให้ร้อยละของการได้กลับคืนมากกว่า 78
4) วิธีการที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์ไฟโทสเทอรอลได้ในช่วงความเข้มข้น 2.5-30.0 พีพีเอ็มโดยให้ความเป็นเส้นตรงมากกว่า 0.9970 และให้ LOD และ LOQ อยู่ในช่วง 1.9-5.6 และ 6.4-18.6 พีพีเอ็ม ตามลำดับ
5) สิโทสเทอรอลจะตรวจพบได้เกือบทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยไฟโทสเทอรอลในส่วนที่เป็นของเหลวจะมีความเข้มข้นตั้งแต่ไม่สามารถตรวจวัดได้จนถึง 59.3 พีพีเอ็ม และในส่วนที่เป็นอนุภาคจะมีความเข้มข้นตั้งแต่ไม่สามารถตรวจพบได้จนถึง 60.5 พีพีเอ็ม
6) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า น้ำมะพร้าวอ่อนจัดเป็นแหล่งอาหารที่มีไฟโทสเทอรอล ซึ่งมีคุณค่าต่อการบริโภค

4.2 ข้อเสนอแนะและเรื่องที่ควรทำวิจัยต่อไป

1) ทำ standard addition เพื่อที่จะศึกษาผลของตัวรบกวน (Interferences)
2) ทำ stability test เพื่อที่จะศึกษาผลของการเก็บตัวอย่างต่อระดับของไฟโทสเทอรอลในน้ำมะพร้าวแต่ละชนิด
3) ศึกษาชนิดและปริมาณไฟโทสเทอรอลในตัวอย่างน้ำมะพร้าวอ่อนพันธุ์ต่าง ๆ และที่อายุต่าง ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ได้จริงและเป็นประโยชน์มากขึ้น

บทที่ 5
เอกสารอ้างอิง

กลุ่มเกษตรสัญจร. มะพร้าวน้ำหอม. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม. นนทบุรี

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์และศูนย์สมุนไพรทักษิณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. 2551. สำนักพิมพ์จ. เจริญการพิมพ์. กรุงเทพ

Abidi, S.L. 2001. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. Journal of Chromatography A 935 (1-2), 173-201.

Abidi, S.L. 2004. Capillary electrochromatography of sterols and related steryl esters derived from vegetable oils. Journal of Chromatography A 1059, 199-208.

Awad, A.F., Fink, C.S. 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. Journal of Nutrition 130 (9), 2127-2130.

Borse, B.B., Jagan, L., Rao, J.M., Ramalakshmi, K., Raghavan, B. 2007. Chemical composition of volatiles from coconut sap (*neera*) and effect of processing. Food Chemistry 101, 877-880.

Cañabate-Díaz, B., Carretero, A.S., Fernández-Gutiérrez, Vega, A.B., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., Martos, J.D. 2007. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. Food Chemistry 102, 593-598.

Careri, M., Elviri, L., Mangia, A. 2001. Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. Journal of Chromatography A 935 (1-2), 249-257.

Fonseca, A.M., Monte, F.J.Q., de Oliveira, M.D.C.F., de Mattos, M.C., Cordell, G.A., Braz-Filho, R., Lemos, T.L.G. 2009. Coconut water (Cocos nucifera L.) - A new biocatalyst system for organic synthesis. Journal of Molecular Catalysis B:

Ge, L., Yong, J.W.H., Tan, S.N., Ong, E.S. 2006. Determination of cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. Electrophoresis 27, 2171-2181.

Ge, L., Yong, J.W.H., Tan, S.N., Yang, X.H., Ong, E.S. 2006. Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone eletrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. Journal of Chromatography A 1133, 322-331.

Ge, L., Yong, J.W.H., Tan, S.N., Hua, L., Ong, E.S. 2008. Analyses of gibberellins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by partial filling-micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry with reversal of electroosmotic flow. Electrophoresis 29, 2126-2134.

Han, J.H., Yang, Y.X., Feng, M.Y. 2008. Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. Biomedical and Environmental Sciences 21, 449-453.

Kalo, P., Kuuranne, T. 2001. Analysis of free and esterified sterols in fats and oils by flash chromatography, gas chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 935 (1-2), 237-248.

Kuhnle, G.G.C., Dell' Aquila, C., Aspinall, S.M., Runswick, S.A., Joosen, A.M.C.P., Mulligan, A.A., Bingham, S.A. 2009. Phytoestrogen content of fruits and vegetables commonly connsumed in the UK based on LC-MS and ^{13}C-labelled standards. Food Chemistry 116, 542-554.

Laakso, P. 2005. Analysis of sterols from various food matrices. European Journal of Lipid Science and Technology 107 (6), 402-410.

Lagarda, M.J., García-Llatas, G., Farré, R., 2006. Analysis of phytosterols in foods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41 (5), 1486-1496.

Ling, W.H., Jones, P.J. 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. Life Science 57 (3), 195-206.

López Ortíz, C.M., Prats Moya, M.S., Berenguer Navarro, V. 2006. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of β-sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. Journal of Food Composition and Analysis 19 (2-3), 141-149.

Lu, B., Zhang, Y., Wu, X., Shi, J. 2007. Separation and determination of diversiform phytosterols in food materials using supercritical carbon dioxide extraction and ultraperformance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 588, 50-63.

Ma, Z., Ge, L., Lee, A.S.Y., Yong, J.W.H., Tan, S.N., Ong, E.S. 2008. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. Analytica Chimica Acta 610, 274-281.

Miller, J.C., Miller, J.N. 1993. Statistics for Analytical Chemistry. 3rd ed., Ellis Horwood, New York, pp. 115-118.

Normén, L., Ellegård, L., Brants, H., Dutta, P., Andersson, H. 2007. A phytosterol database: fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. Journal of Food Composition and Analysis 20 (3-4), 193-201.

Ortíz, C.M.L., Moya, M.S.P., Navarro, V.B. 2006. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of β-sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oil. Journal of Food Composition and Analysis 19, 141-149.

Ostlund Jr., RE. 2002. Phytosterols in human nutrition. Annual Review of Nutrition 22 (1), 533-549.

Parcerisa, J., Casals, I., Boatella, J., Codony, R., Rafecas, M. 2000. Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of triacylglycerols and gas-liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). Journal of Chromatography A 881 (1-2), 149-158.

Parish, E.J., Li, S., Bell, A.D. 2008. Chemistry of Waxes and Sterols. In *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (Eds. Akoh, C.C. and Min, D.B.) 3rd edition, CRC Press, Boca Raton, New York, p 106-120.

Phillips, K.M., Tarrago-Trani, M.T., Stewart, K.K. 1999. Phytosterol content of experimental diets differing in fatty acid composition. Food Chemistry 64 (3), 415-422.

Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Toivo, J.I., Swank, M.A., Simpkins, A.H. 2002. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. Journal of Food Composition and Analysis 15 (2), 123-142.

Puchakawimol, P. 2003. Study on the quality changes of aromatic coconut at different maturity [online]. Available from http://kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC4106021.pdf. [Accessed 17/12/09].

Punghmatharith, B. 1988. Sex hormone-like substances in young coconut juice and their effects on uterine growth in rats. Songklanakarin Journal of Science and Technology 10 (2), 221-226.

Radenahmad, N., Vongvatcharanon, U., Withyachumnarnkul, B. and Connor, J.R. 2006. Serum levels of 17β-estradiol in ovariectomized rats fed young-coconut-juice and its effect on wound healing. Songklanakarin Journal of Science and Technology 28 (5), 897-910.

Rujiralai, T., Sitaruno, N. 2010. Analysis of phytosterols of young coconut juice by gas chromatography-mass spectrometry. Poster Presentation in the 35th Congress on Science and Technology of Thailand, 2010,

Sadex, P.C. 1996. The HPLC solvent guide, John Wiley & Sons, New York, p. 25.

Santoso, U., Kubo, K., Ota, T., Tadokoro, T., Mackawa, A. 1996. Nutrient composition of *kopyor* coconuts (*Cocos nucifera* L.). Food Chemistry 57, 299-304.

Shahidi, F. 2010. Antioxidants: Chemistry and health effects. II [online]. Available from http://colleges.ksu.edu.sa/Arabic%20Colleges/CollegeOfAgriculture/SSFS/Documents/Copy%20of%20Saudi%20Arabia%20.II.pdf [Accessed 26/08/10].

Verger, Ph., Leblanc, J.C. 2003. Concentration of phytohormones in food and feed and their impact on the human exposure. Pure and Applied Chemistry 75 (11-12), 1873-1880.

Warner, K., Mounts, T.L. 1990. Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable olis by HPLC with evaporative light – scattering detection. Journal of the American Oil Chemists' Society 67(11), 827-831.