การสกัด การทำให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลจากไขรำข้าวของไทย

จิราภรณ์ พึ่งธรรม [1] กรณ์กนก อายุสุข [2] คณิศา กิตติรัตนไพบูลย์ [3]
นฤมล จียโชค [4] และ คณิต กฤษณังกูร [4]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

บทคัดย่อ

โพลิโคซานอล (policosanol) คือกลุ่มของแอลกอฮอล์สายตรงยาวที่มีความยาวคาร์บอน 20-36 อะตอม พบในไขจากสัตว์และพืชบางชนิด เช่น ไขจากผึ้ง รำข้าว อ้อย ข้าวโอ๊ต และข้าวสาลี เป็นต้น มีคุณสมบัติช่วยลดการจับตัวของเกล็ดเลือด ลดอันตรายต่อเยื่อบุหลอดเลือด ลดการสร้างโฟมเซลล์ และลดโคเลสเตอรอลในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ตับ หัวใจ และเนื้อเยื่อไขมันได้ ไขรำข้าวเป็นแหล่งโพลิโคซานอลอีกชนิดที่มีราคาถูก แต่ยังไม่มีการศึกษาการสกัดโพลิโคซานอลในประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการเพิ่มมูลค่าของไขรำข้าวที่ได้จากการผลิตน้ำมันรำข้าวของประเทศไทย โดยการนำไปสกัดโพลิโคซานอล เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของไขรำข้าวของไทยพบว่าประกอบด้วย น้ำมันร้อยละ 55.91 แวกซ์เอสเทอร์ร้อยละ 40.67 ไขมันแอลกอฮอล์อิสระสายยาวร้อยละ 2.56 และอื่นๆ ร้อยละ 1.86 จากนั้นนำไขรำข้าวที่ผ่านการเร่งปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชันมาสกัดและเลือกสกัดด้วยตัวทำละลาย เมื่อนำโพลิโคซานอลที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบและความบริสุทธิ์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) และโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าโพลิโคซานอลที่ได้ประกอบด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความยาวอยู่ในช่วง 16-36 อะตอม โดยองค์ประกอบหลักที่ละลายในโทลูอีน ไอโซออกเทน และส่วนตกตะกอนจากไอโซออกเทนได้แก่ไขมันแอลกอฮอล์ที่มีความยาว C_{26} (ร้อยละ 21.4), C_{24} (ร้อยละ 29.5) และ C_{30} (ร้อยละ 33.1) ที่ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 94 โดยไขรำข้าวของไทยสามารถสกัดโพลิโคซานอลได้ปริมาณสุทธิร้อยละ 26.56

คำสำคัญ : การทำให้บริสุทธิ์ / การสกัดด้วยตัวทำละลาย / ไขมันแอลกอฮอล์สายยาว / ไขรำข้าว / โพลิโคซานอล / สปอนนิฟิเคชัน

---

[1] *นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[2] *อาจารย์ประจำ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[3] *นักวิจัย สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[4] *รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

Extraction Purification and Characterization of Policosanol from Thai Rice Bran Wax

Jiraporn Puengtham [1], Kornkanok Aryusuk [2], Kanisa Kittiratanapiboon [3], Narumon Jeyashoke [4], and Kanit Krisnangkura [4]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Takham, Bangkhuntien, Bangkok 10150

Abstract

Policosanol is a mixture of long chain aliphatic alcohols of 20-36 carbon atoms. It is a constituent of animal and plant waxes such as beeswax, rice bran, sugar cane, oat and wheat. Policosanol can be used to reduce platelet aggregation, endothelial damage, foam cell formation and cholesterol content in different tissues such as liver, heart and fatty tissue. Rice bran wax is a good source of policosanol. It is cheap but there has been no research about policosanol in Thailand. Thus, the objective of this research is to increase the value added of Thai rice bran wax which is a by product from rice bran oil refinery. The wax contained 55.91% oil, 40.67% wax ester, 2.56% free long chain fatty alcohol and 1.86% unidentified matter. After saponification, policosanol was selectively extracted into the organic solvent. The composition and purity of policosanol were analyzed by gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The obtained policosanol consisted of alcohols of 16-36 carbon atoms. The main composition of policosanol extracted by toluene, isooctane and the precipitate from the isooctane extract were fatty alcohol of C_{26} (21.4%), C_{24} (29.5%) and C_{30} (33.1%) with the purity over than 94%. The yield of policosanol from Thai rice bran wax is 26.56%.

Keywords : Purification / Solvent Extraction / Long Chain Fatty Alcohol / Rice Bran Wax / Policosanol / Saponification

[1] *Graduated Student, Biochemical Technology Program, School of Bioresources and Technology.*

[2] *Lecturer, Biochemical Technology Program, School of Bioresources and Technology.*

[3] *Researcher, Biochemical Technology Program, School of Bioresources and Technology.*

[4] *Associated Professor, Biochemical Technology Program, School of Bioresources and Technology.*

1. บทนำ

โพลิโคซานอล (policosanol) คือกลุ่มของแอลกอฮอล์สายตรงยาว (long chain aliphatic alcohols) ที่มีความยาวคาร์บอน 20-36 อะตอม [1] พบในไขจากสัตว์และพืชบางชนิด เช่น ไขจากผึ้ง รำข้าว อ้อย ข้าวโอ๊ต และข้าวสาลี เป็นต้น โดยปริมาณและองค์ประกอบของโพลิโคซานอลในไขแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาสกัด เช่นไขอ้อยมีโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 24-34 อะตอม โดยมีออกตะโคซานอล (octacosanol ; C_{28}) มากที่สุด 66% [2] ส่วนในไขผึ้งพบโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 18-34 อะตอม โดยมีไตรอคอนทานอล (triacontanol ; C_{30}) มากที่สุด 30.2% เป็นต้น [3]

มีการศึกษาประโยชน์ของโพลิโคซานอลพบว่าสามารถลดโคเลสเตอรอลในเลือดได้ โดยการบริโภคโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 24-34 อะตอม 5-20 มิลลิกรัม/วัน สามารถลดโคเลสเตอรอลที่ไม่ดี (Low Density Lipoprotein Cholesterol; LDL-C) ได้ 21-29% ในขณะที่มีโคเลสเตอรอลที่ดี (High Density Lipoprotein Cholesterol ; HDL-C) เพิ่มขึ้น 8-15% [4] นอกจากนี้มีรายงานว่าโพลิโคซานอลสามารถป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ [5] ช่วยยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลและเพิ่มการย่อยสลาย LDL [6] ลดการรวมตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) ลดอันตรายของเยื่อบุหลอดเลือด (endothelial damage) และลดการสร้างโฟมเซลล์ [7, 8] ส่วนทางด้านความปลอดภัยนั้นพบว่าการให้โพลิโคซานอลไม่มีพิษต่อยีนทั้งในเซลล์ร่างกายและเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต [9]

จากประโยชน์ที่กล่าวมาข้างต้นจึงมีการนำโพลิโคซานอลไปใช้เป็นยา และองค์ประกอบในอาหารเสริมหลายชนิด ส่งผลให้มีการผลิตโพลิโคซานอลเพื่อการค้า โดยส่วนใหญ่สกัดจากไขอ้อยและไขผึ้ง แต่เนื่องจากความต้องการโพลิโคซานอลที่เพิ่มจึงทำให้มีการหาแหล่งวัตถุดิบชนิดอื่นๆ รวมทั้งพยายามพัฒนากระบวนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการในปัจจุบัน ซึ่งการสกัดโพลิโคซานอลจากไขชนิดต่างๆ นั้นอาจแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนหลักคือ การสกัด (extraction) โพลิโคซานอลออกจากพันธะเอสเทอร์ของไขซึ่งจะได้โพลิโคซานอลและกรดไขมัน ส่วนขั้นที่สองคือการทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์ (purification) ด้วยการแยกโพลิโคซานอลออกจากกรดไขมัน

ขั้นตอนการสกัดนั้น ส่วนใหญ่จะนำไขมาสปอนนิไฟด์ (saponified) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ในตัวทำละลายต่างๆ เช่น เฮพเทน อะซีโตน โทลูอีน เบนซีน เมทานอล และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น โดยใช้เวลาและอุณหภูมิแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ เช่น การนำไขอ้อย ไขผึ้ง และส่วนต่างๆ ของเมล็ดพืชมาสปอนนิไฟด์ด้วย 1 N NaOH ในเมทานอล รีฟรักซ์ 30-45 นาที [1, 10] Gamble และคณะ [11] นำไขผึ้งมาหลอมที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 10.7 M KOH เพื่อสปอนนิไฟด์ โดยกวนที่ 40-100 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วน Vali และคณะ [12] สปอนนิไฟด์ไขรำข้าว 0.5 กรัมด้วย 30% KOH ในไอโซโพรพานอล ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในขณะที่ Chen และคณะ [13] สปอนนิไฟด์ไขรำข้าวด้วย 0.2% KOH ในบิวทานอล เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เป็นต้น

สำหรับการทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์นั้น ทำได้ยากและปัจจุบันยังมีปัญหาในเรื่องของปริมาณและความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลที่ได้ ทำให้มีวิธีการทำให้บริสุทธิ์แตกต่างกันไป แต่ส่วนใหญ่มักนิยมนำตัวอย่างที่สปอนนิไฟด์แล้วมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เพื่อแยกโพลิโคซานอลออกจากกรดไขมัน เช่นการใช้ไดเอทิลอีเทอร์ในการสกัดโดยสกัดซ้ำ 3 ครั้ง [1, 10] Vali และคณะ [12] สกัดโพลิโคซานอลโดยใช้เอทิลอะซิเตท กวนที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วน Chen และคณะ [13] สกัดด้วยเอทานอลที่ 70 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งใช้การกลั่น (molecular distillation) ในการทำให้ ออกตะโคซานอลบริสุทธิ์ เป็นต้น

การใช้ตัวทำละลายร่วมกับการตกผลึกเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์มากขึ้น โดย Gamble และคณะ [11] นำไขผึ้งที่ผ่านการสปอนนิไฟด์มาสกัดด้วยอะซิโตนที่ 50-60 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งกวนเป็นเวลา 3-7 ชั่วโมง จากนั้นลดอุณหภูมิลงที่ 2 ถึง -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง เพื่อให้โพลิโคซานอลตกตะกอน

และนำไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเฮพเทนและอะซิโตน จะได้โพลิโคซานอลที่มีความบริสุทธิ์ 80-99% เช่นเดียวกับ Empie และคณะ [14] ที่แยกโพลิโคซานอลออกจากวัตถุดิบซึ่งอยู่ในรูปของแข็งโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (solid-liquid extraction) ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง และตกผลึกอีกครั้งโดยใช้ตัวทำละลายจะได้โพลิโคซานอลที่มีความบริสุทธิ์ประมาณ 50-90%

นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นๆ ที่พยายามลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และพยายามนำเทคโนโลยีอื่นๆ มาประยุกต์ใช้ในการสกัดและทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์ เช่น การใช้คาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide) แทนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส (metanolysis) เพื่อแยกแอลกอฮอล์สายยาวออกจากไขผึ้งโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึง (Novozyme 435) [15] รวมทั้งมีการใช้อัลตราซาวด์ที่ความเข้มสูง (high-intensity ultrasound ; HIU) ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไขรำข้าว 5 กรัมที่เติม 0.2 M KOH (ในน้ำ : เมทานอล, 3 : 1) 50 มิลลิลิตร ภายในเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether ; PE) แล้วทำให้บริสุทธิ์บนคอลัมน์ซิลิกาเจล (silica gel) โดยใช้ PE เป็นตัวชะ (eluent) [16]

ไขรำข้าว (rice bran wax) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันรำข้าวในขั้นตอนการกำจัดไข (dewaxing/winterization) เป็นวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจมากขึ้นในระยะที่ผ่านมา เพราะเป็นแหล่งของโพลิโคซานอลที่สำคัญและมีราคาถูก ไขรำข้าวมีลักษณะเป็นของแข็ง แห้ง เป็นผลึกเล็กน้อย มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงเข้ม ปริมาณและองค์ประกอบของโพลิโคซานอลในไขรำข้าวอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยด้านการเพาะปลูก กระบวนการผลิต และสภาวะในการสกัด ปกติน้ำมันรำข้าวมีไขอยู่ 2-4% แต่บางครั้งอาจสูงถึง 8% [17] ไขรำข้าวประกอบด้วยแวกซ์เอสเทอร์ (wax ester) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัว C_{16}-C_{26} กับไขมันแอลกอฮอล์อิ่มตัว C_{24}-C_{34} [18, 19] น้ำมัน (triglyceride) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) และไขมันแอลกอฮอล์อิสระสายยาว

ไขรำข้าวสามารถใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เป็นสารเคลือบผัก ผลไม้ ยาอม ลูกกวาดหรือหมากฝรั่ง เป็นส่วนประกอบในการผลิตเครื่องสำอาง สารขัดเงา กระดาษห่อช็อคโกแลต และกระดาษคาร์บอน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การนำไขรำข้าวมาใช้ประโยชน์มักทำในต่างประเทศ โดยเฉพาะการสกัดโพลิโคซานอลจากไขรำข้าว ทั้งๆ ที่ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวเพื่อการส่งออกที่ใหญ่ที่สุดในโลกและมีโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวอยู่หลายแหล่ง แต่การนำไขรำข้าวมาใช้ประโยชน์กลับไม่มากเท่าที่ควร ส่วนใหญ่มักขายเป็นเชื้อเพลิงหรือวัตถุดิบเพื่อการผลิตในราคาเพียงกิโลกรัมละ 20 บาทเท่านั้น ดังนั้นหากสามารถสกัด โพลิโคซานอลจากไขรำข้าวในประเทศไทยได้จะช่วยเพิ่มมูลค่าของไขรำข้าวให้มากขึ้น

สำหรับโพลิโคซานอลจากไขรำข้าวที่ศึกษาในต่างประเทศพบว่ามีปริมาณ และองค์ประกอบแตกต่างกัน เช่น Stuchlik และ Zak [2] รายงานว่าโพลิโคซานอลที่พบในไขรำข้าวมีความยาวคาร์บอน 22-36 อะตอม โดยมีไตรอคอนทานอลมากที่สุด 30% เช่นเดียวกับ Vali และคณะ [12] ที่พบ ไตรอคอนทานอลมากที่สุด 24-27% โดยมีโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 22-40 อะตอม ส่วน Bianchi และคณะ [18] พบโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 22-30 อะตอม โดยมีเตตระโคซานอล (tetracosanol ; C_{24}) มากที่สุด 43% เป็นต้น การที่โพลิโคซานอลจากไขรำข้าวมีความแตกต่างกันนั้นอาจเนื่องจากความแตกต่างของไขที่ใช้ วิธีการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาหรือสกัดโพลิโคซานอลจากไขรำข้าวที่ผลิตในประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องเริ่มจากการศึกษาองค์ประกอบของไขรำข้าวเสียก่อน จากนั้นจึงหาวิธีการสกัดและการทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์ รวมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบและหาปริมาณของโพลิโคซานอลที่ได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสกัดโพลิโคซานอล จากไขรำข้าวในประเทศไทยในเชิงการค้าต่อไป

3. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 สารเคมี

โทลูอีน (toluene ; $C_6H_5CH_3$) คลอโรฟอร์ม (chloroform ; $CHCl_3$) ไอโซออกเทน (isooctane ;

$(CH_3)_2CHCH_2C(CH_3)_3$) กรดอะซิติก (acetic acid 98% ; CH_3COOH) analytical grade เฮกเซน (hexane; C_6H14) ไอโซโพรพานอล (isopropanol ; $(CH_3)_2CHOH$) commercial grade จากบริษัท Labscan Asia จำกัด ประเทศไทย เอทานอล (ethanol ; CH_3CH_2OH) analytical grade ซิลิกาเจล (Silica gel 60 GF_{254}) จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน โพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide; KOH) reagent grade จากบริษัท Scharlau Chemie S.A. ประเทศสเปน

3.2 วัสดุอุปกรณ์

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) คอลัมน์เป็น Phenogel (Phenomenex, USA) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 300 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคบรรจุ 5 ไมครอน ขนาดรู (pore size) 100 อังสตรอม (□) ต่อกับ injector ยี่ห้อ Rheodyne รุ่น 7125 Sample loop ขนาด 20 ไมโครลิตร ปั๊ม (pump) ของ Waters รุ่น 510 และเครื่องตรวจวัดชนิด Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) ของ SEDEX รุ่น 55 เครื่องประมวลผลรุ่น CSW 32 ของบริษัท Sedere ประเทศฝรั่งเศส ใช้แก๊สไนโตรเจน (99.5%) ของบริษัทแพรกซ์แอร์ (ประเทศไทย) จำกัด ในการระเหยตัวทำละลายออก

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ Shimadzu รุ่น GC-17A ต่อกับเครื่องตรวจวัดชนิด FID และเครื่องประมวลผล CBM-102 จากบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น ใช้คอลัมน์ Zebron ZB-5 (5% phenyl-95% diethylpolysiloxane) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ใช้แก๊สไนโตรเจน (99.99%) ของบริษัทแพรกซ์แอร์ (ประเทศไทย) จำกัด เป็นแก๊สตัวพา

3.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

ไขรำข้าวจากการผลิตน้ำมันรำข้าวของบริษัทน้ำมันบริโภคไทย จำกัด

3.4 การสกัดโพลิโคซานอล

กำจัดน้ำมัน (ไตรกลีเซอไรด์) ที่คงเหลืออยู่ในไขรำข้าวโดยนำไขรำข้าว 100 กรัม เติมเฮกเซนร้อน 700 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 ˚C กรองตะกอนไข แล้วล้างด้วยเฮกเซนร้อน 350 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เติมไอโซโพรพานอลด้วยปริมาตรเท่ากันรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แช่เย็นและกรองเช่นเดิม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไขรำข้าวด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ Chloroform : Hexane : Acetic acid (70 : 30 : 0.1) โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ หากไขรำข้าวที่ได้ยังมีไตรกลีเซอไรด์เจือปนอยู่ให้ล้างด้วยเฮกเซนร้อนและทำซ้ำขั้นตอนเดิมจนกว่าไขที่ได้จะบริสุทธิ์ นำไขไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมงเพื่อกำจัดเฮกเซนออก หลังจากนั้นนำไขรำข้าวที่ได้ 50 กรัม มาเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) หรือสปอนนิฟิเคชัน (saponification) ด้วยโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 30 กรัม ใน 90% เอทานอล 250 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่ 80-85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ไขรำข้าวถูกสกัดออกมาอยู่ในรูปของไขมันแอลกอฮอล์และกรดไขมัน จากนั้นตรวจสอบความสมบูรณ์ปฏิกิริยาไฮโดรไล-ซิส ด้วย TLC

3.5 การทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์

นำไขรำข้าวที่ไฮโดรไลส์แล้ว 100 กรัม ละลายในน้ำร้อน 200 มิลลิลิตร เติมโทลูอีน 500 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน และเติมเอทานอลประมาณ 70 มิลลิลิตร จนชั้นโทลูอีนแยกจากชั้นน้ำชัดเจน นำไปรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกให้ความร้อนพร้อมกับกวนสารให้เข้ากันนาน 30 นาที ส่วนช่วงที่สองหยุดการกวนและลดอุณหภูมิลงที่ 60-70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้สารละลายใสแยกเป็นสองชั้น จากนั้นนำชั้นโทลูอีนมาสกัดซ้ำอีก 2-3 ครั้ง โดยใช้น้ำร้อนประมาณ 200 มิลลิลิตร เพิ่มโทลูอีน 50-100 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน และเติมเอทานอลจนสารละลายแยกชั้นกันชัดเจนขึ้น นำไปรีฟลักซ์เช่นเดิม แยกเฉพาะชั้นโทลูอีนออกมาและนำไประเหย โทลูอีนออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นจึงเติมไอโซออกเทน 600 มิลลิลิตร น้ำร้อน 300 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลประมาณ 80 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 80-90 องศา

เซลเซียส ทำเช่นเดียวกับการสกัดด้วยโทลูอีน เมื่อสารละลายใสแยกเป็นสองชั้นแล้ว ให้นำเฉพาะชั้น ไอโซออกเทน มาใส่กรวยแยก ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้ไขมันแอลกอฮอล์ตกตะกอน นำส่วนตะกอนและส่วนไอโซออกเทนไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ phenogel ที่ต่อกับเครื่องตรวจวัดชนิด ELSD และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ 0.25% กรดอะซิติกในโทลูอีน อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 2 บาร์ โดยฉีดตัวอย่างโพลิโคซานอลที่ละลายด้วยโทลูอีน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC หากพบว่ายังมีกรดไขมันอิสระเจือปนให้สกัดซ้ำด้วยไอโซออกเทน และน้ำร้อนเช่นเดิม

3.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอล

วิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลด้วยเครื่อง GC รุ่น GC-17A เครื่องตรวจวัดชนิด FID ต่อพ่วงกับเครื่องประมวลผล CBM-102 โดยใช้คอลัมน์ Zebron ZB-5 (5% phenyl-95% diethylpolysiloxane) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ตั้งค่าอุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (Injector port) และส่วนตรวจวัด (detector) เท่ากับ 360 องศาเซลเซียส ส่วนเตาอบ (oven) ตั้งค่าอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 15 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 350 องศาเซลเซียส และคงไว้ 10 นาที สร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอกอริทึมธรรมชาติของค่าเวลาคงค้างของสารที่ปรับแก้แล้ว ($\ln t'_R$) กับจำนวนคาร์บอนอะตอมของไขมันแอลกอฮอล์ที่ทราบความยาวคาร์บอน การระบุชนิดของไขมันแอลกอฮอล์สามารถทำได้ โดยการแทนค่าเวลาคงค้างที่ปรับแก้ของสารตัวอย่างลงในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ ร้อยละขององค์ประกอบคำนวณได้จากค่าพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารแต่ละชนิด และคำนวณปริมาณสุทธิ (%yield) ของโพลิโคซานอลที่สกัดจากไขรำข้าว โดยเทียบปริมาณกับน้ำหนักไขรำข้าวเริ่มต้น

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

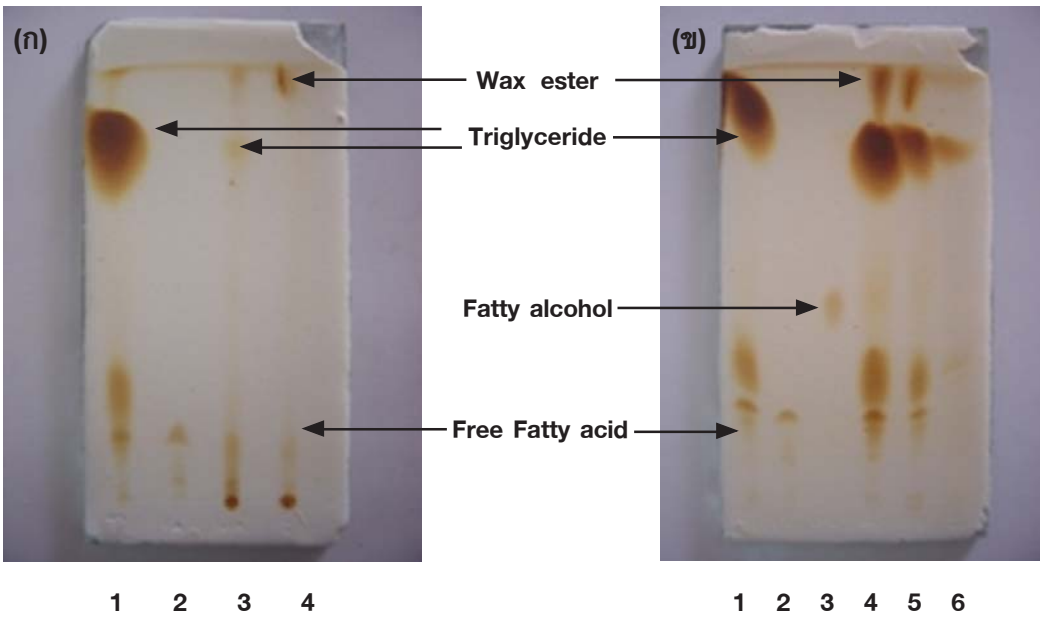
4.1 การสกัดโพลิโคซานอล

ในปัจจุบันการสกัดโพลิโคซานอลจากไขรำข้าวทางการค้าทำได้ยาก เนื่องจากยังมีปัญหาในเรื่องความบริสุทธิ์และปริมาณที่ได้ รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการผลิตสูง ส่งผลให้โพลิโคซานอลทั้งหมดผลิตในต่างประเทศและมีราคาแพง ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงใช้ไขรำข้าวซึ่งเป็นผลพลอยได้ในการผลิตน้ำมันรำข้าวในประเทศไทยเป็นวัตถุดิบในการสกัดโพลิโคซานอล ซึ่งปกติจะมีน้ำมันผสมอยู่ 20-80% ขึ้นอยู่กับกระบวนการแยกและสภาวะที่ใช้ [12] เมื่อนำไขรำข้าวของไทยไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย HPLC พบว่าน้ำมัน 55.91% แวกซ์เอสเทอร์ 40.67% ไขมันแอลกอฮอล์อิสระสายยาว 2.56% และอื่นๆ 1.86% ไขรำข้าวที่นำมาใช้จึงควรกำจัดน้ำมันและสารปนเปื้อนอื่นๆ เช่น กรดไขมันอิสระ และฟอสโฟไลปิดออกเพื่อลดความยุ่งยากในการกำจัดกรดไขมันอิสระออกในขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ ผลของการล้างไขรำข้าวด้วยเฮกเซนร้อนและไอโซโพรพานอลแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณไขรำข้าวที่ผ่านการล้างด้วยตัวทำละลาย

ไขรำข้าว	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักไขเมื่อผ่านการล้าง (กรัม)		
		เฮกเซนครั้งที่ 1	เฮกเซนครั้งที่ 2	ไอโซโพรพานอล
ตัวอย่างที่ 1	100	66.14	62.50	40.94
ตัวอย่างที่ 2	100	64.29	58.50	44.64
ตัวอย่างที่ 3	100	78.63	71.32	46.73
เฉลี่ย	100	69.69	64.11	44.10

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้เฮกเซนร้อนในการล้างไขครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มีไขเหลืออยู่ 69.69 และ 64.11 กรัม ตามลำดับ ส่วนการล้างด้วยไอโซโพรพานอลนั้นสามารถกำจัดน้ำมัน รวมทั้งสารที่มีขั้ว เช่น กรดไขมันอิสระได้อีกบางส่วน นอกจากนี้ไขที่ได้ยังมีลักษณะร่วนเป็นผงกว่าการล้างด้วย เฮกเซน ทำให้น้ำหนักเบา สะดวกต่อการเก็บ และง่ายต่อการนำไปใช้ทดลอง ไขรำข้าวที่ผ่านการล้างแล้วมีปริมาณไขสุทธิ 44.10% ในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค TLC ซึ่งเป็นโครมาโตกราฟีอย่างง่าย และทำได้รวดเร็วมาใช้ในการตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนของการทำงานวิจัย อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วย TLC ในที่นี้เป็นเพียงขั้นตอนตรวจสอบเชิงคุณภาพ (qualitative) เพียงคร่าวๆ เท่านั้น รูปที่ 1 แสดง TLC ของไขรำข้าวก่อนและหลังการล้างน้ำมันออก เปรียบเทียบกับส่วนที่ได้จากการล้างและสารมาตรฐาน



รูปที่ 1 ภาพ TLC ของ (ก) ไขรำข้าวที่ผ่านการกำจัดน้ำมัน (ข) ตัวทำละลายที่ใช้ล้างไขรำข้าว เทียบกับสารมาตรฐาน โดยแถบที่ 1-4 (ก) คือ น้ำมันรำข้าว กรดโอเลอิค ไขรำข้าวก่อนและหลังล้างด้วยเฮกเซนร้อนครั้งที่ 2 ตามลำดับ ส่วนแถบที่ 1-6 (ข) คือ น้ำมันรำข้าว กรดโอเลอิค ไขมันแอลกอฮอล์ เฮกเซนที่ใช้ล้างไขรำข้าวครั้งที่ 1 และ 2 และไอโซโพรพานอล ตามลำดับ

จากรูปที่ 1(ก) แสดงให้เห็นว่าไขรำข้าวที่ผ่านการล้างด้วยเฮกเซนร้อน 2 ครั้ง สามารถลดปริมาณน้ำมันลงได้ จึงไม่เห็นแถบของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งต่างจากไขรำข้าวที่ไม่ได้ล้างเฮกเซนร้อนที่ยังคงเห็นแถบของไตรกลีเซอไรด์อยู่ อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบส่วนของตัวทำละลายที่ใช้ล้างไขรำข้าวดังรูปที่ 1(ข) แสดงให้เห็นว่าถึงแม้เฮกเซนร้อนสามารถละลายไตรกลีเซอไรด์และกรดไขมันอิสระออกจากไขได้ดีก็จริงแต่มีแวกซ์เอสเทอร์บางส่วนสูญเสียไปในขั้นตอนการล้างด้วยเฮกเซน ดังนั้นจึงควรล้างน้ำมันออกจากไขด้วยเฮกเซนร้อนเพียงครั้งเดียวจากนั้นจึงล้างต่อด้วยไอโซโพรพานอล [12]

ไขรำข้าวหรือแวกซ์เอสเทอร์ประกอบด้วยกรดไขมันและไขมันแอลกอฮอล์สายยาวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ การสกัดไขมันแอลกอฮอล์จึงต้องทำลายพันธะเอสเทอร์โดย

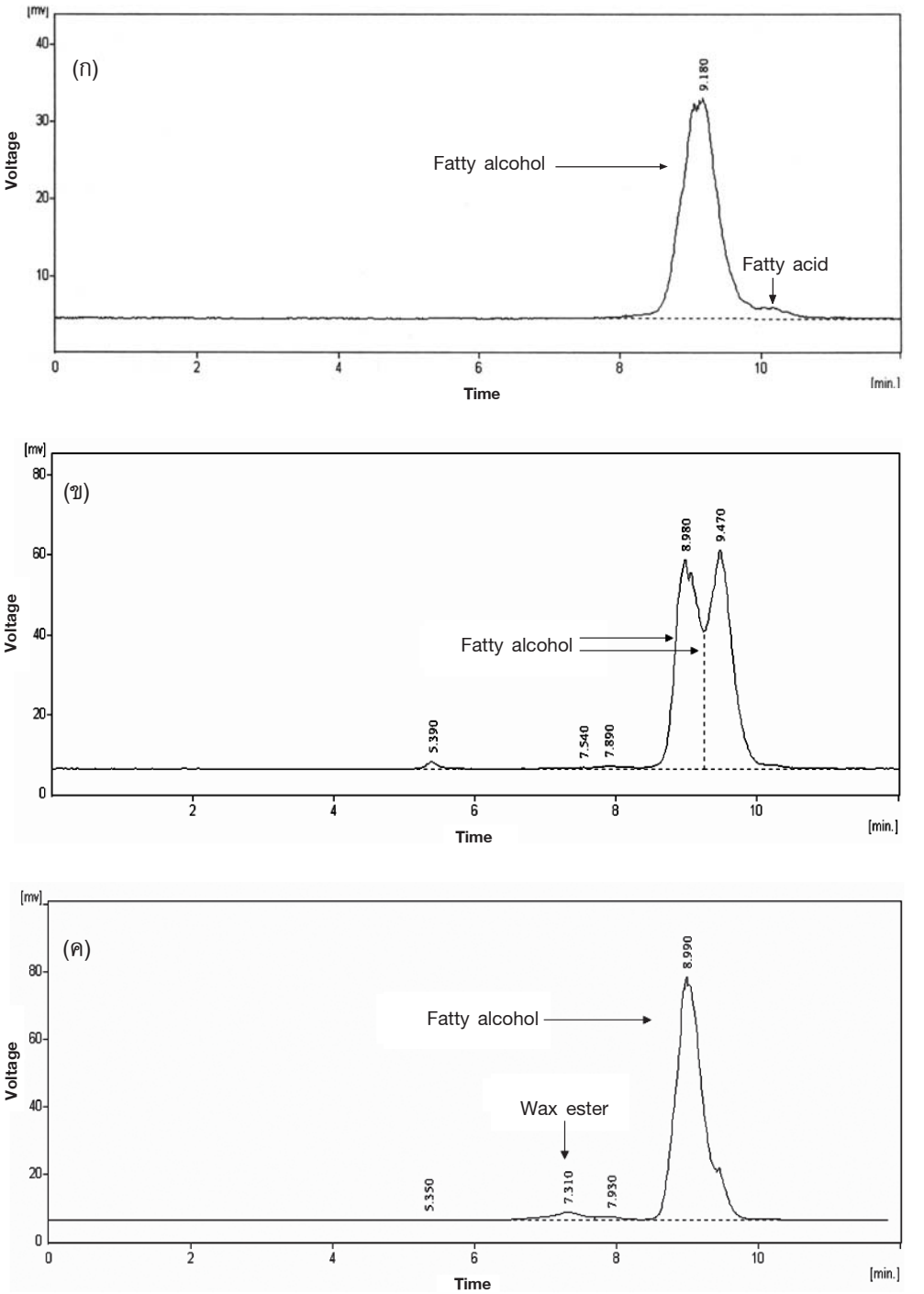
ใช้ด่างในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส หรือสปอนนิฟิเคชัน เพื่อให้ไขรำข้าวถูกสกัดออกมาอยู่ในรูปของไขมันแอลกอฮอล์และกรดไขมัน จากนั้นจึงนำไปกำจัดกรดไขมันออกเพื่อให้ไขมันแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ต่อไป

4.2 การทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์

การทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์นั้นเริ่มจากการนำไขรำข้าวที่ผ่านการไฮโดรไลส์ ซึ่งประกอบด้วยไขมันแอลกอฮอล์ผสมกับเกลือของกรดไขมันมาสกัดด้วยน้ำและโทลูอีน โดยไขมันแอลกอฮอล์จะละลายในโทลูอีน ส่วนเกลือของกรดไขมันจะละลายน้ำ แต่เนื่องจากส่วนของสายไฮโดรคาร์บอนในโมเลกุลกรดไขมันมีสายยาวและไม่มีขั้ว จึงสามารถละลายได้ในโทลูอีน ดังนั้นจึงเกิดเป็นอิมัลชันขึ้น ซึ่งทำให้ยากต่อการแยกโพลิโคซานอลให้บริสุทธิ์ได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้เอทานอลในการลดอิมัลชัน ซึ่งพบว่า การใช้เอทานอลช่วยให้แยกชั้นสารละลายและน้ำได้ชัดเจนยิ่งขึ้น รวมทั้งยังให้ความร้อนเพื่อให้โพลิโคซานอลละลายในโทลูอีนได้ดีขึ้นด้วย ซึ่งเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย HPLC ได้ผลดังรูปที่ 2 (ก) ซึ่งพบพีคของไขมันแอลกอฮอล์ที่มีกรดไขมันอิสระปนเปื้อนเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีความเข้มข้นต่ำจึงตรวจสอบไม่พบแว็กซ์เอสเทอร์

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการทดลองซ้ำด้วยวิธีการเดิมกลับพบว่าไม่สามารถสกัดโพลิโคซานอลให้บริสุทธิ์ได้เช่นเดิม กล่าวคือยังมีกรดไขมันอิสระปนเปื้อนอยู่ในชั้นของโทลูอีนในปริมาณที่สูงขึ้น จึงทดลองโดยการสกัดซ้ำด้วยสารละลายไม่มีขั้ว (non-polar) ที่สูงกว่าโทลูอีน คือไอโซออกเทน ทำให้ได้โพลิโคซานอลที่บริสุทธิ์ขึ้น เนื่องจากกรดไขมันอิสระละลายในไอโซออกเทนได้น้อยลง จากนั้นนำส่วนไอโซออกเทนที่สกัดได้มาใส่ในกรวยแยก เมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการตกตะกอนของโพลิโคซานอล ซึ่งเมื่อนำส่วนใสและส่วนตะกอนมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC ได้ผลดังรูปที่ 2 (ข) และ (ค) ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าโพลิโคซานอลที่สกัดได้มีแวกซ์เอสเทอร์ปนเปื้อนอยู่เล็กน้อย เนื่องจากการไฮโดรไลส์ไขรำข้าวเกิดได้ไม่สมบูรณ์ แต่สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของด่าง หรือใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาให้นานขึ้น

เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย HPLC พบว่าแอลกอฮอล์ที่ได้จากส่วนที่ละลายในไอโซออกเทนและส่วนตกตะกอนมีความบริสุทธิ์ 98.01% และ 94.54% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าไขมันแอลกอฮอล์ที่ละลายในไอโซออกเทน เมื่อฉีด HPLC แยกเป็น 2 พีค ดังรูปที่ 2 (ข) โดยพีคแรกอยู่ตำแหน่งเดียวกับไขมันแอลกอฮอล์ที่ได้จากส่วนที่ตกตะกอน ดังรูปที่ 2 (ค) ส่วนอีกพีคอยู่ตำแหน่งถัดไป ทั้งนี้อาจเนื่องจากองค์ประกอบของโพลิโคซานอลจากไขรำข้าวมีขนาดโมเลกุลที่ต่างกันในช่วงกว้าง โดยประกอบด้วยแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอน 22-36 อะตอม [2] จึงเป็นไปได้ว่าพีคแรกเป็นไขมันแอลกอฮอล์ที่มีสายยาว มีน้ำหนักโมเลกุลและจุดหลอมเหลวสูง



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของโพลิโคซานอลที่สกัดจากไขรำข้าวเมื่อ (ก) สกัดด้วยโทลูอีน (ข) ส่วนที่สกัดซ้ำและละลายในไอโซออกเทน (ค) ส่วนที่สกัดซ้ำด้วยไอโซออกเทนและตกตะกอนเมื่อวางไว้ข้ามคืน โดยวิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้คอลัมน์ phenogel ต่อกับ Evaporative Light Scattering Detector และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ 0.25% กรดอะซิติกในโทลูอีน อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 2 บาร์

ตกตะกอนในไอโซออกเทนเมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเนื่องจากความสามารถในการละลายต่ำ และถูกชะออกจากคอลัมน์ phenogel ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่แยกสารตามขนาดอนุภาคออกมาก่อน ส่วนพีคหลังเป็นไขมันแอลกอฮอล์สายสั้นกว่าจึงละลายอยู่ในไอโซออกเทนได้ง่าย และโมเลกุลมีขนาดเล็กกว่าจึงถูกชะออกมาทีหลัง สมมุติฐานดังกล่าวสามารถพิสูจน์ได้โดยการนำโพลิโคซานอลไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี

4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี

แม้ว่ามีการงานวิจัยที่ศึกษาองค์ประกอบของโพลิโคซานอลจากไขรำข้าวบ้างแล้ว [2, 12, 18] แต่องค์ประกอบที่ได้แตกต่างกันไป ซึ่งอาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบของไขรำข้าวที่นำมาใช้ วิธีการสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาองค์ประกอบของโพลิโคซานอลจากไขรำข้าวที่ผลิตในประเทศไทย ดังนั้นจึงนำโพลิโคซานอลที่ได้จากส่วนที่สกัดด้วยโทลูอีน ไอโซออกเทน และส่วนที่ตกตะกอนมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และได้รายงานชนิดและปริมาณองค์ประกอบไว้ในตารางที่ 2

จากตารางพบว่าให้ผลสอดคล้องกับสมมุติฐานที่ว่าส่วนตะกอนที่อยู่ในไอโซออกเทนประกอบด้วยโพลิโคซานอลสายยาว มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยมีโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 30 และ 32 อะตอม 33.1% และ 23.7% ตามลำดับ ซึ่ง Stuchlik และ Zak [2] และ Vali และคณะ [12] รายงานว่ามีโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 30 อะตอม มากที่สุดเช่นกัน คือ 30.1% และ 24-27% ตามลำดับ ส่วนที่ละลายไอโซออกเทน พบว่าส่วนใหญ่ประกอบด้วยโพลิโคซานอลสายสั้น C_{24} และ C_{26} เท่ากับ 29.5% และ 23.1% ตามลำดับ สำหรับโพลิโคซานอลที่ได้จากการสกัดด้วยโทลูอีนเพียงอย่างเดียว เป็นการรวมทั้งส่วนตะกอนและส่วนใสเข้าด้วยกันจึงพบโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอนปานกลาง โดยส่วนใหญ่ประกอบด้วย C_{26} และ C_{30} ซึ่งมีปริมาณ 21.4% และ 20.9% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากทั้ง 3 ส่วนพบว่ามีโพลิโคซานอลที่ไม่สามารถระบุความยาวคาร์บอนได้อย่างชัดเจน แต่คาดว่าเป็นโพลิโคซานอลที่มีสายโซ่กิ่ง (branch chain) หรือมีความยาวคาร์บอนเป็นเลขคี่ สอดคล้องกับ Vali และคณะ [12] ซึ่งรายงานว่าไขรำข้าวที่ถูกสปอนนิไฟด์มีโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอนเป็นเลขคี่ประมาณ 3.5-4.7% และพบโพลิโคซานอลสายโซ่กิ่งที่มีความยาวคาร์บอน 34, 36 และ 38 อะตอม เท่ากับ 2.8%, 4% และ 2.9% ตามลำดับ

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบชนิดและร้อยละปริมาณของโพลิโคซานอลที่สกัดจากไขรำข้าวในส่วนที่สกัดด้วยโทลูอีน ส่วนที่ละลายในไอโซออกเทน ส่วนที่ตกตะกอนจากไอโซออกเทน เปรียบเทียบกับที่รายงานโดย Stuchlik และ Zak [2]

ไขมันแอลกอฮอล์		ร้อยละขององค์ประกอบ			
		รายงานของ Stuchlik & Zak	สกัดด้วยโทลูอีน	ส่วนที่ละลายในไอโซออกเทน	ส่วนตกตะกอนจากไอโซออกเทน
Hexadecanol	C_{16}	-	-	0.2	-
Octadecanol	C_{18}	-	-	0.5	-
Eicosanol	C_{20}	-	-	0.1	-
Docosanol	C_{22}	1.1	1.2	2.1	0.3
Tricosanol	C_{23}	-	-	0.4	-
Tetracosanol	C_{24}	11.6	19.9	29.5	4.6
Pentacosanol	C_{25}	-	0.6	0.9	-
Hexacosanol	C_{26}	10.6	21.4	23.1	8.0
Heptacosanol	C_{27}	-	-	0.1	-
Octacosanol	C_{28}	20.2	16.8	14.8	14.5
Nonacosanol	C_{29}	-	-	0.2	0.5
Triacontanol	C_{30}	30.1	20.9	12.7	33.1
Hentriacontanol	C_{31}	-	2.9	0.4	-
Dotriacontanol	C_{32}	16.8	8.3	4.1	23.7
Tritriacontanol	C_{33}	-	-	-	0.3
Tetratriacontanol	C_{34}	8.0	3.8	3.4	11.2
Haxatriacontanol	C_{36}	1.4	0.6	0.8	1.7
Others		-	3.6	6.8	2.1

เมื่อนำน้ำหนักโพลิโคซานอลจากส่วนที่ได้จากการสกัดซ้ำและละลายในไอโซออกเทน และส่วนที่สกัดซ้ำด้วยไอโซออกเทนและตกตะกอนเมื่อวางไว้ข้ามคืน ซึ่งเตรียมจากไขรำข้าวที่ผ่านการล้างด้วยเฮกเซน 2 ครั้ง และไอโซโพรพานอล 1 ครั้ง เทียบกับน้ำหนักของไขรำข้าวเริ่มต้นก่อนล้าง พบว่าได้ปริมาณโพลิโคซานอลสุทธิเท่ากับ 26.56% จะเห็นว่าปริมาณที่ได้ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากมีแว็กซ์เอสเทอร์สูญเสียไปบางส่วนในระหว่างการล้างน้ำมันออกจากไข และในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มีการสกัดซ้ำหลายครั้ง โดยในการสกัดครั้งแรกไม่ได้นำส่วนน้ำมาสกัดด้วยโทลูอีนซ้ำอีกครั้งจึงทำให้สูญเสียโพลิโคซานอลไปส่วนหนึ่งรวมทั้งในขั้นตอนการแยกชั้นสารละลายและชั้นน้ำ จะเกิดการสูญเสียโพลิโคซานอลที่อยู่ระหว่างทั้ง 2 ชั้นดังกล่าวด้วย

5. สรุปผลการทดลอง

จากการนำไขรำข้าวที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวในประเทศไทยไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วย HPLC พบว่าประกอบด้วย น้ำมัน 55.91% แวกซ์เอสเทอร์ 40.67% ไขมันแอลกอฮอล์อิสระสายยาว 2.56% และอื่นๆ 1.86% การล้างไขรำข้าวด้วยเฮกเซนและไอโซโพรพานอล เพื่อต้องการกำจัดน้ำมันออกไปพบว่ามีไขเหลือสุทธิเท่ากับ 44 กรัมจากไขรำข้าวเริ่มต้น 100 กรัม

จากการสกัดโพลิโคซานอลและทำให้บริสุทธิ์ พบว่าโพลิโคซานอลมีความสามารถละลายในตัวทำละลายได้แตกต่างกัน จึงทำให้องค์ประกอบของโพลิโคซานอลในแต่ละส่วนแตกต่างกันด้วย จากการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย GC พบว่าโพลิโคซานอลที่ได้มีความยาวอยู่ในช่วง 16-36 อะตอม โดยโพลิโคซานอลที่มีปริมาณมากที่สุดในส่วนที่ละลายในโทลูอีน ไอโซออกเทน และส่วนตกตะกอนจากไอโซออกเทนได้แก่ C_{26}, C_{24} และ C_{30} ซึ่งมีสัดส่วนองค์ประกอบเท่ากับ 21.4%, 29.5% และ 33.1% ตามลำดับ เมื่อคำนวณปริมาณโพลิโคซานอลที่ได้ เทียบกับน้ำหนักไขรำข้าวเริ่มต้นที่ยังไม่ผ่านการล้างน้ำมันออก พบว่าไขรำข้าวของไทยสามารถสกัดโพลิโคซานอลปริมาณสุทธิได้ 26.56% โดยมีความบริสุทธิ์เกิน 94%

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัทน้ำมันบริโภคไทยที่อนุเคราะห์ตัวอย่างไขรำข้าว และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการทุนวิจัยพระจอมเกล้าธนบุรี

7. เอกสารอ้างอิง

1. Irmak, S., Dunford, N. T., and Milligan, J., 2006, "Policosanol Contents of Beeswax, Sugar Cane and Wheat Extracts," *Food Chemistry,* Vol. 95, pp. 312-318.

2. Stuchlik, M. and Zak, S., 2002, "Vegetable Lipids as Components of Functional Foods," *Biomedical Papers,* Vol. 146, pp. 3-10.

3. Jimenez, J. J., Bernal, J. L., Aumente, S., Toribio, L., and Bernal, J., 2003, "Quality Assurance of Commercial Beeswax: II Gas Chromatography-Electron Impact Ionization Mass Spectrometry of Alcohols and Acids," *Journal of Chromatography A,* Vol. 1007, pp. 101-116.

4. Hargrove, J. L., Greenspan, P., and Hartle, D. K., 2004, "Nutritional Significance and Metabolism of Very Long Chain Fatty Alcohols and Acids from Dietary Waxes," *Experimental Biology and Medicine,* Vol. 229, pp. 215-226.

5. Varady, K. A., Wang, Y., and Jones, P. J. H., 2003, "Role of Policosanols in the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease," *Nutrition Reviews,* Vol. 61, pp. 376-383.

6. Menendez, R., Fernandez, S. I., Del Rio, A., Gonzalez, R. M., Fraga, V., and Amor, A. M., 1994, "Policosanol Inhibits Cholesterol Biosynthesis and Enhances LDL Processing in Cultured Human Fibroblasts," *Biological Research,* Vol. 27, pp. 199-203.

7. Arruzazabala, M. L., Carbajal, D. R. M., Garcia, M., and Fraga, V., 1993, "Effects of Policosanol on Platelet Aggregation in Rats," *Thrombosis Research,* Vol. 69, pp. 321-327.

8. Carbajal, D., Arruzazabala, M. L., Valdes, S., and Mas, R., 1998, "Effect of Policosanol on Platelet Aggregation and Serum Levels of Arachidonic Acid Metabolites in Healthy Volunteers," *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,* Vol. 58, pp. 61-64.

9. Rendon, A., Rodriguez, M. D., Lopez, M., Garcia, H., de la Cajigas, A., and Mas, R., 1992, "Policosanol : A Study of its Genotoxicity and Teratogenicity in Rodents," *Toxicology Letters,* Vol. 63, pp. 249.

10. Irmak, S. and Dunford, N. T., 2005, "Policosanol Contents and Compositions of Wheat Varieties," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* Vol. 53, pp. 5583-5586.

11. Gamble, W. R., Liu, Z., Bailey, D. T., Perez, P. P., Stull, D. P., Richheimer, S. L., Nichols, R. L., and Lenoble, R., 2003, *"High Molecular Weight Primary Aliphatic Alcohols Obtained from Natural Products and Used Thereof",* No. 6596776 B2

12. Vali, S. R., Ju, Y.-H., Kaimal, T. N. and

Chern, Y.-T., 2005, "A Process for the Preparation of Food-Grade Rice Bran Wax and the Determination of its Composition," *Journal of the American Oil Chemists' Society,* Vol. 82, pp. 57-64.

13. Chen, F., Cai, T., Zhao, G., Liao, X., Guo, L., and Hu, X., 2005, "Optimizing Conditions for The Purification of Crude Octacosanol Extract from Rice Bran Wax by Molecular Distillation Analyzed Using Response Surface Methodology," *Journal of Food Engineering,* Vol. 70, pp. 47-53.

14. Empie, M. W., Hilaly, A., Lane, D. B., and Sanborn, A. J., 2004, *"Policosanol Compositions Extraction from Novel Sources and Use Thereof",* US 20040034241 A1

15. Jackson, M. A. and Eller, F. J., 2006, "Isolation of Long-Chain Aliphatic Alcohols from Beeswax using Lipase-Catalyzed Methanolysis in Supercritical Carbon Dioxide," *The Journal of Supercritical Fluids,* Vol. 37, pp. 173-177.

16. Cravotto, G., Binello, A., Merizzi, G., and Avogadro, M., 2004, "Improving Solvent-Free Extraction of Policosanol from Rice Bran by High-Intensity Ultrasound Treatment," *European Journal of Lipid Science and Technology,* Vol. 106, pp. 147-151.

17. Gingras, L., 2000, "Refining of Rice Bran Oil," *International News on Fats, Oils and Related Materials,* Vol. 11, pp. 1196-1203.

18. Bianchi, G., Lupotto, E., and Russo, S., 1979, "Composition of Epicuticular Wax of Rice, Oryza sativa," *Cellular and Molecular Life Sciences,* Vol. 35, p. 1417.

19. Yoon, S. H. and Rhee, J. S., 1982, "Composition of Waxes from Crude Rice Bran Oil," *Journal of the American Oil Chemists' Society,* Vol. 59, pp. 561-563.