ปริมาณอีพีเอและดีเอชเอ ในน้ำมันปลาชนิดแคปซูล

วัฒนา เพชรเกษม

บทคัดย่อ

การดัดแปลงและปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมกา 3 (omega 3) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโพลีในรูปของกรดไอโคซาเพนตะอิโนอิก หรือ อีพีเอ(eicosapentaenoic acid , EPA) และกรดโดโคซะเฮกซะอิโนอิก หรือ ดีเอชเอ (docosahexaenoic acid , DHA) ในน้ำมันปลาชนิดแคปซูล โดยใช้วิธีตาม AOAC (1981,1984) แต่เพิ่มเวลาของการรีฟลัก (reflux time) คัดเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสมแก่การวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันที่ได้กับกรดไขมันมาตรฐานโดยใช้เทคนิคค่าความสมดุลย์ของความยาวโครงสร้างเคมี หรือ อีซีแอล (equivalent chain length value , ECL)

ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณ อีพีเอ และ ดีเอชเอ ในน้ำมันปลาชนิดแคปซูลจำนวน 8 ตัวอย่างที่มีเครื่องหมายการค้าต่างกัน ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟ (gas chromatograph , GC) ใช้เมทิล ไตรโคสะโนเอท (methyl tricosanoate , $C_{23:0}$) เป็นสารมาตรฐานภายใน หรือ ไอเอส (internal standard,IS)คอลัมน์ที่ใช้คือ bonded Carbowax 20M polyglycol ชนิด fused silica cap-

บทนำ

ในอดีตมีความเชื่อว่าปลาและสัตว์น้ำชนิดอื่นเป็นแหล่งของอาหารโปรตีนเท่านั้น ในปี ค.ศ. 1940 น้ำมันปลาถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตวิตามินเอและดี ต่อมาพบว่าวิตามินทั้งสองชนิดมีมากในตับปลา จึงใช้ตับปลาแทนน้ำมันปลาในการผลิตวิตามินดังกล่าวและเป็นการเพิ่มมูลค่าวัตถุเหลือทิ้งจากปลาด้วย ส่วนกรดไขมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์ยังไม่ได้รับการสนใจเท่าที่ควรในระยะเริ่มแรก เนื่องจากยังไม่มีวิธีวิเคราะห์และพิสูจน์ชนิดของกรดไขมัน ทำให้พื้นฐานความเข้าใจคุณลักษณะทางธรรมชาติของสารประกอบเคมีที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันปลายังไม่ดีพอ ปัจจุบันวิธีวิเคราะห์ไขมันและน้ำมันได้พัฒนาอย่างมาก ทำให้ทราบชนิดและโครงสร้างของเกรดไขมันในน้ำมันปลา และมีการศึกษาถึงคุณประโยชน์ขององค์ประกอบของน้ำมันปลาที่มีต่อร่างกายด้วย น้ำมันปลามีองค์ประกอบทางเคมีที่ซับซ้อนกว่าน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ ประกอบด้วยกลุ่มกรดไขมันโอเมกา 3 และกลุ่มกรดไขมันโอเมกา 6 ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโพลี กลุ่มกรดไขมันโอเมกา 3 ประกอบด้วย กรดแอลฟา-ลิโนเลนิก (α-linolenic acid) กรดไอโคซาเพนตะอิโนอิก หรือ อีพีเอ eicosapentaenoic acid,EPA) และกรดโดโคซะเฮกซะอิโนอิกหรือ ดีเอชเอ (docosahexaenoic acid , DHA) ส่วนกลุ่มกรดไขมันโอเมกา 6 ประกอบด้วย กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และกรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid) กรดไขมันทั้งสองกลุ่มนี้ร่างกายสร้างไม่ได้จำเป็นต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น จากการศึกษาทางคลีนิคนานกว่า 20 ปี ทำให้มีข้อมูลเพียงพอที่จะสรุปได้ว่าองค์ประกอบที่สำคัญและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ในน้ำมันปลา คือ อีพีเอและดีเอชเอ โดยที่กรดทั้งสองชนิดมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและลดการเสี่ยงในการเป็นโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ หลอดเลือดตีบตัน ความดันโลหิตสูง โรคไขข้ออักเสบและโรคปวดศีรษะไมเกรน ปัจจุบันมีการผลิตน้ำมันปลาในเชิงการค้าออกจำหน่ายในรูปแคปซูล และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ได้จัดให้น้ำมันปลาเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ การบริโภคเนื้อปลาและอาหารทะเลทำให้ร่างกายได้รับสารโปรตีนและกรดไขมันอีพีเอ/ดีเอชเอ แต่สำหรับบุคคลบางคนอาจได้รับกรดไขมันอีพีเอ/ดีเอชเอจากอาหารไม่เพียงพอ จึงจำเป็นต้องได้รับจากอาหารเสริมควบคู่กันไปด้วย โดยการรับประทานน้ำมันปลาชนิดแคปซูลโดยตรงหรือรับประทานอาหารเสริมอีพีเอ/ดีเอชเอในรูปแบบอื่นซึ่งปัจจุบันมีจำหน่ายในประเทศไทย ได้แก่ ไข่ไก่สดเพิ่มกรดไขมันโอเมกา 3 ส่วน ประเทศในยุโรปและอเมริกามีอาหารเสริมอีพีเอ/ดีเอชเอ หลายชนิด เช่น ขนมปัง เค้ก ไส้กรอก

เนื่องจากกรดไขมัน อีพีเอ/ดีเอชเอ มีประโยชน์มากต่อร่างกาย และมีการเสริมกรดไขมันทั้งสองชนิดในอาหารประเภทต่าง ๆ กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ จึงเห็นความจำเป็นในการศึกษาทดลองและหาวิธีวิเคราะห์กรดไขมันอีพีเอ/ดีเอชเอ ที่เหมาะสมเพื่อให้บริการหน่วยราชการและเอกชนในอนาคตอันใกล้

illary ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีตาม AOAC พบว่าวิธีที่ดัดแปลงจาก AOAC ได้ปริมาณอีพีเอ และ ดีเอชเอ อยู่ในช่วง 140-170 และ 80-115 มิลลิกรัมต่อกรัมแคปซูล ตามลำดับ ส่วนวิธี AOAC ได้ปริมาณอีพีอี และ ดีเอชเอ อยู่ในช่วง 98-166 และ 78-113 มิลลิกรัมต่อกรัมแคปซูล ตามลำดับ วิธีที่ดัดแปลงจาก AOAC ได้ปริมาณอีพีเอ และ ดีเอชเอ มากกว่าวิธีตาม AOAC

ขั้นตอนการวิเคราะห์กรดไขมันโดยทั่วไปประกอบด้วย การเตรียมตัวอย่างกรดไขมันจากน้ำมันปลา ฉีดเข้าเครื่อง GC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน และพิสูจน์ชนิดของกรดไขมัน การเตรียมตัวอย่างเตรียมได้โดยตรงด้วยกระบวนการทรานซ์เอสเทอริฟิเคชัน (trans-esterification) ซึ่งมีผู้ทำการวิจัยและศึกษาทดลองมาแล้วหลายวิธีด้วยกัน เช่น

1. วิธีสปอนนิฟิเคชัน (saponification) เพื่อสกัดสารที่ไม่ต้องการออก เช่น ไฮโดรคาร์บอน สเตอรอล(sterol) และไข (wax) การเปลี่ยนกรดไขมันที่ได้ให้อยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ หรือ เฟม (fatty acid methyl ester , FAME)
2. วิธีเมทอกไซด์ คาทาลิสต์ เมทานอไลซิส (methoxide catalyzed methanolysis)
3. วิธีบอรอน ไตรฟลูโอไรด์ เมทิลเลชัน (boron trifluoride methylation)

การพิสูจน์ชนิดของกรดไขมัน ได้ใช้การเปรียบเทียบ retention time ของกรดไขมันในตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดกับ retention time ของสารมาตรฐานที่ทราบชนิดแล้ว โดยเปรียบเทียบค่าความสมดุลย์ของความยาวของโครงสร้างทางเคมี หรือ อีแอลซี (equivalent chain length value , ECL) ตามหลักของ อีแอลซี เป็นความสัมพันธ์ระหว่าง logarithm ของ retention time และจำนวนคาร์บอนอะตอมของกรดไขมัน

จากการศึกษาค้นคว้าวิธีวิเคราะห์กรดไขมันจากเอกสารต่าง ๆ ทำให้เห็นว่าวิธีที่ได้พัฒนาปรับปรุงจากวิธีวิเคราะห์ตาม AOAC (1981,1984) โดย Einig และ Ackmann เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาทดลอง เนื่องจาก Einig และ Ackmann ได้เพิ่มเวลาของการรีฟลัก และใช้เมทิล ไตรโคสะโนเอท เป็นสารมาตรฐานภายใน เพื่อควบคุมความผิดปกติของการเตรียม ตัวอย่าง จึงนำวิธีดังกล่าวมาใช้และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีตาม AOAC

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

น้ำมันปลาที่มีเครื่องหมายการค้าต่างกันจำนวน 8 ตัวอย่าง ซื้อมาจากแหล่งจำหน่ายอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์(เกรดคุณภาพวิเคราะห์)
2. เมทิล แอลกอฮอล(เกรดคุณภาพวิเคราะห์)
3. บอรอน ไตรฟลูโอไรด์(เกรดคุณภาพวิเคราะห์)
4. ไอโซออกเทน(เกรดคุณภาพวิเคราะห์)
5. โซเดียมคลอไรด์(เกรดคุณภาพวิเคราะห์)
6. เมทิล ไตรโคสะโนเอท(เกรดแกสโครมาโตกราฟ)
7. สารมาตรฐานอีพีเอและดีเอชเอ (เกรดแกสโครมาโตกราฟ)
8. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มัลในเมทานอล
   - ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.0 กรัมด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยเมทานอล
9. สารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์
   - ละลายโซเดียมคลอไรด์ 36 กรัมด้วยน้ำกลั่น 100 มล.
10. สารละลายบอรอน ไตรฟลูโอไรด์ในเมทานอลร้อยละ 12
    - เป็นสารละลายสำเร็จที่สั่งซื้อโดยตรงจากบริษัทตัวแทนจำหน่าย
11. สารละลายมาตรฐานภายใน
    - ละลายเมทิล ไตรโคสะโนเอท 60 มก. ด้วยไอโซออกเทนและปรับปริมาตรให้เป็น 10 มล.ด้วยไอโซออกเทน

อุปกรณ์

1. แท่นให้ความร้อน (heating block) ควบคุมอุณหภูมิที่ 100° ซ.
2. หลอดแก้วพร้อมฝาเกลียว ขนาด 2 มล. และ 20 มล.
3. ปิเปตขนาด 20-200 ไมโครลิตร
4. ขวดแก้วปริมาตร ขนาด 10 มล. และ 100 มล.
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า ชั่งได้ละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. แกสไนโตรเจนแห้ง
7. เครื่องแกสโครมาโตรกราฟ ของ Shimadzu รุ่น GC-15 A

1.การเตรียมตัวอย่าง

1.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานภายใน (ข้อ 11) 1 มล. ลงในหลอดแก้วขนาด 20 มล. ระเหยด้วยแกสไนโตรเจนแห้ง ปิดจุก เก็บในตู้เย็น

1.2 ชั่งตัวอย่างน้ำมันปลา 50 มก. ในหลอดแก้วที่เตรียมไว้ตามข้อ 1.1 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ข้อ 8) จำนวน 1.5 มล. เติมแกสไนโตรเจนแห้ง ปิดจุก เขย่า ให้ความร้อนที่ 100° ซ.นาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายบอรอน ไตรฟลูโอไรด์ (ข้อ 10) จำนวน 2 มล. เติมแกสไนโตรเจนแห้ง ปิดจุก ให้ความร้อนที่ 100° ซ. 20 นาที ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

1.3 สกัดอีพีเอและดีเอชเอโดยเติมไอโซออกเทน 1 มล. ในตัวอย่างที่เตรียมตามข้อ 1.2 เติมแกสไนโตรเจนแห้ง ปิดจุก เขย่าอย่างแรง 30 วินาที เติมสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ (ข้อ 9) 5 มล.

เติมแกสไนไตรเจนแห้ง เขย่า ตั้งไว้ให้แยกชั้น ดูดส่วนที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดแก้ว ทำการสกัดด้วยไอโซออกเทนอีก 2 ครั้ง ตามวิธีข้างต้น รวมสารที่สกัดได้เข้าด้วยกัน ระเหยด้วยแกสไนโตรเจนแห้งจนเหลือ 1 มล.

2. การฉีดเข้าเครื่องโครมาโตกราฟ

สภาวะของเครื่อง

คอลัมน์ :- bonded Carbowax 20 M polyglycol ชนิด Fused silica capillary ขนาด 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร (i.d.)

แกสพา (carrier gas) : ไนโตรเจน

อุณหภูมิ : คอลัมน์ 210° ซ. หัวฉีด (injector) 240°ซ. เครื่องตรวจวัด(detector) 260° ซ.

อัตราการแยก (split ratio) = 100 : 1

เมื่อปรับสภาวะของเครื่องแล้ว ฉีดตัวอย่างที่เตรียมไว้ตามข้อ1.3จำนวน 1-2 ไมโครลิตร เปรียบเทียบตัวอย่างกับสารมาตรฐานโดยใช้วิธีอีซีแอล

ผลการศึกษาทดลอง

1. ใช้วิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก AOAC ในน้ำมันปลาชนิดแคปซูล 8 ตัวอย่าง มีปริมาณอีพีเออยู่ในช่วง 140-170 มก./กรัม และปริมาณดีเอชเออยู่ในช่วง 80-115 มก./กรัม ดังตารางที่ 1

2. ใช้วิธีตาม AOAC ในน้ำมันปลาชนิดแคปซูล 8 ตัวอย่าง มีปริมาณอีพีเออยู่ในช่วง 98-166 มก./กรัม และปริมาณดีเอชเออยู่ในช่วง 78-113 มก./กรัม ดังตารางที่ 2

วิจารณ์และสรุป

จากผลการศึกษาทดลองพบว่า ในตัวอย่างน้ำมันปลาชนิดแคปซูล 8 ตัวอย่าง เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ที่ได้ดัดแปลงจากAOAC มีปริมาณอีพีเออยู่ในช่วง 140-170 มก./กรัม และปริมาณดีเอชเออยู่ในช่วง 80-115 มก./กรัม แต่ถ้าใช้วิธีวิเคราะห์ตามวิธี AOAC จะได้ปริมาณอีพีเออยู่ในช่วง 98-166 มก./กรัม และปริมาณดีเอชเออยู่ในช่วง 78-113 มก./กรัม ซึ่งวิธีที่ได้ดัดแปลงจาก AOAC ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีค่าสูงกว่าวิธี AOAC 7 ตัวอย่าง ส่วนอีก1 ตัวอย่าง คือ MaxEPA 300 (Walgreen Lab. Inc.) cold water natural fish oil ให้ผลการวิเคราะห์น้อยกว่า

สรุปได้ว่าวิธีที่ได้ดัดแปลงจาก AOAC ให้ผลการวิเคราะห์มากกว่าวิธี AOAC

ตารางที่ 1 ปริมาณ อีพีเอและดีเอชเอในน้ำมันปลาชนิดแคปซูลตามวิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก AOAC

Trade name, company and source of oils	EPA and DHA levels (manufacturer's claim)		EPA and DHA levels (determined by GLC)			
	EPA	DHA	EPA		DHA	
	mg/g	mg/g	mg/g	wt%*	mg/g	wt%*
Kodel's (Kodel 1 Nutritional Products) Salmon oil	180	120	170	17.1	101	11.3
KAL (KAL, Inc.) Fish oil from cold water	180	120	169	17.1	110	11.5
MAXI-FISH (VITA-BEST) Fish oil concentrate	180	120	165	16.7	100	10.4
Cardi-Omega 3 (Solar Nutritional Inc.) All natural MaxEPA fish oil concentrate	180	120	168	17.0	100	10.9
MaxEPA 300 (Walgreen Lab. Inc.) Cold water natural fish oil	180	120	147	15.3	80	8.8
MaxEPA (Solgar Co. Inc.) Marinc lipid concentrate	180	120	140	14.0	104	9.9
Your Life (P. Leiner Nutr. Prod. Inc.) Natural fish oil concentrate	180	120	167	16.9	115	11.3
Natural OMEGA-3 (Country Life) Fish body oil	180	120	165	17.1	115	11.3

หมายเหตุ 1. ขนาดของแคปซูลที่บรรจุ มีขนาดบรรจุต่างกัน เช่น 500 มิลลิกรัม หรือ 600 มิลลิกรัม ในการคำนวณ EPA และ DHA อยู่บนฐาน 1000 มิลลิกรัมหรือกรัม

2. *น้ำหนักเปอร์เซนต์ของกรดไขมันคิดเป็นต่อน้ำหนัก 100 กรัมของกรดไขมันทั้งหมดที่ตรวจพบในระบบการวิเคราะห์ด้วย CLC

ตารางที่ 2 ปริมาณอีพีเอและดีเอชเอในน้ำมันปลาชนิดแคปซูล ตามวิธี AOAC

Trade name, company and source of oils	EPA and DHA levels (manufacturer's claim)		EPA and DHA levels (determined by GLC)			
	EPA	DHA	EPA		DHA	
	mg/g	mg/g	mg/g	wt%*	mg/g	wt%*
Kodel's (Kodel Nutritional Product) Salmon oil	180	120	145	15.5	94	10.3
KAL(KAL, Inc.) Fish oil from cold water	180	120	151	16.0	100	10.6
MAXI-FISH (VITA-BEST) Fish oil concentrate	180	120	147	14.2	90	10.3
Cardi-Omega 3(Solar Nutritional Inc.) All natural MaxEPA fish oil concentrate	180	120	126	16.4	78	9.8
MaxEPA 300 (Walgreen Lab. Inc.) Cold water natural fish oil	180	120	166	15.6	113	10.7
MaxEPA (Solgar Co. Inc.) Marine lipid concentrate	180	120	98	11.4	80	9.7
Your life(P. Leiner Nutr. Inc.) Natural fish oil. concentrate	180	120	142	15.7	99	10.5
Natural OMEGA-3(Country Life) Fish body oil	180	120	147	15.3	105	11.1

หมายเหตุ 1.ขนาดของแคปซูลที่บรรจุ มีขนาดบรรจุต่างกัน เช่น 500 มิลลิกรัม หรือ 600 มิลลิกรัม ในการคำนวณ EPA และ DHA อยู่บนฐาน 1000 มิลลิกรัมหรือกรัม

2.* น้ำหนักเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันคิดเป็นต่อน้ำหนัก 100 กรัมของกรดไขมันทั้งที่ตรวจพบในระบบการวิเคราะห์ด้วย CLC

เอกสารอ้างอิง

Bannon, Cecill D. (et. al.) Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability II : Methylation of fats and oils with boron trifluoride methanol.Journal of Chromatography, September, 1982, vol. 247, no. 1, p, 63-69.

..... Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability III : Literature review of an investigation into the development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanolysis of fats and oils. Journal of Chromatography, September, 1982, vol.247, no. 1, p. 71-89.

Bannon, Cecil D., Craske, J.O., and Hilliker, A.E. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability V : Validation of theoretical relative response factors of unsaturates esters in the flame ionization detector. Journal of the American Oil Chemist' Society, January, 1986, vol. 63, no. 1, p. 105-110

Einig, R.G., and Ackman, R.G. Omega-3 PUFA in marine oil products. Journal of the American Oil Chemist' Society, April, 1987, vol. 64, no. 4, p. 499-502.

Jamieson, G.R., GlC identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids. Journal Chromatography Science, October, 1975, vol. 13, no. 10, p. 491-497.

Sheppard, A.J., and Iverson, J.L. Esterification of fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. Journal Chromatography Science, September, 1975, vol. 13, no. 9, p. 448-452.