Original Article

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และความเป็นพิษทางพันธุกรรมของน้ำมันปรุงอาหารทอดซ้ำในเซลล์เพาะเลี้ยง

Study on Cytotoxicity and Genotoxicity of Repeatedly Fried Cooking Oils by Cell Culture

เจตนา วีระกุล[1], วงศ์วิวัฒน์ ทัศนียกุล[2], ปราโมทย์ มหคุณากร[3], สุพัตรา ปรศุพัฒนา[3]*
Jetana Weerakul[1], Wongwiwat Tassaneeyakul[2], Pramote Mahakunakorn[3], Supattra Porasuphatana[3]*

Received: 28 May 2009 **Accepted:** 16 Oct 2009

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาปริมาณของสารก่อมะเร็งกลุ่มโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) และความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารสกัดของน้ำมันทอดซ้ำ เมื่อปริมาณร้อยละของค่าโพลาร์รวม (Total polar compounds, %TPC) เพิ่มขึ้นโดยศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (HepG2) ทำการทดสอบในน้ำมันพืชสองชนิด คือน้ำมันถั่วเหลือง (SBO) และน้ำมันปาล์ม (PO) โดยการทอดที่อุณหภูมิ 165 องศาเซลเซียส วัด %TPC ด้วยวิธีมาตรฐาน IUPAC 2.507 วัดปริมาณ PAHs โดยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) เปรียบเทียบกับ PAHs มาตรฐาน 18 ตัว วัดความเป็นพิษต่อเซลล์โดยดูการมีชีวิตรอดของเซลล์ (MTT assay) และการเกิดไมโครนิวเคลียส (Micronucleus assay) จากการศึกษาพบว่าไม่พบ PAHs ในสารสกัดของน้ำมันถั่วเหลืองที่มี %TPC น้อยกว่า 25 ในน้ำมันปาล์มตรวจพบ fluorene, phenanthrene และ anthracene ที่ %TPC 20.30 และค่า %TPC ที่สูงขึ้น บ่งชี้ถึงปริมาณของ PAHs และปริมาณระดับ %TPC ของน้ำมันที่กฎหมายกำหนดคือไม่เกินร้อยละ 25 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดน้ำมันปาล์มทดสอบยืนยันด้วยวิธี MTT assay ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าทำให้การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงและจากข้อมูลการทดสอบความเป็นพิษทางพันธุกรรม สารสกัดจากน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปาล์มที่ %TPC 39.66 และ 29.54 ตามลำดับ ทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากข้อมูลการศึกษานี้พบว่าปริมาณสารก่อมะเร็งกลุ่ม PAHs พบสูงขึ้นเมื่อค่า %TPC สูงขึ้นและสารสกัดจากน้ำมันทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์และพิษทางพันธุกรรมเมื่อเซลล์ได้รับสัมผัส ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงน่าที่จะให้ข้อมูลที่มีประโยชน์ในการรณรงค์เพื่อป้องกันการได้รับสารพิษอันไม่พึงประสงค์จากน้ำมันทอดซ้ำที่เสื่อมคุณภาพแก่ผู้บริโภค

คำสำคัญ: พิษต่อเซลล์ พิษทางพันธุกรรม น้ำมันปรุงอาหารทอดซ้ำ
วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2552; 5(3): 235-242

---

[1] นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพิษวิทยา, [2] Ph.D. รองศาสตราจารย์, [3] Ph.D. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น

[1] Master degree student, [2] Ph.D., Associate Professor, [3] Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen

* Corresponding author: Supattra Porasuphatana, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Tel. +66 4336 2089 Fax. +66 4336 2092 E-mail: psupatra@kku.ac.th

Abstract

This study aimed to investigate the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and cytotoxicity of extracts from repeatedly fried cooking oils. Special focus was on the correlation between the level of total polar compounds (TPCs) and toxicity to the hepatoma cell line (HepG2). Soybean (SBO) and palm (PO) oil samples were prepared by frying dough at high temperature (165°C), and periodically determining %TPCs by the standard IUPAC 2.507 method. Analysis of PAHs was carried out by liquid extraction followed by gas chromatography (GC), using PAHs mixed consisting of 18 PAHs compounds as standards. Cytotoxicities were measured using cell viability (MTT assay) and micronucleus assays. Results showed undetectable levels of PAHs in frying SBO at %TPCs less than 25%. By comparing fluorene, phenanthrene and anthracene were detected in PO at 20.30% and higher, indicating the formation of PAHs in PO when its %TPCs were close to or exceeding the legal limitation of 25%. Cytotoxicity of extracts from repeated frying PO was confirmed by the reduction of cell viability at 48 and 72 hours incubation. Formation of micronucleus gradually increased with increases in %TPCs, and reached significant levels at 39.66%TPCs and 29.54%TPCs for SBO and PO, respectively. Results from this study suggest that carcinogenic PAHs form when cooking oils are repeatedly used. This is the case for higher %TPCs especially. These findings may aid campaigns for consumer protection against toxic substances generated from repeatedly used cooking oil.

Keywords: Cytotoxicity, Genotoxicity, Repeatedly fried cooking oils

IJPS 2009: 5(3): 235-242

บทนำ

อาหารจำพวกทอดเป็นอาหารประเภทหนึ่งที่ได้รับความนิยมโดยทั่วไป เพราะจะมีกลิ่นหอมและรสชาติชวนรับประทาน กรรมวิธีการปรุงอาหารชนิดนี้ต้องอาศัยวัตถุดิบหลักที่สำคัญคือน้ำมันต่างๆ ที่ใช้ในการทอด กระบวนการทอดน้ำมันปรุงอาหารที่ผ่านความร้อนสูงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทางกายและทางเคมีที่อาจก่อให้เกิดสารอันตรายต่อสุขภาพของตัวผู้ผลิตเองและผู้บริโภค โดยเฉพาะน้ำมันที่มีการนำกลับมาใช้ซ้ำหรือที่เรียกว่าน้ำมันทอดซ้ำ น้ำมันเหล่านี้อาจเสื่อมคุณภาพและเกิดสารพิษหลายชนิดสะสมในน้ำมัน บางชนิดมีคุณสมบัติก่อกลายพันธุ์ (mutagens) บางชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) หากนำกลับมาใช้สารพิษจะปนเปื้อนไปกับอาหารที่รับประทานทำให้เกิดผลร้ายโดยตรงต่อสุขภาพ

น้ำมันเปรียบเสมือนตัวนำความร้อนหากได้รับอุณหภูมิสูงเป็นเวลานานจะเกิดการเสื่อมสภาพ พบสารก่อมะเร็ง เช่น อัลดีไฮด์ (aldehydes), มาโลนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA), 4-ไฮดรอกซี-2-โนนีนอล (*trans*-4-hydroxy-2-nonenal; HNE), โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) โดยเฉพาะสารกลุ่ม PAHs เป็นสารพิษกลุ่มใหญ่และมีความเป็นพิษร้ายแรงมาก ส่วนใหญ่เป็นสารเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็ง PAHs เป็นสารไม่มีขั้ว (non-polar) ดังนั้นจึงละลายได้ดีในน้ำมันและไขมัน ละลายได้น้อยในน้ำ จึงสะสมอยู่ในร่างกายได้นานและขับออกจากร่างกายได้ยาก มีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปจัดเรียงเป็นเส้นตรงเป็นมุมหรือเป็นกลุ่มมีเฉพาะอะตอมของไฮโดรเจนและคาร์บอน เกิดจากกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของถ่านหิน น้ำมัน แก๊ส ไม้และวัตถุอินทรีย์ต่างๆ (Hodgeson, 1990) เข้าสู่ร่างกายมี 3 ทางคือ ทางปอดโดยการหายใจ ระบบทางเดินอาหารโดยการกินอาหารที่ปนเปื้อนและทางผิวหนังเมื่อสัมผัสสิ่งแวดล้อมที่มี PAHs ปนเปื้อน (Ramesh et al., 2004) ในน้ำมันทอดซ้ำยังพบสาร MDA ซึ่งเป็นสารประกอบอัลดีไฮด์ที่มีความสามารถในการแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายและเข้าทำลายเซลล์และดีเอ็นเอทำให้เซลล์เกิดความเสียหายหรือเสียสภาพ (Halliwell and Gutteridge, 1998) ทำให้เกิดมะเร็งบนผิวหนังของหนูทดลอง การเจริญเติบโตผิดปกติ ลำไส้ทำงานผิดปกติ ตับและไตโต โลหิตจาง วิตามินอีในเลือดและตับลดลง และอาจทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นทำให้เกิด

พิษต่อเซลล์เรียกว่า ภาวะเครียดออกซิเจน (oxidative stress)

น้ำมันปรุงอาหารทอดซ้ำที่เสื่อมคุณภาพทั้งทางกายภาพและทางเคมี ทำให้เกิดการสะสมของสารโพลาร์ในน้ำมันมากขึ้น ปริมาณร้อยละสารโพลาร์รวมในน้ำมัน (Total polar compounds) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงคุณภาพของน้ำมันตัวหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับที่สุด โดยตามกฎหมายประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับ 283) พ.ศ. 2547 กำหนดไว้ไม่ให้เกินร้อยละ 25 ของน้ำหนักน้ำมัน แต่การวัดค่าปริมาณร้อยละสารโพลาร์รวมในน้ำมันไม่ได้ชี้วัดความเป็นพิษของน้ำมัน ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าในน้ำมันทอดซ้ำที่มีระดับค่าโพลาร์สูงขึ้นจะมีการสะสมของสารพิษอันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีมากขึ้นเช่นกัน งานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารพิษที่ตกค้างในน้ำมันทอดซ้ำที่มีร้อยละสารโพลาร์รวมในน้ำมันสูงขึ้นและศึกษาปริมาณสารกลุ่ม PAHs ในน้ำมันทอดซ้ำที่ระดับปริมาณสารโพลาร์ในน้ำมันต่างกัน โดยมุ่งประเด็นไปที่การตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และความเป็นพิษทางพันธุกรรม (genotoxicity) เพื่อจะนำข้อมูลไปใช้เป็นประโยชน์ในการศึกษาความเป็นพิษจากการใช้น้ำมันทอดซ้ำต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและเครื่องมือ

Standard PAHs (บริษัท SUPELCO ประเทศสหรัฐอเมริกา) Fetal bovine serum (FBS) (บริษัท GIBCO Auckland ประเทศสหรัฐอเมริกา), Dulbelco's Modified Eagie Medium (DMEM) (บริษัท GIBCO ประเทศสหรัฐอเมริกา), Pennicillin streptromycin (บริษัท GIBCO ประเทศสหรัฐอเมริกา), Trypsin EDTA (บริษัท GIBCO ประเทศแคนาดา), Phosphate buffer saline (PBS), 3-(4,5-dimethythiazol-2-y)-2,5-diphenyltettrazolium bromide (MTT) (บริษัท Eugene, Oregon ประเทศสหรัฐอเมริกา), Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (บริษัท Sigma-Aldrich Laborachemikaline GmbH ประเทศเยอรมันนี), cytochalasin B (บริษัท MERCKS ประเทศเยอรมันนี), Giemsa stain (บริษัท MERCKS ประเทศเยอรมันนี), Glacial acetic acid (บริษัท CARLO ERBA ประเทศเยอรมันนี) เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการทดสอบผล Microplate reader รุ่น 680 (บริษัท Bio-rad ประเทศสหรัฐอเมริกา) CO_2 Incubator JENCONS-PLS (บริษัทเดลตา แล็บบอราตอรี่ จำกัด ประเทศไทย) เครื่อง Gas Chromatography รุ่น HP 6890 (บริษัท Hewlett Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา)

การเตรียมตัวอย่างน้ำมัน

เตรียมตัวอย่างน้ำมันทอดซ้ำให้ได้ค่าร้อยละสารโพลาร์รวม (Total polar compounds) เท่ากับ 9-16, 17-24 และที่ร้อยละ 25-40 โดยเริ่มจากการนวดแป้งกับน้ำให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที อัตราส่วนแป้งต่อน้ำ คือ แป้งสาลี 1 kg ต่อน้ำ 500 mL เมื่อแป้งเหนียวได้ที่ปั้นเป็นแผ่นแบนๆ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 นิ้ว ผึ่งลมพักไว้ เทน้ำมัน 5 L ลงในกระทะตั้งไฟ 15 นาที วัดอุณหภูมิได้ 165 °C เริ่มทอด ความร้อนขณะทอดวัดได้ 180±10 °C ใช้เวลาในการทอดจำนวน 2 ชั่วโมง เสร็จแล้วปิดไฟทิ้งไว้บนเตาอีก 1 ชั่วโมง แล้วเก็บในขวดสีน้ำตาลจำนวน 60 mL เพื่อนำไปตรวจวัดค่าร้อยละสารโพลาร์รวมทำเช่นนี้ทุกวันเป็นเวลา 9 วัน โดยไม่มีการกรองและเติมน้ำมันใหม่

การวิเคราะห์ปริมาณสารโพลาร์รวม (%Total polar compounds; %TPCs)

การวิเคราะห์ปริมาณ %TPCs ใช้วิธี IUPAC 2.507 (Dobarganes et al., 2000) เตรียมคอลัมน์โดยอุดปลาย คอลัมน์ด้วยสำลีจากนั้นไล่อากาศในคอลัมน์ด้วยสารละลาย elution solvent 1 (Petroleum ether: Diethyl ether, อัตราส่วน 9:1) ปริมาตร 5 mL เติม silica gel 3 g เคาะเบาๆ ให้ silica gel กระจายตัวสม่ำเสมอ แล้วจึงเติม sodium sulphate anhydrous 1 g บนชั้นของ silica gel เติมตัวอย่างน้ำมัน 1 g ตามด้วย elution solvent 1 ปริมาตร 60 mL แล้วไขสารละลายทิ้ง (non-polar) ด้วยอัตรา 1.5 mL/min เมื่อ elution solvent 1 หยุดไหลเติม elution solvent 2 (Diethyl ether) ปริมาตร 50 mL (polar) และเก็บลงในขวดก้นกลมที่ชั่งน้ำหนักแล้ว นำขวดก้นกลมระเหยแห้งแล้วจึงอบที่อุณหภูมิ 96 °C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง บันทึกน้ำหนักขวดก้นกลมนำไปคำนวณ

การคำนวณร้อยละสารโพลาร์รวม (%TPC)

%TPC = (Mp/M) x 100

Mp = น้ำหนัก polar fraction (g)

M = น้ำหนักตัวอย่างน้ำมัน (g)

การสกัดสาร PAHs จากตัวอย่างน้ำมัน

ชั่งตัวอย่างน้ำมันปริมาตร 30 g ละลายใน n-Heptane 20 mL แล้วบรรจุในกรวยแยก (separatory funnel) สกัดสารละลายน้ำมันด้วย DMSO 15 นาที ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ หลังจากนั้นค่อยๆ เติมน้ำ 60 mL ลงในสารละลายน้ำมันแล้วทำการสกัดซ้ำด้วย cyclohexane จำนวน 150 mL 15 นาที ด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ ล้างด้วยน้ำปริมาตรจำนวน 100 mL ทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้นไขส่วนน้ำทิ้ง ขั้นตอนนี้ทำสองครั้ง ระเหยจนเหลือ cyclohexane ประมาณ 20 mL จึงนำไปผ่านคอลัมน์เพื่อให้ตัวอย่างสะอาดขึ้น การเตรียมคอลัมน์เพื่อทำให้ตัวอย่างสะอาดขึ้นโดยใช้คอลัมน์ขนาด 20x2.2 cm ที่บรรจุ silica gel 5 g และ sodium sulfate anhydrous 1 กรัม เติม cyclohexane 10 mL และ dichloromethane 5 mL ไขทั้งสองส่วนนี้ทิ้งจนหมด บรรจุสารละลายลงในคอลัมน์แล้วจึงเติม cyclohexane 10 mL และ dichloromethane 5 mL ระเหยให้แห้งแล้วละลายด้วย acetonitrile 1 mL ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้งเก็บส่วน acetonitrile ทั้งหมดรวมกันเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอทำการทดสอบ

การวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ด้วยเทคนิค Gas Chromatography

วิธีวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Howard (Howard et al., 1994) ใช้คอลัมน์ Phenomenex ZB-5 30 m x 0.25 mm อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 130 °C เพิ่มอุณหภูมิ 4 °C/min จนถึง 290 °C ตรวจวัดสารที่แยกได้ด้วย Flame Ionization Detection (FID) ที่อุณหภูมิ 300 °C โดยมีอุณหภูมิ Injector 200 °C ฉีดสารมาตรฐานรวมประกอบด้วยสารมาตรฐาน PAHs 18 ตัวที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนโดยใน spit mode 10:1 คำนวณปริมาณสาร PAHs ในตัวอย่างสารสกัดจากกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic assay; MTT assay)

เลี้ยงเซลล์ HepG2 ใน 96 well plate (ปริมาณ 10^4 cells/well) ในอาหารเลี้ยง DMEM ร่วมกับ 10% FBS ละลายสารสกัดทดสอบใน DMSO (ไม่เกิน 0.2%) และเติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ในความเข้มข้นของสารสกัดที่ต้องการ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C (5% CO_2) ตามเวลาที่กำหนด คือที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์และเติมสารละลาย MTT (5 mg/mL) ทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นดูดเอาสารละลายออกแล้วเติมร้อยเปอร์เซ็นต์ DMSO 150 μL/well นำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมือสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ความยาวคลื่น 550 nm คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ cell viability จากจำนวนเซลล์ที่เหลือหลังจากทดสอบกับสารสกัด

การทดสอบความเป็นพิษทางพันธุกรรมด้วยวิธีไมโครนิวเคลียส (Isabelle et al., 2003)

เลี้ยงเซลล์ Hep G2 ใน 6-well plate ($5x10^5$ cells/well) ทำการทดสอบกับสารสกัดที่ละลายใน DMSO และบ่มเซลล์เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูด DMEM เก่าทิ้ง ล้างด้วย PBS จำนวน 1 mL เติม DMEM ใหม่ที่มี CytochalacinB (4.5 μg/mL) บ่มในตู้อบเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาบ่มในตู้อบเลี้ยงเซลล์ 90 นาที ใส่ DMEM ใหม่และ PBS อัตราส่วน 1:1 จำนวน 2 mL บ่มในตู้อบเลี้ยงเซลล์ 1.5 ชั่วโมง ดูด DMEM เก่าทิ้งใส่ Trypsin เติม 1 mL ดูดทิ้งทันที ใส่ DMEM ที่ไม่มีซีรั่ม 1 mL ผสมให้เข้ากันแล้วดูดใส่หลอดพลาสติกขนาดเล็ก เติมสารละลาย fixative (acetic acid: ethanol, 1:1 v/v) 1 mL ปั่นเหวี่ยง 400 rpm 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งสารละลาย เติม fixative 2 mL ทิ้งไว้ 15 นาที ปั่นเหวี่ยง 400 rpm อีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเติม fixative พอสมควรแล้วหยดลงแผ่นสไลด์ตากไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง ย้อมด้วย May-Grunwald diluted 1:1 (v/v) Sorensen buffer pH 7 เป็นเวลา 8 นาที แล้วย้อมด้วย Giemsa diluted 1:1 (v/v) Sorensen buffer pH 7 เป็นเวลา 25 นาที เสร็จแล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วนับเซลล์เทียบกับ Blank control

วิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองมาทดสอบทางสถิติ Statistical analysis โดยใช้โปรแกรม Sigma stat ทดสอบ ความแตกต่างทางสถิติด้วย one way ANOVA

ผลการศึกษาวิจัย

ผลการวัดปริมาณร้อยละสารโพลาร์รวม

น้ำมันปาล์มใหม่และน้ำมันถั่วเหลืองใหม่หรือน้ำมันที่ไม่ได้ผ่านการทอด มีค่าร้อยละสารโพลาร์รวมเท่ากับ 8.45 และ 3.53 ตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้กำหนดค่าร้อยละสารโพลาร์รวมเป็นช่วงที่ร้อยละ 9-16,

17-24 และ 25-40 จากการติดตามวัดค่าร้อยละสารโพลาร์ของตัวอย่างน้ำมันพบว่าน้ำมันปาล์มมีค่าโพลาร์เริ่มต้นสูงกว่าน้ำมันถั่วเหลืองน้ำมันพืชทั้งสองชนิดมีการเปลี่ยนแปลงค่าโพลาร์ตามเวลาทอดไม่เท่ากัน โดยน้ำมันถั่วเหลืองมีการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่า ดังแสดงในตารางที่ 1 น้ำมันปาล์มทอดที่ชั่วโมง 1, 10 และ 15 มีค่าร้อยละสารโพลาร์รวมเท่ากับ 10.46, 20.31 และ 29.54 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันถั่วเหลืองมีค่าร้อยละสารโพลาร์รวมที่ 20.86 ภายในเวลา 7 ชั่วโมงและภายในเวลา 13 ชั่วโมงมีค่าสูงถึง 39.66

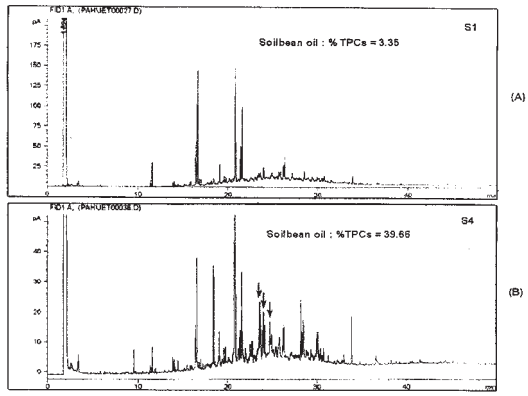
ผลการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs

การวิเคราะห์ปริมาณ PAHs โดยการเปรียบเทียบการปรากฏของสัญญาณที่ค่า Retention time (Rt) ตามที่ปรากฏของสารมาตรฐาน PAHs จากนั้นคำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน PAHs พบว่าในน้ำมันทั้งสองชนิดน้ำมันใหม่ที่ยังไม่ผ่านการทอด (blank control) ไม่พบสัญญาณของ PAHs ดังตัวอย่างรูปที่ 1 (A) และสารสกัดน้ำมันทอดซ้ำจะปรากฏสัญญาณของ PAHs แต่ละค่า ดังตัวอย่างโครมาโตแกรมดังรูปที่ 1 (B)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ PAHs ของน้ำมันทั้งสองชนิดพบว่าเมื่อน้ำมันทอดซ้ำที่มีค่าร้อยละของสารโพลาร์ทั้งหมดสูงขึ้น ปริมาณ PAHs ที่ตรวจพบจะสูงขึ้น โดยน้ำมันถั่วเหลืองที่ค่าร้อยละ TPC 39.66 ตรวจพบ Total PAHs 22.23 μg/kg น้ำมันปาล์มที่ค่าร้อยละของสารโพลาร์ทั้งหมด 20.30 ตรวจพบ Total PAHs 11.99 μg/kg น้ำมันปาล์มที่ค่าร้อยละของสารโพลาร์ทั้งหมด 29.53 ตรวจพบ Total PAHs 31.49 μg/kg ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ค่าร้อยละสารโพลาร์รวมของน้ำมันทอดซ้ำที่เตรียม

ชนิดน้ำมัน	จำนวนเวลารวมในการทอด (hrs)	ร้อยละสารโพลาร์รวม (%TPCs) (mean± SD)
ปาล์ม	0	8.46±0.13
ปาล์ม	1	10.46±0.04
ปาล์ม	10	20.31±0.74
ปาล์ม	15	29.54±2.23
ถั่วเหลือง	0	3.53±0.17
ถั่วเหลือง	2	9.95±0.09
ถั่วเหลือง	7	20.86±0.91
ถั่วเหลือง	13	39.66±1.05



รูปที่ 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารสกัดจากน้ำมันเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas chromatography โครมาโตแกรมของสาร PAHs จากการสกัดตัวอย่างน้ำมันใหม่ (A) และน้ำมันทอดซ้ำ (B)

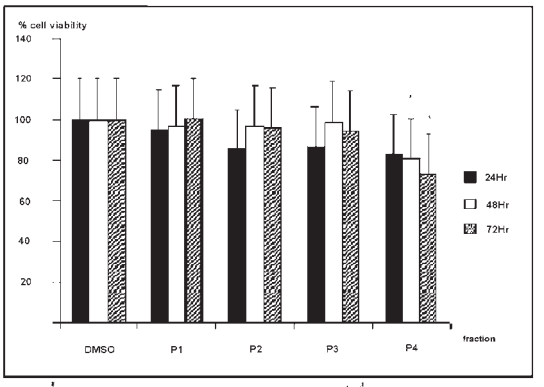
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารในน้ำมันทอดซ้ำด้วยวิธี MTT

ทำการทดสอบความเป็นพิษโดยใช้ระยะเวลาในเวลาการทดสอบสารกับเซลล์ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดน้ำมันปาล์ม (P) โดย P1= %TPC 8.45, P2 = %TPC 10.46, P3 = %TPC 20.30 และ P4 = %TPC 29.53 ตามลำดับ พบว่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับ control DMSO และมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง $p<0.001$

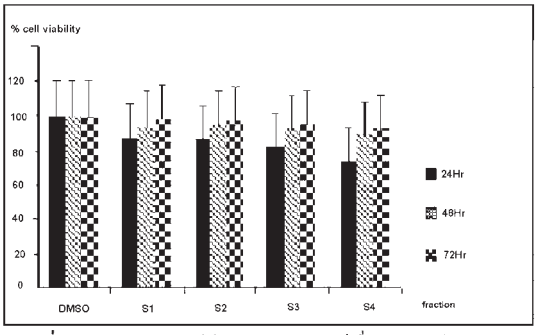
เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดน้ำมันถั่วเหลือง (S) โดย S1 = %TPC 3.53, S2 = %TPC 9.94, S3 = %TPC 20.86 และ S4 = %TPC 39.66 ตามลำดับพบว่า ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับ control DMSO

ตารางที่ 2 ปริมาณ PAHs ที่สกัดได้จากน้ำมัน 300 กรัม

ชนิดน้ำมัน	%TPCs	ปริมาณ PAHs (μg/Kg)	
น้ำมันปาล์ม	8.46	ตรวจไม่พบ	
น้ำมันปาล์ม	10.46	ตรวจไม่พบ	
น้ำมันปาล์ม	20.30	Fluorene	4.70
		Phenanthrene	7.29
น้ำมันปาล์ม	29.54	Acenapthrene	2.76
		Fluorene	16.62
		Phenanthrene	12.10
น้ำมันถั่วเหลือง	3.53	ตรวจไม่พบ	
น้ำมันถั่วเหลือง	9.95	ตรวจไม่พบ	
น้ำมันถั่วเหลือง	20.86	ตรวจไม่พบ	
น้ำมันถั่วเหลือง	39.663	Acenapthrene	1.79
		Fluoranthrene	17.85
		Pyrene	2.58



รูปที่ 2 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อทดสอบกับสาร PAHs ที่สกัดจากน้ำมันปาล์ม (* p<0.001) (n = 4)

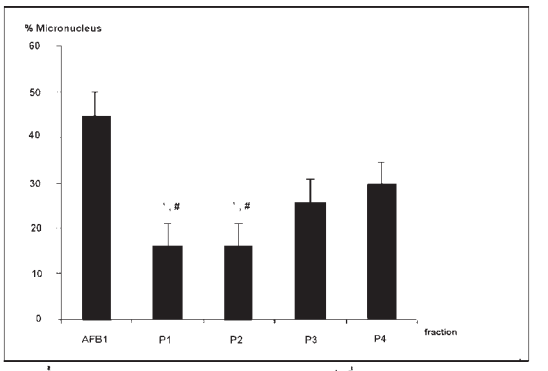


รูปที่ 3 ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อทดสอบกับสาร PAHs ที่สกัดจากน้ำมันถั่วเหลือง (n = 4)

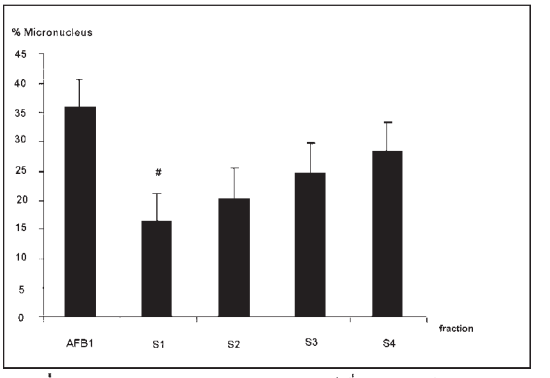
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อยีนด้วยวิธี Micronucleus assay

การเกิด Micronucleus (MN) ของเซลล์ที่ผ่านการทดสอบสารสกัดจากน้ำมันผลร้อยละการเกิดไมโครนิวเคลียสต่อไบนิวเคลียสเทียบกับ Positive control (Aflatoxin B1, AFB1) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพราะ AFB1 มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งและให้ผลเกิด Micronucleus อย่างชัดเจน ผลร้อยละการเกิดจำนวนไมโครนิวเคลียสต่อไบนิวเคลียส Positive control และสารสกัดจากน้ำมันปาล์มกับเซลล์ พบว่าเมื่อค่าร้อยละสารโพลาร์รวมของน้ำมันสูงขึ้น การเกิดไมโครนิวเคลียสจะเพิ่มขึ้นและ P1 กับ P2 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ P3 และ P4 ดังแสดงในรูปที่ 4

ผลร้อยละการเกิดจำนวนไมโครนิวเคลียสต่อไปนิวเคลียส positive control (Aflatoxin B1, AFB1) เช่นเดียวกับน้ำมันปาล์ม พบว่าเมื่อค่าร้อยละสารโพลาร์รวมของน้ำมันสูงขึ้นการเกิดไมโครนิวเคลียสจะเพิ่มขึ้นและ S1 จะมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ S4 ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 4 ร้อยละของการเกิด MN ของเซลล์เมื่อทดสอบกับสาร PAHs ที่สกัดจากน้ำมันปาล์ม (#, *p<0.001)
= แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ P4
* = เทียบกับแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ P3



รูปที่ 5 ร้อยละของการเกิด MN ของเซลล์เมื่อทดสอบกับสาร PAHs ที่สกัดจากน้ำมันถั่วเหลือง (# p<0.05)
เมื่อ # = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ S4

อภิปรายผลและสรุป

ผลการศึกษาเตรียมตัวอย่างน้ำมันดูความสัมพันธ์ของร้อยละของสารโพลาร์รวมกับเวลาในการทอด พบว่าเมื่อทอดแป้งโดยใช้น้ำมันสองชนิด คือ น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปาล์ม น้ำมันทั้งสองชนิดจะได้ค่าร้อยละของสารโพลาร์รวมสูงขึ้นเมื่อใช้เวลาทอดนานขึ้น แสดงว่าความร้อนมีผลในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของน้ำมัน ทำให้เกิดสารที่มีประจุและสารพิษที่ไม่พึงประสงค์ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพของน้ำมัน ยิ่งหากใช้เวลาทอดนานจะสามารถสังเกตและสัมผัสได้ถึงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำมัน คือ สีของน้ำมันจะเปลี่ยนไปมีสีเข้มขึ้น ควันและมีกลิ่นเหม็นเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของสารโพลาร์รวมของน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปาล์มจะเกิน 25 ใช้เวลาในการทอด 13 และ15 ชั่วโมงตามลำดับ ร้อยละ

ของสารโพลาร์รวมที่วัดได้ คือ 39.66±1.056 และ 29.54±2.234 พิสัยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 0.36-7.56 การเตรียมน้ำมันในการทดลองนี้เลือกใช้การทอดแป้งเพราะต้องการหลีกเลี่ยงความสกปรกและสิ่งรบกวนจากการทอดอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ และต้องการกำหนดค่าร้อยละสารโพลาร์รวมให้มีความใกล้เคียงกันจึงกำหนดค่าเป็นช่วงๆ แต่เนื่องจากอัตราเร็วในการเพิ่มของสารโพลาร์ในน้ำมันทั้งสองชนิดไม่เท่ากันดังนั้นจึงทำให้ผลการใช้เวลาในการทอดไม่เท่ากัน

การหาปริมาณ PAHs ของน้ำมันทั้งสองชนิดพบว่าเมื่อน้ำมันทอดซ้ำที่มีค่าร้อยละของสารโพลาร์รวมสูงขึ้น ปริมาณ PAHs ที่ตรวจพบจะสูงขึ้น (ตารางที่ 2) ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงมีค่าระหว่าง 0.990 - 0.999 กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 2.0 - 200 ng/μL ร้อยละของการสกัดได้อยู่ในช่วง 0.89 - 84.63 จากผลการทดลองแสดงว่าเมื่อน้ำมันได้รับความร้อนสูงเป็นเวลานานนอกจากจะเกิดสารโพลาร์เพิ่มขึ้นแล้วยังสามารถทำให้เกิดสารก่อมะเร็งกลุ่ม PAHs จากการทดลองพบว่าปริมาณ PAHs ที่ตรวจพบเพิ่มขึ้นตามค่าร้อยละของสารโพลาร์รวมซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณ PAHs ในน้ำมันทอดซ้ำที่มีสัมพันธ์กับเวลาในการทอด (Manoj et al., 2006)

จากผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 เมื่อได้รับสารสกัดจากน้ำมันทอดซ้ำแล้วทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการทำงานเอนไซม์ภายในไมโตรคอนเดรียของเซลล์ พบว่าน้ำมันทั้งสองชนิดที่มีค่าร้อยละของสารโพลาร์รวมสูงขึ้นจะส่งผลให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ HepG2 ลดลง แสดงว่าเมื่อร้อยละของสารโพลาร์รวมสูงขึ้นจะทำให้น้ำมันเกิดการเสื่อมสภาพและเกิดการสะสมของสารพิษที่มีอันตรายต่อเซลล์ โดยเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดที่ได้จากน้ำมันปาล์มที่ค่าร้อยละของสารโพลาร์เกิน 25 ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.001$ แสดงว่าสารที่สกัดได้มีความพิษต่อเซลล์เพราะสามารถทำให้เซลล์ตายได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ทดสอบกับ DMSOในปริมาณที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สารสกัดจากน้ำมันทำให้เซลล์ตายได้อาจเกิดจากการเข้าทำลายโดยตรงจากความแรงของสารหรืออาจทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเจนโดยไปเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระที่ส่วนต่างๆ ของเซลล์ทำให้เซลล์เสียหายหรือเสียสภาพ (Halliwell and Gutteridge,1998) ในกรณีการทดสอบกับสารสกัดน้ำมันถั่วเหลืองพบว่าภายหลังการบ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์กลับมีจำนวนสูงขึ้นอาจแสดงถึงการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตรอดจนได้จำนวนเซลล์ที่สูงกว่าการบ่มเพาะกับสารสกัดเป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ปรากฏการณ์ดังกล่าวไม่พบในการทดสอบด้วยสารสกัดจากน้ำมันปาล์มที่ยังคงแสดงจำนวนเซลล์ที่ลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเซลล์นานขึ้น จากผลการทดสอบยังได้แสดงว่าเวลาในการทดสอบจะมีผลต่อการเกิดพิษต่อเซลล์ด้วย เพราะนอกจากความเข้มข้นของสารพิษที่สกัดได้อาจจะได้ปริมาณไม่เท่ากันเพราะการทดลองนี้ใช้ค่าโพลาร์เป็นตัวแบ่งกลุ่มของน้ำมันซึ่งค่าโพลาร์เป็นเพียงค่าที่บอกถึงการเสื่อมสภาพของน้ำมันเท่านั้น ไม่ได้บงชี้ถึงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรง เวลาจะมีผลเพราะการทดลองนี้สามารถที่จะทำให้เซลล์ได้รับสารที่ต้องการทดสอบได้โดยละลายใน DMSO ในร้อยละที่ไม่สูงเกินกว่าความเข้มข้นของ DMSO ที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ คือไม่เกินร้อยละ 0.2 (ณัฐถากรณ์, 2550) ดังนั้นหากสารที่สกัดได้มีความเป็นพิษน้อยหรือมีการกลไกการเกิดพิษที่ยาวนาน ย่อมส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลการทดลอง โดยเมื่อสารพิษมีความเข้มข้นน้อยเมื่อใช้เวลาทดสอบยาวนานขึ้นเซลล์อาจมีการเจริญเติบโตขึ้นอีก ทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นจึงควรทำการทดสอบวิธีอื่นๆ ควบคู่ไปด้วยเพื่อความมั่นใจในผลการทดลอง

จากผลการทดสอบความเป็นพิษทางพันธุกรรมของเซลล์ เมื่อได้ทดสอบเซลล์กับสารสกัดจากน้ำมันทอดซ้ำด้วยวิธีไมโครนิวเคลียส ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการผิดปกติหรือเสียหายต่อดีเอ็นเอพบว่าน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปาล์มที่มีค่าร้อยละของสารโพลาร์รวมสูงขึ้นร้อยละการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ HepG2 จะเพิ่มขึ้นและที่ระดับค่าร้อยละของสารโพลาร์รวมสูงเกินร้อยละ 25 จะมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.001$ และ $p<0.05$ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อน้ำมันที่มีค่าร้อยละของสารโพลาร์รวมสูงขึ้น ความเป็นพิษทางพันธุกรรมก็จะสูงขึ้นด้วย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารที่สกัดได้จากน้ำมันทอดซ้ำนั้น มีความเป็นพิษซึ่งมีสัมพันธ์กับค่าร้อยละของสารโพลาร์รวมเพราะมีความเป็นพิษต่อ

กลไกการทำงานของเซลล์ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายหรือเสียสภาพจนเกิดการตายของเซลล์ในที่สุด พิสูจน์ให้เห็นชัดยิ่งขึ้นเมื่อทดสอบความเป็นพิษทางพันธุกรรม พบว่าสามารถสร้างความเสียหายต่อดีเอ็นเอและทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม โดยวัดปริมาณเซลล์ที่เกิดความเสียหายของนิวเคลียสในขั้นตอนการแบ่งเซลล์ เมื่อเกิดความเสียหายทางพันธุกรรมขึ้นหากระบบการจัดการของร่างกายไม่สามารถรักษาได้ อาจทำให้เกิดความผิดปกติหรือการเกิดมะเร็งในที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้มอบทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ และคณะเภสัชศาสตร์ที่ได้มอบทุนส่งเสริมบัณฑิตศึกษาตลอดการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

ณัฐถากรณ์ รังสร้อย. *ผลเพิ่มภาวะออกซิเดชันและผลลดภาวะออกซิเดชันของกรดเอลฟ่าไลโพอิกในเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยอะฟลาทอกซินบีวัน* [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพิษวิทยา]. ขอนแก่น: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2550.

Conserving oil quality [online]. 2005. [cited 2009 Feb 24]. Available from http://www.asiafoodjournal.com

Dobarganes MC, Velasco J, Dieffenbacher A. Determination of polarcompounds, polymerizeds and oxidized diacylglycerols and triacylglycerols in oils and fats. *Pure Appl Chem* 2000; 72: 1563-1575.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Can oxidation DNA damage be used as abiomarker of cancer risk in humans problems, resolution studies. *Free Radical Research* 1998; 29: 469-486.

Hodgeson JW. Polycyclic aromatic hydrocarbons: EPA method 550.1. *US Environmental Protection Agency* 1990; 143.

Howard JW, Fazio T, White RH. Polycyclic aromatic hydrocarbon in solvent use in extraxct edible oils. *J Agr Food Chem* 1994; 2: 5-7.

Manoj K, Padey A, ditya B, Pant MD. In vitro cytotoxicity of polycyclicaromatic hydrocarbon residuesarising through repeated fish fried oil in human hepatoma Hep G2 cell line. *Toxicology in Vitro* 2006; 20: 308-316.

Ramesh M, et al. Bioaviability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbon. *J Toxicol* 2004; 23: 301-333.

Valentin-Severin I, Le Hegarat L, Lhuguenot JC, Le Bon AM, Chagnon MC. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research* 2003; 536: 79-90.