บทที่ 1

บทนำ

1.1 น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด (mustard seed oil)

น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเป็นน้ำมันที่ได้จากเมล็ดมัสตาร์ด โดยที่มัสตาร์ดเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ทั้งในเขตหนาวและเขตร้อน โดยพบปริมาณน้ำมันในเมล็ดมัสตาร์ดมีค่าอยู่ในช่วง 30-60% ในการสกัดน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด พบว่า จะได้ปริมาณของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดซึ่งเป็นน้ำมันที่ระเหยยากประมาณ 1000 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ของเมล็ดมัสตาร์ดที่ปลูก บทบาทที่สำคัญของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดคือเป็นแหล่งของกรดไขมันชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า กรดอีรูซิค (erucic aicd) ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมีความยาวของสายคาร์บอนเท่ากับ 22 อะตอม สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมาย (Leonard, 1993) ประเทศที่สามารถทำการผลิตน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่สำคัญ ได้แก่ ประเทศจีน แคนาดา ญี่ปุ่น เยอรมันตะวันออกและตะวันตก อังกฤษ อินเดียและฝรั่งเศส ประเทศในแถบเอเชีย เช่น อินเดีย ปากีสถานและบังคลาเทศ ผลิตน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเพื่อใช้ในการบริโภค โดยน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่ผลิตได้จะมีปริมาณ 33-35% โดยน้ำหนัก และพบว่าจะมีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงถึง 42% ส่วนประเทศแคนาดาและยุโรปทำการผลิตน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่มีกรดอีรูซิคในปริมาณที่ต่ำ โดยพบเพียงแค่ 1.3% เท่านั้น และสามารถผลิตน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดได้ประมาณ 41-42% โดยน้ำหนัก ความสามารถในการผลิตน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดของแต่ละประเทศ แสดงไว้ในตารางที่ 1.1 (John et al. , 1983) ซึ่งเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดของแต่ละประเทศและปริมาณที่ผลิตได้ในแต่ละปีโดยสกัดจากเมล็ดมัสตาร์ด 1000 ตัน ความแตกต่างของปริมาณของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับ แหล่งที่ใช้ในการเพาะปลูก ภูมิอากาศและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ รวมทั้งสายพันธุ์ของมัสตาร์ดด้วย

ลักษณะของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่ผลิตได้ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์มีลักษณะ เป็นสีดำอำพัน เนื่องจากประกอบด้วยสารพวก phosphatide ในปริมาณที่สูง และมีรงควัตถุปนมาด้วยก็คือ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ที่มาจากเมล็ดที่ไม่สุกเต็มที่ และสารพวก sulfur ด้วย (Flank et al. , 1986) แต่เมื่อทำให้บริสุทธิ์พบว่าลักษณะของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดจะมีสีเหลืองใส และไม่พบสารพวก sulfur และ phosphatide และคุณสมบัติของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่วิเคราะห์แสดงในตารางที่ 1.2 (Frank et al. ,1986)

ตารางที่ 1.1 production of rapeseed and mustard seed oil by country (in 1000 tonnes) (John et al., 1983)

Country	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981
Bangladesh	70	47	51	37	50	44	40	44	48	46	53
Canada	77	106	134	126	108	141	226	259	296	365	418
China	347	419	504	485	441	520	425	370	588	757	751
France	184	261	223	217	190	167	184	182	229	218	260
Geramany,East	64	68	84	85	102	125	102	113	112	82	121
Geramany,West	104	102	97	166	149	121	181	151	214	303	368
India	525	523	561	522	599	598	564	578	558	430	645
Japan	172	233	288	275	304	304	324	352	434	406	480
Netherlands	23	18	31	26	55	34	34	27	30	35	63
Pakistan	84	70	75	77	65	70	78	63	64	78	78
Poland	175	181	145	159	183	219	270	236	259	87	208
Sweden	45	55	61	62	62	77	73	69	82	71	65
United Kingdom	28	42	43	10	38	66	110	130	131	127	165

ตารางที่ 1.2 คุณสมบัติของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด (Characteristics of mustard seed oil) (Frank et al. ,1986)

	Draft Codex (Codex. 1970)
Relative density (20 °C/water at 20 °C)	0.910–0.921
Refractive index (n_D^{40})	1.461–1.469
Saponification value	170–184
Iodine value	92–125
Unsaponifiable matter (g/kg)	15
Allyl isothiocyanate (g/kg) (method specified)	Not more than 4

เมื่อ 70 ปีที่ผ่านมาพบว่าน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดสามารถนำมาใช้ในการบริโภคได้ และต่อมาได้มีการศึกษาวิจัยพบว่าน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดมีผลอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ที่บริโภคน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเข้าไป โดยพบว่ากรดอีรูซิคที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด ไปพอกตามอวัยวะภายในต่างๆ (Maheshwari et al., 1985) เช่น กล้ามเนื้อหัวใจ ตับ สมอง ม้าม ทำให้อวัยวะเหล่านี้ทำงานผิดปกติ ดังนั้น FAO/WHO จึงกำหนดให้ใช้น้ำมันที่มีกรดอีรูซิคในปริมาณ < 5 % เท่านั้นในการบริโภค ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของมัสตาร์ด เพื่อสามารถทำการผลิตน้ำมันที่มีกรดอีรูซิคในปริมาณที่ต่ำ เพื่อนำมาใช้ในการบริโภค โดยประเทศแคนาดาพบว่าได้มีการผลิตน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่มีกรดอีรูซิคในปริมาณที่ต่ำ เพียง < 5.5 % เท่านั้น และมีชื่อเรียกใหม่ว่า canola oil (Flank et al. ,1986) และในประเทศเยอรมัน สามารถผลิตน้ำมันที่มีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบเพียง < 2 % เท่านั้น และจะเรียกว่า sinola oil และจากการปรับปรุงสายพันธุ์ของมัสตาร์ด ยังพบว่ามีปริมาณของกรดโอเลอิค (oleic acid) เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิมด้วย ดังแสดงในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 Fatty acids in old and new varieties of mustard (wt %) (Frank et al. , 1986)

	Brassica napus				*Brassica campestris*	
	Winter (French)		Summer (Canada)		Summer (Canada)	
	Old major	New major	Old target	New tower	Old span	New candle
16 : 0	3.5	4.5	3.0	3.9	4.0	3.8
18 : 0	1.2	1.5	0.1	0.3	0.1	0.2
18 : 1	14.2	60.5	19.5	65.0	58.0	53.5
20 : 1	10.9	0.9	10.0	1.2	3.8	1.4
22 : 1	46.9	0.2	39.5	1.0	3.7	1.0
18 : 2	13.8	21.6	16.0	19.0	20.0	23.5
18 : 3	9.1	10.3	11.0	8.6	14.0	14.0
Others	0.4	0.5	0.9	1.0	0.4	0.6

1.1.1 แหล่งที่พบน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด

แหล่งที่พบน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดส่วนใหญ่พบในพืชตระกูลบราสิกา (*Brassica*) โดยเฉพาะในวงศ์ครูซิเฟอรี่ (*Cruciferae*) โดยในแต่ละสายพันธุ์พบปริมาณของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดในปริมาณที่แตกต่างกันและแตกต่างกันในปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบด้วย โดยสายพันธุ์ที่พบว่ามีน้ำมันเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง ได้แก่ *Brassica napus* , *Brassica campestris*, *Brassica alba* (white mustard) , *Brassica hirta* (yellow mustard) , *Brassica nigra* (black mustard) , *Brassica juncea* (brown mustard) และ *Brassica carinata Braun* (ethiopian mustard) เป็นต้น โดยพบว่า *Brassica juncea* จะปลูกมากในประเทศอินเดีย ปากีสถาน และบังคลาเทศ เป็นต้น น้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดแต่ละสายพันธุ์พบว่ามีความแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1.4 (John et al.,1983) โดยแสดงปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดในสายพันธุ์ต่างๆ และเทียบกับน้ำมันที่ได้จากพืชเมล็ดน้ำมันชนิดอื่นด้วย

ตารางที่ 1.4 Fatty acid composition of oilseed *Brassica* crops and common vegetable oils (John et al. ,1983)

Species, crop or variety	Ref.[a]	Fatty acid composition in percent[b]												
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1
B. napus rape														
Victor winter	1	0.0	3.0	0.3	0.8	9.9	13.5	9.8	0.6	6.8	0.7	53.6	0.0	1.0
Jet Neuf winter	2	0.0	4.9	0.4	1.4	56.4	24.2	10.5	0.7	1.2	0.3	0.0	0.0	0.0
Target summer	2	0.0	3.0	0.3	1.5	20.9	13.9	9.1	0.5	12.2	0.3	38.3	0.0	0.0
Tower summer	2	0.0	3.9	0.3	1.1	59.7	23.3	8.6	0.8	1.8	0.2	0.3	0.0	0.0
B. campestris turnip rape														
Duro winter	1	0.0	2.0	0.2	1.0	12.9	13.4	9.1	0.7	9.6	0.2	49.8	0.0	1.1
Yellow sarson	2	0.0	1.8	0.2	0.9	13.1	12.0	8.2	0.9	6.2	0.0	55.5	0.0	1.2
Echo summer	2	0.0	2.5	0.2	1.0	32.5	18.8	8.9	0.6	12.0	0.0	23.5	0.0	0.0
Tobin summer	2	0.0	3.8	0.1	1.2	58.6	24.0	10.3	0.6	1.0	0.1	0.3	0.0	0.0
B. juncea mustard														
Indian origin	3	0.0	2.5	0.3	1.2	8.0	16.4	11.4	1.2	6.4	1.2	46.2	0.7	1.9
Leth 22A	2	0.0	2.8	0.3	1.0	20.9	22.4	15.6	0.8	13.4	0.0	22.8	0.0	0.0
Zem. 1	2	tr[c]	3.6	0.4	2.0	45.0	33.9	11.8	0.7	1.5	0.3	0.1	0.2	0.5
Glycine max soybean														
Group I var.	4	0.0	15.3	0.0	4.2	23.6	48.2	8.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Helianthus annuus sunflower														
Peredovik	5	0.1	5.8	0.1	5.2	16.0	71.5	0.2	0.2	0.1	0.7	0.0	0.1	0.0
Carthamus tinctorius safflower														
US-10	6	0.0	7.6	0.0	2.0	10.8	79.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Zea maus corn														
U.S. sources	7	tr	11.5	0.0	2.2	26.6	58.7	0.8	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Gossupium hirsutum cotton	8	1.0	23.4	0.8	2.5	17.9	54.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Arachis hyogaea peanut														
Virginia Bunch	9	9.2	0.0	0.0	3.1	57.2	23.4	0.0	1.4	1.4	2.6	0.0	1.8	0.0
Cook Jumbo	9	6.7	0.0	0.0	4.3	71.4	11.1	0.0	1.6	1.0	2.7	0.0	1.3	0.0

[a] References: 1, Appelqvist (1969); 2, Downey (unpublished data); 3, Appelqvist (1970); 4, Hymowitz *et al.* (1972); Collins and Sedgwick (1959); 5, arle *et al.* (1968); 6, Knowles (1968); 7, Beadle *et al.* (1965); 8, Anderson and Worthington (1971); 9, Worthington and Hammons (1971).

[b] Fatty acids represented by the number of carbon atoms and double bonds.

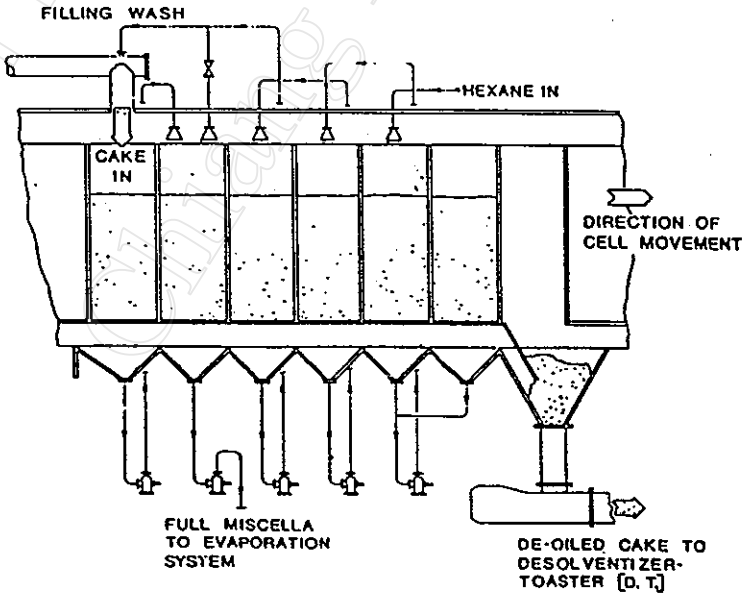
[c] tr = Trace amounts.

1.1.2 **การแยกน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดออกจากเมล็ดมัสตาร์ด**

การแยกน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดออกจากเมล็ดมัสตาร์ดโดยทั่วไปแล้วทำได้ 2 วิธี โดยอาจทำเพียงวิธีเดียวหรือทั้งสองวิธีร่วมกันก็ได้ (John et al.,1983)

วิธีแรกเป็นวิธีที่ใช้พลังงานกลในการแยกเอาน้ำมันออกมาจากเมล็ด โดยการใช้แรงบีบอัดและใช้ระบบ continuous screw press เพื่อบีบเอาน้ำมันออกจากเมล็ด นอกจากนี้ยังใช้เครื่องสกัดน้ำมันที่ใช้แรงบีบ (crushes) แรงตัด (shears) และแรงอัด(compresses) เข้ามาใช้ในการสกัดน้ำมันด้วย พบว่าสามารถทำการสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดได้ 75 % แต่การสกัดน้ำมันโดยวิธีใช้แรงบีบอัดนี้ พบว่ามีข้อเสียคือ ทำให้เกิดความร้อน ซึ่งมีผลต่อองค์ประกอบอื่นที่อยู่ในเมล็ดมัสตาร์ดได้ในกรณีที่จะนำกากมัสตาร์ดไปใช้ประโยชน์ในขั้นตอนต่อไป

วิธีที่สอง เป็นวิธีการสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ โดยส่วนใหญ่ใช้เฮกเซน การสกัดโดยวิธีนี้ถือว่าเป็นวิธีที่ค่อนข้างง่าย รวดเร็ว และสามารถทำการสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดได้มากกว่าการใช้แรงบีบอัด การสกัดด้วยตัวทำละลายนี้อาศัยหลักการคือการแพร่กระจายของตัวทำละลายเข้าไปในเมล็ดมัสตาร์ดและทำให้น้ำมันที่อยู่ภายในเมล็ดละลายออกมารวมกับตัวทำละลาย แต่การสกัดด้วยวิธีนี้มีข้อควรระวังคือ อัตราการแพร่ของตัวทำละลาย ความสามารถของน้ำมันในเมล็ดในการละลายอกมารวมกับตัวทำละลาย และอุณหภูมิของเครื่องสกัดด้วย รูปที่ 1.1 แสดงเครื่องสกัดน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดออกจากเมล็ดมัสตาร์ดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน



รูปที่ 1.1 แสดงเครื่องสกัดน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน

ในขั้นตอนการสกัดน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดออกจากเมล็ดพบว่าสามารถทำได้ทั้งสองวิธีร่วมกันโดยทำการบีบน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยแรงบีบอัดก่อน จากนั้นนำกากมัสตาร์ดที่ได้มาทำการสกัดน้ำมันด้วยตัวละลายอีกครั้งหนึ่ง การใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันทำให้ได้ปริมาณของน้ำมันออกมามากที่สุด และมากกว่าการใช้วิธีเดียวในการสกัด

1.1.3 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด (Frankb et al., 1986)

องค์ประกอบที่พบมากที่สุดในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดคือกรดไขมัน โดยเฉพาะกรดไขมันที่มีชื่อว่า กรดอีรูซิคหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า cis – 13 – docosenoic acid ถือว่าเป็นกรดไขมันที่พบมากที่สุดและเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวโดยมีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุล 1 พันธะและมีความยาวของคาร์บอนต่อกันเท่ากับ 22 อะตอม โดยพบว่ามีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดสูงถึง 42% และกรดอีรูซิคนี้มีบทบาทสำคัญมากในการนำน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดมาใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันชนิดอื่นด้วย โดยพบกรดไขมันที่เป็นชนิดอิ่มตัว ได้แก่ กรดปาล์มิติค (palmitic acid) กรดสเตียริค (stearic acid) เป็นต้น โดยพบประมาณ 5-6 % เท่านั้น และยังพบว่ามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่สำคัญและมีปริมาณมากในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วย คือ กรดโอเลอิค (oleic acid) และยังพบกรดลิโนเลอิค(linoleic acid) กรดลิโนเลนิค (linolenic acid) และกรดไอโคซิโนอิค (eicosenoic acid) โดยพบกรดไขมันเหล่านี้กระจายอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ในรูปกลีเซอร์ไรด์ในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด

น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่พบส่วนใหญ่มีโครงสร้างเป็นไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล โดยพบกรดไขมันชนิดที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในโมเลกุล และกรดไขมันแต่ละชนิดกระจายไปอยู่ที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ มีการพบกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวและเป็นกรดไขมันที่ต่อกันเป็นสายยาว (C_{20}- C_{24}) โดยพบมากตรงตำแหน่งที่ 1 และ 3 ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ โดยเฉพาะกรดอีรูซิคพบมากตรงตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด ดังแสดงในตารางที่ 1.5 และจากตารางนี้ยังพบว่ากรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ได้แก่ กรดโอเลอิค กรดลิโนเลอิค และกรดลิโนเลนิค จะพบมากในตำแหน่งที่ 2 ของโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ และจากการวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยวิธี argentation chromatography เป็นวิธีการวิเคราะห์แบบโครมาโทกราฟีผิวบางโดยมีการเติม silver nitrate ผสมเข้าไปเพื่อเพิ่มความสามารถในการแยกให้มากขึ้น พบการกระจายตัวของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ดังแสดงในตารางที่ 1.6 (John et al., 1983)

ตารางที่ 1.5 Proportion of fatty acids found in various position of rapeseed oil triglyceride and mustard seed oil triglyceride (John et al., 1983)

Oil and position	Fatty acid								
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2 *n*-6	18:3 *n*-3	20:1	22:0	22:1
HEAR (in mole %)[a,b]									
1-	4.1	0.3	2.2	23.1	11.1	6.4	16.4	1.4	34.9
2-	0.6	0.2	—	37.3	36.1	20.3	2.0	—	3.6
3-	4.3	0.3	3.0	16.6	4.0	2.6	17.3	1.2	51.0
HEAR (in mole%)									
1,3-[c]	5	—	1	10	5	5	15	—	59
2-[c]	1	—	1	32	41	22	—	—	3
2-[d]	<1	<1	—	34	42	22	1	—	1
HEAR, cv. Sinus (in weight %)[e]									
2-	0.2	0.1	0.2	44.6	37.1	17.5	0.2	—	0.1
LEAR, cv. Oro (in mole %)[f]									
1-	6.4	—	1.7	64.7	15.8	7.4	1.8	0.2	0.7
2-	0.2	—	0.1	52.7	30.6	15.7	0.3	—	0.1
3-	7.8	—	1.8	70.4	10.3	5.4	2.7	0.7	1.0
LEAR, cv. Janpol (in weight %)[e]									
2-	0.5	0.1	0.2	56.8	29.1	13.1	0.1	—	—
LEAR, Canbra (in weight %)									
2-[e]	1.2	0.5	0.5	52.4	31.8	12.3	—	—	—
2-[h]	0.6	0.3	—	56.3	30.6	12.1	—	—	—
2-[d]	0.3	0.2	—	50.0	33.5	15.9	0.1	—	—
LEAR, cv. Primor (in weight %)[g]									
2-	1.6	0.1	0.8	49.4	32.8	14.5	0.2	—	—
Mustard (in mole %)[i]									
1-	4.3	0.1	1.9	25.9	10.7	4.4	14.3	—	36.1
2-	2.0	0.3	1.3	38.4	32.3	27.7	0.2	—	0.5
3-	2.4	—	0.3	5.3	2.8	7.0	18.3	—	59.0

HEAR = High Erucic Acid Rapeseed oil , LEAR = Low Erucic Acid Rapeseed oil

16 : 0 = Palmitic acid , 16 : 1 = , 18 : 0 = Stearic acid

18 : 1 = Oleic acid , 18 : 2 n-6 = Linoleic acid , 18 : 3 n-3 = Linolenic acid

20 : 1 = Eicosenoic acid, 22 : 0 = Erucic acid , 22 : 1 =

ตารางที่ 1.6 Molecular species of triacylglycerols (in mole%) of mustard seed oil (John et al., 1983)

Molecular species[b]	Mustard seed oil		Molecular species[b]	Mustard seed oil	
	Calc.[c]	Reconst.[d]		Calc.[c]	Reconst.[d]
16:0 18:1 18:1	0.088	0.65	18:1 18:2 22:1	4.93	5.22
18:1 18:1 16:0	0.24		22:1 18:1 18:1	0.62	
			20:1 18:2 20:1	0.85	0.79
16:0 16:0 22:1	0.05	0.07	18:3 18:1 22:1	1.00	0.93
22:1 16:0 16:0	0.02		22:1 18:1 18:3	0.97	
16:0 18:1 20:1	0.30	0.73	18:2 18:2 22:1	2.03	1.36
20:1 18:1 16:0	0.13		22:1 18:2 18:2	0.32	
18:1 18:1 18:1	0.53	1.24	18:1 18:3 22:1	3.78	4.00
18:1 18:1 18:2	0.28	0.46	22:1 18:3 18:1	0.47	
18:2 18:1 18:1	0.22		20:1 18:3 20:1	0.65	0.61
18:1 18:2 18:1	0.44	1.04	18:3 18:2 22:1	0.84	0.78
18:1 18:1 18:3	0.69	0.46	22:1 18:2 18:3	0.81	
18:3 18:1 18:1	0.09		18:2 18:3 22:1	1.56	1.04
18:1 18:2 18:3	0.58	0.39	22:1 18:3 18:2	0.25	
18:3 18:2 18:1	0.08		18:3 18:3 22:1	0.65	0.60
18:1 18:3 18:3	0.45	0.30	22:1 18:3 18:3	0.62	
18:3 18:3 18:1	0.06		18:0 18:1 22:1	0.42	0.78
			22:1 18:1 18:0	0.04	
16:0 18:1 22:1	0.98	1.33	20:1 16:0 22:1	0.17	0.28
22:1 18:1 16:0	0.33		22:1 16:0 20:1	0.13	
18:1 16:0 22:1	0.30	0.32	18:1 18:1 22:1	5.87	6.22
22:1 16:0 18:1	0.40		22:1 18:1 18:1	0.74	
18:1 18:1 20:1	1.82	2.04	18:0 18:2 22:1	0.36	0.65
20:1 18:1 18:1	0.29		22:1 18:2 18:0	0.04	
16:0 18:2 22:1	0.83	1.12	20:1 18:1 20:1	1.01	0.95
22:1 18:2 16:0	0.28		18:2 18:1 22:1	2.42	1.62
18:2 18:1 20:1	0.75	0.66	22:1 18:1 18:2	0.39	
20:1 18:1 18:2	0.15				
18:1 18:2 20:1	1.53	1.71	16:0 22:1 22:1	0.01	0.02
20:1 18:2 18:1	0.25		22:1 22:1 16:0	0.04	
16:0 18:3 22:1	0.63	0.86	22:1 16:0 22:1	0.42	0.42
22:1 18:3 16:0	0.22		20:1 18:1 22:1	3.25	5.34
18:2 18:2 20:1	0.63	0.55	22:1 18:1 20:1	2.54	
20:1 18:2 18:2	0.13		18:1 20:1 22:1	0.03	0.03
18:1 18:3 20:1	1.17	1.31	22:1 20:1 18:1	0.0	
20:1 18:3 18:1	0.19		20:1 18:2 22:1	2.73	4.48
18:2 18:3 20:1	0.48	0.43	22:1 18:2 20:1	2.13	
20:1 18:3 18:2	0.10		20:1 18:3 22:1	2.09	3.44
			22:1 18:3 20:1	1.64	
22:1 18:0 22:1	0.27	0.27	20:1 22:1 22:1	0.04	0.07
22:1 18:1 16:0	8.19	8.15	22:1 22:1 20:1	0.03	
18:1 22:1 22:1	0.08	0.08	22:1 18:1 24:1	0.46	0.83
22:1 22:1 18:1	0.01		24:1 18:1 22:1	0.42	
20:1 20:1 22:1	0.02	0.03	22:1 20:1 22:1	0.04	0.04
22:1 20:1 20:1	0.01				
22:1 18:2 22:1	6.88	6.84	22:1 22:1 22:1	0.11	0.11
22:1 18:3 22:1	5.27	5.24			

นอกจากพบจากกรดไขมันในไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดแล้ว ยังพบสารจำพวก sterols , 4-methylsterols และ triterpene alcohol และยังพบสารพวก tocopherols (mg/kg) ได้แก่ α-tocopherol (18-24 mg/kg), δ -tocopherol (1.1-1.2 mg/kg) และ γ-tocopherol (38-42 mg/kg) นอกจากนี้ยังพบ selenium อยู่ในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 8.9 ng/g ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยพบควบคู่กับสารพวก sulfur และยังพบสารพวกโลหะหนักด้วย แต่พบในปริมาณที่น้อยมาก เช่น สังกะสี (zinc) พบปริมาณ 1-2 ppm ตะกั่ว (lead) ปริมาณ 0.06-0.24 ppm ทองแดง(copper) ปริมาณน้อยกว่า 0.05 ppmและแคดเมียม (cadmium) จะพบน้อยกว่า 0.0005 ppm (Flank et al., 1986)

ซึ่งสังเกตได้ว่าองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด คือกรดไขมันที่กระจายอยู่ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้นหากสามารถทำการแยกกรดไขมันเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะกรดอีรูซิคซึ่งมีบทบาทสำคัญในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดซึ่งจะกล่าวในหัวข้อ 1.2.2 ก็เป็นการเพิ่มคุณค่าของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด

1.1.4 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด

เมื่อ 70 ปีผ่านมาแล้วได้มีการนำน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดมาใช้ในการบริโภค โดยในประเทศญี่ปุ่นทำการผลิตน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเพื่อทางการค้า โดยนำมาใช้ในการปรุงอาหาร (cooking oil) และเป็น frying oil แต่เนื่องจากพบว่าในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดมีกรดอีรูซิคในปริมาณที่สูงเมื่อบริโภคเข้าไปแล้ว ทำให้เกิดอันตรายได้ ดังนั้นจึงไม่นิยมนำมาใช้ในการบริโภค แต่ใช้น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่มีกรดอีรูซิคในปริมาณที่น้อยแทนซึ่งได้จากการปรับปรุงพันธุ์ของมัสตาร์ด โดยสามารถปรับปรุงให้มีปริมาณของกรดอีรูซิคเหลือเพียง 5% เท่านั้น

ประโยชน์ทางด้านอาหารพบว่าสามารถใช้ผสมในแป้งที่นวดแล้ว (Will et al., 1976) โดยใช้เป็นตัวให้ความเหนียวแก่แป้งในขณะที่มีการอบ เพื่อป้องกันการแข็งตัวของแป้งในระหว่างการอบได้ และโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดสามารถนำไปใช้ทำเบเกอรี่ได้ โดยทำให้เกิดการยึดจับกันได้ดีใน water-in-oil emulsion ในกรณีที่มีน้ำมากๆ ได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นองค์ประกอบในสารพวก shortening margarine และ margarine oil salad และ cooking oil ได้ (John et al.,1983)

ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม พบว่าส่วนใหญ่แล้วใช้น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเป็นสารหล่อลื่น (lubricant) ในเครื่องยนต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Flank et al.,1986) โดยในประเทศแคนาดาได้มีการใช้ประโยชน์สำหรับเป็นสารหล่อลื่นเป็นส่วนใหญ่ โดยต้องทำน้ำมันเมล็ด

มัสตาร์ดให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายด่าง (alkali refined) และทำให้สีของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดจางลง จากนั้นมีการผ่านอากาศร้อนอุณหภูมิ 95-120 องศาเซลเซียส เข้าไปในน้ำมันเป็นเวลาหลายๆ ชั่วโมง ทำให้น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดมีความหนืดมากขึ้นและมีค่าความถ่วงจำเพาะสูงขึ้นด้วย และจากการมีคุณสมบัติการเหนียวยืดหยุ่นได้เมื่อผสมกับปิโตรเลียมแล้ว สามารถนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์หล่อลื่นได้ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยึดติดกับผิวของโลหะได้ดี ในกรณีที่มีการชะล้างผิวของโลหะด้วยไอน้ำหรือน้ำในปริมาณที่มากๆได้ (John et al.,1983) นอกจากนี้ยังได้มีการนำน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดมาใช้เป็นส่วนผสมในการเป็นเชื้อเพลิงของเครื่องยนต์แทรกเตอร์อีกด้วย (Strayer et al.,1983)

1.2 กรดอีรูซิค (erucic acid)

กรดอีรูซิค (erucic acid) มีชื่อทางเคมีว่า ซิส-13-โดโคซิโนอิค (cis-13-docosenoic acid) เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวประกอบด้วยคาร์บอนต่อกัน 22 อะตอมและมีพันธะคู่อยู่ 1 พันธะตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 13 มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{42}O_2$ ลักษณะและสมบัติของกรดอีรูซิคเปรียบเทียบกับกรดไขมันชนิดอื่นแสดงในตารางที่ 1.7 (Pattison, 1968)

ตารางที่ 1.7 ลักษณะและคุณสมบัติของกรดไขมันชนิดต่างๆ (Pattison, 1968)

	Systematic name	Number of C atoms	Molecular weight	Viscosity centipoises (T°C)	Melting point, °C	Index of refraction (T°C)
Saturated						
Capric	Decanoic	10	172.3	2.88 (70)	31.3	1.4130 (80)
Undecylic	Undecanoic	11	186.3	7.30 (50)	29	1.4164 (80)
Lauric	Dodecanoic	12	200.3	4.43 (70)	43.5	1.4191 (80)
Myristic	Tetradecanoic	14	228.4	5.83 (70)	54.4	1.4236 (80)
Pentadecanoic	Pentadecanoic	15	242.4		52.1	1.4254 (80)
Palmitic	Hexadecanoic	16	256.4	7.8 (70)	62.9	1.4272 (80)
Margaric	Heptadecanoic	17	270.4		61	1.4287 (80)
Stearic	Octadecanoic	18	284.5	9.87 (70)	69.6	1.4299 (80)
Arachidic	Eicosanoic	20	312.5		75.4	1.4250 (100)
Behenic	Docosanoic	22	340.6		80.0	1.4270 (100)
Unsaturated						
Palmitoleic	9-Hexadecenoic	16	254.4		0.5	1.44103 (70)
Oleic	9-Octadecenoic	18	282.5	9.41 (60)	14	1.4582 (20)
Erucic	13-Docosenoic	22	338.6		34	1.4758 (20)
Linoleic	9,12-Octadecadienoic	18	280.5		−5	1.4699 (20)
Linolenic	9,12,15-Octadecatrienoic	18	278.5		−11	1.480 (20)
Eleostearic (α)	9,11,13-Octadecatrienoic	18	278.5		49 (67)	1.5112 (50)
Substituted						
Ricinoleic	12-Hydroxy-9-octadecenoic	18	298.5		5.0 (7.7)(16)	1.4716 (20)
Vernolic	12-Epoxy-9-octadecenoic	18	296.5		30–31	1.4628 (40)

1.2.1 แหล่งที่พบกรดอีรูซิค

กรดอีรูซิคเป็นกรดไขมันที่พบได้ในธรรมชาติและสามารถสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้กระบวนการทางเคมีได้ แต่กรดอีรูซิคที่ได้จากธรรมชาติมีความสำคัญและมีบทบาทมากกว่าในการนำมาใช้เนื่องจากเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ และเป็นการใช้ประโยชน์จากสิ่งที่ด้อยค่าให้เกิดประโยชน์มากขึ้นด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงกรดอีรูซิคที่มีแหล่งมาจากธรรมชาติเท่านั้น โดยพบว่ากรดอีรูซิคที่พบในธรรมชาติ เป็นองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันในพืช โดยเฉพาะในพืชตระกูล *Brassica* วงศ์ *Cruciferae* ซึ่งพบกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงมากถึง 50% โดยกรดอีรูซิคที่พบในธรรมชาตินั้นได้มาจากการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (John et al., 1983) โดยเริ่มต้นจากมีการเติมคาร์บอนอะตอม 2 อะตอมเข้าไปที่ปลายคาร์บอกซิลของกรดโอเลอิค ทำให้ได้กรดไอโคซิโนอิค จากนั้นเติมคาร์บอนอะตอม 2 อะตอมเข้าไปที่ปลายคาร์บอกซิลของกรดไอโคซิโนอิค ทำให้ได้กรดอีรูซิค โดยกระบวนการสังเคราะห์กรดอีรูซิคแสดงในรูปที่ 1.2

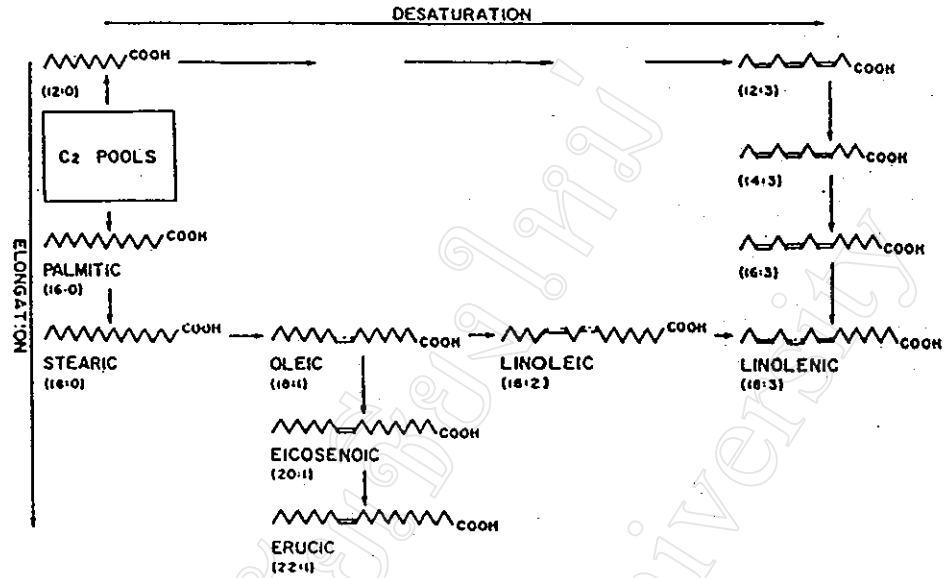
จากที่ได้กล่าวมาแล้วว่าโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด พบกรดอีรูซิคมากในตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ โดยพบในปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ในวงศ์ *Cruciferae* เดียวกันซึ่งสามารถแบ่งแหล่งที่พบกรดอีรูซิคได้เป็น 3 แหล่งดังนี้

1.น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด (Mustard seed oil)

จากที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดว่าพบกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบในน้ำมันประมาณ 40-50% ดังแสดงในตารางที่ 1.8 และในตารางที่ 1.5 ซึ่งแสดงการกระจายของกรดอีรูซิคในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดพบว่ากรดอีรูซิคจะอยู่ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์

2.Crambe oil

เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ *Cruciferae* เช่นเดียวกับมัสตาร์ด (Flank et al.,1986) จัดเป็นแหล่งของกรดอีรูซิคอีกแหล่งหนึ่งเช่นกัน โดยพบกรดอีรูซิคสูงถึง 50-60% ส่วนใหญ่มีการปลูกในทางยุโรปตะวันออก องค์ประกอบของน้ำมันจาก Crambe แสดงในตารางที่ 1.9



รูปที่ 1.2 แสดงการสังเคราะห์กรดอีรูซิคทางชีวภาพของพืชในวงศ์ Cruciferae (John et al., 1983)

ตารางที่ 1.8 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด (Frank et al., 1986)

16 : 0	18 : 0	20 : 0	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 1	22 : 1	Others
2.6	0.8	0.7	0.1	23.2	8.9	10.4	8.1	43.1	2.1

ตารางที่ 1.9 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในน้ำมันเมล็ด Crambe (Frank et al., 1986)

	14 : 0	16 : 0	20 : 0	22 : 0	16 : 1	16 : 3	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 1	22 : 1	24 : 1
C. abyssinica	0.1	1.7	1.3	2.7	0.3	1.0	16.7	7.8	6.9	2.9	55.7	2.9
C. hispanica	0.1	3.7	tr	1.6	0.4	0.5	20.1	10.7	5.5	4.6	52.8	—

3.Rapeseed oil

Rapesseed ถือว่าเป็นแหล่งของกรดอีรูซิคที่สำคัญแหล่งหนึ่ง เมล็ดมีลักษณะกลมมีสีดำหรือน้ำตาล ประกอบด้วยน้ำมัน 40-60% และกาก (meal) 59% (protein 34%) Rapeseed สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มโดยจะแบ่งตามปริมาณของกรดอีรูซิคที่เป็นองค์ประกอบ คือ

3.1 High erucic acid rapeseed oil (HEAR)

น้ำมันที่ได้จากเมล็ดในกลุ่มนี้พบว่ามีกรดอีรูซิคมากถึง 50% จัดเป็นน้ำมันที่ไม่สามารถนำมาใช้ในการบริโภคได้ (non-edibie oil) ส่วนใหญ่นำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมมากกว่า เช่น เป็นสารหล่อลื่น เป็นต้น

3.2 Low erucic acid rapeseed oil (LEAR)

จัดว่าเป็นน้ำมันที่สามารถนำมาใช้ในการบริโภคได้ (edible oil) เนื่องจากมีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผสมอาหาร

1.2.2 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้กรดอีรูซิค

กรดอีรูซิคมีความสำคัญมากในด้านอุตสาหกรรม โดยสามารถนำกรดอีรูซิคไปใช้ได้โดยตรงหรือทำการเตรียมให้อยู่ในรูปอนุพันธ์แล้วจึงนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

ในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้กรดอีรูซิคในรูปของอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดอีรูซิค โดยทำหน้าที่เป็นตัวที่ทำให้ไขมันเกิดการแตกตัว (emulsifier) ในครีมเทียมที่ใช้ในการทำช็อกโกเลต (Takahashi and Yochida, 1986) ซึ่งเอสเทอร์นี้เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอสเทอร์ของกรดอีรูซิคกับน้ำตาล (erucic sugar ester) เอสเทอร์ของกรดอีรูซิคเช่น โมโนอีรูซิคแอซิค ได้แก่ กลีเซอริลโมโนอีรูซิเนต (glyceryl monoerucinate) ใช้เป็นตัวทำให้ไขมันแตกตัวในขนมปังคุกกี้และน้ำสลัดด้วย (Ookochi et al., 1993) โดยทำให้น้ำสลัดคงสภาพอยู่ได้นานขึ้น นอกจากนี้กลีเซอริลโมโนอีรูซิคแอซิค (glyceryl monoerucic acid) ใช้ในการเป็น emulsifier ในการแปรรูปให้อยู่ในรูปที่เป็นผงได้

ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยาใช้เอสเทอร์ของออกติลโดเดซิลอีรูเซต (octyldodecyl erucate) เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางเช่น ลิปสติก (Amaya, 1994) ครีมทาผิว ทำให้มีคุณสมบัติในการยึดติดกับผิวได้ดีขึ้น (Deckner et al., 1992) เดกซิลอีรูเซต (n- decyl erucate)ใช้เป็นส่วนผสมในครีมทาผิว โอเลอิลอีรูเซต (oleyl erucate) เป็นส่วนผสมในน้ำยาบำรุงเส้นผม (Kawaguchi et al.,1991) แชมพูขจัดรังแค (Nakama et al.,1993) และน้ำยาปลูกผม

เพื่อป้องกันการเป็นโรคหัวล้าน (alopecia)ได้ (Onodera et al., 1990, Antoku et al., 1992)

ในทางการแพทย์พบว่ากรดอีรูซิคมีความสำคัญคือ สามารถใช้ในการรักษาโรคทางพันธุกรรมที่เรียกว่า อะดรีโนลิวโคดิสโทรฟี (adrenoleukodystrophy, ALD) โดยกรดอีรูซิคจะไปลดระดับของกรดไขมันที่มีสายยาวมากในเลือด ที่สามารถไปทำลายเนื้อเยื่อไมอีลินในสมองได้ (Painuly, P.,1992) นอกจากนี้ยังได้มีการผลิตวัคซีนที่กินได้ โดยที่ภายในประกอบด้วย เลคติน (lectin) และกรดอีรูซิคและกรดไขมันที่สายยาวไม่อิ่มตัว โดยกรดอีรูซิคจะทำหน้าที่เป็น antitumor medication) สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคสิวและโรคแผลเปื่อยได้

ในอุตสาหกรรมทางเคมีใช้เป็นสารที่เติมเข้าไปในโพลิเมอร์พวกโพลี สไตรีน (polystyrene) โดยทำให้โพลิเมอร์มีความยืดหยุ่นสูงขึ้น (Morita and Nihei, 1991) กรดอีรูซิคยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไนลอน 1313 (nylon 1313) (Donald and Mclvin, 1990) โดยเป็นแหล่งของกรดบราสซิลลิค (brassylic acid) ที่เป็นตัวเริ่มต้นในการผลิต nylon1313 ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ในแชมพู นำมาใช้เป็นองค์ประกอบในน้ำยาปรับผ้านุ่มในอุตสาหกรรมเส้นใยต่างๆ ใช้เป็น fatliquoring agent ในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง และที่สำคัญที่สุดคือ erucamide สามารถใช้เป็นสารหล่อลื่น (lubricant) (Laemsae, 1995)และเป็นน้ำมันไฮดรอลิก (hydrolic oil) (Dye et al., 1995) นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารที่ทำให้ไขมันแตกตัวในน้ำมันดีเซล (diesel) เพื่อเป็นการประหยัดเชื้อเพลิงอีกทางหนึ่งด้วย (Skopal and Komees, 1996)

นอกจากกรดอีรูซิคมีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรมแล้ว ยังนำไปประยุกต์ใช้ในทางด้านเกษตรกรรมอีกด้วย เช่นใช้ในการลดการชะล้างหน้าดิน ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชทางชีวภาพได้และใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำได้อีกด้วย

1.2.3 การแยกกรดอีรูซิคเพื่อใช้ในทางอุตสาหกรรม

ในปัจจุบันการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับกรดอีรูซิคมีความก้าวหน้ามาก โดยพบว่าได้มีการนำกรดอีรูซิคมาประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง ดังนั้นการศึกษาวิจัยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในด้านของการนำกรดอีรูซิคไปประยุกต์ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด ดังได้กล่าวในหัวข้อการประยุกต์ใช้กรดอีรูซิคไปแล้วส่วนการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับทางด้านการแยกและการทำบริสุทธ์กรดอีรูซิค ออกจากน้ำมันที่มีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง พบว่าได้มีการศึกษากันอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากกรดอีรูซิคที่พบในธรรมชาติถือว่าเป็นแหล่งของกรดอีรูซิคที่สำคัญแหล่งหนึ่ง ดังนั้นการแยกกรดอีรูซิคออกจากแหล่งน้ำมันนี้ จึงถือว่าเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดมากขึ้น

Mcneill และ Philip (1995) ได้ทำการแยกกรดอีรูซิคออกจาก High erucic acid rapeseed oil โดยใช้เอนไซม์ไลเปส (lipase hydrolysis) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และได้ศึกษาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ 3 ชนิดคือ *Pseudomonas cepacia*, *Geotrichum candidium* และ *Candida rugosa*. โดยพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้แตกต่างกัน พบว่า *Pseudomonas cepacia* lipase สามารถย่อยสลายได้กรดไขมันมีคาร์บอน 18 อะตอมและกรดไขมันที่มีคาร์บอน 22 อะตอมมากที่สุด *Candida rugosa* lipase สามารถย่อยสลายแล้วได้กรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอมมากที่สุด และกรดไขมันที่พบรองลงมาคือกรดไขมันที่มีคาร์บอน 22 อะตอม ส่วน *Geotrichum candidium* lipase สามารถย่อยสลายได้กรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอมมากที่สุด เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อชนิดนี้มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอมและมีพันธะคู่อยู่ที่ตำแหน่งที่ 9 ของโมเลกุลของกรดไขมัน ต่อมา Michael และคณะ (1993) ได้แยกกรดอีรูซิคออกมาและเตรียมให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ของกรดอีรูซิคคือ ไตรอีรูซิน(trierucin) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* หลังจากนั้นย่อยสลายน้ำมันที่มีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง (High erucic acid rapeseed oil) ด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* พบว่าสามารถย่อยสลายแล้วได้ไดอีรูซินบริสุทธิ์(dierucin) 17% จากนั้นใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus arrhizus* ย่อยสลายไดอีรูซินให้เป็นกรดอีรูซิคอิสระ และใช้ Lypozyme สังเคราะห์ให้เป็นไตรอีรูซิน

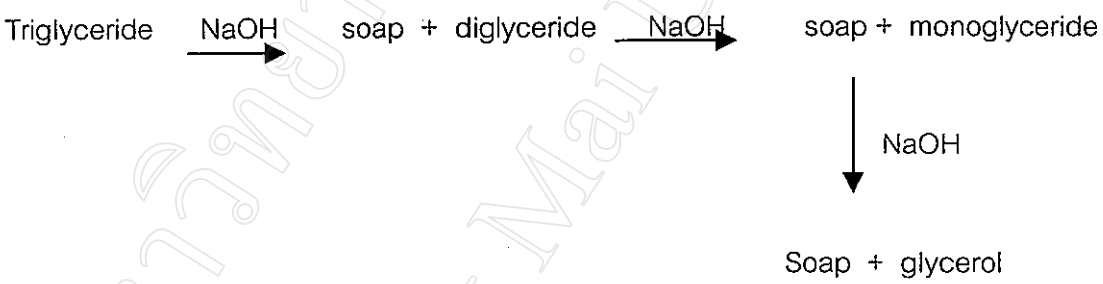
นอกจากการแยกกรดอีรูซิคโดยวิธีการทางเอนไซม์ดังกล่าวแล้วการแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันเจือปนชนิดอื่น สามารถทำได้โดยใช้การกลั่นลำดับส่วน (fractionation distillation) เป็นวิธีที่ใช้อุณหภูมิสูงมาก เพื่อให้กรดไขมันเกิดการระเหยกลายเป็นไอออกมาโดยอาศัยการแยกกรดไขมันที่มีจุดเดือดต่างกันออกจากกัน โดยกรดไขมันที่มีจุดเดือดต่ำถูกแยกออกมาก่อนกรดไขมันที่มีจุดเดือดสูงกว่า เนื่องจากวิธีนี้ต้องใช้อุณหภูมิสูงในการแยกทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการปนออกมาด้วย ดังนั้นจึงไม่นิยมใช้ในการแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันอื่น ต่อมาได้มีการศึกษาการแยกกรดอีรูซิคโดยใช้การตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำ โดยที่ Hagemann และคณะ (1961) ได้แยกบริสุทธ์กรดอีรูซิคออกจากน้ำมัน *Crambe abyssinaca* oil ซึ่งมีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงถึง 55% พบว่าสามารถแยกกรดอีรูซิคออกได้บริสุทธิ์สูงถึง 94-98% โดยใช้สารละลายน้ำผสมตัวทำละลายมาใช้ในการตกผลึกที่อุณหภูมิ -11 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ได้มีการแยกกรดอีรูซิคให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี preparative high performance liquid chromatography ร่วมกับการตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำ (Painuly and Charles, 1992) พบว่าจะได้

กรดอีรูซิคบริสุทธิ์สูงถึง 99% เป็นต้น การศึกษาวิจัยในการแยกกรดอีรูซิคเป็นการวิจัยที่เป็นจุดเริ่มต้นในการนำกรดอีรูซิคที่พบในธรรมชาติไปใช้ให้เกิดประโยชน์ให้มากที่สุด

1.3 ปฏิกิริยาในการย่อยสลายน้ำมัน

1.3.1 การย่อยสลายน้ำมันด้วยสารละลายเบส (alkaline hydrolysis)

การย่อยสลายน้ำมันด้วยเบส เป็นการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (hydrolysis) โดยใช้สารละลายเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้อยู่ในรูปสบู่และกลีเซอรอล เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ปฏิกิริยาซาปอนิฟิเคชัน (saponification) ดังรูปที่ 1.3 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีความร้อนเข้าช่วยเพื่อดีกรีของการแตกตัวของกรดไขมันสมบูรณ์ขึ้น ส่วนใหญ่เป็นเกลือของโซเดียมและเกลือของโปแตสเซียม



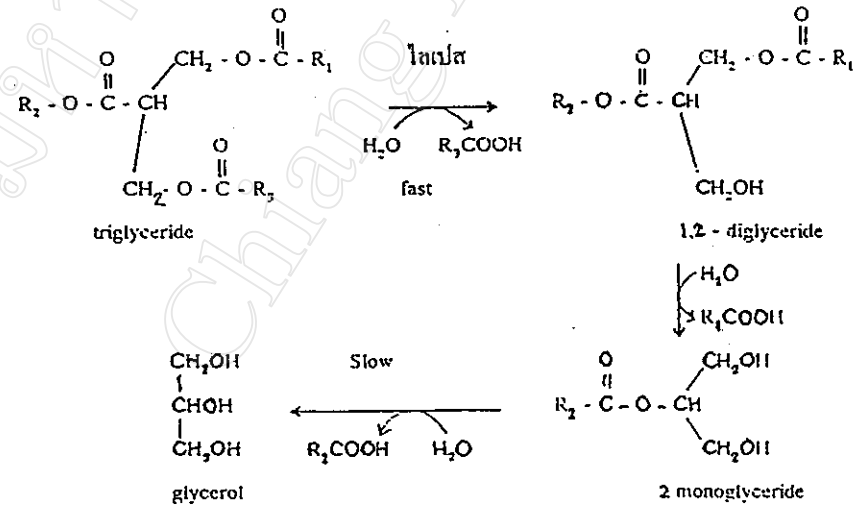
รูปที่ 1.3 แสดงปฏิกิริยาซาปอนิฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Frank et al., 1986)

ลักษณะของการเกิดปฏิกิริยาซาปอนิฟิเคชันสามารถเกิดได้ทั้งที่เป็นแบบ batch และแบบ continuous process โดยพิจารณาจากองค์ประกอบของทั้ง 3 ขั้นตอนในการเกิดปฏิกิริยา คือ การเกิดซาปอนิฟิเคชัน การล้างสบู่ (soap washing) เพื่อแยกกลีเซอรอล และการ fitting ในการเกิดปฏิกิริยาซาปอนิฟิเคชันพบว่าการเกิดปฏิกิริยากับไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์พบว่าสามารถเกิดได้เร็วกว่าการเกิดปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาซาปอนิฟิเคชันขึ้นอยู่กับ องค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารที่เข้าทำปฏิกิริยา และปัจจัยทางกายภาพอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยา

1.3.2 การย่อยสลายน้ำมันด้วยเอนไซม์ไลเปส (lipase hydrolysis)

เอนไซม์ไลเปส มีชื่อตามระบบว่า triacylglycerol acyl hydrolase (E.C.3.1.1.3) ปัจจุบันถือว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม โดยจะเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับไขมันและน้ำมัน ในการสลายพันธะเอสเทอร์ในไตรกลีเซอไรด์ โดยกลไกการสลายพันธะเอสเทอร์แสดงในรูปที่ 1.4 ในกรณีที่ปฏิกิริยาเกิดได้สมบูรณ์จะได้กรดไขมันอิสระกับกลีเซอรอล แต่โดยทั่วไปการเกิดปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะพบสารตัวกลางเกิดขึ้นในปฏิกิริยาด้วยคือ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ โดยที่ประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่มีต่อสับสเตรตและตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยา

แหล่งที่พบเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ในสัตว์ พืชและผลิตได้โดยจุลินทรีย์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่มาจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งที่สำคัญ เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากและเพียงพอกับความต้องการ รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ และการผลิตเอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้มั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง โดยเมื่อผลิตแล้วถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ของจุลินทรีย์เรียกว่า extracellular lipase ทำให้ง่ายในการสกัดเอนไซม์เพื่อมาใช้งานได้

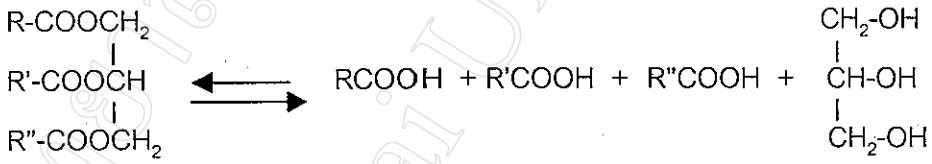


รูปที่ 1.4 แสดงการสลายพันธะเอสเทอร์โดยเอนไซม์ไลเปส(lipase hydrolysis) (Neena, 1997)

เอนไซม์ไลเปสที่นำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยานั้น สามารถแบ่งโดยอาศัยความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีต่อสับสเตรท สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ (Macrae , 1983)

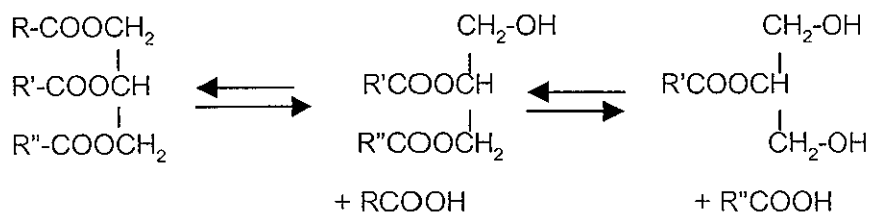
1. เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจง (nonspecific lipase)

เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ทำการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างไม่จำเพาะเจาะจง สามารถเข้าเร่งสลายพันธะเอสเทอร์ได้ทั้ง 3 ตำแหน่งในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้เข้าเร่งปฏิกิริยาได้สมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระกับกลีเซอรอล แต่ถ้าเกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์พบว่ามีโมเลกุลของไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยา แหล่งที่พบเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้ได้แก่ *Candida rugosa, Pseudomonas cyclopium, Corynebacterium aenes* และ*Staphylococcus aureus* เป็นต้น โดยจะเกิดปฏิกิริยาดังนี้



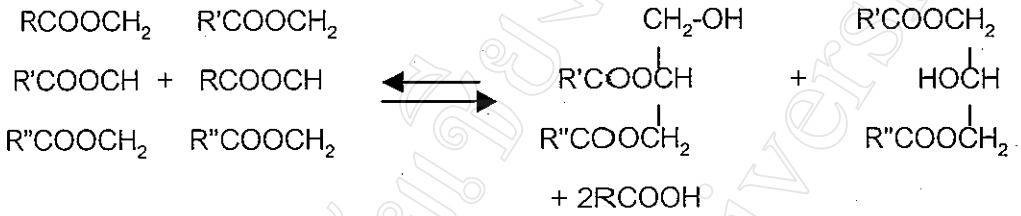
2. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (1 ,3 – specific lipase)

เอนไซม์กลุ่มนี้เร่งการสลายพันธะเอสเทอร์ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่ทางด้านนอกของโมเลกุล ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ รวมอยู่กับ 1,2 (2,3) ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ และพบว่า 2-โมโนกลีเซอไรด์ไม่คงตัว สามารถเกิด acyl migration ได้ 1,3 ไดกลีเซอไรด์และ 1(3) โมโนกลีเซอไรด์ตามลำดับ และจากนั้นถูกย่อยได้เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลต่อไปถ้าปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์ แหล่งที่พบเอนไซม์ชนิดนี้ได้แก่ *Aspergillus niger, Mucor jaranicus* และ *Rhizopus* species และลักษณะการเกิดปฏิกิริยาแสดงได้ดังนี้



3. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมัน (fatty acid specific lipase)

เป็นเอนไซม์ไลเปสที่พบว่ามีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้พบใน *Geotrichum candidium* โดยมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่เป็นสายยาวที่มีพันธะคู่อยู่ในตำแหน่งที่ 9 ของโมเลกุล เช่น cis-9-unsaturated acid โดยพบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้



ในการทำงานของเอนไซม์มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงาน เช่น ความเข้มข้นของสับสเตรท ค่าพีเอช อุณหภูมิ ตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส การทำงานของเอนไซม์ไลเปสพบว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างแพร่หลาย นอกจากใช้เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาการย่อยสลาย (hydrolysis) น้ำมันแล้ว สามารถใช้เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาต่างๆ (Neena, 1997) เช่น ปฏิกิริยา esterification ปฏิกิริยา transesterification โดยจะเกิด alcoholysis aminolysis และ acidolysis และที่สำคัญคือการใช้เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยา interesterification เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาในสภาวะที่รุนแรงเมื่อเกิดปฏิกิริยาด้วยสารละลายด่าง นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในทางด้านอุตสาหกรรมอีกด้วย เช่นใช้ในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของน้ำมันและไขมันเพื่อผลิตสบู่ ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา esterification เพื่อผลิตเอสเทอร์ของกรดไขมันใช้เป็นสารให้กลิ่น โดยมีลักษณะที่เป็นสารที่มีกลิ่นหอมเฉพาะตัวด้วย และยังใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชสุขภัณฑ์ ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษและในอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอกเป็นต้น

1.4 การใช้ดีเทอร์เจนต์(detergent) ร่วมกับเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมัน

Fujii และคณะ (1986) ได้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันมะกอก (olive oil) โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปส และได้ศึกษาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสโดยนำดีเทอร์เจนต์มาเป็นตัวร่วมในการเร่งปฏิกิริยา พบว่าปริมาณของกรดไขมันอิสระที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณที่มากกว่าเมื่อทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสเพียงอย่างเดียว และพบว่าในอุตสาหกรรมการซักล้างได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง (Martin et al.,1989) ดังนั้นในการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปส สามารถนำดีเทอร์เจนต์มาเป็นตัวร่วมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสได้ เพื่อสามารถทำการย่อยสลายแล้วได้ปริมาณของกรดไขมันอิสระออกมามากที่สุด

ดีเทอร์เจนต์(detergent) ได้เริ่มมีการผลิตตั้งแต่สงครามโลกครั้งที่ 2 โดยประเทศที่สามารถผลิตได้มากคือ ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยพบว่าในปี 1940 สามารถทำการผลิตได้ 30 ล้านปอนด์ ต่อมาได้ทำการผลิตมากขึ้นเรื่อย โดยปัจจุบันพบว่าสามารถผลิตได้ถึง 4.3 ล้านล้านปอนด์ โดยดีเทอร์เจนต์ที่ผลิตได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและในอุตสาหกรรมซักฟอก สามารถแบ่งชนิดของดีเทอร์เจนต์ได้เป็น 4 ชนิดด้วยกันคือ

1.4.1 ดีเทอร์เจนต์กลุ่มที่เป็น Anionic detergent (Jungermann, 1979)

ดีเทอร์เจนต์กลุ่มนี้จัดเป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด และมีอนุพันธ์ที่มีความสำคัญคือ sulfate และ sulfonate โดยที่ sulfate เป็นสารประกอบที่มี sulfur จับกับคาร์บอนอะตอมโดยมี oxygen atom อยู่ตรงกลาง มีโครงสร้างดังนี้ $-C-O-SO_3^-$ และสาร sulfonate จะมี sulfur จับกับ oxygen atom โดยตรง มีโครงสร้างดังนี้ $-C-SO_3^-$ anionic detergent ตัวที่สำคัญคือ alkyl sulfates โดยเตรียมได้จาก fatty alcohol ทำปฏิกิริยากับ metallic sodium ได้เป็น sodium alkyl sulfates โดยมีความเสถียรในสารละลายด่าง กลาง และกรดอ่อน แต่ถูกย่อยสลายด้วยกรดแก่ ดีเทอร์เจนต์ชนิดนี้สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในสบู่ แชมพู น้ำยาล้างจาน และครีมอาบน้ำ เป็นต้น ตัวอย่างดีเทอร์เจนต์ในกลุ่มนี้ได้แก่ สารประเภท alkylbenzene sulfonate (ABS) , linear alkylbenzene sulfonate (LAS) alkane sulfonate, - olefinsulfonate (aos) , alkyl sulfate (FAS) และ alkyl ether sulfate (FES) เป็นต้น

1.4.2 **ดีเทอร์เจนต์กลุ่มที่เป็น Cationic detergent**

ดีเทอร์เจนต์กลุ่มนี้ประกอบด้วย hydrophobic group จับกับ nitrogen atom ที่มีประจุบวกโดยเป็น hydrophilic group โดย Einhorn และ Mannich (1979) ได้เตรียมเกลือของ quaternary ammonium salts ดีเทอร์เจนต์กลุ่มนี้มีบทบาทในการเป็น sanitizers , antiseptic agent , germicides , เป็นองค์ประกอบของเครื่องสำอาง เป็น textiles chemical , flotation agent และ corrosion inhibitor เป็นต้น ดีเทอร์เจนต์กลุ่มนี้ประกอบด้วย dialkyldimethylammonium chloride , imidazolinium saits และ alkyldimethylbenzyl ammonium chloride เป็นต้น

1.4.3 **ดีเทอร์เจนต์กลุ่มที่เป็น Nonionic detergent**

ดีเทอร์เจนต์ชนิดนี้มีกลุ่มที่สำคัญคือ polyoxyethylene และ polyoxy propylene เป็นอนุพันธ์ของ fatty alcohol , amides และ acids พบว่ามีส่วนที่เป็น hydrophobic และ hydrophilic อยู่ในโมเลกุล แหล่งที่เป็น hydrophilic พบว่ามี functional group ของพวก ether oxygen หรือ hydroxyl oxygen ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการละลายน้ำของ nonionic detergent ได้ ส่วนแหล่งที่เป็น hydrophobic คือ long chain acids , alcohol และ amides ดีเทอร์เจนต์กลุ่มนี้ได้แก่ alkylphenol polyglycol ether (APEO) , alkyl polyglycol ether (AEO) และ amide oxides เป็นต้น

1.4.4 **ดีเทอร์เจนต์กลุ่มที่เป็น Amphoteric detergent**

ดีเทอร์เจนต์กลุ่มนี้เป็นดีเทอร์เจนต์ที่ประกอบด้วย anionic และ cationic group อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน โดยประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถผลิตได้ 14 ล้านปอนด์ ดีเทอร์เจนต์กลุ่มนี้มีราคาแพง เนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้มาก ดีเทอร์เจนต์ชนิดนี้ผลิตจาก fatty imidazoline derivatives พบว่าใช้เป็นส่วนประกอบใน mild baby shampoo และตัวที่สำคัญในกลุ่มนี้ คือ fatty amine oxides ได้แก่ dodecyldimethylamine oxide และ 1-hydroxyethyl – 2 – octodecyl imidazoline oxide โดยพบใช้ใน แชมพู น้ำยาทำความสะอาด และ น้ำยาปรับผ้านุ่ม นอกจากนี้ยังพบสารพวก alkylbetaines และ alkylsulfobetaines อีกด้วย

นอกจากคุณสมบัติของดีเทอร์เจนต์ดังได้กล่าวมาแล้ว พบว่าดีเทอร์เจนต์ยังสามารถใช้เป็นตัวร่วมในการย่อยสลายไขมันด้วยเอนไซม์ไลเปสออกจากเส้นใยของผ้าได้ (Jakobi,G.,1987) โดยพบว่าสามารถทำการย่อยสลายได้กรดไขมันออกมามากกว่าใช้เอนไซม์ไลเปสเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ได้มีการวิจัยเกี่ยวกับดีเทอร์เจนต์ในการนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิด

ประโยชน์ในทางด้านอุตสาหกรรมให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ (Murata et al.,1993) และในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจึงได้มีการนำดีเทอร์เจนต์มาเป็นตัวร่วมในการเร่งปฏิกิริยาด้วย โดยเลือกดีเทอร์เจนต์ในกลุ่มที่เป็น cationic detergent และกลุ่มที่เป็น anionic detergent เนื่องจากสามารถเกิดการแตกตัวแล้วได้ประจุบวกและประจุลบในโมเลกุลตามลำดับ

1.5 เทคนิคการแยกและการวิเคราะห์กรดไขมัน

1.5.1 เทคนิคการแยกกรดไขมัน

การแยกกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันสามารถใช้เทคนิคต่างๆ ได้แก่ การตกผลึก การแยกโดยวิธี urea fractionation การแยกโดยการกลั่นลำดับส่วน การแยกโดยวิธี adsorption chromotography และการแยกโดยวิธี ultrafiltration membrane เป็นต้น

1.5.1.1 การตกผลึก (crytallization) (Frank et al., 1986)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกกรดไขมันและอนุพันธ์ของกรดไขมันให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยกรดไขมันที่ต้องการแยกมาจากการย่อยสลายน้ำมันด้วยสารละลายเบสและเอนไซม์ไลเปส โดยสามารถทำการตกผลึกกรดไขมันได้ที่อุณหภูมิ 0 และที่ต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส โดยพบว่าในการแยกกรดไขมันอิ่มตัว(saturated acid) สามารถทำการตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสและแยกผลึกออกจากสารละลายโดยการกรอง ส่วนการแยกกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ และต้องทำการตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำ 0-(-90) องศาเซลเซียส และทำการกรองผลึกที่อุณหภูมิที่ใช้ในการตกผลึกด้วย ทั้งนี้ต้องให้สารละลายนั้นเย็นลงอย่างช้าๆ ในอุณหภูมิที่ใช้ในการตกผลึกและทำการตกผลึกเป็นเวลานานๆ 4-24 ชั่วโมง พบว่าทำให้ได้ผลึกของกรดไขมันมีขนาดใหญ่ ทำให้ง่ายในการกรองแยกผลึก

ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้ในการตกผลึกได้แก่ เมธานอล เอธานอล อีเทอร์ ปิโตรเลียมอีเทอร์ และ อะซิโตน เป็นต้น โดยใช้ที่มีความเข้มข้นเจือจาง 5 -10 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมของกรดไขมัน (Hilditch and Williams,1964) การตกผลึกเพื่อแยกกรดไขมันนั้นพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงถึง 99% ตัวอย่างในการแยกโดยการตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำ ได้แก่ การตกผลึกแยกกรดไลโนเลอิก โดยใช้อะซิโตน ที่ -75 องศาเซลเซียส ได้กรดไลโนเลอิก 93% ของกรดไลโนเลอิกที่พบทั้งหมด การตกผลึกแยกกรดโอเลอิก โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ -40 องศาเซลเซียสได้กรดโอเลอิก 90% ของกรดโอเลอิกทั้งหมดเป็นต้น นอกจากนี้การตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำเพื่อแยกกรดไขมันชนิดอิ่มตัวออกจากกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบในน้ำ

มัน rice bran oil ได้โดยใช้เมธานอลที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส (El-Zanati and Hedr, 1991) ดังนั้นการตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแยกกรดไขมันที่พบในธรรมชาติได้

1.5.1.2 **การแยกโดยใช้วิธี** Urea fractionation (Frank et al., 1986)

เทคนิคนี้ใช้ในการแยกกรดไขมันที่อิ่มตัว(saturated acid) ออกจากกรดไขมันไม่อิ่มตัว(unsaturated aicd) โดยนำกรดไขมันและยูเรีย (urea) ละลายในสารละลายเมธานอลหรือยูเรียที่ร้อน ได้เมธิลเอสเทอร์แล้วนำไปละลายในสารละลายผสมระหว่างเมธานอลและเอธานอล แล้วทำการตกผลึกที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ จุดประสงค์ในการแยกด้วยวิธีนี้คือการแยกกรดไขมันที่เป็นสายยาวออกจากกรดไขมันที่เป็นกิ่งก้านสาขาและกรดไขมันที่เป็นวง และทำการแยกกรดไขมันที่เป็นวงออกจากที่เป็นสาขา ตัวอย่างคือการแยกกรดไขมันที่เป็นวงออกจาก linseed oil โดยใช้อุณหภูมิสูงจะได้กรดไขมันบริสุทธิ์ 95% และนอกจากนี้ยังสามารถทำการแยกกรดโอเลอิกและกรดไลโนเลอิกออกจากน้ำมันที่พบในธรรมชาติอีกด้วย

1.5.1.3 **การแยกโดยการกลั่นลำดับส่วน** (distillation fractionation) (Frank et al., 1986)

เป็นการกลั่นแยกเอสเทอร์ของกรดไขมันออกจากกัน โดยความสามารถในการแยกขึ้นอยู่กับความแตกต่างของจุดเดือดของกรดไขมันแต่ละชนิด ความยาวของโครงสร้างของกรดไขมัน รวมทั้งดีกรีความไม่อิ่มตัว พบว่าสามารถทำการแยกเอสเทอร์ของ C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18} และ C_{20} acid ได้ โดยในการกลั่นลำดับส่วนของเมธิลเอสเทอร์ภายใต้ความดันต่ำ (0.1-1.0mm) และใช้อุณหภูมิสูง 200 องศาเซลเซียส และถ้าทำการแยกกรดไขมันพวกไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะที่เป็น conjugated และยาวกว่า C_{18} พบว่าจะต้องอุณหภูมิสูงกว่านี้

การกลั่นลำดับส่วนพบว่ามีความสำคัญมากในการแยกกรดไขมันอิ่มตัวในทางอุตสาหกรรมเช่น สามารถทำการแยก 16:0, 18:0 ออกจาก hydrogenated tallow และ seed oil ทำการแยก 18:0, 20:0, 22:0 และ 24:0 ออกจาก hydrogenated fish oil และ high erucic acid rapeseed oil โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 160-230 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 20 mm

1.5.1.4 **การแยกกรดไขมันด้วย** Adsorption chromatography (Frank et al., 1986)

เทคนิคการแยกกรดไขมันด้วย adsorption chromatography เป็นการแยกโดยอาศัยความแตกต่างของความมีขั้ว (polarity) โดยสามารถทำการแยกแบบคอลัมน์และแบบแผ่นบาง (thin layer) โดยจะใช้ซิลิกา(silica) เป็นตัวดูดซับ(adsorbent) โดยคอลัมน์ใช้ซิลิกา 30 กรัมต่อ 1 กรัมของกรดไขมัน ใช้ flow rate 1-3 ml/min

การแยกและการวิเคราะห์กรดไขมันด้วยวิธี โครมาโทกราฟีผิวบาง (thin layer chromatography , TLC) สามารถทำการแยกและวิเคราะห์กรดไขมันได้โดยอาศัยความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลายที่ไม่เท่ากัน และสารแต่ละชนิดมีแรงดูดซับกับตัวดูดซับได้ต่างกัน ทำให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ตามตัวทำละลายด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน โดยปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการแยกของ TLC (Joseph, 1995) ได้แก่ การเลือกใช้ตัวดูดซับ (stationary phase) และการเลือกระบบตัวทะลำลาย(mobile phase) ที่เหมาะสม โดยการเลือกใช้ระบบตัวละลายขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยก ระบบของตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารพวกไขมันจะแสดงในตารางที่ 1.10

ในการแยกกรดไขมันด้วยเทคนิค TLC พบว่าได้มีการปรับปรุงโดยการเติมสารซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) ผสมด้วย เรียกว่า argentaton thin layer chromatography (Lars et al., 1993) โดยจะเกิด Olefiric bond เกิดเป็นคอมเพลกซ์กับ silver ion โดยสารที่เติมนี้จะเพิ่มความสามารถในการแยกกรดไขมันได้ โดยเติม silver nitrate ประมาณ 5-25 % ทำให้สามารถทำการแยกกรดไขมันได้ตามความแตกต่างของดีกรีความไม่อิ่มตัว (degree of unsaturation) และใช้ในการแยกตามจำนวนพันธะคู่ที่อยู่ในโมเลกุลได้ ในการแยกนั้นจะใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง ether : benzene หรือ chloroform : methanol และทำการตรวจสอบการแยกด้วยการสเปรย์สารพวก 2',7'- dichlorofluorescein solution และตรวจหาโดยใช้แสง UV (ultraviolet)

ตารางที่ 1.10 ระบบของตัวทำละลายประเภทต่างๆที่ใช้ในการแยกสารพวกไขมันด้วย TLC

สารที่ต้องการศึกษา	ระบบตัวทำละลาย	อัตราส่วน
Ester จาก oleic acid	Petroleum ether : diethylether : acetic acid	70:30:1
Plant lipids	Chloroform : methanol : acetic acid : water	85: 15: 10: 4
Glycolipids	Chroroform : methanol : water	65 : 25 : 0,2,4,6
Neutral lipids	Hexane : diethylether : acetic acid	80 : 30 : 0, 1, 5, 10

จากการทดลองของ Sosulski และคณะ (1979) ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันชนิด medium และ low erucic acid rapeseed oil ได้ทำการแยกไตรกลีเซอร์ไรด์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ที่มีซิลิกาเจล จากนั้นทำการแยกองค์ประกอบโดยใช้โครมาโทกราฟีผิวบาง (thin layer chromatography) ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล G และมีการเติมเงินไนเตรต (silver nitrate) 20% และใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ benzene/diethyl ether (90 : 10 v/v) จากนั้นตรวจหาแถบที่เกิดจากการแยกด้วยการสเปรย์สารพวก 2',7'- dichlorofluorescein solution และตรวจหาโดยใช้แสง UV (ultraviolet) จากนั้นทำการขูดแต่แถบออกมาและละลายใน diethyl ether และนำไปเตรียมอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์และวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่างๆ โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยดครมาโทกราฟีกาซ

1.5.1.5 การแยกโดยวิธี Ultrafiltration membrane (Munir, C., 1986)

การกรอง (Filtration) มีคำจำกัดความว่า เป็นการแยกองค์ประกอบหนึ่งหรือสององค์ประกอบออกจากส่วนที่เป็นของเหลว ในอดีตจะหมายถึงการแยกของแข็ง ของที่ไม่ผสมกัน และอนุภาคต่างๆ ออกจากส่วนที่เป็นของเหลวหรือกาซ

การกรองผ่านเยื่อเลือกผ่าน (membrane filtration) เป็นการกรองที่ได้มีการประยุกต์ใช้โดยจะใช้เกี่ยวกับการแยกตัวทำละลายที่ละลายได้ของเหลวหรือการแยกส่วนผสมที่เป็นกาซ โดยมีการยอมให้องค์ประกอบบางชนิดผ่านและกักเก็บองค์ประกอบบางชนิดที่อยู่ในส่วนผสมไว้ เมมเบรนจะมีสถานะที่เป็นของแข็ง ของเหลวหรือเป็นแบบผสมกัน เมมเบรนสามารถทำการแบ่งชนิดได้โดยอาศัยคุณสมบัติ ธรรมชาติของเมมเบรน (ที่ได้จากธรรมชาติหรือได้จากการสังเคราะห์) โครงสร้างของเมมเบรน (มีรูพรุนหรือ ไม่มีรูพรุน) การประยุกต์ใช้เมมเบรน (การแยกอนุภาคที่เป็นกาซ หรือ กาซปนกับของเหลว หรือ ของเหลวกับของเหลว) กลไกการทำงานของเมมเบรน (การดูดซับ การแพร่ การแลกเปลี่ยนประจุ ออสโมซิส หรือ เป็นเมมเบรนที่ไม่มีความจำเพาะ) เป็นต้น

ในกระบวนการแยกโดยเมมเบรนมีความแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับ ขนาดของอนุภาคหรือโมเลกุล และตัวแปรที่มีผลต่อกระบวนการแยก ได้มีการจำแนกกระบวนการแยกโดยใช้เมมเบรนได้ดังนี้ reverse osmosis , ultrafiltration , microfiltration , dialysis และ electrodialysis โดยแต่ละกระบวนการแตกต่างกันดังแสดงไว้ในตารางที่ 1.11 แสดงคุณสมบัติของแต่ละกระบวนการ พบว่า osmosis เป็นการแยกโดยการให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเลือกผ่าน (semi-permeable membrane) จากด้านที่มีความเข้มข้นของสารละลายเจือจางไปยังด้านที่มีความเข้มข้นสารละลายเข้มข้นสูงกว่าของเยื่อเลือกผ่าน dialysis เป็นเทคนิคที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์สารโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ (Koseoglu et al., 1990) เช่น การแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีน โดยอาศัยแรงขับเคลื่อนที่เกิดจากการที่มีความเข้มข้นต่างกัน ระหว่างสารละลายในถุง dialysis กับสารละลายที่อยู่นอกถุง electrodialysis อาศัยแรงขับเคลื่อนทางไฟฟ้า (voltage หรือelectromotive force) และเมมเบรนที่มีความจำเพาะต่อประจุ โดยใช้ในการแยกกลุ่มสารที่มีประจุ microfiltration , ultrafiltration และ reverse osmosis อาศัย hydrualic pressure ใช้ในการเคลื่อนที่ของสารซึ่งพบว่าทำให้สารเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเลือกผ่านได้เร็วขึ้น โดยทั่วไปแล้วธรรมชาติของเมมเบรนขึ้นอยู่กับ องค์ประกอบของสารที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อเลือกผ่านและองค์ประกอบที่ถูกกักเก็บไว้ พบว่า microfiltration สามารถทำการแยกสารที่มีขนาดในระดับ micron หรือ submicron คืออยู่ในช่วง 0.02-2.0 μm ส่วน ultrafiltration สามารถแยกสารที่มีโมเลกุลขนาด 0.002-0.2 μm ซึ่งมี molecular weight cut - off อยู่ในช่วง 500-30,000

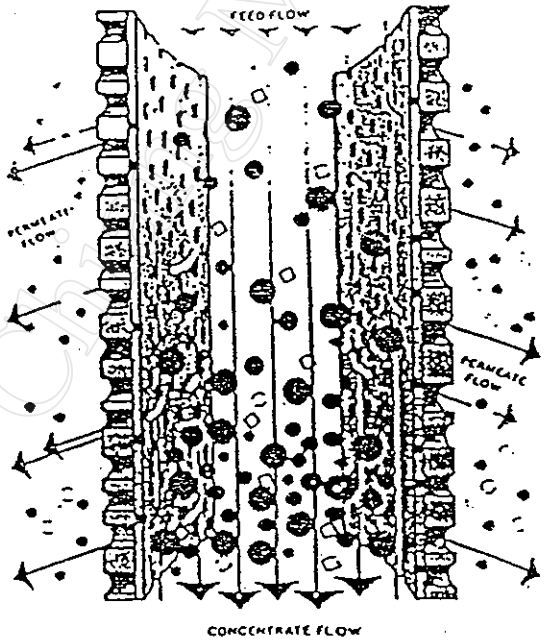
การแยกโดยใช้ ultrafiltration membrane เป็นวิธีการที่ใช้ในการแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กออกจากสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ทำให้สารละลายของสารโมเลกุลใหญ่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ภายใต้สภาวะที่ใช้แรงดันเหนือสารละลาย ทำให้ตัวทำละลายและสารโมเลกุล

เล็กถูกดันผ่านเยื่อเลือกผ่านออกมา และสารโมเลกุลใหะถูกกักไว้อีกด้านหนึ่งของเมมแบรน ทำให้สารโมเลกุลใหญ่มีความเข้มข้นสูงขึ้น รูปที่ 1.2 แสดงการแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลและน้ำหนักโมเลกุลต่างกันด้วยวิธี ultrafiltration membrane

ตารางที่ 1.11 แสดงคุณสมบัติของการแยกด้วยกระบวนการต่างๆของเมมเบรน (Munir, 1986)

Process	Driving Force	Permeate	Retentate*
Osmosis	Chemical Potential	Water	Solutes
Dialysis	Concentration Difference	Water + Small Molecules	Large Molecules
Ultrafiltration	Pressure	Water + Small Molecules	Large Molecules
Reverse Osmosis	Pressure	Water	Solutes
Electrodialysis	E.M.F.	Water + Ionic Solutes	Nonionic Solutes
Microfiltration	Pressure	Water + Dissolved Solutes	Large Suspended Particles

*Also includes water



รูปที่ 1.2 **แสดงการแยกสารด้วยวิธี** ultrafiltation membrane (Koseoglu et al.,1990)

การแยกด้วยวิธี ultrafiltration membrane สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวางเช่น ใช้ในการแยกทางด้าน water treatment , sugar refining , pulp and paper industry , textile industry เป็นต้น และสามารถใช้ในการแยกกรดไขมันออกจากน้ำมันหรือไตรกลีเซอไรด์ พบว่า Prazeeres และคณะ (1993) ได้ทำการแยกกรดโอเลอิคที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันมะกอกด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไว้ในเมมเบรน และ ultrafiltration membrane bioreactor ในการแยกกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปส และ Keurentjes และคณะ (1992) ได้ทำการสกัดและแยกกรดไขมันออกจากน้ำมันโดยใช้การแยกแบบ ultrafiltration membrane ในการแยกใช้เมมเบรนที่เป็น cellulose hollow fiber membrane พบว่าสามารถทำการแยกกรดไขมันที่มีค่า overall mass transfer coefficient อยู่ในช่วง 7×10^{-9} m/s สำหรับกรดอีรูซิค ถึง 5×10^{-7} m/s สำหรับกรดคาโปอิคออกจากตัวทำละลายที่เป็น 1,2-butanediol นอกจากนี้ได้มีการนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับน้ำมันที่สามารถนำมาบริโภคได้ (edible oil) เช่น oilseed, fruit pulps, animal และ fish เป็นต้น

1.5.2 เทคนิคการวิเคราะห์กรดไขมัน

1.5.2.1 การวิเคราะห์กรดไขมันโดยวิธีการไทเทรต (Swern et al., 1982)

เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันอิสระทั้งหมดที่ได้จากการย่อยสลายหรือที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน โดยค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มีความใกล้เคียงกับค่าแอซิดนัมเบอร์ (acid value) แต่ใช้วิธีการเทียบที่ต่างกัน การหาปริมาณของกรดไขมันอิสระสามารถนำกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน ขึ้นอยู่กับน้ำหนักหรือปริมาณของกรดไขมันที่นำมาวิเคราะห์ โดยนำกรดไขมันมาละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างเอธานอล 95% กับไดเอธิลอีเทอร์ในอัตราส่วน 1 : 1 และไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยมีฟีนอล์ฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติของการไทเทรตสังเกตจากการเปลี่ยนสีเป็นสีแดงชมพูเป็นเวลานาน 30 วินาที ก่อนจากหายไป และคำนวณหาปริมาณของกรดไขมันอิสระโดยคำนวณจากปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ สามารถคำนวณในหน่วยมิลลิโมลของกรดไขมันเทียบกับกรัมของสารตัวอย่าง สามารถคำนวณได้ดังนี้

มิลลิโมลของกรดไขมันอิสระ = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ml) × ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)

สามารถรายงานค่าปริมาณของกรดไขมันอิสระในหน่วยมิลลิโมลของกรดไขมันอิสระต่อกรัมน้ำมัน

$$\text{มิลลิโมลของกรดไขมันต่อกรัมน้ำมัน} = \frac{\text{มิลลิโมลของกรดไขมันที่ได้จากการไทเทรต}}{\text{น้ำหนักของน้ำมันที่ใช้ในการไทเทรต}}$$

จากเทคนิคการวิเคราะห์ของ AOAC พบว่าน้ำหนักและปริมาณของสารตัวอย่างเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณและความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต เช่น การหากรดไขมันในน้ำมันที่เป็น crude oil 7.05 กรัม ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.25 นอร์มอล ส่วนน้ำมันที่บริสุทธ์ 56.4 กรัม ใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล และพบว่าในการหาปริมาณของกรดไขมันใน crude oil จะคำนวณในเทอมของกรดโอเลอิค โดยให้มวลโมเลกุลของกรดไขมันอิสระมีค่าเฉลี่ยเท่ากับมวลโมเลกุลของกรดโอเลอิค และการรายงานปริมาณของกรดไขมันอิสระสามารถรายงานในหน่วยมิลลิโมลหรือมิลลิกรัมต่อ 1 กรัมของน้ำมัน

1.5.2.2 **การวิเคราะห์กรดไขมันโดยโครมาโทกราฟีกาซ**(gas chromatography)

การวิเคราะห์กรดไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกาซพบว่าเป็นวิธีที่นิยมมาก โดยสารที่นำมาวิเคราะห์ต้องสามารถกลายเป็นไอ และผ่านเข้าสู่คอลัมน์โดยกาซตัวพา (carrier gas) โดยกรดไขมันที่วิเคราะห์ถูกแยกตามมวลโมเลกุลและจุดเดือดของกรดไขมัน โดยกรดไขมันที่มีมวลโมเลกุลน้อยและจุดเดือดต่ำออกมาก่อนกรดไขมันที่มีมวลโมเลกุลและจุดเดือดสูงกว่า และเพื่อความสะดวกในการวิเคราะห์สามารถเตรียมกรดไขมันให้อยู่ในรูปอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์กรดไขมัน (Ka-Shun,L., 1994) เนื่องจากจุดเดือดของอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์กรดไขมันต่ำกว่ากรดไขมัน ทำให้สามารถวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ธรรมดาได้

ในการเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมันสามารถทำการเตรียมให้อยู่ในรูปเอสเทอร์กรดไขมัน ไตรกลีเซอไรด์ สามารถการเตรียมเมธิลเอสเทอร์ได้หลายวิธี (Marie et al.,1961)คือ

1.การเตรียมเมธิลเอสเทอร์โดยการเกิปฏิกิริยากับ diazomethane

Ropper และ Ma (1957) ได้ทำการเตรียมเมธิลเอสเทอร์โดยนำกรดไขมันมาทำปฏิกิริยากับ diazomethane เรียกปฏิกิริยานี้ว่า diazomethanolysis โดยในการเกิดปฏิกิริยามีการเติมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 50% ลงไป พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการเตรียม

เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ และเป็นวิธีการเตรียมเมธิลเอสเทอร์ที่รวดเร็วมาก แต่พบว่ามีการสูญเสียเนื่องจากการเตรียมมาก ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ในปริมาณที่ต่ำ

2. การเตรียมเมธิลเอสเทอร์โดยใช้ Methanol-Hydrochloric acid with sublimation

Stoffed , Chu และ Ahrens (1958) ได้ทำการเตรียมเมธิลเอสเทอร์โดยการนำกรดไขมันมาละลายในเบนซินและ 5% กรดไฮโดรคลอริก แล้วเติมเมธานอล จากนั้นทำ reflux แล้วสกัดเอสเทอร์โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) แล้วทำให้เป็นกลาง กำจัดน้ำโดยใช้โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส-โซเดียมไบคาร์บอเนต

3. การเตรียมเมธิลเอสเทอร์โดยใช้ Methanol-Hydrochloric aicd บน Ion-exchange Resin

Hornstein และคณะ (1960) ได้นำกรดไขมันมาเตรียมเมธิลเอสเทอร์ โดยกรดไขมันถูกดูดซับบน Amberlite IRA และทำให้เป็นเมธิลเอสเทอร์บน resin ด้วย เมธานอล-กรดไฮโดรคลอริก และถูกชะออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์

4. การเตรียมเมธิลเอสเทอร์โดยใช้ Methanol-Borontrifluoride

Metealfe และ Schmitz (1961) ได้ทำการเตรียมเมธิลเอสเทอร์โดยใช้ เมธานอลโบรอนไตรฟลูออไรด์ โดยโบรอนไตรฟลูออไรด์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกิริยา methylation ด้วยเมธานอล และในการเกิดปฏิกิริยาให้ความร้อนในช่วงเวลาสั้น 2 นาที แล้วสกัดเมธิลเอสเทอร์โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์

การเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันขึ้นอยู่กับ molar ratio ระหว่างเมธานอลกับกรดไขมัน อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา โดยในการเตรียมเมธิลเอสเทอร์ใช้เมธานอลเป็นหลัก แล้วสกัดเอสเทอร์โดยใช้ตัวทำละลายได้แก่ n-pentane , n- hexane , iso-octane หรือ petroleum ether และในการสกัดเอสเทอร์ทำการสกัด 2 ครั้ง เพื่อที่สามารถสกัดเอสเทอร์ออกได้ทั้งหมด

การวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีกาซสามารถแยกและวิเคราะห์ได้ทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ (Eder, 1995) ในด้านคุณภาพอาศัยค่าเวลารีเทนชันและตำแหน่งของพีกเทียบกับสารมาตรฐาน ส่วนในด้านปริมาณใช้พื้นที่ใต้พีกของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้พบว่าเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเนื่องสามารถทำการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันได้อย่างถูกต้อง

1.6 จุดประสงค์การทดลอง

เนื่องจากการที่กรดอีรูซิคสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้หลายประเภท เช่น การประยุกต์ใช้ในด้านอาหาร เครื่องสำอางและยา เป็นสารที่ทำให้ไขมันแตกตัว (emulsifier) โดยเฉพาะที่นิยมใช้มากคือเป็นสารหล่อลื่นและน้ำมันไฮดรอลิก ดังนั้นจึงทำให้กรดอีรูซิคมีความสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมและทำให้กรดอีรูซิคมีราคาแพง และแหล่งที่พบกรดอีรูซิคมากคือเป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่ได้จากเมล็ดของพืชตระกูล *Brassica* วงศ์ *Cruciferae* โดยพบกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบสูงถึง 50% ดังนั้นหากแยกกรดอีรูซิค ออกจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดได้ง่ายและปริมาณมาก จะสามารถนำกรดอีรูซิคที่แยกได้ไปประยุกต์ใช้ได้ ในการวิจัยนี้จึงได้มีการประยุกต์เทคนิคในการย่อยสลายกรดไขมันโดยการใช้เอนไซม์ไลเปสจากที่มีการขายในทางการค้า และได้ทำการวิจัยผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารกากมัสตาร์ดเหลือทิ้งเพื่อนำไปย่อยน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด รวมทั้งนำดีเทอร์เจนต์มาเป็นตัวช่วยในการย่อยสลาย เพื่อเป็นการเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดของเอนไซม์ไลเปส จากนั้นได้พยายามหาเทคนิคในการแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันเจือปนอื่น เพื่อที่สามารถนำกรดอีรูซิคที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป และเป็นการเพิ่มมูลค่าของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด