บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ผลิตด้วยวิธีการหมัก และการหีบเย็น ในงานวิจัยได้เตรียมตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์จากตัวอย่างมะพร้าว 6 สายพันธุ์ คือ มะพร้าวต้นพันธุ์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เวสท์แอฟริกันต้นสูง มลายูสีเหลืองต้นเตี้ย และไทยต้นสูง และมะพร้าวลูกผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สวีลูกผสม 1 ลูกผสมชุมพร 60 และลูกผสมชุมพร 2 ที่ปลูกรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

3.1.2 สารเคมี

- กรดแกลลิก (Gallic acid, $C_{75}H_{52}O_{46}$) (Sigma-aldrich, ประเทศเยอรมัน)
- กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4) (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid, H_3PO_4) (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- กรดลอริก (Lauric acid, C12:0) (Sigma-aldrich, ประเทศเยอรมัน)
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- กลีเซอรอล (Glycerol) Analytical grade (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$) Analytical grade (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- โซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส (Sodium sulfate anhydrous, Na_2SO_4) (BHD, ประเทศอังกฤษ)
- โซเดียมฟอสเฟต (Sodiumphosphate, Na_3PO_4) (Sigma-aldrich, ประเทศเยอรมัน)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- โทลูอีน (Toluene, $C_6H_5CH_3$) Analytical grade (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide, KOH) Analytical grade (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- ฟีนอล์ฟธาลีน (Phenolphthalein, $C_{20}H_{14}O_4$) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- ฟอลิน ซิโอแคลตู (Folin-Ciocalteu) (BHD, ประเทศอังกฤษ)
- เมทานอล (Methanol, CH_3OH) (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- อะซิติลคลอไรด์ (Acetyl chloride, CH_3COCl) (Sigma-aldrich, ประเทศเยอรมัน)
- เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH) (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- เอนไซม์ไลเปสจี (Lipase G) จากเชื้อ *Penicillium camembertii* (Sigma-aldrich, ประเทศสิงคโปร์) (EC number: 3.1.1.3 และ activity: 50,000 U/g)
- เอนไซม์ไลโปไซม์ (Lypozyme) จากเชื้อ *Rhizomucor miehei* (RM IM lipase) (Sigma-aldrich, ประเทศสิงคโปร์) (EC number: 3.1.1.1 และ activity: 30 U/g)
- เอนไซม์ไลเปสอาร์ (Lipase R)จากเชื้อ *Rhizopus arrhizus* (Sigma-aldrich, ประเทศสิงคโปร์) (EC number: 3.1.1.3 และ activity: 2 U/g)
- ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol, C_3H_8O) Analytical grade (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- แอมโมเนียมโมลิปเดท (Ammonium molybdate, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) (Sigma-aldrich, ประเทศเยอรมัน)
- แอลฟาโทโคเฟอรอล (Alfa-tocopherol) HPLC grade (Sigma-aldrich, ประเทศเยอรมัน)
- เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14}) Analytical grade (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)
- เฮปเทน (Heptane, C_7H_{16}) Analytical grade (Labscan Asia Co. Ltd., ประเทศไทย)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

- หลอดทดลองชนิดฝาเกลียว (Screw cap tube)
- ชั้นวางหลอดทดลอง (Rack)
- บีกเกอร์ (Beaker)
- หลอดเหวี่ยง (Centrifuge tube)
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
- กระบอกตวง (Measuring cylinder)
- เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) อุณหภูมิ 0-200 องศาเซลเซียส
- ขวดใส่สารขนาดเล็ก (Vial)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- ไปเปต (Pipette)
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- หลอดหยด (Dropper)
- ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
- แท่งแก้วคน (Stirring rod)
- Cuvette ชนิด Quartz

3.2.2 เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์

- เครื่อง Heating block รุ่น SHT 100 D ยี่ห้อ Stuart Scientific ประเทศเนเธอร์แลนด์
- คอลัมน์ชนิดคะปิลารี่ (Capillary column) รุ่น SP^{TM}-2560, 100 m x 0.25 mm I.D. x 0.20 um film thickness ยี่ห้อ Supelco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- คอลัมน์ชนิดคะปิลารี่ (Capillary column) รุ่น DB-1, 25 m x 32 mm I.D. x 12 um film thickness ยี่ห้อ Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatography, GC) รุ่น 6890N ยี่ห้อ Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องชั่งสารความละเอียด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) รุ่น ED224S ยี่ห้อ Sartorius ประเทศเยอรมนี
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น HARRIER 15/80 Bench Top Refrigerated Centrifuge ยี่ห้อ Sanyo ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S UV/Vis ยี่ห้อ Thermo fisher sciencetific ประเทศสหราชอาณาจักร
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น SevenEasy ยี่ห้อ Mettler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- เครื่องระเหยสุญญากาศ (Vacuum evaporator) รุ่น R/210 ยี่ห้อ Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- ตู้เขย่า (Shaking incubator) รุ่น LSI-5002M ยี่ห้อ Daihan Lab Tech ประเทศเกาหลี

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3 วิธีการทดลอง

มะพร้าวที่ใช้ในการวิจัย ขอความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร โดยมีพันธุ์เวสท์แอฟริกันต้นสูง (West african tall, WAT) พันธ์ไทยต้นสูง (Thai tall, THT) และพันธุ์มลายูสีเหลืองต้นเตี้ย (Malayan yellow dwarf, MYD) เป็นพันธุ์ดั้งเดิมที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ และมะพร้าวพันธุ์ลูกผสมที่ได้หลังการปรับปรุง คือ พันธุ์สวีลูกผสม 1 (WAT x MYD) พันธุ์ลูกผสมชุมพร 60 (WAT x THT) และพันธุ์ลูกผสมชุมพร 2 (MYD x THT) มะพร้าวทั้ง 6 สายพันธุ์ (รูปที่ 12) นำมาผลิตเป็นน้ำมัน 2 วิธี คือ การหมักแบบธรรมชาติ และการหีบเย็น ขั้นตอนการเตรียมน้ำมันมะพร้าว แสดงดังรูปที่ 13 และ 14

Prince of Songkla University
Pattani Campus

รูปที่ 12 มะพร้าวสายพันธุ์ต่างๆ A: พันธุ์เวสท์แอฟริกันต้นสูง B: พันธุ์ไทยต้นสูง C: พันธุ์มลายูสีเหลืองต้นเตี้ย D: พันธุ์สวีลูกผสม 1 E: พันธุ์ลูกผสมชุมพร 60 และ F: พันธุ์พันธุ์ลูกผสมชุมพร 2

คัดเลือกมะพร้าวสภาพสมบูรณ์ ไม่งอก และไม่เน่า ผ่า แล้วขูด

เตรียมน้ำกะทิ โดยใช้มะพร้าวขูด: น้ำสะอาด ในอัตราส่วน 1:1 แล้วคั้นด้วยมือเอากะทิ

ทำการแยกกะทิ โดยตั้งโถครีมกะทิไว้ในกล่องโฟมที่ปรับอุณหภูมิภายในด้วยหม้อน้ำร้อน (70-80 องศาเซลเซียส) จะเกิดการแยกชั้นเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

ตักแยกชั้นของน้ำมันมากรองผ่านผ้าขาวบางพับ 8 ชั้น

ระเหยน้ำออกจากน้ำมันด้วยการตั้งภาชนะที่ใส่น้ำมันในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส น้ำมันที่ได้จะมีลักษณะใส บรรจุขวดที่แห้งสนิท

รูปที่ 13 การผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยวิธีการหมักธรรมชาติ

Prince of Songkla University
Pattani Campus

คัดเลือกมะพร้าวสภาพสมบูรณ์ไม่งอก และไม่เน่า ผ่า แล้วขูด

↓

อบเนื้อมะพร้าวขูดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
เพื่อให้ความชื้นลดลงเหลือประมาณ 15%

↓

มะพร้าวอบหีบน้ำมันด้วยเครื่องบีบอัดแบบสกรู

↓

กรองน้ำมันที่ได้ด้วยผ้าขาวบางพับ 8 ชั้น น้ำมันที่ได้จะมีลักษณะใส
บรรจุขวดที่แห้งสนิทเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

รูปที่ 14 การผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยวิธีการหีบเย็น

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันมะพร้าว 6 สายพันธุ์

3.3.1.1. ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน (ดัดแปลงจาก Durmaz *et al*., 2007)

ชั่งตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวปริมาณ 30 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เติม Acetyl chloride/CH_3OH (1:19, v:v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 5 นาที ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมเฮกเซน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันอีกครั้งด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายสารละลายลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ หมุนเหวี่ยงที่ระดับ 3000 rpm อุณหภูมิ 20 ^{0}C นาน 15 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น ไปเปตสารละลายส่วนบนซึ่งเป็นส่วนของ Fatty acid methyl ester (FAME) ใส่ในบีกเกอร์ กำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต ไปเปต FAME ใส่ในขวดใส่สารขนาดเล็ก (Vial) ฉีดตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตรเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (สภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ แสดงในตารางที่ 8) คำนวณร้อยละของกรดไขมันแต่ละชนิดต่อปริมาณกรดไขมันทั้งหมด

การคำนวณ

Fatty acid (%) = (A1/A2) x 100

โดย

A1 = พื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันที่ต้องการวิเคราะห์

A2 = พื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันทั้งหมด

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 8 สภาวะในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันมะพร้าวโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

Item	**Value**
Flow rate of carrier gas (Helium)	2 ml/min
Injector temperature	250 ^{0}C
Injection volume	1 µl
Column	Capillary column, SP^{TM}-2560, 100 m x 0.25 µm I.D. x 0.20 mm film thickness
Temperature Program	60 ^{0}C (held for 1 min), then increased to 170 ^{0}C at a rate of 10^{0}C/ min, held at 170 ^{0}C for 10 min, then increased at a rate of 4 ^{0}C/ min to 224 ^{0}C and held at 200 ^{0}C for 5 min
Detector	Flame Ionization Detector (FID), 250 ^{0}C

3.3.1.2. รูปแบบของไตรกลีเซอไรด์ (ดัดแปลงจาก Ulberth and Gaberning, 1997)

ชั่งตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวปริมาณ 10 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เติมเฮปเทน 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 5 นาที ไปเปตสารละลายใส่ใน Vial และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เพื่อวิเคราะห์รูปแบบของไตรกลีเซอไรด์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (สภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ แสดงในตารางที่ 9) รูปแบบของไตรกลีเซอไรด์รายงานในค่าของเลขคาร์บอน (Carbon number, CN) โดยเทียบกับ Retention time ของไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน (Tricaprin, Trilaurin, Trimyristin และ Tripalmitin)

ตารางที่ 9 สภาวะในการวิเคราะห์รูปแบบของไตรกลีเซอไรด์ โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

Item	**Value**
Flow rate of carrier gas (Helium)	2 ml/min
Injector temperature	320 ^{0}C
Injection volume	1 µl
Column	Capillary column, DB-1, 25 m x 32 mm I.D. x 12 µm film thickness
Temperature Program	280 ^{0}C (held for 1 min), then increased to 320 ^{0}C at a rate of 20^{0}C/ min and held at 320 ^{0}C for 15 min
Detector	Flame Ionization Detector (FID), 320 ^{0}C

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.1.3. ค่ากรด (Acid value) (AOCS Official Method Cd 3d-63 revised., 2003)

ชั่งน้ำมันมะพร้าวประมาณ 10 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายผสมของ Isopropyl alcohol: toluene ที่อัตราส่วน 1:1 v/v ปริมาตร 125 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง หยด Phenolphthalein ลงไปในสารละลาย นำไปไทเทรตกับ 0.1 N โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนถึงจุดยุติ (จุดยุติเป็นสีชมพูนาน 30 วินาที) นำสารละลาย Blank มาไทเทรทกับ 0.1 N โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนถึงจุดยุติ คำนวณปริมาณกรด และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม (mg KOH/ g oil) ตามสูตรคำนวณข้างล่าง

การคำนวณ

$$\text{mg KOH/g of sample} = [(A-B) \times N \times 56.1] / W$$

โดย

A = ปริมาตรของ KOH 0.1 N ที่ใช้ในการไทเทรทกับตัวอย่าง (mL)

B = ปริมาตรของ KOH 0.1 N ที่ใช้ในการไทเทรทกับสารละลาย Blank (mL)

N = ความเข้มข้นของ KOH (Normality)

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (g) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

56.1 = มวลโมเลกุลของ KOH

3.3.1.4. ปริมาณแอลฟาโทโคฟีรอล (ดัดแปลงจาก Prieto *et al.*, 1999)

ไปเปตตัวอย่างน้ำมันมะพร้าว 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง บ่มสารละลายในเครื่อง Shaker ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ไปเปตสารสกัดที่ได้ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียวที่มี Reagent (0.4 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มสารละลายในเครื่อง Shaker ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 nm ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เทียบกับสารละลาย Blank ซึ่งใช้ Isopropyl alcohol แทนตัวอย่าง

Prince of Songkla University Pattani Campus

การคำนวณ

$$\text{Alfa-Tocopherol content (mg/100 g oil)} = [(A-A_o) \times V \times 1000] / (v \times m)$$

โดย

A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

A_o = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Blank

V = ปริมาตรของ Isopropyl alcohol (mL)

v = ปริมาตรของสารสกัด (μL)

m = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (g) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.3.1.5. ปริมาณสารประกอบฟีนอล

ชั่งน้ำมันมะพร้าว 10 กรัม ผสมกับสารละลายเฮกเซนปริมาตร 50 มิลลิลิตร สกัดด้วย 60% เอทานอล นำส่วนใสที่ได้มาระเหยด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้มาละลายในเอทานอลที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ครั้งต่อไป (ดัดแปลงจาก Nevin and Rajamohan, 2004)

สารสกัดที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เทียบกับสารละลาย Blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด หาปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัด โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำมัน 100 กรัม (mg GAE/ 100 g oil) (ดัดแปลงจาก Marina *et al*., 2009)

3.3.1.6. การต้านการเกิดออกซิเดชัน (Antioxidant activity)

สารสกัดที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจากข้อ 3.3.1.5 มาเจือจางด้วยเอทานอล ให้ได้สารละลาย 5 ระดับ คือ 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 0.2 mM DPPH ในเอทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เทียบกับชุดควบคุมซึ่งใส่เอทานอลแทนสารสกัด นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล DPPH (% Inhibition) (ดัดแปลงจาก Marina *et al*., 2008)

การคำนวณ

$$\% \text{ Inhibition} = (Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control} \times 100$$

โดย

$Abs_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Blank

Abs_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

Prince of Songkla University Pattani Campus

จากนั้น คำนวณหาค่า EC_{50} จากกราฟระหว่าง % Inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัด โดยค่า EC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50%

3.3.2 การเตรียมโมโนลอริน

นำน้ำมันมะพร้าวจากข้อ 3.3.1 ที่มีปริมาณกรดลอริกมากที่สุดมาไฮโดรไลซ์ (Hydrolyze) และนำไปผลิตเป็นโมโนลอรินต่อไป

3.3.2.1. การไฮโดรไลซ์น้ำมันมะพร้าว (Salimon *et al.*, 2011)

ชั่งน้ำมันมะพร้าว 40 กรัม ใส่ในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร เติม 2 โมลาร์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอล ปริมาตร 240 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดและบ่มสารละลายในเครื่อง Shaker ที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนสารละลายด้วยเครื่องกวนสารละลายอย่างต่อเนื่อง ค่อยๆ เติม 2 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริกลงไปในสารละลาย ปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายเท่ากับ 2 จากนั้น เติมเฮกเซน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และถ่ายสารละลายลงในกรวยแยก เติมน้ำกลั่นลงไปในสารละลายจนกระทั่งค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 สารละลายจะแยกเป็น 2 ส่วน ถ่ายสารละลายส่วนล่างทิ้ง สารละลายส่วนบนซึ่งเป็นส่วนของเฮกเซนถ่ายลงในบีกเกอร์ กรดไขมันที่สกัดได้จะละลายอยู่ในเฮกเซน กำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต จากนั้นนำไประเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไปเปตกรดไขมันที่สกัดได้ใส่ขวดสีชาเพื่อใช้ในเตรียมโมโนลอรินต่อไป

3.3.2.2. การเตรียมโมโนลอริน

เปรียบเทียบเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโมโนลอริน 3 ชนิด คือ เอนไซม์ไลเปสจี (Lipase G) จากเชื้อ *Penicillium camembertii* เอนไซม์ไลโปไซม์ (Lypozyme®) จากเชื้อ *Rhizomucor miehei* และเอนไซม์ไลเปสอาร์ (Lipase R) จากเชื้อ *Rhizopus arrhizus*

3.3.2.2.1. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนลอรินด้วยเอนไซม์ไลเปสจี (Lipase G)

น้ำมันมะพร้าวจากข้อ 3.3.2.1 มาผลิตโมโนลอริน ผสมน้ำมันมะพร้าว กลีเซอรอล และเอนไซม์ Lipase G แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ (รายละเอียดวิธีการเตรียมโมโนลอรินอยู่ในภาคผนวก ข) วางแผนการทดลองแบบ CCD (Central Composite Design) อัตราส่วนระหว่างกลีเซอรอลกับกรดลอริก ความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตโมโนลอริน แสดงรายละเอียดในตารางที่ 10-11 (ดัดแปลงจาก Fureby *et al.*, 1997 และ Freitas *et al.*, 2010)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 10 รหัสและสัดส่วนของค่าจริงของปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมโมโนลอรินด้วยเอนไซม์ Lipase G

Design factor	-1.682	-1	0	1	1.682
X1: Molar ratio*	1.0	1.5	3.0	4.5	6.0
X2: Enzyme (%w/w)**	0.1	0.8	1.6	2.3	3.0
X3: Time (h)	8.0	11.2	16	21.2	24.0

*= อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลกับกรดลอริก

**= ความเข้มข้นของเอนไซม์โดยน้ำหนักต่อกรดลอริก

ตารางที่ 11 รายละเอียดชุดการทดลองที่ใช้ในการเตรียมโมโนลอรินด้วยเอนไซม์ Lipase G

Design point	X1: Molar ratio*	X2: Enzyme (%w/w)**	X3: Time (h)
1	4.5	2.3	21.2
2	4.5	2.3	11.2
3	4.5	0.8	21.2
4	4.5	0.8	11.2
5	1.5	2.3	21.2
6	1.5	2.3	11.2
7	1.5	0.8	21.2
8	1.5	0.8	11.2
9	6.0	1.6	16.0
10	1.0	1.6	16.0
11	3.0	3.0	16.0
12	3.0	0.1	16.0
13	3.0	1.6	24.0
14	3.0	1.6	8.0
15	3.0	1.6	16.0
16	3.0	1.6	16.0

*= อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลกับกรดลอริก

**= ความเข้มข้นของเอนไซม์โดยน้ำหนักต่อกรดลอริก

Prince of Songkla University Pattani Campus

ผลึกโมโนลอรินที่เตรียมได้มาละลายในเฮกเซนที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ครั้งต่อไป โมโนลอรินที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เติมสารละลายผสมของ Hexane: athyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที ไปเปตสารละลายใส่ใน Vial และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของโมโนลอรินด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (สภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ แสดงในตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 สภาวะในการวิเคราะห์ปริมาณของโมโนลอรินโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

Item	**Value**
Flow rate of carrier gas (Helium)	2 ml/min
Injector temperature	320 ^{0}C
Injection volume	1 µl
Column	Capillary column, DB-1, 25 m x 32 mm I.D. x 12 µm film thickness
Temperature Program	90 ^{0}C (held for 0.3 min), then increased to 320 ^{0}C at a rate of 30^{0}C/ min and held at 320 ^{0}C for 2 min
Detector	Flame Ionization Detector (FID), 320 ^{0}C

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.2.2.2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนลอรินด้วยเอนไซม์ Lypozyme®

น้ำมันมะพร้าวจากข้อ 3.3.2.1 มาผลิตโมโนลอริน ผสมน้ำมันมะพร้าว กลีเซอรอล และเอนไซม์ Lypozyme® แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ (รายละเอียดวิธีการเตรียมโมโนลอรินอยู่ในภาคผนวก ข) วางแผนการทดลองแบบ CCD (Central Composite Design) อัตราส่วนระหว่างกลีเซอรอลกับกรดลอริก ความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตโมโนลอริน แสดงรายละเอียดในตารางที่ 13-14 (ดัดแปลงจาก Fureby *et al.*, 1997 และ Pereira *et al.*, 2004)

ตารางที่ 13 รหัสและสัดส่วนของค่าจริงของปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมโมโนลอรินด้วยเอนไซม์ Lypozyme®

Design factor	-1.682	-1	0	1	1.682
X1: Molar ratio*	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
X 2: Enzyme(%w/w)**	0.1	0.8	1.6	2.3	3.0
X 3: Time (h)	8.0	11.2	16	21.2	24.0

*= อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลกับกรดลอริก

**= ความเข้มข้นของเอนไซม์โดยน้ำหนักต่อกรดลอริก

ตารางที่ 14 รายละเอียดชุดการทดลองที่ใช้ในการเตรียมโมโนลอรินด้วยเอนไซม์ Lypozyme®

Design point	X1: Molar ratio*	X2: Enzyme (%w/w)**	X3: Time (h)
1	2.5	2.3	21.2
2	2.5	2.3	11.2
3	2.5	0.8	21.2
4	2.5	0.8	11.2
5	1.5	2.3	21.2
6	1.5	2.3	11.2
7	1.5	0.8	21.2
8	1.5	0.8	11.2
9	3.0	1.6	16.0
10	1.0	1.6	16.0
11	2.0	3.0	16.0
12	2.0	0.1	16.0
13	2.0	1.6	24.0
14	2.0	1.6	8.0
15	2.0	1.6	16.0
16	2.0	1.6	16.0

*= อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลกับกรดลอริก

**= ความเข้มข้นของเอนไซม์โดยน้ำหนักต่อกรดลอริก

Prince of Songkla University Pattani Campus

ผลึกโมโนลอรินที่เตรียมได้มาละลายในเฮกเซนที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ครั้งต่อไป โมโนลอรินที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เติมสารละลายผสมของ Hexane: athyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที ไปเปตสารละลายใส่ใน Vial และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของโมโนลอรินด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (สภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ แสดงในตารางที่ 12)

3.3.2.2.3. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนลอรินด้วยเอนไซม์ Lipase R

นำน้ำมันมะพร้าวจากข้อ 3.3.2.1 มาผลิตโมโนลอริน ผสมน้ำมันมะพร้าว กลีเซอรอล และเอนไซม์ Lipase R แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ (รายละเอียดวิธีการเตรียมโมโนลอรินอยู่ในภาคผนวก ข) วางแผนการทดลองแบบ CCD (Central Composite Design) อัตราส่วนระหว่างกลีเซอรอลกับกรดลอริก ความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตโมโนลอริน แสดงรายละเอียดในตารางที่ 15-16 (ดัดแปลงจาก Fureby *et al.*, 1997 และ Gancet, 1990)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 15 รหัสและสัดส่วนของค่าจริงของปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมโมโนลอรินด้วยเอนไซม์ Lipase R

Design factor	-1.682	-1	0	1	1.682
X1: Molar ratio*	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
X 2: Enzyme (%w/w)**	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
X 3: Time (h)	8.0	11.2	16	21.2	24.0

*= อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลกับกรดลอริก

**= ความเข้มข้นของเอนไซม์โดยน้ำหนักต่อกรดลอริก

ตารางที่ 16 รายละเอียดชุดการทดลองใช้ในการเตรียมโมโนลอรินด้วยเอนไซม์ Lipase R

Design point	X1: Molar ratio*	X2: Enzyme (%w/w)**	X3: Time (h)
1	2.5	4.0	21.2
2	2.5	4.0	11.2
3	2.5	2.0	21.2
4	2.5	2.0	11.2
5	1.5	4.0	21.2
6	1.5	4.0	11.2
7	1.5	2.0	21.2
8	1.5	2.0	11.2
9	3.0	3.0	16.0
10	1.0	3.0	16.0
11	2.0	5.0	16.0
12	2.0	1.0	16.0
13	2.0	3.0	24.0
14	2.0	3.0	8.0
15	2.0	3.0	16.0
16	2.0	3.0	16.0

*= อัตราส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลกับกรดลอริก

**= ความเข้มข้นของเอนไซม์โดยน้ำหนักต่อกรดลอริก

ผลึกโมโนลอรินที่เตรียมได้มาละลายในเฮกเซนที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ครั้งต่อไป โมโนลอรินที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เติมสารละลายผสมของ Hexane: athyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที ไปเปตสารละลายใส่ใน Vial และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของโมโนลอรินด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (สภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ แสดงในตารางที่ 12)

Prince of Songkla University Pattani Campus