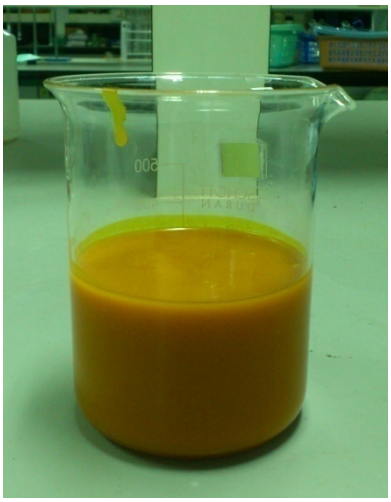
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 น้ำมันปาล์มดิบ

น้ำมันปาล์มดิบได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ชาคริต ทองอุไร จากโรงหีบน้ำมันปาล์มในภาคใต้ของประเทศไทย โดยน้ำมันปาล์มดิบจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในภาชนะที่ทึบแสงและอับอากาศรูปที่ 3.1 แสดงตัวอย่างของน้ำมันปาล์มดิบที่ใช้ทดลอง



รูปที่ 3.1 น้ำมันปาล์มดิบที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง

3.1.2 สารเคมี

1. แอลฟาโทโคฟีรอล(α-Tocopherol, HPLC Grade, Labscan)
2. เบตาแคโรทีน(β-Carotene, HPLC Grade, Labscan)
3. กรดแอสคอบิค (Ascorbic acid,AR grade, Ajax Finechem Pty)
4. เอทานอลแอบซอลูท (Ethanol Absolute, AR grade, RCI Lab scan analytical science)
5. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium Hydroxide, AR grade, MERCK)
6. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride, AR grade, MERCK)
7. เฮกเซน (Hexane,AR grade, RCI Lab scan analytical science)
8. เมธานอล (Methanol, AR grade, RCI Lab scan analytical science)
9. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol,AR grade, RCI Lab scan analytical science)

10. กรดอะซีโตน (Acetone, AR grade, RCI Lab scan analytical science)
11. ฟีนอฟทาลีน (Phenolphthalein)
12. แก๊สไนโตรเจน (Nitrogen) ความบริสุทธิ์ 99 %
13. ซิงค์ออกไซด์ (Zinc oxide, AR grade, Ajax Finechem Pty)
14. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, AR grade, MERCK)
15. โซเดียมโมลิบเดท(Sodium molydate, AR grade, Fluka)
16. ไฮดราซิลซัลเฟต(Hydrazine sulfate, AR grade, APS)
17. โพแทสเซียมดีไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate,AR grade, Ajax Finechem Pty)

3.2 อุปกรณ์การทดลอง

3.2.1 เครื่องแก้วทั่วไป ประกอบด้วย บีกเกอร์ฟลาสก์ แท่งแก้ว ฯล

3.2.2 เยื่อแผ่นชนิดไมโครฟิลเตรชั่นอัลทราฟิลเตรชั่น และ นาโนฟิลเตรชั่นโดยเยื่อแผ่นทุกชนิดที่ใช้เป็นเกรดการค้าจากประเทศเยอรมันนีโดยคุณลักษณะของเยื่อแผ่นแสดงได้ดังตารางที่ 3.1-3.2

ตารางที่ 3.1 คุณลักษณะเยื่อแผ่นระดับไมโครฟิลเตรชั่นและอัลทราฟิลเตรชันเกรดการค้าที่ใช้ในการทดลอง

เยื่อแผ่น	ไมโครฟิลเตรชัน	อัลทราฟิลเตรชัน	
	MP005P	UP005P	UP020P
membrane material	PES	PES	PES
backing material	PE/PP	PE/PP	PE/PP
water flux (l/m^2h)	>30	>30	>200
%rejection PVP K30	91-96%	91-96%	93-96%
thickness	210-250 μm.	210-250 μm.	210-250 μm.
pH range	0-14	0-14	0-14
processing temperature (^oC)	5-95°C	5-95°C	5-95°C

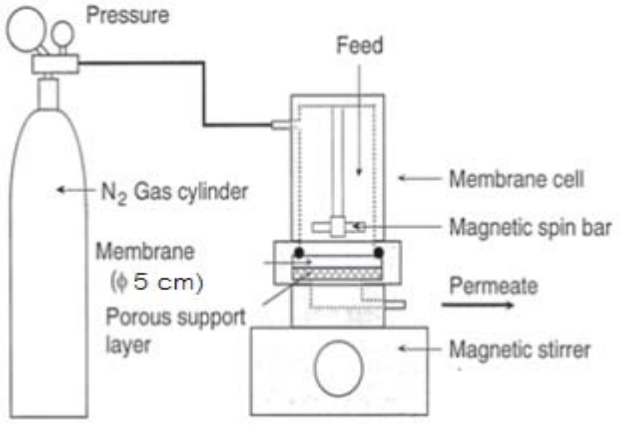
ตารางที่ 3.2คุณลักษณะเยื่อแผ่นระดับนาโนฟิลเตรชั่นที่ใช้ในการทดลอง

เยื่อแผ่นแบบนาโนฟิลเตรชั่น	NADIR®NP010P	NADIR®NP030P
วัสดุเมมเบรน	PES	PES
วัสดุรองรับ	PE/PP	PE/PP
MWCO	~200 Da	~800 Da
ช่วง pH	0-14	0-14
อุณหภูมิกระบวนการ(สูงสุด)	95°C	95°C

3.2.3 ชุดการกรอง

ระบบการกรองเป็นแบบปิดตาย (dead end filtration) โดยแผนภาพแสดงชุดเครื่องกรองดังรูปที่ 3.2 และชุดเครื่องมือที่ใช้จริงในการทดลองแสดงดังรูปที่3.3 ดังนี้ ส่วนประกอบหลักของชุดทดสอบการกรองแบบปิดตายประกอบด้วย

1. ท่อแก๊สไนโตรเจนความดันสูง บรรจุแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ 99.98% มีความดันแก๊สสูงสุด 1,500 psi หรือ 10,500 kPa
2. ถังสารละลายตั้งต้น (feed container) 2.5 ลิตร
3. ถังกรองแบบปิดตาย (dead end stirred cell) 250 ml
4. ท่อสเตนเลสเชื่อมระหว่างถังแก๊สไนโตรเจนความดันสูงกับถังสารละลายตั้งต้น และท่อสเตนเลสเชื่อมระหว่างถังสารละลายตั้งต้นกับถังกรองแบบปิดตาย



รูปที่ 3.2 แผนภาพชุดเครื่องกรองด้วยเยื่อแผ่นแบบปิดตายในการทดลอง

รูปที่ 3.3 ภาพชุดจริงของเครื่องกรองด้วยเยื่อแผ่นแบบปิดตายในการทดลอง

วิธีการใช้เครื่อง

1. ตัดแผ่นเยื่อกรองเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับชั้นรองรับ (แผ่นสเตนเลสพรุน)
2. คลายน๊อตทุกตัวของชุดทดสอบถังระบบปิดตายเพื่อถอดฝาด้านบนและฝาด้านล่างของจุดทดสอบออก ที่ฝาด้านล่างของจุดทดสอบ ให้วางแผ่นสเตนเลสพรุนลงในร่อง จากนั้นวางผ่านเยื่อกรองที่ตัดไว้ปิดทับไปบนแผ่นสเตนเลสพรุน โดยให้ขอบของแผ่นเยื่อกรองจะต้องวางอยู่บนยางโอริงของฝาด้านล่างพอดี จากนั้นให้วางท่อกลางเข้ากับฝาด้านล่าง โดยระวังไม่ให้เยื่อกรองขยับออก แล้วจึงขันน๊อตทุกตัวยึดท่อกลางกับฝาด้านล่างให้แน่น (การขันน๊อตจะต้องค่อยๆ เวียนขันน๊อตทุกตัวทีละน้อย จนแน่นเสมอกัน)
3. วางชุดกวนแม่เหล็กลงในท่อกลาง ปิดฝาด้านบน ขันน๊อตฝาด้านบนกับท่อกลางให้แน่น
4. เตรียมสารละลายตั้งต้นปริมาตร 2.5 ลิตร ในถังป้อน
5. คลายน๊อตที่ฝาด้านบนของถังบรรจุสารละลายตั้งต้นออก เติมสารละลายตั้งต้น ปิดฝาให้แน่น ขันเกลียวทุกตัว
6. ขันเกลียวข้อต่อท่อสเตนเลส¼ นิ้ว เชื่อมระหว่างฝาด้านบนของถังสารละลายตั้งต้นกับฝาด้านบนของหน่วยทดสอบให้แน่น
7. ขันเกลียวข้อต่อท่อสเตนเลส¼ นิ้ว ที่มาจากท่อแก๊สไนโตรเจนความดันสูง เข้ากับฝาด้านบนของถังสารละลายให้แน่น
8. เปิดเครื่องกวนแม่เหล็ก ตรวจสอบให้มั่นใจว่าแท่งแม่เหล็กในหน่วนทดสอบหมุนปกติดี ให้บีกเกอร์วางบนเครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ โดยจัดให้ปลายท่อออกของเพอร์มิเอทที่ฝาด้านล่างของหน่วยทดสอบให้ไหลลงในบีกเกอร์พอดี

9. คลายวาล์วปรับความดันที่หัวท่อไนโตรเจนอย่างช้าๆ สังเกตุเข็มเกจวัดความดันที่หัวท่อในโตรเจน ปรับให้เข็มชี้คงที่ที่ค่า 500 psi

10. ปรับวาล์วที่อยู่ระหว่างท่อไนโตรเจนกับถังสารละลายตั้งต้น สังเกตุเข็มของเกจวัดความดันที่ติดอยู่ที่ฝาด้านบนของถังสารละลายตั้งต้น รอจนเข็มขึ้นถึงค่าความดันที่ต้องการใช้งานแล้ว ปิดวาล์วให้แน่น กรณีมีเกจความดันที่ถังกรองระบบปิดตาย ให้ปิดความดันที่ถัง

11. ในระหว่างการทดลอง ถ้าความดันที่เกจวัดความดันบนฝาด้านบนของถังสารละลายตั้งต้นตกลงจากค่าที่ตั้งไว้ ก็สามารถปรับวาล์วที่อยู่ระหว่างท่อไนโตรเจนกับถังสาละลายตั้งต้นจนถึงค่าความดันที่ต้องการใช้งานแล้วปิดวาล์วให้แน่น

12. รอจนมีกระแสเพอร์มิเอทไหลผ่านเมมเบรนลงสู่บีกเกอร์ จนได้ปริมาตรมากพอที่จะตรวจวัดพารามิเตอร์ต่างๆ

13. สวามารถเลือกใช้ความดันในการกรองด้วยการปรับความดันในถังสารละลายตั้งต้น โดยสามารถปรับได้ตั้งแต่ 0-500 psi ขึ้นอยู่กับชนิดของแผ่นเยื่อกรองว่าเป็นเยื่อกรองชนิดไมโครฟิลเตรชัน อัลทราฟิลเตรชัน นาโนฟิลเตรชัน

14. เมื่อต้องการเลิกใช้งานเครื่อง ให้ดำเนินการดังนี้

a. ปิดวาล์วที่หัวท่อไนโตรเจน โดยการหมุนวาล์วในทิศทวนเข็มนาฬิกาจนแน่น (ข้อควรระวังคือ อย่าหมุนผิดทาง เพราะจะทำให้ความดันสูงขึ้นมากกว่า 500 psi ซึ่งจะอันตรายมาก)

b. คลายเกลียวบนฝาด้านบนของถังสารละลายตั้งต้นอันที่เชื่อมไปยังท่อไนโตรเจน ให้ทำเบาๆ จะได้ยินเสียงแก๊สรั่วออกมาในช่วงเวลาสั้นๆ ให้รอจนเสียงหยุดลง แสดงว่าแก๊สที่ค้างท่ออยู่ได้ออกไปจนหมดแล้ว (ห้ามคลายเกลียวบนฝาด้านบนของถังสารละลายตั้งต้นอันที่เชื่อมไปยังหน่วยทดสอบ เพราะจะมีสารละลายตั้งต้นรั่วออกมาด้วย)

3.2.4 อุปกรณ์เสริมต่างๆ มีดังนี้

1 เครื่องกวนแม่เหล็กยี่ห้อ HL Instrument รุ่น HS-115 ปรับความเร็วได้ 8ระดับ

รูปที่ 3.4 เครื่องกวนแม่เหล็ก

2 เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง (PIONEER)

รูปที่ 3.5 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3 ตู้อบ ยี่ห้อ WTD-Finder รุ่น FD 115 ความจุ 115 ลิตรปรับอุณหภูมิในช่วง 0-300C

รูปที่ 3.6 ตู้อบ ยี่ห้อ WTD-Finder

3.3วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองประกอบด้วย 2 ส่วนคือ การทำซาพอนนิฟิเคชันและการกรองด้วยเยื่อกรอง ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การทำซาพอนนิฟิเคชัน

ในที่นี้แสดงรายละเอียดการทำซาพอนนิฟิเคชันบนฐานเพื่อให้ได้ส่วนอันซาพอนนิฟาย์ประมาณ250 มิลลิลิตรเพื่อใช้เป็นสารป้อนในการกรองด้วยเยื่อในกรณีที่ต้องการเพิ่มหรือลดปริมาตรของอันซาพอนนิฟายนั้นสามารถใช้การเทียบปรับอัตราส่วนนี้ได้

1. เตรียมกรดแอสคอบิกน้ำหนัก 21 กรัมในเอธานอลแอบซอลูท1594มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตรทำการคนสารละลายด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) จนสารทั้งหมดได้ละลายเข้ากันจนเป็นเนื้อเดียว การเตรียมสารละลายในข้อนี้ จะต้องเป็นการเตรียมสดใหม่ทุกครั้ง

2. ชั่งน้ำมันปาล์มดิบ CPO น้ำหนัก 42.5 กรัม ผสมลงในสารละลายกรดแอสคอบิกในข้อ 1 ข้างต้น แล้วคนให้เข้ากัน ทำการผสมกรดแอสคอบิก

3. เตรียมสารละลาย KOH 10% (w/v)ในเมธานอลจากนั้นให้ใช้สารละลาย KOH 10%ที่เตรียมไว้นั้นใส่ลงในบีกเกอร์ข้อ 2 (ซึ่งเป็นของสารผสมน้ำมันปาล์มดิบและกรดแอสคอบิกในเอธานอลแอบซอลูท) จากนั้นทำการกวนให้สารทั้งหมดเข้ากันทั้งหมด

4. แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ 9 ขวดเท่าๆกันแล้วปิดฝาด้วยกระจกนาฬิกา

5. นำขวดรูปชมพู่ไปอบในตู้อบที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

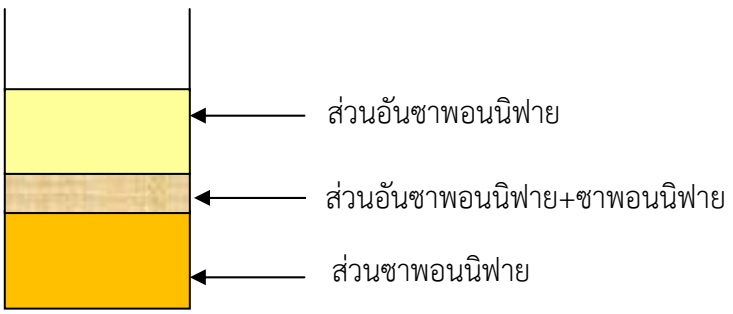
หมายเหตุ: ตู้อบจะถูกเปิดให้ร้อนจนได้อุณหภูมิคงที่ที่ 70 องศาเซลเซียส แล้ว จึงค่อยนำขวดสารรูปชมพู่ไปใส่ให้ความร้อน

6. เตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำกลั่นดังนี้ ชั่งน้ำหนักโซเดียมคลอไรด์25 กรัมแล้วละลายลงในน้ำกลั่นจำนวนหนึ่ง จนละลายเข้ากันหมด จากนั้นให้ทำการปรับปริมาตรให้ได้สารละลาย 1 ลิตร

7. จากนั้นทำการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ทั้ง 9 ขวด (ที่ผ่านการอบร้อนในข้อ 5แล้ว) โดยเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ขวดละ 59 มิลลิลิตรเมื่อเติมแล้ว ให้ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

สำหรับการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์นั้น เพื่อต้องการให้เกิดการแยกชั้นสารได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพื่อแยกระหว่างส่วนที่เรียกว่า “ซาพอนนิฟาย” (เป็นส่วนที่เกิดปฏิกิริยาซาพอนนิฟิเคชั่นกลายเป็นสบู่) และส่วน “อันซาพอนนิฟาย” ซึ่งส่วนอันซาพอนนิฟายจะเป็นส่วนที่มีวิตามินอีและเบตาแคโรทีนละลายอยู่นั่นคือส่วนอันซาพอนนิฟายจึงเป็นส่วนที่จะถูกนำไปใช้ในการกรองต่อไป

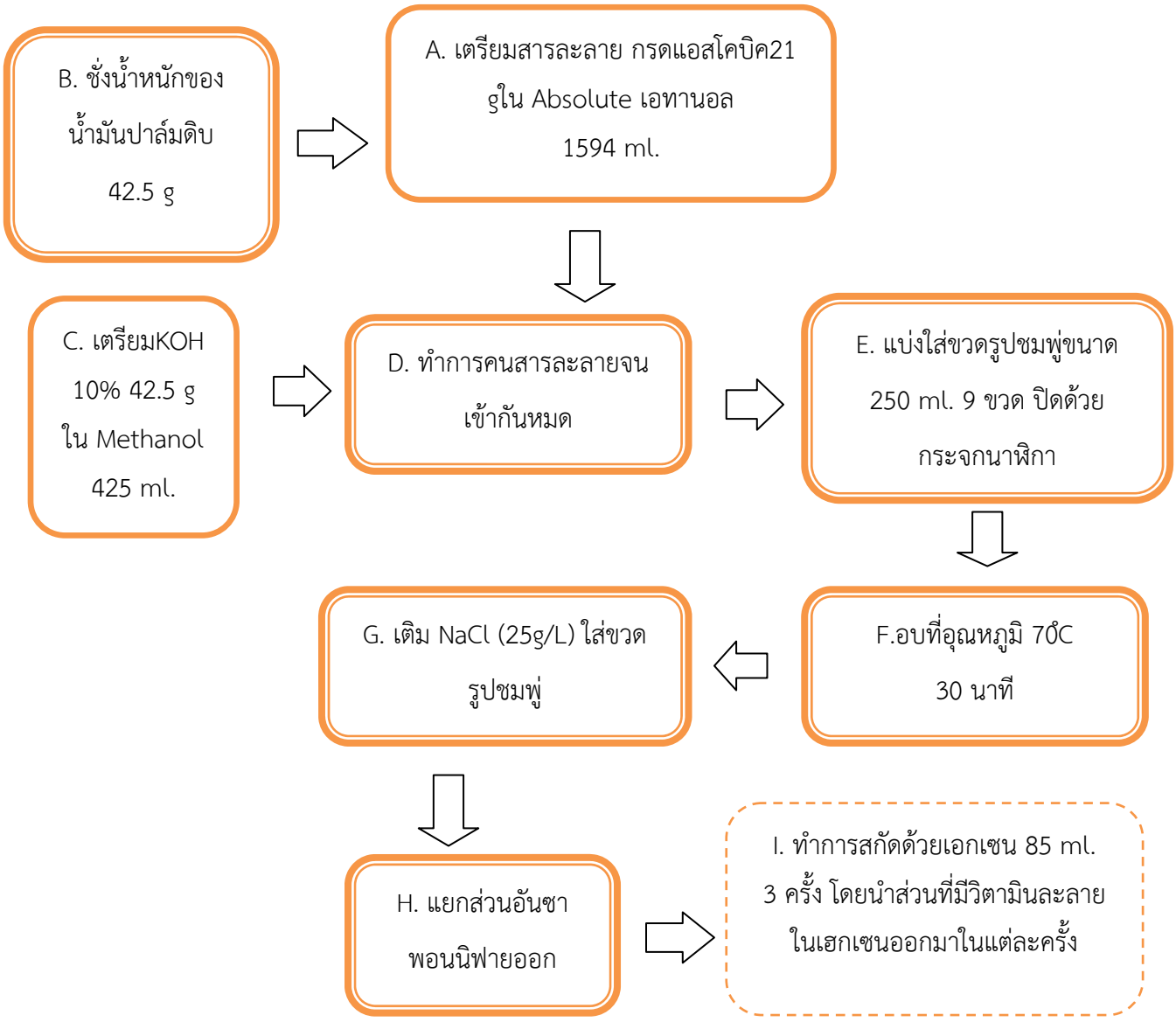
ในทางปฏิบัติ การแยกชั้นของส่วนซาพอนนิฟายและส่วนอันซาพอนนิฟาย สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3.7 ซึ่งการดึงส่วนอันซาพอนนิฟายจะเป็นการดึงไปเฉพาะชั้นด้านบนสุดเท่านั้น สำหรับชั้นตรงกลางจะเป็นส่วนผสมระหว่างซาพอนนิฟายและอันซาพอนนิฟาย ในขณะที่ชั้นล่างสุดจะเป็นส่วนซาพอนนิฟายที่เป็นไขสบู่ ดังนั้นชั้นกลางและชั้นล่างสุดจะถูกทิ้งไป เพื่อป้องกันไขสบู่เข้าสู่ระบบการกรอง



รูปที่ 3.7 ชั้นแยกที่ได้หลังจากการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์

9. ให้ดูดสารที่เป็นส่วนบนสุด (ส่วนอันซาพอนนิฟาย) จากขวดรูปชมพู่ทั้งหมดมารวมกันในบีกเกอร์รวม จากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้ปริมาตรเฮกเซนทั้งหมดเพื่อการสกัดในสัดส่วนเชิงปริมาตรระหว่างเฮกเซนต่อน้ำมันปาล์มดิบคือ 6:1 โดยการสกัดจะแบ่งออกเป็น 3 ครั้ง เพื่อช่วยให้ประสิทธิภาพการละลายดีขึ้น เมื่อทำการสกัดแต่ละครั้งจะแยกสารออกได้เป็น 2 ชั้น คือชั้นบนและชั้นล่าง โดยการทดลองนี้จะทำการแยกส่วนบนเก็บไว้ (ส่วนบนเป็นส่วนที่มีวิตามินละลายอยู่ในเฮกเซน) จากนั้นแล้วนำส่วนล่างมาสกัดต่อด้วยเฮกเซน แล้วจึงทำการเก็บแยกชั้นบนเช่นเดิม จากนั้นให้ทำการสกัดครั้งที่สามเป็นครั้งสุดท้ายและแยกเอาส่วนบนออกเหมือนเดิม

ด้วยวิธีการข้างต้น พบว่าเมื่อทำการสกัดครบสามครั้งแล้ว จะได้สารที่สามารถ นำไปทำการทดลองการกรองประมาณ 250 ml. สำหรับวิธีการทำซาพอนนิฟิเคชันแสดงได้ดังรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 แผนภาพขั้นตอนการทำซาพอนนิฟิเคชั่น

เนื่องจากปฏิกิริยาซาพอนนิฟิเคชันที่มีผลต่อเสถียรภาพของวิตามินอีอย่างสูง และจากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าปริมาณวิตามินอีในตัวอย่างที่ผ่านการซาพอนนิฟิเคชันมีค่าน้อยลง ดังนั้นเพื่อให้การทดลองสามารถควบคุมปัจจัยความเข้มข้นของวิตามินอีให้ใกล้เคียงทุกชุดการทดลอง จึงได้มีการปรับค่าวิตามินอี (บนฐานของแอลฟาโทโคฟีรอล) ในสารป้อนก่อนการกรองให้มีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยในที่นี้ได้ทำการปรับค่าเพื่อให้มีความเข้มข้นแอลฟาโทโคฟีรอลในช่วงประมาณ100 ppm. และไม่ทำการปรับค่าเบตาแคโรทีน

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์คุณสมบัติน้ำมันปาล์มดิบและสารป้อน

1. น้ำมันปาล์มดิบถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟไลปิด กรดไขมันอิสระวิตามินอี และเบตาแคโรทีน
2. สารป้อนอันซาพอนนิฟายด์ (น้ำมันที่ผ่านการซาพอนนิฟิเคชั่น) นำมาวิเคราะห์ห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ แอลฟาโทโคฟีรอลและเบตาแคโรทีน

<u>ขั้นตอนที่ 3 การทดลองการกรองด้วยเยื่อแผ่นกับน้ำมันที่ผ่านการซาพอนนิฟิเคชัน</u>

ขั้นตอนการทดลองการกรองด้วยเยื่อแผ่นกับน้ำมันที่ผ่านการซาพอนนิฟิเคชันแสดงได้ดังรูปที่ 3.9 และมีรายละเอียดการทดลองดังต่อไปนี้

1. นำน้ำมันปาล์มที่ผ่านการซาพอนนิฟิเคชั่นมาทำการกรองด้วยชุดเครื่องมือการกรองด้วยเยื่อแผ่น MP005

ช่วงการทดลอง: ความดัน 5, 6, 7 บาร์

ผลการทดลอง:

1.1ฟลักซ์ของเพอร์มิเอทที่ได้จากการกรอง ณ เวลาการกรองต่างๆ

1.2 ดึงตัวอย่างจากข้อ 1.1 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี และเบตาแคโรทีน

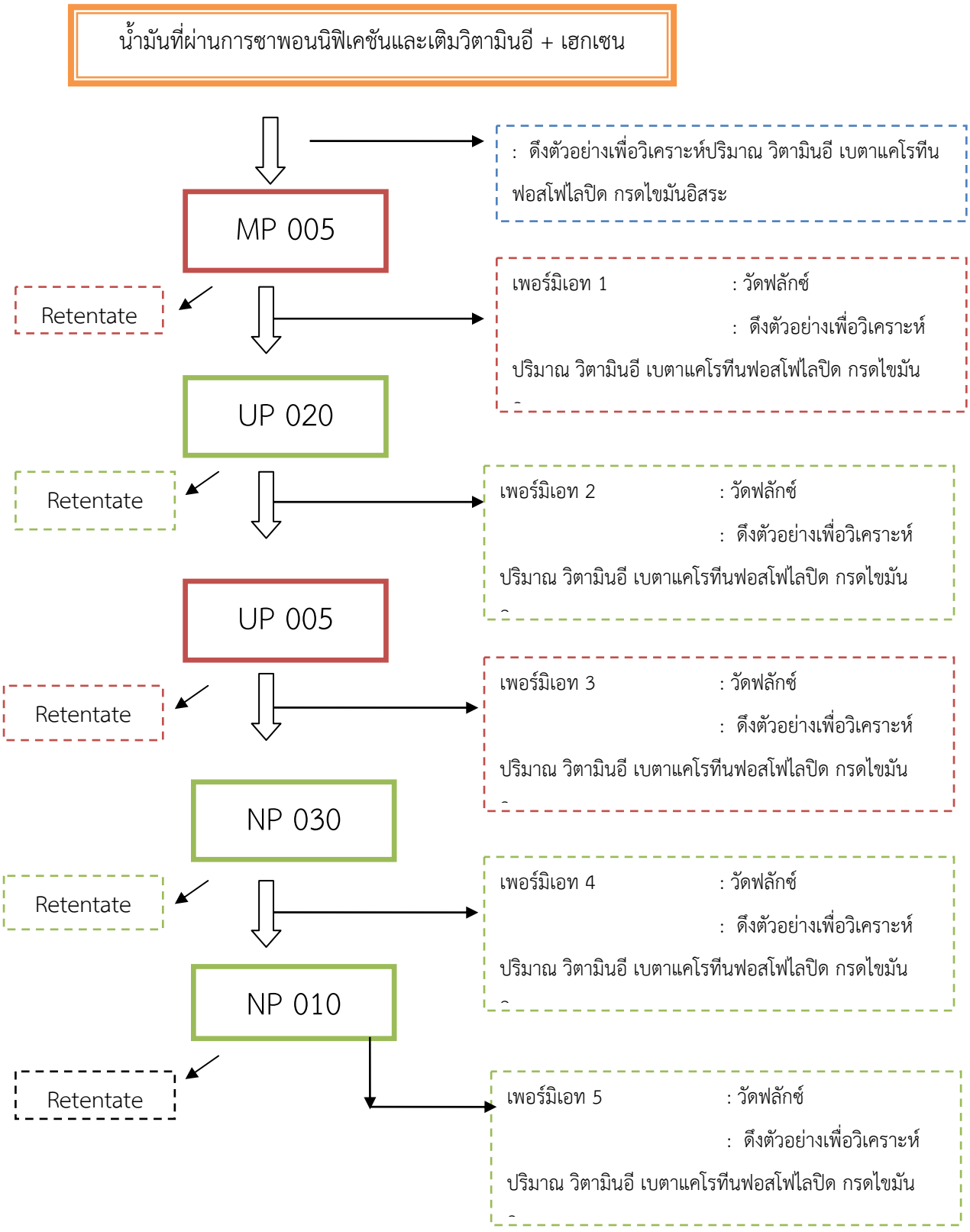
2. นำเพอร์มิเอทจากข้อ 1 เป็นสารป้อนของการกรองด้วยเยื่อแผ่น UP020

ช่วงการทดลอง: ความดัน 3และ 4 บาร์

ผลการทดลอง:

2.1 ฟลักซ์ของเพอร์มิเอทที่ได้จากการกรอง ณ เวลาการกรองต่างๆ

2.2 ดึงตัวอย่างจากข้อ 2.1 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี และเบตาแคโรทีน



รูปที่ 3.9 ขั้นตอนการแยกด้วยเยื่อแผ่นกับน้ำมันที่ผ่านการซาพอนนิฟิเคชัน

3. นำเพอร์มิเอทจากข้อ 2 เป็นสารป้อนของการกรองด้วยเยื่อแผ่น UP005

ช่วงการทดลอง: ความดัน 15และ 18 บาร์

ผลการทดลอง:

3.1 ฟลักซ์ของเพอร์มิเอทที่ได้จากการกรอง ณ เวลาการกรองต่างๆ

3.2 ดึงตัวอย่างจากข้อ 3.1 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี เบตาแคโรทีน

4. นำเพอร์มิเอทจากข้อ 3 เป็นสารป้อนของการกรองด้วยเยื่อแผ่นแบบนาโนฟิลเตรชั่นNP030

ช่วงการทดลอง: ความดัน 20 บาร์

ผลการทดลอง:

4.1 ฟลักซ์ของเพอร์มิเอทที่ได้จากการกรองนาโนฟิลเตรชั่น ณ เวลาการกรองต่างๆ

4.2 ดึงตัวอย่างจากข้อ 4.1 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี เบตาแคโรทีน

5. นำเพอร์มิเอทจากข้อ 4 เป็นสารป้อนของการกรองด้วยเยื่อแผ่นแบบนาโนฟิลเตรชั่นNP010

ช่วงการทดลอง: ความดัน 20 บาร์

ผลการทดลอง:

5.1 ฟลักซ์ของเพอร์มิเอทที่ได้จากการกรองนาโนฟิลเตรชั่น ณ เวลาการกรองต่างๆ

5.2 ดึงตัวอย่างจากข้อ 5.1 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี และเบตาแคโรทีน

หมายเหตุ: เยื่อแผ่นใหม่จะต้องถูกปรับสภาพก่อนทำการทดลอง โดยแช่ในเฮกเซน24 ชั่วโมงก่อนการกรอง เพื่อลดแรงกระทำระหว่างเมมเบรนและตัวถูกละลาย

3.4 การวิเคราะห์

3.4.1 การวิเคราะห์เชิงปริมาณของแอลฟาโทโคฟีรอลในน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการแยกด้วยเยื่อแผ่นโดยเทคนิคแก๊สโคมาโทกราฟี(Gas Chromatrography) จะใช้วิธีExternal standard โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน ของแอลฟาโทโคฟีรอล เพื่อสร้าง calibration curve มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมสารมาตรฐานแอลฟาโทโคฟีรอลที่มีความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง แอลฟาโทโคฟีรอล0.05 กรัม ละลายในเฮกเซนโดยให้สารละลายมีปริมาตร 5 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารมาตรฐานแอลฟาโทโคฟีรอลที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรจากสารละลายข้อ 1
3. เตรียมสารมาตรฐานแอลฟาโทโคฟีรอลด้วยเฮกเซนจนมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่ต้องการใช้งาน 6 ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 การเตรียมสารมาตรฐานแอลฟาโทโคฟีรอลความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นที่ต้องการ (ppm)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 500 ppm (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารที่เตรียม(มิลลิลิตร)
30	0.12	2
40	0.16	2
50	0.20	2
80	0.32	2
100	0.40	2
120	0.48	2

4. วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography ที่มีส่วนตรวจวัดชนิด เฟลมไอออนไนซ์เซชัน ยี่ห้อVarian รุ่น CP-3800 และใช้มีสภาวะในการดำเนินการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 3.4

ตารางที่ 3.4 สภาวะการวิเคราะห์แอลฟาโทโคฟีรอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ข้อมูลและสภาวะที่ทำการวิเคราะห์	
Initial Oven Temperature(^{o}C)	200
Final Oven Temperature(^{o}C)	300 at 25 ^{o}C/min
Detector Temp.(^{o}C)	350
ปริมาตรที่ฉีด(ไมโครลิตร)	1
Carrier gas flow rate (ml/min)	4
Carrier gas	Hydrogen 99.999 %
Injector Temp. (^{o}C)	255
ชนิดแคพิลลารีคอลัมน์	ZB-5(30 m, 250 µm .I.D., 0.25 µm film thickness

3.4.2 การวิเคราะห์เบต้าแคโรทีนในน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการแยกด้วยเยื่อแผ่นด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น CP-3800 สภาวะต่างๆสภาวะในการดำเนินการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 3.5

ตารางที่ 3.5 สภาวะการวิเคราะห์เบตาแคโรทีน

สภาวะที่ทำการวิเคราะห์	
ความยาวคลื่นที่ตรวจสอบ (nm)	449
ความเข้มข้นที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.78125, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 , 50
ตัวทำละลาย	Acetone (AR grade)

3.4.3 การวิเคราะห์ FFA (Free Fatty Acids; AOAC Method))ดำเนินตามวิธีมาตรฐานAOAC และการวิเคราะห์ฟอสโฟไลปิดดำเนินตามวิธีมาตรฐานAOCS official Method Ca 12-55