ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

1. **การวิเคราะห์ค่าสปอนิฟิเคชัน** (saponification value)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มอล ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % ซึ่งเตรียมไว้อย่างน้อย 5 วัน
2. กรดเกลือเข้มข้น 0.5 นอร์มอล
3. ฟีนอฟทาลีน ร้อยละ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-2 กรัม ใส่ในขวดสะอาดและแห้ง
2. เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปต และเติมลูกแก้ว
3. จัดเครื่องกลั่นพร้อมเปิดน้ำหล่อชุดควบแน่น รีฟลักซ์สารละลาย (ให้เดือดเบาๆ) นาน 1 ชั่วโมง
4. นำขวดใส่สารละลายออกจากอุปกรณ์ควบแน่นของชุดกลั่น
5. เติมฟีนอฟทาลีน 5 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก
6. เตรียมและไตเตรท blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง
7. คำนวณค่าสปอนิฟิเคชันจากสูตร

$$\text{ค่าสปอนิฟิเคชัน} = \frac{(B - A) \times N \times 56.1}{W}$$

โดย

B = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

A = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ไตรเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นสารละลายกรดไฮโดรคลอริค (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

2. **การวิเคราะห์ค่าเพอร์ออกไซด์**

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายผสมอะซิติก-คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 3:2
2. สารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์
3. สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต เข้มข้น 0.01 นอร์มอล
4. น้ำแป้งเข้มข้น 1 %

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

ปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์

ค่าเปอร์ออกไซด์ที่คาดคะเนไว้ (มิลลิกรัมสมมูล)	น้ำหนักตัวอย่างที่เหมาะสม (กรัม)
0-12	5.0-2.0
12-20	2.0-1.2
20-30	1.2-0.8
30-50	0.8-0.5
50-90	0.5-0.3

2. เติมสารละลายแอซิติก-คลอโรฟอร์ม 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลาย
3. เติมสารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ 1 มิลลิลิตร ปิดจุกพร้อมเขย่านาน 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 5 นาที
4. เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร
5. ไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต พร้อมเขย่าอย่างแรงจนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 0.5 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทต่อไปจนสีน้ำเงินหมดไป
6. เตรียมและไตเตรทแบลงก์เช่นเดียวกับตัวอย่าง
7. คำนวณค่าเปอร์ออกไซด์จากสูตร

$$\text{ค่าเปอร์ออกไซด์} = \frac{(a - b) \times N \times 1000}{W}$$

a = ปริมาตร(มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตกับตัวอย่าง

b = ปริมาตร(มิลลิลิตร) ของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตกับแบลงก์

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3. **การวิเคราะห์ค่าไอโอดีนในไขมันและน้ำมัน**

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายวิจส์ โดยการชั่งสารไอโอดีนคลอไรด์ (ICl) หนัก 16.5 กรัม ละลายใน glacial acetic acid และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร หรืออาจเตรียมโดยชั่งไอโอดีนไตรคลอไรด์ 9 กรัม ละลายในสารละลายผสมของกรดแอซิติก 700 มิลลิลิตร และคาร์บอนเตตราคลอไรด์ 300 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา ปิดผนึกให้แน่นด้วยพาราฟิน จนกว่าจะนำมาใช้
2. โพแทสเซียมไอโอไดด์เข้มข้นร้อยละ 10
3. โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

โดยชั่งโซเดียมไทโอซัลเฟต 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดเบาๆ 5 นาที แล้วถ่ายลงในขวดเก็บสีชาขณะร้อน เก็บสารละลายในที่มืดและเย็น ทำการหาความเข้มข้นมาตรฐานโดยการอบสารโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอนใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 3 ขวดๆ ละ 0.1 กรัม (สำหรับความเข้มข้น 1 นอร์มอล) แต่ละขวดเติมน้ำกลั่นปราศจากคลอรีนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่มีโพแทสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม และเติมสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งในที่มืดทันที เป็นเวลา 10 นาที แล้วไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตข้างต้น โดยใช้น้ำแป้งเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นอินดิเคเตอร์

4. คำนวณความเข้มข้นจากสูตร

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

$$= \frac{\text{น้ำหนักโพแทสเซียมไดโครเมต (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรท} \times 0.0490}$$

สมมูลของโพแทสเซียมไดโครเมต = 49.032

5. คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4)
6. น้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน

ปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ค่าไอโอดีน

ค่าไอโอดีนที่คาดคะเน	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
< 5	3.00
5-20	1.00
21-50	0.40
51-100	0.20
101-150	0.13
151-200	0.10

2. เติมคาร์บอนเตตราคลอไรด์ 15 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายวิจส์ 25 มิลลิลิตร
4. เขย่าขวดและตั้งไว้ที่มืด 1-2 ชั่วโมง
5. เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ปริมาณ 20 มิลลิลิตร และน้ำต้มใหม่ซึ่งเย็นแล้ว 150 มิลลิลิตร

6. ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.1 นอร์มอล จนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 2-3 หยด จะกลายเป็นสีน้ำเงินแล้วไตเตรทต่อปจนสีน้ำเงินหมดไป ก่อนปฏิกิริยาจะสิ้นสุดถึงจุดยุติให้ปิดขวดด้วยจุกยางเขย่าอย่างแรงเพื่อให้ไอโอดีนที่เหลืออยู่ในชั้นของคาร์บอนเตตราคลอไรด์ถูกดึงออกมาให้หมด
7. เตรียมแบลงก์โดยวิธีเดียวกัน
8. คำนวณค่าไอโอดีนจากสูตร

$$\text{ค่าไอโอดีน} = \frac{(b - a) \times N \times 12.69}{W}$$

a = ปริมาณโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b = ปริมาณโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับแบลงก์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

หมายเหตุ : ถ้าค่า $a - b > b/2$ ให้ทดลองใหม่โดยใช้ปริมาณตัวอย่างให้น้อยลง

4. **การวิเคราะห์ค่ากรดและกรดไขมันอิสระ**

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล สำหรับความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บสารละลายด่างในขวดแก้ว ก่อนใช้ทำการหาความเข้มข้นมาตรฐานที่แน่นอนโดยการนำโพแทสเซียมเอซิดพาทาเลท ($KHC_8H_4O_4$) ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 1- 2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 0.8 กรัม (สำหรับความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอเนต 25 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทกับสารละลายด่างข้างต้น โดยมีฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์
3. คำนวณความเข้มข้นด่างจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นสารละลาย NaOH} = \frac{\text{น้ำหนักโพแทสเซียมแอซิดพาทาเลต (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลาย NaOH ที่ใช้} \times 0.2042}$$

สมมูลของโพแทสเซียมแอซิดพาทาเลท = 204.216

4. ฟีนอฟทาลีน เข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-10 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายเอทธิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกลาง โดยเติมฟีนอฟทาลีน 5 หยด และปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล หยดด่างที่ละหยดพร้อมทั้งเขย่าหรือคนจนได้สีชมพูถาวร
3. เติมเอทิลแอลกอฮอล์ที่เป็นกลาง 50 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง เขย่าอย่างแรงให้ตัวอย่างละลายในแอลกอฮอล์ ถ้าละลายได้ไม่ดีให้อุ่นที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส
4. ไตเตรทสารละลายตัวอย่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ขณะไตเตรทต้องเขย่าอย่างแรง จนกระทั่งได้สีชมพูคงที่อยู่ประมาณ 1 นาที
5. คำนวณค่ากรดและปริมาณกรดไขมันอิสระจากสูตร

ค่ากรด (มิลลิกรัม) = $\frac{\text{ปริมาตรด่างที่ใช้ (มิลลิลิตร) x ความเข้มข้นด่าง (นอร์มอล) x 56.1}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$

กรดไขมันอิสระร้อยละในรูปกรดโอเลอิก

$= \frac{\text{ปริมาตรด่างที่ใช้ (มิลลิลิตร) x ความเข้มข้นด่าง (นอร์มอล) x 28.2}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$

5. **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไลเปส ตามวิธีการของ** Lowry **และคณะ** (1951)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A : คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2. สารละลาย B : โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassiumtartrate. $4H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 1(น้ำหนักต่อปริมาตร)
3. สารละลาย C : โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
4. Folin-Ciocalteu reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย WS1 และ WS2 ใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน โดย

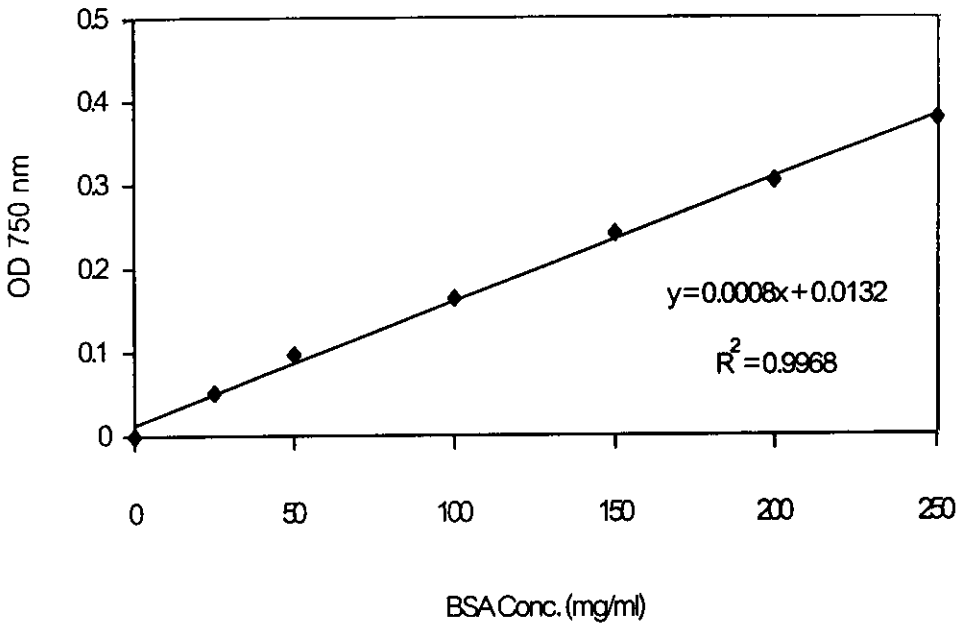
   WS1 : สารผสมของสารละลาย A : สารละลาย B : สารละลาย C : ในอัตราส่วน 1:1:98 (ปริมาตร : ปริมาตร : ปริมาตร)

   WS2 : สารละลาย Folin-Ciacalteu reagent เจือจางกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
2. เติมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นในช่วงที่เหมาะสม (5-100 ไมโครกรัม) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 5.0 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายตัวอย่าง WS1 ปริมาตร 2.1 มิลลิลิตร ปั่นผสม แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที
4. เติมสารละลายตัวอย่าง WS2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ปั่นผสม แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที
5. นำสารละลายที่ได้มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยทำ blank เช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA)

1. ชั่ง bovine seru albumin (BSA) น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น โดยค่อยๆ เติมน้ำกลั่นเพื่อชะฟองที่เกิดขึ้น เมื่อชะฟองหมดปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร จะได้ BSA ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. นำสารละลายที่ได้ในข้อ 1 ปริมาตร 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิลิตรจะได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. นำสารละลายที่ได้ในข้อ 2 ความเข้มข้นละ 0.2 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดขนาด 5 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลาย WS1 ปริมาตร 2.1 มิลลิลิตร ปั่นผสม แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที
5. เติมสารละลาย WS2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ปั่นผสมทันทีแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที
6. นำสารละลายที่ได้มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยทำ blank เช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง
7. นำข้อมูลที่เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน (BSA) แสดงดังภาพผนวก ก1



ภาพภาคผนวก ก1 กราฟมาตรฐานโปรตีน

Figure-Appendix A1 Standard curve of protein

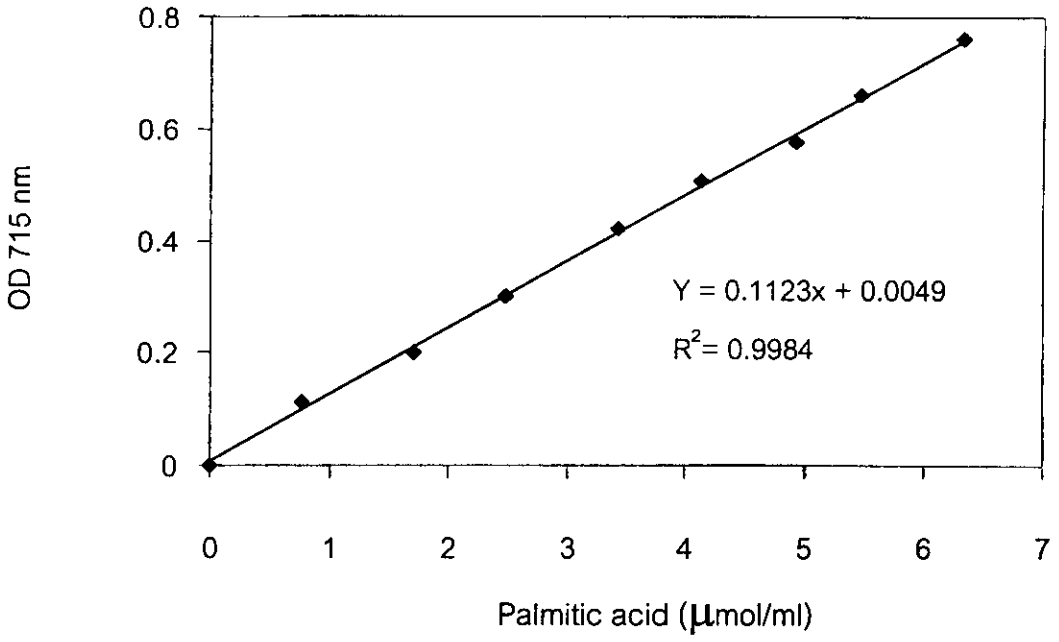
6. **การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดปาล์มมิติก**

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. กรดปาล์มมิติก
2. ไอโซออกเทน
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 (ภาคผนวก ข)
4. สารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมโดยชั่ง cupric acetate ($C_4H_6CuO_4.H_2O$) 50.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร กรองส่วนที่ไม่ละลายออก ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.1 ด้วยไพริดีน และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งกรดปาล์มมิติกที่มีความบริสุทธิ์สูงให้มีน้ำหนักแน่นอนตั้งแต่ 0-10 มิลลิกรัม ละลายในไอโซออกเทนปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยในการละลาย
2. นำสารละลายกรดปาล์มมิติกที่เตรียมได้จากข้อ 1 ความเข้มข้นละ 1.0 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมอย่างรวดเร็ว ทิ้งให้แยกชั้น
3. ดูดสารละลายชั้นบนวัดการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออกเทนเป็น blank
4. นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดปาล์มิติก แสดงดังภาพภาคผนวก ก2



ภาพภาคผนวก ก2 กราฟมาตรฐานกรดปาล์มมิติก

Figure-Appendix A2 Standard curve of palmitic acid

7. **การเตรียมสารละลายเมทิลเอสเทอร์**

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเมทิลเอสเทอร์

1. ไอโซออกเทน
2. สารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ในเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 20
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้) (ภาคผนวก ข)
4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว
5. ก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์

วิธีการเตรียมเมทิลเอสเทอร์

1. ชั่งตัวอย่างไขปาล์ม 25 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์และปิดฝาหลอดให้แน่น ปั่นผสมแล้วแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
2. ทำให้เย็นทันทีแล้วเติมสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ในเมทานอล ปริมาตร2.0 มิลลิลิตร เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์และปิดฝาหลอดให้แน่น ปั่นผสมแล้วแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที
3. ทำให้เย็นทันทีโดยให้มีอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส แล้วเติมไอโซออกเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ปั่นผสมเป็นเวลา 30 วินาที
4. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ทันที ปั่นผสมแล้วตั้งทิ้งไว้สารละลายแยกชั้น
5. ดูดสารละลายชั้นบน (ส่วนของไอโซออกเทน) ใส่ใน injection vial tube ที่สะอาดและแห้ง
6. สกัดสารละลายชั้นล่างซ้ำอีกครั้งด้วยไอโซออกเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ปั่นผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนที่ได้ใส่ใน injection vial tube เดียวกันกับที่ได้จากข้อ 5 เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์และปิดฝาหลอดให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

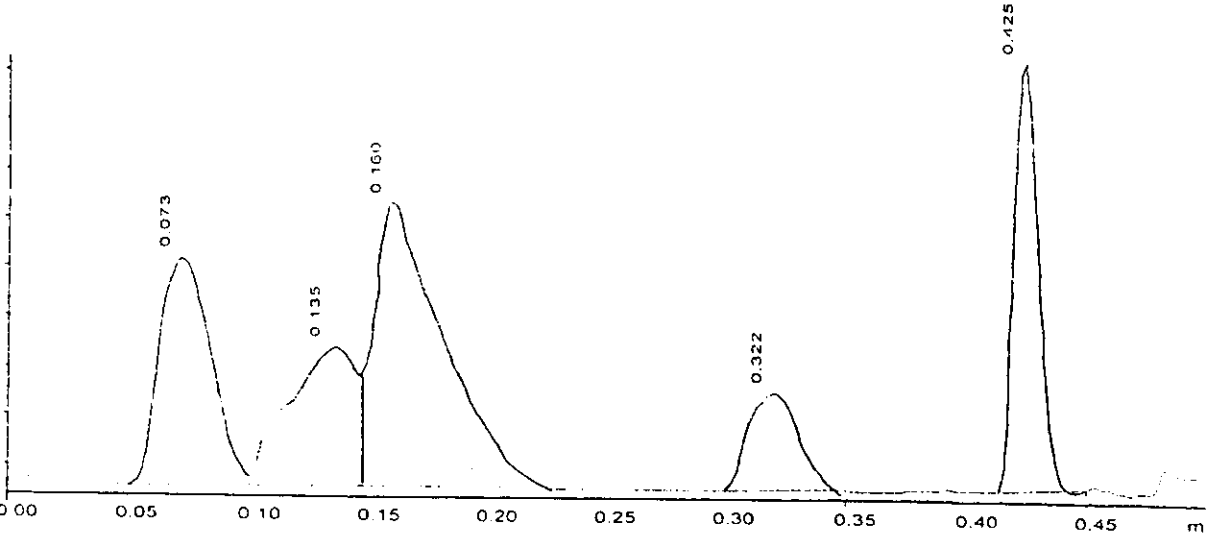
8. การหาค่ามาตรฐานของสารประกอบกลีเซอไรด์และเมทิลเอสเทอร์

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารประกอบกลีเซอไรด์มาตรฐาน (tristearin, stearic acid, di-stearin และ mono-stearin) และ เมทิลเอสเทอร์
2. กรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 3
3. สารละลายผสมของ เฮกเซน : ไดเอทธิลอีเทอร์ : กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 50 : 20 : 0.3 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) และสารละลายผสมของ เฮกเซน : เบนซีน ในอัตราส่วน 1 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

วิธีวิเคราะห์

1. ละลายสารประกอบกลีเซอไรด์และเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยคลอโรฟอร์ม และเจือจางเป็น 100 เท่า
2. เตรียม quartz rods (silica gel poedre coated Chromarod S-III) โดยแช่ในสารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาที นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปทำ blank scan ด้วย TLC/FID analyzer ภายใต้สภาวะ 30 วินาทีต่อสแกน อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของอากาศ 2000 มิลลิลิตรต่อนาที
3. หยดสารละลายไตรกลีเซอไรด์และเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานบน quartz rods ประมาณ 1 ไมโครลิตร นำ quartz rods ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน : ไดเอทิลอีเทอร์ : กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 50 : 20 : 0.3 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 8 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน : เบนซิน ในอัตราส่วน 1: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร
4. นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาสแกนภายใต้สภาวะเดียวกันกับ blank scan
5. อ่านผลการวิเคราะห์จากโปรแกรม ChromStar light โดยผลการทดลองแสดงในรูปเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แต่ละ peak ดังภาพผนวก ก3



Calculation Method : Percent

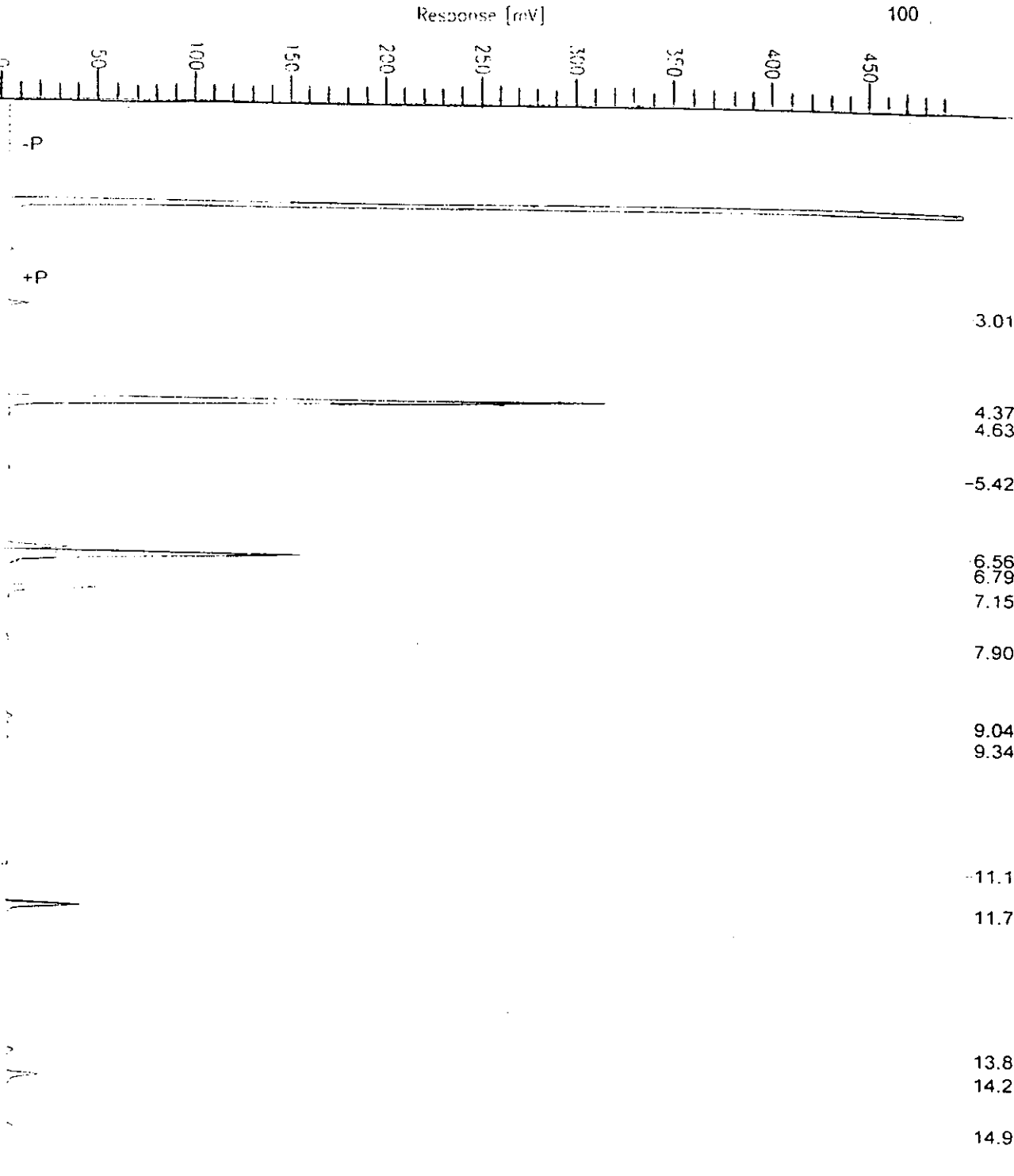
Peak-No	Ret.Time (min)	Pk.Start (min)	Pk.End(min) Area	Area	Height(mV)	Area%
1	0.073	0.050	0.100	7099	9.22	20.769
2	0.135	0.100	0.147	5771	5.63	16.884
3	0.160	0.147	0.225	12031	11.47	35.199
4	0.322	0.300	0.347	2821	3.89	8.254
5	0.425	0.412	0.450	6458	17.38	18.893
				34181	47.59	100.000

ภาพภาคผนวก ก3 ค่า Retention time ของสารประกอบกลีเซอไรด์และเมทิลเอสเทอร์มาตรฐาน

Figure-Appendix A3 Retention time of standard glyceride and methyl esters.

7. การหาค่ามาตรฐานขององค์ประกอบไขมันในไขปาล์มและเมทิลเอสเทอร์

การหาค่ามาตรฐานขององค์ประกอบกรดไขมันในไขปาล์มและเมทิลเอสเทอร์ ในการทดลองนี้ใช้การหาค่ามาตรฐานเชิงคุณภาพ (Qualitative Standard) ทำการทดลองโดยเตรียมไขปาล์มให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ แล้ววิเคราะห์ด้วย GC/FID analyzer ที่มีคอลัมน์แบบ Fused silica capillary DF 0.25 ไมโครเมตร ชนิด PERMABOND-FFAP ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิลิตร ความยาว 25 เมตร ให้มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 245 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มจาก 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 นาที เพิ่มขึ้นเป็น 170 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียส และเพิ่มเป็น 195 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที หลังจากนั้นเพิ่มเป็น 215 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ที่ 215 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12.5 นาที และอุณหภูมิของ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการไหลของแก๊สฮีเลียม 25 เซนติเมตรต่อนาที และ Split ratio เท่ากับ 100:1 เมื่อ GC/FID analyzer พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ ฉีดสารละลายเมทิลเอสเทอร์ของไขปาล์ม ปริมาตร 1-10 ไมโครลิตร ที่ injector port โดย GC/FID analyzer มีระบบสแกนอัตโนมัติ ผลการทดลองคำนวณได้จากพื้นที่ของ peak ซึ่งเปรียบเทียบในรูปเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ของแต่ละ peak ผลการทดลองแสดงในรูปเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แต่ละ peak ดังภาพภาคผนวก ก4



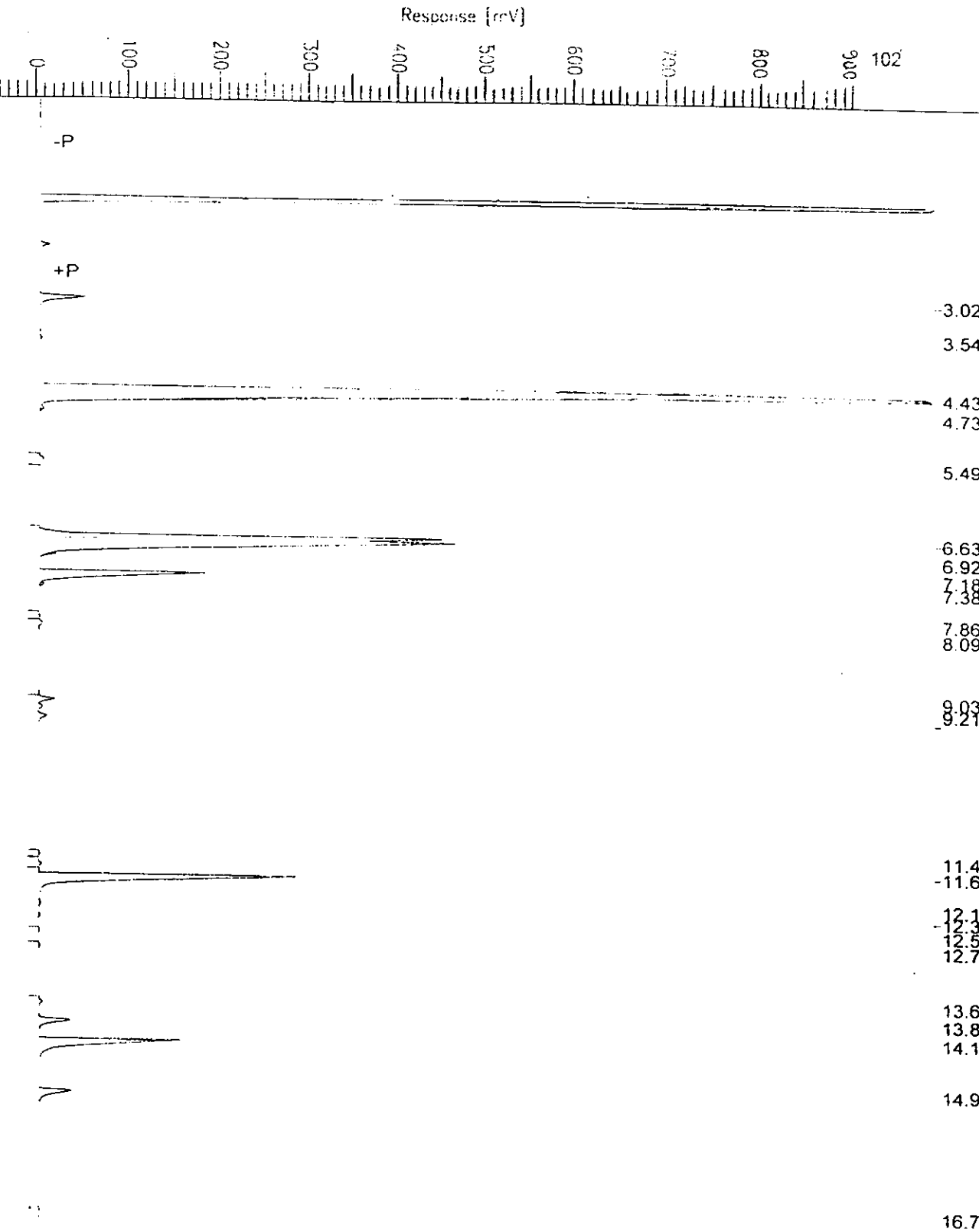
ผนวก ก4 ค่า Retention Time ขององค์ประกอบกรดไขมันในไขปาล์ม

ure-Appendix A4 Retention time of composition fatty acid from palm stearin.

Peak No.	Ret.Time(min)	Area(uV.s)	Type	Height(Uv)	Area(%)	Fatty acid
1	3.006	24052.10	BB	10781.26	1.03	C14:0
2	4.374	1199841.72	BB	312713.08	51.16	C16:0
3	4.626	1668.96	BB	788.76	0.07	
4	5.420	2309.98	BB	879.49	0.10	
5	6.561	101006.71	BV	31243.13	4.31	C18:0
6	6.630	663876.80	VE	152313.99	28.31	C18:1
7	6.785	5421.87	EB	2588.15	0.23	
8	7.145	148047.18	BE	4801.05	6.31	C18:2
9	7.289	2245.42	EB	978.84	0.10	
10	7.903	2052.81	BB	843.60	0.09	C18:3
11	9.039	7212.42	BB	2841.14	0.31	
12	9.158	1437.73	BB	605.31	0.06	
13	9.340	967.51	BB	454.93	0.04	
14	11.167	1061.48	BB	455.38	0.05	
15	11.758	107908.97	BB	38499.68	4.60	
16	13.864	9648.58	BB	3114.81	0.41	
17	14.208	56732.91	BB	16320.91	2.42	
18	14.959	9847.31	BB	2860.63	0.42	

ภาคผนวก ก4 (ต่อ)

Figure-Appendix A4 (continued)



ภาคผนวก ก5 ค่า Retention Time ขององค์ประกอบกรดไขมันในเมทิลเอสเทอร์จากไขปาล์ม

Figure-Appendix A5 Retention time of composition fatty acid from FAMEs.

Peak No.	Ret.Time(min)	Area(uV.s)	Type	Height(Uv)	Area(%)	Fatty acid
1	3.021	177715.30	BB	49287.65	1.08	C14:0
2	3.538	683.95	BB	349.09	0.00	
3	3.659	2312.35	BB	797.80	0.01	
4	4.431	8256312.27	BE	988697.91	50.24	C16:0
5	4.727	11891.16	EB	4115.47	0.07	
6	5.486	17751.56	BB	4243.50	0.11	
7	6.632	1559265.31	BV	447303.37	9.49	C18:0
8	6.696	2963078.56	VE	464672.16	18.03	C18:1
9	6.916	16832.34	EB	8291.20	0.10	
10	7.180	845066.77	BE	184205.25	5.14	C18:2
11	7.376	10590.28	EB	4412.72	0.06	
12	7.857	3679.64	BV	1101.35	0.02	C18:3
13	7.962	14193.03	VV	4458.17	0.09	
14	8.086	3070.44	VB	966.60	0.02	
15	9.027	1637.94	BV	650.93	0.01	C20:0
16	9.096	51342.93	VV	17796.50	0.31	C20:1
17	9.214	12609.65	VB	4218.35	0.08	
18	9.352	29696.58	BB	8772.53	0.18	
19	11.427	2850.77	BB	1253.85	0.02	
20	11.573	8542.61	BB	3881.82	0.05	
21	11.667	1447.88	BV	675.82	0.01	
22	11.728	1343338.06	VB	282057.67	8.17	
23	12.159	3880.56	BB	1615.95	0.02	
24	12.338	2089.19	BB	955.52	0.01	
25	12.554	1582.54	BB	802.99	0.01	
26	12.784	2672.15	BB	1094.10	0.02	
27	13.612	11033.83	BB	3775.92	0.07	
28	13.879	128187.21	BB	33821.14	0.78	
29	14.168	794617.12	BB	155295.56	4.84	
30	14.938	149128.85	BB	35024.54	0.91	
31	16.740	6486.70	BB	1600.36	0.04	

ภาคผนวก ก5 (ต่อ)

Figure-Appendix A5 (continued)

9. **การวิเคราะห์หาจุดไหลเท** (Pour Point ; ASTM-D97)

วิธีวิเคราะห์

1. เขย่าตัวอย่างและเทใส่หลอดแก้วทดสอบเท่าขีดบอกระดับ (45 มิลลิลิตร)
2. ปิดฝาด้วยจุกค็อกพร้อมกับใส่เทอร์โมมิเตอร์โดยให้ตำแหน่งช่วง capillary ของเทอร์โมมิเตอร์ต่ำกว่าผิวหน้าของตัวอย่าง 3 มิลลิเมตร
3. อุ่นตัวอย่างให้ได้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้อุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง
4. ให้ควบคุมการลดลงของอุณหภูมิตัวอย่างดังนี้

เมื่ออุณหภูมิตัวอย่างได้ (°C)	ย้ายหลอดแก้วสู่อ่างแอลกอฮอล์
27	0
9	-18
-6	-33
-24	-51
-42	-69

หมายเหตุ : การปรับอุณหภูมิอ่างแอลกอฮอล์ ใช้น้ำแข็งแห้งใส่ทางฝาเปิดอ่าง เปิดมอเตอร์ขับใบกวนให้ระดับอุณหภูมิในอ่างสม่ำเสมอกัน

5. เมื่ออุณหภูมิของตัวอย่างได้ 9 องศาเซลเซียส เหนือจุดไหลเท ให้ยกหลอดแก้วขึ้นจากอ่างเหมือนเดิม (ขั้นตอนนี้ไม่เกิน 3 วินาที)
6. กระทำซ้ำเหมือนข้อ 4 ทุกๆ อุณหภูมิ จนกระทั่งพบว่าตัวอย่างเป็นไขแข็งตัว (100%) ให้เอียงหลอดแก้วในแนวระนาบต่อเนื่อง 5 วินาที ถ้าตัวอย่างไม่มีการไหลตัวให้หยุดการทดสอบ
7. การรายงานผลให้เอาอุณหภูมิสุดท้ายที่ตัวอย่างเป็นไขแข็งตัวเป็นอุณหภูมิจุดไหลเท

10. **การทดสอบจุดเดือดสุดท้ายของการกลั่น** (Distillation characteristics; ASTM-D86)

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมตัวอย่างที่จะทดสอบ และจัดเตรียมชุดอุปกรณ์การทดสอบ
2. เติมสารทำความเย็นในอ่างทำความเย็นโดยให้ระดับของเหลวในอ่างทำความเย็นอยู่เหนือจุดสูงสุดของท่อควบแน่น บางครั้งอาจจำเป็นต้องให้มีการไหลเวียน หรือมีการกวนสารทำความเย็น เพื่อทำให้อุณหภูมิในอ่างคงตัว
3. ควบคุมให้กระบอกตวงมีอุณหภูมิคงที่ 13-18 องศาเซลเซียส โดยการจุ่มกระบอกตวงลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ และให้ระดับของเหลวในอ่างอยู่สูงกว่าหรือเท่ากับระดับปริมาตร 100 มิลลิลิตร
4. ตวงสารตัวอย่างปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทสารตัวอย่างลงในขวดกลั่น เติมเศษกระเบื้องลงในขวดกลั่นเพื่อช่วยให้มีการกระจายความร้อนที่ขวดกลั่นอย่างสม่ำเสมอและไม่ให้เกิดการเดือดอย่างรุนแรง
5. ยึดเทอร์โมมิเตอร์เข้ากับปากของขวดกลั่นด้วยจุกยางให้แน่น
6. ยึดท่อนำไอของขวดกลั่นกับท่อควบแน่นโดยใช้จุกยาง ปรับให้ขวดกลั่นอยู่ในแนวตั้งและให้ท่อนำไอยื่นเข้าไปในท่อควบแน่นเป็นระยะ 25-50 มิลลิเมตร ยกและปรับแผ่นยึดขวดกลั่นเพื่อรองรับส่วนล่างของขวดกลั่น
7. ให้ความร้อนแก่ขวดกลั่น โดยควบคุมช่วงเวลาตั้งแต่เริ่มต้นของการให้ความร้อนจนถึงจุดเริ่มต้นเป็น 5-10 นาที สังเกตและบันทึกผลอุณหภูมิเริ่มต้น (initial boiling point) เวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนจากอุณหภูมิจุดเริ่มต้น จนได้ส่วนกลั่นเป็นร้อยละ 5 เป็น 60-75 วินาที
8. ให้ความร้อนอย่างต่อเนื่อง โดยควบคุมให้อัตราการควบแน่นจากปริมาตรส่วนกลั่น 5% จนถึงปริมาตรของส่วนที่เหลือค้างอยู่ในขวดกลั่นเท่ากับ 5 มิลลิลิตร เป็น 4 ถึง 5 มิลลิลิตรต่อนาที
9. เมื่อมีของเหลวเหลือค้างอยู่ในขวดกลั่นประมาณ 5 มิลลิลิตร ปรับการให้ความร้อนจนของเหลวในขวดกลั่นหมดหรือถึงจุดเดือดสุดท้ายของการกลั่นโดยใช้เวลา 3-5 นาที
10. สังเกตและบันทึกอุณหภูมิสุดท้าย (end point) และหยุดการให้ความร้อน

11. **การทดสอบหาจุดวาบไฟ** (Flash point; ASTM-D93)

วิธีวิเคราะห์

1. เติมน้ำมันลงตัวอย่างลงในถ้วยให้ถึงขีดที่กำหนดให้ ณ อุณหภูมิที่ทำการทดลอง
2. ปิดฝาพร้อมตรวจสอบว่าอุปกรณ์อยู่ในตำแหน่งล๊อคที่ถูกต้อง
3. ใส่เทอร์โมมิเตอร์
4. จุดไฟที่ใช้ทดสอบที่หัวพ่นก๊าซและปรับให้มีขนาดเปลวไฟตามต้องการ (3.2-4.8 มิลลิเมตร)
5. ให้ความร้อนน้ำมันในถ้วยอัตรา 5-6 องศาเซลเซียสต่อนาที พร้อมกับเปิดสวิตซ์ให้ใบทวนหมุนในอัตรา 90-120 rpm
6. อ่านอุณหภูมิของน้ำมันที่จุดเริ่มต้นประมาณ 17 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าจุดค่าประมาณของจุดวาบไฟที่คาดไว้ จากนั้นได้ปิดลูกหมุนทำให้เปลวไฟจุ่มลงในถ้วยน้ำมันแช่ไว้ประมาณ 1 วินาที แล้วปล่อยให้มือบิดกลับที่ตำแหน่งเดิม ในขณะที่ทดสอบต้องหยุดการกวน
7. จากนั้นทำซ้ำทุกๆ 1 องศาเซลเซียสที่เพิ่มขึ้น
8. สังเกตุสีของเปลวไฟในถ้วยน้ำมันถ้าเห็นมีสีสว่างขึ้นมาแล้วดับไปนั้นคือจุดวาบไฟ

12. **การวิเคราะห์หาความหนืด** (Viscosity; ASTM-D445)

วิธีวิเคราะห์

1. เติมตัวอย่างน้ำมันลงไปใน viscometer
2. จับเวลาเมื่อของไหลภายใต้แรงโน้มถ่วงผ่านหลอดคาปิลลารี ในเครื่องวัดความหนืดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
3. คำนวนหาค่า Kinematic viscosity ได้จากสูตร

$$v = Ct$$

โดยที่ v = Kinematic viscosity

C = ค่าคงที่ที่ได้จากการทำมาตรฐานของเครื่งมือ (cSt/s)

t = เวลาที่ใช้ในการไหล (s)

13. **การวิเคราะห์หาความหนาแน่น** (Density; ASTM-D1298)

วิธีวิเคราะห์

1. เทน้ำมันลงไปในกระบอกตวง 250 มิลลิลิตร
2. จุ่ม ไฮโดรมิเตอร์ที่วัดความหนาแน่นในช่วง 0.8-1 กรัมต่อลูกบาศเซ็นติเมตร
3. อ่านค่าความหนาแน่นที่วัดได้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. **การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์** ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

(Perin and Dempsey, 1974)

โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอช 7.0 โดยการวัดด้วยเครื่องวัดพีเอช

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.21 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 monobasic sodium phosphate (NaH2PO4.2H2O 36.61 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

2. **การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอล ความเข้มข้น** 0.5 **นอร์มอล**

ชั่งสารโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์น้ำหนัก 28.055 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้ได้ 1 ลิตร สารละลายที่ได้ควรมีสีเหลืองฟางหรือไม่มีสี เก็บสารละลายที่ได้ในขวดแก้วสีชาที่สะอาดซึ่งฝาปิดไม่เป็นแก้ว โดยเตรียมสารละลายไว้อย่างน้อย 5 วัน ก่อนนำไปใช้

3. **การเตรียมและหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น** 0.5 **นอร์มอล**

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 45 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน (ได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่าได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล) เก็บสารละลายที่ได้ในขวดแก้วสีชาที่สะอาด

การหาความเข้มข้น

ชั่งสารโซเดียมเตตราบอเรต(Borex : $Na_2B_4O_7 10H_2O$) ให้ได้น้ำหนักแน่นอน 2.0 กรัม (สำหรับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 นอร์มอล) ใส่ลงในลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมได้ ใช้สารละลายฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูที่จุดยุติ แล้วคำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)} = \frac{\text{น้ำหนักสารโซเดียมเตตราบอเรต (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท (มล.)} \times 0.1907}$$

สมมูลของเตตราบอเรต = 190.72

4. **การเตรียมสารละลายฟีนอฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)**

ชั่งฟีนอฟทาลีนน้ำหนัก 1 กรัม ละลายในเอทธานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร