การวิเคราะห์กรดไขมันจากเมล็ดธัญพืชด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-เฟลมไอออไนเซชัน

The Analysis of Fatty Acids in Whole Grains by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection

ศักดิ์ชัยบดี ปิ่นศรีทอง[1*] พิมพ์พิมล พฤกษ์ภัทรานนต์[1] และ วัชระ แก้วสุวรรณ์[1]
Sakchaibordee Pinsrithong[1*], Pimpimon Phukpattaranont[1] and WatcharaKaewsuwan[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยฉบับนี้ได้แสดงวิธีการสกัดกรดไขมันจากเมล็ดธัญพืช แล้วนำไปเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันกับเมทานอล ด้วยกระบวนการเตรียมอนุพันธ์ 2 ขั้นตอน ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาต่างกัน คือ ด่างแก่และกรดแก่ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า เวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแต่ละขั้นตอน คือ 20 นาที ในการสกัดกรดไขมันออกจากเมล็ดธัญพืชเพื่อวิเคราะห์หาสัดส่วนกรดไขมันจะทำการเติมสารละลายกรดลอริกความเข้มข้น 1 mg/mL ซึ่งเป็นสารละลายอ้างอิงภายในตั้งแต่กระบวนการสกัด เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดและการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ในการทดลองนี้ พบว่า ร้อยละโดยมวลของการเกิดปฏิกิริยาเป็นเมทิลลอเรตอยู่ที่ 96.38 และเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน พบว่า สามารถแยกเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานทั้ง 20 สารประกอบและเมทิลลอเรตโดยให้พีคที่สมมาตรและมีค่าการแยกที่ดี ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของรีเทนชันไทม์จากการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (n = 6) และระหว่างวัน (n = 12) อยู่ในช่วง 0.04 – 0.28 และ 0.06 – 0.47 ตามลำดับ การวิเคราะห์ร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมันในเมล็ดธัญพืชทั้งหมด 5 ชนิด ด้วยเครื่อง GC-FID พบว่า สามารถแยกชนิดกรดไขมันที่สนใจได้ชัดเจน สามารถคำนวณร้อยละโดยมวลและร้อยละองค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดได้ง่าย ซึ่งร้อยละโดยมวลรวมของกรดไขมันในเมล็ดธัญพืชที่ตรวจพบใน เมล็ดแมงลัก เมล็ดงาดำ เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเขียว และเมล็ดถั่วลิสง คือ 14.44, 45.10, 1.89, 1.12และ38.91ตามลำดับ

คำสำคัญ: ชนิดกรดไขมัน GC-FID เมล็ดธัญพืช การสกัด

Abstract

This research work describes extraction and determination of fatty acids from whole grains. A combination of strong basic-catalyzed and strong acid-catalyzed transesterification of fatty acids to Fatty Acid Methyl Esters (FAMEs) was carried out. In the determination of fatty acid profiles of whole grains, 1 mg/mL lauric acid, an internal reference standard, was added during extraction process to determine extraction and transesterification efficiency. The optimum reaction time for each step of transesterification was 20 minutes, which gave the mass percentage of 96.38% Methyl laurate. All 20 standard FAMEs and methyl laurate were separated satisfactorily with symmetrical peaks and high plate counts based on separation conditions of the gas chromatograph-flame ionization detection (GC-FID). The %RSD of retention time from the repeated analysis on intraday (n = 6) and interday (n = 12) were in the range of 0.04 - 0.28 and

[1]ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา 90110
[1] Scientific Equipment Center, Prince of Songkhla University, Hat Yai Campus, Songkhla, 90110
*Corresponding author: e-mail: Sakchaibordee.s@psu.ac.th

***Received:** 10 March 2019, **Revised:** 26 March 2019, **Accepted:** 9 April2019, **Published:** 29April 2019*

0.06 - 0.47, respectively. The values were calculated as the total masspercentage and composition of fatty acids 5 whole grains, namely, basil seeds, poppy seeds, corn seeds, mungbean and peanut seeds were found at 14.44, 45.10, 1.89, 1.12 and 38.91% respectively.
Keywords: fatty acid profile, GC-FID, whole grains, extraction

บทนำ

กรดไขมันเป็นสารประกอบทางเคมีในอาหารที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย โดยกรดไขมันที่มีการบริโภคส่วนใหญ่จะได้มาจากเมล็ดธัญพืช โดยในเมล็ดธัญพืชแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ จะมีสัดส่วนกรดไขมัน (Fatty acidprofile) ต่อน้ำหนักที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการที่เหมาะสมในการทดสอบหาสัดส่วนกรดไขมัน (Kuhnt*et al*. 2012, Vicente *et al*. 2015) เพื่อประโยชน์ในการศึกษาหรือเลือกใช้สำหรับการบริโภค การผลิตทางอุตสาหกรรมหรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เป็นต้น โดยเทคนิคที่ได้รับความนิยมในการทดสอบกรดไขมัน คือ เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (Gas chromatography-Flame ionization detection, GC-FID) เนื่องจากเป็นเครื่องมือทดสอบที่สามารถวิเคราะห์สารผสมและมีความไวสูงในการทดสอบสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและออกซิเจน (Kamatou and Viljoen,2017;แม้น และคณะ, 2555) โดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นสถาบันบริการที่มีการทดสอบชนิดของกรดไขมันจากตัวอย่างที่ผ่านการสกัดออกมาเป็นน้ำมันแล้ว โดยทางผู้ทดสอบจะเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์ของตัวอย่างน้ำมันที่ส่งทดสอบ แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID แล้วรายงานปริมาณสัดส่วนกรดไขมันที่ตรวจพบแต่ละชนิดโดยดูจากค่าเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟ ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเพื่อขยายบริการและสร้างวิธีการทดสอบตั้งแต่การสกัดกรดไขมันในตัวอย่างเมล็ดธัญพืช โดยได้สุ่มเลือกเมล็ดธัญพืชที่มีการบริโภคในชีวิตประจำวันของคนไทย ที่มีการวางจำหน่ายตามร้านค้าหรือห้างสรรพสินค้าในเชิงพาณิชย์และยังมีรายงานเปอร์เซ็นต์กรดไขมันรวมที่แตกต่างกัน 5 ชนิดในการศึกษาการสกัดกรดไขมัน ได้แก่ เมล็ดแมงลัก เมล็ดงาดำ เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเขียว และเมล็ดถั่วลิสง เป็นต้น แล้วนำน้ำมันที่ได้มาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification reaction) กับเมทานอลเพื่อเปลี่ยนจากกรดไขมัน ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (Fatty acid methyl ester, FAME) เพื่อลดจุดเดือด ทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID จากนั้นสกัดเมทิลเอสเทอร์ที่สนใจออกจากตัวอย่าง ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Liquid-liquid extraction, LLE) แล้วนำส่วนสกัดได้ไประเหยตัวทำละลายออก ก่อนนำไปทดสอบด้วยเครื่อง GC-FID โดยใช้สภาวะการทดสอบที่เหมาะสมแล้วคำนวณผลของสัญญาณที่ได้เทียบกับสารละลายอ้างอิง ซึ่งงานวิจัยนี้ได้คำนวณเป็นร้อยละโดยมวลด้วยสมการคำนวณที่สร้างขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการการสกัด การเตรียมอนุพันธ์และสภาวะการตรวจวัดด้วย GC-FID ของกรดไขมันในเมล็ดธัญพืช
2. เพื่อแสดงวิธีการสกัด การเตรียมอนุพันธ์ วิเคราะห์ และคำนวณร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมัน

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ตัวอย่างเมล็ดธัญพืช: ที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เมล็ดแมงลัก เมล็ดถั่วเขียว เมล็ดงาดำ เมล็ดข้าวโพด ถูกสุ่มเลือกซื้อมาจากห้างสรรพสินค้าและเมล็ดถั่วลิสงซื้อจากตลาดสด ทั้งหมดเป็นตัวอย่างเมล็ดธัญพืชแบบแห้งที่วางจำหน่ายในจังหวัดสงขลา

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย: การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันกับเมทานอลเพื่อเปลี่ยนกรดไขมันเป็นเมทิลเอสเทอร์ ใช้ Thermoreactor รุ่น TR 320 Spectroquant และการวิเคราะห์ปริมาณร้อยละโดยมวลเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (GC-FID) ยี่ห้อ Hewlett Packard รุ่น 6890 โดยสภาวะการทดสอบที่เหมาะสมในการแยกของสารประกอบที่สนใจแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมัน

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ		ตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน	
อุณหภูมิหัวฉีด	290 °C	อุณหภูมิตัวตรวจวัด	300 °C
สัดส่วนสารเข้าคอลัมน์	Splitless @ 0.5 min	อัตราไหลแก๊สเชื้อเพลิง (H_2)	30 mL/min
อัตราไหลแก๊สพา (He)	1.0 mL/min	อัตราไหลแก๊สออกซิแดนซ์ (Air zero)	300 mL/min
อุณหภูมิตู้อบ	เริ่มต้น 140 °C คงที่ 5 min เพิ่มขึ้น 10 °C/min จนได้ 210 °C คงที่ 5 min เพิ่มขึ้น 20 °C/min จนได้ 250 °C คงที่ 8 min	อัตราไหลแก๊ส Make up(N_2)	25 mL/min
ชนิดคอลัมน์	VARIAN cat.no. CP9080: Select Biodiesel for FAME (Length 30 m, I.D 0.32 mm, Film thickness 0.25 μm)		

3. สารเคมีที่ใช้ ตัวทำละลาย คือ Heptane (HPLC grade)Chloroform (HPLC grade) Methanol (HPLC grade) Petroleum Ether (AR grade)Potassium hydroxide (KOH) 85% ซื้อจาก RCI Labscan (Bangkok, Thailand) Hydrochloric acid (Conc. HCl) 37% ซื้อจาก Merck (Darmstadt, Germany), สารละลายอ้างอิงภายใน 2 สารประกอบ ได้แก่ สารละลายอ้างอิง 1 คือ กรดลอริก (C12:0) สารละลายอ้างอิง 2 คือ Methyl heptadecanoate (C17:0 ME) สารมาตรฐานผสมเมทิลเอสเทอร์จำนวน 20 สารประกอบ ซึ่งประกอบด้วยสารมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ ได้แก่ Caprylic acid methyl ester (C8:0, ME), Nonanoic acid methyl ester (C9:0, ME), Capric acid methyl ester (C10:0, ME), Undecanoic acid methyl ester (C11:0, ME), Methyl laurate (C12:0, ME), Tridecanoic acid methyl ester (C13:0, ME), Myristic acid methyl ester (C14:0, ME), Pentadecanoic acid methyl ester (C15:0, ME), Palmitic acid methyl ester (C16:0, ME), Palmitoleic acid methyl ester (C16:1, ME), Stearic acid methyl ester (C18:0, ME), Oleic acid methyl ester (C18:1, ME), Linoleic acid methyl ester (C18:2, ME), Linolenic acid methyl ester (C18:3, ME), Arachidic acid methyl ester (C20:0, ME), Eicosenoic acid methyl ester (C20:1, ME), Behenic acid methyl ester (C22:0, ME), Erucic acid methyl ester (C22:1, ME), Lignoceric acid methyl ester(C24:0, ME), Selacholeic acid methyl ester (C24:1, ME) ทั้งหมดซื้อจาก Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany)

4. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

4.1) การเตรียมสารทำปฏิกิริยาและสารละลายอ้างอิง

สารทำปฏิกิริยา: รีเอเจนต์ผสมที่ 1 คือ 0.5 M KOH ใน Methanol เตรียมโดยการบด KOH ให้มีขนาดเล็กลงด้วยครกบดขนาดเล็กแล้วชั่งน้ำหนัก KOH 0.825g จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย Methanol ให้ได้ปริมาตร 25 mL รีเอเจนต์ผสมที่ 2 คือ HCl : Methanol (4 : 1, v/v)สารละลายอ้างอิง 1: สารละลายกรดลอริก ความเข้มข้น 1 mg/mL ใน Heptane เป็นสารละลายอ้างอิงเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัด การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของกรดไขมันเป็นเมทิลเอสเทอร์และการคำนวณร้อยละโดยมวลของกรดไขมัน สารละลายอ้างอิง 2: สารละลาย Methyl heptadecanoate, C17:0 ME ความเข้มข้น 10 mg/mL ใน Heptane ใช้กรณีศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์ โดยทั้งสารละลายอ้างอิง 1 และ 2 เขย่าด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 1 นาทีทุกครั้ง และเตรียมสารละลายอ้างอิงใหม่ทุกวันก่อนใช้งาน

4.2) ศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์

การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะใช้กรดลอริกเป็นตัวแทนของกรดไขมันทั้งหมด โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดัดแปลงจากวิธีของ Jham และคณะ (Jham *et al.,* 1982) ที่ได้ศึกษาเวลาที่เหมาะสมด้วยการตรวจสอบจากสัญญาณพีคกรดไขมันที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลาที่เตรียมอนุพันธ์ บทความวิจัยนี้จะศึกษาเพิ่มเติมในการหาเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันโดยหาจากปริมาณร้อยละของผลผลิตกรดไขมันในรูปของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลาที่ศึกษา โดยดัดแปลงวิธีการคำนวณมาจากการทดสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในตัวอย่างน้ำมันไบโอดีเซลตามมาตรฐานยุโรป เลขมาตรฐาน EN 14103

(European Standard NormeEuropeenneEuropaische Norm, 2003) โดยใช้กรดลอริก (C12:0) เป็นตัวแทนของชนิดกรดไขมันในตัวอย่างหลังผ่านการสกัดออกจากเมล็ดธัญพืชเป็นตัวอย่างน้ำมัน แล้วหาค่าร้อยละของผลผลิต (Percent yield) ของเมทิลลอเรต (C12:0 ME) ที่เกิดขึ้นหลังผ่านการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน 2 ขั้นตอนกับเมทานอลที่เวลาต่างๆ โดยการคำนวณเทียบจากพื้นที่พีคของสัญญาณเมทิลลอเรต, C12:0 ME กับพื้นที่พีคของสัญญาณของสารละลายอ้างอิง 2 คือ สารละลาย Methyl heptadecanoate, C17:0 ME ที่ทราบความเข้มข้นและปริมาตรที่แน่นอน ซึ่งได้แสดงสมการการคำนวณดังสมการที่ 1 แทนวิธีการเดิมนอกจากนี้ยังเพิ่มช่วงเวลาการศึกษาจากที่เคยมีการศึกษาไว้เพื่อให้เห็นการเกิดอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นสูงสุด

$$\%TE = \frac{A_{C12:0\ ME} \times C_{IS2} \times V_{IS2}}{A_{IS2} \times m_{C12}} \times 100\% \qquad \text{.....สมการที่ 1}$$

$\%TE$ = ร้อยละของผลผลิต (Percent yield)

$A_{C12:0\ ME}$ = พื้นที่พีคของสัญญาณเมทิลลอเรต (C12:0 ME)

A_{IS2} = พื้นที่พีคของสัญญาณสารละลายอ้างอิง 2 (Methyl heptadecanoate, C17:0 ME)

C_{IS2} = ความเข้มข้นสารละลายอ้างอิง 2: หน่วย mg/mL (Methyl heptadecanoate, C17:0 ME)

V_{IS2} = ปริมาตรของสารละลายอ้างอิง 2: หน่วย mL (Methyl heptadecanoate, C17:0 ME)

m_{C12} = น้ำหนักของกรดลอริกในหน่วย mg

สำหรับวิธีการทดลอง เริ่มจากชั่งสารมาตรฐานกรดลอริกน้ำหนัก 100 mg ในหลอดทำปฏิกิริยา บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AT261) การเตรียมอนุพันธ์ขั้นตอนแรกจะเติมรีเอเจนต์ 1 ของ 0.5 M KOH ใน Methanol ปริมาตร 1.0 mL ปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปทำปฏิกิริยาใน Thermoreactor (ยี่ห้อ Merck รุ่น Spectroquant TR 320) ที่อุณหภูมิ 100ºC โดยได้มีการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์เป็นเมทิลลอเรตที่เวลา 1,5, 10, 20, 30 และ 40 นาที เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมของการใช้ตัวเร่งด่างแล้วจะคงเวลาที่เหมาะสมไว้ แล้วไปศึกษาเวลาที่เหมาะสมของตัวเร่งกรดต่อไป การเตรียมอนุพันธ์ขั้นตอนที่สองจะเติมรีเอเจนต์ 2 ของ HCl : Methanol (4 : 1, v/v) ปริมาตร 0.4 mL ปิดฝาให้สนิทแล้วนำไปทำปฏิกิริยาใน Thermoreactor ที่อุณหภูมิ 100ºC โดยได้มีการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์เป็นเมทิลลอเรตที่เวลา 1,5, 10, 20, 30 และ 40 นาที เช่นเดียวกัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้เปิดฝาช้าๆ เพื่อลด H_2 ที่เกิดขึ้นแล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำ DI ปริมาตร 2.0 mL และเติม Petroleum ether ปริมาตร 3.0 mL สำหรับสกัดเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น แล้วนำมา Vortex mixer (ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น Vortex-genie 2)เป็นเวลา1 นาทีวางไว้ให้แยกชั้นแล้วเก็บส่วนบน (Organic phase) ใส่ในขวดขนาด 20mL สกัดซ้ำอีกครั้งด้วย Petroleum ether ปริมาตร 3.0 mL นำส่วนที่สกัดได้มาระเหยสารละลายรวมด้วยแก๊ส N_2 ให้แห้ง จากนั้นเติมสารละลายอ้างอิง 2 ปริมาตร 0.5 mL เพื่อใช้ศึกษาร้อยละของผลผลิตก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID

4.3) การสกัดและเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในเมล็ดธัญพืช

ในขั้นตอนการสกัดกรดไขมันจากเมล็ดธัญพืชได้ดัดแปลงจากวิธีของ Kuhnt และคณะ (Kuhnt *et al.* 2012) โดยการชั่งตัวอย่างเมล็ดธัญพืชบดละเอียดน้ำหนัก 500 mg ในหลอดทดลอง บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง เติมตัวทำละลายสกัด $CHCl_3$: Methanol (3 : 2, v/v) ปริมาตร 5.0mL นำไป Vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที เติมสารละลายอ้างอิง 1 ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 0.5 mL จากนั้นเติมน้ำ DI ปริมาตร 2.0 mL เก็บส่วนล่าง (Organic phase) ใส่หลอดทำปฏิกิริยาแล้วระเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วยแก๊ส N_2เมื่อตัวอย่างน้ำมันที่สกัดได้แห้ง นำมาผ่านกระบวนการเตรียมอนุพันธ์ซึ่งจะดำเนินการเหมือนกับข้อ 4.2 โดยเลือกใช้เวลาการเตรียมอนุพันธ์ที่ดีที่สุดที่ได้จากการศึกษาข้อ 4.2 ก่อนเติมตัวทำละลาย Heptane ปริมาตร 0.5 mL แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID โดยในการคำนวณผลของร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมันได้แสดงการคำนวณดังสมการที่ 2 ซึ่งสมการการคำนวณดัดแปลงมาจากวิธีคำนวณตาม EN 14103 เช่นเดียวกับ

สมการที่ 1 และในขั้นตอนการเติมสารละลายอ้างอิง 1 ที่ใช้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดและการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของกรดไขมันเป็นเมทิลเอสเทอร์ สามารถวัดค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพได้โดยการเทียบสัดส่วนพื้นที่พีคของสารละลายอ้างอิง 1 กับสารมาตรฐานเมทิลลอเรตที่ความเข้มข้นเดียวกัน

$$\%FA = \frac{A \times C_{IS1} \times V_{IS1}}{A_{C\ 12:0\ ME} \times m} \times 100\% \qquad \text{.....สมการที่ 2}$$

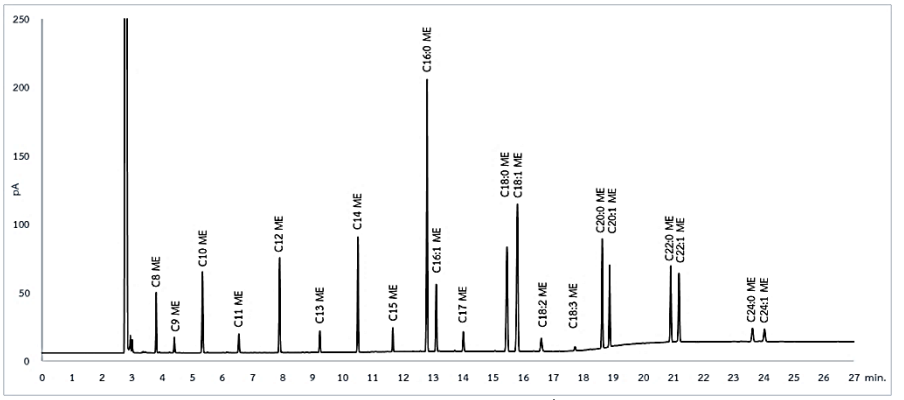
%FA	=	ร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมันที่สนใจ
A	=	พื้นที่พีคของสัญญาณของสารที่สนใจ (Methyl ester)
$A_{C\ 12:0\ ME}$	=	พื้นที่พีคของสัญญาณเมทิลลอเรต (C12:0 ME)
C_{IS1}	=	ความเข้มข้นสารละลายอ้างอิง 1: หน่วย mg/mL(กรดลอริก, C12:0)
V_{IS1}	=	ปริมาตรของสารละลายอ้างอิง 1: หน่วย mL (กรดลอริก, C12:0)
m	=	น้ำหนักของตัวอย่างในหน่วย mg

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาการวิเคราะห์ตัวอย่างสกัดกรดไขมันจากเมล็ดธัญพืชแล้วทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันกับเมทานอลที่มากเกินพอโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาด่างและกรดก่อนตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-FID ผลการวิจัยแสดงข้อมูลดังนี้

1. สภาวะที่เหมาะสมและความจำเพาะเจาะจงของสารมาตรฐานผสมทั้ง 21 สารประกอบ

จากการเลือกใช้คอลัมน์ชนิด Select Biodiesel for FAME (Length 30 m, I.D 0.32 mm, film thickness 0.25 µm ในการวิเคราะห์จากการศึกษาหาสภาวะการแยกที่เหมาะสมและใช้เวลาการวิเคราะห์ไม่นานเกินไป ดังตารางที่ 1 โดยใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ (Run time) 27 นาที ใช้ปริมาตรในการฉีดครั้งละ 1 ไมโครลิตร ผลการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของ Fatty acid methyl ester ทั้ง 21 สารประกอบ ให้โครมาโทแกรมจากการทดสอบด้วยเครื่อง GC-FID ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมจากการทดสอบสารมาตรฐานด้วยสภาวะที่เหมาะสม

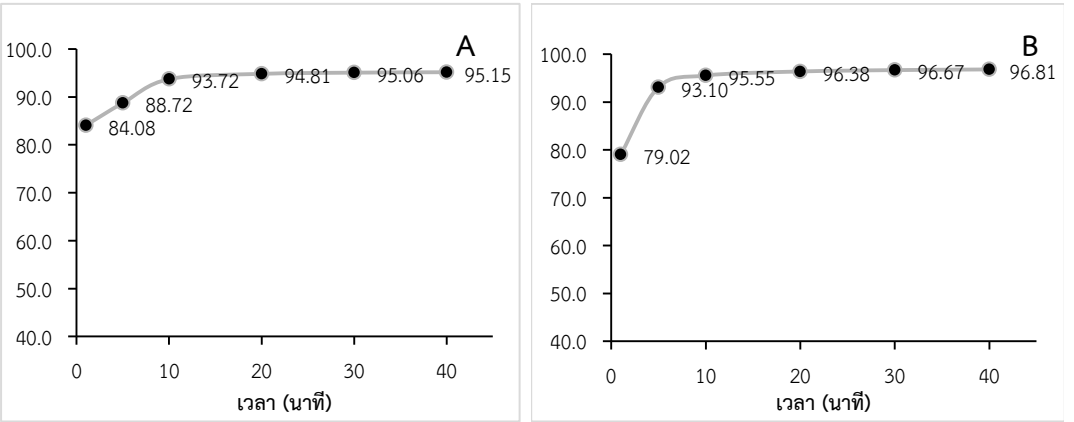
ประสิทธิภาพการแยกของ Fatty acid methyl ester มาตรฐานทั้ง 21 สารประกอบ แสดงดังตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้สามารถแยกพีคของ Fatty acid methyl ester ทั้งหมดออกจากกันได้อย่างชัดเจน และให้ค่า %RSD ของรีเทนชันไทม์ของสารทั้ง 21 สารประกอบ จากการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (n = 6) อยู่ในช่วง 0.04 – 0.28 และระหว่างวัน (n = 12) อยู่ในช่วง 0.06–0.47 และให้ Peak characteristic แสดงพีค Symmetry มีค่าสมมาตรอยู่ในช่วง 0.95–1.31 สำหรับจำนวน Plate แสดงประสิทธิภาพของคอลัมน์ต่อการแยกเมทิลเอสเทอร์อยู่ในช่วง 99,499–1,579,292 plates

ตารางที่ 2 ลักษณะสำคัญของโครมาโทแกรม

สารประกอบเมทิลเอสเทอร์			ประสิทธิภาพการแยก	
รีเทนชันไทม์ (นาที)	**ชื่อสารประกอบ**	**ชื่อย่อ**	**Symmetry**	**Plate**
3.797	Caprylic acid methyl ester	C8:0(ME)	1.05	99,499
4.401	Nonanoic acid methyl ester	C9:0(ME)	0.98	104,265
5.337	Capric acid methyl ester	C10:0(ME)	0.96	125,817
6.548	Undecanoic acid methyl ester	C11:0(ME)	1.04	176,690
7.903	Methyl laurate	C12:0(ME)	1.02	275,853
9.241	Tridecanoic acid methyl ester	C13:0(ME)	1.06	425,751
10.508	Myristic acid methyl ester	C14:0(ME)	1.01	579,118
11.668	Pentadecanoic acid methyl ester	C15:0(ME)	1.1	807,834
12.808	Palmitic acid methyl ester	C16:0(ME)	0.99	724,482
13.113	Palmitoleicacid methyl ester	C16:1(ME)	1.31	777,626
14.015	Heptadecanoic acidmethyl ester	C17:0(ME)	1.04	773,806
15.465	Stearic acid methyl ester	C18:0(ME)	1.03	567,160
15.812	Oleic acid methyl ester	C18:1(ME)	1.24	527,338
16.606	Linoleic acidmethyl ester	C18:2(ME)	1.28	520,712
17.727	Linolenic acid methyl ester	C18:3(ME)	0.95	945,249
18.634	Arachidic acid methyl ester	C20:0(ME)	0.99	1,463,852
18.879	Eicosenoic acid methyl ester	C20:1(ME)	1.19	1,574,242
20.912	Behenic acid methyl ester	C22:0(ME)	1.10	1,579,292
21.185	Erucic acid methyl ester	C22:1(ME)	1.12	1,491,252
23.630	Lignoceric acid methyl ester	C24:0(ME)	1.09	1,007,296
24.028	Selacholeic acid methyl ester	C24:1(ME)	1.06	981,621

2. เวลาที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมัน

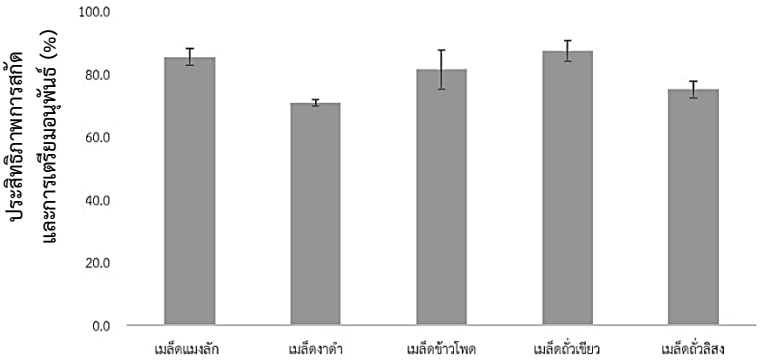
จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันโดยใช้กรดลอริกเป็นตัวแทนในการศึกษาเพื่อดูปัจจัยของเวลาต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันทั้ง 2 ขั้นตอน เพื่อให้การเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันเกิดขึ้นสูงสุด โดยขั้นตอนแรกใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาศึกษาช่วงเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 40 นาที ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 2A เวลาที่เหมาะสม คือ 20 นาที ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นค่อนข้างคงที่และขั้นตอนที่สอง ใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ศึกษาช่วงเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 40 นาที ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 2B ให้เวลาที่เหมาะสม คือ 20 นาที ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นค่อนข้างคงที่เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 2 เวลาที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมัน, A: ร้อยละของผลผลิต (ด่าง), B: ร้อยละของผลผลิต (กรด)

3. ผลประสิทธิภาพการสกัดและการเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันจากเมล็ดธัญพืช

ในการตรวจสอบผลของประสิทธิภาพการสกัดและการเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันในเมล็ดธัญพืช โดยการเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์สัดส่วนพื้นที่พีคของกรดลอริกที่ผ่านการสกัดจากตัวอย่างเมล็ดธัญพืชทั้ง 5 ชนิดแล้วถูกเตรียมเป็นอนุพันธ์ของเมทิลลอเรตกับสารมาตรฐานเมทิลลอเรตที่ความเข้มข้นเดียวกัน ผลเปอร์เซ็นต์ที่ได้จากการสกัดและการเตรียมอนุพันธ์ (n = 2) แสดงดังรูปที่ 3 เท่ากับ 85.5 ± 2.7, 70.9 ± 1.0, 81.4 ±6.3, 87.3 ± 3.3 และ 75.1 ± 2.6 ของเมล็ดแมงลัก เมล็ดงาดำ เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเขียว และเมล็ดถั่วลิสง ตามลำดับ

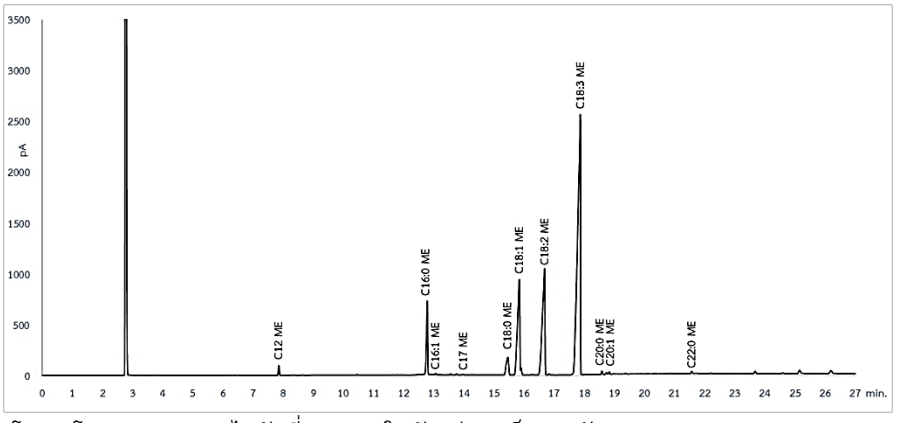


ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการสกัดและการเตรียมอนุพันธ์

4. ผลการวิเคราะห์ร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมันจากเมล็ดธัญพืช

ผลการวิเคราะห์ของตัวอย่างเมล็ดธัญพืชทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เมล็ดแมงลัก เมล็ดงาดำ เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเขียว และเมล็ดถั่วลิสง แสดงตัวอย่างของโครมาโทแกรมของชนิดกรดไขมันที่ตรวจพบในตัวอย่างเมล็ดแมงลัก ดังรูปที่ 4 และเมื่อใช้สมการที่ 2 ในการคำนวณร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมันต่อน้ำหนักเมล็ดธัญพืชทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงผลข้อมูลดังตารางที่ 3 โดยผลที่ได้แสดงร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมันต่อน้ำหนักตัวอย่างและแสดงค่าความเที่ยงของการตรวจวัดกรดไขมันที่พบในตัวอย่างเมล็ดธัญพืชในรูปแบบของ % RSD ของการวัดซ้ำ (n = 3) ต่อตัวอย่างและความเที่ยงของการสกัดและเตรียมอนุพันธ์ซ้ำ (n = 2) ดังข้อมูลในตารางที่ 3 นอกจากนี้ยังได้แสดงตัวอย่างการคำนวณของตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด ชนิดกรดไขมันที่แสดง คือ Linoleic acid(C18:2) ฉีดซ้ำครั้งที่ 2 คำนวณด้วยสมการที่ 2 เพื่อเป็นแนวทางให้นักวิจัยหรือผู้ที่สนใจสามารถปฏิบัติตามได้ง่าย ดังตัวอย่างด้านล่าง

$$\%C18{:}2 = \frac{2269.98 \times 1.0\frac{mg}{mL} \times 0.5\ mL}{216.91 \times 500.30\ mg} \times 100\% = 1.05\%\frac{m}{m}$$



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่ตรวจพบในตัวอย่างเมล็ดแมงลัก

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมันต่อน้ำหนักเมล็ดธัญพืช (g/100g หรือ %w/w±SD)

ที่	สารประกอบ	ชื่อตัวอย่าง				
		เมล็ดแมงลัก	เมล็ดงาดำ	เมล็ดข้าวโพด	เมล็ดถั่วเขียว	เมล็ดถั่วลิสง
1	C8:0(ME)	-	-	-	-	-
2	C9:0(ME)	-	-	-	-	-
3	C10:0(ME)	-	-	-	-	-
4	C11:0(ME)	-	-	-	-	-
5	C13:0(ME)	-	-	-	-	-
6	C14:0(ME)	-	0.01 ± 0.00	0.002 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.01 ± 0.00
7	C15:0(ME)	-	-	-	0.001 ± 0.000	0.004 ± 0.000
8	C16:0(ME)	0.96 ± 0.02	4.16 ± 0.02	0.25 ± 0.00	0.28 ± 0.00	4.65 ± 0.01
9	C16:1(ME)	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.002 ± 0.000	-	0.02 ± 0.00
10	C17: 0(ME)	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.004 ± 0.000	0.02 ± 0.00
11	C18:0(ME)	0.45 ± 0.00	2.55 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.07 ± 0.00	1.78 ± 0.01
12	C18:1(ME)	2.24 ± 0.01	17.33 ± 0.11	0.42 ± 0.00	0.03 ± 0.00	15.77 ± 0.05
13	C18:2(ME)	2.83 ± 0.01	20.31 ± 0.14	1.05 ± 0.01	0.41 ± 0.00	13.33 ± 0.05
14	C18:3(ME)	7.77 ± 0.04	0.14 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.02 ± 0.00
15	C20:0(ME)	0.04 ± 0.00	0.28 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.78 ± 0.00
16	C20:1(ME)	0.03 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.004 ± 0.000	-	0.31 ± 0.00
17	C22:0(ME)	0.01 ± 0.00	0.07 ± 0.00	-	0.02 ± 0.00	1.58 ± 0.01
18	C22:1 (ME)	-	-	-	-	0.02 ± 0.00
19	C24:0(ME)	-	-	-	0.01 ± 0.00	0.51 ± 0.00
20	C24:1(ME)	-	-	-	-	-
ความเที่ยง (%RSD)	**การวัดซ้ำ (n = 3)**	0.55 - 2.54	0.53 - 1.16	0.35 - 3.71	0.22 - 2.75	0.14 - 1.00
	การทำซ้ำ (n =2)	2.86 - 7.76	0.58 - 2.26	6.02 - 9.05	5.44 - 6.75	1.01 - 4.20

หมายเหตุ: - คือตรวจไม่พบ, ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ, S/N ≥ 10) = 0.001 %w/w

จากข้อมูลร้อยละโดยมวลของกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างในตารางที่ 3 หากรวมน้ำหนักกรดไขมันชนิดต่างๆ ในตัวอย่างชนิดเดียวกันแล้วคำนวณเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นที่ใช้ แสดงข้อมูลออกมาเป็นร้อยละโดยมวลของกรดไขมันรวมที่มีในตัวอย่าง ดังข้อมูลในตารางที่ 4 พร้อมทั้งได้แสดงสัดส่วนร้อยละองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันของเมล็ดธัญพืชทั้ง 5 ชนิดที่ตรวจพบ โดยที่ร้อยละโดยมวลของกรดไขมันรวมในตัวอย่างเมล็ดธัญพืชที่ตรวจวัดได้ อยู่ในช่วงร้อยละ 1.12 – 45.10 เมื่อเทียบค่าร้อยละของกรดไขมันรวมและร้อยละองค์ประกอบของกรดไขมันแต่ละชนิดที่ตรวจวัดได้ของงานวิจัยนี้กับรายงานการวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้า แสดงให้เห็นว่า ร้อยละกรดไขมันรวมและร้อยละองค์ประกอบของกรดไขมันในตัวอย่างเมล็ดธัญพืช อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาก่อนหน้า ยกเว้นเมล็ดข้าวโพดที่ถึงแม้ร้อยละองค์ประกอบกรดไขมันจะใกล้เคียงกับรายงานวิจัยที่ใช้อ้างอิง แต่ผลของร้อยละกรดไขมันรวมต่ำกว่างานวิจัยที่ได้ศึกษาก่อนหน้าที่ใช้อ้างอิงมาก อาจเป็นเพราะตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่นำมาศึกษาเป็นเมล็ดข้าวโพดดิบแบบอบแห้งชนิดแข็งสำหรับทำป๊อบคอร์นที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาทำให้ค่ากรดไขมันที่ได้ต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับการศึกษาเมล็ดข้าวโพดที่ปลูกในประเทศไทย

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ร้อยละโดยมวลของกรดไขมันรวมในตัวอย่างและร้อยละองค์ประกอบของกรดไขมันหลักในน้ำมัน

ร้อยละโดยมวลของกรดไขมันรวม		ร้อยละองค์ประกอบของกรดไขมัน									
		C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C24:0
เมล็ดแมงลัก											
งานวิจัยนี้	14.44	-	6.65±0.17	3.10±0.02	15.54±0.09	19.59±0.10	53.81±0.27	0.25±0.00	0.18±0.00	0.04±0.00	-
A	3.1-17.78	-	6.23-10.16	2.97-4.88	6.22-19.92	16.73-24.93	42.45- 61.85	-	-	-	-
เมล็ดงาดำ											
งานวิจัยนี้	45.10	0.02±0.00	9.22±0.05	5.64±0.05	38.41±0.24	45.02±0.30	0.32±0.00	0.63±0.00	0.19±0.00	0.15±0.00	-
B	32.43-45.52	-	12.85 - 18.55	2.40 - 4.25	13.11 - 24.13	71.50 - 52.60	0.30 - 0.41	-	-	-	-
เมล็ดข้าวโพด											
งานวิจัยนี้	1.89	0.09±0.00	13.04±0.05	2.18±0.03	22.35±0.13	55.30±0.30	0.80±0.01	0.36±0.01	0.21±0.00	-	-
C	4.88	-	13.27	2.24	33.72	47.47	2.96	-	-	-	-
เมล็ดถั่วเขียว											
งานวิจัยนี้	1.12	0.32±0.00	24.66±0.12	6.71±0.06	2.49±0.01	36.83±0.11	15.28±0.04	1.46±0.00	-	1.88±0.01	0.93±0.02
C	1.30	0.27	24.35	6.86	5.12	42.46	-	18.03	-	1.44	-
เมล็ดถั่วลิสง											
งานวิจัยนี้	38.91	0.03±0.00	11.94±0.03	4.57±0.03	40.54±0.14	34.25±0.12	0.04±0.00	2.01±0.01	0.80±0.01	4.05±0.03	1.31±0.01
C	38.70	-	12.83	4.1	41.54	36.81	1.76	0.75	-	3.08	-
D	40-50	-	6.7	2.3	78.2	4.4	-	1.2	1.9	2.6	1.8

A: Mostafavi *et al*. 2019, B: Ozcan and Atalay 2006, C: สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2545, D: Moser 2012

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาหาวิธีการวิเคราะห์ร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมันแยกแต่ละชนิดจากเมล็ดธัญพืช ในการศึกษาหาสภาวะในการแยกเมทิลเอสเทอร์ทั้ง 21 สารประกอบด้วย GC-FID ที่ได้ศึกษาแสดงให้เห็นว่า พีคที่ได้สมมาตรและมีการแยกที่ดีมีจำนวน Plate การแยกที่สูง และผลของการทำซ้ำที่ได้ศึกษาในรูปแบบของค่า % RSD ของรีเทนชันไทม์ ของสารมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ทั้ง 21 สารประกอบ ทั้งจากการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกันและการวิเคราะห์ต่างวันค่าที่ได้ต่ำกว่า 1 ตามลำดับทำให้ผู้สนใจที่ต้องการทดสอบชนิดกรดไขมันในพืชน้ำมันสามารถนำสภาวะที่แสดงไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากสภาวะที่แสดงสามารถทดสอบกรดไขมันได้ช่วงกว้าง คือ ทดสอบได้ตั้งแต่กรดไขมันเส้นสั้นสุด คือ Caprylic acid (C8:0) ถึงเส้นยาวสุดที่ศึกษา คือ Selacholeic acid (C24:1) ซึ่งค่อนข้างคลอบคลุมชนิดกรดไขมันที่มีการศึกษาอยู่ในปัจจุบัน ผลการศึกษาการเตรียมอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ด้วยการวัดปริมาณร้อยละของผลผลิตของอนุพันธ์กรดไขมันที่เป็นตัวแทน คือ เมทิลลอเรต แสดงให้เห็นว่าเวลาในการทำปฏิกิริยาทั้ง 2 ขั้นตอนของการใช้ด่างแก่ คือ KOH ในเมทานอลที่มากเกินพอและครั้งที่สองการใช้กรดแก่ HCl ในเมทานอลที่มากเกินพอเช่นกัน ร้อยละของผลผลิตที่เกิดขึ้นทั้ง 2 ขั้นตอนจะเพิ่มขึ้นตามเวลาและคงที่หลังเวลา 20 นาที สอดคล้องทั้ง 2 ขั้นตอน ซึ่งผลผลิตร้อยละที่ได้แสดงค่าไม่ถึง 100% อาจเนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ต้องสกัดเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ด้วยวิธี liquid liquid extraction ด้วยตัวทำละลาย Petroleum ether จากชั้นน้ำที่ใช้ในการแยกเกลือที่เป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยา จึงเป็นไปได้ว่า เมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นบางส่วนละลายติดไปกับน้ำ (เอสเทอร์มีขั้วเล็กน้อย) และบางส่วนหายไปจากการดูดส่วนของสารละลายอินทรีย์ของ Petroleum ether มาไม่หมด เพราะหากดูดสารละลายจนถึงรอยต่อการแยกชั้นของสารอาจทำให้ติดชั้นของน้ำมาได้ เป็นผลให้ไม่สามารถระเหยตัวอย่างให้แห้งได้และอาจจะมีผลต่อความเข้มข้นของสาร ในขั้นตอนการเติมตัวทำละลายก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-FID ดังนั้นที่เวลา 20 นาที จึงเป็นเวลาที่ถูกเลือกเนื่องจากผลของเมทิลเอสเทอร์ที่ค่อนข้างคงที่และเป็นเวลาที่ไม่ต้องรอคอยนานจนเกินไป

จากการทดลองสกัดกรดไขมันในเมล็ดธัญพืชทั้งหมด 5 ชนิดได้แก่ เมล็ดแมงลัก เมล็ดงาดำ เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเขียว และเมล็ดถั่วลิสง ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ผสมของคลอโรฟอร์มกับเมทานอลและใช้สารละลายอ้างอิงกรดลอริก ความเข้มข้น 1 mg/mL เป็นสารละลายอ้างอิงภายในตั้งแต่กระบวนการสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดธัญพืชจนถึงการเตรียมอนุพันธ์เป็นเมทิลเอสเทอร์แล้วสกัดเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ด้วย Petroleum ether

แล้ววิเคราะห์สัญญาณด้วย GC-FID ก่อนคำนวณผลเป็นร้อยละโดยมวลของกรดไขมันแต่ละชนิดด้วยสมการที่สร้างขึ้น ผลของประสิทธิภาพการสกัดและการเตรียมอนุพันธ์กรดไขมันจากเมล็ดธัญพืชอยู่ในช่วง 70.9 ± 1.0 ถึง 87.3 ± 3.3 ของเมล็ดงาดำและเมล็ดถั่วเขียวตามลำดับ ผลการทดลองจะเห็นว่า ตัวอย่างเมล็ดธัญพืชที่มีปริมาณน้ำมันมาก (เมล็ดงาดำมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 45.10 ต่อน้ำหนักตัวอย่าง) จะมีค่าการสกัดและการเตรียมอนุพันธ์ต่ำกว่าเมล็ดธัญพืชที่มีปริมาณน้ำมันน้อย (เมล็ดถั่วเขียวมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 1.12 ต่อน้ำหนักตัวอย่าง) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสัดส่วนของน้ำมันต่อตัวทำละลายในขั้นตอนสกัดและสัดส่วนน้ำมันต่อสารเคมีทำปฏิกิริยาในการเตรียมอนุพันธ์ที่ใช้ในบทความวิจัยนี้ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากบทความวิจัยนี้ได้ใช้สารละลายกรดลอริกเป็นสารละลายอ้างอิง ตั้งแต่กระบวนการสกัด เตรียมอนุพันธ์ การวิเคราะห์ด้วย GC-FID และการคำนวณผล ดังนั้นถึงแม้ในตัวอย่างเมล็ดธัญพืชจะไม่สามารถสกัดและการเตรียมอนุพันธ์ได้ 100% ผลก็จะเกิดกับสารละลายอ้างอิงเป็นสัดส่วนเช่นเดียวกัน ทำให้ผลที่ได้ของร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมันในแต่ละตัวอย่าง ยังคงความถูกต้องดังข้อมูลการเปรียบเทียบในตารางที่ 4 ของบทความวิจัยนี้และรายงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้า

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์ร้อยละโดยมวลของชนิดกรดไขมันจากเมล็ดธัญพืชด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชันในตัวอย่างเมล็ดธัญพืชทั้ง 5 ชนิดโดยใช้กรดลอริกเป็นสารละลายอ้างอิงภายในเพื่อลดผลของการสูญหายของกรดไขมันระหว่างกระบวนการวิเคราะห์ งานวิจัยนี้ได้แสดงวิธีการสกัดกรดไขมัน เวลาในการเตรียมอนุพันธ์เป็นเมทิลเอสเทอร์ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งชนิดด่างแก่และกรดแก่ และสภาวะของเครื่อง GC-FID ที่ใช้แยกสารประกอบเมทิลเอสเทอร์ พร้อมทั้งได้แสดงวิธีการคำนวณผลร้อยละโดยมวลแยกตามชนิดของกรดไขมันตั้งแต่ Caprylic acid(C8:0) ถึง Selacholeic acid (C24:1) เพื่อให้นักวิจัย นักศึกษา หรือผู้ที่สนใจสามารถนำวิธีการไปประยุกต์ใช้ทดสอบสำหรับตัวอย่างอื่นๆ ที่สนใจได้ง่าย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก นางรุสนี กุลวิจิตร หัวหน้าฝ่ายบริการเครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำตลอดการวิจัยและ ผู้ช่วยศาสตราจารย์จุฬาลักษณ์ พัฒนศักดิ์ภิญโญ ผู้อำนวยการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนให้บุคลากรของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ได้มีการพัฒนาความรู้ต่อยอดงานประจำสู่งานวิจัย เพื่อตอบสนองความต้องการทางด้านวิชาการจากหน่วยงานทั้งภาครัฐและภาคเอกชน ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2545. กรดไขมันและ คอเลสเตอรอลในอาหารไทย Fatty Acids Composition and Cholesterol in thai Foods. [Online]. Available: http://nutrition.anamai.moph.go.th/images/file.pdf. (สืบค้นเมื่อ มีนาคม 2562)

แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวณิช, ภควดี สุทธิ์ไวยกิจ, มาณพ สิทธิเดช, สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์, อุมาพร สุขม่วง และวันเพ็ญ ช้อนแก้ว. 2555. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ (PARTII) (PRINCIPLES & TECHNIQUES OF INSTRUME. กรุงเทพฯ : ชวนพิมพ์. กรุงเทพมหานคร. 623 หน้า.

Jham, N.G., Teles, F.F.F. and Campos, L.G. 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(3): 132-133.

European Standard NormeEuropeenneEuropaische Norm. 2003. In Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents, Vol. EN 14103.

Ozcan, M.M. and Atalay, C. 2006. Determination of seed and oil properties of some poppy (*Papaver somniferum* L.) varieties. Grasas y Aceites. 57(2): 169-174.

Moser, B.R. 2012. Preparation of fatty acid methyl esters from hazelnut, high-oleic peanut and walnut oils and evaluation as biodiesel. Fuel, 92(1): 231-238.

Kuhnt, K., Degen, C., Jaudszus, A. and Jahreis, G. 2012. Searching for health beneficial n-3 and n-6 fatty acids in plant seeds. European journal of lipid science and technology: EJLST, 114(2): 153-160.

Vicente, J., Carvalho, M.G. and Garcia-Rojas, E.E. 2015. Fatty acids profile of Sacha Inchi oil and blends by 1H NMR and GC–FID. Food Chemistry. 181: 215-221.

Mostafavi, S., Asadi-Gharneh, H.L. and Miransari, M. 2019. The phytochemical variability of fatty acids in basil seeds (Ocimumbasilicum L.) affected by genotype and geographical differences. Food Chemistry 276: 700-706.