บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

เชื้อราที่ทำลายเมล็ดข้าวหลังการเก็บเกี่ยว

เชื้อราที่พบบนเมล็ดข้าวหลังการเก็บเกี่ยวแล้ว แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ field fungi และ storage fungi แต่จะพบมากน้อยแค่ไหนนั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างซึ่งได้แก่ พันธุ์ข้าว วิธีการปลูก ฤดูปลูก และพื้นที่ปลูก สภาพแวดล้อมขณะทำการเก็บเกี่ยว การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวและสภาพของโรงเก็บรักษาเมล็ดข้าว field fungi เป็นเชื้อราที่ติดมาจากในไร่ ส่วนใหญ่เป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ ของข้าวในแปลงปลูก ซึ่งถ้าติดมาแล้วจะมีผลต่อคุณภาพของเมล็ดข้าวเปอร์เซ็นต์ความงอกและการเกิดโรคในระยะต้นกล้าของข้าว เชื้อราเหล่านี้ได้แก่ *Fusarium* spp., *Drechslera* spp., *Curvularia* spp., *Alternaria* spp. และ *Trichoconis padwickii* (อรุณี และคณะ, 2523; พากเพียร และคณะ, 2527; Gora *et al.*, 1987) ส่วน storage fungi เป็นกลุ่มเชื้อราซึ่งเข้าทำลายเมล็ดข้าวหลังเก็บเกี่ยวมาแล้วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงการเก็บรักษา เชื้อราเหล่านี้ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* และ *Mucor* (Neergaard, 1977) Raper และ Fennell(1965) ได้รายงานว่า *Aspergillus flavus* และ *A. glaucus* เป็นกลุ่มที่พบเข้าทำลายเมล็ดข้าวในโรงเก็บมากที่สุด ส่วนในญี่ปุ่นพบว่าเชื้อรา *Penicillium* เป็นเชื้อราที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรคของข้าวในโรงเก็บ (Tatsumo, 1963) เช่นเดียวกันกับ Sakufiwa(1988)ได้รายงานว่า เชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* เป็นกลุ่มเชื้อราหลักที่สร้างความเสียหายให้กับเมล็ดพืชในโรงเก็บมากที่สุด

เชื้อรา *Aspergillus* และกรดไขมันอิสระ(free fatty acid)

เมื่อเมล็ดข้าวที่เก็บไว้ในโรงเก็บถูกเชื้อราเข้าทำลายจะทำให้เมล็ดมีการเปลี่ยนทางสรีระวิทยาโดยปริมาณสารอาหารต่างๆที่อยู่ในเมล็ดจะมีลดลง ยกเว้นกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) จะมีการเพิ่มขึ้นเมื่อเมล็ดข้าวถูกเชื้อราเข้าทำลาย (Fujino *et al.* 1999) ซึ่งคล้ายกันกับที่ Christensen *et al.* (1969) ได้เคยรายงานไว้ว่าหากความชื้นเมล็ดในการเก็บรักษาสูงก็จะทำให้เกิดเชื้อราขึ้นบนเมล็ดส่งผลให้เกิดกลิ่นเหม็น และเมล็ดเกิดการเสื่อม เมล็ดก็จะสูญเสียความงอก แล้วยังทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณกรดไขมันอิสระนี้ปัจจุบันเรียกเป็นค่า fat acidity value(FAV) และใช้ค่าดังกล่าวเป็นดัชนีวัดการเสื่อมสภาพของเมล็ด สภาพที่เก็บรักษาและระยะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เวลาในการเก็บรักษาเมล็ดได้ ซึ่งจากการทดลองในการปลูกเชื้อรา *Aspergillus* ชนิดต่างๆ ลงบนข้าวโพดพบว่าค่า FAV ที่เกิดขึ้นหลังจากปลูกเชื้อราดังกล่าวมีดังต่อไปนี้ เชื้อรา *A. candidus* 74.8 units หลังจากปลูกเชื้อไป 4 สัปดาห์ *A. amstelodomi* 384 units หลังจากปลูกเชื้อ 2 สัปดาห์ และจะลดลงเหลือ 247.7 units เมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์ เชื้อรา *A. candidus* พบว่าจะให้ค่า FAV และสร้างความเสียหายมากกว่า *A. amstelodomi* และเชื้อราอีกชนิดหนึ่งคือ *A. niger* มี FAV 180.5 units หลังจาก 2 สัปดาห์ แต่จะลดลงเหลือ 129.0 units หลังจาก 4 สัปดาห์ผ่านไป นอกจากนี้ในการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium solitum, A. flavus, A. candidus* และ *A. amstelodomi* ในอาหาร cornmeal พบว่าเชื้อราทั้ง 4 ชนิด จะให้ค่า FAV ที่เพิ่มขึ้นตอนแรกแล้วจะลดลงในที่สุด ซึ่งจากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าค่า FAV จะแปรผันตามชนิดและระยะเวลาที่เชื้อราเจริญเติบโต

Christensen และ Dorworth (1966) ได้รายงานว่าถั่วเหลืองที่มีความชื้นต่ำกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานถึง 300-400 วันจะถูกเชื้อรา 2 กลุ่มเข้าทำลาย คือ กลุ่มเชื้อรา *Aspergillus glaucus* group และเชื้อรา *A. restrictus* group การเข้าทำลายของเชื้อราดังกล่าวทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเมล็ดลดลงมาก และพบว่าค่า FAV เพิ่มขึ้นด้วย ต่อมาในปี 1967 Christensen ได้รายงานผลการตรวจสอบถั่วเหลือง 8 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าในตอนแรกตรวจพบเชื้อรา *Aspergillus glaucus* group เพียง 5.7 เปอร์เซ็นต์ โดยพบเพียงชนิดเดียว หลังจากนั้นจึงนำเมล็ดถั่วเหลืองเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 และ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นเมล็ด 13 และ 15 เปอร์เซ็นต์ สุ่มตัวอย่างมาตรวจหาเชื้อราในโรงเก็บและค่า FAV ผลปรากฏว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ความชื้นเมล็ด 13 เปอร์เซ็นต์ ตรวจพบปริมาณเชื้อรา *Aspergillus glaucus* group 5 เปอร์เซ็นต์ ค่า FAV ค่อนข้างต่ำเมื่อเก็บเป็นเวลานาน 150-170 และ 480-500 วัน ส่วนเมล็ดถั่วเหลืองที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นเมล็ด 13 เปอร์เซ็นต์ นั้นพบปริมาณเชื้อราดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนและค่า FAV เพิ่มขึ้นในระยะเวลาที่เก็บ 150-170 วันและในช่วงหลังคือ 480-500 วัน พบเชื้อราเข้าทำลายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ค่า FAV พบมากถึง 37 units ส่วนในเมล็ดถั่วเหลืองที่เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ความชื้นเมล็ด 14 เปอร์เซ็นต์ ตรวจพบปริมาณเชื้อราดังกล่าวและค่า FAV เพิ่มขึ้นไม่มากนักเมื่อเก็บเป็นเวลานาน 150-170 และ 480-500 วัน แต่ในเมล็ดถั่วเหลืองที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นเมล็ด 14 เปอร์เซ็นต์นั้นตรวจพบเชื้อราดังกล่าวถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 150-170 วัน ค่า FAV สูงถึง 30 units และในระยะเวลาเก็บ 480-500 วัน เชื้อราดังกล่าว 100 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน ค่า FAV สูงถึง 63 units หลังจากนั้นในปี 1968 Dorworth และ Christensen ได้รายงานถึงผลของความชื้นเมล็ด อุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาถั่วเหลืองว่า มีผลทำให้การเปลี่ยนแปลงของเชื้อราที่เกิดขึ้น ความงอกของเมล็ดและปริมาณค่า FAV (fat acidity value) ที่เกิดขึ้นโดยการทดลองเก็บเมล็ดถั่วเหลืองไว้ที่ระดับความชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของเมล็ดต่าง ๆ กัน คือ 12.1, 14.7, 16.5 และ 18.3 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจสอบทุก 4 สัปดาห์ พบว่าค่า FAV ที่พบเพิ่มขึ้นอย่างไม่แน่นอน ดังนี้ ถั่วเหลืองที่เก็บไว้นาน 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นเมล็ด 16.5 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเชื้อรา *Aspergillus glaucus* เข้าทำลายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ความงอกไม่มีเลยและค่า FAV ที่วัดได้ 23.7 units ในขณะที่ระยะเวลาเก็บรักษานานเท่ากัน อุณหภูมิเดียวกัน แต่ความชื้นเริ่มต้น 18.3 เปอร์เซ็นต์ จะพบเชื้อรา *Penicillium* เข้าทำลายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *Aspergillus glaucus* 93 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดไม่มีการงอก แต่ค่า FAV วัดได้ 40 units ซึ่งไม่ได้สอดคล้องกับปริมาณเชื้อราที่ตรวจพบ

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมันและน้ำมัน

Chrastil (1993) ได้กล่าวว่าไขมันส่วนใหญ่ในข้าวจะอยู่ในชั้น aleurone layer หรือในส่วนของรำข้าว(bran) ซึ่งในระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดข้าว ไขมันและ/หรือ phospholipid จะถูก hydrolyzed และ/หรือ oxidized จะได้ free fatty acid และ/หรือ peroxides และสารประกอบ ไขมันดังกล่าวจะเป็นสาเหตุทำให้ความเป็นกรดเพิ่มสูงขึ้น เกิดการเสื่อมสภาพของเมล็ดทั้งในแง่ของรสชาติหรือกลิ่น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในขบวนการนี้มี enzyme หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง คือ lipases, lipoxidases, esterases, phospholipases และ phophatases เป็นต้น โดยปริมาณไขมันในข้าวนั้น Fujino *et al.*(1999) ได้กล่าวไว้ (ตารางที่ 1)

ส่วนปริมาณกรดไขมันอิสระนั้น ปราณี(2534)ได้กล่าวว่ามีส่วนประกอบดังนี้กรดปาล์มิติดและสเตียริค 13.0 % กรดโอเลอิค 52.0 % และ กรดไลโนเลอิค 35.0 % และยังได้กล่าวอีกว่าจุลินทรีย์จำพวกเชื้อราเมื่อเข้าทำลายเมล็ดพืชแล้วจะมีการสร้างเอนไซม์ที่ชื่อว่า lipases ขึ้นมาซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะเป็นสาเหตุทำให้เมล็ดเกิดการเหม็นหืนซึ่งสอดคล้องกันกับที่ Magan และ Evans (2000) รายงานไว้ว่าเอนไซม์ lipases ที่ผลิตโดยเชื้อราในโรงเก็บสามารถที่จะย่อย lipid แล้วผลลัพธ์ที่ได้คือ กรดไขมันอิสระ และเมื่อกรดไขมันอิสระเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นแล้ว ก็จะทำให้เกิดสารประกอบต่าง ๆ ดังนี้ คือ lactones, esters, aldehydes และ alcohol เป็นต้น เช่นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ของกรดไขมันอิสระที่ชื่อ linoleic แล้วได้ 1-octen-3-ol ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 สัดส่วนของไขมันในเมล็ดข้าว

ชนิดของไขมัน	เปอร์เซ็นต์ไขมัน
ปริมาณไขมันทั้งหมด	2.9-3.4
สัดส่วนของไขมันชนิดต่าง ๆ	
Neutral lipid	85-87
Triglyceride	69-71
Phospholipid	8-9
Glycolipid	4-6
Fatty acid	6-7
Acylglycosylsterol	2-3
Glycosylsterol	<1
Diglycosyldiglyceride	<1
Phosphotidylcholine	4
Phosphotidylethanolamine	3-4
Lysophosphatidylcholine	-
Lysophosphatidylethanolamine	<1
อื่น ๆ	8-11

ที่มา : Fujino *et al.*, 1999

กรดไขมัน(Fatty Acids)

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์สายตรงที่มีหมู่คาร์บอกซิล 1 หมู่ (straight chain aliphatic monocarboxylic acid) ในธรรมชาติจะพบกรดไขมันเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ที่อยู่ในไขมัน น้ำมัน และฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride) เป็นส่วนใหญ่ ที่พบในรูปของกรดไขมันอิสระมีน้อยมากพันธะระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลของกรดไขมันมีทั้งที่เป็นพันธะเดี่ยวและพันธะคู่ กรดไขมันที่มีพันธะเดี่ยวทั้งหมดเรียกว่า กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acids) ส่วนกรดไขมันที่มีพันธะคู่ 1 อัน หรือมากกว่า 1 อันเรียกว่า กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) (นิธิยา, 2539)

ในการสกัดน้ำมันในพืชนั้น นิธิยา (2541) กล่าวว่าการสกัดไขมันหรือน้ำมันออกจากวัตถุดิบด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก ใช้สกัดน้ำมันออกจากเมล็ดพืชที่มีปริมาณน้ำมันต่ำหรือสกัดจากกากที่เหลือจากการบีบด้วยเครื่องอัด ตัวทำละลายที่ใช้จะต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ได้แก่ เฮกเซน(n-hexane) คาร์บอนไดซัลไฟด์(carbon disulphide) และไดเอธิลอีเทอร์ (diethylether)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ เฮกเซน วิธีการสกัดทำได้โดยให้ตัวทำละลายไหลซึมผ่านเมล็ดที่บดละเอียด น้ำมันที่อยู่ในเมล็ดจะละลายออกมากับตัวทำละลาย เมื่อน้ำมันละลายออกมาหมดแล้วนำไปกลั่นแยกเอาตัวทำละลายออก สารละลายของน้ำมันในตัวทำละลายบางทีเรียกว่า miscella การใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายจะได้ปริมาณน้ำมันสูงกว่าวิธีอื่น เมล็ดพืชบางชนิดใช้วิธีการบีบร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย อย่างไรก็ดีการสกัดด้วยตัวทำละลายจะเสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีอื่น ๆ เพราะตัวทำละลายมีราคาแพง ถึงแม้จะกลั่นแยกเอาตัวทำละลายกลับมาใช้ได้อีกก็ตาม แต่ก็มีบางส่วนที่ระเหยหายไปด้วย น้ำมันที่ได้ออกมาเป็นน้ำมันที่ไม่บริสุทธิ์ เรียกว่า crude oil มักมีสารประกอบต่าง ๆปนอยู่มากมาย ต้องนำไปผ่านกระบวนการทำให้น้ำมันบริสุทธิ์ต่อไป ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการสกัดไขมันและน้ำมันได้แก่

1. ปริมาณของตัวทำละลาย ถ้าใช้ปริมาณตัวทำละลายในการสกัดมาก จะทำให้สกัดน้ำมันออกมาได้มากและมีน้ำมันเหลืออยู่ในกากน้อย แต่ถ้าใช้ตัวทำละลายมากก็ต้องใช้เวลานานในการกลั่นแยกเอาตัวทำละลายออก ทำให้สูญเสียตัวทำละลายที่ระเหยออกไปมากขึ้นด้วย ดังนั้นตัวทำละลายที่ใช้ควรมีปริมาณที่เหมาะสม โดยปกติการสกัดน้ำมันจากเมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดนุ่น และเมล็ดฝ้าย จะใช้ตัวทำละลายต่อน้ำหนักของเมล็ดพืชที่สกัดในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง

2.ชนิดของตัวทำละลาย ตัวทำละลายหลายชนิดที่ใช้ในการสกัดน้ำมันได้และตัวทำละลายแต่ละชนิดจะมีสมบัติแตกต่างกันออกไป ต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิดของเมล็ดพืชและไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุด คือ เฮกเซน

3. อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด การสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 60 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยทำให้น้ำมันละลายออกมาจากเมล็ดพืชได้ง่าย

4. ความหนาของแผ่นเมล็ดพืชอัด เมล็ดพืชก่อนมาสกัด จะถูกบดให้แตกเป็นชิ้นเล็ก ๆ อัดให้เป็นแผ่น แล้วปล่อยให้ตัวทำละลายไหลซึมเข้าไปสัมผัสกับแผ่นเมล็ดพืชอัด ถ้าเมล็ดพืชถูกบดให้ละเอียดเกินไปจะอัดกันแน่น ตัวทำละลายจะซึมผ่านเข้าไปได้ยาก ความหนาของแผ่นเมล็ดถั่วเหลืองที่เหมาะสมประมาณ 0.014 นิ้ว

5. ความชื้นของเมล็ดพืช เมล็ดพืชที่นำมาสกัดน้ำมันควรมีความชื้นไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ และตัวทำละลายจะต้องไม่มีน้ำหรือความชื้นปนอยู่เพราะจะทำให้สกัดน้ำมันออกได้ยาก

6. เวลาที่ใช้ในการสกัด การสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลาย ต้องใช้เวลานานพอสมควรเพื่อให้ตัวทำละลายสามารถสกัดเอาน้ำมันออกมาให้ได้มากที่สุดโดยทั่วๆไปจะใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง โดยทั่ว ๆ ไปแล้วไขมันและน้ำมันที่มีอยู่ในพืชน้ำมันมีสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ แต่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์(petroleum ether) ไดเอธิลอีเทอร์ คาร์บอนเตตระคลอไรด์(carbontetrachloride) คลอโรฟอร์ม(chloroform) และเฮกเซน เป็นต้น จึงต้องสกัดไขมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และน้ำมันออกจากพืชด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออก ไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายนี้ เรียกว่า crude fat หรือ crude oil ดังที่กล่าวข้างต้น ถ้าใช้ตัวทำละลายที่เป็นอีเทอร์ อาจเรียกว่า ether extract ก็ได้ สารที่สกัดได้ทั้งหมดนอกจากมีไขมันและน้ำมันซึ่งเป็นไตรกลีเซอร์ไรด์แล้ว ยังอาจมีไขหรือแวกซ์(wax) สารสี ไฮโดรคาร์บอนสเตอรอยด์ (hydrocarbonsteroid) และกรดไขมันอิสระปนออกมาด้วย ซึ่งปริมาณไขมันและน้ำมันในอาหารแต่ละชนิดจะผันแปรเป็นช่วงกว้าง เช่น ผัก และผลไม้ส่วนใหญ่มีไขมันต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นอะโวคาโดมีไขมัน 26 เปอร์เซ็นต์ มะกอกมีน้ำมัน 17 เปอร์เซ็นต์ น้ำนมมีไขมัน 3.6 เปอร์เซ็นต์ เนยมีไขมันนม 82 เปอร์เซ็นต์ และพวกนัทต่าง ๆ มีไขมันและน้ำมันประมาณ 35-70 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น วิธีการสกัดไขมันและน้ำมันทำได้ดังนี้

1. **วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย** เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันและน้ำมันโดยวิธี gravimetric มีขั้นตอนดังนี้ (อ้างโดย ลักขณา และนิธิยา, 2531)
   - บดตัวอย่างอาหารให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน อาจร่อนผ่านตะแกรงเพื่อให้อนุภาคมีขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งจะทำให้สกัดไขมันออกได้ง่ายขึ้น
   - ชั่งตัวอย่างอาหารที่ผ่านการอบแห้ง (ปราศจากน้ำ) มา 3 กรัม ใส่ในฟลาส์คขนาด 125 มิลลิลิตรที่มีจุกปิดได้ (ถ้าตัวอย่างอาหารเป็นของเหลวใช้ separating flask) เติมตัวทำละลายเช่น อีเธอร์ลงไป 30 มิลลิลิตร ปิดจุก เขย่าให้เข้ากันประมาณ 30 นาที
   - กรองของเหลวผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่พับเป็นจีบ (pleated) ใส่ลงใน evaporating disk ที่สะอาด ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแล้ว
   - นำกากที่เหลือบนกระดาษกรองใส่คืนลงในฟลาส์ค สกัดซ้ำอีก 2-3 ครั้ง และล้างฟลาส์คด้วยตัวทำละลายเพียงเล็กน้อย
   - นำ evaporating disk ไปวางบน water bath หรือปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ตัวทำละลายระเหยออกไป แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 98-105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที ปล่อยให้เย็นใน descicator
   - ชั่งหาน้ำหนักไขมันหรือน้ำที่สกัดได้ = a กรัม
   - คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ crude fat หรือ crude oil ในตัวอย่างอาหาร

วิธีคำนวณ ตัวอย่างอาหาร 3 กรัม มี crude fat = a กรัม

" 100 " " = $\frac{a}{3}$ x 100 กรัม

$$\% \text{ crude fat} = \frac{\text{น้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างอาหารแห้งที่ใช้ (กรัม)}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. วิธีการสกัดโดยใช้ Soxhlet (อ้างโดย ลักขณา และนิธิยา, 2531)

- ชั่งตัวอย่างอาหารที่บดละเอียดและผ่านการอบแห้งจำนวน 10 กรัม ใส่ลงใน Soxhlet thimble ปิดด้านบนด้วยสำลี (หรืออาจใช้วิธีการห่อตัวอย่างอาหารด้วยกระดาษกรองก็ได้)
- ชั่งน้ำหนัก thimble ทั้งหมด
- นำ thimble ใส่ลงในชุดสกัดแบบ Soxhlet
- นำฟลาส์คสกัดไปชั่งน้ำหนักก่อนเติมตัวทำละลายลงไป
- เติมตัวทำละลายลงไปประมาณ 30-50 มิลลิลิตร (ปิโตรเลียมอีเทอร์จุดเดือด 50-70 องศาเซลเซียส)
- สกัดนาน 2 ชั่วโมง แล้วกลั่นไล่เอาตัวทำละลายออกจนหมด นำฟลาส์คไปชั่งหาน้ำหนักของไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้ ส่วน thimble นำไปอบให้แห้ง แล้วชั่งหาน้ำหนักที่หายไปซึ่งจะเท่ากับน้ำหนักของไขมันหรือน้ำมันที่ถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลาย
- เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของไขมันและน้ำมันในตัวอย่างอาหารดังกล่าวในข้อ 1.

การใช้ตัวทำละลายชนิดที่ไม่มีโพลาร์หรือมีโพลาร์ต่ำ เช่น ปิโตรเลียมอีเธอร์และไดเอธิลอีเทอร์จะสกัดได้เฉพาะลิปิดอิสระ(free lipid)เท่านั้น ส่วนลิปิดที่จับอยู่กับโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เช่น ฟอสโฟลิปิด(phospholipid)หรือกลัยโคลิปิด(glycolipid) ต้องสกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นโพลาร์(polar) ดังนั้นปริมาณของลิปิดที่สกัดได้อาจทำการไฮโดรไลซ์ด้วยสารเคมีชนิดอื่นเพื่อทำลายพันธะเสียก่อนก็ได้ ดังนั้นปริมาณของลิปิดที่สกัดได้อาจผันแปรไปตามวิธีการสกัดไขมันและน้ำมันที่ใช้ และรูปของไขมันและน้ำมันที่อยู่ในอาหารที่นำมาวิเคราะห์ วิธีการที่ดี คือ ใช้ตัวทำละลายชนิดโพลาร์ผสมกับชนิดไม่มีโพลาร์ เช่น ใช้คลอโรฟอร์มผสมกับเมธานอล(methanol) ในอัตราส่วน 2:1 เป็นต้น แต่มีข้อเสีย คือ จะสกัดได้น้ำและสารที่ละลายได้ในน้ำปนออกมาด้วย ดังนั้นเมื่อระเหยไล่ตัวทำละลายออกไปหมดแล้วต้องเติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous sodiumsulphate)ลงไปช่วยดูดน้ำออกและสกัดไขมันและน้ำมันซ้ำด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์อีกครั้งหนึ่ง เมธิลีนคลอไรด์(methylenechloride)สามารถนำมาใช้ผสมกับเมธานอลแทนการใช้คลอโรฟอร์มให้ผลในการสกัดไขมันและน้ำมันในอาหารได้ดีเช่นเดียวกัน ในกรณีที่อาหารมีน้ำปนอยู่ อาจกำจัดน้ำออกได้โดยการบดตัวอย่างอาหารด้วย แคลเซียมซัลเฟต(calcium sulphate)หรือแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต แล้วจึงนำไปใส่ใน soxhlet thimble ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมือที่ใช้สกัดไขมันได้รวดเร็วและให้ผลถูกต้องออกมาจำหน่าย ตัวอย่างเช่น Foss-Let Fat Analyser เป็นเครื่องมือที่ออกแบบขึ้นมาเพื่อใช้สกัดน้ำมันจากพืชน้ำมัน และ Tecator Soxtec Apparatus เป็นเครื่องมือสกัดชนิด semi-automatic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้ ลักขณา และนิธิยา(2531) ยังได้กล่าวอีกว่าในการวิเคราะห์ไขมันในธัญพืช เช่น ในแป้งข้าวสาลีสามารถวิเคราะห์ได้โดยการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ หรือไดเอธิลอีเทอร์หลังจากทำไฮโดรไลซิสด้วยกรดแล้ว ปริมาณไขมันที่สกัดได้จะผันแปรขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดด้วย ปริมาณไขมันที่ได้จากการสกัดโดยตรงเป็นไขมันอิสระ(free fat) เท่านั้น ส่วนในข้าวนั้น Juliano(1985) ได้กล่าวว่าโดยทั่ว ๆ ไปไขมันในข้าวจะอยู่ในรูปของ nonstarch lipid ซึ่งการสกัดเอา nonstarch lipid จากข้าวนั้น จะใช้ตัวทำละลายที่เป็นแบบ nonpolar solvent อย่างเช่น ไดเอธิลอีเทอร์ ปิโตรเลียมอีเทอร์ และ คลอโรฟอร์ม:เมธานอล (2:1, v/v) หลังจากนั้นจึงสกัดซ้ำด้วย water-saturated butanol (WSB) นาน 30-60 นาที ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส จากนั้นเม็ดแป้งจะถูกย่อยและปล่อย starch lipid ออกมาผสมกับ nonstarch lipid ในสารละลาย WSB แต่ในข้าวที่สีแล้วจะมีส่วนของ lipid ที่อยู่ในรูปของสารประกอบ protein ซึ่งประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ของไขมันจะอยู่ในรูปของสาร nonstarch lipid และประมาณ 84 เปอร์เซ็นต์จะสกัดได้โดยใช้ คลอโรฟอร์ม:เมธานอล (2:1, v/v) นาน 8 ชั่วโมง ดังที่กล่าวแล้ว และอีก 11 เปอร์เซ็นต์ที่เหลือสกัดได้โดยใช้ WSB ที่เย็น โดยจะใช้เวลาในการสกัดนาน 5 นาที

การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด Acid Value (A.V.) หรือกรดไขมันอิสระ Free Fatty Acid (FFA)
(อ้างโดย ลักขณา และนิธิยา, 2531)

Acid value ของไขมันหรือน้ำมัน คือจำนวนมิลลิกรัมของโปแตสเซี่ยมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมัน 1 กรัม เป็นกลางพอดี ผลการทดลองอาจจะคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันอิสระได้ค่า Acid value ที่วิเคราะห์ได้ ใช้เป็นตัวชี้บ่งว่าไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมันถูกทำลายด้วยเอนไซม์ไลเปสเป็นกรดไขมันอิสระมากน้อยเพียงใด ถ้าค่า A.V. สูงแสดงว่าไตรกลีเซอไรด์ถูกทำลายได้เป็นกรดไขมันอิสระมาก แสดงว่ามีการหืนชนิด hydrolytic rancidity เกิดขึ้นแก่ไขมันหรือน้ำมันนั้น ความร้อนและแสงช่วยให้การหืนเกิดขึ้นได้เร็วขึ้น

วิธีทำ เตรียมตัวทำละลายโดยใช้ไดเอธิลอีเทอร์ 25 มิลลิลิตร รวมกับเอธิลแอกอฮอล์ 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1 มิลลิลิตร ค่อย ๆ ไตเตรตตัวทำละลายผสมให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ (ใช้ด่างประมาณ 2-3 หยด)

ชั่งน้ำมันตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักแน่นอน (ใช้ประมาณ 2-5 กรัม) ใส่ในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่แห้งสนิท เทตัวทำละลายผสมที่เป็นกลางลงไปละลายน้ำมันตัวอย่าง ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ เขย่าขณะทำการไตเตรต จนกระทั่งได้สีชมพู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งคงตัวนาน 15 วินาที จดปริมาตรของด่างที่ใช้ การไตเตรตไม่ควรใช้สารละลายด่างเกิน 10 มิลลิลิตร ถ้าใช้มากกว่า 10 มิลลิลิตร ต้องทำการทดลองใหม่ โดยใช้น้ำมันตัวอย่างให้น้อยลง

วิธีคำนวณ $\text{Acid value} = \frac{V \times 5.61}{W}$

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ที่ใช้

W = น้ำหนักของน้ำมันตัวอย่างที่ใช้

ถ้าต้องการคำนวณเป็นปริมาณของกรดไขมันอิสระ ให้คำนวณอยู่ในรูปของเปอร์เซ็นต์กรดปาล์มิติค(palmetic acid)ใช้กับน้ำมันปาล์ม หรือกรดลอริค(louric acid)ใช้กับน้ำมันมะพร้าวและน้ำมัน palm-kernel หรือกรดโอเลอิค (oleic acid)ใช้กับน้ำมันอื่น ๆ คำนวณได้จากค่ามาตรฐานดังนี้

1 มิลลิลิตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับกรดโอเลอิค 0.0282 กรัม หรือกรดปาล์มิติค 0.0256 กรัม หรือกรดลอริค 0.0200 กรัม

โดยปกติน้ำมันจะมีปริมาณกรดไขมันอิสระประมาณ 0.5-1.5 เปอร์เซ็นต์ ในรูปของกรดโอเลอิค

การหาปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันพืช ยังสามารถวัดได้โดยใช้ colorimeter โดยใช้เบนซิน (benzene) สกัดกรดไขมันอิสระออกมา แล้วนำมาเขย่ากับสารละลาย copper acetate กรดไขมันอิสระจะทำปฏิกิริยากับทองแดงได้เป็นสีน้ำเงินในชั้นของเบนซิน ซึ่งวัดความเข้มข้นของสีได้ที่ความยาวคลื่น 640-690 นาโนเมตร เปรียบเทียบโดยใช้กรดโอเลอิคที่ทราบปริมาณแน่นอนเป็นมาตรฐาน (ลักขณา และนิธิยา, 2531)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved