การทดสอบหาชนิดของกรดไขมันในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี

Determination of Fatty Acid Profiles in Vegetable Oils and Animal Fats Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry

วราภรณ์ รัศมีผะกาย[1*]
Waraporn Ratsameepakai[1*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ พัฒนาวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรีสำหรับทดสอบหาองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ กรดไขมันถูกเตรียมให้อยู่ในรูปของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน การระบุชนิดของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ในตัวอย่างโดยเปรียบแมสสเปกตรัมและค่ามวล/ประจุซึ่งแสดงความเป็นเอกลักษณ์ของกรดไขมันแต่ชนิดกับฐานข้อมูลมาตรฐาน NISTและWiley ผลการทดสอบพบว่ากรดไขมันอิ่มตัวมีมากที่สุดในน้ำมันมะพร้าวประมาณ 90% ของกรดไขมันทั้งหมด น้ำมันคาโนลา น้ำมันมะกอก น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์มโอเลอิน น้ำมันไก่ และน้ำมันหมู มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง ประมาณ 41 ถึง65% ของกรดไขมันทั้งหมด น้ำมันข้าวโพด น้ำมันอีฟนิงพริมโรส น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันดอกสตาร์ฟลาวเวอร์ และน้ำมันปลามีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่มากกว่า 1 ตำแหน่ง ประมาณ 50-75% ของกรดไขมันทั้งหมด น้ำมันปลามีกรดไขมันแตกต่างจากตัวอย่างชนิดอื่น ๆ มีกรดไขมันอีโคซะเพนตะอีโนอิกและกรดไขมันโดโคซะเฮกซะอีโนอิก 30 และ 24% ตามลำดับ วิธี GC-MS ที่พัฒนาขึ้นสามารถทดสอบชนิดกรดไขมันในตัวอย่างน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ได้และสามารถระบุคู่ไอโซเมอร์กรดไขมันได้ นอกจากนั้น GC-MS ให้ข้อมูลองค์ประกอบของธาตุและโครงสร้างของกรดไขมันแต่ละชนิดได้ วิธี GC-MS เหมาะสำหรับนำมาใช้ในงานประจำและสามารถประยุกต์ใช้ในการหาองค์ประกอบของกรดไขมันในตัวอย่างอื่น ๆ ได้

คำสำคัญ: กรดไขมัน แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี น้ำมันพืช ไขมันสัตว์

Abstract

The purpose of this research was to develop the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for identification and determination of the fatty acid (FA) profiles in vegetable oils and animal fats. FAs were converted into fatty acid methyl esters (FAMEs) by transesterification. FAMEs identification in the samples was performed by comparison of the mass spectrum and the mass/charge (m/z) ratio characteristic of each FAME component with the reference NIST and Wiley libraries. The results of the experiment showed

that, the highest content of saturated fatty acids approximately 90% of the total fatty acid, was found in the coconut oil. And canola, olive, rice bran, palmolein, chicken and lard oils presented a total monounsaturated FAMEs ranging from 41 to 65% of the total fatty acid. Corn, evening primrose, sesame, soybean, sunflower, starflower and fish oils have polyunsaturated fatty acids approximately 50-75% of the total fatty acid. Fish oil presented differently from the others by presenting amount of eicosapentaenoic acid and

[1] สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110
[1] Office Of Scientific Instrument and Testing, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110
*Corresponding author: e-mail: waraporn.ra@psu.ac.th

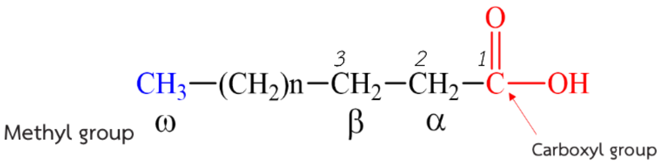
***Received:** April 11, 2020, **Accepted:** July 26, 2020, **Published:** September 24, 2020*

docosahexaenoic acid 30 and 24%, respectively. The developed GC–MS method is capable of analyzing FAs in vegetable oils and animal fats, and allows identification of different isomers. Moreover, the GC–MS method provides the elemental composition and structural information. Then, the GC-MS method is suitable for routine analysis of the FAs profiles, and can also be applied for the FAs profile in other samples.

Keywords: Fatty Acids, Gas chromatography-Mass Spectrometry, Vegetable Oils, Animal Fats

บทนำ

กรดไขมันมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมเป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ และทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย (Rustan and Drevon, 2005) ได้มีรายงานการนำกรดไขมันไปใช้เป็นองค์ประกอบสำคัญในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายประเภท เช่น สบู่ (Kuntom *et al*., 1996) สารลดแรงตึงผิว น้ำมันหล่อลื่นพลาสติไซเซอร์ สี สารเคลือบ อาหาร ยา ผลิตภัณฑ์ดูแลส่วนบุคคล ไบโอดีเซล (Satyarthi *et al.,* 2011) และเครื่องสำอาง (Zielińska and Nowak, 2014) จากประโยชน์ที่หลากหลายของกรดไขมันทำให้มีการศึกษาหาองค์ประกอบของกรดไขมันในตัวอย่างหลากหลายชนิด ทั้งในพืชน้ำมัน (Guil-Guerrero *et al*., 2001) เนื้อสัตว์ (Janiszewski *et al*., 2016) จุลินทรีย์ *(Cho et al*., 2020) และสาหร่าย (Liu *et al*., 2016) กรดไขมันมีโครงสร้างทางเคมี (ภาพที่ 1) ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม (Carbon atom, C) ไฮโดรเจนอะตอม (Hydrogen atom, H) และออกซิเจนอะตอม (Oxygen atom, O) จัดเรียงต่อกันเป็นสายโซ่คาร์บอน ปลายด้านหนึ่งเป็นหมู่เมทิล (Methyl group,-CH_3) เรียกว่า โอเมก้า (Omega, ω) และปลายอีกด้านหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิล(-COOH) (Rustan and Drevon, 2005) ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมถัดจากหมู่คาร์บอกซิล เรียกว่า แอลฟา (alpha, α) คาร์บอน ถัดจากแอลฟาคาร์บอนเรียกว่า เบต้า (beta, β) คาร์บอน คาร์บอนอะตอมของหมู่คาร์บอกซิล เป็นคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ถัดมาเป็น C2 และ C3 ตามลำดับจนถึงปลายของหมู่เมทิล

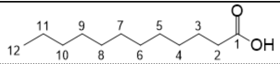
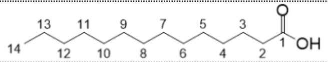
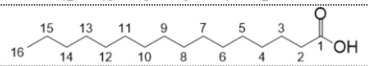
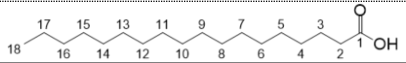
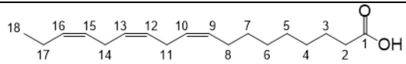
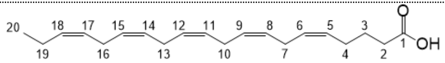
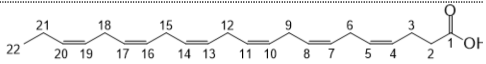
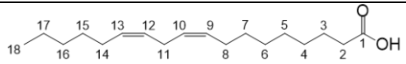
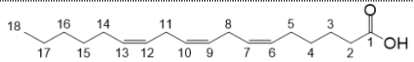
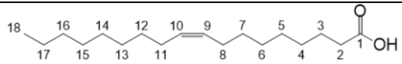
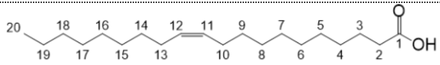


ภาพที่ 1 โครงสร้างทั่วไปของกรดไขมันและการระบุตำแหน่งคาร์บอนของกรดไขมัน

กรดไขมันแบ่งตามชนิดของพันธะในสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนของโมเลกุลกรดไขมันเป็น 2 ชนิด ชนิดแรกคือกรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acids, SFAs) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะระหว่างคาร์บอนอะตอม (C-C) เป็นพันธะเดี่ยวทั้งหมด กรดไขมันอิ่มตัวที่เกิดขึ้นในธรรมชาติมีโครงสร้างเป็นแบบโซ่ตรง มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ ส่วนใหญ่ที่พบมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่อยู่ในช่วง C12-C22 (Rustan and Drevon, 2005) ชนิดที่สองคือกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acids, UFAs) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนอะตอม (C=C) หนึ่งตำแหน่ง (Monounsaturated fatty acids, MUFAs) หรือมีจำนวนพันธะคู่ตั้งแต่สองตำแหน่งหรือมากกว่า (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เกิดขึ้นในธรรมชาติโดยส่วนใหญ่มีโครงร่างเป็นแบบซิส (*cis*-configuration) คือไฮโดรเจนอะตอมจับกับคาร์บอนอะตอมที่ตำแหน่งพันธะคู่อยู่ในทิศทางเดียวกัน แต่ถ้าไฮโดรเจนอะตอมอยู่ในตำแหน่งด้านตรงกันข้ามเรียกโครงร่างแบบทรานส์ (trans-configuration) นอกจากนั้นกรดไขมันยังสามารถจำแนกตามความจำเป็นของร่างกายได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือกรดไขมันไม่จำเป็น (Non-essential fatty acids) เป็นกรดไขมันที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ เช่น กรดปาล์มิติก (Plamitic acid) กลุ่มที่ 2 กรดไขมันจำเป็น (Essential fatty acids) เป็นกรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองเช่น กรดไขมันอีโคซะเพนตะอีโนอิก (Eicosapentaenoic acid, EPA) และ กรดไขมันโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (Docosahexaenoic acid, DHA) เป็นกรดไขมันชนิดโอเมก้า 3 (Omega-

3) และกรดไขมันลิโนลีอิก (Linoleic acid, C18:2) เป็นกรดไขมันชนิดโอเมก้า 6 (Omega-6) (Das, 2006) ตารางที่ 1 แสดงการเรียกชื่อกรดไขมัน ชื่อสามัญ ชื่อตาม International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ชื่อย่อ และโครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว

ตารางที่ 1 ตัวอย่างชื่อสามัญ ชื่อ IUPAC ชื่อย่อ และโครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว

ชื่อสามัญ	ชื่อ IUPAC	ชื่อย่อ	โครงสร้างทางเคมี
กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid, SFAs)			
Lauric acid	Dodecanoic acid	C12:0	
Myristic acid	Tetradecanoic acid	C14:0	
Palmitic acid	Hexadecanoic acid	C16:0	
Stearic acid	Octadecanoic acid	C18:0	
กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโอเมก้า 3 (Polyunsaturated fatty acids: omega-3 fatty acids)			
α-Linolenic acid	(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoic acid	C18:3 (C18:3ω3)	
Eicosapentaenoic acid (EPA)	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenoic acid	C20:5 (C20:5ω3)	
Docosahexaenoic acid (DHA)	(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid	C22:6 (C22:6ω3)	
กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโอเมก้า 6 (Polyunsaturated fatty acids: omega-6 Fatty Acids)			
Linoleic acid	(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoic acid	C18:2 (C18:2ω6)	
gamma (γ)-Linolenic acid	(6Z,9Z,12Z)-octadeca-6,9,12-trienoic acid	C18:3 (C18:3ω6)	
กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโอเมก้า 9 (Monounsaturated fatty acids, MUFAs)			
Oleic acid	(Z)-Octadec-9-enoic acid	C18:1 (C18:1ω9)	
Gondoic acid	(Z)-Icos-11-enoic acid	C20:1 (C20:1ω9	

การเตรียมตัวอย่างน้ำมันเพื่อทดสอบหาชนิดกรดไขมัน (Fatty acid profiles) โดยการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของน้ำมัน/ไขมันซึ่งอยู่ในรูปของไตรกลีเซอร์ไรด์หรือไตรกลีเซอรอล ให้อยู่ในรูปของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (Fatty Acid Methyl Esters, FAMEs) สามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น “rapid” transmethylation เป็นการเตรียมกรดไขมันให้อยู่ในรูปของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ภายใต้สภาวะที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา “general” transmethylation/methylation เป็นวิธีการเตรียมภายใต้สภาวะที่ใช้เบสและกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาตามลำดับ การเตรียมกรดไขมันให้อยู่ในรูปของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์โดยใช้ Boron trifluoride (BF_3) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และ Acid-catalysed transmethylation of glycerides (ISO 12966-2, 2017) กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ ถูกทดสอบโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-เฟลมไอออไนเซชัน (Gas chromatography-Flame ionization, GC-FID) ร่วมกับตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (Fame Ionization

Detector, FID) ซึ่ง GC-FID เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้าง (Kuntom *et al*., 1996; Zhang *et al*., 2015; Pereira *et al*., 2018)

ปัจจุบันสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้เปิดให้บริการทดสอบเพื่อหาองค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างหลากหลายชนิด เช่น ส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืชน้ำมัน (เมล็ด ใบ) เนื้อสัตว์ จุลินทรีย์ สาหร่าย โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีควบคู่กับตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน GC-FID ถึงแม้ว่า GC-FID เป็นเครื่องมือที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับทดสอบกรดไขมัน เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ มีความทนทาน ต้นทุนในการทดสอบต่ำ แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค GC-FID มีข้อจำกัดคือต้องมีสารมาตรฐานของกรดไขมันในรูปของ FAMEs เพื่อเทียบค่ารีเทนชันไทม์ (Retention time, RT) กรณีที่มีสารมาตรฐานไม่ครอบคลุมกรดไขมันทั้งหมดหรือในกรณีที่มีคู่ไอโซเมอร์ของกรดไขมันทำให้ไม่สามารถระบุชนิดของกรดไขมันได้อย่างถูกต้อง อีกทั้งกรณีตัวอย่างที่มีตัวรบกวนซับซ้อนการระบุพีคของกรดไขมันก็มีความยุ่งยาก

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีทดสอบหาองค์ประกอบของกรดไขมัน โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี ใช้หลักการไอออไนเซชันแบบอิเล็กตรอนไอออไนเซชัน (Electron Ionization, EI) และตรวจวัดมวลต่อประจุของไอออน (mass-to-charge, *m/z*) ที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องวัดมวลแมสสเปกโทรมิเตอร์ (Mass Spectrometer, MS) ชนิด Single Quadrupole เพื่อดูลักษณะแมสสเปกตรัมของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์แต่ละชนิดเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐาน และระบุโครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์แต่ละชนิดได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารมาตรฐานในการเทียบค่ารีเทนชันไทม์ และสามารถระบุพีคของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ได้อย่างถูกต้อง กรณีมีตัวรบกวนการทดสอบที่ซับซ้อนหรือกรณีที่มีคู่ไอโซเมอร์ของกรดไขมัน

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบหาองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์โดยใช้เทคนิค GC-MS
2. เพื่อเพิ่มศักยภาพและขยายขอบเขตการให้บริการการทดสอบหาองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในตัวอย่างหลากหลายชนิด

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 15 ชนิด เป็นน้ำมันพืช 11 ชนิด ประกอบด้วย น้ำมันมะพร้าว (Coconut oil)น้ำมันข้าวโพด (Corn oil) น้ำมันคาโนลา (Canola oil) น้ำมันอีฟนิงพริมโรส (Evening primrose oil) น้ำมันมะกอก (Olive oil)น้ำมันปาล์มโอเลอิน (Palmolein oil) น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil) น้ำมันรำข้าว (Rice bran oil) น้ำมันงา (Sesame oil) น้ำมันดอกสตาร์ฟลาวเวอร์ (Starflower oil) น้ำมันดอกทานตะวัน (Sunflower oil) น้ำมันจากสัตว์ 3 ชนิด ประกอบด้วย น้ำมันปลา (Fish oil) น้ำมันไก่ (Chicken oil) น้ำมันหมู (Lard) และเนยผสม (blended butter) 1 ชนิด กรณีน้ำมันดอกสตาร์ฟลาวเวอร์ น้ำมันอีฟนิงพริมโรส และน้ำมันปลา เป็นน้ำมันที่ใช้เป็นอาหารเสริมอยู่ในรูปแคปซูล น้ำมันไก่และน้ำมันหมูได้จากการเจียวหนังไก่และหนังหมูตามลำดับ ลักษณะตัวอย่างต้องเป็นของเหลว ใส ไม่มีน้ำผสม ถ้าตัวอย่างเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง เช่น ไขมันสัตว์ และเนยผสม ใช้วิธีการอุ่นตัวอย่างในอ่างอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิประมาณ 30-37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวอย่างมีลักษณะเป็นของเหลว

2. สารเคมีและการเตรียมกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (Fatty Acid Methyl Esters, FAMEs) โดยวิธี Transesterificationอ้างอิงและดัดแปลงจาก Jham *et al*. (1982) และ ISO 12966-2 (2017)

โดยธรรมชาติกรดไขมันในน้ำมันและไขมันสัตว์จะอยู่ในรูปของไตรกลีเซอร์ไรด์ (Triglycerides, TAGs) ซึ่งมีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ มีความสามารถในการระเหยกลายเป็นไอได้น้อย ดังนั้นต้องทำอนุพันธ์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์และลดความมีขั้วของไตรกลีเซอไรด์ให้อยู่ในรูปของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (Fatty Acid Methyl Esters, FAMEs) ก่อนที่จะทดสอบด้วยเทคนิค GC-MS ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันถูกนำมาใช้เพื่อเปลี่ยนไตรกลีเซอร์ไรด์ ให้อยู่ในรูปของ FAMEs ภายใต้สภาวะที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Alkaline-catalysed) และตามด้วยกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2.1 สารเคมี ประกอบด้วย เมทานอล (Methanol, MeOH) น้ำกลั่น โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide, KOH) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) ปิโตรเลียมอีเทอร์จุดเดือด 40-60 องศาเซลเซียส (Petroleum ether, bp 40-60 °C) เฮปเทน (Heptane) โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Sodium sulfate anhydrous, Na_2SO_4) แก๊สไนโตรเจน (Nitrogen gas, high purity grade) เตรียมสารละลาย 0.5 โมลาร์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล และเตรียมสารละลายผสมของกรดไฮโดรคลอริกในเมทานอลอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร (HCl:MeOH, 4:1 v/v)

2.2 การเตรียมอนุพันธ์กรดไขมันให้อยู่ในรูปของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ ชั่งตัวอย่างน้ำมันประมาณ 50 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดปฏิกิริยาขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.5 โมลาร์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดปฏิกิริยาให้สนิท เขย่าเพื่อให้สารละลายเข้ากันด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 1 นาที นำหลอดปฏิกิริยาวางในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoreactor) ให้ความร้อนกับหลอดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำหลอดปฏิกิริยาออกจากเครื่องควบคุมอุณหภูมิ เติมสารละลายผสมของกรดไฮโดรคลอริกในเมทานอล (อัตราส่วน HCl:MeOH (4:1 v/v)) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (Vortex) เป็นเวลา 1 นาที นำหลอดปฏิกิริยาวางในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดปฏิกิริยาออกจากเครื่องควบคุมอุณหภูมิ วางทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเพื่อลดอุณหภูมิของหลอดปฏิกิริยา ขั้นตอนนี้จะสังเกตเห็นหยดน้ำมันเกิดขึ้นในหลอดปฏิกิริยา จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างโดยเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 3 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดปฏิกิริยา สังเกตสารละลายเกิดการแยกเป็นสองชั้น ชั้นล่างเป็นชั้นน้ำ ส่วนชั้นบนเป็นปิโตรเลียมอีเทอร์ ดูดสารละลายชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ซึ่งอยู่ชั้นบนใส่ในขวดเก็บสารละลาย และทำการสกัดซ้ำด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 3 มิลลิลิตร อีกครั้ง ขั้นตอนการดูดสารละลายจะต้องทำอย่างระมัดระวัง โดยให้ปลายทิปอยู่ในชั้นสารละลายชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ (ชั้นบน) และค่อย ๆ ดูดสารละลายไม่ให้สารละลายในชั้นน้ำปนเปื้อน เก็บสารละลายชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์รวมเข้าด้วยกัน เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Sodium sulfate anhydrous, Na_2SO_4) ในสารละลายที่สกัดได้เพื่อกำจัดน้ำซึ่งอาจจะปนเปื้อนในขั้นตอนของการดูดสารละลาย ดูดสารละลายที่ผ่านการกำจัดน้ำออกแล้ว ใส่ขวดเก็บสารละลาย จากนั้นระเหยสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนจนกระทั่งสารละลายแห้ง ส่วนที่เหลืออยู่มีลักษณะเป็นหยดน้ำมัน เติมทำละลายเฮปเทน 1 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้ Vortex ดูดสารละลายที่ได้ใส่ขวดขนาด 2 มิลลิลิตรสำหรับฉีดเข้าเครื่อง GC-MS

2.3 เครื่องมือและสภาวะการทดสอบ กรดไขมันซึ่งอยู่ในรูปของ FAMEs ถูกทดสอบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ-แมสสเปกโทรมิเตอร์ (GC-MS) รุ่น Thermo Scientific™ ISQ™ single quadrupole mass spectrometer และเครื่อง GC-MS รุ่น 5977B ยี่ห้อ Agilent ซึ่งมีรายละเอียดดังตารางที่ 2

2.4 วิธีการระบุชนิดกรดไขมันและการคำนวณองค์ประกอบของกรดไขมัน การระบุชนิดกรดไขมันซึ่งอยู่ในรูปของ FAME ถูกระบุโดยลักษณะแมสสเปกตรัมของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์แต่ละชนิดเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST and Wiley คะแนนความเหมือนของแมสสเปกตรัมต้องมากกว่า 90% สำหรับการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันแต่ละชนิดเทียบกับกรดไขมันทั้งหมดที่พบ ดังนั้นพีคของสารที่ไม่สามารถระบุได้ (Unknown) จะไม่ถูกนำมารวมในผลรวมของพื้นที่ใต้พีคทั้งหมด การคำนวณกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์แต่ละชนิดในรูปของสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค (Area Fraction) แสดงดังสูตรการคำนวณด้านล่าง

$$x_i = \frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

เมื่อ x_i คือ เปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้พีคของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์แต่ละชนิด

A_i คือ พื้นที่ใต้พีคของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์แต่ละชนิด

$\sum A$ คือ ผลรวมของพื้นที่ใต้พีคของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ทั้งหมด

2.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าวิธีการทดสอบที่ได้พัฒนาและดัดแปลงขึ้น สามารถตรวจวัดสารประกอบกรดไขมันได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นได้ทำการทดสอบสารมาตรฐานของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จำนวน 37 องค์ประกอบ (Food Industry FAME Mix) Cat.# 35077. ยี่ห้อ Restek

ตารางที่ 2 สภาวะของเครื่อง GC-MS สำหรับการทดสอบกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์

สภาวะของ GC	
Capillary column:	VF-WAXms, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm ยี่ห้อ Agilent J&W
Carrier gas:	Helium, 1.0 mL/min
Injector temperature:	250 ^{o}C
Split mode	50:1
Oven programmed temperature:	120 ^{o}C to 250 ^{o}C with 4 ^{o}C/min, hold time at final temp 7 min
Injection volume	1 μL

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สภาวะของ MS	
Transfer line temperature	250 ^{o}C
Ion source temperature	230 ^{o}C
Solvent delay time	2 min
Scan mass range	35-500 amu

ผลการวิจัย

เพื่อให้มั่นใจเกี่ยวกับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง FAMEs และผลการทดสอบมีความถูกต้องน่าเชื่อถือทางห้องปฏิบัติทดสอบได้เลือกการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญซึ่งจัดโดยสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ การเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญเป็นกระบวนการการควบคุมคุณภาพจากภายนอก (External quality control) น้ำมันพืชที่ใช้เป็นตัวอย่างของโปรแกรมทดสอบความชำนาญครั้งนี้ ประกอบด้วยกรดไขมัน 5 ชนิด คือ กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) กรดลิโนเลอิก (C18:2) และกรดลิโนเลนิก (C18:3) เนื่องจากเป็นกรดไขมันที่ไม่ซับซ้อน ทางห้องปฏิบัติการเลือกทดสอบด้วยเครื่อง GC-FID ผลการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงการให้ค่าสัดส่วนกรดไขมัน (%Peak area) ประเมินสมรรถนะของห้องปฏิบัติการโดยใช้ Zeta-scores $|\zeta|$ จากผลการประเมินพบว่ากรดไขมันทั้ง 5 ชนิด ให้ค่า $|$zeta-scores $|\zeta| \leq 2$ แสดงว่าผลการทดสอบเป็นที่น่าพอใจ “Satisfactory” ดังแสดงในตารางที่ 3

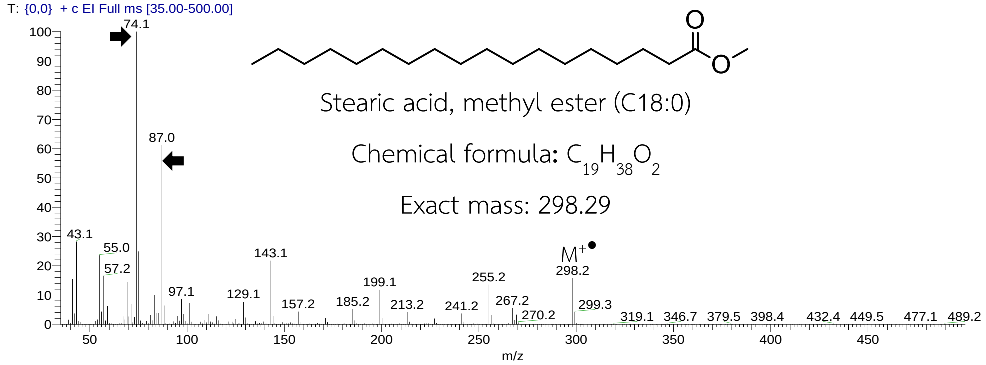
ตารางที่ 3 แสดงผลการประเมินความชำนาญการวัดสัดส่วนกรดไขมัน 5 ชนิด ในตัวอย่างน้ำมันพืช

พารามิเตอร์	**Palmitic acid (C16:0)**	**Stearic acid (C18:0)**	**Oleic acid (C18:1)**	**Linoleic acid (C18:2)**	**Linolenic acid (C18:3)**
%Peak area	11.48	4.02	25.98	53.44	5.07
Uncertainty @95% CI (k=2)	0.02	0.01	0.06	0.17	0.01
Zeta-scores	0.20	-0.50	1.34	0.14	-1.25
Interpretation	Satisfactory	Satisfactory	Satisfactory	Satisfactory	Satisfactory

ที่มา: รายงาน Proficiency Testing Report การวิเคราะห์สัดส่วนกรดไขมันในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ (Determination of Fatty acid Profiles in Edible Oil) ฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพ สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (2562)

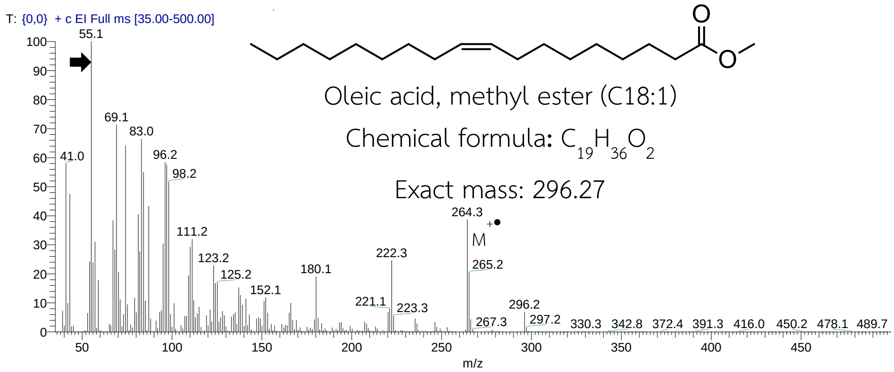
ผลจากการทดสอบหาองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ โดยการเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำมันหรือไขมันซึ่งอยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ให้อยู่ในรูปของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ โดยผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและทดสอบโดยใช้เทคนิค GC-MS แบบอิเล็กตรอนไอออไนเซชัน พบว่าลักษณะของแมสสเปกตรัมที่ได้จากกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์อิ่มตัว กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ชนิดไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ชนิดไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ชนิดไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 3 ตำแหน่ง และกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ชนิดไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่มากกว่า 3 ตำแหน่ง มีลักษณะของแมสสเปกตรัมที่แตกต่างกัน ตัวอย่างแมสสเปกตรัมของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 และ C20:5 มีลักษณะแมสสเปกตรัมดังภาพที่ 2-6 แมสสเปกตรัมของกรดไขมันอิ่มตัว Stearic acid, methyl ester (C18:0) แสดงไอออนโมเลกุล (Molecular ion, $M^{+\bullet}$) ที่ *m/z* 298.2 ไอออนที่ *m/z* 267.2 เกิดจากการหลุดของหมู่ methoxyl ($-O-CH_3$) มวลอะตอมเท่า 31 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเป็นกรดไขมัน

เมทิลเอสเทอร์ ไอออนที่ *m/z* 74 $[CH_3OCHOHCO(CH_2]^+$ เป็นแม็กแลฟเฟอทีไอออน (McLafferty Ion) (Christie, 2018) เกิดจากการแตกพันธะและจัดเรียงตัวใหม่แบบแม็กแลฟเฟอที (McLafferty Rearrangement) ไอออนที่ *m/z* 74 มีความเข้มของสัญญาณสูงที่สุด เรียกว่าเบสพีก (base peak) เป็นไอออนที่มีความเสถียรและมีความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ (Relative abundance) เป็น 100% ไอออนที่ *m/z* 87 $[(CH_2)_2COOCH_3]^+$ เกิดจากการแตกพันธะตำแหน่งแอลฟา ซึ่งเป็นไอออนที่มีความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์รองจากไอออนที่ m/z 74 ความสัมพันธ์ของไอออนที่ *m/z* 74 และ 87 แสดงความเป็นเอกลักษณ์ของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ชนิดอิ่มตัว (ภาพที่ 2)



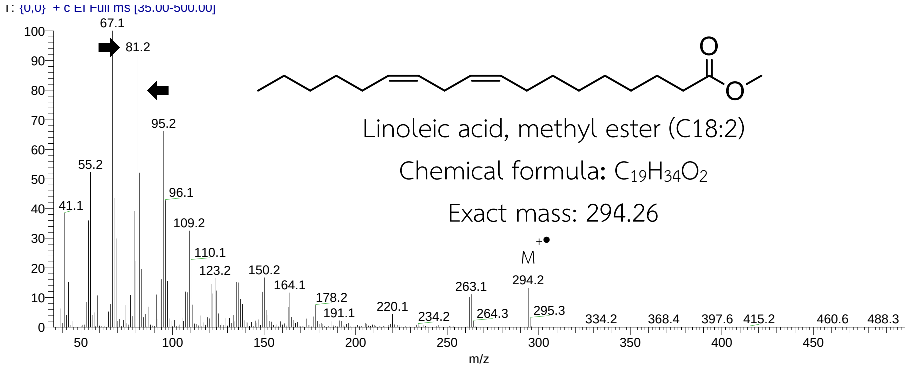
ภาพที่ 2 แมสสเปกตรัมของ Stearic acid, methyl ester (C18:0)

แมสสเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว Oleic acid, methyl ester (C18:1) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง แสดงไอออนโมเลกุลที่ m/z 296.2 และไอออนที่ m/z 55 ของ $[C_4H_7]^+$ เป็น base peak ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง (ภาพที่ 3)



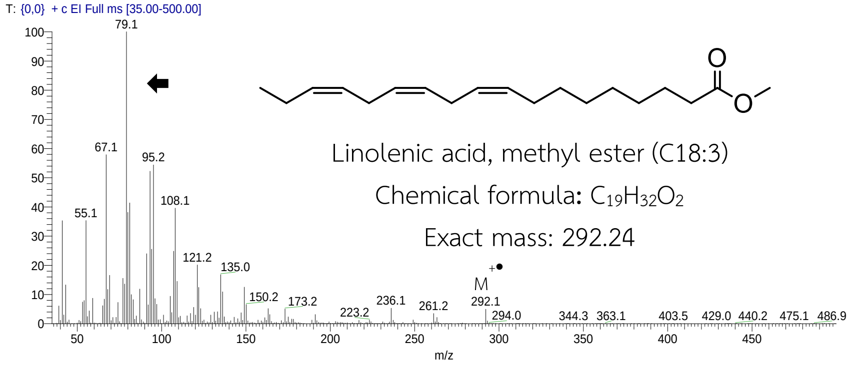
ภาพที่ 3 แมสสเปกตรัมของ Oleic acid, methyl ester (C18:1)

สำหรับเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง Linoleic acid, methyl ester (C18:2) จะได้ไอออนที่ *m/z* 67 ของ $[C_5H_7]^{+1}$ เป็น base peak ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง ไดอีน (dienes) (ภาพที่ 4)

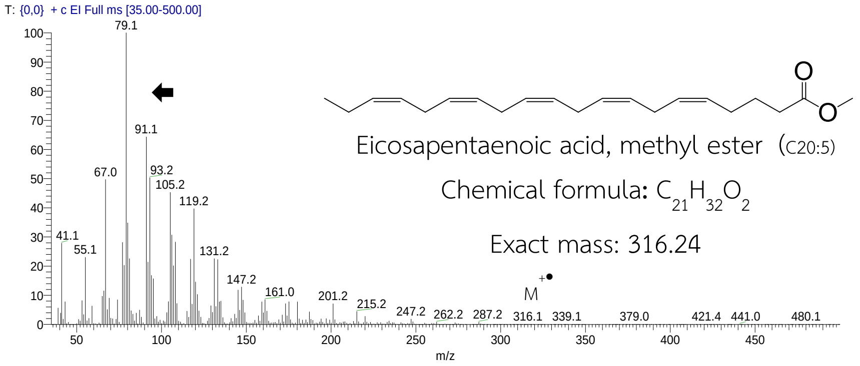


ภาพที่ 4 แมสสเปกตรัมของ Linoleic acid, methyl ester (C18:2)

สำหรับแมสสเปกตรัมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำนวนพันธะคู่ 3 ตำแหน่ง เช่น Linolenic acid, methyl ester (C18:3) (ภาพที่ 5) หรือ Eicosapentaenoic acid, methyl ester (C20:5n3 หรือ EPA) (ภาพที่ 6) มีจำนวนพันธะคู่มากกว่า 3 ตำแหน่ง แสดงไอออนที่ *m/z* 79 ของ $[C_nH_{2n-5}]^{+1}$ เมื่อ n เท่ากับ 6 เป็น base peak สำหรับ C20:5n3 หรือ EPA ปรากฏเส้นไอออนโมเลกุลที่ *m/z* 316 ที่มีความเข้มของสัญญาณน้อยมาก ซึ่งอาจจะต้องพิจารณาจากเส้นไอออนที่ *m/z* 91 มีสูตรโมเลกุลอนุกรมของ $[C_nH_{2n-5}]^{+1}$ เมื่อ n = 7 ซึ่งอยู่ในภาพของโทรไพเลียมแคตไอออน (Tropylium cation) ที่เสถียร (Christie, 2018) และมีความอุดมสมบูรณ์สัมพัทธ์ (Relative abundance) รองจากไอออนที่ *m/z* 79



ภาพที่ 5 แมสสเปกตรัมของ Linolenic acid, methyl ester (C18:3)



ภาพที่ 6 แมสสเปกตรัมของ Eicosapentaenoic acid, methyl ester (C20:5)

นอกจากนั้นแมสสเปกตรัมของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์แต่ละชนิดเปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมจากฐานข้อมูล NISTและWiley เพื่อระบุโครงสร้างและชนิดของกรดไขมัน ดังนั้นเทคนิค GC-EI/MS สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างที่ซับซ้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

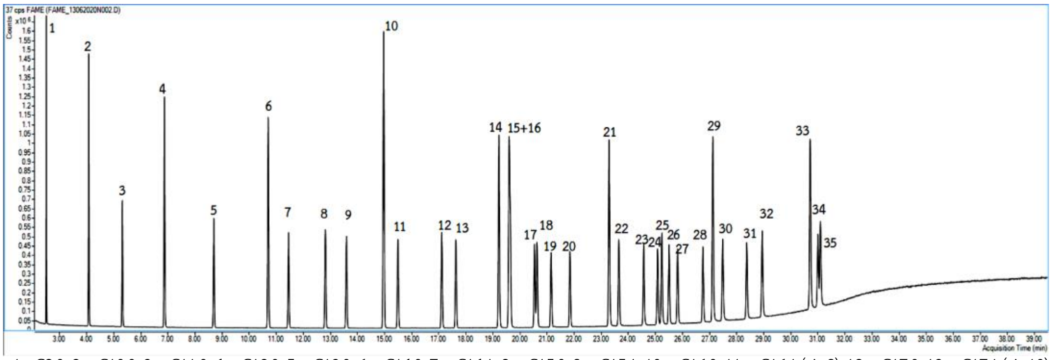
ในน้ำมันพืชและไขมัน/น้ำมันสัตว์แต่ละชนิด มีทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบ กรดไขมันอิ่มตัว (SFAs) พบมากที่สุดในน้ำมันมะพร้าวมีกรดไขมันอิ่มตัวสูงถึงประมาณ 90% ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Krishna *et al.* (2010) รองลงมา คือ เนยผสมประมาณ 69% สำหรับน้ำมันหมูและน้ำมันปาล์มโอเลอินมีสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวใกล้เคียงกันประมาณ 40% ของกรดไขมันทั้งหมด กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว MUFAs พบมากที่สุดในน้ำมะกอกและน้ำมันคาโนลามีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูงมากกว่า 60% ของกรดไขมันทั้งหมด สำหรับกรดไขมันชนิด PUFAs พบมากที่สุดในน้ำมันปลาและน้ำมันดอกอีฟนิงพริมโรส ประมาณ 70-75% ของกรดไขมันทั้งหมด นอกจากนั้นกรดไขมันชนิด PUFAs พบในน้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกสตาร์ฟลาวเวอร์ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันงาสัดส่วนประมาณ 50%ของกรดไขมันทั้งหมด สัดส่วนของกรดไขมันในน้ำมันพืชและไขมัน/น้ำมันสัตว์แต่ละชนิดสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Krishna *et al.*, 2010; Moigradean *et al.*, 2013)

ผลจากการทดลองหาองค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่าง เนยผสม น้ำมันหมู น้ำมันไก่ น้ำมันปลา น้ำมันมะพร้าว น้ำมันคาโนลา น้ำมันข้าวโพด น้ำมันอิฟนิ่งพริมโรส น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอเลอิน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันงา น้ำมันดอกสตาร์ฟลาวเวอร์ และ น้ำมันดอกทานตะวัน โดยใช้เทคนิค GC-MS พบว่าน้ำมันและไขมันแต่ละชนิดมีรูปแบบองค์ประกอบของกรดไขมันแตกต่างกัน และสัดส่วนกรดไขมันในตัวอย่างแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สัดส่วนชนิดกรดไขมันที่ตรวจพบในตัวอย่าง 15 ชนิด

ชนิดตัวอย่าง	**สัดส่วนชนิดของกรดไขมันที่พบ (%)**		
	Saturated fatty acids	Monounsatuarted fatty acids	Polyunsaturated fatty acids
เนยผสม	69.4	26.3	4.3
น้ำมันไก่	32.4	48.7	18.9
น้ำมันหมู	42.2	44.5	13.3
น้ำมันปลา	9.7	20.6	69.7
น้ำมันคาโนลา	7.9	62.3	29.8
น้ำมันมะพร้าว	89.7	8.2	2.1
น้ำมันข้าวโพด	15.5	34.0	50.5
น้ำมันอีฟนิงพริมโรส	13.8	11.2	75.1
น้ำมันมะกอก	20.3	64.6	15.1
น้ำมันปาล์มโอเลอิน	41.6	45.7	12.7
น้ำมันรำข้าว	25.5	41.5	33.0
น้ำมันงา	17.3	32.2	50.4
น้ำมันถั่วเหลือง	17.4	26.8	50.5
น้ำมันดอกทานตะวัน	11.7	37.8	50.5
น้ำมันดอกสตาร์ฟลาวเวอร์	16.4	28.7	55.0

ผลจากการตรวจสอบความใช้ของวิธีโดยใช้สารละลายมาตรฐาน FAMEs 37 องค์ประกอบ (cat.# 35077) แยกด้วยคอลัมน์ VF-WAXms, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น (ภาพที่ 7) พบว่าสามารถแยกกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ ที่เป็นคู่ไอโซเมอร์ C18:2 (all-cis-9,12) และ C18:2 (all-trans-9,12) ออกจากกันได้ แต่คู่ไอโซเมอร์ C18:1 (cis-9) และ C18:1 (trans-9) ไม่สามารถแยกได้ด้วยสภาวะดังกล่าว ส่วน C4:0 และ C6:0 ถูกชะออกไปในส่วนของช่วง Solvent delay time



1= C8:0, 2 = C10:0, 3 = C11:0, 4 = C12:0, 5 = C13:0, 6 = C14:0, 7 = C14:1, 8 = C15:0, 9 = C15:1, 10 = C16:0, 11 = C16:1 (cis-9), 12 = C17:0, 13 = C17:1 (cis-10), 14 = C18:0, 15,16 = C18:1 (cis+trans-9), 17= C18:2 (all-cis-9,12), 18 = C18:2 (all-trans-9,12), 19 = C18:3 (all-cis-6,9,12), 20 = C18:3 (all-cis-9,12,15), 21 = C20:0, 22 = C20:1 (cis-11), 23 = C20:2 (all-cis-11,14,), 24 = C20:3 (all-cis-8,11,14), 25 = C21:0, 26 = C20:4 (all-cis-5,8,11,14), 27 = C20:3 (all-cis-11,14,17), 28 = C20:5 (all-cis-5,8,11,14,17) 29 = C22:0, 30 = C22:1 (cis-13), 31 = C22:2 (all-cis-13,16), 32 = C23:0, 33 = C24:0, 34 = C22:6 (all-cis-4,7,10,13,16,19), 35 = C24:1

ภาพที่ 7 Total Ion Chromatogram (TIC) ของสารละลายมาตรฐาน FAMEs แยกโดยใช้วิธี GC-MS ที่ได้พัฒนาขึ้น

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ ตัวอย่างถูกเตรียมให้อยู่ในรูปของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์โดยผ่านปฏิกิริยา Transesterification ใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในเมทานอลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาตามลำดับขั้นตอน เป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย การวิเคราะห์กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้ความยาวคอลัมน์ 30 เมตร ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 40 นาที สามารถแยกคู่ไอโซเมอร์ C18:2 (all-cis-9,12) และ C18:2 (all-trans-9,12) ได้ นอกจากนั้น GC-MS ยังให้ข้อมูลแมสสเปกตรัมของกรดไขมันแต่ละชนิดที่มีความเป็นเอกลักษณ์แตกต่างกัน เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัวสายโซ่ตรงแสดงลักษณะเด่นของไอออนที่ *m/z* 74 และ 87 กรดไขมันเมทิลเอสแทอร์ไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง แสดงไอออนที่ *m/z* 55 เป็นเบสพีคซึ่งป็นลักษณะเฉพาะ ไอออนที่ *m/z* 67 เป็นเบสพีคเป็นลักษณะเฉพาะของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง ไอออนที่ m/z 79 เป็นลักษณะเฉพาะสำหรับเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 3 ตำแหน่ง นอกจากนั้นแมสสเปกตรัมของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์แต่ละชนิดในตัวอย่างเปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมจากฐานข้อมูล NISTและWiley ซึ่งต้องมีคะแนนความเหมือนมากกว่า 90% ในการยืนยันและระบุโครงสร้างชนิดของกรดไขมันในตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารมาตรฐาน

จากการศึกษาหาองค์ประกอบของกรดไขมันในตัวอย่างน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าน้ำมันพืชและไขมันสัตว์มีองค์ประกอบของไขมันทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวผสมกันด้วยสัดส่วนที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดหรือแหล่งของน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ กรดไขมันอิ่มตัวพบมากที่สุดในน้ำมันมะพร้าว รองลงมาเป็นเนยผสมและน้ำมันหมู น้ำมันคาโนลา น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอเลอิน น้ำมันรำข้าว น้ำมันไก่ น้ำมันหมู มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง อยู่ในช่วงประมาณ 41-65%ของกรดไขมันทั้งหมด ในขณะที่น้ำมันข้าวโพด น้ำมันอีฟนิงพริมโรส น้ำมันปลา น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกสตาร์ฟลาวเวอร์ และน้ำมันดอกทานตะวัน มีสัดส่วนของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่มากกว่า 1 ตำแหน่ง อยู่ในช่วงประมาณ 50-75% ของกรดไขมันทั้งหมด โดยส่วนใหญ่เป็นกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n9,12) ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมก้า 6 อยู่ในช่วงประมาณ 34-63% นอกจากนั้นน้ำมันอีฟนิงพริมโรสและน้ำมันดอกสตาร์ฟลาวเวอร์ยังพบกรดไขมันแกมม่าลิโนลีอิก (γ-linolenic acid, C18:3n6,9,12) เป็นกรดไขมันโอเมก้า 6 จัดเป็นกรดไขมันจำเป็นเนื่องจากร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ น้ำมันดอกสตาร์ฟลาวเวอร์มีสัดส่วนกรดไขมันแกมม่าลิโนลีอิกประมาณ มากกว่าน้ำมันอีฟนิ่งพริมโรสประมาณ 2 เท่า น้ำมันปลามีกรดไขมันอีโคซะเพนตะอีโนอิก (Eicosapentaenoic acid, EPA (C20:5)) 30% และกรดไขมันโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (Docosahexaenoic acid, DHA (C22:6)) ประมาณ 24% ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมก้า 3 (omega-3) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้เป็นกรดไขมันจำเป็น กรดไขมันทั้งสองพบเฉพาะในน้ำมันปลาเท่านั้น วิธี GC-MS ที่พัฒนาขึ้นสามารถทดสอบกรดไขมันในตัวอย่างน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ได้ และ

สามารถระบุชนิดของไอโซเมอร์ของกรดไขมันได้ นอกจากนั้นเทคนิค GC-MS ยังให้ข้อมูลองค์ประกอบของธาตุและโครงสร้างของกรดไขมันแต่ละชนิดได้ ดังนั้นวิธี GC-MS เหมาะสำหรับนำมาใช้ในงานประจำและสามารถประยุกต์ใช้ในการหาองค์ประกอบของกรดไขมันในตัวอย่างอื่น ๆ ได้

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

วิธี GC-MS ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อทดสอบหาองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันและไขมันสัตว์ สามารถแยกกรดไขมันคู่ไอโซเมอร์ C18:2 (all-cis-9,12) และ C18:2 (all-trans-9,12) ได้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัย (David *et al*., 2005) นอกจากนั้นการวัดสัดส่วนกรดไขมันในตัวอย่าง น้ำมันหมู น้ำมันไก่ ให้ค่าสัดส่วนของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Nizar *et al*., 2013) และสัดส่วนกรดไขมันที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำมันพืชแต่ละชนิดให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kostik *et al*. (2013)

ปัจจุบันวิธีการดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดโอเมก้า 3 และโอเมก้า 6 ในตัวอย่าง ทำให้เพิ่มศักยภาพและขยายขอบเขตการให้บริการการทดสอบหาองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ได้ อย่างไรก็ตามอาจจะต้องปรับสภาวะการทดสอบเพื่อแยกคู่ไอโซเมอร์ของ C18:1 (cis-9) และ C18:1 (trans-9) ให้ดียิ่งขึ้นในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่สนับสนุนให้บุคลากรดำเนินงานวิจัย และอำนวยความสะดวกในการใช้งานเครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มงานวิเคราะห์อินทรีย์เคมี ฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพ ฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพ. 2562. Proficiency Testing Report การวัดสัดส่วนกรดไขมันในน้ำมันพืช (Determination of Fatty acid Profiles in Edible Oil) กรกฎาคม 2562 หน้า 14-18.

Cho, I.J., Choi, K.R. and S.Y. Lee. 2020. Microbial production of fatty acids and derivative chemicals. Current Opinion in Biotechnology. 65: 129-41.

Christie, W.W. 2018. Mass Spectrometry of Methyl Ester Derivatives of Fatty Acids. Online]. Available: https://www.lipidhome.co.uk/ms/methylesters.htm. (Retrieved April 1, 2020).

Das, U.N. 2006. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology. 1: 420-439.

David, F., Sandra, P. and Vickers, A.K., 2005. Column selection for the analysis of fatty acid methyl esters. Food analysis application.1-12.

Guil-Guerrero, J.L., García Maroto, F.F and A. Giménez Giménez. 2001. Fatty acid profiles from forty-nine plant species that are potential new sources of γ-linolenic acid. Journal of the American Oil Chemists' Society. 78(7): 677-684.

International Standard. 2015. ISO 12966-4 Animal and vegetable fats and oils-Gas chromatography of fatty acid methyl ester Part 4: Determination by capillary gas chromatography. 1-21.

International Standard. 2017. ISO 12966-4 Animal and vegetable fats and oils-Gas chromatography of fatty acid methyl ester Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. 1-15.

Jham, G.N., Teles, F.F.F. and L.G. Campos. 1982. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. Journal of the American Oil Chemists' Society. 59: 132–133.

Janiszewski, P., Grześkowiak, E., Lisiak, D., Borys, B., Borzuta, K., Pospiech, E. and E. Poławska. 2016. The influence of thermal processing on the fatty acid profile of pork and lamb meat fed diet with increased levels of unsaturated fatty acids. Meat science. 111: 161–167.

Kuntom, A., Kifli, H. and P.K. Lim. 1996. Chemical and physical characteristics of soap made from distilled fatty acids of palm oil and palm kernel oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. 73: 105-108.

Krishna, A.G., Gaurav, R., Singh, B.A., Kumar, P.P. and C. Preeti. 2010. Coconut oil: chemistry, production and its applications-a review. Indian Coconut Journal. 53(3) :15-27.

Kostik, V., Memeti, S. and Bauer, B. 2013. Fatty acid composition of edible oils and fats. Journal of Hygienic Engineering and Design. 4: 112-116.

Liu, J., Vanormelingen, P. and W. Vyverman. 2016. Fatty acid profiles of four filamentous green algae under varying culture conditions. Bioresource technology. 200: 1080-1084.

Moigradean, D., Poiana, M.A., Alda, L.M. and I. Gogoasa. 2013. Quantitative identification of fatty acids from walnut and coconut oils using GC-MS method. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. 19(4): 459-463.

Nizar, N. N. A., Marikkar, J. M. N. and Hashim, D. M. 2013. Differentiation of lard, chicken fat, beef fat and mutton fat by GCMS and EA-IRMS techniques. Journal of oleo science, 62(7): 459-464.

Pereira, E., Napp, A., Braun, J.V., Fontoura, L.A., Seferin, M., Ayres, J. and Vainstein, M.H. 2018. Development and validation of analytical methodology by GC-FID using hexadecyl propanoate as an internal standard to determine the bovine tallow methyl esters content. Journal of Chromatography B. 1093: 134-140.

Rustan, A.C. and C.A. Drevon. 2005. Fatty acids: structures and properties. Encyclopedia of Life Sciences. 1-7.

Satyarthi, J.K., Srinivas, D. and P. Ratnasamy. 2011. Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts. Applied Catalysis A: General. 391: 427-435.

Zielińska, A. and I. Nowak. 2014. Fatty acids in vegetable oils and their importance in cosmetic industry. CHEMIK nauka-technika-rynek. 68: 103-110.

Zhang, H., Wang, Z. and O. Liu. 2015. Development and validation of a GC–FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. Journal of pharmaceutical analysis. 5: 223-230.