

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารต้านออกซิเดชันคาร์ดานอลไฮโดรจินิตและอนุพันธ์ในใบโอดีเซล
โดยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิวคิตโครมาโทกราฟี

นางสาวสุปรียา สุอังคณรัตน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
ปีการศึกษา 2556

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตที่ส่งมาขึ้นทะเบียนวิทยานิพนธ์ที่ส่งมาทางบัณฑิตวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTIOXIDANT HYDROGENATED CARDANOL AND
DERIVATIVES IN BIODIESEL BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Miss Supreeya Su-angkanarat



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Petrochemistry and Polymer

Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารต้านออกซิเดชันคาร์ดา นอลไฮโดรจินเนตและอนุพันธ์ในใบโอดีเซลโดยไฮเพอร์ ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี
โดย	นางสาวสุปรียา สุอังคณารัตน์
สาขาวิชา	ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนุญ หนูจักร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เก็จวลี พุกษาทร)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนุญ หนูจักร)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)
.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.อมรवारณ อินทศิริ)
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ประภาส ขอพึง)

สุปรียา สุอังคนารัตน์ : การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารต้านออกซิเดชันคาร์ดานอลไฮโดรจิเนตและอนุพันธ์ในไบโอดีเซลโดยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี. (QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTIOXIDANT HYDROGENATED CARDANOL AND DERIVATIVES IN BIODIESEL BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.จรธรรมนุญ หนูจักร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์, 81 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณสำหรับประเมินสารต้านออกซิเดชัน hydrogenated cardanol (CDN), 5-*n*-pentadecyl-2-*tert*-butylphenol (PBP) และ *O,O*-diethyl *O*-(3-pentadecylphenyl) phosphorothioate (DPP) ในไบโอดีเซลโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ใช้คอลัมน์ HPLC LiChrospher® 100 RP-18e (ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) ยาว 125 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร และอัตราเร็วเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิตรต่อนาที พร้อมทั้งปริมาตรสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรและความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร ได้ภาวะ HPLC ที่เหมาะสมซึ่งได้ความสมบูรณ์ของการแยกมากกว่า 1.5 คือ อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส และเฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนต์โดยที่ 0–13 นาที MeOH:น้ำ (90:10 โดยปริมาตร) คงที่ จากนั้นปรับอัตราส่วนแบบเส้นตรงจนเป็น MeOH:น้ำ (100:0 โดยปริมาตร) ภายใน 10 นาที ก่อนวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในไบโอดีเซลด้วย HPLC ได้ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายซึ่งมีประสิทธิภาพสูง (94.43-99.76%) โดยใช้เมทานอล 9 มิลลิตรสำหรับไบโอดีเซล 1 มิลลิตรในหลอดเซนตริฟิวจ์ จากนั้นวอร์เทกซ์ 3 นาที แล้วหมุนเหวี่ยง 5 นาที เก็บส่วนใสด้านบนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ด้วยวิธีนี้พบว่าขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการ และขีดจำกัดการหาปริมาณของวิธีการเท่ากับ 2.34-4.32 ppm และ 9.63-14.4 ppm ตามลำดับ ซึ่งดีพอสำหรับใช้ตรวจวัดสารต้านออกซิเดชันทั่วไปในไบโอดีเซลที่ความเข้มข้นสูงกว่า 20 ppm จากการเติมสารต้านออกซิเดชันซึ่งทราบความเข้มข้นที่ขีดจำกัดการหาปริมาณของวิธีการ 20 และ 40 ppm ในไบโอดีเซล พบว่าความแม่นยำในช่วงร้อยละของการกลับคืน 92-104 และความเที่ยงภายในวันเดียวกันและระหว่างวันมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 4% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ยิ่งไปกว่านั้นปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่วัดได้ยังคงอยู่ในช่วงขีดจำกัดควบคุมของค่ากลาง $\pm 2SD$ ซึ่งบ่งบอกให้ทราบถึงความคงตัวอย่างสูงของสารต้านออกซิเดชันในไบโอดีเซล

สาขาวิชา ปีโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5472251823 : MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE

KEYWORDS: HPLC / ANTIOXIDANT / BIODIESEL

SUPREEYA SU-ANGKANARAT: QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTIOXIDANT HYDROGENATED CARDANOL AND DERIVATIVES IN BIODIESEL BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. ADVISOR: ASSOC. PROF.THUMNOON NHUJAK, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.SANGVANICH, Ph.D., 81 pp.

A quantitative method was developed for determination of antioxidant CDN, PBP and DPP in biodiesel using solvent extraction and high performance liquid chromatography (HPLC), where CDN, PBP and DPP refer to hydrogenated cardanol, 5-*n*-pentadecyl-2-*tert*-butylphenol and *O,O*-diethyl *O*-(3-pentadecylphenyl) phosphorothioate, respectively. Using an HPLC LiChrospher[®] 100 RP-18e column (125 x 4 mm I.D., 5 μm) and 1.0 ml/min flow rate of mobile phase, together with 10 μl sample loop injection and UV detection at 265 nm, the following HPLC conditions were optimized to achieve baseline resolution ($R_s > 1.5$) of three analytes: column temperature 30 °C and a gradient elution of methanol:water (v/v) mobile phase starting from 90:10 for 13 min holding and then using a linear gradient increase to 100:0 within 10 min. Prior to HPLC analysis of three antioxidants in biodiesel, high efficiency of solvent extraction (94.43-99.76%) was obtained using 9 ml of methanol for 1 ml of biodiesel in a centrifuged tube, and followed by vortexing and centrifuging for 3 and 5 minutes, respectively, and then storing in a 4 °C refrigerator for 2 hours. This method gave method detection limit of 2.34-4.32 ppm and method quantitative limit of 9.63-14.4 ppm, which is allowed to determine these three antioxidants with levels higher than 20 ppm typically in biodiesel. With spiking antioxidants at known levels of MQL, 20 and 40 ppm in biodiesel, acceptable accuracy and precision were obtained with recoveries in a range of 92-104 % and relative standard deviation less than 4% for intraday and interday. In addition, the amount of antioxidant determined within two months was found to lie in a control interval limit of mean ± 2SD, implying high stability of antioxidants in biodiesel.

Field of Study: Petrochemistry and
Polymer Science

Academic Year: 2013

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือของรองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมบุญ หนูจักร อาจารย์ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวนิช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาที่ดีตลอดงานวิจัยนี้ ขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. นวพร วินยเวคิน สำหรับคำปรึกษาและความกรุณาให้ยืมห้องปฏิบัติการและเครื่องมือ



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป.....	ญ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ปัญหาหรือมูลเหตุจูงใจ.....	1
1.2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎี.....	5
2.1 ไบโอดีเซล.....	5
2.1.1 ไบโอดีเซลจากปาล์มน้ำมัน.....	5
2.1.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน.....	6
2.1.3 สารต้านออกซิเดชันในไบโอดีเซล.....	7
2.2 คาร์ดานอล (Cardanol).....	9
2.2.1 ของเหลวสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ (cashew nut shell liquid, CNSL).....	9
2.2.2 คาร์ดานอลไฮโดรจิเนต (hydrogenated cardanol, CDN).....	10
2.2.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของคาร์ดานอลไฮโดรจิเนต.....	10
2.3 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC).....	13
2.3.1 เฟสเคลื่อนที่.....	13
2.3.2 ปุ่ม.....	14
2.3.3 ระบบฉีดตัวอย่าง.....	15
2.3.4 คอลัมน์.....	16
2.3.5 เครื่องตรวจวัด.....	17

2.3.6 ค่าพารามิเตอร์.....	18
2.4 การเตรียมตัวอย่าง.....	20
2.4.1 การละลาย.....	21
2.4.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction).....	21
2.5 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ.....	22
2.5.1 พื้นที่ใต้พีค (Peak area).....	22
2.5.2 การหาปริมาณสารตัวอย่าง.....	22
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	24
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	24
3.2 สารเคมี.....	25
3.3 สังเคราะห์อนุพันธ์ของ hydrogenated cardanol (CDN).....	26
3.3.1 5- <i>n</i> -pentadecyl-2- <i>tert</i> -butylphenol (PBP)	26
3.3.2 <i>O,O</i> -diethyl <i>O</i> -(3-pentadecylphenyl)phosphorothioate (DPP).....	27
3.4 การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย HPLC-UV.....	27
3.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน.....	27
3.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับ HPLC-UV.....	27
3.4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยตัวทำละลายของสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างไบโอดีเซล.....	28
3.4.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี.....	29
3.5 ความคงตัวของตัวอย่าง	31
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ hydrogynated cardanol (CDN).....	32
4.1.1 5- <i>n</i> -pentadecyl-2- <i>tert</i> -butylphenol (PBP)	32
4.1.2 <i>O,O</i> -diethyl <i>O</i> -(3-pentadecylphenyl) phosphorothioate (DPP).....	33
4.2 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับ HPLC-UV.....	35
4.2.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสม.....	35
4.2.2 อุณหภูมิคอลัมน์ที่เหมาะสม.....	37

4.2.3 เฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม	38
4.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย	41
4.3.1 ตัวทำละลายที่เหมาะสม	41
4.3.2 ปริมาณตัวทำละลายที่เหมาะสม	43
4.3.3 อุณหภูมิในการกำจัดเอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัวและไตรกลีเซอไรด์	45
4.4 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ	47
4.4.1 ขีดจำกัดต่ำสุดของการวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ	47
4.4.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง	48
4.4.3 ความแม่นยำและความเที่ยง	49
4.4.4 อิทธิพลของเมทริกซ์	51
4.5 ความคงตัวของตัวอย่าง	53
บทที่ 5 สรุป	55
รายการอ้างอิง	57
ภาคผนวก	63
ภาคผนวก ก	64
ภาคผนวก ข	73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	81

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์	5
2.2 วงจรการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและการทำหน้าที่ของสารต้านออกซิเดชัน	8
2.3 โครงสร้างโมเลกุลของส่วนประกอบของ CNSL	9
2.4 โครงสร้างเรโซแนนซ์ของสารประกอบฟีนอล	10
2.5 กลไกการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่แอลคิล	11
2.6 แผนภาพอุปกรณ์ HPLC	13
2.7 ระบบฉีดตัวอย่างแบบวาล์วหกพอร์ต โดยลูกศรแทนทิศทางการไหลของสารตัวอย่าง	15
2.8 ลักษณะการแยกของพีคที่ R_s ต่างๆ	19
2.9 ลักษณะของความไม่สมมาตรของพีคแบบต่างๆ	20
4.1 โครงสร้างโมเลกุลของ PBP	33
4.2 โครงสร้างโมเลกุลของ DPP	34
4.3 โคโรมาโทแกรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm วิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ด้วยเฟสเคลื่อนที่ MeOH:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) แบบอัตราส่วนคงที่ ที่ความยาวคลื่น (ก) 275 (ข) 270 (ค) 268 (ง) 260 (จ) 265 นาโนเมตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	36
4.4 โคโรมาโทแกรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm ใช้เฟสเคลื่อนที่ MeOH:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) แบบอัตราส่วนคงที่ ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ (ก) 25 และ (ข) 30 องศาเซลเซียส	38
4.5 โคโรมาโทแกรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ (ก) ACN (ข) ACN:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) (ค) MeOH (ง) MeOH:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	39

4.6	โครมาโทแกรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ได้จากการวิเคราะห์ HPLC-UV ใช้คอลัมน์ LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) ยาว 125 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.0 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนต์โดยเริ่มจาก MeOH:น้ำ (90:10 โดยปริมาตร) ที่ 0–13 นาที จากนั้นปรับอัตราส่วนแบบเส้นตรงเป็น MeOH:น้ำ (100:0 โดยปริมาตร) ภายใน 10 นาที อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตรสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร	40
4.7	ร้อยละการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิด ความเข้มข้น (ก) 10 และ (ข) 40 ppm ในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล ซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH, ACN และ MeOH:ACN (1:1 โดยปริมาตร)	42
4.8	ร้อยละการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิด ความเข้มข้น (ก) 10 และ (ข) 40 ppm ในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล ซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH ปริมาตร 9 มิลลิลิตร	44
4.9	ลักษณะตะกอนซึ่งเกิดขึ้นจากการเก็บส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง	45
4.10	ร้อยละการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิด ความเข้มข้น (ก) 10 และ (ข) 40 ppm ในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล ซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วเก็บส่วนสกัดตัวอย่างในอุณหภูมิห้อง 4 และ -4 องศาเซลเซียส	46
4.11	กราฟเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานกับกราฟเส้นตรงของตัวอย่าง (ก) CDN (ข) PBP (ค) DPP	52
4.12	แผนภูมิควบคุมค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ของสารต้านออกซิเดชัน (ก) CDN 20 ppm (ข) CDN 40 ppm (ค) PBP 20 ppm (ง) PBP 40 ppm (จ) DPP 20 ppm (ฉ) DPP 40 ppm ในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล	54

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ผลเสียหายต่อเครื่องยนต์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน	7
4.1	โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ PBP	33
4.2	โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ DPP	34
4.3	ความสูงพีคของสารต้านออกซิเดชัน CDN, PBP และ DPP ในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm วิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ใช้เฟสเคลื่อนที่ MeOH:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) แบบอัตราส่วนคงที่ อุณหภูมิคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส	35
4.4	รีเทนชันไทม์ (t_R) จำนวนเพลททางทฤษฎี (N) ความสูงพีค และรีเทนชันแฟกเตอร์ (k) ของโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm ใช้เฟสเคลื่อนที่ MeOH:น้ำ อัตราส่วน 95:5 ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 25 และ 30 องศาเซลเซียส	37
4.5	รีเทนชันไทม์ (t_R) พื้นที่ใต้พีค จำนวนเพลททางทฤษฎี (N) ความไม่สมมาตรของพีค (A_s) และความสมบูรณ์ของการแยก (R_s) ของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ได้จากการวิเคราะห์ ด้วยภาวะ HPLC ดังรูปที่ 4.6	40
4.6	LOD, LOQ, MDL และ MQL ของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิด	48
4.7	ความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง	49
4.8	ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอดีเซล	49
4.9	ความเที่ยงภายในวันเดียวกันและความเที่ยงระหว่างวันของการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอดีเซล	51
4.10	เปรียบเทียบความชันของกราฟเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานกับกราฟเส้นตรงของตัวอย่างโดยใช้การทดสอบที และร้อยละของอิทธิพลของเมทริกซ์	52

สัญลักษณ์และคำย่อ

CDN	hydrogenated cardanol
PBP	5- <i>n</i> -pentadecyl-2- <i>tert</i> -butylphenol
DPP	<i>O,O</i> -diethyl <i>O</i> -(3-pentadecylphenyl)phosphorothioate
HPLC	ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี
UV	อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
t_R	รีเทนชันไทม์
N	จำนวนเพลททางทฤษฎี
A_s	ความไม่สมมาตรของพีค
m/z	ค่ามวลต่อประจุ
k	รีเทนชันแฟกเตอร์
R_s	ความสมบูรณ์ของการแยก
δ	ตำแหน่งการเลื่อนเชิงเคมี
s	singlet
d	doublet
t	triplet
m	multiplet
dd	doublet of doublet
MeOH	เมทานอล
ACN	แอสีโทไนไทรล์
LOD	ขีดจำกัดต่ำสุดของการวัด
LOQ	ขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ
MDL	ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการ
MQL	ขีดจำกัดการหาปริมาณของวิธีการ
ppm	หนึ่งในล้านส่วน
λ	ความยาวคลื่น
R_f	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่บนทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี
r^2	สัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง

%RSD	ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
$t_{\text{calculate}}$	ค่า t ที่คำนวณได้
t_{critical}	ค่า t จากตาราง



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาหรือมูลเหตุจูงใจ

ไบโอดีเซล^[1] คือ น้ำมันดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ ซึ่งผ่านกระบวนการทางเคมีเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน ไบโอดีเซลจัดเป็นพลังงานทางเลือกเพื่อทดแทนน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรที่มีปริมาณจำกัด และลดน้อยลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้การนำพืชผลทางการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลยังช่วยแก้ปัญหาด้านผลผลิตที่ล้นตลาดและราคาผลผลิตทางการเกษตรตกต่ำอีกด้วย ปัจจุบันหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกปาล์มน้ำมัน เพื่อผลิตเป็นน้ำมันพืชสำหรับบริโภคและนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล โดยทุกส่วนของน้ำมันปาล์มสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล เช่น น้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันปาล์มโอลีน ไชสเทียรีน กรดไขมันปาล์มกลั่น และน้ำมันเมล็ดในปาล์ม โดยผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์

ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่ใช้ในปัจจุบันอาจเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ผ่านการแยกหรือไม่ผ่านการแยกกลีเซอรอลออก ดังนั้น ในผลิตภัณฑ์จึงพบสิ่งเจือปนต่างๆ คือกลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ และอื่นๆ เนื่องจากปฏิกิริยาและการแยกเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

เนื่องจากไบโอดีเซลมีเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ง่ายต่อการเกิด ปฏิกิริยาออกซิเดชัน^[2] ทำให้ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีความเสถียรต่ำกว่าดีเซลธรรมดา และก่อให้เกิดความเสียหายต่อเครื่องยนต์ได้^[3, 4] จึงจำเป็นต้องเติมสารต้านออกซิเดชันลงในไบโอดีเซลเพื่อเพิ่มความเสถียรมากขึ้น เช่น tertiary butylhydroquinone (TBHQ) และ/หรือ butylated hydroxytoluene (BHA) เป็นต้น ซึ่งสารต้านออกซิเดชันเหล่านี้ได้จากการสังเคราะห์สารปิโตรเคมี

จากแนวโน้มของการใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติแทนปิโตรเลียมจึงมีผู้พัฒนาสารต้านออกซิเดชันจากคาร์ดานอล (cardanol) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในของเหลวสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ (cashew nut shell liquid, CNSL) โดยเปลี่ยนคาร์ดานอลเป็นคาร์ดานอลไฮโดรจิเนตและอนุพันธ์ของคาร์ดานอลไฮโดรจิเนต

เนื่องจากเสถียรภาพต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงคุณภาพของน้ำมันเชื้อเพลิง การควบคุมค่าเสถียรภาพต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไบโอดีเซลจึงเป็นสิ่งสำคัญ ทั้งในการควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการผลิตและควบคุมผลิตภัณฑ์ให้ได้ตามมาตรฐานไบโอดีเซลของ

ประเทศต่างๆ ดังนั้นปริมาณวิเคราะห์ของสารต้านออกซิเดชันในไบโอดีเซลจึงเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิเคราะห์ของคาร์ดานอลไฮโดรจินเนตและอนุพันธ์ของคาร์ดานอลไฮโดรจินเนตในไบโอดีเซลต่างๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาวิธีการวิเคราะห์คาร์ดานอลไฮโดรจินเนตและอนุพันธ์ในไบโอดีเซลด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี

1.2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

จากการสืบค้นวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่ามีการพัฒนาวิธีการหาปริมาณสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างอาหาร น้ำมันพืช สารละลายตัวอย่างอาหาร และผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

ที่ผ่านมาได้มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันด้วย GC พร้อมทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่าง ดังต่อไปนี้ คือ การวิเคราะห์ปริมาณ butylated hydroxytoluene (BHT), BHA และ TBHQ ในน้ำมันปรุงอาหาร^[5] การวิเคราะห์ปริมาณ BHA, BHT, TBHQ, ethoxyquin (EQ) และ 2,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxymethylphenol (Ionox100) ในน้ำมันพืช^[6] และการวิเคราะห์ปริมาณ *tert*-butyl-4-hydroxyanisole, 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-hydroxytoluene, TBHQ, แอลฟาโทโคเฟอรอล และแอลฟาโทโคเฟอรอลอะซิเตตในอาหารไขมันสูง^[7] โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น แอซีโทไนไทรล์^[5] และเอทานอล^[6] และการสกัดด้วยเฟสของแข็ง เช่น สกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายเป็นแอซีโทไนไทรล์ที่อิ่มตัวในเฮกเซน:2-โพรพานอล:เอทานอล อัตราส่วน 2:1:1 แล้วนำมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกรอง และระเหยตัวทำละลายออก นำส่วนที่เหลือละลายในกรดไนตริก และตามด้วยการสกัดด้วยเฟสของแข็งเรซิน XAD-2^[7] ส่วนเครื่องตรวจวัดที่ใช้ ได้แก่ เฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์^[7] และแมสสเปกโตรเมตรี^[5, 6] ซึ่ง GC มีข้อจำกัดสำหรับวิเคราะห์สารที่ต้องกลายเป็นไอได้และไม่สลายตัวด้วยความร้อน

ได้มีงานวิจัยที่ผ่านมาที่รายงานการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างต่างๆ ด้วย HPLC แบบรีเวอร์สเฟส (reverse phase)^[8-17] ที่มีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายผสมทั้งแบบอัตราส่วนคงที่และเกรเดียนต์ ดังต่อไปนี้ (1) TBHQ ในน้ำมันพืช (คอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB-C18) และเฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ:เมทานอล อัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร^[8] (2) วิเคราะห์ BHA, TBHQ, propyl gallate (PG), octyl gallate (OG), Ionox100, 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP), nordihydroguaiaretic acid (NDGA), 4-hexylresorcinol (4HR), 2,4-Dichlorophenoxyacetic

acid (2,4 DA), 2-Naphthol (2-NL) และ 2-Phenylphenol (OPP) ในน้ำมันพืช (คอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB-C18 และเฟสเคลื่อนที่เป็นแอสีโทไนไทรล์กับน้ำกลั่นแบบเกรดเดียนต์)^[9] (3) วิเคราะห์ TBHQ, BHA, BHT และ PG ในน้ำมันพืช มาการีน เนย และชีส (คอลัมน์ LiChrospher® C18 และเฟสเคลื่อนที่เป็นแอสีโทไนไทรล์:1% กรดแอสีติกแบบเกรดเดียนต์)^[10] (4) วิเคราะห์ TBHQ, BHA, BHT ในน้ำมันเรปซีด (คอลัมน์ Hypersil ODS2 (C18) และเฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ เมทานอล และเทระไฮโดรฟูแรนแบบเกรดเดียนต์)^[11] (5) วิเคราะห์ PG, OG, BHA, BHT, TBHQ ในอาหาร (คอลัมน์ Supercosil LC-C18 และเฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ (ที่ pH 3.0 ด้วยกรดฟอสฟอริก) กับเมทานอล:แอสีโทไนไทรล์ (อัตราส่วน1:1) แบบเกรดเดียนต์)^[12] (6) วิเคราะห์ 1,3,5-trimethyl-2,4,6-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)benzene (Ethanox330), BHA, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol (DBP), BHT, pentaerythritol tetrakis (3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate) (Irganox1010), octadecyl-3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxy phenyl)propionate (Irganox 1076) และ Tris(2,4-di-*tert*-butyl phenyl)phosphate (Irgafos168) ในอาหาร (เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลกับเทระไฮโดรฟูแรนแบบเกรดเดียนต์)^[13] (7) วิเคราะห์ TBHQ ในน้ำมันพืช (คอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB-C18 และเฟสเคลื่อนที่เป็นของเมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร)^[14] (8) วิเคราะห์ BHT, Irganox1076 และ Irganox1010 ในพลาสติกพอลิเอทิลีน (คอลัมน์ μ -Bondapak-C18 และเฟสเคลื่อนที่เฮปแทนผสมเมทิลีนคลอไรด์แบบเกรดเดียนต์)^[15] (9) วิเคราะห์ Irganox1010, Irganox1076 และ Irgafos168 ในน้ำ (คอลัมน์ Zorbax Extend-C18 และเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล)^[16] (10) วิเคราะห์ tocopherol ในไบโอดีเซล (คอลัมน์ Acquity C18 และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายกรดฟอสฟอริก 0.2% กับแอสีโทไนไทรล์แบบเกรดเดียนต์)^[17]

ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC เครื่องตรวจวัดที่ใช้ในงานวิจัยที่กล่าวข้างต้น คือ อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (HPLC-UV)^[10-13, 15-17] และแมสสเปกโตรเมตรี (HPLC-MS)^[8, 9, 14] สำหรับอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210^[16] หรือ 276^[13] หรือ 280^[10-12, 15] หรือ 294^[17] นาโนเมตร

สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ด้วย HPLC นั้น ได้มีรายงานการใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น เมทานอล^[11, 12] แอสีโทไนไทรล์^[17] แอสีโทไนไทรล์ที่อิมัตว์ด้วยเฮกเซน^[9] เฮกเซนและตามด้วยเอทานอล^[8] เฮกเซนและตามด้วยเอทิลแอลกอฮอล์^[14] เฮกเซน:2-โพรพานอล อัตราส่วน 1:1^[12] เมทานอล:แอสีโทไนไทรล์ อัตราส่วน 1:1 โดยสกัดด้วยเครื่อง ultrasonic bath^[10] หรือคาร์บอนเทระคลอไรด์ปริมาณน้อยระดับไมโครลิตร (microextraction) โดยเติมแอสีโทไนไทรล์เป็นสารช่วยกระจายตัว^[16] และยังมีรายงานการสกัดสารละลายตัวอย่างอาหารด้วยเฟสของแข็งที่เป็น silica C18 cartridge^[13]

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

หาภาวะที่เหมาะสมของ HPLC-UV ในการแยกและวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันคาร์ดานอล ไฮโดรจินेट *O,O*-diethyl *O*-(3-pentadecylphenyl)phosphorothioate และ 5-*n*-pentadecyl-2-*tert*-butylphenol ในสารละลายมาตรฐานและส่วนสกัดตัวอย่างไปโอดีเซล หาวิธีที่เหมาะสมในการแยกสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดออกจากตัวอย่างโดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ และศึกษาระยะเวลาที่สารต้านออกซิเดชันยังคงตัวในไปโอดีเซล



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

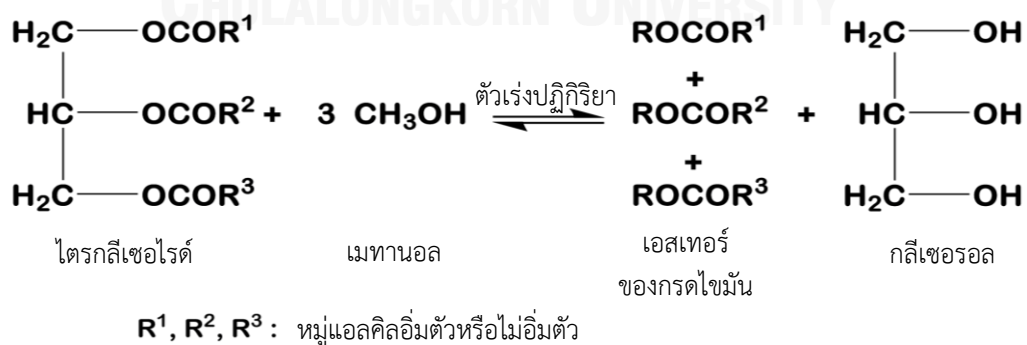
บทที่ 2

ทฤษฎี

2.1 ไบโอดีเซล

2.1.1 ไบโอดีเซลจากปาล์มน้ำมัน

การผลิตไบโอดีเซลที่นิยมใช้ในปัจจุบัน^[1, 18] เป็นการเปลี่ยนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันพืชหรือไขสัตว์ให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลงและมีความซับซ้อนน้อยกว่า เพื่อลดความหนืดและความถ่วงจำเพาะให้เหมาะสมต่อเครื่องยนต์ หนึ่งในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเชิงพาณิชย์ที่นิยมใช้กันคือ กระบวนการทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันหรือแอลกอฮอล์ไลซิส เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์เป็น เอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์โมเลกุลเล็กที่มีปริมาณมากเกินพอพร้อมกับ ตัวเร่งปฏิกิริยา ดังรูปที่ 2.1 วัตถุประสงค์หลักในการผลิตไบโอดีเซลของประเทศไทยได้จากปาล์มน้ำมัน เนื่องจากมีการปลูกปาล์มน้ำมันมากทางภาคใต้ของประเทศ และปาล์มน้ำมันยังเป็นพืชที่ให้ปริมาณน้ำมันต่อไร่สูงสุดเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น โดยปาล์มน้ำมันได้จากการสกัดเปลือกหุ้มภายนอก และเนื้อในของผลปาล์ม ส่วนใหญ่ปาล์มน้ำมันมีสัดส่วนกรดไขมันดังนี้ กรดไขมันชนิดลอริก (C 12:0) ไมริสติก (C 14:0) ปาล์มมิติก (C 16:0) ปาล์มมิโตลิก (C 16:1) สเตียริก (C 18:0) โอเลอิก (C 18:1) ลิโนเลอิก (C 18:2) ลิโนเลนิก (C 18:3) อะราคิติก (C 20:0) แกโดเลอิก (C 20:1) เบเฮนิก (C 22:0) ลิกโนเซอิก (C24:0)^[19]



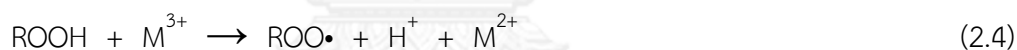
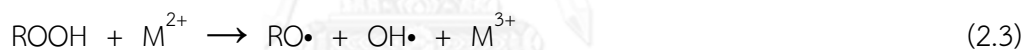
รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์^[11]

2.1.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ไบโอดีเซลมีสัดส่วนและชนิดของกรดไขมันเหมือนน้ำมันพืชหรือไขสัตว์ที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ เนื่องจากกรดไขมันในน้ำมันพืชส่วนใหญ่มีพันธะคู่ในโมเลกุล จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ไบโอดีเซลว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน แสงแดด อุณหภูมิสูง และสิ่งปนเปื้อนที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น โลหะ

กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน มีทั้งหมด 3 ขั้นตอน ดังนี้^[4]

ขั้นที่ 1 ขั้นเริ่มปฏิกิริยา ระยะที่อนุมูลอิสระ (I•) เข้าทำปฏิกิริยากับพันธะคู่ของกรดไขมัน (RH) ในไบโอดีเซล ทำให้อะตอมไฮโดรเจนหลุดออกจากกรดไขมัน เกิดอนุมูลอิสระของกรดไขมัน (R•) ดังสมการเคมี 2.1 ซึ่งอนุมูลอิสระ (I•) อาจเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะอุณหภูมิสูง (thermal dissociation) ดังสมการเคมี 2.2 หรือสัมผัสกับโลหะ (metal catalyzed decomposition) ดังสมการเคมี 2.3-2.4 หรือสัมผัสแสงแดด (photo-oxidation)



ขั้นที่ 2 ขั้นการแผ่ปฏิกิริยา เมื่ออนุมูลอิสระของกรดไขมัน (R•) ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศ เกิดอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ของกรดไขมัน (ROO•) ซึ่งไม่เสถียรและไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน (RH) แล้วรับไฮโดรเจนเกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของกรดไขมัน (ROOH) กับอนุมูลอิสระของกรดไขมันตัวใหม่ (R•) อนุมูลอิสระนี้ก็เข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนอีกครั้ง เกิดเป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องแบบลูกโซ่ ดังสมการเคมี 2.5 – 2.6 ทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของกรดไขมัน



ขั้นที่ 3 ขั้นสิ้นสุดปฏิกิริยา เมื่อความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ (R•) และ (ROO•) เพิ่มสูงขึ้น อนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยากันเอง เกิดผลิตภัณฑ์คงตัว ดังสมการเคมี 2.7 – 2.8 และทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่สิ้นสุดลง



ผลกระทบจากปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาออกซิเดชันไฮโดรเปอร์ออกไซด์ และสามารถแตกตัวเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิ สารประกอบเหล่านี้สามารถส่งผลเสียต่อเครื่องยนต์ได้ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ผลเสียหายต่อเครื่องยนต์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน^[20]

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน	ผลเสียหายต่อเครื่องยนต์
พอลิเมอร์	- เกิดยางเหนียว - การอุดตันในหัวฉีด และชิ้นส่วนอื่นๆ ของเครื่องยนต์
กรดไขมัน	- เกิดโครงสร้างแบบร่างแหของกรดไขมันกลายเป็นพอลิเมอร์ - เกิดการกัดกร่อนของชิ้นส่วนโลหะ - เกิดสบู่
อนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์	- ชิ้นส่วนยางบางชนิดเปราะบาง

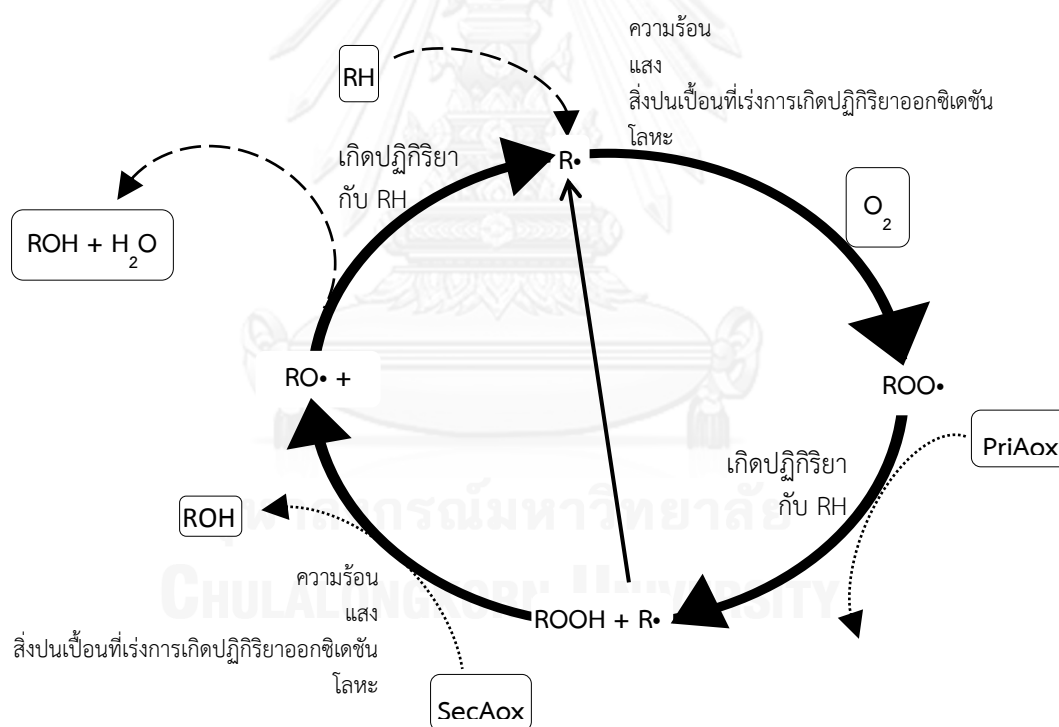
2.1.3 สารต้านออกซิเดชันในไบโอดีเซล

สารต้านออกซิเดชัน เป็นสารเติมแต่งซึ่งช่วยยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งมีทั้งชนิดที่พบในธรรมชาติและชนิดที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยสามารถจำแนกตามกลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็น 2 ชนิด คือ สารต้านออกซิเดชันชนิดปฐมภูมิ และทุติยภูมิ

สารต้านออกซิเดชันชนิดปฐมภูมิ (primary antioxidant, PriAox) ทำหน้าที่ดักจับอนุมูลอิสระ สารกลุ่มนี้ต้องมีหมู่ไฮดรอกซีที่ไวต่อปฏิกิริยา (ฟีนอลที่มีหมู่เกาะ) (ArOH) หรือหมู่เอมีนทุติยภูมิที่ไวต่อปฏิกิริยา (อะโรแมติกเอมีนทุติยภูมิ) ในโมเลกุล จึงสามารถให้อะตอมไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระด้วยอัตราการเข้าทำปฏิกิริยามากกว่าไขมันไม่อิ่มตัว และเมื่อให้อนุมูลไฮโดรเจนแล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีความคงตัวจึงไม่ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอีก ทำให้ปฏิกิริยาถูกชะลอสู่จุดลง ดังสมการเคมี 2.9 – 2.12^[21] สารต้านออกซิเดชันชนิดปฐมภูมิทางการค้า เช่น TBHQ, BHT, BHA และ PG เป็นต้น



สารต้านออกซิเดชันชนิดทุติยภูมิ (secondary antioxidant, SecAox) ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายไฮโดรเปอร์ออกไซด์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่คงตัว ดังสมการเคมี 2.13 เพื่อป้องกันการแตกตัวของไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระแอลคอกซีและอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สารต้านออกซิเดชันชนิดทุติยภูมิมักเป็นสารประกอบฟอสฟอรัสและ Thiosynergist เช่น เอสเทอร์ของกรด 3,3 - thiodipropionic เป็นต้น



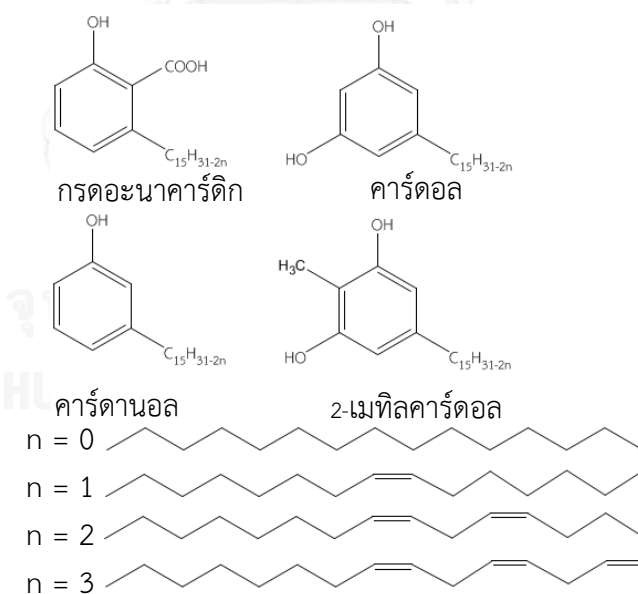
รูปที่ 2.2 วงจรการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและการทำหน้าที่ของสารต้านออกซิเดชัน^[22]

2.2 คาร์ดานอล (Cardanol)

2.2.1 ของเหลวสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ (cashew nut shell liquid, CNSL)

CNSL เป็นสารสกัดธรรมชาติที่ได้จากของเสียของกระบวนการผลิตเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ อีกทั้งยังเป็นสารที่สามารถย่อยสลายได้ทางธรรมชาติ^[23] CNSL จึงได้รับความสนใจจากนักวิจัย เพื่อนำมาพัฒนาในสาขาต่างๆ ทั้งในอุตสาหกรรมพลาสติก^[24, 25] ยาง^[26, 27] โฟม^[28, 29] ไม้^[30, 31] สารลดแรงตึงผิว^[32, 33] การแพทย์^[34, 35] ปิโตรเลียม^[36] และอื่นๆ^[37, 38]

CNSL ตามธรรมชาติประกอบด้วยกรดอะนาคาร์ดิก (anacardic acid) 82.00-83.06% คาร์ดานอล (cardanol) 1.60-1.77% 2-เมทิลคาร์ดอล 2.60-2.76% คาร์ดอล 13.8-14.59%^[39] อย่างไรก็ตามเมื่อ CNSL เข้าสู่กระบวนการสกัด ส่วนประกอบเหล่านี้เปลี่ยนไปตามวิธีการสกัด เมื่อนำ CNSL มาสกัดด้วยความร้อนทำให้กรดอะนาคาร์ดิกเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันกลายเป็นคาร์ดานอล ทำให้มีปริมาณของคาร์ดานอลเพิ่มเป็น 60-65% คาร์ดอล 15-20% พอลิเมอร์ 10% และ 2-เมทิลคาร์ดอลจำนวนเล็กน้อย^[40] โครงสร้างโมเลกุล ดังรูปที่ 2.3

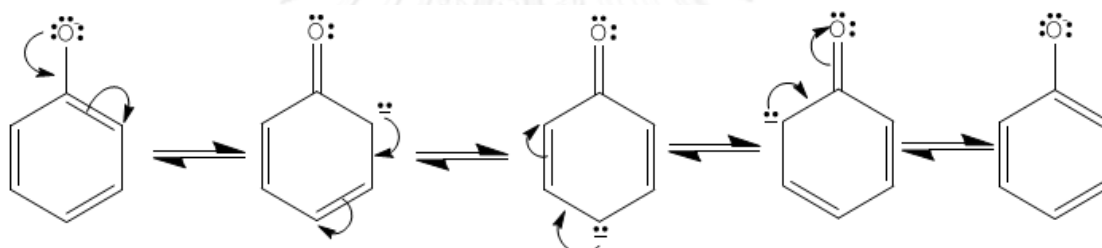


รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของส่วนประกอบของ CNSL^[41]

2.2.2 คาร์ดานอลไฮโดรจิเนต (hydrogenated cardanol, CDN)

คาร์ดานอลเป็นสารประกอบอัลคิลฟีนอล หมู่อัลคิลที่เกาะที่ตำแหน่งเมทา มีทั้งชนิดอิมตัวและไม่อิมตัวผสมกัน ในอัตราส่วนคือสายโซ่ที่อิมตัว 5% สายโซ่ที่มีพันธะคู่หนึ่งตำแหน่ง 49% พันธะคู่สองตำแหน่ง 16.8% และพันธะคู่สามตำแหน่ง 29.3%^[42] หากนำมาทำปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชันในเครื่องปฏิกรณ์แบบความดัน และเร่งปฏิกิริยาด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาแพลเลเดียม 10% บนถ่านกัมมันต์ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง^[43] ได้ผลิตภัณฑ์เป็น CDN หรือ 3-เพนตะเดซิลฟีนอล (3-pentadecylphenol)

สารประกอบฟีนอลเป็นสารประกอบที่มีสมบัติต้านออกซิเดชันที่ดี เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลซึ่งเมื่อให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลมีเสถียรภาพสูง เพราะสามารถเกิดโครงสร้างเรโซแนนซ์ได้ ดังรูปที่ 2.4 ดังนั้นจากโครงสร้างโมเลกุลของ CDN จึงอาจสันนิษฐานว่าสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันปฏิกิริยาได้ดีเช่นกัน^[44]



รูปที่ 2.4 โครงสร้างเรโซแนนซ์ของสารประกอบฟีนอล^[45]

Rodrigues และคณะ^[46] ศึกษาคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของ CDN ในน้ำมันไบโอดีเซลเมล็ดฝ้าย พบว่าน้ำมันไบโอดีเซลเมล็ดฝ้ายเติม CDN 800 ppm มีความเสถียรต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าน้ำมันไบโอดีเซลเมล็ดฝ้ายที่ไม่เติมสารเติมแต่ง 4 เท่า

2.2.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของคาร์ดานอลไฮโดรจิเนต

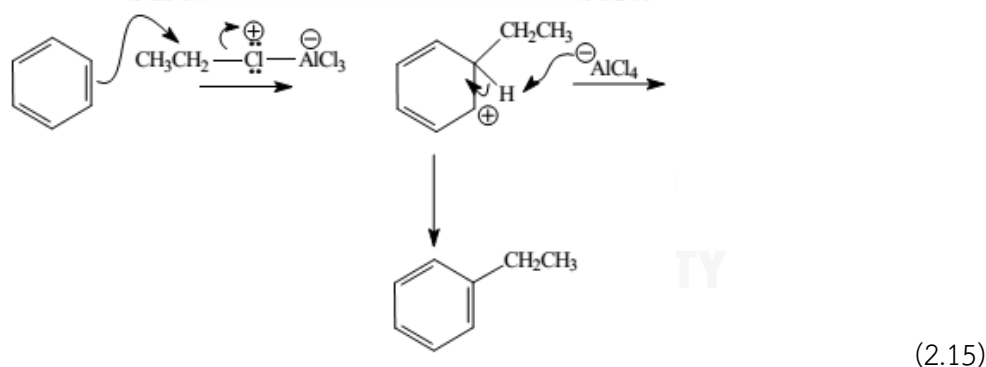
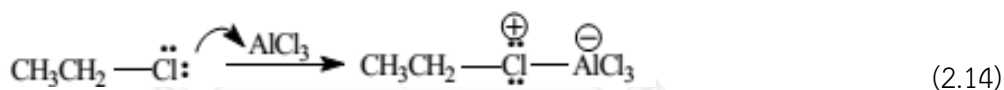
แม้ว่า CDN สามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันชนิดปฐมภูมิได้ดี อย่างไรก็ตามก็ยังมีการพัฒนาอนุพันธ์ของคาร์ดานอลที่มีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันทั้งชนิดปฐมภูมิและทุติยภูมิ เช่น สารต้านออกซิเดชันชนิดปฐมภูมิ 5-*n*-pentadecyl-2-*tert*-butylphenol (PBP)^[47] หรือสารต้าน

ออกซิเดชันชนิดทุติยภูมิ *O,O*-diethyl *O*-(3-pentadecylphenyl)phosphorothioate (DPP)^[48] เป็นต้น

ปฏิกิริยาการเติมหมู่แอลคิล

การเติมหมู่ให้อิเล็กตรอนแก่สารประกอบฟีนอล เป็นการเพิ่มความหนาแน่นของอิเล็กตรอนที่อะตอมออกซิเจนของฟีนอล ทำให้สารประกอบฟีนอลนั้นมีความสามารถต้านออกซิเดชันมากขึ้น^[44] การเติมหมู่แอลคิลบนวงเบนซีนอาจใช้ปฏิกิริยาฟรีเดล-คราฟ อัลคิเลชัน (Friedel-Crafts alkylation) โดยทำปฏิกิริยากับแอลคิลเฮไลด์ พร้อมตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรดลิวอิส กรดลิวอิสที่ใช้ทั่วไปคือ อะลูมิเนียมคลอไรด์ กลไกการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่แอลคิลเริ่มจากกรดลิวอิสเข้าทำปฏิกิริยากับแอลคิลเฮไลด์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ดังสมการเคมี 2.14 จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนนี้แตกตัวเป็นคาร์โบแคทไอออน ซึ่งคาร์โบแคทไอออนเกิดการจัดเรียงตัวใหม่เพื่อให้ได้คาร์โบแคทไอออนที่เสถียรกว่า คือ คาร์โบแคทไอออนชนิดตติยภูมิ ทุติยภูมิและปฐมภูมิ เรียงลำดับจากมากไปน้อย

จากนั้นคาร์โบแคทไอออนนี้จึงเข้าแทนที่วงเบนซีน เกิดสารประกอบเชิงซ้อน แล้วสูญเสียโปรตอน เกิดเป็นแอลคิลเบนซีน ดังสมการเคมี 2.15^[49]

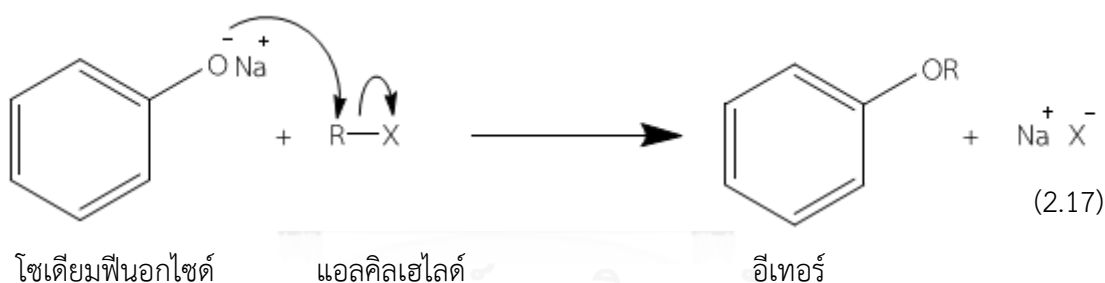
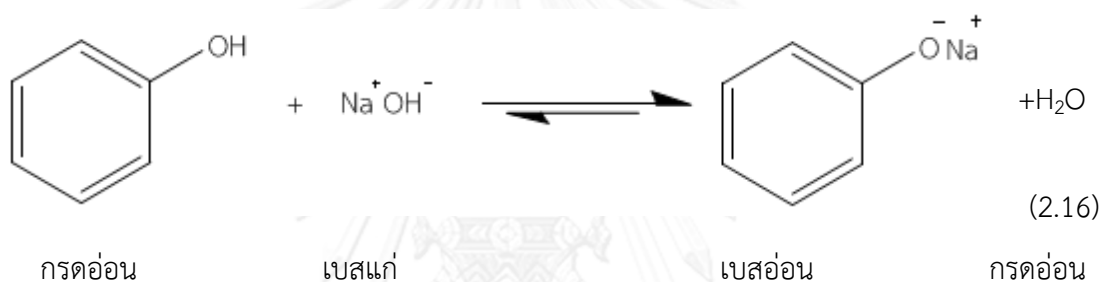


รูปที่ 2.5 กลไกการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่แอลคิล

Rios และคณะ^[47] ทำการศึกษาเปรียบเทียบการต้านออกซิเดชันของ PBP เทียบกับสารต้านออกซิเดชันทางการค้า ซึ่ง PBP มีความคงตัวและช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันดีกว่า Maia และคณะ^[50] ศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของ CDN และ PBP พบว่า PBP มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันที่ดีกว่า CDN

ปฏิกิริยาฟอสฟอรีเลชัน^[45]

สารประกอบฟอสเฟตสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันทุติยภูมิ นอกจากนั้นยังสามารถเป็นสารป้องกันการสีกหรือ และสารป้องกันสนิมในเครื่องยนต์ได้ด้วย สารประกอบฟีนอลสามารถเปลี่ยนเป็นสารประกอบอีเทอร์ด้วยการสังเคราะห์วิลเลียมสัน (Williamson synthesis) เป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบอีเทอร์ที่มีหมู่ R_1 และ R_2 แตกต่างกันหรือสารประกอบอีเทอร์ไม่สมมาตร เริ่มจากการเปลี่ยนสารประกอบฟีนอลเป็นสารประกอบฟีนอกไซด์โดยอาศัยความเป็นกรดของฟีนอลที่มากกว่าแอลกอฮอล์จึงสามารถเปลี่ยนเป็นเกลือโซเดียมฟีนอกไซด์ได้ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังสมการเคมี 2.16 จากนั้นอาศัยปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอกไซด์กับสารประกอบอัลคิลเฮไลด์ เรียกว่าปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ ดังสมการเคมี 2.17



Lopes และ คณะ^[51] ศึกษาการต้านออกซิเดชันของ CDN อนุพันธ์ฟอสฟอเรตของ CDN และ DPP ในน้ำมันแวนีลิก พบว่า DPP สามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันชนิดทุติยภูมิในน้ำมันแวนีลิก และสามารถปรับปรุงคุณสมบัติต้านออกซิเดชันได้ดีกว่า CDN และอนุพันธ์ฟอสฟอเรตของ CDN

2.3 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

เป็นหนึ่งในเทคนิคทางการแบ่งหรือการแยกองค์ประกอบในสารละลายผสม โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละสารซึ่งกระจายอยู่ในสองเฟส คือ เฟสคงที่ (stationary phase) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกจากเฟสคงที่ด้วยการพาของเฟสเคลื่อนที่ที่เวลาแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความสามารถในการกระจายตัวอยู่ระหว่างสองเฟสหรือค่าคงที่ของการกระจายตัว (partition coefficient, K) ดังสมการที่ 2.18 ซึ่งเป็นค่าจำเพาะของสารแต่ละชนิดในระบบและอุณหภูมิใดๆ ค่าคงที่ของการกระจายตัวที่แตกต่างกันนี้ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน โดยสารที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่ออกจากเฟสคงที่เร็วกว่า (K น้อย) ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสเคลื่อนที่หรือสามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสคงที่ก็ออกจากคอลัมน์ช้ากว่า (K มาก) จากนั้นเฟสเคลื่อนที่พาสารเข้าสู่เครื่องตรวจจับ (detector) เพื่อประมวลผลออกมาในรูปแบบกราฟที่เรียกว่าโครมาโทแกรม (chromatogram) โดยทั่วไประบบ HPLC ประกอบด้วยภาชนะรองรับเฟสเคลื่อนที่ ปัมป์ ระบบฉีดตัวอย่าง คอลัมน์ และเครื่องตรวจจับ เรียงลำดับตามการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ดังรูปที่ 2.6

$$\text{partition coefficient } (K) = \frac{\text{ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสคงที่}}{\text{ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่}} \quad (2.18)$$



รูปที่ 2.6 แผนภาพอุปกรณ์ HPLC

2.3.1 เฟสเคลื่อนที่

เป็นเฟสของตัวทำละลาย ทำหน้าที่นำสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC ด้วยปัมป์ ชนิดของตัวทำละลายส่งผลต่อการแยก พิจารณาจากความแรงของตัวทำละลาย (solvent strength) ตัวทำละลายที่มีความแรงมากสามารถชะสารออกมาได้เร็วกว่า แต่หากใช้ตัวทำละลายมีความแรงมากเกินไปอาจทำให้สารที่สนใจแยกออกจากกันไม่ดี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการแยกบางครั้งจึงต้องใช้ตัวทำ

ละลายมากกว่าหนึ่งชนิดผสมกัน โดยอาจผสมกันในอัตราส่วนคงที่ (isocratic elution) หรือไม่คงที่ (gradient elution)

อย่างไรก็ตามการเลือกเฟสเคลื่อนที่ควรมีคุณสมบัติพื้นฐานดังนี้ 1. มีความบริสุทธิ์สูง 2. ไม่ทำปฏิกิริยากับเฟสคงที่ ระบบฉีดตัวอย่าง เครื่องตรวจวัด และสารตัวอย่างจนทำให้สารตัวอย่างเสื่อมสภาพไป 3. ตัวทำละลายต้องผสมเป็นเนื้อเดียวกัน 4. มีความเหมาะสมกับเครื่องตรวจวัด นอกจากนี้ต้องคำนึงถึงราคา จุดเดือด ความหนืด ความเป็นพิษและการติดไฟได้อีกด้วย

อิทธิพลของเฟสเคลื่อนที่^[52]

เมื่อสารเป้าหมายเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องกับการแข่งขันระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลาย (X) กับโมเลกุลของตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ (S) เพื่อเข้าครองตำแหน่งที่ว่างไว้ต่อปฏิกิริยาบนตัวดูดซับหรือเฟสคงที่ สมดุลเกิดขึ้นดังสมการเคมี 2.19 ถ้าการดูดซับของตัวทำละลายดีกว่ามีผลทำให้การดูดซับของตัวถูกละลายลดลง



เมื่อ X_m คือโมเลกุลของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ X_{ads} คือโมเลกุลของตัวถูกละลายในสถานะที่ถูกดูดซับ S_{ads} คือโมเลกุลของตัวทำละลายซึ่งถูกดูดซับที่ผิวของตัวดูดซับ S_m คือโมเลกุลของตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ n คือจำนวนโมเลกุลของตัวทำละลายที่ถูกดูดซับต่อการดูดซับของ X 1 โมเลกุล

2.3.2 ปัม

เป็นส่วนที่ใช้ดูดตัวทำละลายออกจากภาชนะรองรับเฟสเคลื่อนที่ เพื่อพาสารเข้าสู่คอลัมน์ และส่งเข้าเครื่องตรวจวัด และช่วยรักษาความดันของตัวทำละลายให้คงที่ในช่วงอัตราเร็วช่วงใดช่วงหนึ่ง โดยชนิดของปั๊มแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือปั๊มแบบอัตราการไหลคงที่และปั๊มแบบความดันคงที่ สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ปั๊มแบบอัตราไหลคงที่ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือปั๊มประเภทลูกสูบชักและปั๊มประเภทไซริงก์

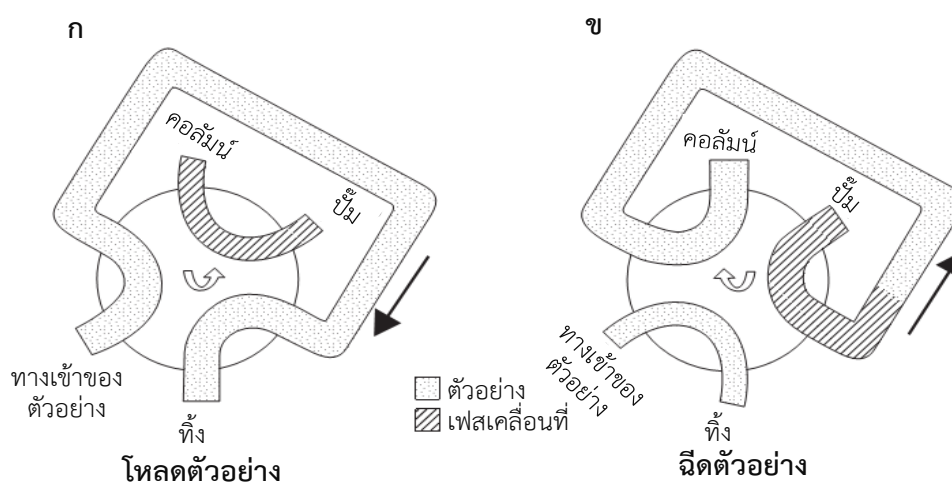
ปั๊มประเภทลูกสูบชัก (reciprocating pump) เป็นปั๊มที่นิยม เนื่องจากสามารถเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วกว่าปั๊มประเภทไซริงก์เพราะมีความจุของปั๊มเพียง 0.1 มิลลิลิตร หลักการทำงานของปั๊มชนิดนี้คือ ก้านสูบ (piston) ของปั๊มจะเคลื่อนที่เข้า-ออก เมื่อลูกสูบเคลื่อนที่เข้าจะเป็นการดัน

เฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ และเมื่อเคลื่อนออกจะเป็นการดึงเฟสเคลื่อนที่จากภาชนะรองรับเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ลูกสูบผ่าน check valve บั้มชนิดนี้ควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ด้วยการปรับอัตราเร็วของการชักลูกสูบ

2.3.3 ระบบฉีดตัวอย่าง

ระบบฉีดตัวอย่าง เป็นส่วนที่นำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์และควบคุมปริมาตรของสารตัวอย่างให้คงที่ ระบบฉีดตัวอย่างที่ดีควรมีลักษณะดังนี้ 1. ใช้ฉีดตัวอย่างได้ทุกชนิด 2. สะดวกต่อการใช้ 3. มีความแม่นยำและเที่ยงของปริมาตรที่ฉีด 4. ฉีดตัวอย่างขณะที่มีแรงดันกลับสูง ๆ ได้ แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ระบบฉีดแบบไซริงก์ และระบบฉีดแบบวาล์ว

ระบบฉีดแบบวาล์วหกพอร์ต เป็นระบบฉีดตัวอย่างเข้าคอลัมน์ที่มีข้อดีและนิยมใช้กันมาก เพราะสามารถทนแรงดันได้ในช่วง 2,000-6,000 ปอนด์/ตารางนิ้ว



รูปที่ 2.7 ระบบฉีดตัวอย่างแบบวาล์วหกพอร์ต โดยลูกศรแทนทิศทางการไหลของสารตัวอย่าง^[53]

จากรูปที่ 2.7 แสดงรูปที่มีลิ้นเปิดปิดหกทาง รูป 2.7 (ก) แสดงรูปขณะฉีดตัวอย่างเข้าไปเก็บไว้ โดยไซริงก์ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่าง (sample loop) ซึ่งมีปริมาตรคงที่ (fixed loop injector) รูป 2.8 (ข) เมื่อฉีดสารเข้าไปหมดแล้ววาล์วจะหมุนให้ลิ้นด้านหนึ่งปิดและเปิดอีกด้านหนึ่ง ทำให้เฟสเคลื่อนที่ไล่สารตัวอย่างทั้งหมดเข้าสู่คอลัมน์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถดูดสารตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่างซึ่งมีสารละลายอยู่ก่อนแล้ว เมื่อหมุนลิ้นไปที่ตำแหน่งฉีดสารละลายจะพาสารตัวอย่างทั้งหมดเข้าไปในคอลัมน์ (syringe loop injector)

2.3.4 คอลัมน์

คอลัมน์ HPLC คือท่อทรงกระบอกซึ่งภายในบรรจุเฟสคงที่ ทำหน้าที่ขนส่งสารตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่ โดยทั่วไปคอลัมน์มีความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางให้เลือกหลากหลาย เช่น ความยาว 5-30 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคเฟสคงที่ 3-10 ไมโครเมตร

ชนิดของเฟสคงที่มีหลายประเภท โดยอาจแบ่งตามกลไกการแยก เช่น การดูดซับ การกระจายตัว การแลกเปลี่ยนไอออน การคัดเลือกตามขนาด และบอนด์เฟส เป็นต้น ระบบ HPLC ที่ได้รับความนิยมคือแบบรีเวอร์สเฟสซึ่งเป็นหนึ่งในระบบบอนด์เฟส คอลัมน์ในระบบนี้บรรจุเฟสคงที่ชนิดซิลิกาตัดแปรทางเคมี ประเภทไม่มีขั้ว คือเกิดพันธะโควาเลนต์กับอัลคิล C8 หรือ C18 เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้จึงต้องเป็นสารละลายผสมของสารมีขั้ว เช่น แอซีโทไนไตรล์ น้ำ และเมทานอล เป็นส่วนใหญ่ ระบบนี้เหมาะสำหรับแยกสารตัวอย่างประเภทมีขั้ว

คอลัมน์ C18 คอลัมน์ประเภทนี้ได้รับความนิยมเนื่องจากสามารถนำมาใช้แยกทั้งสารประกอบที่ไม่แตกตัว และแตกตัวเป็นไอออนได้ บางครั้งสามารถแยกสารประเภทนี้พร้อมกันได้ เป็นคอลัมน์ที่ค่อนข้างเสถียร สมดุลในคอลัมน์จะเกิดขึ้นได้รวดเร็ว และเหมาะกับเฟสเคลื่อนที่ระบบเกรเดียนต์

กลไกการแยกของคอลัมน์ C18

กลไกการแยกของ HPLC แบบรีเวอร์สเฟส เป็นทั้งแบบดูดซับและแบบกระจายตัว คือสารตัวอย่างเกิดอันตรกิริยากับหมู่ฟังก์ชัน C18 บนผิวของซิลิกาเจล โดยอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นมีหลายประเภท ทั้งแบบไม่เฉพาะเจาะจง เช่น เกิดการกระจายหรือแรง Van der Waal และแบบเฉพาะ เช่น อันตรกิริยาเกี่ยวกับขั้วคู่ถาวร (permanent dipoles) หรืออันตรกิริยาเกี่ยวกับการให้และรับอิเล็กตรอน (electron donor-acceptor interactions) เช่น การเกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วนใหญ่จะเกิดจากอันตรกิริยากับหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้วของตัวถูกละลาย

ความไม่ชอบน้ำของสารที่แตกต่างกันนี้ส่งผลต่อลำดับของการชะออกจากคอลัมน์ สารที่มีความไม่ชอบน้ำต่ำโดนชะล้างออกมาก่อน เนื่องจากโดนดูดซับบนตัวดูดซับ (ไม่มีขั้ว) น้อย แต่ชอบที่จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ (มีขั้ว) มาก จึงโดนชะออกมาก่อน ส่วนสารที่มีความไม่ชอบน้ำสูงกว่าจะถูกดูดซับบนตัวดูดซับมาก ทำให้ถูกชะออกมาทีหลัง

อุณหภูมิคอลัมน์^[53]

เนื่องจากอุณหภูมิเป็นตัวแปรสำคัญในระบบ HPLC ที่มีผลกระทบต่อค่า k (retention factor) ส่วนมากกรีเทนชันไทม์หรือ t_R ของโมเลกุลตัวถูกละลายขึ้นกับอุณหภูมิตามสมการ Van't Hoff ดังสมการที่ 2.20

$$\log k = A + \frac{B}{T_k} \quad (2.20)$$

เมื่อ A และ B เป็นค่าคงที่อิสระต่ออุณหภูมิ T_k คืออุณหภูมิคอลัมน์ ค่า k มักลดตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น โดยค่า k ลดลง 1-2% ต่ออุณหภูมิคอลัมน์ที่เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส เช่น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 50 องศาเซลเซียสจะทำให้ค่า k ลดลง 2 เท่า อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพการแยกลดลง แต่ทำให้ความสูงพีคเพิ่มขึ้น

นอกจากนั้นอุณหภูมียังส่งผลต่อจำนวนเพลททางทฤษฎี (N) เพิ่มขึ้นและการลดลงของความดัน ในการใช้งานจริงจำกัดอุณหภูมิไม่เกิน 80 องศาเซลเซียส เพราะอายุการใช้งานของคอลัมน์ HPLC มักสั้นลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส

2.3.5 เครื่องตรวจวัด

เป็นส่วนสำคัญในการมอนิเตอร์สารที่ออกจากคอลัมน์ เครื่องตรวจวัดที่ได้รับความนิยมคือ อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยโครมาโทแกรมได้จากการพล็อตระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับกรีเทนชันไทม์ (retention time, t_R)

อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์มีหลักการทำงานโดยอาศัยความสามารถดูดกลืนพลังงานของโมเลกุลในช่วงรังสีอัลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 200–400 นาโนเมตร) และวิสิเบิล (ความยาวคลื่น 400–700 นาโนเมตร) ของสารตัวอย่าง เมื่อโมเลกุลรับพลังงานจากแสงแล้ว อิเล็กตรอนวงนอกของโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานที่เรียกว่าอิเล็กตรอนิกทรานสิชัน แล้ววัดปริมาณของแสงที่ผ่านทะลุออกมาเปรียบเทียบกับแสงที่ทะลุออกมาเมื่อไม่มีสารตัวอย่าง ค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงปริมาณเป็นไปตามกฎของเบียร์ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย (A) มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารที่สามารถดูดกลืนแสง (c) ดังสมการที่ 2.21

$$A = kc \quad (2.21)$$

เหมาะสำหรับตรวจวัดสารที่มีหมู่ฟังก์ชันไม่อิ่มตัวซึ่งสามารถดูดกลืนพลังงานแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตและวิสิเบิลได้ หรือหมู่โครโมฟอร์ โมเลกุลที่มีหมู่โครโมฟอร์เรียกว่าโครโมเจน ชนิดของโครโมฟอร์แบ่งอย่างง่ายเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ 1. โครโมฟอร์เดี่ยว มีพันธะไม่อิ่มตัวระหว่าง 2 อะตอมของธาตุที่ไม่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว เช่น $>C=C<$ 2. โครโมฟอร์คอนจูเกต มีพันธะไม่อิ่มตัวระหว่าง 2 อะตอมของธาตุที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว เช่น $>C=O$ 3. โครโมฟอร์ที่มีวงเบนซีน หรือสารประกอบอะโรมาติก ปัจจุบันอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือชนิดกำหนดความยาวคลื่น ชนิดความยาวคลื่นแปรผันได้ และชนิดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ สำหรับอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดความยาวคลื่นแปรผันได้ ซึ่งใช้ใน งานวิจัยนี้ ประกอบด้วยหลอดควิที่เรียมและหลอดทังสเตน หลอดทั้งสองนี้สามารถใช้วัดแสงได้ในช่วง 190–800 นาโนเมตร และมีโมโนโครเมเตอร์ เพื่อใช้สำหรับเลือกความยาวคลื่นตามที่ต้องการได้^[54]

2.3.6 ค่าพารามิเตอร์

จำนวนเพลททางทฤษฎี (Theoretical plate, N)

เป็นค่าซึ่งบอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) โดยพิจารณาจากความกว้างของพีค อ้างอิงถึงทฤษฎีสมมติซึ่งจำลองการคำนวณเพลทย่อยๆ ภายในคอลัมน์ โดยเมื่อสารอยู่ในเพลทย่อย สมดุลของการกระจายระหว่างตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่เกิดขึ้น ดังนั้นจำนวนเพลททางทฤษฎีสูง จึงแสดงถึงจำนวนครั้งของสมดุลซึ่งเกิดขึ้นในคอลัมน์มาก สูตรในการคำนวณ N ดังสมการที่ 2.22

$$N = 16 \times \frac{t_R^2}{W_b} = 5.54 \times \frac{t_R^2}{W_h} \quad (2.22)$$

เมื่อ t_R คือเวลาที่สารเป้าหมายใช้ในการเคลื่อนที่ภายในคอลัมน์หรือรีเทนชันไทม์ W_b คือความกว้างของพีคที่ความสูง 50% จากฐานพีค W_h คือความกว้างของพีคที่ฐาน ค่า N ที่มาก แสดงถึงประสิทธิภาพของการแยกสารต่อเฟสคงที่ในคอลัมน์สูง ความกว้างของพีคหรือแถบของการแยกมีค่าน้อย ในขณะที่ค่า N ที่น้อย บอกถึงประสิทธิภาพคอลัมน์ต่ำ และความกว้างของพีคหรือแถบของการแยกกว้าง

รีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor, k)

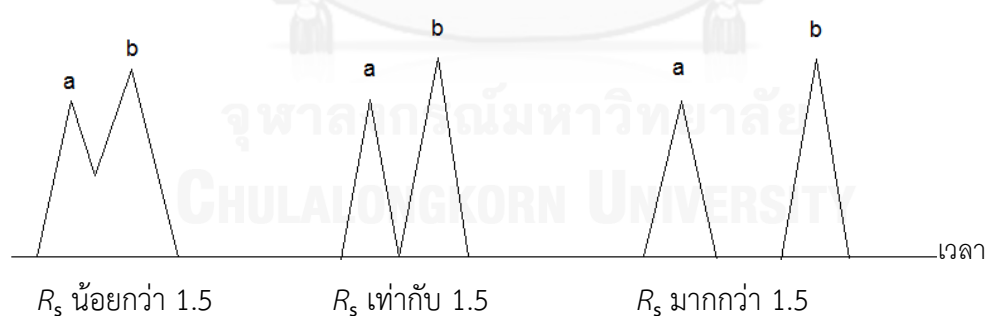
เป็นตัวชี้ตำแหน่งของสาร โดยการเปรียบเทียบ t_R เวลาเคลื่อนที่ของสารเป้าหมายที่ถูกหน่วง อยู่ในคอลัมน์กับ t_m เวลาเคลื่อนที่ของสารที่ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์ หรือคำนวณจาก K คูณกับ อัตราส่วนของปริมาตรของเฟสคงที่กับเฟสเคลื่อนที่ ดังสมการที่ 2.23 ดังนั้นรีเทนชันแฟกเตอร์จึงบอก ถึงจำนวนเท่าของเวลาที่สารเป้าหมายอยู่ในเฟสคงที่ต่อเวลาที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่ หรือความสามารถ จับยึดของสารเป้าหมายในเฟสคงที่

$$k = \frac{t_R - t_m}{t_m} = K \times \frac{V_s}{V_m} \quad (2.23)$$

ความสมบูรณ์ของการแยก (Resolution, R_s)

การปรับปรุงประสิทธิภาพของการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี อาจพิจารณาจาก R_s ซึ่งบอกถึงความสามารถในการแยกพีกสองพีกซึ่งอยู่ใกล้กัน สูตรในการคำนวณ R_s ดังสมการที่ 2.24 การแยกที่สมบูรณ์พิจารณาจากค่า R_s ที่มากกว่า 1.5 ดังรูปที่ 2.8

$$R_s = 2 \times \frac{\Delta t_R}{W_{b,1} + W_{b,2}} = 1.177 \times \frac{\Delta t_R}{W_{h,1} + W_{h,2}} = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{k}{k+1} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \quad (2.24)$$



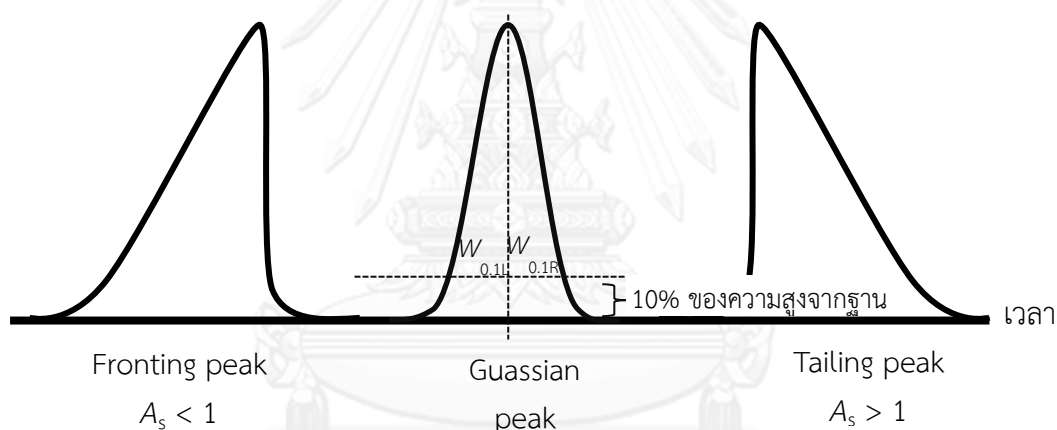
รูปที่ 2.8 ลักษณะการแยกของพีกที่ R_s ต่างๆ

ความไม่สมมาตรของพีค (asymmetry factor, A_s)

เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ ความไม่สมมาตรของพีคอาจเกิดจาก ปริมาณสารตัวอย่างที่มากเกินไป หรือเป็นพีคของสารมากกว่า 1 ชนิดที่ไม่แยกออกจากกัน หรือเกิด ความผิดปกติของเฟสคงที่ในคอลัมน์ หรือเกิดปัญหาในการฉีดสารตัวอย่าง โดยคำนวณ A_s ดังสมการ 2.25

$$A_s = \frac{W_{0.1R}}{W_{0.1L}} \quad (2.25)$$

เมื่อ $W_{0.1R}$ คือความกว้างด้านขวาของพีคที่ความสูง 10% จากฐานพีค $W_{0.1L}$ คือความกว้าง ด้านซ้ายของพีคที่ความสูง 10% จากฐานพีค ช่วงค่า A_s ที่ยอมรับได้คือ 0.8-1.2 เรียกว่าพีค Gaussian ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ลักษณะของความไม่สมมาตรของพีคแบบต่างๆ

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.4 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับ HPLC จุดประสงค์ของขั้นตอนนี้คือเพื่อเตรียม สารละลายที่สามารถเป็นตัวแทนของสารตัวอย่าง ทำซ้ำได้ สารตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน และเหมาะสม สำหรับฉีดเข้าไปในคอลัมน์ การเลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างนั้นต้องคำนึงถึง 1. การลดสารรบกวน 2. ไม่ทำความเสียหายแก่คอลัมน์ 3. เข้ากันได้ดีกับวิธีการแยก HPLC และวิธีการตรวจวัด สารละลาย ตัวอย่างควรละลายได้ในเฟสเคลื่อนที่ ไม่มีผลกระทบต่อการยึดจับของสารตัวอย่างหรือความสมบูรณ์ ในการแยก และไม่รบกวนกับวิธีตรวจวัด^[53]

ประสิทธิภาพของการสกัดหรือร้อยละของการกลับคืน (extraction efficiency หรือ %recovery) คือร้อยละของสารเป้าหมายที่ถูกสกัดออกไปได้ ดังสมการที่ 2.26

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ค่าจริง}} \times 100 \quad (2.26)$$

2.4.1 การละลาย

ละลายสารตัวอย่างในตัวทำละลายซึ่งสามารถเข้ากันได้กับเฟสเคลื่อนที่ และความแรงของตัวทำละลายน้อยกว่าเฟสเคลื่อนที่ เพื่อหลีกเลี่ยงฟีกที่กว้างมากเกินไปหรือเกิด tailing peak

2.4.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

เป็นการแยกสารผสมที่เป็นของเหลวด้วยหลักการละลายได้ของสิ่งที่ถูกวิเคราะห์ในตัวทำละลายที่แตกต่างกันระหว่างเฟสสองเฟสคือเฟสตัวอย่างและเฟสตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยยึดหลักการ like dissolves like ตัวทำละลายที่ใช้ต้องละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีกว่าและไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวอย่าง

การสกัดด้วยตัวทำละลายเกี่ยวข้องกับการกระจายของสารระหว่างตัวทำละลายสองชนิดซึ่งจะมีอัตราส่วนคงที่ที่อุณหภูมิหนึ่ง ค่าคงที่นี้เรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (distribution coefficient หรือ partition coefficient, K_d) เช่น ในการสกัดสาร A จากตัวทำละลายที่ 1 ไปยังตัวทำละลายที่ 2

2.5 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

2.5.1 พื้นที่ใต้พีค (Peak area)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณอาจใช้พื้นที่ใต้พีค ซึ่งได้จากสัญญาณไฟฟ้าของเครื่องตรวจวัดและมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารที่ผ่านเข้าไปในเซลล์ของเครื่องตรวจวัด จึงสามารถนำไปใช้ในการหาปริมาณของสารตัวอย่างได้ สำหรับ HPLC การใช้พื้นที่พีคเพื่อนำไปหาปริมาณของสารตัวอย่างนั้น ได้จากความสัมพันธ์ของปริมาณของสารหรือความเข้มข้นของสารเป็นปฏิภาคโดยตรงกับพื้นที่พีค ดังสมการที่ 2.27^[52]

$$C = f \times A \quad (2.27)$$

เมื่อ C คือความเข้มข้น f คือแฟกเตอร์ของการตอบสนองในหน่วยค่าการดูดกลืนแสงต่อความเข้มข้นและ A คือพื้นที่ใต้พีค เนื่องจากสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดด้วยความเร็วของเฟสเคลื่อนที่ และถ้าใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คงที่ สารตัวอย่างแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วที่กัน ค่า C จึงไม่ขึ้นอยู่กับอัตราการไหล

2.5.2 การหาปริมาณสารตัวอย่าง

ในการหาปริมาณสารตัวอย่าง นอกจากต้องทราบพื้นที่ใต้พีค ต้องทำกราฟสอบเทียบของสารมาตรฐาน ซึ่งมีวิธีต่างๆ กัน ดังนี้

1. วิธี area normalization

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ สารทุกชนิดต้องโดนชะออกจากคอลัมน์และตรวจวัดได้ คำนวณร้อยละขององค์ประกอบ A จากพื้นที่ใต้พีค A เทียบกับพื้นที่ใต้พีคของทุกองค์ประกอบรวมกัน

2. วิธี Internal standard

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ ใช้วิธีเติมสารมาตรฐานที่เป็นสารต่างชนิดกับสารตัวอย่าง (internal standard) ซึ่งทราบความเข้มข้นลงในสารตัวอย่างเพื่อใช้เปรียบเทียบ เทคนิคนี้มีข้อดีที่สารต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของสารตัวอย่างไม่จำเป็นต้องถูกชะออกมาทุกตัว เพียงแค่สารเป้าหมายและ internal standard ก็พอ แต่ก็มีข้อจำกัดคือ 1) internal standard ที่ใช้ต้องเป็นสารที่ไม่เป็นองค์ประกอบ หรือมีอยู่ในสารตัวอย่าง 2) internal standard ต้องแยกจากสารตัวอย่างได้อย่าง

สมบูรณ์ 3) internal standard ต้องเป็นสารบริสุทธิ์ 4) internal standard ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารองค์ประกอบในสารตัวอย่าง 5) ความเข้มข้นของ internal standard ต้องใกล้เคียงกับสารเป้าหมาย 6) internal standard ควรมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดีในช่วงความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์

3. วิธี External standard

เทคนิคนี้มีความซับซ้อนน้อยกว่าวิธี internal standard โดยการใช้กราฟสอบเทียบจากสารมาตรฐานที่ใช้ความเข้มข้นต่างกันกับพื้นที่ใต้พีค หาปริมาณของสารตัวอย่างจากการวิเคราะห์ด้วยสภาวะเดียวกับสารมาตรฐาน จากนั้นหาพื้นที่ใต้พีคแล้วนำไปอ่านจากกราฟสอบเทียบ^[52]

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง รุ่น SI-234 บริษัท Denver instrument จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.2 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน รุ่น Rotavapor® R-3 บริษัท BÜCHI Labortechnik AG จำกัด ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.1.3 เครื่องเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรมิเตอร์ รุ่น Bruker ACF-200 บริษัท Bruker จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.4 เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น HP8453 บริษัท ฮิวเลตต์-แพคการ์ด จำกัด ประเทศไทย
- 3.1.5 เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น Bruker micrOTOF-QII บริษัท Bruker จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.6 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) รุ่น e2695 ต่อกับตัวกำจัดฟองอากาศแบบสูญญากาศ บั๊มควาทอลี ถาดใส่ตัวอย่างอัตโนมัติ และเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ บริษัท Waters จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.7 คอลัมน์ HPLC คาร์ทริดจ์ LiChroCART® 125-4 ยาว 125 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.0 มิลลิเมตร บรรจุด้วย LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (ขนาด 5 ไมโครเมตร) บริษัท เมอร์ค จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.1.8 การ์ดคอลัมน์ รุ่น LiChroCART® 4-4 บริษัท เมอร์ค จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.1.9 ชุดกรองโม่บายน์เฟส ประกอบด้วยขวดรูปชมพู่ 1000 มิลลิลิตร กรวยกรองแก้ว 250 มิลลิลิตร ฐานรองทำด้วยแก้วเคลือบฟริตขนาด 47 มิลลิเมตร และแคลมป์อะลูมิเนียมชุบผิว บริษัท PALL จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.10 เครื่องกวนสารแบบวอร์เท็กซ์ รุ่น Vortex-Genie® 2 บริษัท Scientific Industries จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 3.1.11 เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น Hettich Universal 320R บริษัท DJB Labcare จำกัด ประเทศอังกฤษ
- 3.1.12 แผ่นกรองชนิดไนลอนและชนิดพอลิเอทเธอร์ฟลูออโรเอทิลีน เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตรหนา 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Alltech Associates จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.13 ไชริงก์ฟิลเตอร์ชนิดไนลอนขนาด 13 มิลลิเมตร ความละเอียด 0.45 ไมครอน บริษัท Chrom Tech จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.14 ขวดไวอัล ขนาด 2 มิลลิลิตร พร้อมฝาชนิดพอลิเอทเธอร์ฟลูออโรเอทิลีน บริษัท Waters จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.15 หลอดพลาสติกเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร พร้อมฝาเกลียว บริษัท U&V holding ประเทศไทย
- 3.1.16 ไมโครปิเปตต์ ช่วงการปิเปตต์ 0.5-10 และ 10-100 และ 100-1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.1.17 ไมโครปิเปตต์ทีป บริษัท axygen scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.18 หลอดฉีดยาชนิดพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร บริษัท Nipro จำกัด ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.19 เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง Milli-Q Ultrapure water system บริษัท Elga จำกัด ประเทศอังกฤษ

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 ไฮโดรจินเนตคาร์ดานอล : ศูนย์วิจัยเคมีอินทรีย์ชีวภาพแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
- 3.2.2 ไดเอทิลคลอโรโทโอฟอสเฟต : บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศอเมริกา
- 3.2.3 เทอร์ทบิวทิลคลอไรด์ : บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศอเมริกา
- 3.2.4 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ : บริษัท เมอร์ค จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.2.5 ซิงค์คลอไรด์ : บริษัท Carlo erba reagent จำกัด ประเทศอิตาลี
- 3.2.6 กรดไฮโดรคลอริก 37% : บริษัท RCI Labscan จำกัด ประเทศไทย
- 3.2.7 เอทิลอะซีเตต : บริษัท เมอร์ค จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.2.8 แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต : บริษัท เมอร์ค จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.2.9 คลอโรฟอร์ม : บริษัท RCI Labscan จำกัด ประเทศไทย

- 3.2.10 เฮกเซน : บริษัท RCI Labscan จำกัด ประเทศไทย
- 3.2.11 ไดคลอโรมีเทน : บริษัท RCI Labscan จำกัด ประเทศไทย
- 3.2.12 โซเดียมไบคาร์บอเนต : บริษัท เมอร์ค จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.2.13 ซิลิกาเจล 60 : บริษัท เมอร์ค จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.2.14 ไทโอยูเรีย : บริษัท เมอร์ค จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.2.15 เมทานอล (MeOH) : บริษัท เมอร์ค จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.2.16 อะซีโตนไทรล์ (ACN) : บริษัท เมอร์ค จำกัด ประเทศเยอรมนี
- 3.2.17 ไบโอดีเซลจากปาล์มน้ำมัน : บริษัท บางจากปิโตรเลียม จำกัด (มหาชน) ประเทศไทย

3.3 สังเคราะห์อนุพันธ์ของ hydrogenated cardanol (CDN)

3.3.1 5-*n*-pentadecyl-2-*tert*-butylphenol (PBP)

ผสม CDN 1000 มิลลิกรัม (3.31 มิลลิโมล) ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) 90 มิลลิกรัม (0.662 มิลลิโมล) และเทอร์ตบิวทิลคลอไรด์ (C_4H_9Cl) 305.5 มิลลิกรัม (3.31 มิลลิโมล) ละลายด้วยไดคลอโรมีเทนปราศจากน้ำ (dry CH_2Cl_2) 20 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมสามคอที่ต่อเข้ากับเทอร์โมมิเตอร์ และคอนเดนเซอร์ รีฟลักซ์ของผสมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน และกวนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนกระทั่งปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ โดยติดตามปฏิกิริยาด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ที่ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง รินใส่กรวยแยก สกัดด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 5% โดยปริมาตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 3 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 20 มิลลิลิตร 5 ครั้ง เก็บส่วนสกัดจากชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ เติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตเพื่อดูดน้ำ และระเหยแบบลดความดัน แยกผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซิลิกาเจล 60) โดยใช้สารละลายผสมของเฮกเซนกับเอทิลอะซิเตตในอัตราส่วน 95:5 รายงานผลและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.1

3.3.2 O,O-diethyl O-(3-pentadecylphenyl)phosphorothioate (DPP)

ผสม CDN 1000 มิลลิกรัม (3.31 มิลลิโมล) กับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 186 มิลลิกรัม (3.31 มิลลิโมล) ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร รินสารละลายใส่ขวดก้นกลมสามคอที่ต่อเข้ากับเทอร์โมมิเตอร์ และคอนเดนเซอร์ เติมไดเอทิลคลอโรไทโอฟอสเฟต $((\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}(\text{S})\text{Cl})$ 624.2 มิลลิกรัม (3.31 มิลลิโมล) รีฟลักซ์สารละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน และกวนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนกระทั่งปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ โดยติดตามปฏิกิริยาด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทิ้งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร จากนั้นปรับความเป็นกรด-เบสของผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้เป็นกลางด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 5% โดยปริมาตร เทในกรวยแยก สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เก็บส่วนสกัดจากชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ เติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เพื่อดูดน้ำ และระเหยแบบลดความดัน แยกผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ซิลิกาเจล 60) โดยใช้สารละลายผสมของเฮกเซนกับเอทิลอะซีเตต ในอัตราส่วน 95:5 รายงานผลและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.2

3.4 การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย HPLC-UV

3.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย CDN, PBP และ DPP ความเข้มข้น 100 ppm โดยเติม CDN, PBP และ DPP หนัก 25 มิลลิกรัม ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย MeOH จนได้ปริมาตรของสารละลายเท่ากับ 25 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับ HPLC-UV

หาภาวะที่เหมาะสมของ HPLC-UV ในการแยกเพื่อวิเคราะห์ CDN, PBP และ DPP ในตัวทำละลาย MeOH และในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอติเซล (สกัดด้วยตัวทำละลายตามขั้นตอนการทดลองในหัวข้อ 3.4.3) โดยศึกษาความยาวคลื่น อุณหภูมิคอลัมน์ ชนิดและอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ด้วยอัตราส่วนผสมแบบอัตราส่วนคงที่และแปรผัน รายงานผลและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.2

3.4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยตัวทำละลายของสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างไปโอดีเซล

เตรียมตัวอย่างไปโอดีเซล 3 ชุด ชุดที่ 1 คือตัวอย่างไปโอดีเซลที่ไม่มีสารต้านออกซิเดชัน ชุดที่ 2 คือตัวอย่างไปโอดีเซลที่เติมสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 10 ppm ชุดที่ 3 คือตัวอย่างไปโอดีเซลที่เติมสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 40 ppm จากนั้นหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านออกซิเดชันด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลาย ปริมาณของตัวทำละลาย และอุณหภูมิในการกำจัดเอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัวและไตรกลีเซอไรด์

3.4.3.1 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

ปิเปตต์ตัวอย่างไปโอดีเซลชุดที่ 1 (ไม่มีสารต้านออกซิเดชัน) ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตรลงในหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร ทั้งหมด 15 หลอด ปิเปตต์ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาตร 9.00 มิลลิลิตรลงในหลอดเซนตริฟิวก์ โดยหลอดที่ 1-5 เติมตัวทำละลาย MeOH หลอดที่ 6-10 เติมตัวทำละลาย ACN และหลอดที่ 11-15 เติมตัวทำละลาย MeOH:ACN (1:1 โดยปริมาตร) แล้วเขย่าด้วยวอร์เทกซ์เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 4000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที เก็บส่วนสกัดตัวทำละลายอินทรีย์ของแต่ละหลอดมากรองด้วยไซริงก์ฟิลเตอร์

ปิเปตต์ตัวอย่างไปโอดีเซลชุดที่ 2 (เติมสารต้านออกซิเดชันความเข้มข้น 10 ppm) ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตรลงในหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร ทั้งหมด 15 หลอด จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็น MeOH, ACN และ MeOH:ACN (1:1 โดยปริมาตร) ในทำนองเดียวกัน

ปิเปตต์ตัวอย่างไปโอดีเซลชุดที่ 3 (เติมสารต้านออกซิเดชันความเข้มข้น 40 ppm) ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตรลงในหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร ทั้งหมด 15 หลอด จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็น MeOH, ACN และ MeOH:ACN (1:1 โดยปริมาตร) ในทำนองเดียวกัน

ให้นำส่วนสกัดตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละหลอด (45 หลอด) ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.2 รายงานผลและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.3.1

3.4.3.2 ปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์

ทำการทดลองในทำนองเดียวกับ 3.4.3.1 โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH ที่ปริมาตรต่างๆ กัน คือ 5, 7 และ 11 มิลลิลิตร (9 มิลลิลิตร ใช้ผลจากการทดลอง 3.4.3.1) โดยแต่ละปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ทำซ้ำ 5 หลอด แล้วนำส่วนสกัดตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละหลอด (45 หลอด) ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองจากหัวข้อ 3.4.2 รายงานผลและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.3.2

3.4.3.3 อุณหภูมิในการกำจัดเอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัวและไตรกลีเซอไรด์

ทำการทดลองในทำนองเดียวกับ 3.4.3.1 โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH 9.00 มิลลิลิตร หลังจากปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบ/นาที เวลา 5 นาทีแล้ว ดูดส่วนสกัดตัวทำละลายลงในหลอดเซนตริฟิวก็อีกหลอดหนึ่ง แล้วนำไปเก็บในที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น) และ -4 องศาเซลเซียส (ตู้แช่แข็ง) โดยแต่ละอุณหภูมิทำซ้ำ 5 หลอด (ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ผลจากการทดลอง 3.4.3.1) นำส่วนใสมากรองด้วยไซริงก์ฟิลเตอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองจากหัวข้อ 3.4.2 รายงานผลและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.3.3

3.4.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

3.4.4.1 ขีดจำกัดต่ำสุดของการวัด และขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ

เตรียมสารละลายของสารต้านออกซิเดชันแต่ละชนิดในตัวทำละลาย MeOH (แยกภาชนะ) ที่ความเข้มข้น C_D (ใกล้เคียง LOD) ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.2 แล้ว ให้อัตราส่วนของความสูงของพีคต่อสัญญาณรบกวน (S_D) ใกล้เคียง 3 แล้ว คำนวณ $LOD = 3C_D/S_D$

เตรียมสารละลายของสารต้านออกซิเดชันแต่ละชนิดในตัวทำละลาย MeOH (แยกภาชนะ) ที่ความเข้มข้น C_Q (ใกล้เคียง LOQ) ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.2 แล้ว ให้อัตราส่วนของความสูงของพีคต่อสัญญาณรบกวน (S_Q) ใกล้เคียง 10 แล้ว คำนวณ $LOQ = 10C_Q/S_Q$ ^[55]

รายงาน LOD และ LOQ เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 5 ครั้งและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.4.1

3.4.4.2 ช่วงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับสัญญาณ

เตรียมสารละลายของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ LOQ, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm วิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ซ้ำ 10 ครั้ง ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.2 สร้างกราฟสอบเทียบจากสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ กับสัญญาณที่วัดได้ ทำซ้ำ 10 ครั้ง รายงานผลและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.4.2

3.4.4.3 ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการ และขีดจำกัดการหาปริมาณของวิธีการ (method quantification limit, MQL)

เตรียมตัวอย่างไบโอดีเซลที่เติมสารต้านออกซิเดชันแต่ละชนิด (แยกภาชนะ) ที่ความเข้มข้น C_{MD} (ใกล้เคียง MDL) ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.2 แล้ว ให้อัตราส่วนของความสูงของพีคต่อสัญญาณรบกวน (S_{MD}) ใกล้เคียง 3 แล้ว คำนวณ $MDL = 3C_{MD}/S_{MD}$

เตรียมตัวอย่างไบโอดีเซลที่เติมสารต้านออกซิเดชันแต่ละชนิด (แยกภาชนะ) ที่ความเข้มข้น C_{MQ} (ใกล้เคียง MQL) ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.2 แล้ว ซึ่งให้อัตราส่วนของความสูงของพีคต่อสัญญาณรบกวน (S_{MQ}) ใกล้เคียง 10 แล้ว คำนวณ $MQL = 10C_{MQ}/S_{MQ}$ ^[55]

รายงาน MDL และ MQL เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 5 ครั้งและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.4.1

3.4.4.4 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลกับสัญญาณ

เตรียมตัวอย่างไบโอดีเซลที่เติมสารต้านออกซิเดชันที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ MQL, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm (แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 10 ครั้ง หรือ 10 หลอด) แล้วนำไปสกัดด้วยตัว

ทำละลายตามวิธีที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.3 แล้วนำส่วนสกัดไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.2 สร้างกราฟสอบเทียบของสารเป้าหมายในส่วนสกัด ตัวอย่างไปโอติเซลที่ความเข้มข้นต่างๆ กับสัญญาณที่วัดได้ รายงานผลและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.4.2

3.4.4.5 ความแม่นยำและความเที่ยง

เตรียมตัวอย่างไปโอติเซลที่เติมสารต้านออกซิเดชันที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ MQL, 20 และ 40 ppm (แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 10 ครั้ง หรือ 10 หลอด) แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายตามวิธีที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.3 แล้วนำส่วนสกัดไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.2 คำนวณค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นทำการทดลองซ้ำตามวิธีการเดียวกันเป็นเวลารวมทั้งสิ้น 5 วัน แล้วรายงานผลของแต่ละวันและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.4.3

3.5 ความคงตัวของตัวอย่าง

ศึกษาความคงตัวของสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างไปโอติเซลภายใน 2 เดือน โดยเตรียมสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างไปโอติเซลที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ppm เตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.4.3 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดสีชาพร้อมทั้งหุ้มด้วยฟอยล์ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ตามภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองหัวข้อ 3.4.2 ในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 และ 56 รายงานผลและวิเคราะห์ผลการทดลองในหัวข้อ 4.4.5

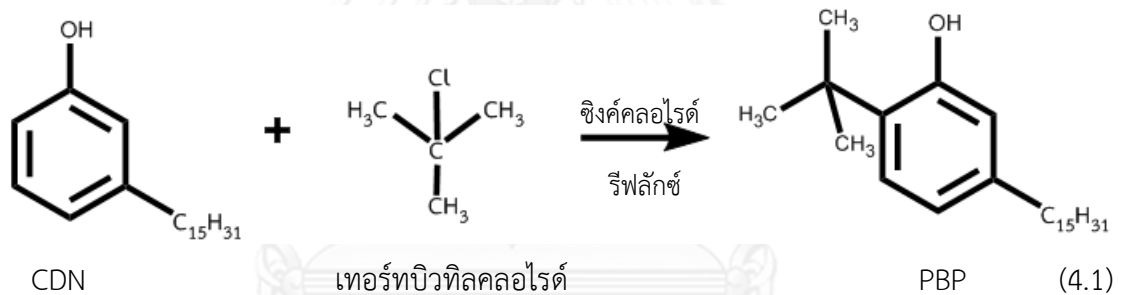
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ hydrogenated cardanol (CDN)

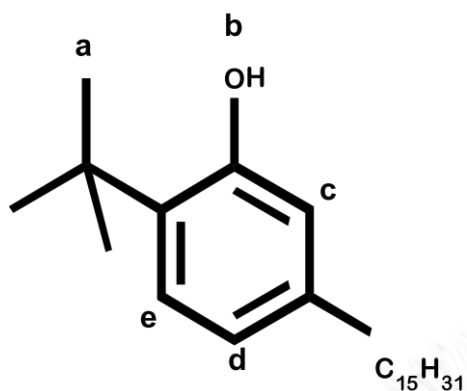
4.1.1 5-*n*-pentadecyl-2-*tert*-butylphenol (PBP)

ได้ทำการสังเคราะห์ PBP โดยการเติมหมู่เทอร์ทิวทิลที่ตำแหน่งอโทของ CDN ด้วยปฏิกิริยาอัลคิเลชัน ซึ่งใช้ซิงค์คลอไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังสมการเคมี 4.1 และขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.3.1 จากผลการทดลองได้ผลได้ PBP ร้อยละ 53



โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ PBP แสดงตำแหน่งการเลื่อนเชิงเคมี (δ_{H}) ที่ 1.43, 6.52, 6.71, 7.17, 7.26 ppm ดังตารางที่ 4.1 และโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมซึ่งแสดงโปรตอนของหมู่เมทิลีนที่ต่อกับวงอะโรมาติกที่ δ_{H} 2.55 ppm (*m*, 2H) โปรตอนของหมู่เมทิลีนในโซ่ข้างของวงอะโรมาติกที่ δ_{H} 1.27–1.32 ppm (*s*, 26H) และโปรตอนของหมู่เมทิลในโซ่ข้างของวงอะโรมาติกที่ δ_{H} 0.92 ppm (*s*, 3H) แสดงดังรูป ข-1.1 ในภาคผนวก ข ซึ่งตรงกับการรายงานของงานวิจัยก่อนหน้า^[47]

แมสสเปกตรัมของ PBP มีค่ามวลต่อประจุ (*m/z*) เท่ากับ 359.33 กรัม/โมล [*M*-H]⁻ แสดงดังรูปที่ ข-2.1 ในภาคผนวก ข ซึ่งสอดคล้องกับมวลโมเลกุลของ PBP (C₂₅H₄₄O) คือ 360.34 กรัม/โมล



รูปที่ 4.1 โครงสร้างโมเลกุลของ PBP

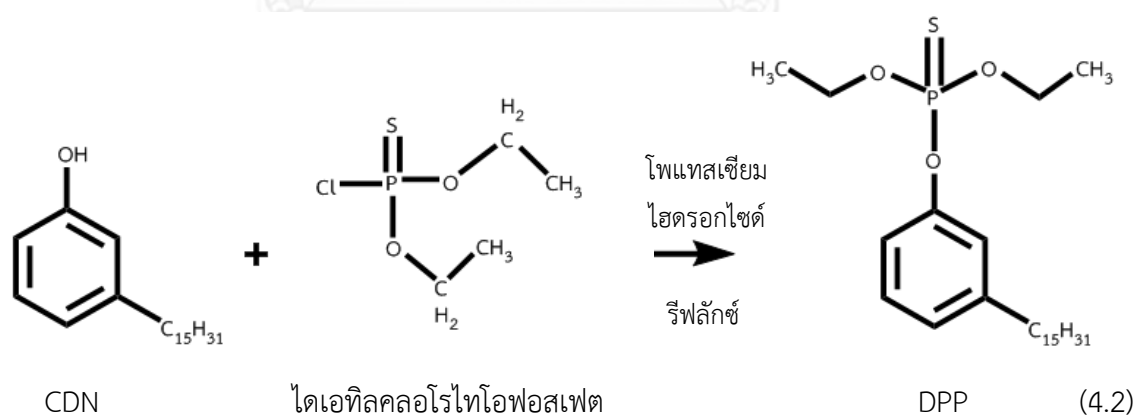
ตำแหน่ง ¹	δ_H (ppm)
a	1.43 (s, 9H)
b	6.52 (d, 1H)
c	7.17 (s, 1H)
d	6.71 (dd, 1H)
e	7.26 (s, 1H)

ตารางที่ 4.1 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ PBP

¹ อ้างอิงตำแหน่งตามรูปที่ 4.1

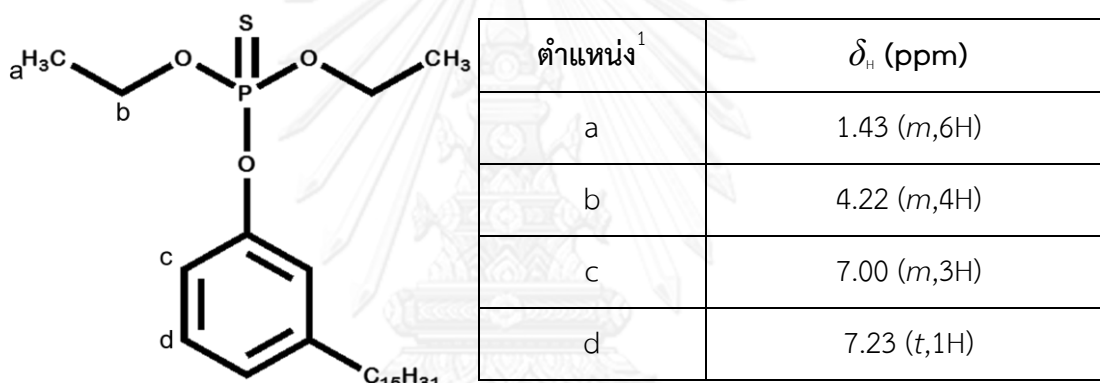
4.1.2 *O,O*-diethyl *O*-(3-pentadecylphenyl) phosphorothioate (DPP)

ได้ทำการสังเคราะห์ DPP โดยการเติมหมู่ไทโอฟอสเฟตในโมเลกุล CDN ด้วยปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน ซึ่งใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังสมการเคมี 4.2 และขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.3.2 จากผลการทดลองได้ผลได้ DPP ร้อยละ 74



โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ DPP แสดงที่ δ_H 1.43, 4.22, 7.00 และ 7.23 ppm ดังตารางที่ 4.2 และโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมซึ่งแสดงโปรตอนของหมู่เมทิลีนที่ต่อกับวงอะโรมาติกที่ δ_H 2.59 ppm (t,2H) โปรตอนของหมู่เมทิลีนในโซ่ข้างของวงอะโรมาติกที่ δ_H 1.26-1.59 ppm (m, 26H) และโปรตอนของหมู่เมทิลในโซ่ข้างของวงอะโรมาติกที่ δ_H 0.88 ppm (t,3H) แสดงดังรูป ข-1.2 ในภาคผนวก ข ซึ่งตรงกับการรายงานของงานวิจัยก่อนหน้า^[48]

แมสสเปกตรัมของ DPP มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) เท่ากับ 457.29 กรัม/โมล $[M+H]^+$ แสดงดังรูป ข-2.2 ในภาคผนวก ข ซึ่งสอดคล้องกับมวลโมเลกุลของ DPP ($C_{25}H_{45}O_3PS$) คือ 456.28 กรัม/โมล



รูปที่ 4.2 โครงสร้างโมเลกุลของ DPP

ตารางที่ 4.2 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ DPP

¹ อ้างอิงตำแหน่งตามรูปที่ 4.2

4.2 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับ HPLC-UV

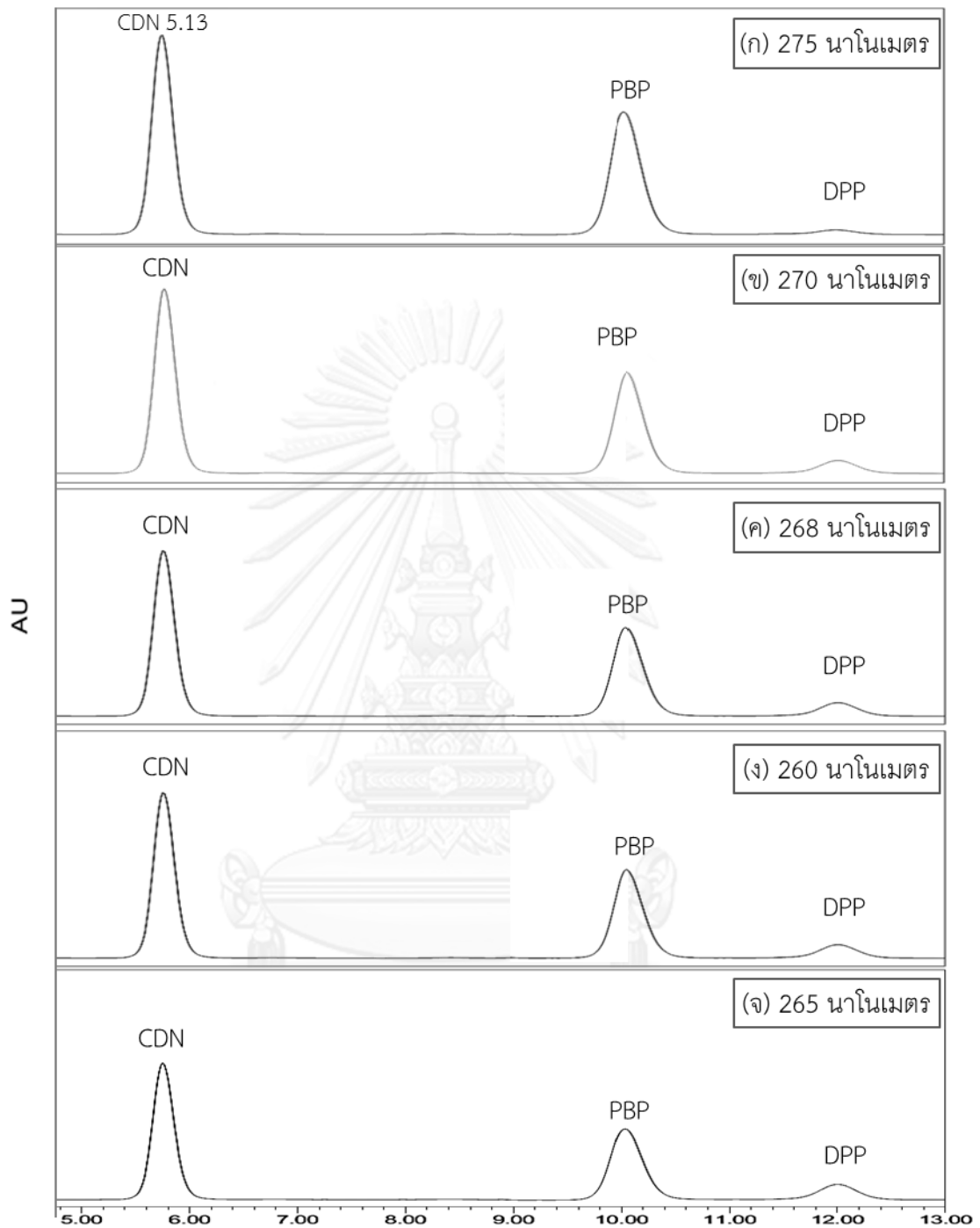
4.2.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

วัดการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตและวิสิเบิลของสารต้านออกซิเดชัน CDN, PBP และ DPP ในตัวทำละลาย MeOH โดยตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตและวิสิเบิลของสารต้านออกซิเดชันแต่ละชนิดในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm ที่ช่วงความยาวคลื่น 190–800 นาโนเมตร พบว่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุด (λ max) ของ CDN, PBP และ DPP ในตัวทำละลาย MeOH เท่ากับ 274, 275 และ 264 นาโนเมตรตามลำดับ ดังรูปที่ ข-3 ในภาคผนวก ข

จากนั้นหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในคราวเดียวกัน โดยวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ใช้เฟสเคลื่อนที่ MeOH:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) แบบอัตราส่วนคงที่ ที่ความยาวคลื่น 260, 265, 268, 270 และ 275 นาโนเมตร พิจารณาจากความสูงพีค ดังตารางที่ 4.3 และแสดงโครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.3 เนื่องจาก DPP เป็นสารที่มีการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลต่ำกว่าสารอีก 2 ชนิด เพื่อประนีประนอมสภาพไว (sensitivity) หรือการตรวจวัดสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในคราวเดียวกัน จึงพิจารณาข้อมูลของ DPP เป็นหลักในการเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสม พบว่าความยาวคลื่น 265 นาโนเมตรเหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในคราวเดียวกัน โดยที่ความสูงของพีคของ CDN และ PBP ยังสูงกว่า DPP ประมาณ 9 และ 5 เท่าตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ความสูงพีคของสารต้านออกซิเดชัน CDN, PBP และ DPP ในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm วิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ใช้เฟสเคลื่อนที่ MeOH:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) แบบอัตราส่วนคงที่ อุณหภูมิคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส

สารเป้าหมาย	ความสูงพีค (μ V)				
	260 นาโนเมตร	265 นาโนเมตร	268 นาโนเมตร	270 นาโนเมตร	275 นาโนเมตร
CDN	11362	17838	21878	24402	26464
PBP	5454	9207	11683	13389	16237
DPP	1813	1981	1769	1687	596



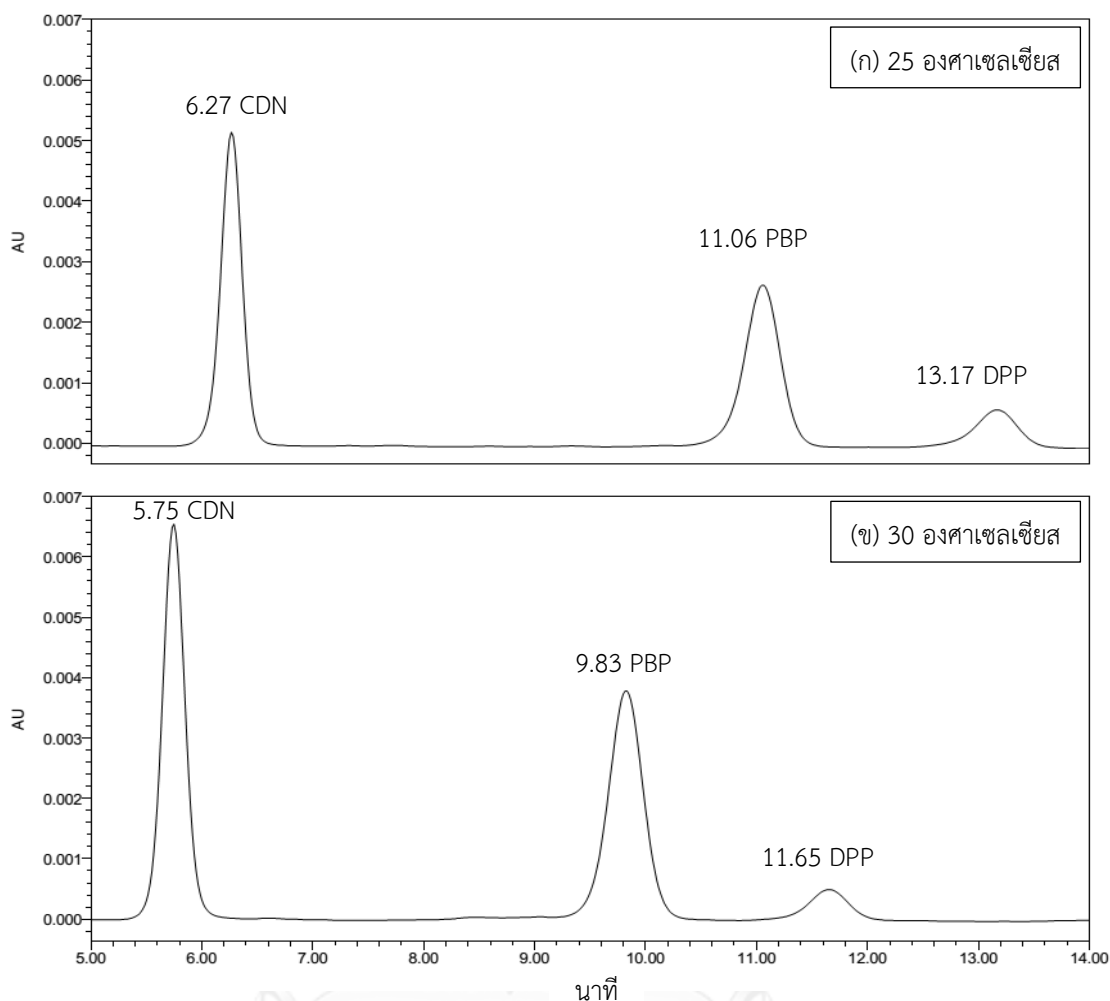
รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm วิเคราะห์ด้วย HPLC-UV ด้วยเฟสเคลื่อนที่ MeOH:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) แบบอัตราส่วนคงที่ ที่ความยาวคลื่น (ก) 275 (ข) 270 (ค) 268 (ง) 260 (จ) 265 นาโนเมตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.2.2 อุณหภูมิคอลัมน์ที่เหมาะสม

หาอุณหภูมิคอลัมน์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดด้วย HPLC-UV โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ MeOH:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) แบบอัตราส่วนคงที่ ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ด้วยเทอร์โมสแตตที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส แสดงผลดังตารางที่ 4.4 และโครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.4 พิจารณารีเทนชันไทม์ (t_R) จำนวนเพลททางทฤษฎี (N) ความสูงพีค และรีเทนชันแฟกเตอร์ (k) พบว่าการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียสแสดงถึงประสิทธิภาพการวิเคราะห์ที่ดีกว่าการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส จึงควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 30 องศาเซลเซียส ตลอดงานวิจัย

ตารางที่ 4.4 รีเทนชันไทม์ (t_R) จำนวนเพลททางทฤษฎี (N) ความสูงพีค และรีเทนชันแฟกเตอร์ (k) ของโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm ใช้เฟสเคลื่อนที่ MeOH:น้ำ อัตราส่วน 95:5 ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 25 และ 30 องศาเซลเซียส

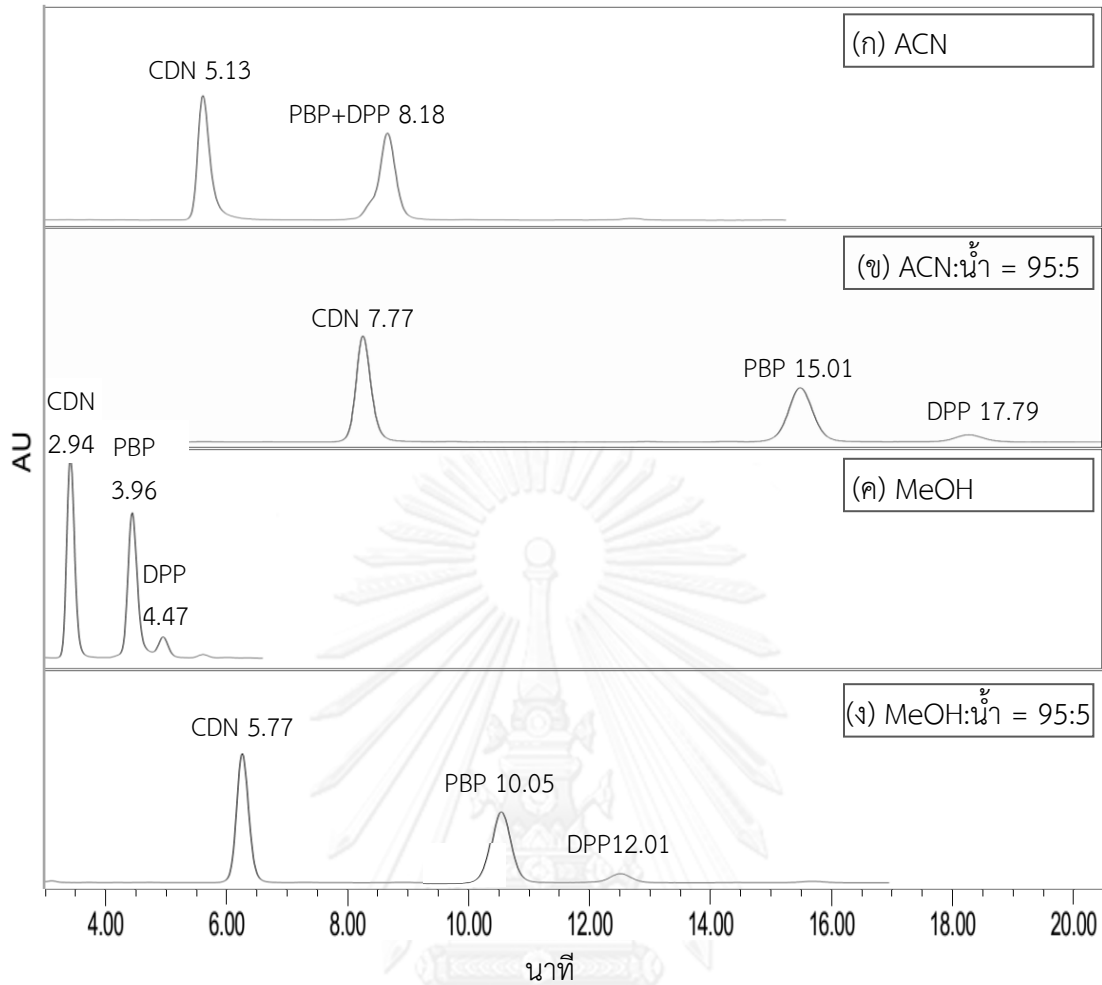
สารเป้าหมาย	อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส				อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส			
	t_R (นาที)	N (USP)	ความสูงพีค (μV)	k	t_R (นาที)	N (USP)	ความสูงพีค (μV)	k
CDN	6.27	3702	17838	4.43	5.75	3811	86527	4.00
PBP	11.06	4499	9207	8.64	9.83	4582	43188	7.72
DPP	13.17	5035	1981	10.45	11.65	5200	8457	9.43



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm ใช้เฟสเคลื่อนที่ MeOH:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) แบบอัตราส่วนคงที่ ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ (ก) 25 และ (ข) 30 องศาเซลเซียส

4.2.3 เฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

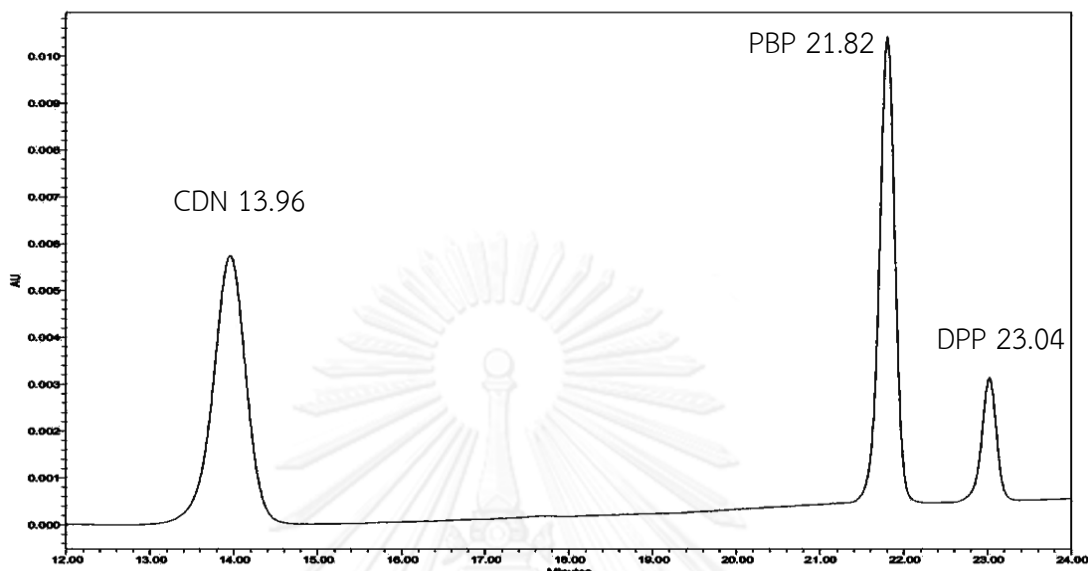
ศึกษาชนิดและอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดตามขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.4.2 เริ่มจากการศึกษาชนิดและอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ด้วยอัตราส่วนผสมแบบอัตราส่วนคงที่ ดังรูปที่ 4.5 ตัวทำละลายที่เลือกมาศึกษา คือ ACN:น้ำ และ MeOH:น้ำ พบว่า MeOH:น้ำ อัตราส่วน 95:5 โดยปริมาตร เหมาะสำหรับการแยกสารต้านออกซิเดชันในตัวทำละลาย MeOH ทั้งสามชนิดด้วยเวลาที่เหมาะสม



รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ความเข้มข้น 100 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ (ก) ACN (ข) ACN:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) (ค) MeOH (ง) MeOH:น้ำ (95:5 โดยปริมาตร) ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส

อย่างไรก็ตาม เฟสเคลื่อนที่ดังกล่าวไม่เหมาะสำหรับแยกสารต้านออกซิเดชันทั้งสามในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล เนื่องจากฟีกของเมทริกซ์ (ส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล) บดบังฟีกของสารเป้าหมาย จึงเปลี่ยนระบบเฟสเคลื่อนที่เป็นแบบเกรเดียนต์ โดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนและเวลาของ MeOH:น้ำ แสดงโครมาโทแกรมดังรูป ข-5 ในภาคผนวก ข พบว่าระบบเฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนต์ที่เหมาะสมคือนาทีที่ 0–13 MeOH:น้ำ (90:10 โดยปริมาตร) จากนั้นปรับอัตราส่วนแบบเส้นตรงเป็น MeOH:น้ำ (100:0 โดยปริมาตร) ภายใน 10 นาที โดยระบบของเฟสเคลื่อนที่นี้ทำให้ความสมบูรณ์ของการแยก (R_s) มากกว่า 1.5 ของทุกฟีกของสารต้านออกซิเดชัน ด้วยเวลาในการวิเคราะห์รวม 24 นาที t_R ของ CDN, PBP และ DPP เท่ากับ 13.96, 21.82 และ 23.04 ตามลำดับ ซึ่งลำดับของการชะเป็นไปตามความไม่ชอบน้ำของสารต้านออกซิเดชันจากน้อยไปมาก ตรงกันข้ามกับระยะทางที่สาร

เคลื่อนที่ (R_f) ของสารต้านออกซิเดชันด้วยเฮกเซนกับเอทิลอะซิเตตในอัตราส่วน 95:5 โดยปริมาตร บนทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้น ดังรูปที่ ข-4 ในภาคผนวก ข



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ได้จากการวิเคราะห์ HPLC-UV ใช้คอลัมน์ LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) ยาว 125 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.0 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนต์โดยนาที่ที่ 0-13 MeOH:น้ำ (90:10 โดยปริมาตร) จากนั้นปรับอัตราส่วนแบบเส้นตรงเป็น MeOH:น้ำ (100:0 โดยปริมาตร) ภายใน 10 นาที อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตรสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.5 รีเทนชันไทม์ (t_R) พื้นที่ใต้พีค จำนวนเพลททางทฤษฎี (N) ความไม่สมมาตรของพีค (A_s) และความสมบูรณ์ของการแยก (R_s) ของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH ได้จากการวิเคราะห์ HPLC-UV ดังรูปที่ 4.6

สารเป้าหมาย	t_R (นาที)	พื้นที่ใต้พีค	N (USP)	A_s	R_s
CDN	13.96	239262	6203	0.9199	-
PBP	21.82	196643	65063	0.9343	15.03
DPP	23.04	49389	86065	0.9026	3.74

4.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

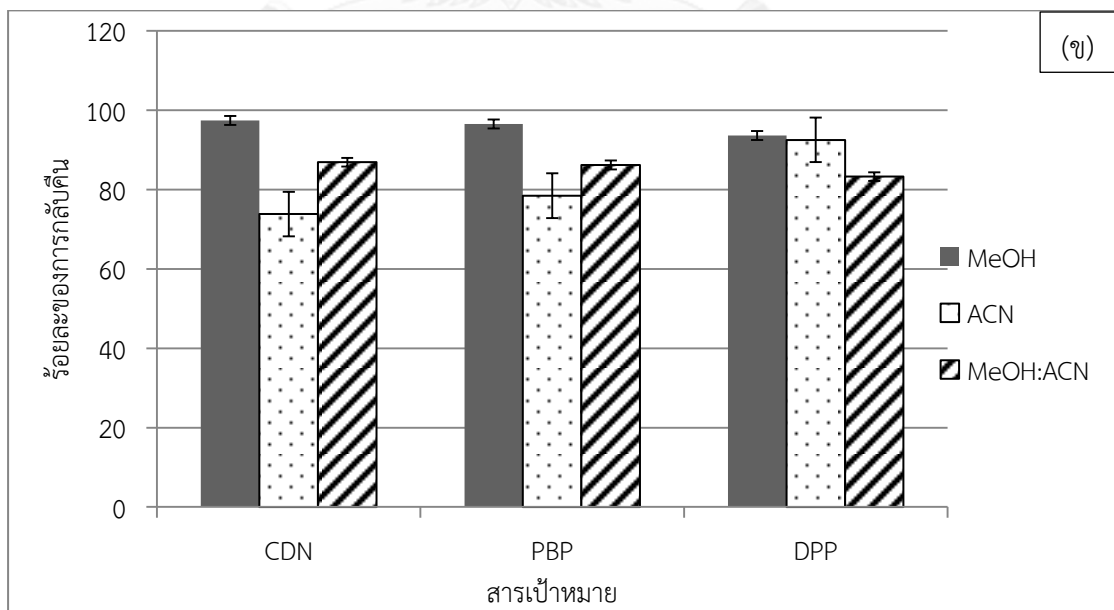
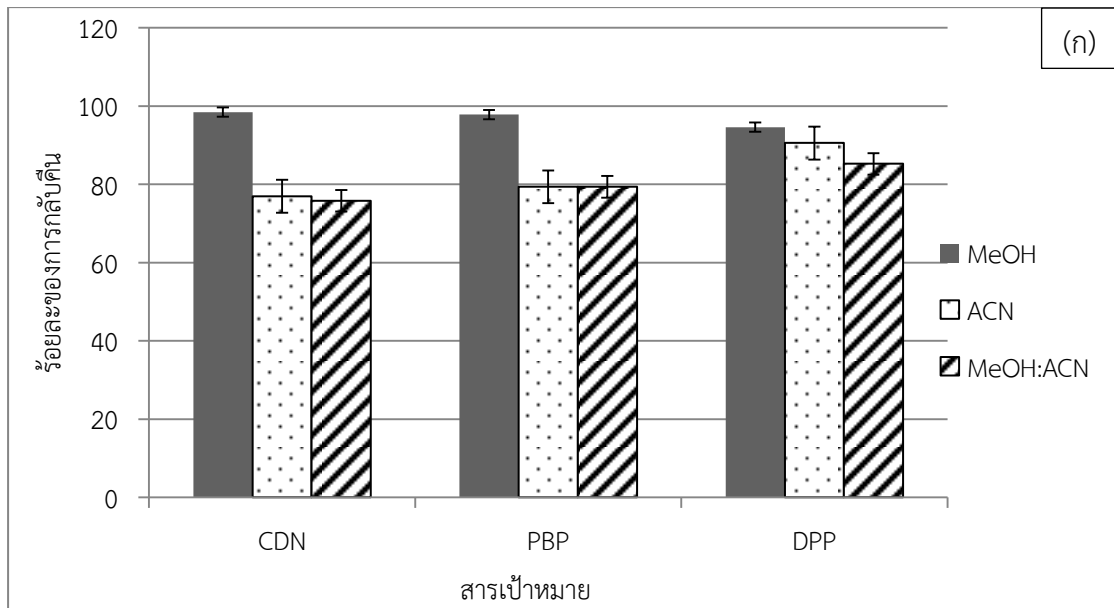
ไบโอดีเซลมีความหนืดค่อนข้างสูงสำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC ดังนั้นการละลายไบโอดีเซลด้วยตัวทำละลายก่อนฉีดเข้าระบบจึงเป็นสิ่งจำเป็น นอกจากนั้นไบโอดีเซลอาจมีไตรกลีเซอไรด์ที่หลงเหลือจากกระบวนการผลิตตามที่กล่าวในหัวข้อ 2.1.1 ซึ่งไตรกลีเซอไรด์อาจรบกวนกระบวนการวิเคราะห์หรือทำลายประสิทธิภาพของคอลัมน์ เนื่องจากไตรกลีเซอไรด์เป็นโมเลกุลที่มีการดูดซับแรง (strong absorption) กับคอลัมน์ C18 ต้องใช้ตัวทำละลายที่มีแรงชะสูง (strong solvent) หรือต้องใช้ HPLC ระบบ non-aqueous reverse-phase HPLC^[56] ดังนั้นการกำจัดไตรกลีเซอไรด์ก่อนเข้าระบบ HPLC จึงสำคัญ

4.3.1 ตัวทำละลายที่เหมาะสม

ตัวทำละลายที่เลือกมาพิจารณา คือตัวทำละลาย MeOH และ ACN ซึ่งเป็นตัวทำละลายในห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ทั่วไป ราคาถูก ความเป็นพิษต่ำ สามารถเข้ากันได้กับเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ HPLC และละลายไตรกลีเซอไรด์ได้น้อย โดยทดสอบความสามารถละลายไตรกลีเซอไรด์ตามขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.4.3.1 ความสามารถในการละลายไตรกลีเซอไรด์ของตัวทำละลาย MeOH, ACN และ MeOH:ACN (1:1 โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง เท่ากับ 4.2×10^{-3} , 4.7×10^{-3} และ 4.4×10^{-3} กรัมต่อตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งพิจารณาตามหลักเกณฑ์ของ The United States Pharmacopeia (USP) ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดนั้นมีความสามารถในการละลายไตรกลีเซอไรด์ต่ำ

เปรียบเทียบร้อยละของการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ppm จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH, ACN และ MeOH:ACN (1:1 โดยปริมาตร) ตามขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.4.3.1 เปรียบเทียบกับแผนภูมิรูปแท่งดังรูปที่ 4.7 การสกัดสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวอย่างไบโอดีเซลด้วยตัวทำละลาย MeOH มีร้อยละของการกลับคืนดีกว่าตัวทำละลาย ACN และ MeOH:ACN (1:1 โดยปริมาตร) ในขณะที่การสกัดด้วยตัวทำละลาย ACN และ MeOH:ACN (1:1 โดยปริมาตร) มีร้อยละของการกลับคืนใกล้เคียงกัน ร้อยละของการกลับคืนของ CDN, PBP และ DPP ด้วยตัวทำละลาย MeOH ที่ความเข้มข้น 10 ppm ได้ 98.5%, 97.8% และ 94.6% ตามลำดับ ร้อยละของการกลับคืนของ CDN, PBP และ DPP ด้วยตัวทำละลาย MeOH ที่ความเข้มข้น 40 ppm ได้ 97.7%, 96.9% และ 93.6% ตามลำดับ

เหตุผลที่ตัวทำละลาย MeOH ให้ร้อยละการกลับคืนมากกว่า ACN อาจเป็นเพราะว่า MeOH มีหมู่ไฮดรอกซีที่สามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลประเภทพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของสารต้านออกซิเดชันซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีของฟีนอล (โดยเฉพาะ CDN และ PBP) และหมู่ไทโอฟอสเฟต (ของ DPP) ในขณะที่ ACN เกิดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลประเภทไดโพล-ไดโพลกับสารต้านออกซิเดชัน

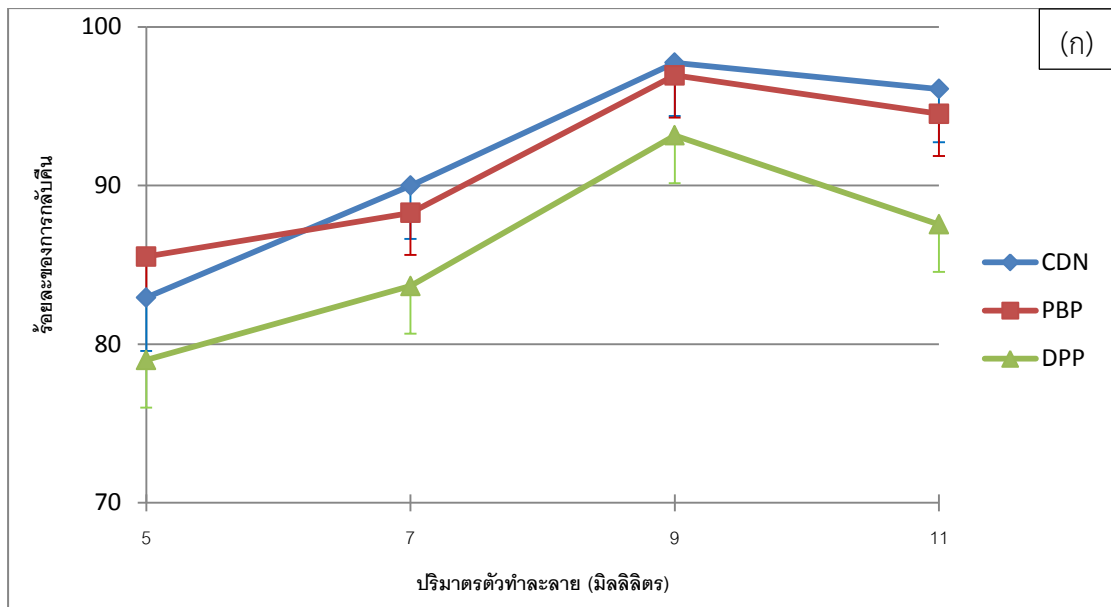


รูปที่ 4.7 ร้อยละการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น (ก) 10 ppm และ (ข) 40 ppm ในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอดีเซล ซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH, ACN และ MeOH:ACN (1:1 โดยปริมาตร)

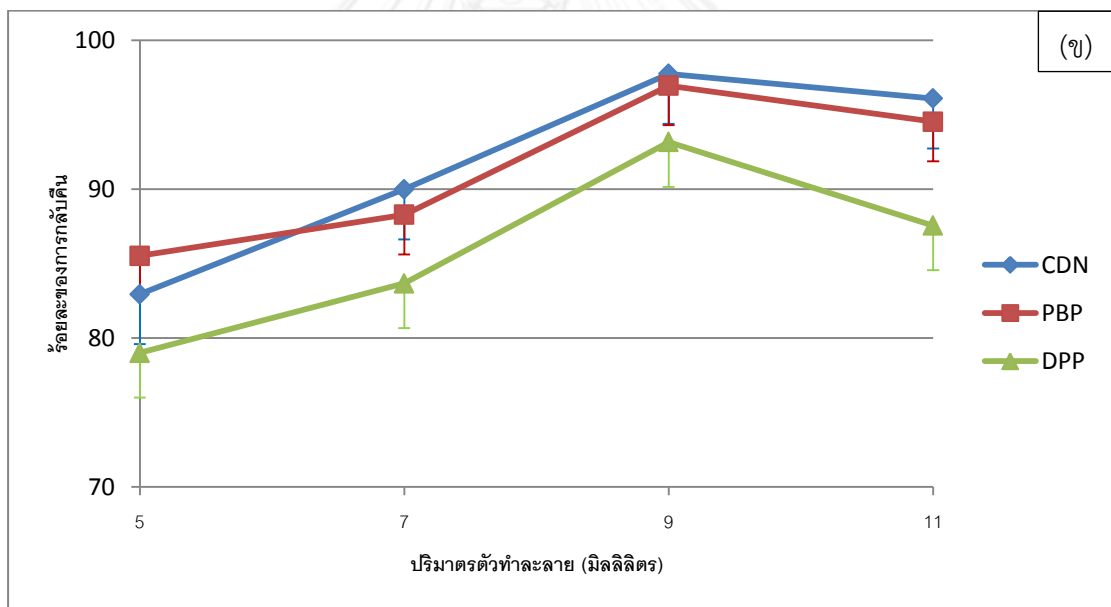
4.3.2 ปริมาณตัวทำละลายที่เหมาะสม

ศึกษาปริมาณตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวอย่างไบโอดีเซลตามขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.4.3.2 โดยเลือกศึกษาปริมาณตัวทำละลาย 5, 7, 9 และ 11 มิลลิลิตร เปรียบเทียบร้อยละของการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวอย่างไบโอดีเซลความเข้มข้น 10 และ 40 ppm ด้วยตัวทำละลาย MeOH 5, 7, 9 และ 11 มิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.8 พบว่าการสกัดสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวอย่างไบโอดีเซลด้วยตัวทำละลาย MeOH 9 และ 11 มิลลิลิตรมีร้อยละของการกลับคืนดีกว่า ในขณะที่การสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH ปริมาตรต่ำกว่า 9 มิลลิลิตรได้ร้อยละของการกลับคืนที่ต่ำกว่าและมีแนวโน้มลดลงตามปริมาตรของตัวทำละลาย MeOH ดังนั้นจึงเลือกปริมาณตัวทำละลาย 9 มิลลิลิตรซึ่งให้ร้อยละของการกลับคืนที่สูงสุด ร้อยละของการกลับคืนด้วยตัวทำละลาย MeOH 9 มิลลิลิตรของ CDN, PBP และ DPP ที่ความเข้มข้น 10 ppm ได้ 98.5%, 97.8% และ 92.1% ตามลำดับ CDN, PBP และ DPP ที่ความเข้มข้น 40 ppm ได้ 97.7%, 96.9% และ 93.2% ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนที่ 10 ppm				
สารเป้าหมาย	ปริมาตรตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)			
	5	7	9	11
CDN	89.6	92.9	98.4	98.7
PBP	87.4	93.6	97.8	95.2
DPP	86.4	90.3	92.1	91.1
ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนที่ 40 ppm				
CDN	82.94	89.98	97.73	96.08
PBP	85.52	88.27	96.94	94.52
DPP	78.99	83.66	93.15	87.55



* มีการกระจายข้อมูลทั้งด้านบนและล่าง แต่แสดงการกระจายข้อมูลเพียงด้านล่าง

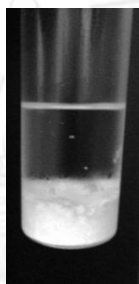


* มีการกระจายข้อมูลทั้งด้านบนและล่าง แต่แสดงการกระจายข้อมูลเพียงด้านล่าง

รูปที่ 4.8 ร้อยละการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิด ความเข้มข้น (ก) 10 และ (ข) 40 ppm ในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอดีเซล ซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH ปริมาตร 5, 7, 9 และ 11 มิลลิลิตร

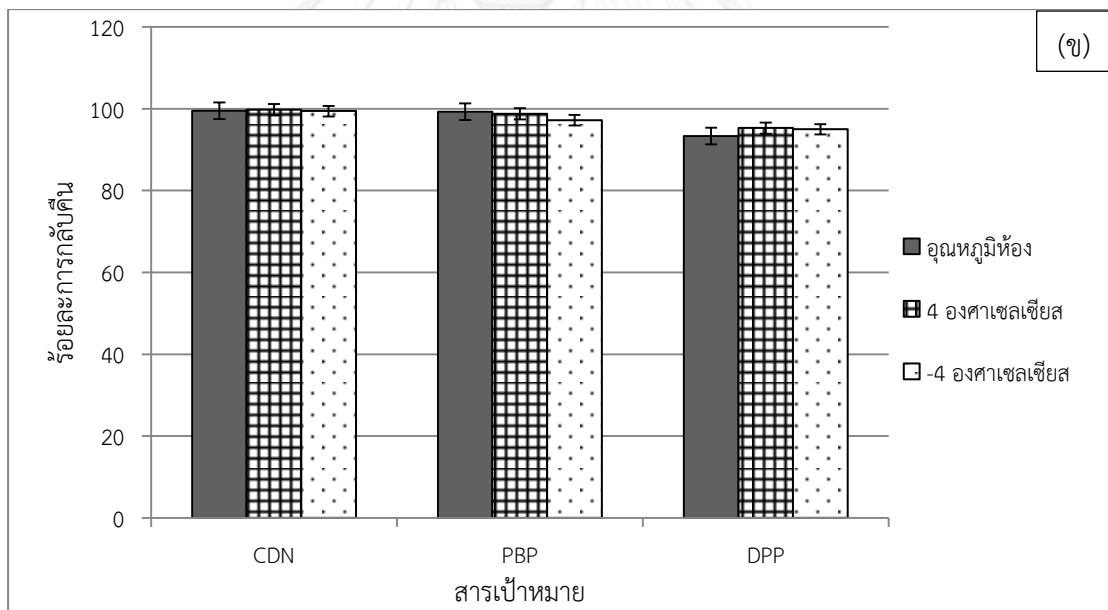
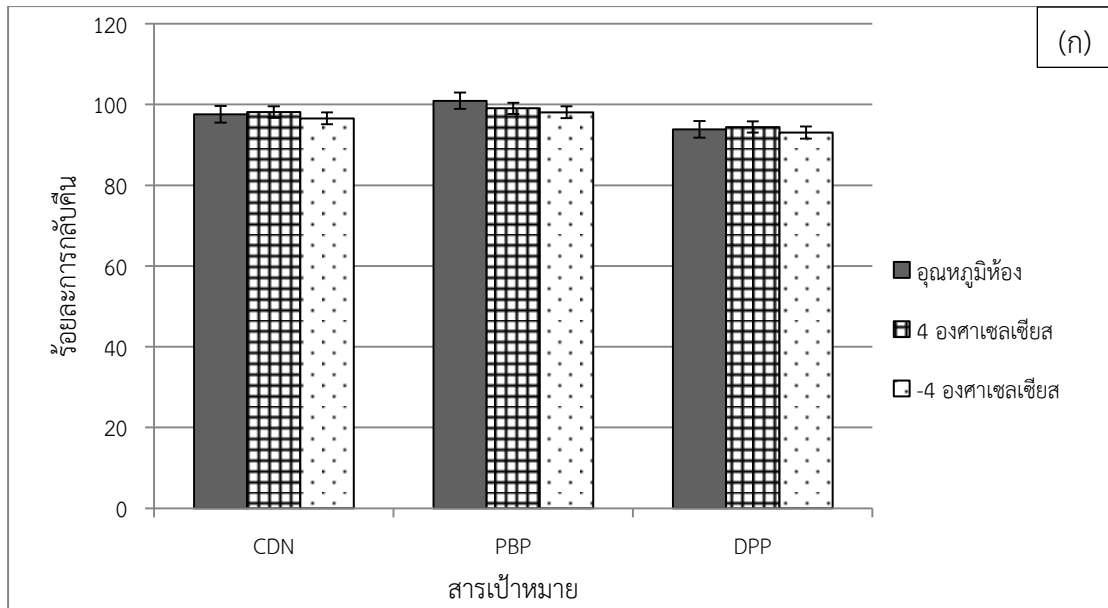
4.3.3 อุณหภูมิในการกำจัดเอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัวและไตรกลีเซอไรด์

จากงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งกล่าวถึงในหัวข้อ 1.2 รายงานเกี่ยวกับการเก็บส่วนสกัดตัวอย่างน้ำมันที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อกำจัดไขมันที่เหลือจากการสกัดด้วยตัวทำละลาย ก่อนฉีดเข้าในระบบ HPLC^[10, 57, 58] โดยกรดไขมันอิ่มตัวและไตรกลีเซอไรด์ซึ่งมีจุดขุ่นมัวสูง (cloud point) เกิดการกลายเป็นของแข็ง (solidification) ตกตะกอนแยกออกจากสารละลาย^[59, 60] มีลักษณะดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ลักษณะตะกอนซึ่งเกิดขึ้นจากการเก็บส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง

ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อร้อยละการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล ที่อุณหภูมิห้อง 4 และ -4 องศาเซลเซียสตามขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.4.3.3 โดยเปรียบเทียบร้อยละของการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลความเข้มข้น 10 และ 40 ppm ด้วยตัวทำละลาย MeOH 9 มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 4 และ -4 องศาเซลเซียสดังรูปที่ 4.10 จากการสกัดสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 4 และ -4 องศาเซลเซียสพบว่าร้อยละการกลับคืนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ข้อมูล ANOVA แสดงดังตารางที่ ก-1 ในภาคผนวก ก ในงานวิจัยนี้จึงเลือกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนที่อาจรบกวนการวิเคราะห์และสร้างความเสียหายแก่คอลัมน์ ร้อยละของการกลับคืนของ CDN, PBP และ DPP ในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ความเข้มข้น 10 ppm ได้ 98.1%, 99.0% และ 94.4% ตามลำดับ ร้อยละของการกลับคืนของ CDN PBP และ DPP ในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลที่ความเข้มข้น 40 ppm ได้ 99.8%, 98.8% และ 95.3% ตามลำดับ



รูปที่ 4.10 ร้อยละการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิด ความเข้มข้น (ก) 10 และ (ข) 40 ppm ในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอดีเซล ซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วเก็บส่วนสกัดตัวอย่างในอุณหภูมิห้อง 4, และ -4 องศาเซลเซียส

4.4 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ เป็นกระบวนการยืนยันความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย LOD, LOQ, MDL, MQL กราฟสอบเทียบจากสารละลายมาตรฐาน กราฟสอบเทียบจากตัวอย่าง ความแม่นยำ ความเที่ยง และอิทธิพลของเมทริกซ์ โดยเติมสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวอย่างไปโอติเซลความเข้มข้น 20 และ 40 ppm จากนั้นนำของผสมไปโอติเซลนี้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH 9 มิลลิลิตร เก็บส่วนใสด้านบนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV

4.4.1 ขีดจำกัดต่ำสุดของการวัดและขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ

LOD (Limit of Detection) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารเป้าหมายซึ่งเครื่องมือสามารถตรวจพบได้ LOQ (Limit of Quantitation) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารเป้าหมายซึ่งเครื่องมือสามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้ความเที่ยงและความแม่นยำที่ยอมรับได้ โดยเป็นระดับความเข้มข้นของสารเป้าหมายที่ให้สัญญาณเป็น 3 และ 10 เท่าของค่าเฉลี่ยสัญญาณรบกวนตามลำดับ^[55] จากการทดลองหัวข้อ 3.4.4.1 ได้ LOD และ LOQ ของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในตัวทำละลาย MeOH แสดงดังตารางที่ 4.6

MDL (Method Detection Limit) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารเป้าหมายในตัวอย่างจริงซึ่งเครื่องมือสามารถตรวจพบได้ และ MQL (Method Quantitation Limit) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารเป้าหมายในตัวอย่างจริงซึ่งเครื่องมือสามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้ความเที่ยงและความแม่นยำที่ยอมรับได้ จากการทดลองหัวข้อ 3.4.4.3 ได้ MDL และ MQL ของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอติเซล แสดงดังตารางที่ 4.6 เนื่องจากขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลายด้วย MeOH ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารเป้าหมายในตัวอย่างไปโอติเซลจึงต้องคูณด้วย 9 จึงส่งผลให้ MDL และ MQL มีค่าสูงกว่า LOD และ LOQ ส่วนค่า LOD, LOQ, MDL และ MQL ของ DPP มีค่าค่อนข้างสูงเนื่องจากค่าแอมพลิจูดของรังสีอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลของ DPP มีค่าค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามค่า MDL และ MQL นี้ก็เพียงพอสำหรับการตรวจสอบสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างไปโอติเซลในงานทดสอบประจำวัน อ้างอิงจากความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันทางการค้าที่เติมในไปโอติเซลมากกว่า 20 ppm

ตารางที่ 4.6 LOD, LOQ, MDL และ MQL ของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิด

สารเป้าหมาย	สารละลายมาตรฐาน		ส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล (ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร สกัดด้วย MeOH 9 มิลลิลิตร)			
	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	MDL (ppm)		MQL (ppm)	
			c	$c \times 9^1$	c	$c \times 9^1$
CDN	0.17	0.57	0.26	2.34	1.07	9.63
PBP	0.09	0.29	0.33	2.97	1.10	9.90
DPP	0.31	1.02	0.48	4.32	1.6	14.4

¹ คำนวณจากความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล $\times 9$

4.4.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของระบบ (system linearity) เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับสัญญาณ บอกถึงความสามารถของเครื่องตรวจวัดที่ให้สัญญาณแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารเป้าหมายในสารละลาย เรียกว่ากราฟสอบเทียบของสารละลายมาตรฐาน จากการทดลองหัวข้อ 3.4.4.2 พล็อตกราฟเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารเป้าหมาย 6 ระดับความเข้มข้น โดยเริ่มจาก LOQ ถึง 100 ppm คำนวณความชัน จุดตัดแกน y และสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง (r^2) ของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในสารละลายมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 4.7

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของวิธีการ (method linearity) เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของความเข้มข้นของสารเป้าหมายในสารตัวอย่างกับสัญญาณ บอกถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ให้สัญญาณจากเครื่องตรวจวัดที่แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารเป้าหมายในสารตัวอย่าง เรียกว่ากราฟสอบเทียบของตัวอย่าง จากการทดลองหัวข้อ 3.4.4.4 พล็อตระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล 6 ระดับความเข้มข้น โดยเริ่มจาก MQL ถึง 100 ppm ความชัน จุดตัดแกน y และสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง (r^2) ของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล แสดงดังตารางที่ 4.7 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดีที่สุดแสดงค่า r^2 มากกว่าหรือเท่ากับ 0.9950 พบว่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของเครื่องมือและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของวิธีการของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงสูง

ตารางที่ 4.7 ความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง

สาร เป้าหมาย	ความเข้มข้น (ppm) ใน ตัวทำละลาย MeOH	ความสัมพันธ์เชิงเส้นของ สารละลายมาตรฐาน			ความเข้มข้น (ppm) ใน ส่วนสกัด ตัวอย่างไปโอ ดีเซล	ความสัมพันธ์เชิงเส้นของ ตัวอย่าง		
		ความชัน	จุดตัด แกน y	r^2		ความชัน	จุดตัด แกน y	r^2
CDN	0.57-100	2422	-1752	0.9991	1.07-100	2914	-3613	0.9990
PBP	0.29-100	1971	-1640	0.9995	1.10-100	2419	-3422	0.9991
DPP	1.02-100	485	-289	0.9992	1.6-100	594	-947	0.9994

4.4.3 ความแม่นยำและความเที่ยง

ความแม่นยำ เป็นความใกล้เคียงกันของค่าที่วัดได้กับค่าจริงของสารเป้าหมายในตัวอย่าง^[61] ด้วยวิธีทดสอบเดียวกัน ซึ่งความแม่นยำบ่งบอกถึงความถูกต้องของวิธีทดสอบ วิเคราะห์ความแม่นยำด้วยการเติมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับในตัวอย่างไปโอดีเซลตามขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.4.4.5 คำนวณร้อยละการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอดีเซลดังตารางที่ 4.8 ซึ่งร้อยละการกลับคืนที่ได้อยู่ภายในช่วงร้อยละการกลับคืนที่ยอมรับได้ของความเข้มข้น 1-10 ppm คือร้อยละ 80-110 ช่วงร้อยละการกลับคืนที่ยอมรับได้ของความเข้มข้น 100 ppm คือร้อยละ 90-107^[55, 62]

ตารางที่ 4.8 ความแม่นยำของการวิธีวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอดีเซล

สารเป้าหมาย	ร้อยละการกลับคืน		
	MLQ	20 ppm	40 ppm
CDN	94.5 - 100.7	94.3 - 102.9	96.2 - 100.9
PBP	96.5 - 102.4	94.0 - 103.8	92.2 - 102.1
DPP	97.5 - 108.2	92.3 - 96.2	91.3 - 100.6

ความเที่ยง เป็นค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลการทดสอบที่ทำการทดสอบซ้ำหลายๆ ครั้ง^[61] แสดงผลเป็นความแปรปรวนของค่าที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างชนิดเดียวกัน โดยการศึกษาความเที่ยงนั้นแบ่งเป็นความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intraday precision) และความเที่ยงระหว่างวัน (interday precision) ศึกษาความเที่ยงภายในวันเดียวกันโดยประเมินร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของร้อยละของการกลับคืนของตัวอย่าง 10 ชุดที่เตรียมและวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน และศึกษาความเที่ยงระหว่างวันโดยแบ่งเตรียมและวิเคราะห์ตัวอย่าง 5 วัน วันละ 10 ชุด ตามขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.4.4.5 การคำนวณ %RSD ของร้อยละการกลับคืนสำหรับการประเมินความเที่ยงระหว่างวันแบ่งเป็น 2 กรณี โดยพิจารณาจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวหรือ One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95^[63] ข้อมูล ANOVA แสดงดังตาราง ก-2 ในภาคผนวก ก คือ กรณีแรก หากค่า p (p-value) มากกว่า 0.05 หมายความว่า %RSD ของความเที่ยงภายในวันเดียวกันแต่ละวันไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น %RSD ของความเที่ยงระหว่างวันเท่ากับ %RSD ของข้อมูลทั้งหมด ($n=50$) กรณีที่สอง ถ้าค่า p น้อยกว่า 0.05 แสดงว่า %RSD ของความเที่ยงภายในวันเดียวกันแต่ละวันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คำนวณ %RSD จาก $\%RSD = 100 \times SD_{interday} / \bar{x}$ เมื่อ \bar{x} คือ ค่าเฉลี่ยและ $SD_{interday}$ คือ รากที่สองของผลรวมของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานภายในกลุ่มยกกำลังสองกับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างกลุ่มยกกำลังสอง^[64] ซึ่งแสดงการคำนวณความเที่ยงระหว่างวันดังตารางที่ ก-3 ภาคผนวก ก จากการคำนวณความเที่ยงภายในวันเดียวกัน พบว่า %RSD แต่ละวันของ CDN และ PBP ที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับ และ DPP ความเข้มข้น MQL ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ส่วน %RSD แต่ละวันของ DPP ความเข้มข้น 20 และ 40 ppm มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงข้อมูลความเที่ยงภายในวันเดียวกันและความเที่ยงระหว่างวันดังตารางที่ 4.10 พบว่าความเที่ยงภายในวันเดียวกันและความเที่ยงระหว่างวันของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับมีค่าน้อยกว่า %RSD ที่ Peer Verified Methods (PVM) กำหนดคือระดับความเข้มข้น 1-10 ppm %RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 7.3 ระดับความเข้มข้น 10-100 ppm %RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 5.3^[55, 62]

ตารางที่ 4.9 ความเที่ยงภายในวันเดียวกันและความเที่ยงระหว่างวันของการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล

สารเป้าหมาย	ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน					ความเที่ยงระหว่างวัน	p-value ¹
	%RSD ที่ MQL						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5		
CDN	1.22	1.97	1.59	0.87	1.06	1.38	0.59
PBP	1.22	1.46	1.13	1.10	0.85	1.16	0.48
DPP	3.42	4.19	3.96	4.54	4.64	4.04	0.91
%RSD ที่ 20 ppm							
CDN	2.10	1.71	1.62	2.56	2.15	2.09	0.28
PBP	2.89	2.01	2.23	2.42	1.35	2.21	0.62
DPP	1.33	1.31	1.52	1.06	1.22	1.42	0.03
%RSD ที่ 40 ppm							
CDN	1.47	1.21	1.43	1.19	0.86	1.24	0.50
PBP	2.84	3.58	0.64	1.25	2.00	2.23	0.98
DPP	1.65	1.11	0.76	1.79	2.53	1.85	0.03

¹ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.4.4 อิทธิพลของเมทริกซ์

อิทธิพลของเมทริกซ์เป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงหรือกำจัดออกไม่ได้ เกิดจากโมเลกุลของสารเป้าหมายยึดติดกับเมทริกซ์อย่างแยกออกจากกันไม่ได้ เนื่องจากอิทธิพลของเมทริกซ์นี้อาจส่งผลต่อความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารตัวอย่าง อีกทั้งยังอาจเป็นสาเหตุความไม่เที่ยงตรงและความไม่แม่นยำที่เพิ่มขึ้น จึงต้องทำการวิเคราะห์อิทธิพลของเมทริกซ์

การวิเคราะห์อิทธิพลของเมทริกซ์จากการเปรียบเทียบความชันของกราฟเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานกับกราฟเส้นตรงของตัวอย่างด้วยการทดสอบที (t-test) เป็นเกณฑ์ตัดสิน^[65] แสดงดังตาราง 4.10 พบว่าค่าที่คำนวณได้ (t_{cal}) ตกอยู่นอกช่วงค่าที่จากตาราง ($t_{critical}$) ที่ระดับค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงอนุมานได้ว่าเมทริกซ์มีอิทธิพลต่อกราฟสอบเทียบ ดังนั้นในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลต้องสร้างกราฟสอบเทียบของตัวอย่าง

ประเมินอิทธิพลของเมทริกซ์จากร้อยละของอิทธิพลของเมทริกซ์ ดังสมการที่ 4.3

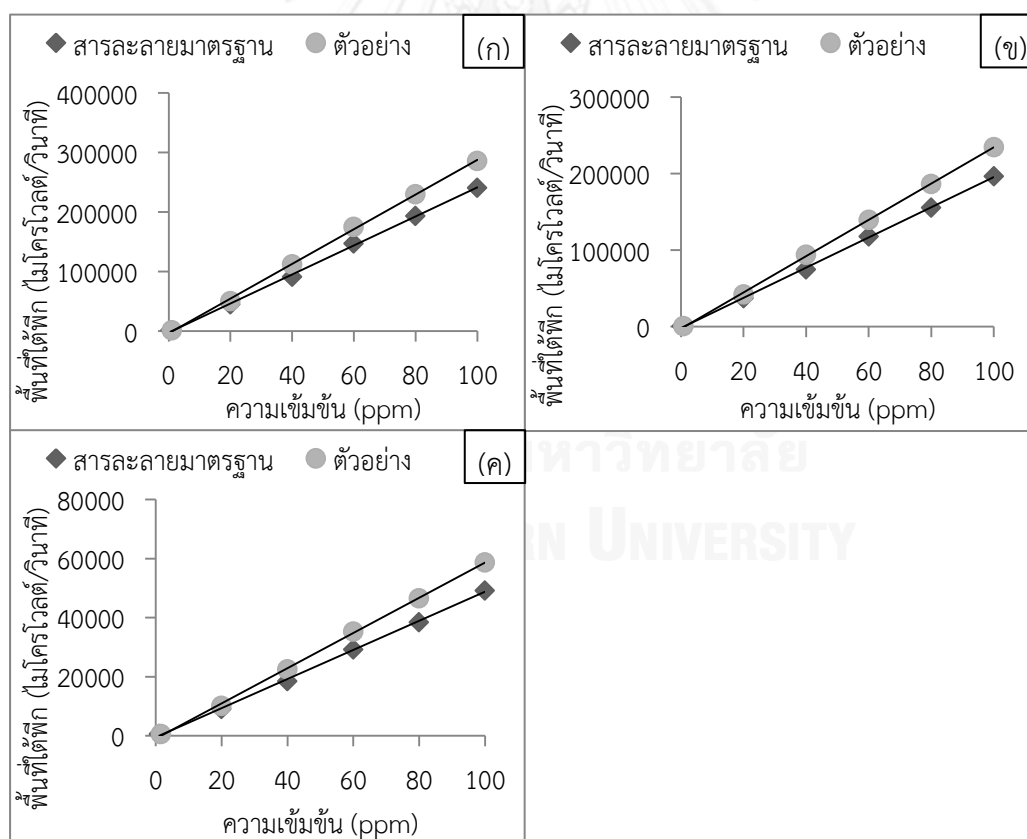
$$\text{ร้อยละของอิทธิพลของเมทริกซ์} = \left(\frac{\text{ความชันของกราฟเส้นตรงของตัวอย่าง}}{\text{ความชันของกราฟเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน}} - 1 \right) \times 100 \quad (4.3)$$

ร้อยละของอิทธิพลของเมทริกซ์ต่อสารต้านออกซิเดชัน แสดงผลดังตารางที่ 4.10 และเปรียบเทียบกราฟเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานกับกราฟเส้นตรงของตัวอย่างดังรูปที่ 4.11

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบความชันของกราฟเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานกับกราฟเส้นตรงของตัวอย่างโดยใช้การทดสอบที และร้อยละของอิทธิพลของเมทริกซ์

สารเป้าหมาย	t_{cal}	$t_{critical}^1$	ร้อยละของอิทธิพลของเมทริกซ์
CDN	47.60	2.26	21.33
PBP	60.12		19.90
DPP	15.97		20.80

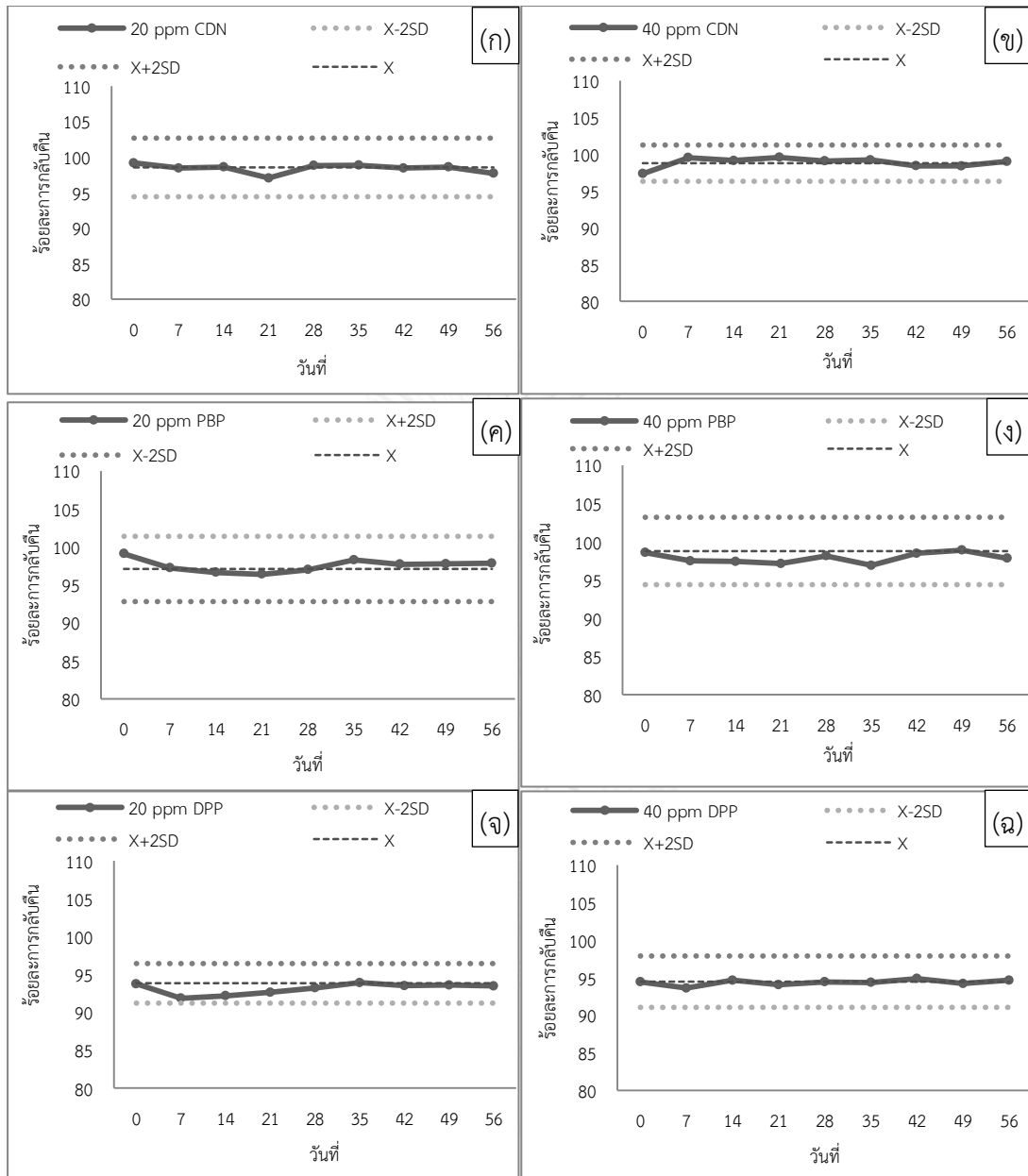
¹ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 4.11 กราฟเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานกับกราฟเส้นตรงของตัวอย่าง (ก) CDN (ข) PBP (ค) DPP

4.5 ความคงตัวของตัวอย่าง

ทดสอบความคงตัวของตัวอย่าง เพื่อติดตามการสลายตัวของสารเป้าหมายตามระยะเวลา และภาวะการเก็บรักษาที่กำหนด โดยวัดปริมาณสารเป้าหมายในตัวอย่างตามช่วงเวลาที่กำหนด แล้วนำค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนมาพล็อตบนแผนภูมิควบคุม (control chart) ที่กำหนดค่าเฉลี่ย และช่วงที่ยอมรับได้ในแผนภูมิควบคุม เพื่อติดตามความผันแปร โดยทั่วไปใช้ค่าเฉลี่ยหรือค่าที่คาดหวังเป็นเส้นกลางและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เป็นขีดจำกัด^[66] สำหรับงานวิจัยนี้ตั้งค่า $\pm 2SD$ เป็นขีดจำกัดต่ำสุดและสูงสุด โดยร้อยละ 95 ของข้อมูลควรตั้งอยู่ในช่วงเกณฑ์ $X \pm 2SD$ เมื่อ X คือ ร้อยละการกลับคืนของสารเป้าหมายในเมทริกซ์เฉลี่ย SD คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละการกลับคืนของสารเป้าหมายในเมทริกซ์ ประเมินความคงตัวตามขั้นตอนการทดลองหัวข้อ 3.5 พล็อตร้อยละการกลับคืนในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 และ 56 บนแผนภูมิควบคุม เพื่อดูแนวโน้มหรือการเบี่ยงเบนออกจากค่ากลาง หากค่าที่ได้ตกนอกขีดจำกัดอนุมานได้ว่าควรทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่วันก่อนหน้า แผนภูมิควบคุมแสดงดังรูปที่ 4.12 และข้อมูลในตารางที่ ก-4 ภาคผนวก ก พบว่าจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอติเซลซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและพ้นจากแสงแดดภายในเวลา 8 สัปดาห์ ปริมาณสารต้านออกซิเดชันไม่เปลี่ยนแปลงไปนอกขีดจำกัด $X \pm 2SD$ จึงอนุมานได้ว่าสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดนี้ยังคงตัวได้ภายใน 8 สัปดาห์ที่ภาวะการเก็บรักษา



รูปที่ 4.12 แผนภูมิควบคุมค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 และ 56 ของสารต้านออกซิเดชัน (ก) CDN 20 ppm (ข) CDN 40 ppm (ค) PBP 20 ppm (ง) PBP 40 ppm (จ) DPP 20 ppm (ฉ) DPP 40 ppm ในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอดีเซล

บทที่ 5

สรุป

ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ hydrogenated cardanol (CDN) คือ 5-*n*-pentadecyl-2-*tert*-butylphenol (PBP) และ *O,O*-diethyl *O*-(3-pentadecylphenyl) phosphorothioate (DPP) แล้วพิสูจน์โครงสร้างของสารที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ และแมสสเปกโทรเมตรีซึ่งได้ผลตรงกับกรารายงานของงานวิจัยก่อนหน้า

ภาวะที่เหมาะสมของ HPLC-UV ในการแยกและวิเคราะห์ปริมาณของสารต้านออกซิเดชัน CDN, PBP และ DPP ในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลด้วยคอลัมน์ HPLC C18 LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (ขนาด 5 ไมโครเมตร) ยาว 125 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.0 มิลลิเมตร โดยฉีดสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ศึกษาความยาวคลื่น อุณหภูมิคอลัมน์ และชนิดและอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม พบว่า ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ที่ 30 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนต์ นาที่ที่ 0–13 MeOH:น้ำ (90:10 โดยปริมาตร) จากนั้นปรับอัตราส่วนแบบเส้นตรงเป็น MeOH:น้ำ (100:0 โดยปริมาตร) ภายใน 10 นาที ซึ่งระบบนี้ให้ความสมบูรณ์ของการแยกมากกว่า 1.5

เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยศึกษาชนิดของตัวทำละลาย ปริมาณตัวทำละลาย และอุณหภูมิ พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นนอร์เทกซ์ 3 นาที แล้วจึงนำมาหมุนเหวี่ยง 5 นาที เก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำส่วนใสมาวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV เป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ได้ร้อยละการกลับคืนสูง

จากการตรวจสอบการใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ พบว่า LOD และ LOQ ของสารต้านออกซิเดชันในตัวทำละลาย MeOH เท่ากับ 0.09-0.31 ppm และ 0.29-1.02 ppm ตามลำดับ MDL และ MQL ของสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างไบโอดีเซลเท่ากับ 2.34-4.32 ppm และ 9.63-14.4 ppm ตามลำดับ ซึ่งเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างไบโอดีเซล ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของของสารต้านออกซิเดชันในตัวทำละลาย MeOH และในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลโดยพล็อตระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้น 6 ระดับเริ่มจาก LOQ หรือ MQL ถึง 100 ppm ซึ่งมีสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.9991-0.9995 และ 0.9990-0.9994 ตามลำดับ ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์คำนวณจากร้อยละของการกลับคืนของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลที่ระดับความเข้มข้น MQL, 20 และ 40 ppm มีร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 94.53-108.22, 92.30-103.83 และ 91.26-102.15 ซึ่งอยู่ภายในช่วงร้อยละการกลับคืนที่ยอมรับได้ ความเที่ยงภายในวันเดียวกันและความเที่ยงระหว่างวันของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลความเข้มข้น MQL, 20 และ 40 ppm เท่ากับ 2.92-4.04, 1.39-2.21 และ 1.24-

2.23 ตามลำดับ ซึ่ง %RSD นี้มีค่าน้อยกว่า %RSD ที่ Peer Verified Methods (PVM) กำหนด ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้สามารถใช้ได้ เมทริกซ์มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ปริมาณของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีร้อยละของอิทธิพลของเมทริกซ์เท่ากับ 19.90-21.33

ศึกษาการคงตัวของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและหุ้มด้วยพอลิเอทิลีนใน 8 สัปดาห์ จากการตรวจวัดปริมาณของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซลพบว่าปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ตรวจวัดได้ไม่เบี่ยงเบนออกนอกขีดจำกัด $X \pm 2SD$ จึงอนุมานว่าสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดนี้ยังคงตัวได้ภายใน 8 สัปดาห์ที่ภาวะการเก็บรักษา

รายการอ้างอิง

- [1] Ma, F. and Hanna, M.A. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology 70(1) (1999): 1-15.
- [2] Knothe, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. Fuel Processing Technology 86(10) (2005): 1059-1070.
- [3] Ryu, K. The characteristics of performance and exhaust emissions of a diesel engine using a biodiesel with antioxidants. Bioresource Technology 101(1, Supplement) (2010): S78-S82.
- [4] Pullen, J. and Saeed, K. An overview of biodiesel oxidation stability. Renewable and Sustainable Energy Reviews 16(8) (2012): 5924-5950.
- [5] Ding, M. and Zou, J. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. Food Chemistry 131(3) (2012): 1051-1055.
- [6] Guo, L., Xie, M.-Y., Yan, A.-P., Wan, Y.-Q., and Wu, Y.-M. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC–MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry 386(6) (2006): 1881-1887.
- [7] González, M., Gallego, M., and Valcárcel, M. Gas chromatographic flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods. Journal of Chromatography A 848(1–2) (1999): 529-536.
- [8] Hao, P.-P., Ni, J.-R., Sun, W.-L., and Huang, W. Determination of tertiary butylhydroquinone in edible vegetable oil by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. Food Chemistry 105(4) (2007): 1732-1737.
- [9] Xiu-Qin, L., Chao, J., Yan-Yan, S., Min-Li, Y., and Xiao-Gang, C. Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. Food Chemistry 113(2) (2009): 692-700.
- [10] Saad, B., et al. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. Food Chemistry 105(1) (2007): 389-394.
- [11] Wang, H. and Liu, W. Optimization of a high-performance liquid chromatography system by artificial neural networks for separation and determination of antioxidants. Journal of Separation Science 27(14) (2004): 1189-1194.
- [12] Perrin, C. and Meyer, L. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection. Food Chemistry 77(1) (2002): 93-100.

- [13] Dopico-García, M.S., López-Vilariño, J.M., and González-Rodríguez, M.V. Determination of antioxidants by solid-phase extraction method in aqueous food simulants. Talanta 66(5) (2005): 1103-1107.
- [14] Huang, W.E.N., Niu, H.A.I., Shi, B.I., Yang, M., and Jiang, J. Hplc coupled with ion trap ms/ms for analysis of tertiary butylhydroquinone in edible oil samples. Journal of Food Lipids 15(1) (2008): 1-12.
- [15] Schabron, J.F. and Fenska, L.E. Determination of BHT, Irganox 1076, and Irganox 1010 antioxidant additives in polyethylene by high performance liquid chromatography. Analytical Chemistry 52(9) (1980): 1411-1415.
- [16] Farajzadeh, M.A., Bahram, M., and Jönsson, J.Å. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array detection as an efficient and sensitive technique for determination of antioxidants. Analytica Chimica Acta 591(1) (2007): 69-79.
- [17] Pauls, R.E. Ultrahigh pressure liquid chromatographic determination of tocopherols in b100 biodiesel. Journal of the American Oil Chemists' Society 89(9) (2012): 1577-1584.
- [18] Demirbas, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. Progress in Energy and Combustion Science 31(5-6) (2005): 466-487.
- [19] Ramos, M.J., Fernández, C.M., Casas, A., Rodríguez, L., and Pérez, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. Bioresource Technology 100(1) (2009): 261-268.
- [20] Monyem, A. and H. Van Gerpen, J. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. Biomass and Bioenergy 20(4) (2001): 317-325.
- [21] Carter, T.E.K.a.M.D. Oxidation chemistry of primary and secondary antioxidants. in World Tribology Congress III, pp. 647-648. Washington, D.C., USA: World Tribology Congress III, 2005.
- [22] Phongtrakul, K. Effect of antioxidant on oxidative stability of biodiesel from palm oil. Master, Chemical Engineering Chulalongkorn University, 2009.
- [23] T. Rajeswari, B.P., K. Teesha and P. Kavitha Kumari. Degradation of cashew nut shell liquid by pseudomonas sp isolated from soil. International Journal of Microbiological Research 2(2) (2011): 172-175.
- [24] Ikeda, R., Tanaka, H., Uyama, H., and Kobayashi, S. Synthesis and curing behaviors of a crosslinkable polymer from cashew nut shell liquid. Polymer 43(12) (2002): 3475-3481.

- [25] Lomonaco, D., Cangane, F., and Mazzetto, S. Thiophosphate esters of cashew nutshell liquid derivatives as new antioxidants for poly(methyl methacrylate). Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 104(3) (2011): 1177-1183.
- [26] Chuayjuljit, S., Rattanametangkool, P., and Potiyaraj, P. Preparation of cardanol-formaldehyde resins from cashew nut shell liquid for the reinforcement of natural rubber. Journal of Applied Polymer Science 104(3) (2007): 1997-2002.
- [27] Arayaprane, W. and Rempel, G.L. Effects of cashew nut shell liquid as a plasticizer on cure characteristics, processability, and mechanical properties of 50 : 50 NR/EPDM blends: A comparison with paraffin oil. Journal of Applied Polymer Science 106(4) (2007): 2696-2702.
- [28] Ionescu, M., Wan, X., Bilić, N., and Petrović, Z. Polyols and rigid polyurethane foams from cashew nut shell liquid. Journal of Polymers and the Environment 20(3) (2012): 647-658.
- [29] Suresh, K.I. and Kishanprasad, V.S. Synthesis, structure, and properties of novel polyols from cardanol and developed polyurethanes. Industrial & Engineering Chemistry Research 44(13) (2005): 4504-4512.
- [30] Kim, S. The reduction of formaldehyde and VOCs emission from wood-based flooring by green adhesive using cashew nut shell liquid (CNSL). Journal of Hazardous Materials 182(1-3) (2010): 919-922.
- [31] Kasemsiri, P., Hiziroglu, S., and Rimdusit, S. Properties of wood polymer composites from eastern redcedar particles reinforced with benzoxazine resin/cashew nut shell liquid copolymer. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing 42(10) (2011): 1454-1462.
- [32] Scorzza, C., Nieves, J., Vejar, F., and Bullón, J. Synthesis and Physicochemical Characterization of Anionic Surfactants Derived from Cashew Nut Shell Oil. Journal of Surfactants and Detergents 13(1) (2010): 27-31.
- [33] Peungjitton, P., Sangvanich, P., Pornpakakul, S., Petsom, A., and Roengsumran, S. Sodium cardanol sulfonate surfactant from cashew nut shell liquid. Journal of Surfactants and Detergents 12(2) (2009): 85-89.
- [34] Al-Hazzani, A., Periyasamy, V., Subash-Babu, P., and Alshatwi, A. Formulation of cashew nut shell liquid (CNSL) nanoemulsion, a potent inhibitor of human MCF-7 breast cancer cell proliferation. Medicinal Chemistry Research 21(7) (2012): 1384-1388.

- [35] Oliveira, M.S.C., et al. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. Acta Tropica 117(3) (2011): 165-170.
- [36] Suwanprasop, S., Nhujak, T., Roengsumran, S., and Petsom, A. Petroleum marker dyes synthesized from cardanol and aniline derivatives. Industrial & Engineering Chemistry Research 43(17) (2004): 4973-4978.
- [37] SenthilKumar, P., Ramalingam, S., Sathyaselvabala, V., Kirupha, S.D., and Sivanesan, S. Removal of copper(II) ions from aqueous solution by adsorption using cashew nut shell. Desalination 266(1-3) (2011): 63-71.
- [38] Kumar, P.S., Ramalingam, S., Kirupha, S.D., Murugesan, A., Vidhyadevi, T., and Sivanesan, S. Adsorption behavior of nickel(II) onto cashew nut shell: Equilibrium, thermodynamics, kinetics, mechanism and process design. Chemical Engineering Journal 167(1) (2011): 122-131.
- [39] Yves Grohens, K.K.S.a.A.B. Recycling and Reuse of Materials and Their Products. Chapter 8. Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) Conversion to Commercially Useful Product, ed. Shobha Suryanarayan Sharma, A.N.a.K.V.P. Vol. 3: Apple Academic Press, 2013.
- [40] Phani Kumar, P., Paramashivappa, R., Vithayathil, P.J., Subba Rao, P.V., and Srinivasa Rao, A. Process for isolation of cardanol from technical cashew (*anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(16) (2002): 4705-4708.
- [41] Lubi, M.C. and Thachil, E.T. Cashew nut shell liquid (CNSL) - a versatile monomer for polymer synthesis. Designed Monomers and Polymers 3(2) (2000): 123-153.
- [42] Pillai, C.K.S., Mathew, A.G., Sudha, J.D., and Menon, A.R.R. Cashewnut shell liquid--its polymeric and other industrial products. Journal of scientific and industrial research 44 (1985): 324.
- [43] Suwanakarn, P. Synthesis of sodium cardanol sulfonate from cashew nut shell liquid. Master degree, Science Chulalongkorn University, 2000.
- [44] Wright, J.S., Johnson, E.R., and DiLabio, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. Journal of the American Chemical Society 123(6) (2001): 1173-1183.
- [45] Solomons, C.B.F.a.T.W.G. Organic Chemistry. 9th ed. Other Reactions of the O-H Group of Phenols. Vol. 9: John Wiley & Sons, Incorporated, 2008.

- [46] Rodrigues F, M., et al. Antioxidative properties of hydrogenated cardanol for cotton biodiesel by PDSC and UV/VIS. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 97(2) (2009): 605-609.
- [47] Rios, M.A.d.S., Santiago, S.N., Lopes, A.A.L.S., and Mazzetto, S.E. Antioxidative activity of 5-*n*-pentadecyl-2-*tert*-butylphenol stabilizers in mineral lubricant oil. Energy & Fuels 24(5) (2010): 3285-3291.
- [48] Mazzetto, S.E., Oliveira, L.D.M., Lomonaco, D., and Veloso, P.A. Antiwear and antioxidant studies of cardanol phosphate ester additives. Associação Brasileira de Engenharia Química 29(3) (2012).
- [49] Daley, R.F.D.a.S.J. Organic Chemistry. 1.3 ed. Chapter 18 Aromatic Substitution Reactions. Daley & Daley, 2005.
- [50] Maia, F.J.N., et al. Electrochemical and computational studies of phenolic antioxidants from cashew nut shell liquid. Electrochimica Acta 79(0) (2012): 67-73.
- [51] Lopes, A.A.S., et al. Study of antioxidant property of a thiosphorated compound derived from cashew nut shell liquid in hydrogenated naphthenics oils. Brazilian Journal of Chemical Engineering 25(1) (2008).
- [52] เพชรสม, แอ.แ. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์, 2535.
- [53] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Dolan, J.W. Sample preparation. in Introduction to modern liquid chromatography, pp. 757-808: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- [54] ศรีพงษ์, ถ. อัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรสโกปี. Vol. 2. มหาวิทยาลัยศิลปากร จ.นครปฐม: โรงพิมพ์ มหาวิทยาลัยศิลปากร 2543.
- [55] Gustavo González, A. and Ángeles Herrador, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. TrAC Trends in Analytical Chemistry 26(3) (2007): 227-238.
- [56] Marcato, B. and Cecchin, G. Analysis of mixtures containing free fatty acids and mono-, di- and triglycerides by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering detection. Journal of Chromatography A 730(1-2) (1996): 83-90.
- [57] Kimura, D.B.R.-A.a.M. Harvestplus handbook for carotenoid analysis. Brasil: HarvestPlus, 2004.
- [58] Karovičová, J. and Šimko, P. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 882(1-2) (2000): 271-281.

- [59] Muniyappa, P.R.B., S. C.; Nouredini, H. . Improved conversion of plant oils and animal fats into biodiesel and co-product. Bioresource Technology 56(1) (1996): 19-24
- [60] Lin, J.-T., Snyder, L.R., and McKeon, T.A. Prediction of relative retention times of triacylglycerols in non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 808(1-2) (1998): 43-49.
- [61] Metrology, J.C.f.G.i. International vocabulary of metrology -Basic and general concepts and associated terms. 2008, Bureau International des Poids et Mesures.
- [62] Taverniers, I., De Loose, M., and Van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. TrAC Trends in Analytical Chemistry 23(8) (2004): 535-552.
- [63] International, A. Use of statistics to developed and evaluate analytical methods. 1987, United State of America.
- [64] Ermer, J., et al. Precision from drug stability studies: Investigation of reliable repeatability and intermediate precision of HPLC assay procedures. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 38(4) (2005): 653-663.
- [65] Soboleva, E., Rathor, N., Mageto, A., and Ambrus, A. Estimation of significance of 'matrix-induced' chromatographic effects. in Fajgelj, A. and Ambrus, A. (eds.),Principles and Practices of Method Validation, pp. 138-156: The Royal Society of Chemistry, 2000.
- [66] Administration, F.a.D. Bioanalytical Method Validation. 2013.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก-1 ข้อมูลจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวหรือ One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ ก-1.1 CDN 10 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	5	487.8534	97.57068	2.025109
Column 2	5	490.5627	98.11254	6.606505
Column 3	5	482.828	96.56561	4.451704

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	6.161294	2	3.080647	0.706391	0.512831	3.885294
Within Groups	52.33327	12	4.361106			
Total	58.49457	14				

ตารางที่ ก-1.2 PBP 10 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	5	504.6391	100.9278	3.963937
Column 2	5	495.1988	99.03975	2.235808
Column 3	5	490.3915	98.07831	1.714589

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	21.01483	2	10.50742	3.982932	0.047137	3.885294
Within Groups	31.65734	12	2.638111			
Total	52.67217	14				

ตารางที่ ก-1.3 DPP 10 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	5	469.1828	93.83657	1.962782
Column 2	5	472.1578	94.43157	2.384092
Column 3	5	465.2033	93.04066	2.752569

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	4.870152	2	2.435076	1.028986	0.386858	3.885294
Within Groups	28.39777	12	2.366481			
Total	33.26792	14				

ตารางที่ ก-1.4 CDN 40 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	5	497.3999	99.47998	0.05755
Column 2	5	498.8171	99.76342	0.474527
Column 3	5	497.0541	99.41082	0.085538

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0.349084	2	0.174542	0.84782	0.452474	3.885294
Within Groups	2.47046	12	0.205872			
Total	2.819545	14				

ตารางที่ ก-1.5 PBP 40 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	5	496.4597	99.29194	7.01876
Column 2	5	493.7694	98.75388	5.416758
Column 3	5	485.9464	97.18928	7.464745

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	11.93104	2	5.965519	0.899313	0.432586	3.885294
Within Groups	79.60105	12	6.633421			
Total	91.53209	14				

ตารางที่ ก-1.6 DPP 40 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	5	466.6176	93.32353	0.428831
Column 2	5	476.3387	95.26775	1.319389
Column 3	5	474.8276	94.96552	0.80131

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	10.94576	2	5.47288	6.43987	0.01259	3.885294
Within Groups	10.19812	12	0.849843			
Total	21.14388	14				

ตารางที่ ก-2 ข้อมูลจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวหรือ One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ ก-2.1 CDN 9.63 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
วันที่ 1	10	978.0007	97.80007	5.905128
วันที่ 2	10	1004.742	100.4742	12.65765
วันที่ 3	10	977.0778	97.70778	4.185649
วันที่ 4	10	977.3741	97.73741	5.724956
วันที่ 5	10	993.7386	99.37386	9.923188

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	62.89883	4	15.72471	2.047671	0.103699	2.578739
Within Groups	345.5691	45	7.679314			
Total	408.468	49				

ตารางที่ ก-2.2 CDN 20 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
วันที่ 1	10	984.3569	98.43569	2.103191
วันที่ 2	10	989.3993	98.93993	1.426571
วันที่ 3	10	983.4393	98.34393	1.992593
วันที่ 4	10	991.0993	99.10993	1.403159
วันที่ 5	10	990.5687	99.05687	0.72874

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	5.197555	4	1.299389	0.848802	0.501877	2.578739
Within Groups	68.88829	45	1.530851			
Total	74.08584	49				

ตารางที่ ก-2.3 CDN 40 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
วันที่ 1	10	984.3569	98.43569	2.103191
วันที่ 2	10	989.3993	98.93993	1.426571
วันที่ 3	10	983.4393	98.34393	1.992593
วันที่ 4	10	991.0993	99.10993	1.403159
วันที่ 5	10	990.5687	99.05687	0.72874

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	5.197555	4	1.299389	0.848802	0.501877	2.578739
Within Groups	68.88829	45	1.530851			
Total	74.08584	49				

ตารางที่ ก-2.4 PBP 7.11 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
วันที่ 1	10	998.3243	99.83243	1.479845
วันที่ 2	10	995.9134	99.59134	2.122944
วันที่ 3	10	999.8465	99.98465	1.288534
วันที่ 4	10	994.4366	99.44366	1.200654
วันที่ 5	10	1003.321	100.3321	0.735779

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	4.820085	4	1.205021	0.882443	0.482088	2.578739
Within Groups	61.44981	45	1.365551			
Total	66.26989	49				

ตารางที่ ก-2.5 PBP 20 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
วันที่ 1	10	975.109	97.5109	7.969451
วันที่ 2	10	972.3935	97.23935	3.83172
วันที่ 3	10	975.3905	97.53905	4.724196
วันที่ 4	10	970.1268	97.01268	5.505365
วันที่ 5	10	961.5898	96.15898	1.67477

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	12.73869	4	3.184672	0.671716	0.615039	2.578739
Within Groups	213.3495	45	4.741101			
Total	226.0882	49				

ตารางที่ ก-2.6 PBP 40 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
วันที่ 1	10	986.3413	98.63413	7.860795
วันที่ 2	10	988.3139	98.83139	12.51121
วันที่ 3	10	989.891	98.9891	0.406556
วันที่ 4	10	984.801	98.4801	1.520324
วันที่ 5	10	989.7186	98.97186	3.917208

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	1.943836	4	0.485959	0.092683	0.984291	2.578739
Within Groups	235.9448	45	5.243217			
Total	237.8886	49				

ตารางที่ ก-2.7 DPP 14.4 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
วันที่ 1	10	1056.924	105.6924	13.06203
วันที่ 2	10	1039.074	103.9074	18.99358
วันที่ 3	10	1048.994	104.8994	17.24269
วันที่ 4	10	1041.948	104.1948	22.38136
วันที่ 5	10	1048.935	104.8935	23.70799

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	19.44001	4	4.860001	0.25475	0.905253	2.578739
Within Groups	858.489	45	19.07753			
Total	877.929	49				

ตารางที่ ก-2.8 DPP 20 ppm

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
วันที่ 1	10	927.4645	92.74645	1.517888
วันที่ 2	10	940.7201	94.07201	1.526584
วันที่ 3	10	944.2698	94.42698	2.061798
วันที่ 4	10	938.4381	93.84381	0.982907
วันที่ 5	10	941.8154	94.18154	1.327923

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	17.09884	4	4.274711	2.88166	0.033025	2.578739
Within Groups	66.7539	45	1.48342			
Total	83.85274	49				

ตารางที่ ก-2.9 DPP 40 ppm

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
วันที่ 1	10	949.285	94.9285	2.446537
วันที่ 2	10	955.8874	95.58874	1.116164
วันที่ 3	10	932.8448	93.28448	0.508025
วันที่ 4	10	941.3438	94.13438	2.847094
วันที่ 5	10	944.5183	94.45183	5.714597

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	29.79939	4	7.449849	2.948703	0.030139	2.578739
Within Groups	113.6918	45	2.526484			
Total	143.4912	49				

ตารางที่ ก-3 คำนวณ %RSD ระหว่างวัน

สารเป้าหมาย	MS_{within} (SD_{within}^2)	MS_{Between}	SD_{between}^2	SD_{interday}	\bar{x}	%RSD ระหว่างวัน
DPP 20 ppm	1.5	4.3	0.28	1.33	93.85	1.42
DPP 40 ppm	2.6	7.4	0.48	1.75	94.48	1.85

$$SD_{\text{within}}^2 = MS_{\text{within}}$$

$$SD_{\text{between}}^2 = \frac{MS_{\text{between}} - MS_{\text{within}}}{n}$$

$$SD_{\text{interday}} = \sqrt{SD_{\text{within}}^2 + SD_{\text{between}}^2}$$

เมื่อ MS_{within} คือความแปรปรวนภายในกลุ่ม MS_{between} คือความแปรปรวนระหว่างกลุ่ม SD_{within}^2 คือส่วนเบี่ยงเบนภายในกลุ่มยกกำลังสอง SD_{between}^2 คือส่วนเบี่ยงเบนระหว่างกลุ่มยกกำลังสอง SD คือส่วนเบี่ยงเบนระหว่างวัน \bar{x} คือค่าเฉลี่ยข้อมูลทั้งหมด

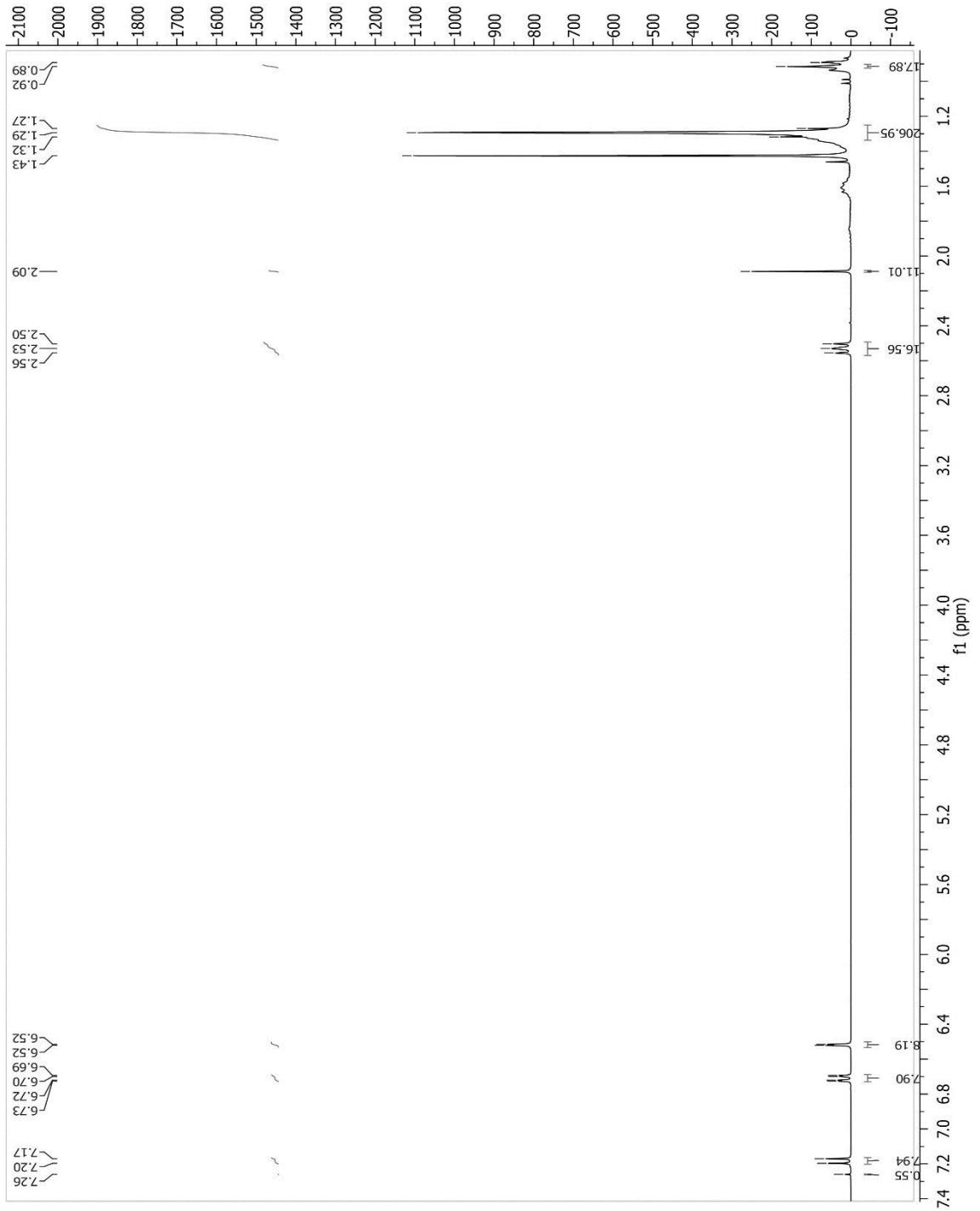
ตารางที่ ก-4 ค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืนในวันที่ 0, 7, 14, 21, 35, 42, 49 และ 56 ของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างไบโอดีเซล

สารเป้าหมาย	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลับคืน									X	X - 2SD	X + 2SD
		วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	วันที่ 35	วันที่ 42	วันที่ 49	วันที่ 56			
CDN	20 ppm	99.2	98.5	98.6	97.1	98.8	98.9	98.5	98.6	97.7	98.6	94.5	102.7
	40 ppm	97.4	99.5	99.1	99.6	99.1	99.2	98.4	98.4	99.0	98.8	96.3	101.2
PBP	20 ppm	99.1	97.2	96.6	96.4	97.0	98.3	97.7	97.8	97.9	97.1	92.8	101.4
	40 ppm	98.6	97.5	97.4	97.1	98.1	96.9	98.5	98.9	97.8	98.8	94.4	103.2
DPP	20 ppm	93.8	91.9	92.2	92.7	93.2	93.9	93.5	93.6	93.5	93.9	91.2	96.5
	40 ppm	94.5	93.6	94.7	94.1	94.5	94.4	94.9	94.2	94.7	94.5	91.1	97.9

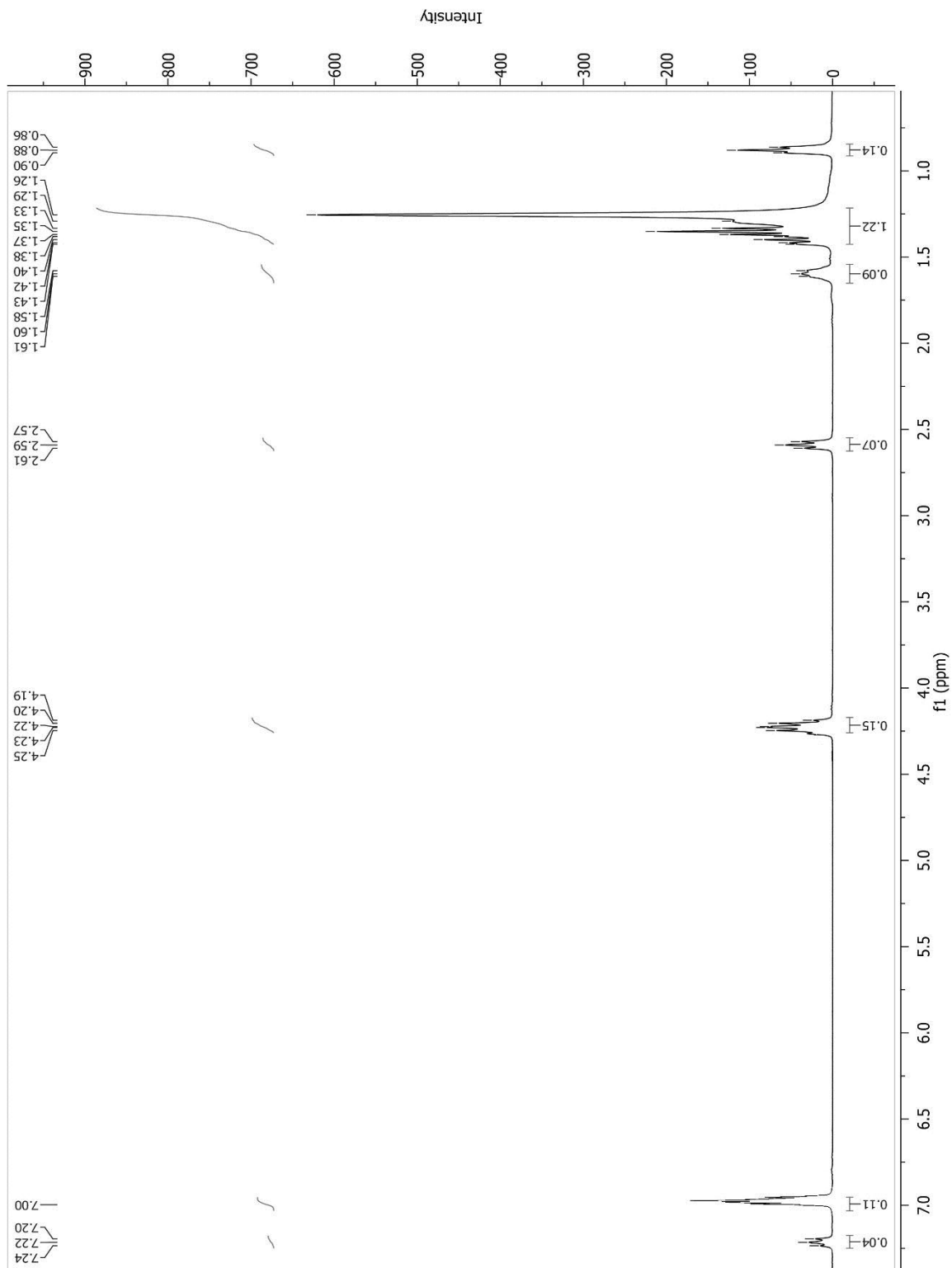
ภาคผนวก ข

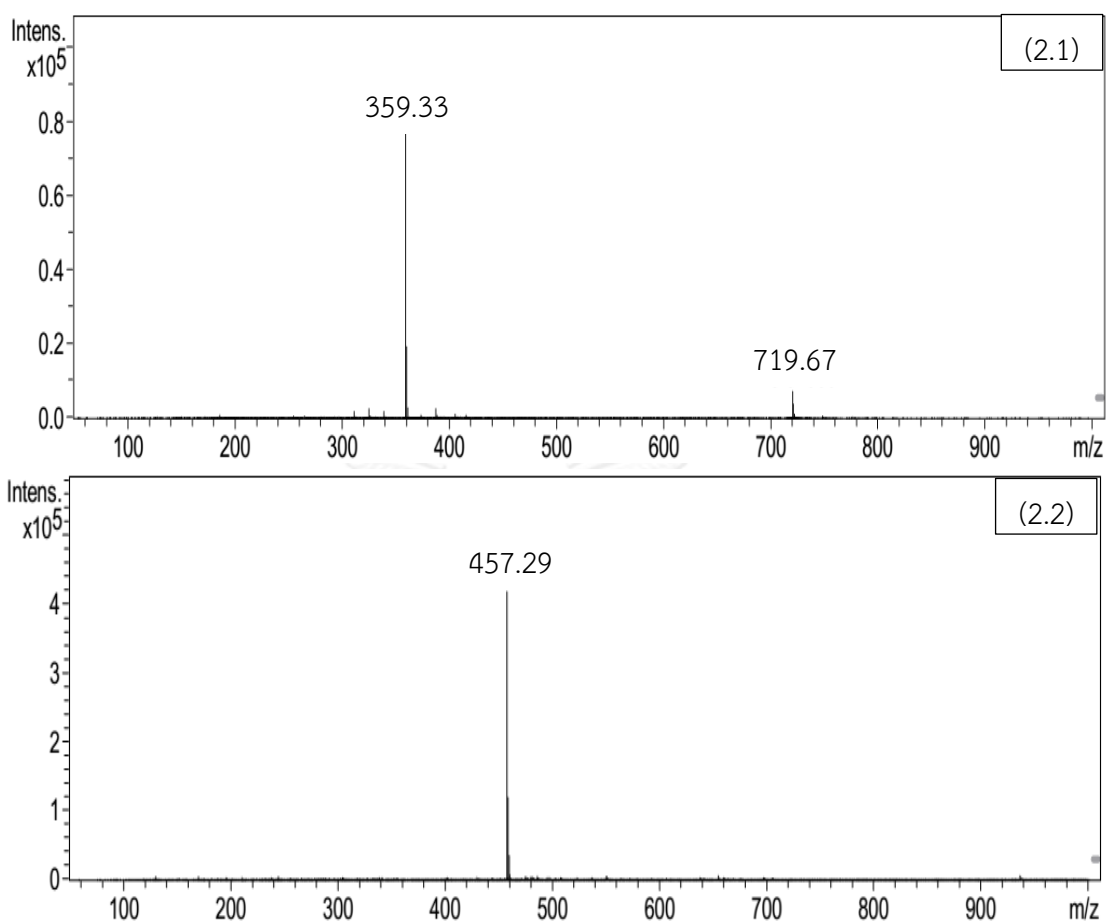
รูปที่ ข-1 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของอนุพันธ์ของ hydrogenated cardanol (CDN)

รูปที่ ข-1.1 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ 5-*n*-pentadecyl-2-*tert*-butylphenol (PBP) ใน CDCl₃

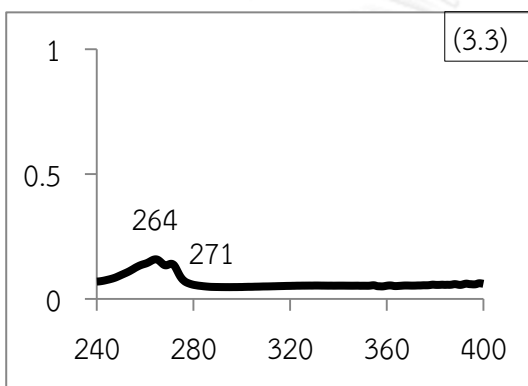
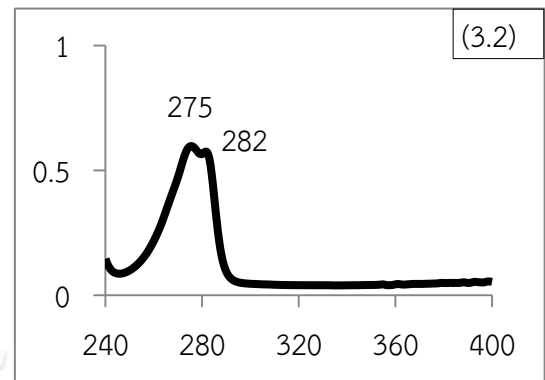
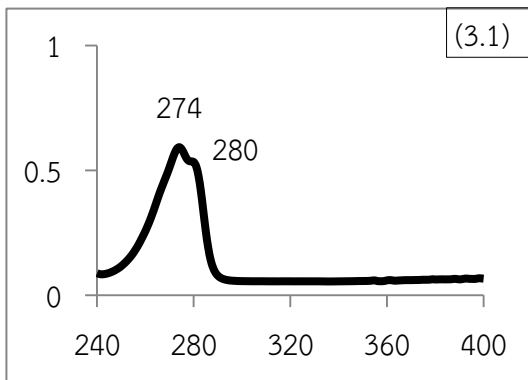


รูปที่ ข-1.2 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ *O,O*-diethyl *O*-(3-pentadecylphenyl) phosphorothioate (DPP) ใน CDCl_3



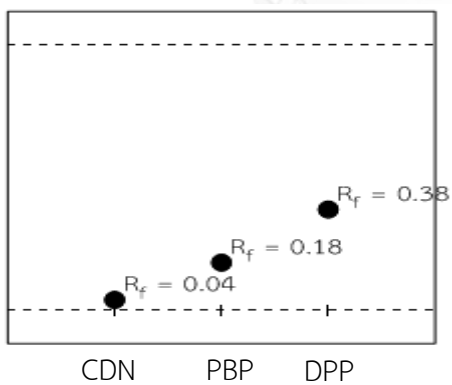


รูปที่ ข-2 แมสสเปกตรัมของอนุพันธ์คาร์ดานอลไฮโดรจินेट (2.1) PBP ใน MeOH (2.2) DPP ใน MeOH

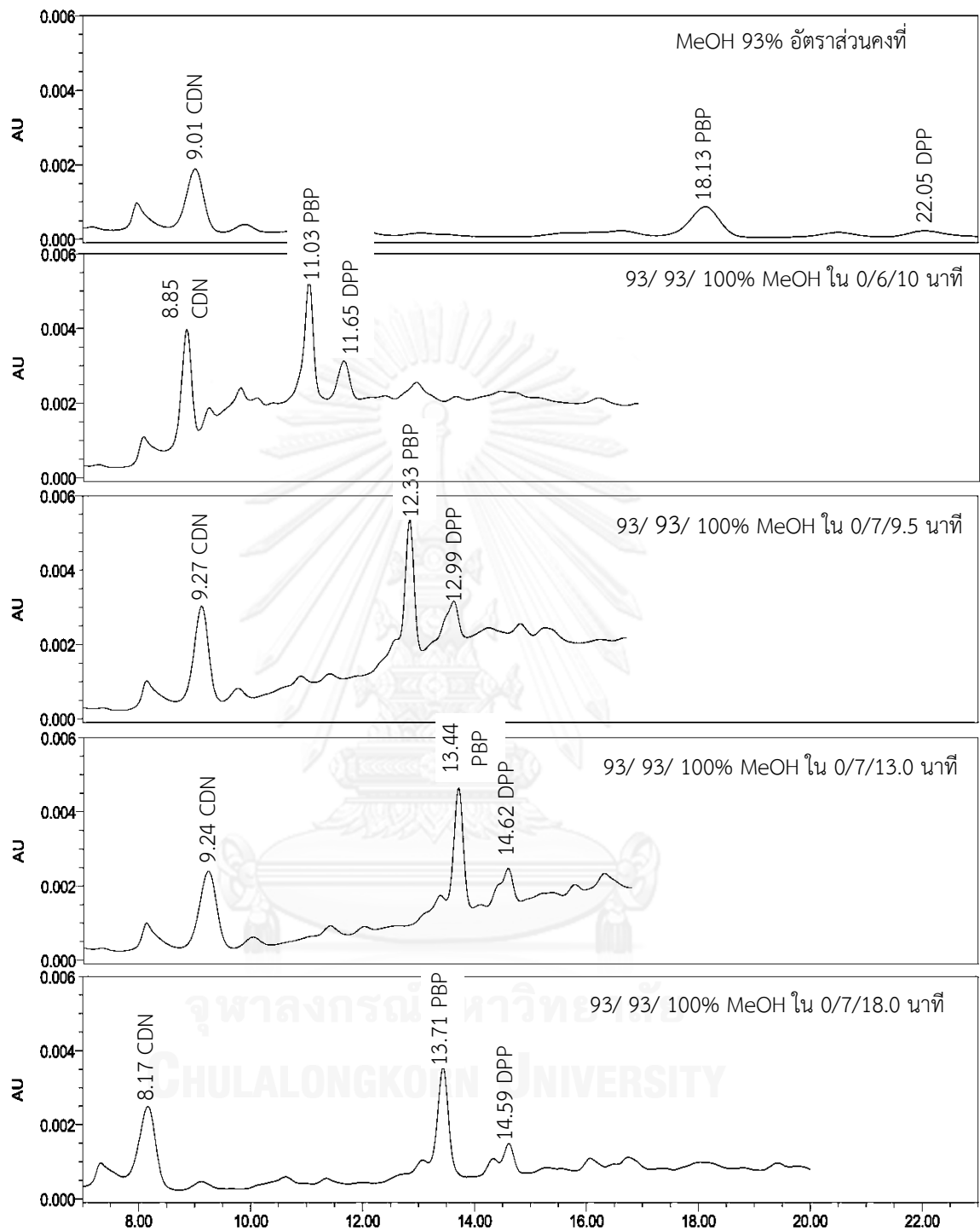


รูปที่ ข-3 อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกตรัมของสารต้านออกซิเดชันในเมทานอล (3.1) CDN

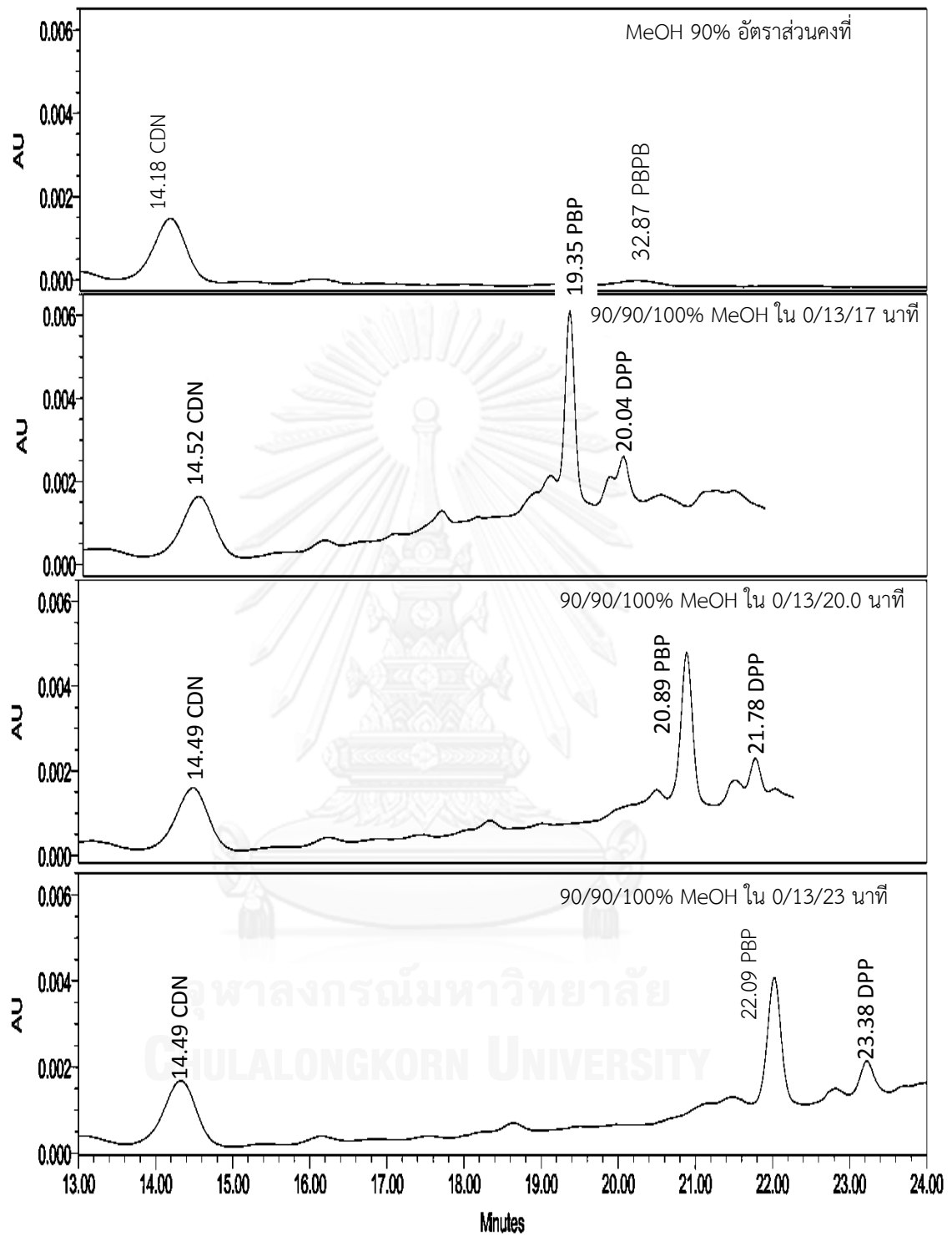
(3.2) PBP (3.3) DPP



รูปที่ ข-4 ระยะทางที่สารเคลื่อนที่บนทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีด้วยเฟสเคลื่อนที่เฮกเซน:เอทิลอะซีเตตในอัตราส่วน 95:5

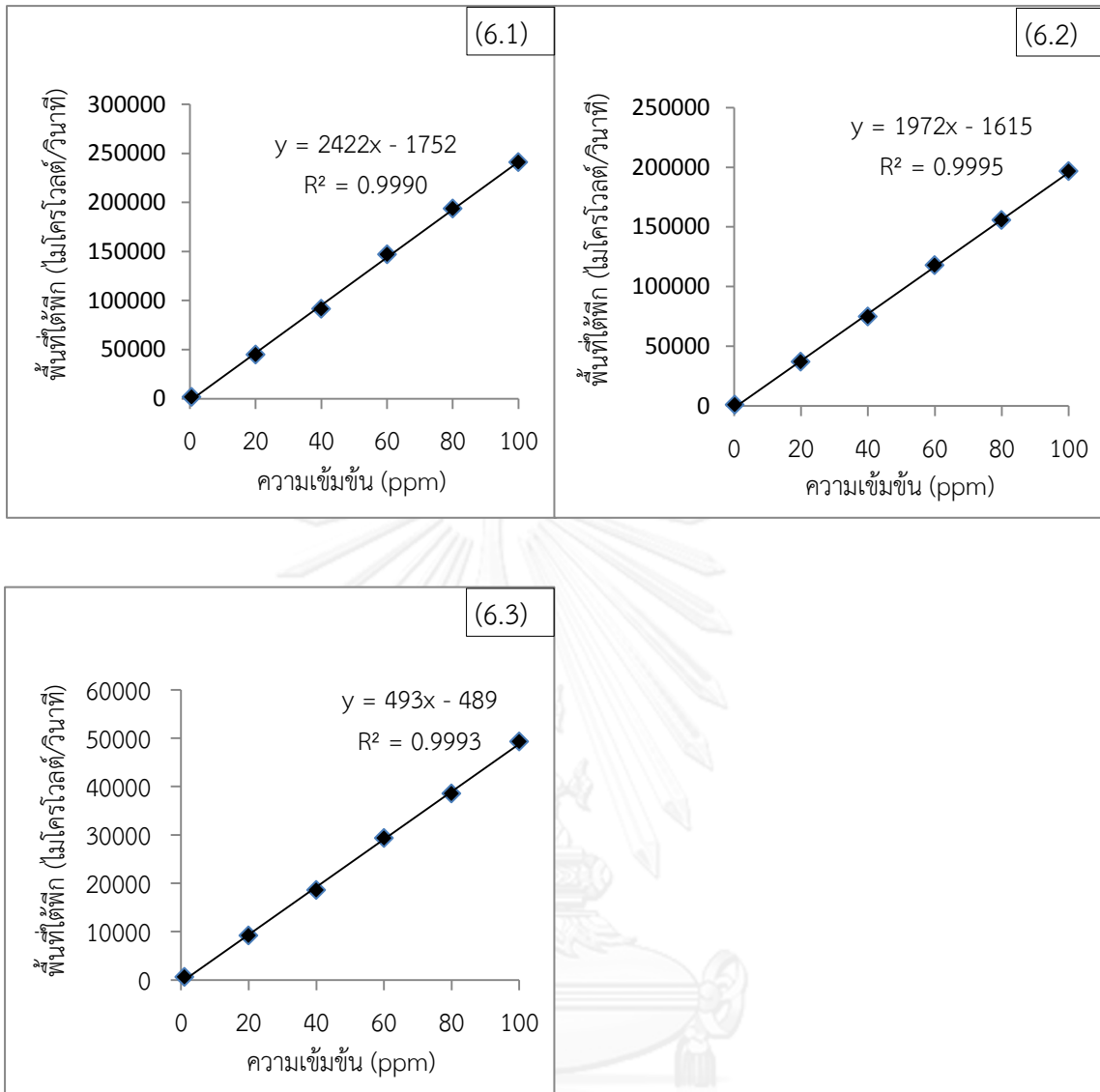


รูปที่ ข-5.1

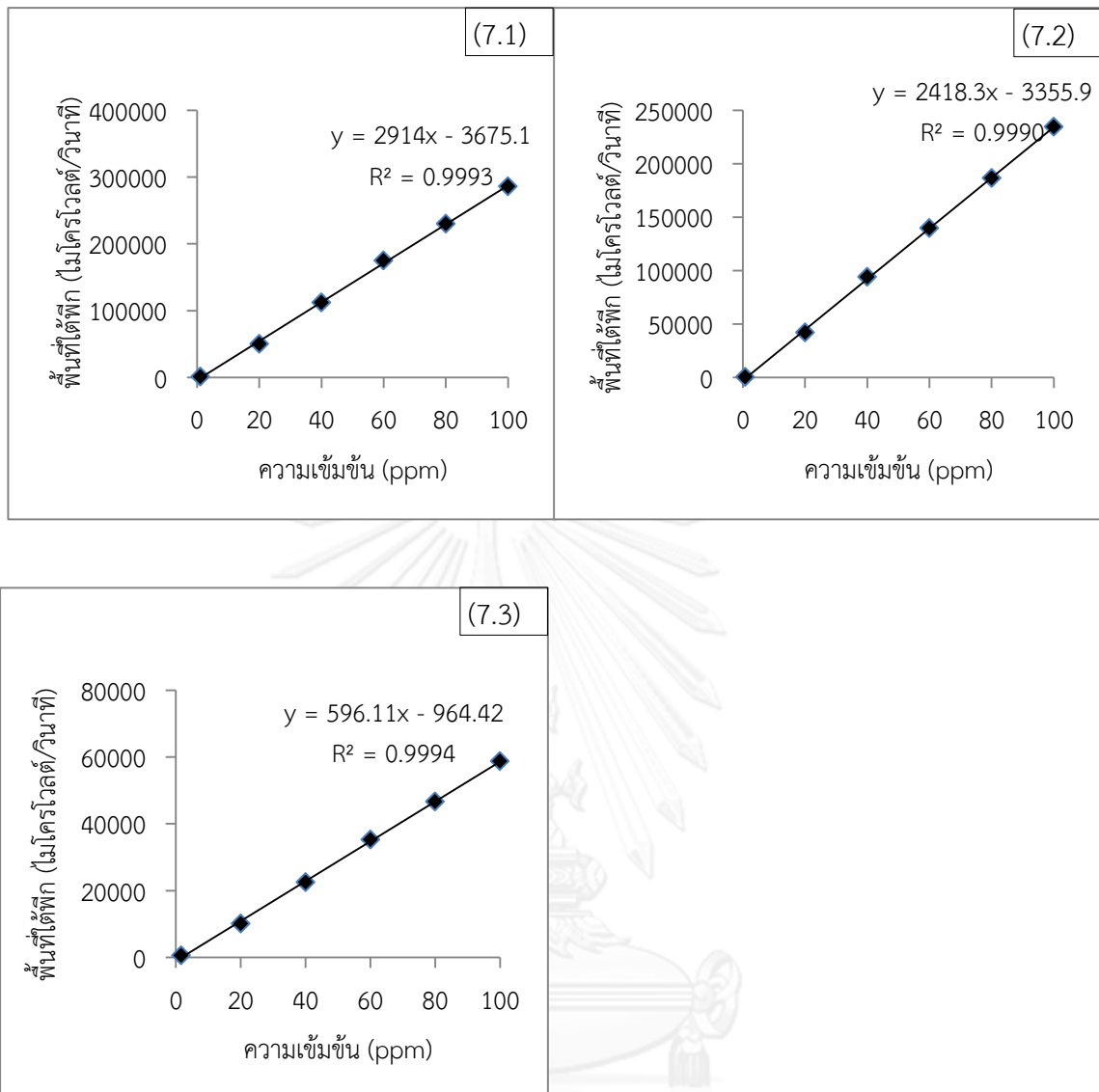


รูปที่ ข-5.2

รูปที่ ข-5 โครมาโทแกรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งสามชนิดในส่วนสกัดตัวอย่างไปโอดีเซลด้วยเฟสเคลื่อนที่เมทานอล:น้ำแบบเกรเดียนท์



รูปที่ ข-6 กราฟมาตรฐานของสารต้านออกซิเดชันในเมทานอล (6.1) CDN (6.2) PBP (6.3) DPP



รูปที่ ข-7 กราฟมาตรฐานของสารต้านออกซิเดชันในส่วนสกัดตัวอย่างใบโอดีเซล (6.1) CDN (6.2) PBP (6.3) DPP

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุปรียา สุอังคนารัตน์ เกิดที่กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีการบรรจุ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในปี พ.ศ. 2550 และในปี พ.ศ. 2554 เริ่มศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY