

วิธีที่แม่นยำในการทำนายค่าอุณหภูมิเทียบเท่า ของอุณหภูมิโปรแกรมแก๊สโครมาโตกราฟี

กรณ์กนก อายุสุข¹ ดารารัตน์ เย็นทรง¹ และ คณิต กฤษณังกูร²
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

รับเมื่อ 27 กันยายน 2545 ตอรับเมื่อ 16 กรกฎาคม 2546

บทคัดย่อ

ค่าอุณหภูมิเทียบเท่า (T_{eq}) เป็นอุณหภูมิซึ่งทำให้สารที่วิเคราะห์ในสภาวะอุณหภูมิคงที่ และสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ (TPGC) มีค่าเวลาคงค้างเท่ากัน ($t_{R(iso)} = t_{R(TPGC)}$) ค่า T_{eq} มีประโยชน์มากต่อการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิจากฐานข้อมูลในสภาวะอุณหภูมิคงที่ซึ่งมีอยู่แล้ว (เช่นค่าดัชนีคงค้างของโกแวกซ์ (I) หรือค่าความยาวคาร์บอนเทียบเท่า (ECL)) สมการทำนายเอกลักษณ์สารในแก๊สโครมาโตกราฟีซึ่งเสนอโดย Krisnangkura และคณะ ดังสมการ (1) สามารถนำมาใช้ในการคำนวณค่า T_{eq} ของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (FAMES) จากน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลี (*Brassica juncea*) ที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ BPX-70 ในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิแบบ 1 ชั้น 2 ชั้น 3 ชั้น และ 4 ชั้น ได้อย่างถูกต้อง

$$\ln \frac{t_R - t_M}{t_M} = a + bz + \frac{c}{T} + \frac{dz}{T} \quad (1)$$

เมื่อ a , b , c และ d คือค่าคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ของคอลัมน์; T คืออุณหภูมิเทียบเท่า (T_{eq}) ในหน่วยเคลวิน (K); z คือจำนวนคาร์บอนอะตอมของสารหรือค่าความยาวคาร์บอนเทียบเท่า (equivalent chain length; ECL); t_R และ t_M คือค่าเวลาคงค้างของสารตัวอย่าง และเวลาของสารไม่คงค้าง ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าค่า t_R ที่ได้จาก T_{eq} ($t_{R(Teq)}$) มีค่าใกล้เคียงกับ t_R จาก TPGC ($t_{R(TPGC)}$) โดยความแตกต่างสูงสุดของ t_R จากแต่ละโครมาโตแกรมมีค่าน้อยกว่า 0.5% ในขณะที่ค่า ECL ที่คำนวณได้จากแต่ละวิธี ได้แก่ ECL ที่ได้จากสภาวะ TPGC ($ECL_{(TPGC)}$), ECL ซึ่งคำนวณได้จากสภาวะอุณหภูมิคงที่ T_{eq} ($ECL_{(Teq)}$) และ ECL ที่สภาวะอุณหภูมิคงที่ T_{eq} ซึ่งหาจากวิธีเขียนกราฟ ($ECL_{(G)}$) มีค่าใกล้เคียงกัน จึงทำให้มั่นใจได้ว่าการคำนวณค่า T_{eq} โดยวิธีนี้มีความถูกต้องและแม่นยำพอที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของ FAMES รวมทั้งสารอินทรีย์ทั่วไปที่วิเคราะห์ด้วย TPGC จากฐานข้อมูลในสภาวะอุณหภูมิคงที่ได้

คำสำคัญ : ความยาวคาร์บอนเทียบเท่า / อุณหภูมิเทียบเท่า / กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ / ค่าดัชนีคงค้าง / แก๊สโครมาโตกราฟีในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ

¹ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

² รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

An Accurate Method for the Estimation of Equivalent Temperature in Programmed Temperature Gas Chromatography

Kornkanok Aryusuk¹, Dararat Yensruang¹, and Kanit Krisnangkura²

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangmod, Toongkru, Bangkok 10140

Received 27 September 2002 ; accepted 16 July 2003

Abstract

Equivalent temperature (T_{eq}) is the temperature at which the isothermal retention time ($t_{R(iso)}$) equal to the temperature-programmed retention time ($t_{R(TPGC)}$). The correct T_{eq} is useful for the identification of compounds analyzed with temperature-programmed gas chromatography (TPGC) by using isothermal database (e.g. Kováts retention index (I) or equivalent chain length (ECL)).

The equation (1) proposed by Krisnangkura *et al.* can be used to calculate T_{eq} of fatty acid methyl esters (FAMEs) from Chinese mustard seed oil (*Brassica juncea*) analyzed on BPX-70 in one-, two-, three- and four steps TPGC correctly.

$$\ln \frac{t_R - t_M}{t_M} = a + bz + \frac{c}{T} + \frac{dz}{T} \quad (1)$$

where a , b , c and d are thermodynamically related to column constants; T (K) is the T_{eq} ; z is the carbon number or equivalent chain length (ECL); t_R and t_M are retention time of solute and gas hold-up time, respectively.

From these experimental results, all the t_R values obtained at the T_{eq} ($t_{R(Teq)}$) are very close to the $t_{R(TPGC)}$ values. The highest difference for each chromatogram is less than 0.5 %. The ECL values calculated from different methods; including $ECL_{(TPGC)}$, $ECL_{(Teq)}$ and the ECL from the graphical method at the T_{eq} ($ECL_{(G)}$), are also in good agreement. Therefore, it can be proposed that the presented method is suitable for and can facilitate in the gas chromatographic identification of FAMEs as well as other general organic compounds in the TPGC from the database of ECL or Kováts retention index.

Keywords : Equivalent Chain Length / Equivalent Temperature / Fatty Acid Methyl Ester / Retention Index / Temperature-programmed Gas Chromatography

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

² Associated Professor, Biochemical Technology Program, School of Bioresources and Technology.

1. บทนำ

การวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร (identification) โดยแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) มีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมคือ การใช้ค่าดัชนีคงค้างของโกลเว็กซ์ (retention index; I) สำหรับสารอินทรีย์ทั่วไป [1] และค่าความยาวคาร์บอนเทียบเท่า (equivalent chain length; ECL) สำหรับวิเคราะห์กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (fatty acid methyl ester; FAMES) [2][3] ซึ่ง Kittiratanapaiboon และคณะ [4] แสดงให้เห็นว่าทั้งค่า I และ ECL มีความสัมพันธ์กันคือสามารถคำนวณค่า I ของ FAMES ได้จากค่า ECL หรือในทางกลับกันค่า ECL ก็สามารถคำนวณได้จากค่า I อย่างไรก็ตาม ทั้ง I และ ECL มีค่าเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ การใช้ค่าทั้งสองนี้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารจึงจำกัดอยู่ที่การใช้ในสภาวะอุณหภูมิคงที่ (isothermal GC; IGC) เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ปัจจุบันนี้ประมาณร้อยละ 75 ของการวิเคราะห์สารด้วย GC จะใช้สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ (temperature program GC; TPGC) เนื่องจากสามารถแยกสารที่มีองค์ประกอบซับซ้อนออกจากกันได้สมบูรณ์ มีความสะดวก รวดเร็ว รวมทั้งผลในโครมาโตแกรมแสดงว่าสารต่างๆ แยกจากกันได้ดีและมีความบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงมีความพยายามจะหาค่า I ของสารที่วิเคราะห์ในสภาวะ TPGC (I_{TP}) กันมากมาย [5]-[8] แต่สมการที่ถูกนำมาใช้มากได้แก่ สมการของ Van den Dool และ Kratz [5] และสมการของ Halang และคณะ [7]

สมการ (2) เป็นสมการของ Van den Dool และ Kratz [5] หาค่า I ในสภาวะ TPGC แต่ใช้ได้เฉพาะใน TPGC แบบขั้นเดียวที่ไม่มีช่วงอุณหภูมิคงที่ (linear TPGC; LTPGC) เท่านั้น

$$I_{TP} = 100z + 100 \frac{T_{R,x} - T_{R,z}}{T_{R,z+1} - T_{R,z}} \quad (2)$$

เมื่อ T_R (retention temperature) คืออุณหภูมิที่สารถูกชะออกจากคอลัมน์ สัญลักษณ์ x, z และ z+1 หมายถึง สารตัวอย่าง และสารอ้างอิงนอร์มัลอัลเคนที่มีจำนวนคาร์บอนจำนวน z และ z+1 ตามลำดับ

สำหรับสมการที่เสนอโดย Halang และคณะ [7] สามารถทำนายค่า I_{TP} ได้ทั้งในสภาวะ LTPGC และ TPGC ที่มีช่วงอุณหภูมิคงที่ (non-linear TPGC) แต่เนื่องจากค่า I_{TP} ของสารไม่ได้ขึ้นอยู่กับสมบัติของวัฏภาคนิ่งเพียงอย่างเดียวเหมือนการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิคงที่ (IGC) แต่ยังเกี่ยวข้องกับสภาวะของ TPGC เช่น อุณหภูมิเริ่มต้น โปรแกรมอุณหภูมิที่ใช้งาน รูปแบบของคอลัมน์ (column geometry) อัตราการไหลของแก๊สตัวพา หรือการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำ TPGC ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งอัตราการโปรแกรมอุณหภูมิ เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความคลาดเคลื่อนของค่า I [9] ดังนั้นการทำซ้ำของข้อมูล (reproducibility) โดยควบคุมตัวแปรต่างๆ เหล่านี้ให้คงที่จึงทำได้ยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่า I_{TP} ที่วิเคราะห์ต่างหน่วยปฏิบัติการกันไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ จึงไม่สะดวกที่จะวิเคราะห์เอกลักษณ์สารด้วยวิธีนี้เนื่องจากไม่มีข้อมูลมาตรฐานของ I_{TP}

ดังนั้นจึงมีความพยายามจะหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_{TP} กับค่า I ที่วิเคราะห์ภายใต้ IGC (I_{iso}) เพื่อนำข้อมูล I_{iso} ซึ่งเป็นค่าที่ได้รับการยอมรับและมีรวบรวมเป็นฐานข้อมูลไว้แล้วมาใช้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารใน TPGC โดยมีงานวิจัยมากมาย [10]-[13] ที่พยายามหาค่าอุณหภูมิเทียบเท่า (equivalent temperature; T_{eq}) ซึ่ง

เป็นอุณหภูมิคงค้าง (T_R) ที่ได้จากการคำนวณที่ทำให้สารที่วิเคราะห์จากทั้งสองสภาวะถูกชะออกจากคอลัมน์พร้อมกัน นั่นคือ $I_{TP} = I_{iso}(T_{eq})$ หรือ $t_{R,TP} = t_{R,iso}(T_{eq})$ เช่น Guiochon [10] เสนอว่าค่า $T_{eq} = T_R - 20$ °ซ Gidding [11] เสนอค่า $T_{eq} = 0.92T_R$ เป็นต้น อย่างไรก็ตามค่า T_{eq} ที่ได้จากแต่ละวิธีไม่มีความแม่นยำพอที่จะนำมาใช้ในการเทียบค่า I_{TP} จาก I_{iso} ได้ โดย Sun และคณะ [14] ได้สรุปไว้ว่าการนำค่า T_{eq} มาใช้ในการหาค่า I_{TP} จะให้ความถูกต้องน้อยกว่าวิธีของ Curvers และคณะ [15] และ Guan และคณะ [16] เช่นเดียวกับ Garcia Domínguez และ Santiuste [17] ที่เปรียบเทียบวิธีคำนวณค่า I_{TP} ด้วยวิธีการต่างๆ และสรุปว่าการหาค่าอุณหภูมิคงค้างตามสมการของ Curvers และคณะ [15] ดังแสดงในสมการที่ (3) ให้ความแม่นยำในการทำนายค่า I_{TP} มากที่สุด

$$r = \frac{\int_{T_i}^{T_R} dT}{t_M \left[1 + \left(\frac{\alpha}{\beta} \right) \exp\left(\frac{\Delta H}{RT} \right) \right]} \quad (3)$$

เมื่อ r คืออัตราการโปรแกรมอุณหภูมิ; T_i และ T_R คืออุณหภูมิเริ่มต้น และอุณหภูมิคงค้างตามลำดับ; T คือค่าอุณหภูมิสัมบูรณ์; t_M คือค่าเวลาของสารไม่คงค้าง; $\alpha = \exp(\Delta S/R)$; β คือ อัตราส่วนระหว่างปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อปริมาตรของวัฏภาคนิ่ง (phase ratio) ของคอลัมน์; ΔS และ ΔH คือค่าเอนโทรปี และเอนทัลปีของการละลาย ตามลำดับ

Gonzalez และ Nardillo [18] สรุปไว้ว่าค่า I_{TP} ไม่ได้ขึ้นอยู่กับตัวแปรทางเทอร์โมไดนามิกส์เพียงอย่างเดียวเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับกลศาสตร์ของของเหลว (fluid dynamic) รวมทั้งกระบวนการชะ (elution process) ด้วย ดังนั้นจึงไม่สามารถนิยามความหมายของ I_{TP} ได้โดยอาศัยคุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์เพียงอย่างเดียวเหมือนในสภาวะ IGC ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ว่าทำไมจึงไม่สามารถเปรียบเทียบค่า I_{TP} กับ I_{iso} ได้

อย่างไรก็ตาม หากมีวิธีในการหาค่า T_{eq} ได้ถูกต้องแม่นยำแล้วการนำข้อมูลของ I_{iso} รวมถึงค่า $ECL_{(iso)}$ มาใช้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารอินทรีย์ และ FAMES ในสภาวะ TPGC ก็มีความเป็นไปได้

ในงานวิจัยนี้จึงนำเสนอวิธีการที่แม่นยำ โดยอาศัยสมการที่ใช้ในการทำนายการเคลื่อนที่ของสารใน GC ซึ่งเสนอโดย Krisnangkura และคณะ [19] มาใช้ในการคำนวณค่า T_{eq} ของ FAMES จากน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลี ที่วิเคราะห์ในสภาวะ TPGC

2. ทฤษฎี

Krisnangkura และคณะ [19] ได้เสนอสมการซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเวลาคงค้าง จำนวนคาร์บอน อุณหภูมิ และคุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ของสารใน GC มาใช้ในการทำนายเอกลักษณ์สารในสภาวะอุณหภูมิคงที่ดังสมการ (1)

$$\ln \frac{t_R - t_M}{t_M} = a + bz + \frac{c}{T} + \frac{dz}{T} \quad (1)$$

เมื่อ T คืออุณหภูมิ (K) t_R คือค่าเวลาคงค้างของสารตัวอย่าง t_M คือค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้าง z คือจำนวนคาร์บอนอะตอมของสาร a, b, c และ d คือค่าคงที่ทางเทอร์โมไดนามิกส์ของสมการ

$$\text{โดย } a = \frac{\Delta S^0}{R} \quad b = \frac{\delta S}{R} \quad c = \frac{\Delta H^0}{R} \quad d = \frac{-\delta H^0}{R}$$

β คือ phase ratio ของคอลัมน์; ΔS^0 และ ΔH^0 คือเอนโทรปี และเอนทัลปีมาตรฐานของการละลาย; δS และ δH คือค่าเอนโทรปี และเอนทัลปีที่เปลี่ยนแปลงไปต่อหนึ่งหน่วยเมทิลีน ตามลำดับ; R คือค่าคงที่ของแก๊ส

ต่อมา Kittiratanapiboon และคณะ [20] นำสมการ (1) มาใช้ร่วมกับวิธีการแบ่งคอลัมน์เป็นส่วนๆ เพื่อใช้ในการทำนายค่าเวลาคงค้างของสารในสภาวะ TPGC ของ Cavalli และ Guinchard [21] ได้สมการซึ่งใช้ในการทำนายการเคลื่อนที่ของสารในสภาวะ TPGC ดังสมการที่ (4)

$$t_R = \frac{\sum_{i=1}^m t_M [1+g(\theta_i-T_i)]}{m} \left(1+e^{(a+bz+\frac{c}{\theta_i}+\frac{dz}{\theta_i})} \right) \quad (4)$$

เมื่อ g คือค่า t_M ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อหน่วยอุณหภูมิ; m คือจำนวนการแบ่งคอลัมน์ออกเป็น ส่วน ๆ; θ_i คืออุณหภูมิที่ส่วน i ของคอลัมน์; T_i คืออุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์

ซึ่งสมการ (4) สามารถคำนวณด้วยโปรแกรม Qbasic ดังอธิบายไว้โดย Lomsugarit และคณะ [22]

3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 สารตัวอย่าง

สารตัวอย่างได้แก่กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์มาตรฐาน (C16:0 ถึง C22:0) จากบริษัทซิกมาเคมีคอล (เซนทลูส์ สหรัฐอเมริกา) เมล็ดผักกาดเขียวปลีซื้อจากร้านขายเมล็ดพันธุ์ คอลัมน์ BPX-70 (ขนาด 30 เมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม.) เคลือบด้วย 70% cyanopropyl polysiloxane หนา 0.25 ไมโครเมตร จากบริษัทเอสจีอี (ออสเตรเลีย)

3.2 แก๊สโครมาโตกราฟี

ใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีรุ่น Shimadzu 14A มีตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออนเซชันต่อพ่วงกับเครื่องประมวลผล C-R-4A (ทั้งหมดของบริษัทซีมัตซี ประเทศญี่ปุ่น) การแยกวิเคราะห์สารทำโดยคอลัมน์แบบแคปิลลารี และส่วนฉีดสาร (injector) แบบ split-splitless อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน (แก๊สตัวพา) 0.7-1.5 มิลลิลิตร/นาที่ อุณหภูมิของส่วนฉีด และ ตัวตรวจวัด (detector) 230 °ซ สภาวะที่ใช้ใน TPGC แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ (TPGC) ของ FAMES จากน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลีที่ใช้ในการทดลองบนคอลัมน์ BPX-70 (30 ม. x 0.25 มม.) อุณหภูมิของส่วนฉีด และส่วนตรวจวัด 230 °ซ

รูปแบบ	ชั้น	Initial hold Time (นาที)	อุณหภูมิเริ่มต้น (°ซ)	อุณหภูมิสุดท้าย (°ซ)	โปรแกรม (°ซ/นาที)
A (1 ชั้น)	1	2	160	220	2
B (2 ชั้น)	1	2	160	190	2
	2	1	190	220	4
C (3 ชั้น)	1	2	160	180	2
	2	1	180	200	4
	3	1	200	220	6
D (4 ชั้น)	1	2	160	170	2
	2	1	170	180	3
	3	1	180	190	4
	4	1	190	220	5

3.3 การเตรียมกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลี

นำตัวอย่างมาแยกเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก บดให้ละเอียด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °ซ ค้างคืน (18-24 ชั่วโมง) และทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) ซึ่งตัวอย่างที่อบแห้งแล้วประมาณ 10-20 มิลลิกรัม จากนั้นทำให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ตามวิธีของ Harrington และ Evans [23]

3.4 การหาค่าคงตัว a , b , c และ d

ค่าคงตัวทั้ง 4 (a , b , c และ d) หาดตามวิธีของ Krisnangkura และคณะ [19] โดยการฉีดสารมาตรฐาน FAMES ที่อุณหภูมิคงที่ 160-200 °ซ ห่างกันช่วงละ 5 °ซ ได้สมการสำหรับทำนายเอกลักษณ์สาร FAMES บนคอลัมน์ BPX-70 คือ

$$\ln \frac{t_R - t_M(T_{eq})}{t_M(T_{eq})} = -9.839 - 0.487z_{(T_{eq})} + \frac{2272.36}{T_{eq}} + \frac{356.09z_{(T_{eq})}}{T_{eq}} \quad (5)$$

3.5 การคำนวณค่าความยาวคาร์บอนเทียบเท่า (ECL) ในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ

ฉีดสารตัวอย่าง FAMES จากน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลี ในสภาวะ TPGC ที่อุณหภูมิ 160 °ซ ถึง 220 °ซ ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 แล้วคำนวณค่า z หรือ ECL ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ โดยใช้สมการ (6)

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_M [1+g(\theta_i-T_i)]}{m} \left(1+e^{(-9.839-0.487z + \frac{2272.36}{\theta_i} + \frac{356.09z}{\theta_i})} \right) \quad (6)$$

3.6 การคำนวณค่าอุณหภูมิเทียบเท่า (T_{eq})

นำข้อมูลค่า t_R , t_M และค่า ECL ที่คำนวณได้จากสมการ (6) ของ FAMES จากน้ำมันเมล็ดฝักกาดเขียวปลี ในสภาวะ TPGC มาแทนค่ากลับไปในสมการ (5)

3.7 การพิสูจน์ความถูกต้องของค่า T_{eq} ที่คำนวณได้

ตรวจสอบความถูกต้องของค่า T_{eq} ที่คำนวณได้จากสมการ (5) โดยการฉีดสารตัวอย่าง FAMES จากน้ำมันเมล็ดฝักกาดเขียวปลีในสภาวะ IGC ที่อุณหภูมิ T_{eq} โดยการปรับค่า t_M ตามสมการ (7)

$$t_{M(T_{eq})} = t_{M(T_i)} + g \times (T_{eq}-T_i) \quad (7)$$

เมื่อ T_i คืออุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ (160°C); g คือค่า t_M ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อหน่วยอุณหภูมิ (0.0015 นาที/ $^{\circ}\text{C}$)

คำนวณค่า ECL ของ FAMES ที่ได้จากสภาวะ IGC ที่อุณหภูมิ T_{eq} โดยวิธีเขียนกราฟ (graphical method) ตามวิธีของ Woodford และ van Gent [2] หรือ Miva และคณะ [3] เปรียบเทียบกับวิธีการคำนวณตามสมการ (8)

$$ECL_{(T_{eq})} = ECL_{(T_i)} + (T_{eq}-T_i) \times \frac{\Delta ECL}{\Delta T} \quad (8)$$

เมื่อ $ECL_{(T_i)}$ คือค่า ECL เริ่มต้นของการทำโปรแกรมอุณหภูมิ (160°C) $\frac{\Delta ECL}{\Delta T}$ คือค่า ECL ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อหน่วยอุณหภูมิ ซึ่งค่าทั้งสองนี้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่า ECL ของ FAMES ไม่อิมตัวจากน้ำมันเมล็ดฝักกาดเขียวปลีที่อุณหภูมิ 160°C และ 180°C

รวมทั้งค่า ECL ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อหน่วยอุณหภูมิ ($\frac{\Delta ECL}{\Delta T}$)

FAMES	$ECL_{(160)}$	$ECL_{(180)}$	$\frac{\Delta ECL}{\Delta T}$
C18:1	18.33	18.40	0.0036
C18:2	18.92	19.04	0.0060
C18:3	19.64	19.80	0.0081
C20:1	20.30	20.38	0.0039
C20:2	20.89	21.01	0.0056
C22:1	22.27	22.35	0.0041
C24:1	24.21	24.29	0.0040

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การทำนายค่า ECL ของ FAMES จากน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลี ในสภาวะ TPGC

รูปที่ 1 แสดงโครมาโตแกรมของ FAMES จากน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลี ที่โปรแกรมอุณหภูมิ แบบ A, B, C และ D ตามสภาวะที่กำหนดไว้ในตารางที่ 1 พีคแรกคือพีคของเฮกเซนซึ่งในคอลัมน์ที่โพลาร์มาก และอุณหภูมิสูงเฮกเซนเกือบจะไม่คงค้าง ดังนั้นเวลาคงค้างของเฮกเซน จึงใช้เป็นค่า t_M ได้ ตัวเลขเหนือพีคต่างๆ คือค่า t_R ของกรดไขมันแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบ

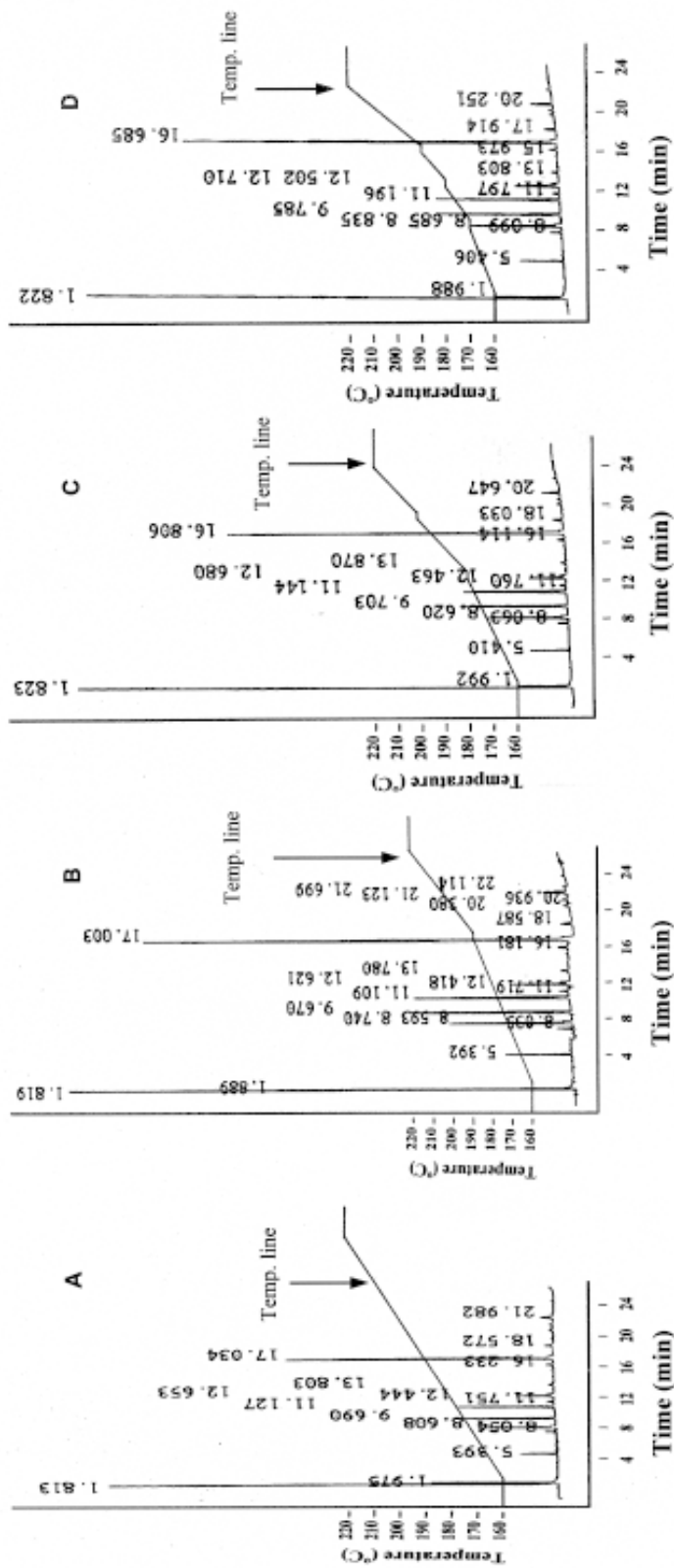
นำค่า t_M และ t_R จากแต่ละโครมาโตแกรมแทนค่าลงในสมการที่ (6) ทำให้คำนวณค่า ECL ของ FAMES ที่สภาวะ TPGC ($ECL_{(TPGC)}$) ได้ ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 3 ซึ่งในที่นี้จะแสดงผลเฉพาะค่า ECL ของ FAMES ชนิดไม่อิ่มตัวเท่านั้น เนื่องจากค่า ECL ของ FAMES ชนิดอิ่มตัวเป็นตัวเลขจำนวนเต็ม และไม่เปลี่ยนค่าตามอุณหภูมิจึงไม่จำเป็นต้องแสดงข้อมูลไว้ โดยจากการคำนวณค่า ECL ทำให้ทราบว่าน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลี มีกรดไขมัน C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:1, C20:2, C22:1 และ C24:1 เป็นองค์ประกอบ

4.2 การคำนวณค่า T_{eq} ของ FAMES จากน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลี

นำค่า ECL ที่คำนวณได้จากข้อ 1 พร้อมกับค่า t_R และ t_M แทนค่าลงในสมการที่ (5) เพื่อคำนวณค่า T_{eq} ของ FAMES แต่ละชนิด ตัวอย่างเช่นที่โปรแกรมอุณหภูมิ A FAME 18:1 ($n-9$) ค่าคำนวณค่า ECL ได้เท่ากับ 18.36 แทนค่าลงในสมการ (5) ได้ดังแสดงในสมการที่ (9)

$$\ln \frac{8.608 - 1.813}{1.813} = -9.839 - 0.487 \times 18.36 + \frac{2272.36}{T_{eq}} + \frac{356.09 \times 18.36}{T_{eq}} \quad (9)$$

ซึ่งคำนวณค่า T_{eq} ได้เท่ากับ 165.13 °C สำหรับค่า T_{eq} ของ FAMES ชนิดอื่น และที่โปรแกรมอื่นๆ แสดงผลไว้ดังตารางที่ 3 เช่นเดียวกัน



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของ FAMES จากน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวสามสีที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ BPX-70 ที่สภาวะ TPGC แบบ 1 ชั้น (A) 2 ชั้น (B) 3 ชั้น (C) และ 4 ชั้น (D) (รายละเอียดของสภาวะโปรแกรมที่ใช้ในการทดลองดูจากตารางที่ 1)

ตารางที่ 3 แสดงค่า T_{eq} และ $Z_{(TPGC)}$ ของ FAMES ไม่อิ่มตัวจากน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลีที่วิเคราะห์โดยโปรแกรมอุณหภูมิแบบต่างๆ โดยค่า T_{eq} และ $Z_{(TPGC)}$ คำนวณด้วยสมการ (5) และ (6) ตามลำดับ (สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิแบบ A, B, C และ D แสดงไว้ในตารางที่ 1)

A			B			C			D			Tentative identification
$t_M = 1.813$ min			$t_M = 1.819$ min			$t_M = 1.823$ min			$t_M = 1.822$ min			
$t_{R(TPGC)}$	$Z_{(TPGC)}$	$T_{eq}(^{\circ}C)$	$t_{R(TPGC)}$	$Z_{(TPGC)}$	$T_{eq}(^{\circ}C)$	$t_{R(TPGC)}$	$Z_{(TPGC)}$	$T_{eq}(^{\circ}C)$	$t_{R(TPGC)}$	$Z_{(TPGC)}$	$T_{eq}(^{\circ}C)$	
8.608	18.36	165.13	8.593	18.34	165.13	8.620	18.34	165.11	8.685	18.35	164.95	18:1(n-9)
9.690	18.97	166.22	9.670	18.95	166.22	9.703	18.96	166.26	9.785	18.95	165.95	18:2(n-6)
11.127	19.72	167.78	11.109	19.69	167.70	11.114	19.70	167.75	11.196	19.70	167.62	18:3(n-3)
12.444	20.35	169.21	12.418	20.32	169.14	12.463	20.33	169.18	12.502	20.33	169.09	20:1(n-9)
13.803	20.96	170.70	13.780	20.94	170.68	13.870	20.94	170.58	13.803	20.95	170.75	20:2(n-6)
17.034	22.34	174.51	17.003	22.31	174.44	16.806	22.32	174.81	16.685	22.32	174.96	22:1(n-9)
21.982	24.33	180.69	21.699	24.29	180.80	20.647	24.32	182.04	20.251	24.33	182.49	24:1(n-9)

4.3 การทดสอบความถูกต้องของค่า T_{eq} ที่คำนวณได้

4.3.1 เปรียบเทียบจากค่าเวลาคงค้าง (t_R) ของสาร

จากค่า T_{eq} ที่คำนวณได้นำมาตั้งเป็นอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ใช้ในการฉีดตัวอย่าง FAMES จากน้ำมันเมล็ด ผักกาดเขียวปลีที่สภาวะ IGC โดยปรับอัตราการไหลของแก๊สตัวพาให้ได้ค่า t_M ตามที่คำนวณได้จากสมการที่ (7) ($t_{M(cal)}$) แล้วนำผลค่า t_R ที่ได้ ($t_{R(Teq)}$) มาเปรียบเทียบกับค่า t_R ที่ได้จากสภาวะ TPGC ($t_{R(TPGC)}$) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 โดยในตารางนี้ได้แสดงค่า $t_{M(exp)}$ ซึ่งได้จากการทดลองจริง และค่า $t_{M(cal)}$ ไว้ด้วย

จากตารางพบว่า FAMES C 24:1 ที่โปรแกรมอุณหภูมิแบบ A มีค่า t_R ต่างกันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.49 อย่างไรก็ตามมีข้อมูลประมาณร้อยละ 10 เท่านั้นที่ให้ความแตกต่างของ t_R เกินร้อยละ 0.40 ซึ่งค่าความแปรปรวนที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากความไม่แม่นยำของการตั้งค่า $t_{M(exp)}$ ซึ่งตั้งค่าให้ตรงกับ $t_{M(cal)}$ ได้ค่อนข้างยาก

4.3.2 เปรียบเทียบจากค่าความยาวคาร์บอนเทียบเท่า (ECL)

จากข้อมูลค่า t_M และ t_R ของ FAMES จากน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลีที่สภาวะ IGC ที่อุณหภูมิ T_{eq} $t_{M(exp)}$ และ $t_{R(Teq)}$ ในตารางที่ 4 ตามลำดับ สามารถนำมาใช้ในการหาค่า ECL ของ FAMES ได้ 2 วิธี เปรียบเทียบกันดังนี้คือ

4.3.2.1 การเขียนกราฟตามวิธีของ Woodford และ van Gent [2] หรือ Miva และคณะ [3] ซึ่งเป็นการเขียนกราฟระหว่าง $\ln \frac{t_R - t_M}{t_M}$ กับค่า ECL ของ FAMES ชนิดอิมิตัวที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดผักกาดเขียว ปลี จากกราฟเส้นตรงที่ได้ทำให้หาค่า ECL ของ FAMES ชนิดไม่อิมิตัวที่เป็นองค์ประกอบจากค่า $\ln \frac{t_R - t_M}{t_M}$ ของ FAMES ชนิดนั้นๆ ที่แต่ละอุณหภูมิได้

4.3.2.2 คำนวณค่า ECL ที่อุณหภูมิ T_{eq} ได้จาก $\frac{\Delta ECL}{\Delta T}$ โดยอาศัยข้อมูลจากตารางที่ 2 นำมาใช้ในการคำนวณค่า ECL ที่อุณหภูมิ T_{eq} ได้โดยใช้สมการ (8)

ผลการคำนวณค่า ECL โดยวิธีต่างๆ คือ ECL จากโครมาโตแกรมในสภาวะ TPGC ($ECL_{(TPGC)}$) โดยใช้สมการ (4) ECL จากโครมาโตแกรมในสภาวะ IGC ที่อุณหภูมิ T_{eq} ($ECL_{(Teq)}$) ซึ่งคำนวณตามสมการ (8) และจากการเขียนกราฟ ($ECL_{(G)}$) ที่โปรแกรมอุณหภูมิ แบบ A, B, C และ D เปรียบเทียบให้เห็นดังตารางที่ 5 ซึ่งพบว่า ECL ที่ได้จากแต่ละวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน โดยความแตกต่างสูงสุด เท่ากับ 0.04 หน่วย ที่ C24:1 ที่โปรแกรมอุณหภูมิแบบ A โดยประมาณร้อยละ 75 ของข้อมูลมีค่า ECL ต่างกันไม่เกิน 0.01 หน่วย

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าค่า T_{eq} ที่คำนวณจากสมการที่ (5) มีความแม่นยำสูง ทำให้สามารถคำนวณค่า $ECL_{(Teq)}$ ของ FAMES จากค่า T_{eq} และค่า ECL ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลได้โดยสมการ (8)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่า $t_{R(\text{Teq})}$ และ $t_{R(\text{TPGC})}$ ของ FAMES ไม่อิ่มตัวจากน้ำมันเมล็ดฝักภาคเขียวปรี

1 ชั้น (A)						
FAMES	T_{eq}	$t_{M(\text{cal})}$	$t_{M(\text{exp})}$	$t_{R(\text{TPGC})}$	$t_{R(\text{Teq})}$	%error
18:1(<i>n</i> -9)	165.13	1.821	1.828	8.608	8.607	0.01
18:2(<i>n</i> -6)	166.22	1.822	1.836	9.690	9.688	0.02
18:3(<i>n</i> -3)	167.78	1.825	1.847	11.127	11.145	-0.16
20:1(<i>n</i> -9)	169.21	1.827	1.850	12.444	12.467	-0.18
20:2(<i>n</i> -6)	170.70	1.829	1.859	13.803	13.789	0.10
22:1(<i>n</i> -9)	174.51	1.835	1.862	17.034	17.099	-0.38
24:1(<i>n</i> -9)	180.69	1.844	1.879	21.982	21.874	0.49

2 ชั้น (B)						
FAMES	T_{eq}	$t_{M(\text{cal})}$	$t_{M(\text{exp})}$	$t_{R(\text{TPGC})}$	$t_{R(\text{Teq})}$	%error
18:1(<i>n</i> -9)	165.13	1.827	1.828	8.593	8.611	-0.21
18:2(<i>n</i> -6)	166.22	1.828	1.833	9.670	9.652	0.19
18:3(<i>n</i> -3)	167.70	1.831	1.847	11.109	11.145	-0.32
20:1(<i>n</i> -9)	169.14	1.833	1.842	12.418	12.454	-0.29
20:2(<i>n</i> -6)	170.68	1.835	1.857	13.780	13.807	-0.20
22:1(<i>n</i> -9)	174.44	1.841	1.862	17.003	17.051	-0.28
24:1(<i>n</i> -9)	180.80	1.850	1.879	21.699	21.772	-0.34

3 ชั้น (C)						
FAMES	T_{eq}	$t_{M(\text{cal})}$	$t_{M(\text{exp})}$	$t_{R(\text{TPGC})}$	$t_{R(\text{Teq})}$	%error
18:1(<i>n</i> -9)	165.11	1.831	1.828	8.620	8.611	0.01
18:2(<i>n</i> -6)	166.26	1.832	1.853	9.703	9.715	-0.12
18:3(<i>n</i> -3)	167.75	1.835	1.847	11.144	11.145	-0.01
20:1(<i>n</i> -9)	169.18	1.837	1.841	12.463	12.494	-0.25
20:2(<i>n</i> -6)	170.58	1.839	1.850	13.870	13.897	-0.19
22:1(<i>n</i> -9)	174.81	1.845	1.863	6.806	16.869	-0.37
24:1(<i>n</i> -9)	182.04	1.856	1.876	20.647	20.607	0.19

4 ชั้น (D)						
FAMES	T_{eq}	$t_{M(\text{cal})}$	$t_{M(\text{exp})}$	$t_{R(\text{TPGC})}$	$t_{R(\text{Teq})}$	%error
18:1(<i>n</i> -9)	164.95	1.829	1.837	8.685	8.689	-0.05
18:2(<i>n</i> -6)	165.95	1.831	1.838	9.785	9.739	0.47
18:3(<i>n</i> -3)	167.62	1.833	1.847	11.196	11.145	0.46
20:1(<i>n</i> -9)	169.09	1.836	1.841	12.502	12.494	0.06
20:2(<i>n</i> -6)	170.75	1.838	1.849	13.803	13.788	0.11
22:1(<i>n</i> -9)	174.96	1.844	1.870	16.685	16.623	0.37
24:1(<i>n</i> -9)	182.49	1.856	1.886	20.251	20.242	0.04

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่า $ECL_{(TPGC)}$, $ECL_{(G)}$ และ $ECL_{(Req)}$ ซึ่งคำนวณโดยสมการ (4), (8) และจากการเขียนกราฟโดยวิธีของ Woodford และ van Gent [2] หรือ Miva และคณะ [3] ของ FAMES ไม่อิมิตจากน้ำมันเมล็ดพื้กาตเขียวปดี

FAMES	1 ชั้น (A)		2 ชั้น (B)		3 ชั้น (C)		4 ชั้น (D)	
	$ECL_{(TPGC)}$	$ECL_{(Req)}$	$ECL_{(TPGC)}$	$ECL_{(Req)}$	$ECL_{(TPGC)}$	$ECL_{(Req)}$	$ECL_{(TPGC)}$	$ECL_{(Req)}$
18:1(n-9)	18.36	18.35	18.34	18.35	18.34	18.35	18.35	18.35
18:2(n-6)	18.97	18.96	18.95	18.96	18.96	18.96	18.95	18.96
18:3(n-3)	19.72	19.70	19.69	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70
20:1(n-9)	20.35	20.34	20.32	20.34	20.33	20.34	20.33	20.34
20:2(n-6)	20.96	20.95	20.94	20.95	20.94	20.95	20.95	20.95
22:1(n-9)	22.34	22.33	22.31	22.33	22.32	22.33	22.32	22.33
24:1(n-9)	24.33	24.29	24.29	24.29	24.32	24.30	24.33	24.30

4.4 การคำนวณค่า T_{eq} จากข้อมูลที่รายงานโดย Lomsugarit และคณะ [22]

Lomsugarit และคณะ [22] ได้รายงานข้อมูลค่าเวลาคงค้าง และค่า $ECL_{(TPGC)}$ ของ FAMES จาก น้ำมันเมล็ดผักกาดเขียวปลีที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ SA-WAX โดยใช้โปรแกรมอุณหภูมิแบบ 1 ชั้น 2 ชั้น 3 ชั้น และ 4 ชั้น ไว้ รวมทั้งได้รายงานค่า $ECL_{(G)}$ ที่อุณหภูมิ 160, 180, 190, 210 °C และค่า $\frac{\Delta ECL}{\Delta T}$ ไว้ด้วย จากข้อมูลที่มีอยู่เพียงพอสำหรับนำมาใช้ในการทำนายค่า T_{eq} ได้ โดยใช้ค่าคงที่ a, b, c และ d ตามรายงานของ Lomsugarit และคณะ [22] ซึ่งมีค่าเท่ากับ -9.134, -0.5443, 1374.296 และ 405.091 ตามลำดับ จากนั้นคำนวณค่า $ECL_{(Teq)}$ ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.2

ผลการคำนวณแสดงไว้ในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นว่า $ECL_{(TPGC)}$ มีค่าใกล้เคียงกับ $ECL_{(Teq)}$ มากยกเว้นที่ C24:1 ซึ่งให้ค่าแตกต่างของค่า ECL สูง ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของ FAMES ชนิดนี้ที่เสนอไว้โดย Lomsugarit และคณะ [22] มีไม่ครบถ้วน

แม้ Lomsugarit และคณะ [22] สามารถคำนวณค่า ECL ในสภาวะ TPGC ต่างๆ ได้ก็ตาม ค่า ECL ที่คำนวณได้นั้นไม่รู้จะเทียบเท่ากับ ECL ของสภาวะ IGC ณ อุณหภูมิใด วิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้จึงเป็นการเสริมการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นคือเทียบค่า ECL ในสภาวะ TPGC ณ อุณหภูมิ T_{eq}

5. สรุป

การทำนายค่า T_{eq} โดยอาศัยสมการที่นำเสนอมีความแม่นยำสูง ทำให้สามารถโยงเอาค่า ECL หรือค่า I ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สาร FAMES รวมถึงสารอินทรีย์อื่นๆ ที่วิเคราะห์ภายใต้สภาวะ TPGC ได้ นอกจากนี้ค่า $I_{(Teq)}$ หรือ $ECL_{(Teq)}$ ที่หาโดยวิธีนี้ยังสามารถตัดปัจจัยของตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเหลวไปได้ โดยมีคุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์เพียงอย่างเดียวเข้ามาเกี่ยวข้องซึ่งสามารถควบคุมได้ง่าย ทำให้ข้อมูลมีความถูกต้องและแม่นยำ เชื่อถือได้ในการวิเคราะห์ (reproducible analyses) และการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างหน่วยปฏิบัติการก็สามารถทำได้เช่นกัน

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ตารางที่ 6 แสดงค่า T_{eq} ที่คำนวณได้ และเปรียบเทียบค่า $ECL_{(TPGC)}$ จากข้อมูลของ Lomsugarit และคณะ [22] และ $ECL_{(Teq)}$ ที่คำนวณได้ (สภาวะ TPGC แบบ A, B, C และ D แสดงไว้ในงานวิจัยของ Lomsugarit และคณะ [22])

1 ชั้น (A)					
FAMEs	$t_{R(TPGC)}$	T_{eq}	$t_{M(cal)}$	$ECL_{(TPGC)}$	$ECL_{(Teq)}$
C18:1	6.249	168.62	1.856	18.16	18.16
C18:2	6.799	170.93	1.859	18.60	18.61
C18:3	7.633	171.41	1.860	19.23	19.23
C20:1	8.915	172.85	1.862	20.13	20.14
C22:1	12.002	178.77	1.869	22.15	22.12
C24:1	15.188	187.12	1.880	24.20	24.11

2 ชั้น (B)					
FAMEs	$t_{R(TPGC)}$	T_{eq}	$t_{M(cal)}$	$ECL_{(TPGC)}$	$ECL_{(Teq)}$
C18:1	6.508	167.06	1.853	18.17	18.16
C18:2	7.13	169.12	1.856	18.61	18.61
C18:3	8.094	169.50	1.856	19.24	19.22
C20:1	9.625	170.85	1.858	20.14	20.13
C22:1	13.321	176.29	1.865	22.14	22.11
C24:1	16.461	185.26	1.877	24.18	24.10

3 ชั้น (C)					
FAMEs	$t_{R(TPGC)}$	T_{eq}	$t_{M(cal)}$	$ECL_{(TPGC)}$	$ECL_{(Teq)}$
C18:1	6.433	166.91	1.835	18.16	18.16
C18:2	7.051	169.03	1.838	18.60	18.61
C18:3	8.012	169.43	1.838	19.22	19.22
C20:1	9.498	170.85	1.840	20.12	20.13
C22:1	12.772	176.95	1.848	22.13	22.11
C24:1	15.649	186.13	1.860	24.18	24.10

4 ชั้น (D)					
FAMEs	$t_{R(TPGC)}$	T_{eq}	$t_{M(cal)}$	$ECL_{(TPGC)}$	$ECL_{(Teq)}$
C18:1	7.093	164.77	1.792	18.15	18.15
C18:2	7.654	167.65	1.796	18.59	18.60
C18:3	8.51	168.13	1.797	19.23	19.22
C20:1	9.873	169.84	1.799	20.15	20.13
C22:1	13.132	176.17	1.807	22.18	22.11
C24:1	16.177	185.27	1.819	24.23	24.10

7. เอกสารอ้างอิง

1. Kováts, E., 1958, "Gas Chromatographic Characterization of Organic Compounds. Part 1. Retention Indexes of Aliphatic Halides, Alcohols, Aldehydes and Ketones," *Helvetica. Chimica. Acta*, Vol. 41, pp. 1915-1932.
2. Woodford, F.P. and van Gent, C.M., 1960, "Gas-Liquid Chromatography of Fatty Acid Methyl Esters: The "Carbon-Number" as a Parameter for Comparison of Columns," *Journal of Lipid Research*, Vol. 1, No. 2 January, pp. 188-190.
3. Miva, T.K., Micolajczak, K.L., Eaele, F.R., and Woff, I.A., 1960, "Gas Chromatographic Characterization of Fatty Acids Identification Constants for Mono- and Dicarboxylic Methyl Esters," *Analytical Chemistry*, Vol. 32, No. 13, pp. 1739-1742.
4. Kittiratanapiboon, K., Jeyashoke, N., and Krisnangkura, K., 1998, "The Relationship of Kováts Retention Indices and Equivalent Chain Lengths of Fatty Acid Methyl Esters on a Methyl Silicone Capillary Column," *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 36, No. 7, pp. 361-364.
5. Van den Dool, H. and Kratz, P.D., 1963, "A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography," *Journal of Chromatography A*, Vol. 11, pp. 463-471.
6. Zenkevich, I.G. and Ioffe, B.V., 1988, "System of Retention Indices for Linear Temperature Programming Regime," *Journal of Chromatography A*, Vol. 439, No. 2, pp. 185-195.
7. Halang, W.A., Langlais, R., and Kugler, E., 1978, "Cubic Spline Interpolation for the Calculation of Retention Indices in Temperature-Programmed Gas-Liquid Chromatography," *Analytical Chemistry*, Vol. 50, No. 13, pp. 1829-1832.
8. Wang, T.S. and Sun, Y.L., 1987, "Definitions and Method of Calculation of the Temperature-Programmed Retention Index, I_{TP} , III. A Simplified Calculation Method Based on the Extended Kováts Definition," *Journal of Chromatography A*, Vol. 390, No. 2, pp. 275-283.
9. Bicchi, C., Binello, A., D'Amato, A., and Rubiolo, P., 1999, "Reliability of Van den Dool Retention Indices in the Analysis of Essential Oils," *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 37, No. 8, pp. 288-294.

10. Guiochon, G., 1964, "Retention Indices in Programmed Temperature Gas Chromatography," *Analytical Chemistry*, Vol. 36, No. 3, pp. 661-663.
11. Giddings, J.C., 1959, "Retention Times in Programmed Temperature Gas Chromatography," *Journal of Chromatography A*, Vol. 4, pp.11-20.
12. Krupčík, J. Repka, D., and Hevesi, T., 1987, "Use of Kováts Indices for Prediction of Retention Temperatures in Linear Temperature-Programmed Capillary Gas Chromatography," *Journal of Chromatography A*, Vol. 407, pp. 65-77.
13. Akporhonor, E.E., Le Vent, S., and Taylor, D.R., 1990, "Calculation of Programmed Temperature Gas Chromatographic Characteristics from Isothermal Data : III. Predicted Retention Indices and Equivalent Temperatures," *Journal of Chromatography*, Vol. 504, pp. 269-278.
14. Sun, Y., Zhang, R. and Wang, Q., 1993, "Programmed-Temperature Gas Chromatographic Retention Index" (Review), *Journal of Chromatography A*, Vol. 657, pp. 1-15.
15. Curvers, J., Rijks, J., Cramers, C., Knauss, K., and Larson, P., 1985, "Temperature-Programmed Retention Indexes from Isothermal Data. Part I: Theory," *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, Vol. 8, pp. 607-610.
16. Guan, Y., Kiraly, J., and Rijks, J. A. 1989, "Interactive Retention Index Database for Compound Identification in Temperature-Programmed Capillary Gas Chromatography," *Journal of Chromatography A*, Vol. 472, pp. 129-143.
17. García Domínguez, J., A. and Santiuste, J.M., 1992, "Programmed-Temperature Gas Chromatography : Comparative Study of Retention Temperatures on Four Unequally Polar Stationary Phase," *Journal of Chromatography A*, Vol. 627, No. 1-2, pp. 203-217.
18. Gonzalez, F.R. and Nardillo, A.M., 1999, "Retention Index in Temperature-Programmed Gas Chromatography" (Review), *Journal of Chromatography A*, Vol. 842, No. 1-2, pp. 29-49.
19. Krisnangkura K., Tancharoon, A., Konkao, C., and Jeyashoke, N., 1997, "An Alternative Method for The Calculation of Equivalent Chain Length or Carbon Number of Fatty Acid Methyl Esters in Gas Chromatography," *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 35, No. 7, pp. 329-332.
20. Kittiratanapiboon, K., Jeyashoke, N., and Krisnangkura, K., 1998, "Forecasting Retention Times of Fatty Acid Methyl Esters in Temperature-Programmed Gas Chromatography," *Journal of*

Chromatographic Science, Vol. 36, No. 11, pp. 541-546.

21. Cavalli, E.J. and Guinchard, C., 1995, "Forecasting Retention Times in Temperature-Programmed Gas Chromatography," *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 33, No. 7, pp. 371-377.

22. Lomsugarit, S., Katsuwan, J., Jeyashoke, N., and Krisnangkura, K., 2001, "An Empirical Approach for Estimating the Equivalent Chain Length of Fatty Acid Methyl Esters in Multistep Temperature-Programmed Gas Chromatography," *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 39, No. 4, pp. 468-472.

23. Harrington, K.J. and D'arcy-Evans, C., 1985, "A Comparison of Conventional and *in situ* Method of Transesterification of Seed Oil from a Series of Sunflower Cultivars," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 62, pp. 1009-1013.