การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและวิเคราะห์กรดไขมันจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงด้วยเทคนิค GC-FID ใช้คอลัมน์ DB-225 ความยาว 20 เมตร

An appropriate extraction and analysis conditions for the determination of fatty acids from mango seeds kernel by GC-FID using 20 meter DB-225 column

ศิริรัตน์ ชาญไววิทย์[1]*, อภินทร์พร ทวีพรกุลพัฒน์[1], ปิยะวรรณ ศรีวิลาศ[2] และ สุนันทา วังกานต์[3]

[1] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2] สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

[3]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Sirirat Chanvaivit[1]*, Apinporn Taweepornkulpat [1] Piyawan Srivilas[2] and Sunanta Wangkarn[3]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

[2]The Institute of Marine Science, Burapha University

[3]Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University

บทคัดย่อ

ได้ทำการสกัดกรดไขมันจากตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วง ด้วยสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทน เมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 2: 1: 0.2 โดยแช่ตัวอย่าง 2 ชั่วโมง แล้วเมทิลเลชั่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 10 ชั่วโมงและทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-เฟลมไอออไนเซชั่นดีเทคเตอร์โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพาด้วยอัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ ณ จุดฉีดสารและดีเทคเตอร์ 240 องศาเซลเซียส ฉีดสารปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ Split ratio 100:1 แยกสารด้วยคอลัมน์ DB-225 (ยาว 20 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.10 มิลลิเมตร เคลือบสารหนา 0.10 ไมโครเมตร) โปรแกรมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส คงที่ 0.5 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 100 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 200 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มด้วยอัตรา 60 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 220 องศาเซลเซียส คงที่ 14 นาที พบกรดไขมัน 9 ชนิดในตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วงทั้ง 6 พันธุ์ กรดไขมันตัวสุดท้าย (C22:6n3) ออกมาที่เวลา 14.33 นาที

คำสำคัญ : กรดไขมัน เนื้อในเมล็ดมะม่วง แก๊สโครมาโทกราฟี

***Corresponding author.** E-mail: sirirat@buu.ac.th

Abstract

The fatty acids from mango seeds kernel were extracted with mixed solvents of dichloromethane methanol and water in the ratio of 2: 1: 0.2 by soak sample for 2 hours then methylation at 80 °C for 10 hours and analysis by gas chromatography-flame ionization detector. Helium was used as carrier gas at 0.3 ml/min. Injection and detector temperatures were 240 ºC. Injection volume was 1 µl and split ratio at 100:1. Samples were separated with DB-225 column (20 m length, 0.10 mm. i.d., 0.1 µm. flim thickness). The program temperature was start at 150 ºC held for 0.5 min., then increase with the rate of 100 ºC /min. to 200 ºC followed by the rate of 60 ºC/min to 220 ºC and held for 14 min. We found 9 fatty acids in 6 varieties of mango seed kernels. The last fatty acid (C22:6n3) came out at 14.33 min.

Keywords: fatty acid, mango seed kernel, gas chromatography

บทนำ

เนื้อในเมล็ดมะม่วงเป็นส่วนเหลือทิ้งจากการบริโภคหรือในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์จากมะม่วง เนื้อในเมล็ดมะม่วงคือส่วนสีขาวที่อยู่ภายในส่วนแข็งของเปลือกเมล็ดมะม่วง ในเนื้อในเมล็ดมะม่วงจะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันเล็กน้อย ซึ่งขึ้นกับสถานที่ปลูก สภาพอากาศและอายุเมล็ด เนื้อในเมล็ดมะม่วงประกอบด้วย แป้ง โปรตีนและกรดไขมัน (Nzikou *et al*., 2010) สำหรับกรดไขมันเป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัว นอกจากมีความจำเป็นต่อร่างกายแล้ว กรดไขมันยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆอีก เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ยาและอาหารสัตว์

การสกัดกรดไขมันโดยวิธีแบบดั้งเดิมใช้วิธีสกัดโดยใช้ซอกห์เลตโดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลาย (Muchiri *et al*., 2012) หรือใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย (Solís-Fuentes and Durán-de-Bazúa, 2004) อย่างไรก็ดีการสกัดโดยใช้ซอกห์เลตเป็นการสกัดที่ต้องใช้พลังงานความร้อนและอุปกรณ์ที่ใช้ทำการสกัด อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการสกัดไขมันคือการแช่ในตัวทำละลาย โดยการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งในการศึกษานี้เลือกสกัดโดยการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลายผสม การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดไขมันได้ศึกษาชนิดของตัวทำละลาย อัตราส่วนการเติมน้ำ เวลาในการสกัดแช่ตัวอย่างและเวลาในการเมทิลเลชั่น การวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันโดยทั่วไปจะเปลี่ยนกรดไขมันให้อยู่ในรูปกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ที่ระเหยได้โดยปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่นโดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ดังสมการ

$$RCOOH + R'OH \rightleftharpoons^{H+,\Delta} RCOOR' + H_2O$$

เมื่อกรดไขมันผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่นจะทำให้จุดเดือดของสารลดลงและง่ายต่อการกลายเป็นไอ และสามารถวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เมื่อเทียบพีคของสารที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่ผ่านการเมทิลเลชั่นกับสารมาตรฐานกรดไขมันที่อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ทำให้ทราบชนิดของกรดไขมัน ซึ่งจากการวิจัยที่ผ่านมีการใช้คอลัมน์หลายชนิด โดยทั่วไปใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่า 30 นาที เช่นงานของ Muchiri และคณะ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 36 นาทีเมื่อใช้คอลัมน์ 4%polyethylene glycol 20 M ที่เคลือบบน 60 -70 mesh diatomite "C" ยาว 1.5 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร และงานของ Nzikou และคณะที่ใช้เวลาวิเคราะห์ 32 นาที เมื่อใช้คอลัมน์ BPX 70 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 60 เมตรและมีความหนาของฟิลม์ที่เคลือบ 0.25 μM ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้คอลัมน์ DB225 ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.10 มิลลิเมตรยาว 20 เมตร สามารถวิเคราะห์ได้ภายใน 15 นาที ในส่วนของแก๊สโครมาโทกราฟี่ได้ศึกษาโปรแกรมอุณหภูมิและการฉีดสารแบบ Split ที่อัตราส่วนต่างๆ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี่-เฟลไอออไนเซชั่นดีเทคเตอร์ โดยการวิจัยนี้ได้ศึกษาในส่วนของโปรแกรมอุณหภูมิและ Split ratio ด้วยเครื่อง GC-FID รุ่น 6890 Series II, Hewlett Packard, USA ที่มีอัตราการไหลของแก๊สพา (ฮีเลียม) 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสาร 1 ไมโครลิตร อุณหภูมิ ณ จุดฉีดสาร 240 องศาเซลเซียส ใช้คอลัมน์ DB-225 ความยาว 20 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.10 มิลลิเมตร เคลือบด้วย (50%-Cyanopropylphenyl)-dimethylpolysiloxane หนา 0.10 ไมโครเมตร อุณหภูมิดีเทคเตอร์ 240 องศาเซลเซียส และใช้สารละลายมาตรฐานกรดไขมันผสม 18 ชนิด PUFA NO.3 ของบริษัท Supelco ความเข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาโปรแกรมอุณหภูมิ 3 แบบ ซึ่งแบบที่ 1 เป็นสภาวะที่เราได้จากการศึกษาโปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไขมันที่ได้รายงานไว้ในภาคนิพนธ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพาปี 2553 โดยรุ่งนภา ไทยเจริญ โดย แบบที่ 1 เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส คงที่ 1.0 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 50 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 200 องศาเซลเซียสคงที่ 1 นาที แล้วเพิ่มด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 220 องศาเซลเซียส คงที่ 13 นาที จากโครมาโทแกรมที่ได้จากแบบที่ 1 ผู้วิจัยได้ทดลองลดเวลาในการวิเคราะห์โดยการปรับโปรแกรมอุณหภูมิ แบบที่ 2 เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส คงที่ 0.5 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 50 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 200 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 220 องศาเซลเซียส คงที่ 13 นาที และแบบที่ 3 เริ่มต้น

ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส คงที่ 0.5 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 100 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 200 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มด้วยอัตรา 60 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 220 องศาเซลเซียส คงที่ 14 นาทีสำหรับการศึกษา split ratio ฉีดสารแบบ split ที่อัตราส่วน 200: 1, 150: 1, 100: 1, 50: 1 และ 25: 1 สำหรับ split ratio จะพิจารณาจากค่าการแยกของพีคที่ติดกันและพื้นที่พีค การศึกษาทั้งหมดทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

2. การสกัดกรดไขมันจากเนื้อในเมล็ดมะม่วง โดยการนำเมล็ดมะม่วงมาตากแดด 3 วัน แกะเอาเนื้อในเมล็ดมะม่วง ชั่งน้ำหนัก แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วเก็บใส่ขวดแล้วนำมาสกัดโดยชั่งตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วง 1 กรัม เติมสารละลายผสมไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ 20 มิลลิลิตร แช่ตัวอย่างในตัวทำละลายแล้วถ่ายส่วนใสลงในกรวยแยกทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง เติมสารละลาย 0.88% โพแทสเซียมคลอไรด์ 12 มิลลิลิตรเขย่าแล้วไขสารละลายชั้นล่างลงในขวดก้นกลมโดยผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำสารละลายชั้นบนไปสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทนและบีเอชที 15 มิลลิลิตร เขย่าแล้วไขสารละลายชั้นล่างลงในขวดก้นกลมใบเดิม นำไประเหยตัวทำละลายออก ชั่งขวดก้นกลมที่มีสารผลิตภัณฑ์อยู่ นำสารที่ได้ไปทำการเมทิลเลชั่นต่อโดย เติมสารละลายผสมไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ 3 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายใส่หลอดทดลองชนิดฝาเกลียว 1 มิลลิลิตรและ 2% กรดซัลฟิวริกในเมทานอล 10 มิลลิลิตร ใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ชะล้างสารในหลอดด้วยสารละลาย 5% โซเดียมคลอไรด์ 5 มิลลิลิตร เทลงในกรวยแยกเดิมสกัดต่อด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร ไขสารละลายชั้นล่างลงหลอดทดลองแล้วเติมเฮกเซน 5 มิลลิลิตร เขย่าและใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายชั้นบนใส่รวมในกรวยแยกเดิม เติมสารละลาย 2% โพแทสเซียมไบคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร เขย่าและเก็บส่วนเฮกเซนโดยผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำไประเหยตัวทำละลายออก ปรับปริมาตรโดยใช้เฮกเซนให้ได้ 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโทกราฟี-เฟลมไอออไนเซชั่นดีเทคเตอร์ ตัวแปรที่ศึกษาในการสกัดได้แก่ อัตราส่วนตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล (2:1) และอัตราส่วนตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : น้ำ (2:1: 0.2) อัตราส่วนการเติมน้ำ (0.04, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0) เวลาในการสกัดโดยแช่ตัวอย่าง (30 นาที 2, 6, 10,15 และ 24ชั่วโมง) และเวลาที่ใช้ในการทำเมทิลเลชั่น 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดที่ใช้เป็นเกรด AR โดยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล จากบริษัท RCI LABSCAN สาร BHT จากบริษัท Sigma เฮกเซนจากบริษัท J.T. Baker โซเดียมคลอไรด์ จากบริษัท Ajex chemical โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสจากบริษัท Fisher

โพแทสเซียมไบคาร์บอเนตจากบริษัท QRëC™ โพแทสเซียมคลอไรด์ เกรด AR จากบริษัท CARLO และกรดซัลฟิวริกเกรด AR จากบริษัท MERCK

3. วิเคราะห์กรดไขมันที่สกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงด้วยสภาวะที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลอง การเตรียมตัวอย่าง ใช้เนื้อในเมล็ดมะม่วง 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พิมเสน ที่เหลือทิ้งจากการแปรรูปของกลุ่มแม่บ้านเกษตรกรปากน้ำโจโล้ จ.ฉะเชิงเทรา พันธุ์ฟ้าลั่นจากห้างแมคโคร พันธุ์แก้ว เขียวเสวย แรดและโชคอนันต์จากไร่สมปอง บ่อทอง จ.ชลบุรี

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการศึกษาสภาวะเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-เฟลมไอออไนเซชั่นดีเทคเตอร์

ผลการศึกษาโปรแกรมอุณหภูมิ

จากการศึกษาโปรแกรมอุณหภูมิเพื่อวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดไขมันผสม 18 ชนิด PUFA NO.3 พบว่าโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 1, 2 และ 3 ให้สารมาตรฐานกรดไขมันตัวสุดท้าย (C22:6n3) ออกมาที่เวลา 16.26, 14.95 และ 14.33 นาที ตามลำดับ ดังรูปที่ 1

กำหนดให้หมายเลขต่อไปนี้แทนชนิดของกรดไขมันที่แสดงบนโครมาโทรแกรม

1 = Myristic acid (C14:0)

2 = Palmitic acid (C16:0)

3 = Palmitoleic acid (C16:1n7)

4 = Hexadecadienoic acid (C16:2n4)

5 = Hexadecatrienoic acid (C16:3n4)

6 = Stearic acid (C18:0)

7 = Oleic acid (C18:1n9)

8 = Vaccenic acid (C18:1n7)

9 = Linoleic acid (C18:2n6)

10 = Octadecatrienoic acid (C18:3n4)

11 = α-Linolenic acid (C18:3n3)

12 = Stearidonic acid (C18:4n3)

13 = Eicosenoic acid (C20:1n9)

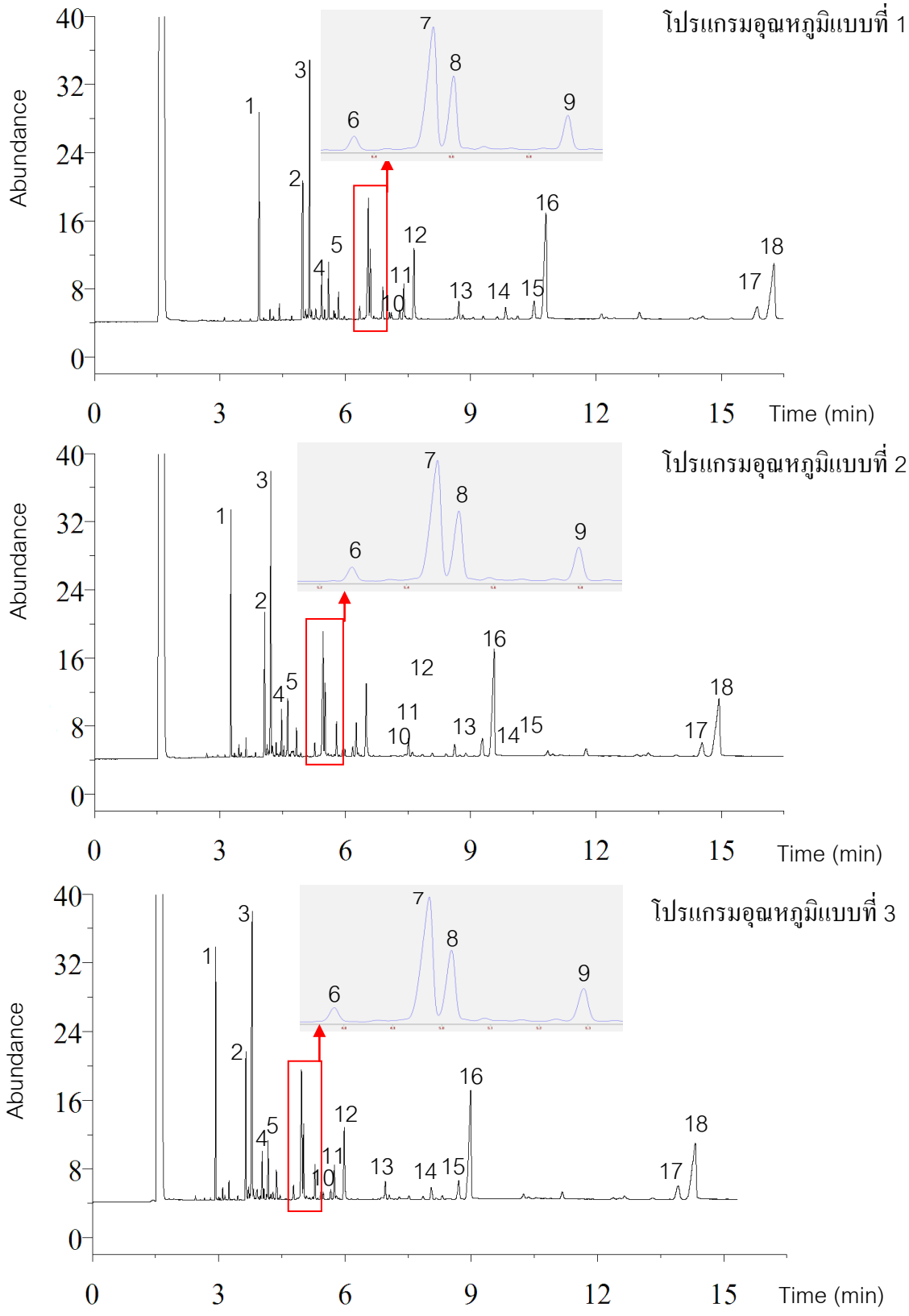
14 = Arachidonic acid (C20:4n6)

15 = Eicosatetraenoic acid (C20:4n3)

16 = Eicosapentaenoic acid (C20:5n3)

17 = Docosapentaenoic acid (C22:5n3)

18 = Docosahexaenoic acid (C22:6n3)

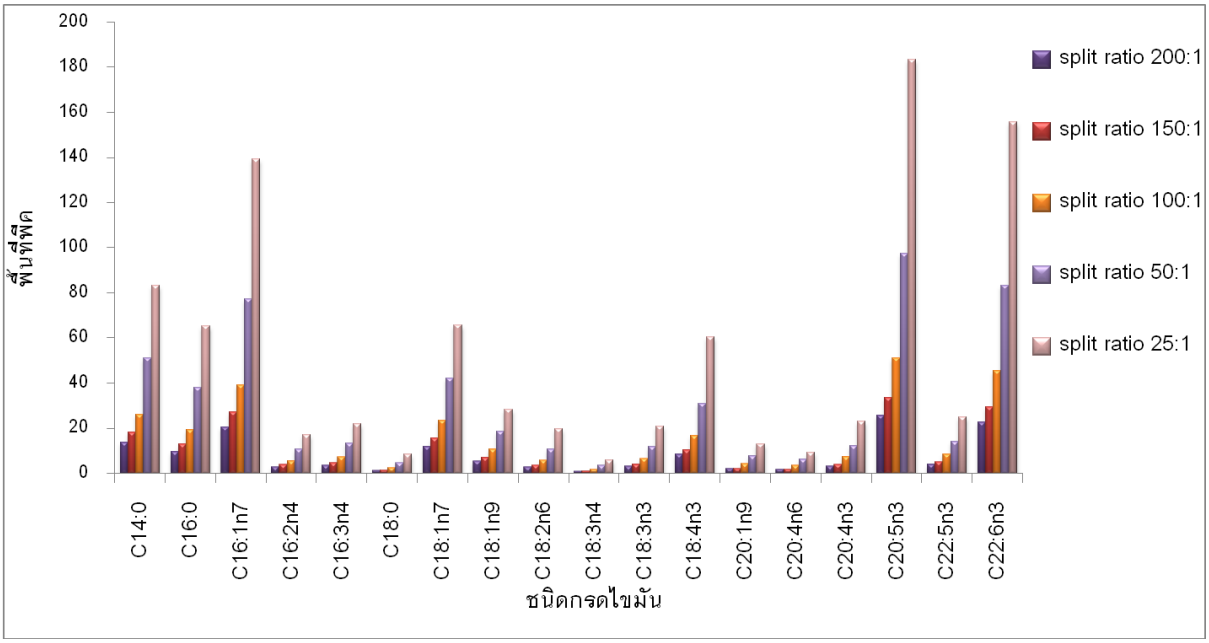


รูปที่ 1 โครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 1, 2 และ 3 โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดไขมันผสม 18 ชนิด ความเข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้การฉีดสารแบบ Split ratio 100:1

จากโครมาโทแกรมจะเห็นได้ว่าโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 3 ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดสั้นที่สุด การศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้โปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 3 คือ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส คงที่ 0.5 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 100 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 200 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มด้วยอัตรา 60 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 220 องศาเซลเซียส คงที่ 14 นาที

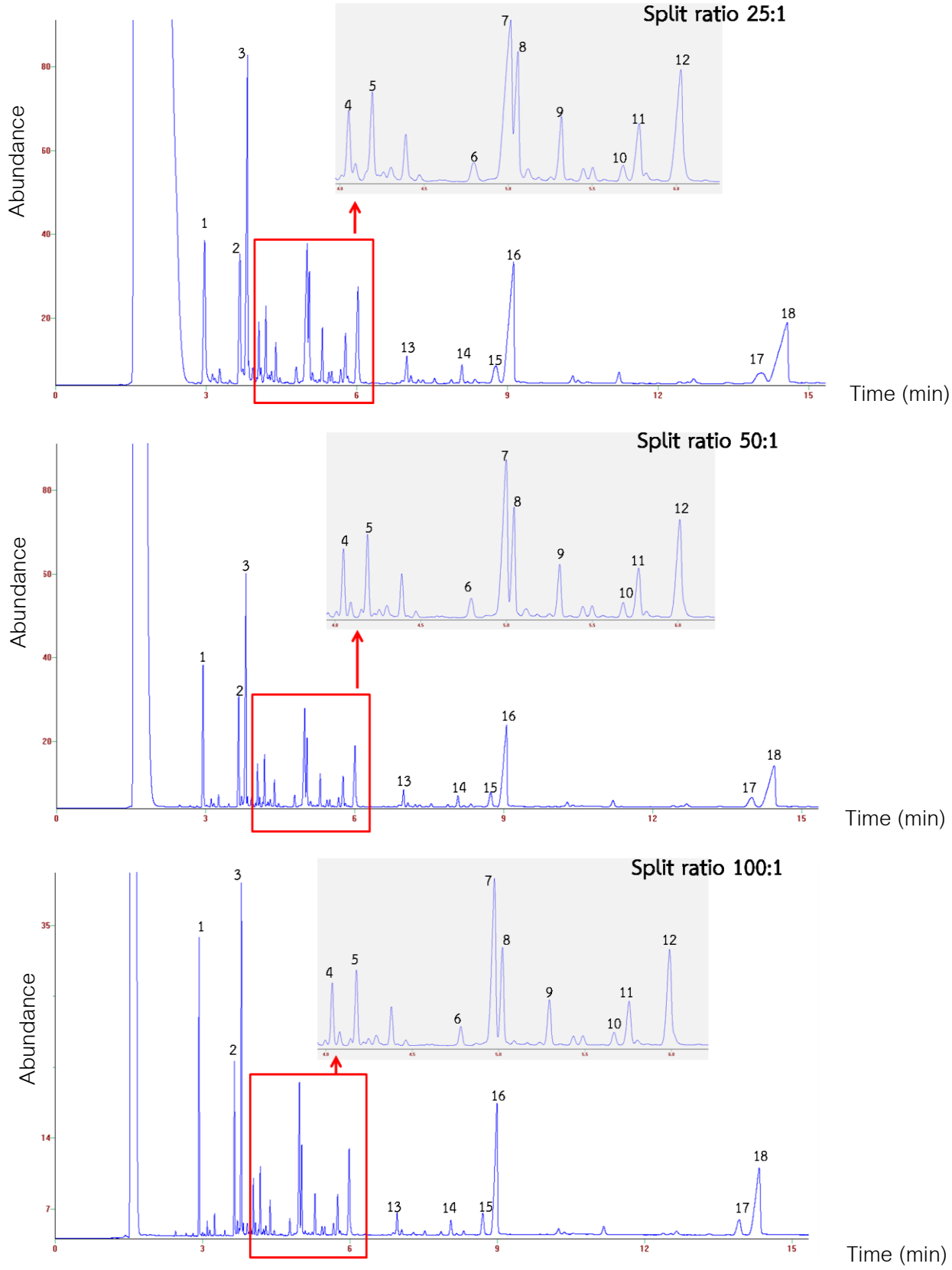
ผลการศึกษาการฉีดสารแบบ Split ที่อัตราส่วนต่าง ๆ

การศึกษาอัตราส่วนการฉีดสารใช้ Split ratio 200: 1, 150: 1, 100: 1, 50: 1 และ 25: 1 ให้พื้นที่พีคแสดงดังรูปที่ 2

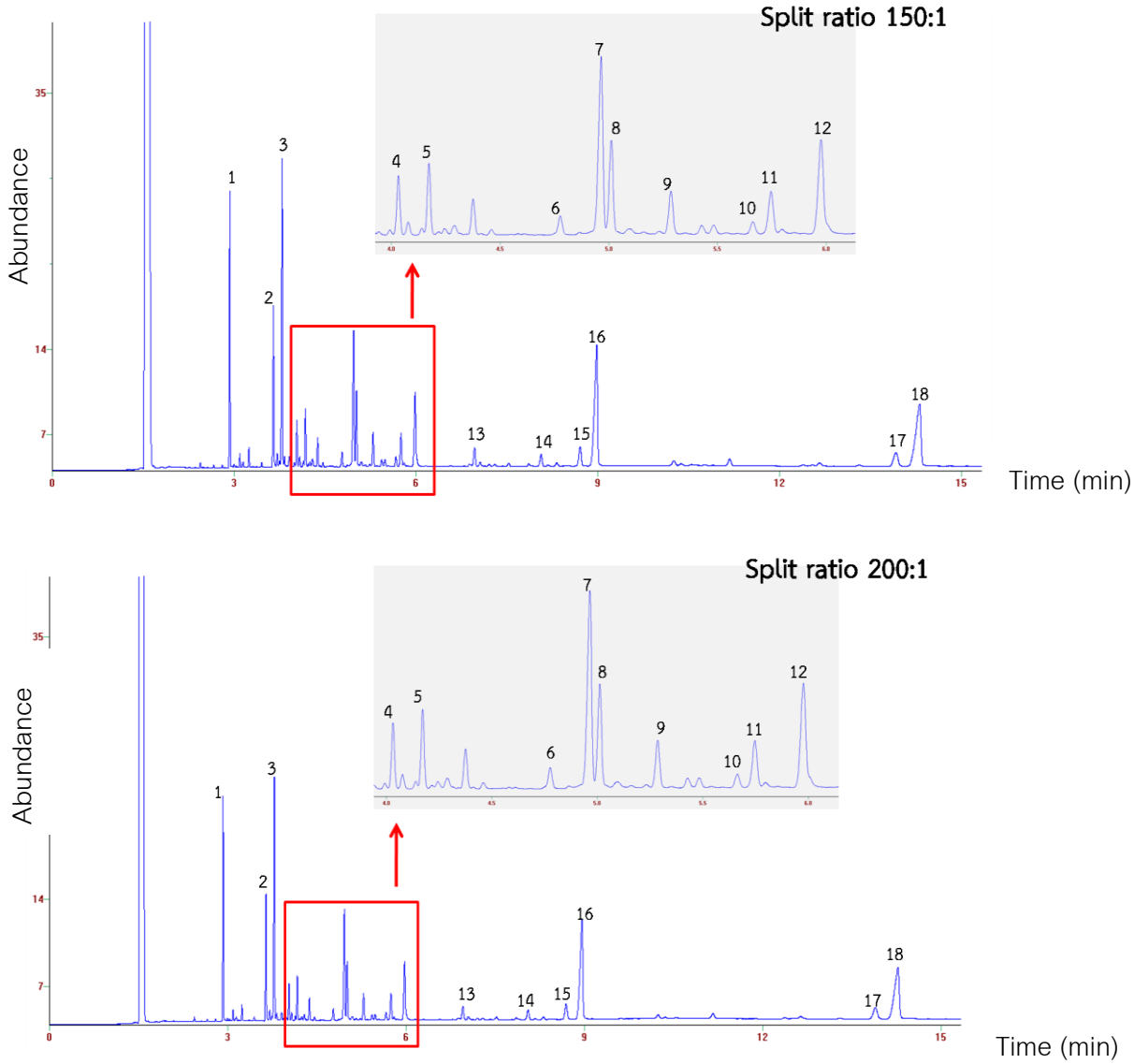


รูปที่ 2 พื้นที่พีคของกรดไขมันจากการฉีดสารละลายมาตรฐานกรดไขมัน 5000 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ split ratio ต่างๆด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 3

จะเห็นได้ว่าที่ Split ratio น้อยให้พื้นที่พีคมากแต่เมื่อพิจารณาการแยกของพีคดังรูปที่ 3 และ 4 จะเห็นได้ว่ามีพีคที่ติดกันคือ พีคหมายเลข 7 (Oleic acid) และ พีคหมายเลข 8 (Vaccenic acid) ที่ไม่สามารถแยกได้ที่ Split ratio 25: 1 และ 50: 1 ส่วนที่ Split ratio 100: 1, 150: 1และ 200: 1 พีคทั้งสองสามารถแยกได้ดีกว่า แต่ที่อัตราส่วน 100: 1 ให้พื้นที่พีคสูงกว่าในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้การฉีดสารที่อัตราส่วน 100: 1



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาการฉีดสารละลายมาตรฐานกรดไขมันผสม 18 ชนิด เข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ split ratio 25:1, 50:1 และ 100:1 ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 3

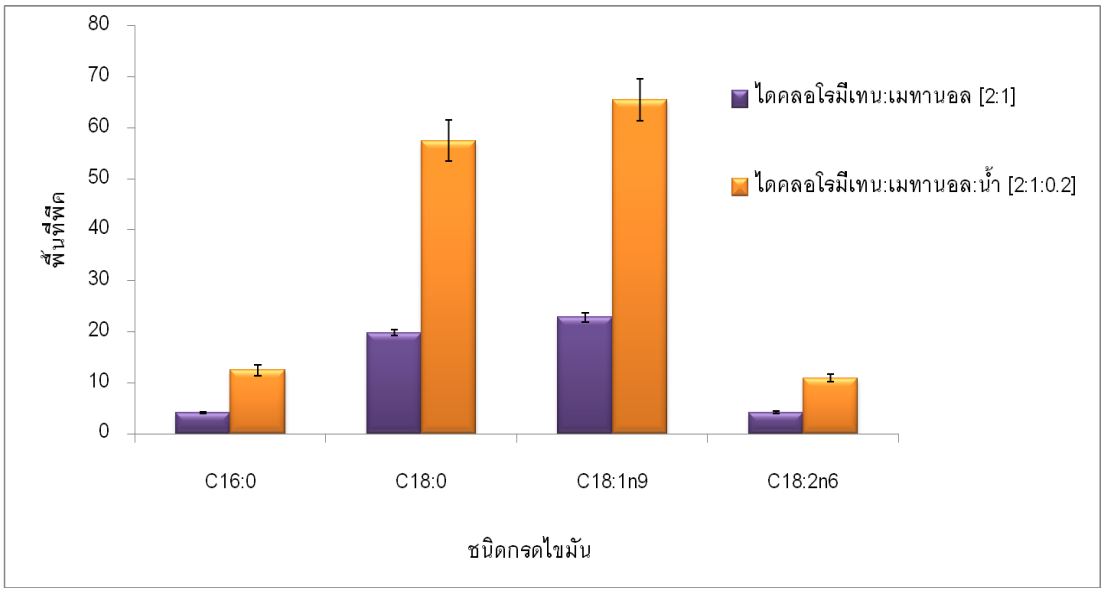


รูปที่ 4 โครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาการฉีดสารละลายมาตรฐานกรดไขมันผสม 18 ชนิด เข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ split ratio 150:1 และ200:1 ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 3

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดไขมัน

การศึกษาชนิดของตัวทำละลาย

จากการสกัดกรดไขมันจากเมล็ดมะม่วงพันธุ์พิมเสนโดยใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (2: 1) เปรียบเทียบกับตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ (2:1: 0.2) ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่5

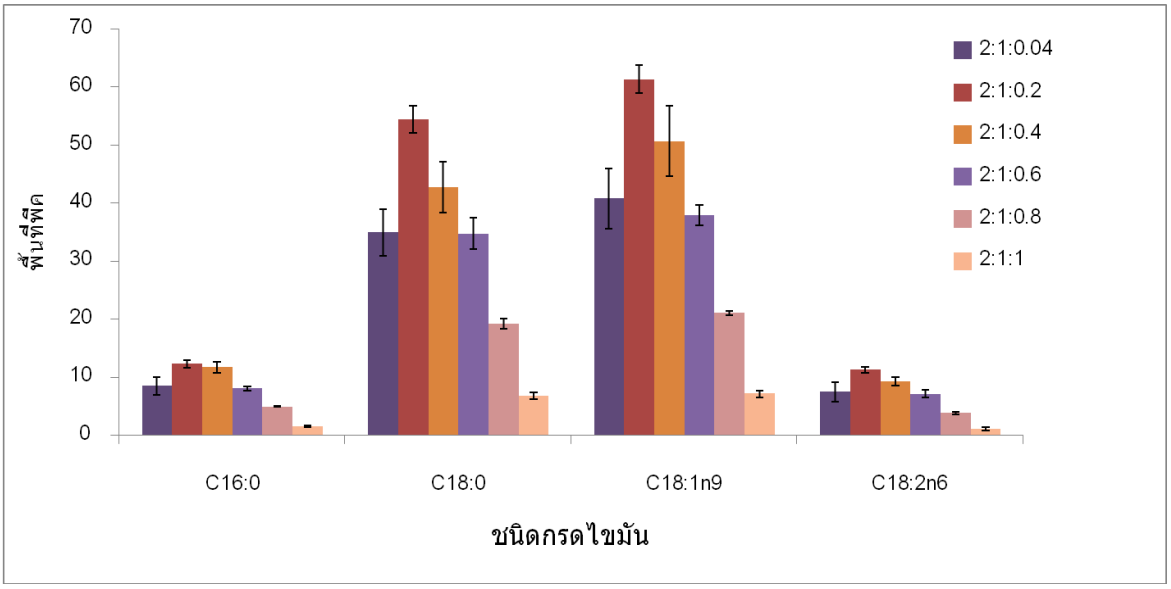


รูปที่ 5 พื้นที่พีคของกรดไขมันที่ได้จากการสกัดเนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์พิมเสนด้วยตัวทำละลาย (n=3)

จากการสกัดตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์พิมเสนด้วยตัวทำละลาย พบว่า การสกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ ที่อัตราส่วน 2: 1: 0.2 ให้พื้นที่พีคสูงกว่า ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน: เมทานอลที่อัตราส่วน 2: 1 ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายผสมที่ไม่ได้เติมน้ำจะเกิดการแยกชั้นของตัวทำละลาย การเติมน้ำปริมาตรที่เหมาะสมทำให้สารละลายผสมรวมกันเป็นเนื้อเดียว ซึ่งส่งผลให้สามารถสกัดกรดไขมันได้ดีขึ้น

การศึกษาอัตราส่วนการเติมน้ำ

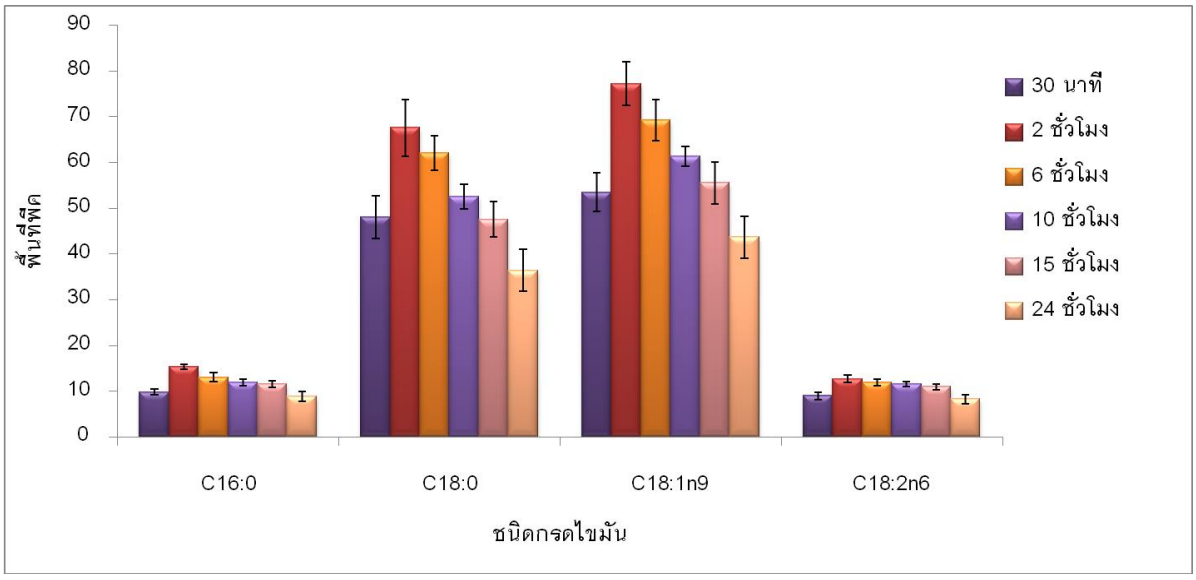
จากการสกัดตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์พิมเสน ด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ ในอัตราส่วน 2: 1: 0.04, 2: 1: 0.2, 2: 1: 0.4, 2: 1: 0.6, 2: 1: 0.8 และ 2: 1: 1 มิลลิลิตร ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 6 พบว่า การสกัดตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์พิมเสนด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ อัตราส่วน 2: 1: 0.2 ให้พื้นที่พีคที่มีสัญญาณสูงที่สุด



รูปที่ 6 อัตราส่วนตัวทำละลายผสมของไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ ในอัตราส่วนต่างๆ กับพื้นที่พีคของกรดไขมันที่สกัดได้จากเนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์พิมเสน (n=3)

การศึกษาเวลาในการสกัดโดยแช่ตัวอย่าง

จากการสกัดตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์พิมเสนด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ อัตราส่วน 2: 1: 0.2 โดยใช้เวลาในการสกัด 30 นาที, 2, 6, 10, 15 และ 24 ชั่วโมง ได้ผลแสดงดังรูปที่ 7

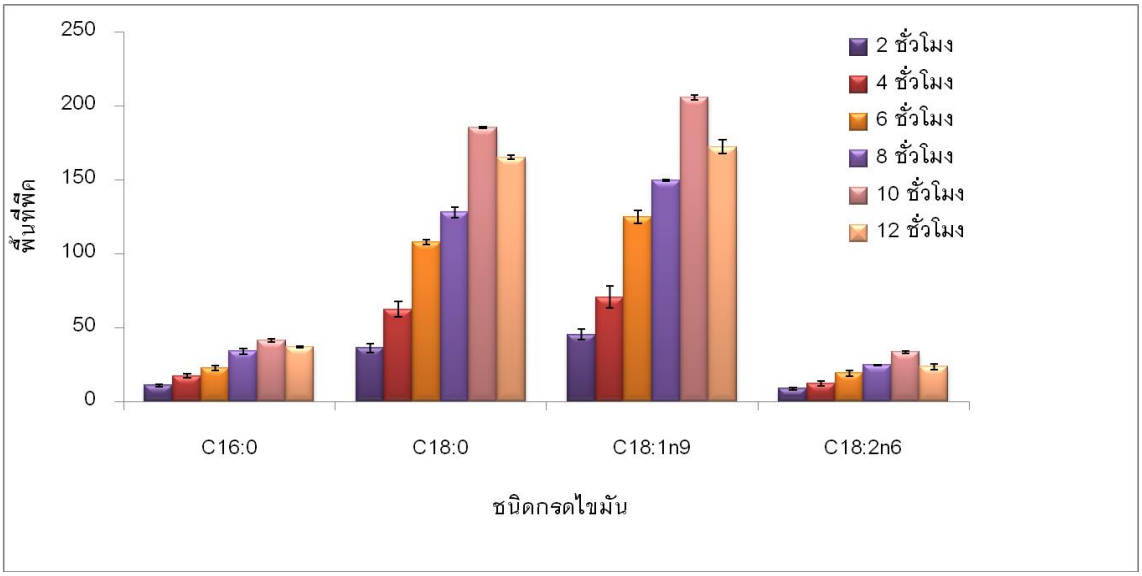


รูปที่ 7 พื้นที่พีคของกรดไขมันที่ได้จากการสกัดตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์พิมเสน ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ (2:1:0.2) ที่เวลาสกัดโดยการแช่ตัวอย่างต่างๆ (n=3)

จะเห็นได้ว่าเวลาในการสกัดแช่ตัวอย่าง 2 ชั่วโมงจะให้พื้นที่พีคที่มีสัญญาณสูงที่สุด และสัญญาณของพื้นที่พีคจะลดต่ำลงเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มเป็น 6, 10, 15 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ที่เวลาการสกัดแช่ 30 นาที ระยะเวลาการสกัดแช่ตัวอย่างอาจสั้นเกินไป กรดไขมันในตัวอย่างอาจยังละลายในตัวทำละลายไม่หมดยังคงเหลืออยู่ในตัวอย่าง ทำให้พื้นที่พีคน้อย แต่เมื่อใช้เวลาสกัดแช่ตัวอย่างเกินกว่า 2 ชั่วโมง พื้นที่พีคของกรดไขมันมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับการสกัดแช่ตัวอย่างเพียง 2 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากเวลาที่นานเกินไปทำให้ ตัวทำละลายบางส่วนระเหยไป และส่งผลต่อทำประสิทธิภาพในการสกัดที่ลดลง

การศึกษาเวลาในการเมทิลเลชั่น

จากการศึกษาเวลาในการทำเมทิลเลชั่นพบว่าการทำเมทิลเลชั่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง ให้พื้นที่พีคที่สูงขึ้นเรื่อยๆ และสูงที่สุดที่เวลา 10 ชั่วโมงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ผลของเวลาในการทำเมทิลเลชั่นของตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์พิมเสนที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ (2:1:0.2) (n=3)

ซึ่งในการเมทิลเลชั่นกรดไขมันจะต้องใช้เวลาเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้สมบูรณ์แต่ถ้าใช้เวลามากเกินไป พื้นที่พีคกลับลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่กรดไขมันได้รับความร้อนสูงเป็นเวลานานจึงเกิดการสลายตัวได้

ผลการศึกษาชนิดของกรดไขมันในตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วง

เปอร์เซ็นต์ไขมันทั้งหมด

จากการศึกษาไขมันทั้งหมดที่ได้จากการสกัดตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วงของมะม่วงทั้ง 6 ชนิด ด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำ (2: 1: 0.2) โดยใช้เวลาสกัดแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย 2 ชั่วโมง ทำการเมทิลเลชั่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่ามะม่วงพันธุ์แก้วให้เปอร์ เซ็นต์ไขมันสูงที่สุด (6.83± 0.26) % และมะม่วงพันธุ์พิมเสนให้เปอร์เซ็นต์ไขมันต่ำที่สุด (3.41± 0.08) %

เปอร์เซ็นต์กรดไขมันที่พบในมะม่วงแต่ละชนิด

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์กรดไขมัน ในมะม่วงพันธุ์ฟ้าลั่น แก้ว เขียวเสวย แรด และโชคอนันต์ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบชนิดกรดไขมันที่พบในตัวอย่างเนื้อในเมล็ดมะม่วงพันธุ์พิมเสนกับมะม่วงพันธุ์อื่น ชนิดของกรดไขมันที่พบเหมือนกัน เปอร์เซ็นต์กรดไขมันที่พบในมะม่วงแต่ละชนิดมีเปอร์เซ็นต์ต่างกันเล็กน้อย ซึ่งผลของเปอร์เซ็นต์กรดไขมันแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์กรดไขมันที่พบในมะม่วงแต่ละชนิด (n=3)

ชนิดกรดไขมัน	เปอร์เซ็นต์กรดไขมัน					
	มะม่วงพิมเสน	มะม่วงฟ้าลั่น	มะม่วงแก้ว	มะม่วงเขียวเสวย	มะม่วงแรด	มะม่วงโชคอนันต์
Myristic acid (C14:0)	0.07±0.01	0.24±0.04	0.04±0.02	0.08±0.01	0.04±0.01	ND
Palmitic acid (C16:0)	9.37±0.07	13.92±0.61	8.93±0.28	11.75±0.46	10.72±0.44	12.50±0.61
Hexadecatrienoic acid (C16:3n4)	0.13±0.01	0.16±0.01	0.18±0.01	0.16±0.01	0.15±0.00	0.15±0.01
Stearic acid (C18:0)	38.69±0.04	39.00±0.66	42.04±0.35	44.24±0.84	44.39±0.18	37.06±0.42
Oleic acid (C18:1n9)	43.19±0.03	37.98±0.26	42.77±0.11	35.85±0.20	36.05±0.69	43.38±0.74
Linoleic acid (C18:2n6)	7.05±0.02	6.73±0.35	4.83±0.07	6.15±0.42	7.08±0.03	5.42±0.43
Octadecatrienoic acid (C18:3n4)	0.10±0.01	0.19±0.04	0.11±0.02	0.10±0.02	0.09±0.03	0.11±0.04
α-Linolenic acid (C18:3n3)	0.70±0.03	0.96±0.02	0.56±0.06	1.03±0.10	0.77±0.04	0.57±0.08
Eicosenoic acid (C20:1n9)	0.69±0.01	0.82±0.15	0.54±0.20	0.65±0.10	0.71±0.12	0.82±0.10

เปอร์เซนต์กรดไขมันจากเม็ดมะม่วงจากการศึกษาครั้งนี้ได้ค่าใกล้เคียงกับกรดไขมันที่พบจากการสกัดโดยใช้ซ็อคเล็ต เช่น งานของ Fahimdanesh และ Bahrami (2013) ที่พบ Stearic acid 37.73% และ Oleic acid 46.22% นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานของ Kaphueaknam, Flood และ Sonwai (2009) ที่พบ Palmitic acid 5.39 %, Stearic acid 46.55% และ Oleic acid 41.09% ในมะม่วงแก้วเมื่อสกัดโดยใช้ซ็อคเล็ตที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6ชั่วโมง และงานของ Supraluckpanya และ Srivilai (2013) ที่พบกรดไขมัน 6 ชนิด ได้แก่ Palmitic acid 8.50-8.93%, Stearic acid 37.37-38.50%, Oleic acid 43.45-44.75%, Linoleic acid 5.67-6.78%, Linolenic acid 0.49-0.79% และ Ecosenoic acid 2.19-2.51% เมื่อสกัดโดยใช้ซ็อคเล็ต โดยเปรียบเทียบการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเธอร์ เอทานอลและเฮกเซน

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาพบว่าการสกัดโดยใช้สารละลายผสมที่เติมน้ำในปริมาณที่เหมาะสมช่วยให้สามารถสกัดกรดไขมันได้ดีขึ้น เนื่องจากกรดไขมันมีสภาพขั้วต่ำแต่ในโมเลกุลมีหมู่คาร์บอกซิลิกที่มีขั้ว การสกัดโดยใช้สารละลายผสมที่ไม่ได้เติมน้ำจะเกิดการแยกชั้นของตัวทำละลาย การเติมน้ำปริมาตรที่เหมาะสมทำให้สารละลายผสมรวมกันเป็นเนื้อเดียวซึ่งส่งผลให้สามารถสกัดกรดไขมันได้ดีขึ้น จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ ใช้สารละลายผสม ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล: น้ำในอัตราส่วน 2: 1: 0.2 โดยแช่ตัวอย่าง 2 ชั่วโมง แล้วเมทิลเลชั่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 10 ชั่วโมง ให้พื้นที่พีคของกรดไขมันสูงที่สุด การวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ที่สั้นทำให้สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว แต่ต้องปรับอัตราการไหลของแก๊สพาและ split ratio ให้เหมาะสม การใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพาด้วยอัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ ณ จุดฉีดสารและดีเทคเตอร์ 240 องศาเซลเซียส ฉีดสารปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ Split ratio 100:1 แยกสารด้วยคอลัมน์ DB-225 (ยาว 20 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.10 มิลลิเมตร เคลือบสารหนา 0.10 ไมโครเมตร) โปรแกรมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส คงที่ 0.5 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 100 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 200 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มด้วยอัตรา 60 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 220 องศาเซลเซียส คงที่ 14 นาที สามารถแยกสารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA NO.3) ทั้ง 18 ชนิดได้โดยใช้เวลาเพียง 14.33 นาที จากการวิเคราะห์กรดไขมัน9 ชนิดในเนื้อในเมล็ดมะม่วงพิมเสน ฟ้าลั่น แก้ว เขียวเสวย แรด และโชคอนันต์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนทุนวิจัยและห้องปฏิบัติการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

รุ่งนภา ไทยเจริญ. (2553). การศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดกรดไขมันจากเปลือกและเนื้อของแก้วมังกรด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-เฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์. ภาคนิพนธ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Fahimdanesh, M. and Bahrami M.E. (2013). Evaluation of Physicochemical Properties of Iranian Mango Seed Kernel Oil. Paper presented at 2 nd International Conference on Nutrition and Food sciences. *IPCBEE,* vol.53, IACSIT Press, Singapore, 44-49.

Kaphueakngam, P., Flood, A. and Sonwai, S. (2009). Production of cocoa butter equivalent from mango seed almond fat and palm oil mid-fraction. *Asian Journal of Food and Agro-Industry. 2*(4), 441-447.

Muchiri, D.R., Mahungu, S.M. and Gituanja, S.N. (2012). Studies on Mango (*Mangifera indica,* L.) Kernel Fat of Some Kenyen Varieties in Meru. *Journal of the American Oil Chemists' Society. 89,* 1567-1575.

Nzikou, J.M., Kimbonguila, A., Matos, L., Loumouamou, B., Pambou-Tobi. N.P.G., Ndangui, C.B., et al. (2010). Extraction and Characteristics of Seed kernel Oil from Mango (*Mangifera indica*). *Journal of Environmental and Earth Sciences. 2*(1), 31-35.

Solís-Fuentes, J.A. and Durán-de-Bazúa, M.C. (2004). Mango seed uses: thermal behaviour of mango seed almond fat and mixtures with cocoa butter. *Bioresource Technology. 92,* 71-78.

Supraluckpanya, K., and Srivilai S. (2013). Mango seed kernel oil and its physicochemical properties. *International Food Research Journal*. 20(3), 1145-1149.