บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. น้ำมันปาล์มดิบ จากกระบวนการสกัดน้ำมันที่แตกต่างกัน 2 กระบวนการ

- น้ำมันปาล์มดิบที่สกัดโดยวิธีบีบอัด (dry method) จากบริษัทรุ่งเรืองกิจน้ำมันพืช จำกัด อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

- น้ำมันปาล์มดิบที่สกัดโดยวิธีใช้ไอน้ำ (wet method) จากบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

2. น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ ซื้อจากร้านค้าทั่วไป
3. เคมีภัณฑ์สำหรับการแยกแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบ
4. เคมีภัณฑ์สำหรับการศึกษาความคงตัวและการเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชัน
5. เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์แคโรทีน
6. สารมาตรฐานเบตาแคโรทีน ยี่ห้อ Sigma (type I, dark red to dark red brown powder)

อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ ยี่ห้อ Eyela รุ่น N-N
2. เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ Juki รุ่น JP7100F
3. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1201
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350
5. อุปกรณ์สำหรับรีฟลักซ์ (reflux) และวิเคราะห์ทางเคมี
6. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ความคงตัวต่อแสง
7. อุปกรณ์สำหรับ TLC
8. เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu
9. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นทางเคมีของน้ำมันปาล์มดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของน้ำมันปาล์มดิบทั้ง 2 ชนิด โดยทำการวิเคราะห์ค่าไอโอดีน (iodine value, Wijs) ค่าสปอนนิฟิเคชัน (saponification value) ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value) และค่ากรด (acid value) ตามวิธีใน IUPAC (1966)

ตอนที่ 2 การแยกแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบด้วยกระบวนการสปอนนิฟิเคชัน

(ตามวิธีในรูปที่ 8)

2.1 ความเข้มข้นและปริมาณของ Et.KOH (ethanolic potassium hydroxide) รวมทั้งระยะเวลาที่เหมาะสมในการสปอนนิไฟด์น้ำมันปาล์มดิบ

นำน้ำมันปาล์มดิบที่ได้จากวิธีการสกัด 2 กระบวนการ มาแยกแคโรทีนอยด์ด้วยกระบวนการสปอนนิฟิเคชัน โดยใช้ Et.KOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10 15 20 และ 25% และอัตราส่วนน้ำมันปาล์มดิบต่อ Et.KOH ที่ระดับต่างๆ คือ 1:1 1:2 และ 1:3 ใช้เวลาในการรีฟลักซ์ 1 2 และ 3 ชั่วโมง แล้วนำสารผสมภายหลังการสปอนนิไฟด์ไปวัดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ด้วยเทคนิค TLC-FID แล้วเลือกชุดการทดลองที่สปอนนิไฟด์ได้สมบูรณ์มาวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

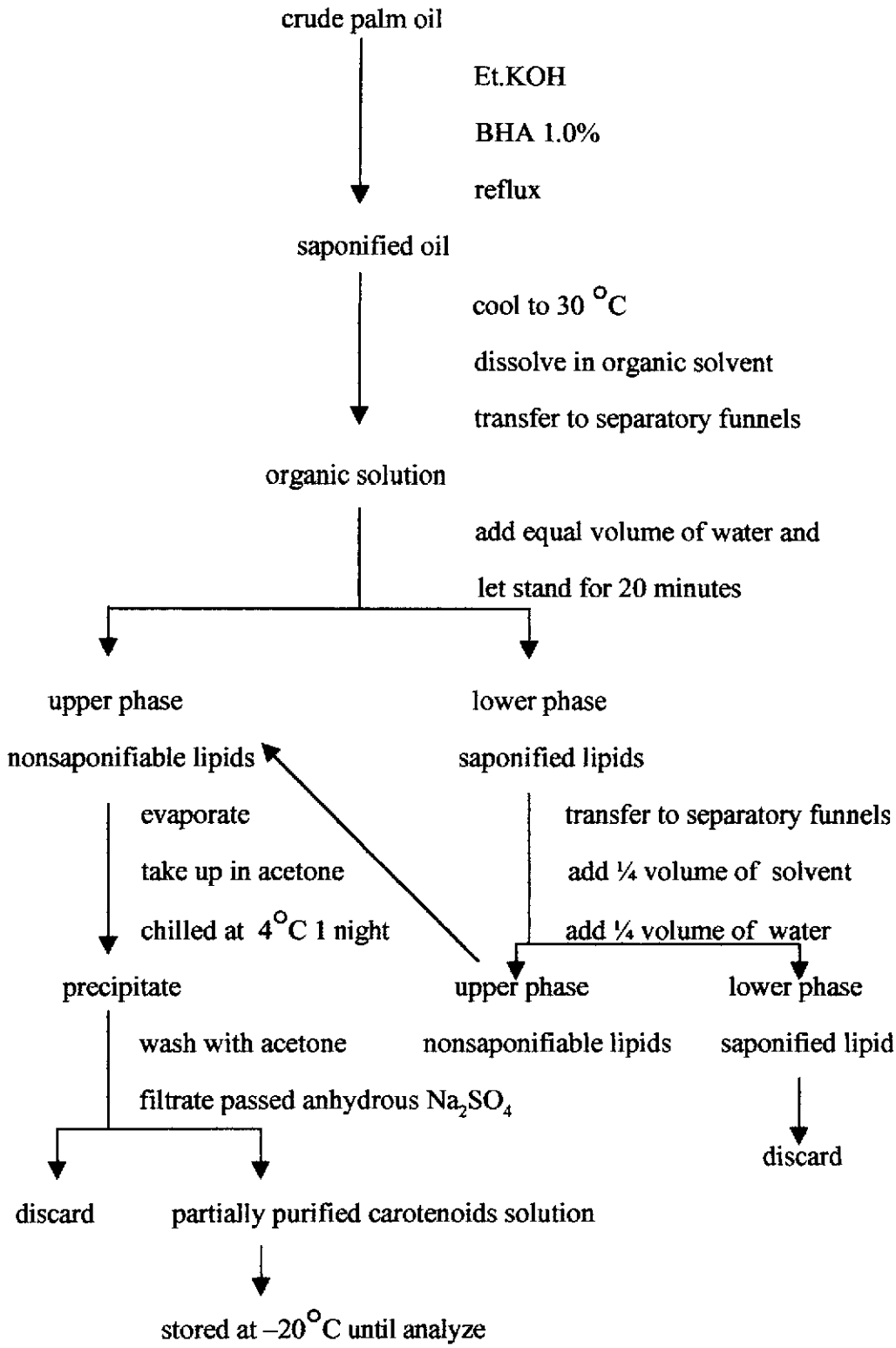
2.2 ชนิดและอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมในขั้นตอนการแยกแคโรทีนอยด์

นำน้ำมันปาล์มดิบที่ได้จากวิธีการสกัด 2 แบบ ผ่านกระบวนการสปอนนิฟิเคชันด้วยสภาวะที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 แล้วแยกแคโรทีนอยด์โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ ไดเอทิลอีเทอร์ เฮกเซน และปิโตรเลียมอีเทอร์ ด้วยอัตราส่วนน้ำมันปาล์มดิบต่อตัวทำละลาย 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 จากนั้นระเหยตัวทำละลาย

ออก แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรในปิโตรเลียมอีเทอร์ (Ritter and Purcell, 1981) และวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่ได้ ดังนี้

$$\text{วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่ได้ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักแคโรทีนอยด์}}{\text{น้ำหนักน้ำมันปาล์มดิบ}} \times 100$$

จัดชุดการทดลองแบบแฟกทอเรียล (3x5) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน และความแตกต่างของชุดการทดลองด้วย Duncan multiple range test แล้วคัดเลือกชุดการทดลองที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณผลผลิตที่ได้สูงสุด



รูปที่ 8 แผนผังการแยกแคโรทีนอยด์จากน้ำมันปาล์มดิบด้วยกระบวนการสปอนนิฟิเคชัน

Scheme for extracting carotenoids from crude palm oil by saponification process.

Source : Adapt from Ritter and Purcell (1981)

ตอนที่ 3 ศึกษาสมบัติบางประการ และความคงตัวของแคโรทีนอยด์

3.1 สมบัติบางประการ

3.1.1 การดูดกลืนแสงของแคโรทีนอยด์

นำแคโรทีนอยด์ที่แยกได้ (จากตอนที่ 2) 0.1 กรัม ละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เฮกเซน อะซิโตน ไดเอทิลอีเทอร์ และเอทานอล 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Visible Spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร (Ritter and Purcell, 1981) เพื่อทราบความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

3.1.2 ค่าสี

วัดค่าสีของแคโรทีนอยด์ที่แยกได้ด้วยเครื่องวัดค่าสีระบบ Hunter (L : ความสว่าง (100) / ความทึบ (0), a : สีแดง (+) / สีเขียว (-), b : สีเหลือง (+) / สีน้ำเงิน (-))

3.2 ความคงตัวของแคโรทีนอยด์

นำแคโรทีนอยด์ที่แยกได้ (จากตอนที่ 2) มาศึกษาความคงตัวดังนี้

3.2.1 ความคงตัวต่อแสง

บรรจุแคโรทีนอยด์ 10 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วขนาดเล็กใส (glass vial) ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน ศึกษาความคงตัวต่อแสงภายใต้ความเข้มแสง 3 ระดับ คือ 3,000 5,000 และ 8,000 ลักซ์ และแคโรทีนอยด์อีกส่วนเก็บในที่มืด ที่เวลาต่างๆกัน คือ 0 3 6 9 12 24 36 48 และ 72 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จากข้อ 3.1.1 และการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยเครื่องวัดค่าสีระบบ Hunter (Chen and Tang, 1998 ; Bradley, 1980 อ้างโดย Goulson and Warthesen, 1999) และรายงานค่าการเปลี่ยนแปลงของสีโดยรวมด้วยค่า ΔE ซึ่งคำนวณจากสูตร

$$\Delta E = \sqrt{(L_1-L_0)^2 + (a_1-a_0)^2 + (b_1-b_0)^2}$$

เมื่อ $L_0 a_0 b_0$ คือ ค่า L, a และ b ก่อนการเก็บรักษา และ $L_1 a_1 b_1 b_0$ คือ ค่า L, a และ b ภายหลังการเก็บรักษาที่เวลาใดๆ

3.2.2 ความคงตัวต่อความร้อน

บรรจุแคโรทีนอยด์ 10 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วขนาดเล็กสีชาภายใต้ก๊าซไนโตรเจนศึกษาความคงตัวต่อความร้อนโดยแช่หลอดแก้วในน้ำที่มีอุณหภูมิต่างๆกันคือ 30 40 50 60 70 80 90 และ 100°C ที่เวลา 0 0.5 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง และการเปลี่ยนแปลงของสี เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

ตอนที่ 4 ความสามารถของแคโรทีนอยด์ที่แยกได้ในการต้านการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์

เติมแคโรทีนอยด์ที่แยกได้ในน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ได้แก่ 0 15 30 60 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร (Goulson and Warthesen, 1999) แล้วศึกษาภายใต้ปัจจัย ดังนี้

- เก็บภายใต้แสงที่มีความเข้มแสง 3,000 5,000 และ 8,000 ลักซ์ เป็นเวลา 0 7 14 และ 21 วัน
- ให้ความร้อนที่อุณหภูมิระดับต่างๆ คือ 30 40 50 60 70 80 90 และ 100°C เป็นเวลา 0 0.5 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง

วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในน้ำมันด้วยการวัดค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำมัน (Goulson and Warthesen, 1999)

ตอนที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของแคโรทีนอยด์ในระหว่างการเก็บรักษา

นำแคโรทีนอยด์ที่แยกได้ (จากตอนที่ 2) 10 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชาในสภาวะการเก็บรักษาที่มีปัจจัยต่างๆ ดังนี้

- อุณหภูมิการเก็บรักษา : อุณหภูมิต่ำ (4 $^{\circ}$C) อุณหภูมิตู้เย็น (10 $^{\circ}$C) และอุณหภูมิห้อง (25-28 $^{\circ}$C)

- บรรยากาศ : บรรยากาศปกติ สุญญากาศ และ ก๊าซไนโตรเจน

เก็บรักษาเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 2 สัปดาห์ ในด้านการเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของแคโรทีนอยด์และการเปลี่ยนแปลงค่าสีของแคโรทีนอยด์ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

จัดชุดการทดลองแบบแฟกทอเรียล (3x3) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน และความแตกต่างของชุดการทดลองด้วย Duncan multiple range test

ตอนที่ 6 วิเคราะห์แคโรทีนในแคโรทีนอยด์ที่แยกได้

6.1 ใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีแบบชินเลเยอร์โครมาโตกราฟี วิเคราะห์แคโรทีนในสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่แยกได้จากน้ำมันปาล์มดิบทั้ง 2 ชนิด เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเบตาแคโรทีน (จากตอนที่ 2) โดยใช้ ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ใช้หลอด capillary จุ่มในสารละลายแคโรทีนอยด์ แล้วจุดลงเหนือปลายด้านล่างของแผ่นชินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ประมาณ 1 เซนติเมตร รอให้จุดสารแห้ง จึงวางแผ่นชินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ในแนวตั้งลงในภาชนะปิดที่บุผนังด้วยกระดาษกรอง ภายในบรรจุตัวทำละลาย สูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร รอจนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระดับที่ห่างจากปลายด้านบนของแผ่นชินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ประมาณ 1 เซนติเมตร จึงยกแผ่นชินเลเยอร์โครมาโตกราฟีออกจากภาชนะ ส่องดูโครมาโตแกรมภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้ตัวทำละลายในการแยกองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ คือ เบนซีน10%ในปิโตรเลียมอีเทอร์, ปิโตรเลียมอีเทอร์ และ อะซิโตน 2% ในปิโตรเลียมอีเทอร์

6.2 ใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์แคโรทีนในแคโรทีนอยด์ที่แยกได้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเบตาแคโรทีนโดยใช้คอลัมน์ชนิด ODS-2 column (5 μm particle size, 4.6 x 150 mm i.d. ; Xterra™ Waters, USA) ตรวจวัดผลการทดลองด้วย UV detector ที่ 450 นาโนเมตร ใช้ระบบในการวิเคราะห์แคโรทีนในแคโรทีนอยด์ ประกอบด้วย อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) 80% และเมทานอล 20% (Baharin et al., 1998) ในอัตราเร็ว (flow rate) 2 มิลลิลิตรต่อนาที

6.3 ใช้เทคนิค NMR ในการวิเคราะห์แคโรทีนในแคโรทีนอยด์ที่แยกได้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเบตาแคโรทีน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วย DMRT (Duncan's multiple range test) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window version 10.0