การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ ไตร ได และโมโนกลีเซอไรด์ ในเอทิลไบโอดีเซล จากแอซิดออยล์ของอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าว

คณิศา กิตติรัตนไพบูลย์ [1] **กษมพล ศักดิ์การินทร์กุล** [2] **และ คณิต กฤษณังกรู** [3]
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

รับเมื่อ 14 กุมภาพันธ์ 2551 ตอบรับเมื่อ 3 ตุลาคม 2551

บทคัดย่อ

วิธีการทางโครมาโตกราฟีแรงดันสูงแบบแยกตามขนาดต่อพ่วงด้วยเครื่องตรวจวัดแบบอีแวพพอเรทีพไลท์สแคทเทอริ่ง (Evaporative Light Scattering Detector; ELSD) ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ไตร- ได- และโมโนกลีเซอไรด์ (bound glycerols) กรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ และกรดไขมันอิสระในไบโอดีเซล การแยกสารประกอบในไบโอดีเซลโดยใช้คอลัมน์ phenogel 100 Å ขนาด 300 mm X 7.8 mm ID, 5μm ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมของร้อยละ 0.5 เตตระไฮโดรฟูแลน (THF) ในโทลูอีน ให้ผลดีกว่าการใช้ THF หรือโทลูอีนเพียงอย่างเดียว เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นผสมในโทลูอีนแทน THF เช่น อะซิโตน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด หรือกรดอะซิติก พบว่าสารประกอบในไบโอดีเซลทุกตัวสามารถแยกได้ถึงเส้นฐานเช่นเดียวกัน แต่ร้อยละ 0.25 กรดอะซิติกในโทลูอีนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด จึงถูกนำมาใช้ในการหาองค์ประกอบของไบโอดีเซลที่ได้จากแอซิดออยล์จากน้ำมันรำข้าว ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาแบบขั้นตอนเดียวโดยมีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อุณหภูมิที่ใช้คือ 75 °C และพบว่าที่อัตราส่วนโมลของกรดไขมันอิสระต่อเอทานอลเท่ากับ 1:480 จะให้ผลผลิตไบโอดีเซลสูงที่สุดคือประมาณร้อยละ 98 ภายในเวลา 30 นาที

คำสำคัญ : กรดไขมันอิสระ / กลีเซอไรด์ / โครมาโตกราฟีแรงดันสูงแบบแยกตามขนาด / ไบโอดีเซล / แอซิดออยล์จากน้ำมันรำข้าว

[1] *นักวิจัย สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[2] *นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[3] *รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

Determination of FFA, Tri-, Di-, and Monoglycerides in Ethyl Biodiesel from Acid Oil of Rice Bran Oil Refinery

Kanisa Kittiratanapiboon [1], Kasamapol Sakkarinukul [2], and Kanit Krisnangkura [3]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thakham, Bangkhuntien, Bangkok 10150

Received 14 February 2008 ; accepted 3 October 2008

Abstract

A Method of high performance size exclusion chromatography (HPSEC) with evaporative light-scattering detector was developed for analysis of tri-, di-, and monoglyceride (bound glycerols) fatty acid ethyl ester and free fatty acids in biodiesel. The separation of the analytes on a phenogel 100Å column (300 mm X 7.8 mm ID, 5μm) eluted with toluene containing 0.5 % tetrahydrofuran (THF) is better than straight THF or toluene. Baseline separation of all the above solutes can also be achieved when acetone, dichloromethane, ethyl acetate or acetic acid is used in place of THF. However, 0.25% acetic acid in toluene was found to be the best mobile phase modifier. Ethyl biodiesels of rice bran acid oil which were derived from simultaneous esterificaton and transeterification of the acid oil with sulfuric acid at 75°C at different molar ratios of FFA:ethanol (between 1:25 to 1:480) were analyzed by HPSEC eluted with 0.25% acetic acid in toluene. The results show that about 98% FAEEs (biodiesel) could be obtained in less than 30 min at 1:480 molar ratio of FFA:ethanol.

Keywords : Free Fatty Acid / Glycerides / High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC) / Biodiesel / Rice Bran Acid Oil

[1] *Research Scientist, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[2] *Graduated Student, Division of Biotechnology, School of Bioresources and Technology.*

[3] *Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

1. บทนำ

ไบโอดีเซลได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในแง่ของพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซล เนื่องจากไบโอดีเซลมีคุณสมบัติทางเคมี-ฟิสิกส์ เช่น ค่าซีเทน (cetane number) ค่าความร้อน (heat content) ความหนืด, จุดหมอก (cloud point) จุดไหลเท (pour point) นั้นใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลหมายเลขหมุนเร็ว ไบโอดีเซลสามารถผลิตจากวัตถุดิบหมุนเวียน (renewable) และผลิตได้ในปริมาณมากย่อยสลายง่ายและไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ [1-3] การผลิตไบโอดีเซลทั่วโลกมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี ในปี 2005 มีปริมาณการผลิตถึง 3,500 ล้านลิตร คิดเป็นร้อยละ 2 ของปริมาณดีเซลที่ใช้ในระบบการขนส่ง และคาดว่าปริมาณการใช้จะเพิ่มเป็นร้อยละ 5.75 ในปี 2010 [4, 5]

ราคาต้นทุนของน้ำมันพืชหรือไขสัตว์บริสุทธิ์ที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลคิดเป็นร้อยละ 70-95 ของราคาต้นทุนทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ วัตถุดิบมีผลต่อราคาของไบโอดีเซลอย่างมากและมีผลให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีราคาสูงกว่าราคาของน้ำมันปิโตรเลียม ดังนั้นจึงได้มีการพยายามหาแหล่งวัตถุดิบชนิดอื่นที่มีราคาถูกกว่ามาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เช่น น้ำมันพืชและไขสัตว์ใช้แล้ว หรือน้ำมันพืชคุณภาพต่ำชนิดอื่น เช่น น้ำมันรำข้าวหรือน้ำมันเมล็ดยางพารา ที่ไตรกลีเซอไรด์บางส่วนถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ไลเปสไปเป็นกรดไขมันอิสระ [6]

แอซิดออยล์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากขั้นตอนการกำจัดกรดไขมันอิสระในกระบวนการทำน้ำมันดิบให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางเคมี เป็นวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากแอซิดออยล์ประกอบด้วยกรดไขมันอิสระและกลีเซอไรด์ (ไตร- ได- และโมโนกลีเซอไรด์) ประมาณร้อยละ 95 ซึ่งพบว่าทั้งกรดไขมันอิสระและกลีเซอไรด์เป็นสารตั้งต้นที่ดีสำหรับการผลิตไบโอดีเซล ปกติแอซิดออยล์จะถูกขายให้กับโรงงานอาหารสัตว์ในราคาถูก ดังนั้นถ้าสามารถนำแอซิดออยล์มาเป็นวัตถุดิบ ก็จะสามารถลดต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลลง และยังเป็นการช่วยโรงงานผลิตน้ำมันพืชเพื่อการบริโภคในการกำจัดแอซิดออยล์ [7]

ในปี 2003, Hass และคณะ [8] ได้นำแอซิดออยล์จากน้ำมันถั่วเหลืองมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล แอซิดออยล์ที่ใช้ประกอบด้วย กรดไขมันอิสระร้อยละ 59.3, ไตรกลีเซอไรด์ร้อยละ 28.0, ไดกลีเซอไรด์ร้อยละ 2.6, และโมโนกลีเซอไรด์น้อยกว่าร้อยละ 1 โดยใช้อัตราส่วนของกรดไขมันอิสระ:เมทานอล:กรดซัลฟูริก เท่ากับ 1:15:1.5 อุณหภูมิที่ใช้คือ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 26 ชั่วโมง ได้ผลผลิตไบโอดีเซลเพียงแค่ร้อยละ 85 และที่เหลือเป็นกรดไขมันอิสระและสารกลีเซอไรด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา ซึ่งถือเป็นปริมาณที่ค่อนข้างสูง จากการทดลองของ Freedman และคณะ [9] พบว่าอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันในเมทิลและเอทิลแอลกอฮอล์ใกล้เคียงกัน แต่การใช้เอทิลแอกอฮอล์จะมีข้อดีกว่าคือ เป็นสารที่สามารถผลิตได้จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ไม่เป็นพิษ และเอทิลเอสเทอร์ที่ได้จะมีค่าความร้อนและค่าซีเทนสูงกว่าเมทิลเอสเทอร์

ไบโอดีเซลได้จากการทำปฏิกิริยาของไตรกลีเซอไรด์ (น้ำมันพืชหรือไขสัตว์) กับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอล, เอทานอล ผ่านปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน โดยมีกรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอน มีไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลาง ถ้าปฏิกิริยาเกิดไม่สมบูรณ์จะสามารถพบไตรกลีเซอไรด์, ไดกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ หรือเรียกรวมว่า bound glycerols ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย รวมทั้งกรดไขมันอิสระที่มาจากวัตถุดิบหรือเกิดจากการไฮโดรไลซีสน้ำมัน สารปนเปื้อนดังกล่าวอาจก่อให้เกิดปัญหากับเครื่องยนต์เช่น การอุดตันของหัวฉีด การสึกกร่อนของเครื่องยนต์เนื่องจากกรดไขมันอิสระ หรือเกิดการปลดปล่อยสารพิษ เช่น acrolein สู่สิ่งแวดล้อม จึงทำให้ในหลายๆ ประเทศได้มีการกำหนดปริมาณสูงสุดของ bound glycerols และกรดไขมันอิสระ ที่จะมีได้ในไบโอดีเซลไว้ในมาตรฐาน ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์สารปนเปื้อนข้างต้นที่ง่ายและน่าเชื่อถือจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการพัฒนาไบโอดีเซล Thin-Layer Chromatography-Flam Ionization Detector; TLC-FID เป็นวิธีแรกๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบในไบโอดีเซล [10] มีรายงานการใช้ High Performance Chromatography; HPLC ทั้งชนิด Reverse Phase-HPLC และ High Performance Size Exclusion Chromatography; HPSEC ในการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันอิสระ, bound glycerols และองค์ประกอบอื่นๆ ในไบโอดีเซล ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถวิเคราะห์โดยไม่ต้องเปลี่ยนสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปอนุพันธุ์ สำหรับ RP-HPLC

ทั้งแบบ isocratic และ gradient elution สามารถใช้แยกกรดไขมันอิสระ และ bound glycerols แต่การวิเคราะห์สารประกอบด้วยวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากเป็นการแยกสารออกเป็นแต่ละชนิดของสาร ไม่ได้แยกออกตามกลุ่มของสาร ทำให้ยากต่อการวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร ซึ่งต้องใช้ผู้ชำนาญในการวิเคราะห์ [11-12] ส่วนการใช้ HPSEC ที่อาศัยหลักการการแยกสารตามมวลโมเลกุล ก็ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของไบโอดีเซลเช่นเดียวกัน ข้อดีของการใช้ HPSEC คือสามารถแยกสารประกอบในไบโอดีเซลออกตามกลุ่มของสาร ทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์เอกลักษณ์ และหาปริมาณ [13-16] แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือจะต้องใช้คอลัมน์มากกว่าหนึ่งคอลัมน์ในการแยกสารให้สมบูรณ์โดยเฉพาะการแยกโมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ และกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ ที่มีขนาดมวลโมเลกุลใกล้เคียงกัน Arzamendi และคณะ [17] ได้ใช้คอลัมน์แบบ Styragel ที่มีขนาดรูพรุน 100 Å 1 อัน ต่อกับ 500 Å 2 อัน แบบอนุกรมในการแยกสารประกอบในไบโอดีเซล คอลัมน์ที่ต่อกันนี้สามารถแยกกรดไขมันอิสระ bound glycerols และกลีเซอรอลอิสระได้ดีขึ้น สามารถแยกโมโนกลีเซอไรด์และกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ได้ถึงเส้นฐาน แต่ไม่สามารถแยกไตรกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์

คณะกรรมการมาตรฐานอเมริกา (American Standard Test Method Committee) และ คณะกรรมการมาตรฐานยุโรป (European standard committee) ได้กำหนดให้ใช้แก๊สโครมาโตกราฟีแบบอุณหภูมิสูง (High Temperature - Gas Chromatography) เพื่อวิเคราะห์เอกลักษณ์และปริมาณขององค์ประกอบไบโอดีเซล ได้แก่ bound glycerols และกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ วิธีนี้จะต้องเปลี่ยนสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ผ่านปฏิกิริยา silylation ก่อนฉีดสารเข้าเครื่อง High Temperature GC ส่วนการหาปริมาณของกรดไขมันอิสระจะใช้วิธีการไตเตรด ทำให้เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์นานมาก [18-21]

การใช้ HPSEC ในการวิเคราะห์องค์ประกอบในไบโอดีเซลมีข้อดีหลายประการ แต่จะให้การแยกเกิดได้สมบูรณ์จำเป็นต้องใช้คอลัมน์มากกว่าหนึ่งคอลัมน์มาต่อกันแบบอนุกรม จึงทำให้สิ้นเปลืองและเสียเวลาในการวิเคราะห์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้เป็นการนำเสนอวิธี HPSEC ที่ใช้คอลัมน์ phenogel เพียงคอลัมน์เดียว และมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสม สามารถแยกสารประกอบในไบโอดีเซลที่ได้จากแอซิดออยล์จากน้ำมันรำข้าว คือโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ และกรดไขมันอิสระ ได้ถึงเส้นฐาน

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

2.1 วัสดุ

แอซิดออยล์จากน้ำมันรำข้าว ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทน้ำมันบริโภคไทย สารมาตรฐาน Tripalmitoyl glycerol, 1,2-dipalmitoyl glycerol, 1(3)-monopalmitoyl glycerol และ กรดปาล์มิติก จากบริษัท ซิกมาเคมิคอล จำกัด (เซนหลุยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา) กรดซัลฟูริก และโซเดียมซัลเฟต จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน ตัวทำละลายอินทรีย์ เกรด HPLC จากบริษัท แลปสแกน จำกัด (ประเทศไทย)

2.2 การเตรียมเอทิลเอสเทอร์ของแอซิดออยล์จากน้ำมันรำข้าว

เอทิลเอสเทอร์ของแอซิดออยล์เตรียมโดยใช้กรดซัลฟูริก 0.5 M ในเอทานอล กับแอซิดออยล์จากน้ำมันรำข้าว ในอัตราส่วนของน้ำมันต่อเอทานอล คือ 1:25, 1:60, 1:120, 1:240 และ1:480 นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 75 องศาเซลเซียส โดยมีการกวนตลอดการทดลอง และเก็บสารตัวอย่างทุกๆ 1, 5, 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที เติมโทลูอีนเพื่อเจือจางสารตัวอย่าง จากนั้นล้างสารตัวอย่างด้วยน้ำ 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดกรดซัลฟูริกส่วนเกิน และทำให้แห้งด้วยโซเดียมซัลเฟต สารตัวอย่างพร้อมที่จะวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูงแบบแยกตามขนาด (HPSEC)

2.3 โครมาโตกราฟีแรงดันสูงแบบแยกตามขนาด

เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบแยกตามขนาด ประกอบด้วย six port injector รุ่น 7125 ปริมาตรของ loop 20 ไมโครลิตร ของบริษัท Rheodyne Incorporated (ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปั๊ม รุ่น 510 ของบริษัท Water Associates (ประเทศสหรัฐอเมริกา) คอลัมน์แบบแยกตามขนาด Phenogel 100 Å (300 mm x 7.8

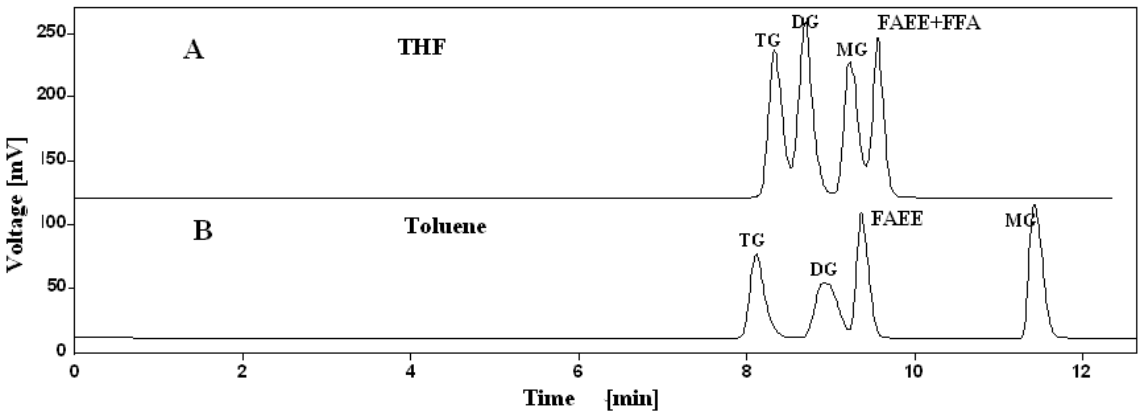
mm ID, 5μm) ของบริษัท Phenomenex (ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตัวตรวจวัดแบบ Evaporative Light Scattering รุ่น Sedex 55 ของบริษัท SEDERE (ประเทศฝรั่งเศส) อุณหภูมิของตัวตรวจวัด 30 องศาเซลเซียส ความดันของ Air คือ 2 บาร์ ข้อมูลจากตัวตรวจวัดถูกเก็บและประมวลผลด้วย CSW32 HPLC software จากบริษัท DataApex Ltd (ประเทศสาธารณะรัฐเชค) วัฏภาคเคลื่อนที่ดังแสดงในผลการทดลอง

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การเปรียบเทียบการแยกสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ ไตร- ได- และโมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ ที่มีตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแลนเชิงเดี่ยวและตัวทำละลายโทลูอีนเชิงเดี่ยวเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

เตรดตระไฮโดรฟูแลน (THF) และโทลูอีน เป็นสารละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับโครมาโตกราฟีแบบแยกตามขนาดที่มีวัฏภาคนิ่งเป็นสารโพลิเมอร์ผสมระหว่าง vinyl-divinyl benzene เนื่องจากโพลิเมอร์ชนิดนี้สามารถพองตัวได้ดีใกล้เคียงกันในตัวละลายทั้งสองชนิดข้างต้น สำหรับการแยก bound glecerols และเมทานอล ในผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล โดยวิธี HPSEC ส่วนใหญ่จะใช้ THF เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ [16, 17]

รูปที่ 1A แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ และกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ บนคอลัมน์ phenogel 100 Å ที่มี THF เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าการแยกสารส่วนใหญ่ไม่ถึงเส้นฐาน และกรดไขมันอิสระกับกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์จะถูกชะออกมาพร้อมกัน จากข้อมูลที่ได้จากบริษัทผลิตคอลัมน์ว่าโทลูอีนเป็นสารละลายที่ให้คุณสมบัติการบวมตัวของวัฏภาคนิ่งใกล้เคียงกับ THF ดังนั้นจึงได้มีการลองใช้โทลูอีนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าค่าเวลาคงค้างของไตรกลีเซอไรด์ และกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ค่าเวลาคงค้างของไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ จะสูงขึ้น และสารทุกตัวสามารถแยกออกจากกันถึงเส้นฐาน ยกเว้นพีคของไดกลีเซอไรด์ที่ขยับมาใกล้พีคของกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์มากขึ้น ทำให้การแยกสารทั้งสองไม่ถึงเส้นฐาน ดังแสดงในรูปที่ 1B. ผลการแยกสารด้วยสภาวะข้างต้นมีความใกล้เคียงกับผลการแยกสารโดยใช้คอลัมน์ styragel ที่มีขนาดรูพรุนต่างกัน 3 คอลัมน์ต่อแบบอนุกรม และมีวัฏภาคนิ่งเป็น THF ของ Arzamendi และคณะ [17]

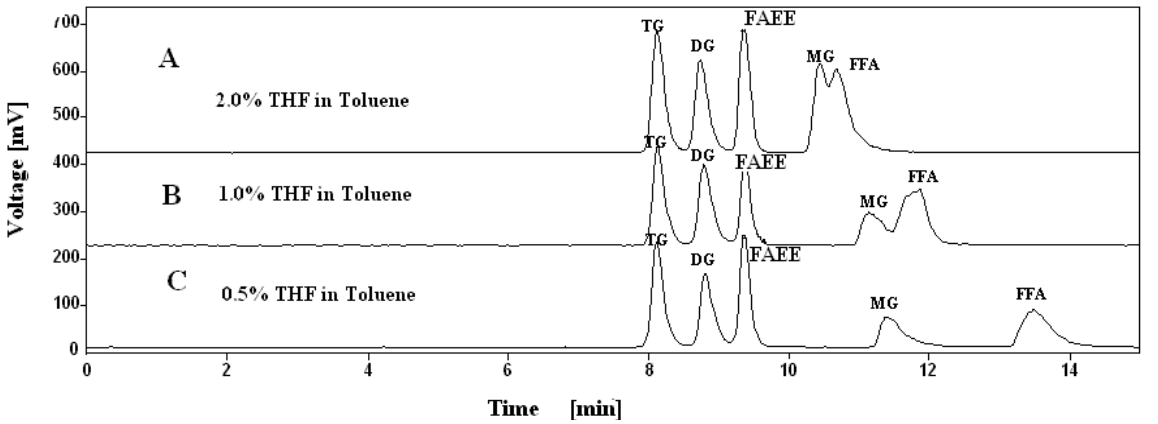


รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน TG, DG, MG, FAEE และ FFA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ในโทลูอีน ที่มี ELSD เป็นตัวตรวจวัด
(A) 100% THF เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (B) 100% toluene เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่
TG =ไตรกลีเซอไรด์, DG = ไดกลีเซอไรด์, MG = โมโนกลีเซอไรด์,
FAEE = กรดไขมันเอทิลเอสเทอร์, FFA = กรดไขมันอิสระ

เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของโมเลกุลของสารทั้งหมดและผลการแยกนั้น พบว่าเมื่อเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่จาก THF เป็นโทลูอีน ทำให้ค่าเวลาคงค้างของไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์สูงขึ้น น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับหมู่ไฮดรอกซีบนโมเลกุลของสารทั้งสองไม่โดยทางตรง ก็โดยทางอ้อม เนื่องจากโมเลกุลของไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ มีหมู่ไฮดรอกซีอิสระอยู่หนึ่งและสองหมู่ ตามลำดับ แต่ไตรกลีเซอไรด์และกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ซึ่งไม่มีหมู่ไฮดรอกซีอยู่ในโมเลกุลนั้นเวลาคงค้างไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้น การที่ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์คงค้างอยู่ในคอลัมน์นานขึ้นเมื่อใช้โทลูอีนเป็นตัวชะ อาจเนื่องมาจากอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซีกับเจลของวัฏภาคนิ่ง ซึ่งแรงของอันตรกิริยานี้จะแข็งแรงกว่าแรงของอันตรกิริยาระหว่างโทลูอีนกับเจล แต่อ่อนกว่าแรงของอันตรกิริยาระหว่าง THF กับเจล ยิ่งกว่านั้นพบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าเวลาคงค้างของโมโนกลีเซอไรด์ ที่มีหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ จะมากกว่าในไดกลีเซอไรด์ ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีเพียงหมู่เดียว ถ้าสิ่งที่กล่าวมาข้างต้นถูกต้อง ก็น่าจะสามารถแยกสารประกอบในไบโอดีเซลได้โดยการใช้คอลัมน์เพียงคอลัมน์เดียว ดังนั้นการทดลองจึงออกแบบโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างโทลูอีนกับ THF ที่อัตราส่วนต่างๆ

3.2 การแยกสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ ไตร ได และโมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่างเตตระไฮโดรฟูแลนและโทลูอีนที่อัตราส่วนต่างๆ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

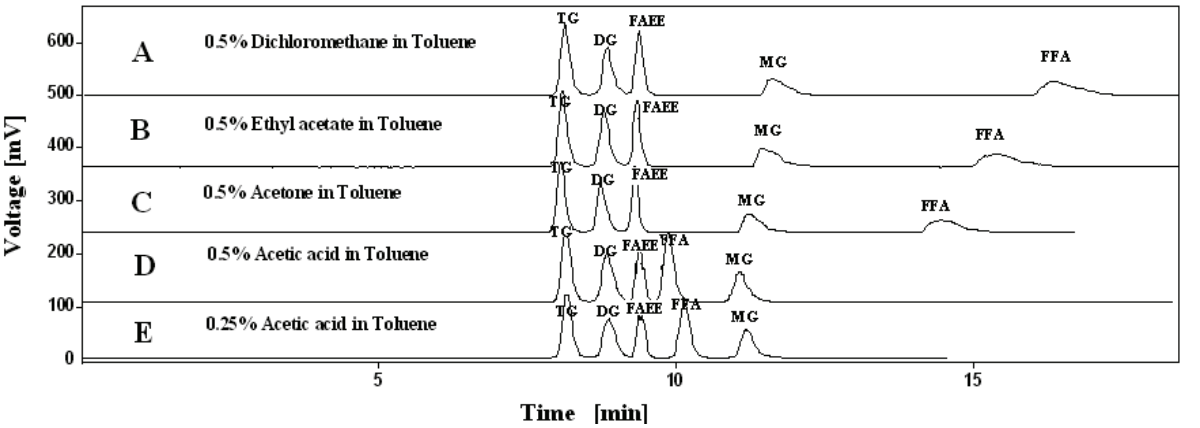
สารละลายผสมระหว่างโทลูอีนกับ THF ที่มีปริมาณของ THF สูงกว่าร้อยละ 2 (v/v) สามารถแยก bound glycerols และกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ได้ แต่ถ้าสารตัวอย่างมีกรดไขมันอิสระอยู่ด้วย กรดไขมันอิสระจะไม่สามารถแยกออกจากโมโนกลีเซอไรด์ได้ ดังแสดงในรูปที่ 2A และจะไม่สามารถเห็นพีคของกรดไขมันอิสระทั้งในกรณีที่ใช้ THF ร้อยละ 0 และร้อยละ 100 (ดังรูปที่ 1) ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น คือ การใช้ THF ร้อยละ 100 ทำให้วัฏภาคเคลื่อนที่มีความเป็นขั้วสูงมาก กรดไขมันอิสระจึงถูกชะออกมาพร้อมกับโมโนกลีเซอไรด์ และเมื่อใช้โทลูอีนร้อยละ 100 พบว่าความเป็นขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ก็น้อยเกินกว่าจะสามารถชะกรดไขมันอิสระออกมาจากคอลัมน์ สำหรับสารละลายผสม THF ในโทลูอีน ร้อยละ 1 สามารถใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ (ดังรูปที่ 2B) แต่สารละลายผสม THF ในโทลูอีนร้อยละ 0.5 ให้ผลการแยกที่ดีกว่า (ดังรูปที่ 2C)



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน TG, DG, MG, FAEE และ FFA ในวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมของโทลูอีนกับ THF ในอัตราส่วนต่างๆ กันคือ (A) = THF ร้อยละ 2.0, (B) = THF ร้อยละ 1.0 และ (C) = THF ร้อยละ 0.5
TG =ไตรกลีเซอไรด์, DG = ไดกลีเซอไรด์, MG = โมโนกลีเซอไรด์,
FAEE = กรดไขมันเอทิลเอสเทอร์, FFA = กรดไขมันอิสระ

3.3 การแยกสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ ไตร ได และโมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ผสมในโทลูอีนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

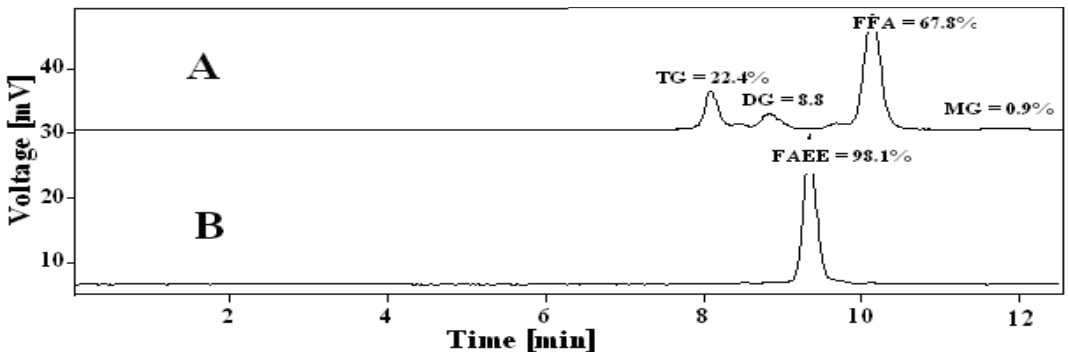
Bergmann และคณะ [22] ได้รายงานผลของสารละลายในโครมาโตกราฟีแบบแยกตามขนาด โดยพบว่าโทลูอีนนั้นมีผลต่ออันตรกิริยาระหว่างสารอะโรมาติกกับโพลิเมอร์ (polystyrene-divinyl benzene) แต่การศึกษานี้เป็นผลของ THF ต่อการชะสารไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระซึ่งมีความน่าสนใจ เนื่องจาก THF จะมีผลต่อสารมีขั้วที่มีหมู่ไฮดรอกซีอิสระหรือกรดคาร์บอกซิลิก เมื่อทดสอบตัวทำละลายชนิดอื่น ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตรด และอะซิโตน ที่มีค่าดัชนีความเป็นขั้ว (polarity index) 3.1, 4.4 และ 5.1 ตามลำดับ (THF มีค่าเท่ากับ 4.0) ผสมกับโทลูอีน พบว่าเวลาชะจะลดลงเมื่อค่าดัชนีความเป็นขั้วมีค่าเพิ่มขึ้นดังรูปที่ 3 (A-C) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ THF ที่มีค่าเท่ากับ 4.0 ซึ่งมีค่าดัชนีความเป็นขั้วต่ำกว่าอะซิโตน (5.1) และเอทิลอะซิเตด (4.4) แต่สามารถชะกรดไขมันอิสระออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าสารทั้งสอง ดังนั้นกลไกการชะสารใน phenogel ไม่ได้ขึ้นกับขนาดของโมเลกุลของสารและค่าดัชนีความเป็นขั้วของวัฏภาคนิ่ง ยังมีอันตรกิริยาระหว่างตัวโพลิเมอร์กับส่วนที่เป็นขั้วของสารตัวอย่าง โดยเฉพาะหมู่ไฮดรอกซีและหมู่คาร์บอกซิลิก ซึ่งอาจรวมถึงพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของสาร THF เป็นเบสอ่อน Lewis จึงสามารถรับ acidic proton จากกรดไขมันอิสระหรือแอลกอฮอล์ (กรดที่อ่อนมากๆ) ดังนั้นอันตรกิริยาระหว่างกรดหรือแอลกอฮอล์ กับตัว Phenogel จึงน้อย มีผลให้สารถูกชะออกมาได้เร็ว สำหรับออกซิเจนบนหมู่คาร์บอนิลของตัวทำละลายอื่นๆ เช่น เอทิลอะซิเตดและอะซิโตนก็สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับสารตัวอย่างได้ แต่อะตอมไฮโดรเจนของคาร์บอนที่ตำแหน่งอัลฟ่าจะเป็นกรด ดังนั้นการที่มันจะรับ acidic proton จากโมเลกุลอื่นจะน้อยกว่า จากโครมาโตแกรมในรูปที่ 3 (A-C) สามารถสรุปได้ว่าตัวทำละลายทุกตัว (ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด อะซิโตน และ THF) สามารถใช้เป็นตัวดัดแปลงในโทลูอีนเพื่อใช้แยกสารประกอบในไบโอดีเซล อย่างไรก็ตามการใช้ตัวทำละลายที่กล่าวมาข้างต้นส่งผลให้พีคไม่สมมาตร พีคของกรดไขมันอิสระเกิดหางพีคสูง ซึ่งเป็นผลมาจากอันตรกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกกับตัว Phenogel แต่เมื่อใช้ร้อยละ 0.5 กรดอะซิติก (รูปที่ 3D) พบว่าหางพีคของกรดไขมันอิสระหายไป และค่าเวลาคงค้างลดลงเป็นอย่างมาก กรดไขมันอิสระถูกชะออกมาหลังกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์เพียงเล็กน้อย แต่ลำดับการชะของโมโนกลีเซอไรด์กับกรดไขมันอิสระจะสลับกัน เมื่อลดความเข้มข้นของกรดอะซิติกลงเหลือร้อยละ 0.25 (รูปที่ 3E) พบว่าสามารถแยกกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ และกรดไขมันอิสระได้ดีขึ้น ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการวิเคราะห์สารตัวอย่างไบโอดีเซลที่มีปริมาณของกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์สูงมากๆ



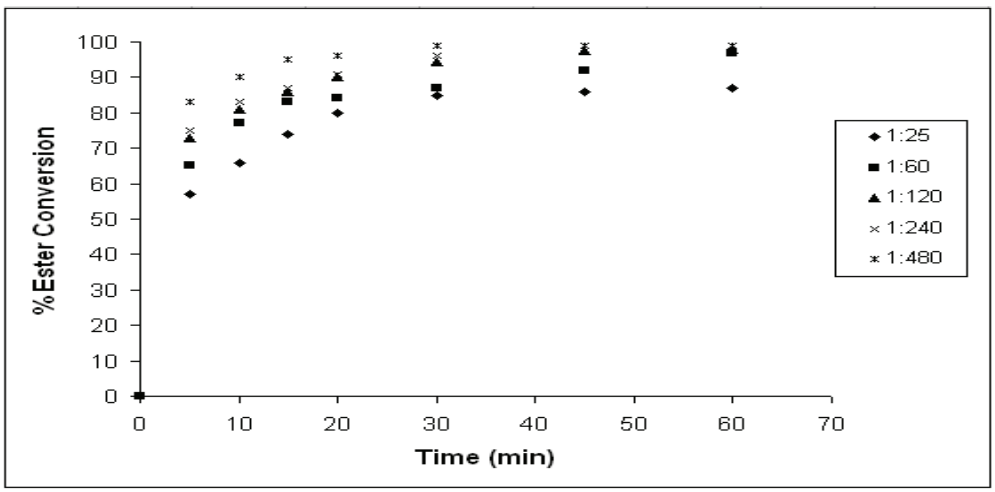
รูปที่ 3 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน TG, DG, MG, FAEE และ FFA เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยโทลูอีน และไดคลอโรมีเทนร้อยละ 0.5 (A), เอทิลอะซิเตดร้อยละ 0.5 (B), อะซิโตนร้อยละ 0.5 (C), กรดอะซิติกร้อยละ 0.5 (D) และ กรดอะซิติกร้อยละ 0.25 (E) TG = ไตรกลีเซอไรด์, DG = ไดกลีเซอไรด์, MG = โมโนกลีเซอไรด์, FAEE = กรดไขมันเอทิลเอสเทอร์, FFA = กรดไขมันอิสระ

3.4 การหาปริมาณของไบโอดีเซลที่ได้จากแอซิดออยล์จากน้ำมันรำข้าว

ในงานทดลองนี้ได้ใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากแอซิดออยล์มีกรดไขมันอิสระเป็นองค์ประกอบสูงถึงร้อยละ 68 (รูปที่ 4A) ถ้าใช้ด่างเป็นตัวเร่ง กรดไขมันอิสระจะถูกเปลี่ยนเป็นสบู่แทนที่จะถูกเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน (ไบโอดีเซล) สำหรับกรดนั้นสามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งเอสเทอริฟิเคชัน และทรานเอสเทอริฟิเคชัน ดังนั้นทั้งกรดไขมันอิสระและไตรกลีเซอไรด์ในแอซิดออยล์ สามารถถูกเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันในเวลาเดียวกัน นอกจากชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาแล้ว ปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ใช้ก็มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาเช่นกัน ดังนั้นในงานทดลองนี้ได้ใช้อัตราส่วนของกรดไขมันอิสระต่อเอทิลแอลกอฮอล์ต่างๆ กันคือ 1:25 1:60 1:120 1:240 และ 1:480 และอุณหภูมิที่ใช้คือ 75°C พบว่าอัตราการเกิดไบโอดีเซลจะเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ในปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาผลของปริมาณแอลกอฮอล์ต่ออัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันในน้ำมันจากเมล็ดทานตะวันด้วยกรดซัลฟูริกของ Siler-Marinkovic และคณะ [23] ที่พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะสูงขึ้นเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4 โครมาโตแกรมของแอซิดออยล์จากน้ำมันรำข้าว (A) และ ไบโอดีเซลที่อัตราส่วนของอัตราส่วนกรดไขมันอิสระต่อเอทานอล เท่ากับ 1:480 เวลา 30 นาที และอุณหภูมิ 75°C (B) ในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยโทลูอีนและกรดอะซิติกร้อยละ 0.25
TG = ไตรกลีเซอไรด์, DG = ไดกลีเซอไรด์, MG = โมโนกลีเซอไรด์,
FAEE = กรดไขมันเอทิลเอสเทอร์, FFA = กรดไขมันอิสระ



รูปที่ 5 ผลของอัตราส่วนโมลาร์ของกรดไขมันอิสระต่อเอทานอลกับร้อยละการเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ของแอซิดออยล์จากน้ำมันรำข้าวโดยมีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 75 °C

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ และกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ ที่ได้จากปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีส เมื่อใช้อัตราส่วนโมลาร์ของกรดไขมันอิสระและเอทานอลต่างๆ คือ 1:25 1:60 1:120 1:240 และ1:480

		%				
Ratio	**Time (min)**	**TG**	**DG**	**MG**	**FFA**	**FAEE**
Acid oil	**0**	**22.4**	**8.8**	**0.9**	**67.8**	**0**
1:25	5	19.3	9.2	ND	14.8	56.7
	10	19.0	8.4	ND	6.1	66.5
	15	15.2	7.4	ND	3.4	74.0
	20	12.2	7.0	ND	3.0	77.8
	30	8.1	6.4	ND	2.8	82.7
	45	6.2	5.1	ND	1.5	87.2
	60	5.4	3.2	ND	1.1	90.3
1:60	5	18.0	5.2	ND	5.2	71.7
	10	17.1	4.5	ND	1.8	76.6
	15	13.3	3.9	ND	1.5	81.3
	20	11.3	3.7	ND	1.4	83.6
	30	10.0	2.0	ND	1.4	86.6
	45	5.7	1.5	ND	1.1	91.7
	60	2.3	0.5	ND	ND	97.2
1:120	5	17.3	5.0	ND	2.3	75.4
	10	14.5	4.5	ND	1.0	80.0
	15	10.2	3.3	ND	ND	86.5
	20	7.3	2.6	ND	ND	90.1
	30	3.8	1.7	ND	ND	94.5
	45	1.5	0.7	ND	ND	97.8
	60	1.4	0.5	ND	ND	98.1
1:240	5	15.4	4.2	ND	ND	80.4
	10	13.3	3.8	ND	ND	82.9
	15	9.8	3.2	ND	ND	87.0
	20	6.2	2.6	ND	ND	91.2
	30	2.9	1.4	ND	ND	95.7
	45	ND	1.0	ND	ND	99.0
	60	ND	0.9	ND	ND	99.1

TG = ไตรกลีเซอไรด์, DG = ไดกลีเซอไรด์, MG = โมโนกลีเซอไรด์, FAEE = กรดไขมันเอทิลเอสเทอร์, FFA = กรดไขมันอิสระ, ND = no detected

ตารางที่ 1 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์ของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ และกรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ ที่ได้จากปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีส เมื่อใช้อัตราส่วนโมลาร์ของกรดไขมันอิสระและเอทานอลต่างๆ คือ 1:25 1:60 1:120 1:240 และ 1:480

		%				
Ratio	**Time (min)**	**TG**	**DG**	**MG**	**FFA**	**FAEE**
Acid oil	**0**	**22.4**	**8.8**	**0.9**	**67.8**	**0**
1:480	5	13.8	3.6	ND	ND	82.6
	10	9.8	2.1	ND	ND	88.1
	15	5.4	1.9	ND	ND	92.7
	20	4.3	1.3	ND	ND	94.4
	30	1.1	0.8	ND	ND	98.1
	45	ND	0.5	ND	ND	99.5
	60	ND	0.5	ND	ND	99.5

TG = ไตรกลีเซอไรด์, DG = ไดกลีเซอไรด์, MG = โมโนกลีเซอไรด์, FAEE = กรดไขมันเอทิลเอสเทอร์, FFA = กรดไขมันอิสระ, ND = no detected

สำหรับที่อัตราส่วนกรดไขมันอิสระต่อเอทิลแอลกอฮอล์ 1:480 จะให้ผลผลิตไบโอดีเซลประมาณร้อยละ 98 ภายในเวลา 30 นาที (รูปที่ 4B) เมื่อเทียบกับผลของ Hass และคณะ [8] ที่ใช้อัตราส่วนของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลต่อกรดซัลฟูริก เท่ากับ 1:15:1.5 ซึ่งได้ผลผลิตเพียงร้อยละ 85 โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาถึง 26 ชั่วโมง พบว่าผลผลิตที่ได้สูงกว่า และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาก็น้อยกว่าด้วย ซึ่งอาจเนื่องมาจากชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ต่างกัน ในการทดลองนี้ใช้เอทานอลซึ่งแอซิดออยล์น่าจะสามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกันได้ดีกว่าในเมทานอล [24] และมีการใช้เอทานอลในปริมาณที่สูงกว่า แม้จะมีการใช้ปริมาณเอทานอลสูงมาก แต่เอทานอลนั้นสามารถระเหยออกและนำกลับมาใช้ใหม่ได้

ตารางที่ 1 ยังแสดงให้เห็นว่าการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของกรดไขมันอิสระจะเร็วกว่าปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์ ที่ทุกๆ อัตราส่วนของแอลกอฮอล์ เนื่องจากความสามารถในการละลายของกรดไขมันอิสระในแอลกอฮอล์สายสั้นทั้งเมทิลและเอทิลแอลกอฮอล์น่าจะดีกว่าไตรกลีเซอไรด์ [25]

4. สรุปผลการทดลอง

สามารถใช้ HPSEC ในการแยกสารไตร- ได- และโมโนกลีเซอไรด์ (bound glycerols) กรดไขมันเอทิลเอสเทอร์ และกรดไขมันอิสระ ได้ถึงเส้นฐาน นอกจากขนาดโมเลกุลของสารแล้วยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับกลไกการแยกสารใน Phenogel HPSEC ได้แก่ การดูดซับระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกและหมู่ไฮดรอกซีของสารตัวอย่างกับโพลิเมอร์ที่ใช้เป็นวัฏภาคนิ่ง ซึ่งสามารถลดแรงกระทำดังกล่าวได้โดยการเติมตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูงลงในวัฏภาคเคลื่อนที่เชิงเดี่ยว ดังนั้นโทลูอีนที่ผสมกับตัวทำละลายมีขั้วจะสามารถแยกสารประกอบในไบโอดีเซลได้ดีกว่าการใช้โทลูอีน หรือ THF เชิงเดี่ยว

โทลูอีนผสมกรดอะซิติกร้อยละ 0.25 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด และถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบในไบโอดีเซลจากแอซิดออยล์จากรำข้าว พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลจากแอซิดออยล์โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแบบขั้นตอนเดียวได้ และผลผลิตที่ได้ขึ้นกับเวลาและอัตราส่วนโมลของกรดไขมันอิสระต่อเอทานอลที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

5. เอกสารอ้างอิง

1. Darnoko, D. and Chenryan, M., 2000, "Continuous Production of Palm Methyl Ester", *Journal of the American Oil Chemist's Society*, Vol. 77, pp. 1269-1272.

2. Krawczyk, U.R., 1996, "Biodiesel-Alternative Fuel Makes Inroads but Hurdles Remain", *Inform*, Vol. 7, pp. 801-829.

3. Hamasaki, K., Kinoshita, E.I., Tajima, H., Takasaki, K., and Morita, D., "Combustion Characteristics of Diesel Engines with Waste Veg e ta ble Oil Methyl Ester", *The Fifth International Symposium on Diagnostics and Modeling of Combustion in Internal Combustion Engine(COMODIA 2001)*, 2001, Nagoya, Japan, pp. 410-419.

4. Bozbas, K., 2005, "Biodiesel as an Alternative Motor Fuel: Production and Policies in the European Union", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 12, pp. 542-552.

5. Muniyappa, P.R., Brammer, S.C., and Noureddini, H., 1996, "Improved Conversion of Plant Oils and Animal Fats into Biodiesel and Co-product", *Bioresouce Technology*, Vol. 56, pp. 19-24.

6. Kulkarni, M.G., and Dalai, A. K., 2006, "Waste Cooking Oils: An Economical Source for Biodiesel: A Review", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol. 45, pp. 2901-2913.

7. Haas, M.J., 2005, "Improving the Economics of Biodiesel Production Through the Use of Low Value Lipids as Feedstocks: Vegetable Oil Soapstock", *Fuel Processing Technology*, Vol. 86, pp. 1087-1096.

8. Haas, M.J., Bloomer, S., and Scott, K., 2003, "Simple, High-Efficiency Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters from Soapstock", *Journal of American Oil Chemist's Society*, Vol. 77, pp. 373-379.

9. Freedman, B.H., Pryde, E.H., and Mounts, T.L., 1984, "Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils", *Journal of American Oil Chemists's Society,* Vol. 61, pp. 1638-1643.

10. Plank, C., and Lorbeer, E., 1995, "Simultaneous Determination of Glycerol, and Mono-, Di- and Triglycerides in Vegetable Oil Methyl Esters by Capillary Gas Chromatography", *Journal of Chromatography A*, Vol. 697, pp. 461-468.

11. Marcato, B., and Cecchin, G., 1996, "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*, Vol. 730, pp. 83-90.

12. Holcapek, M., Jandera, P., Fischer, J., and Prokes, B., 1999, "Analytical Monitoring of the Production of Biodiesel by High-Performance Liquid Chromatography with Various Detection Methods", *Journal of Chromatography A*, Vol. 858, pp. 13-31.

13. Fillİres,].R., Benjelloum-Mlayan, B., and Delmas, M., 1995, "Ethanolysis of Rapeseed Oil: Quantitation of Ethyl Esters, Mono-, Di- and Triglycerides and Glycerol by High-Performance Size-Exclusion Chromatography", *Journal of American Oil Chemist's Society*, Vol. 72, pp. 427-432.

14. Lang, X., Dalai, A.K., Bakhshi, N.N., Reaney, M.J., and Hertz, P.B., 2001, "Preparation and Characterization of Bio-diesels from Various Bio-oils", *Bioresouce Technology*, Vol. 80, pp. 53-62.

15. Schoenfelder, W., 2003, "Determination of Monoglycerides, Diglycerides, Triglycerides and Glycerol in Fats by Means of Gel Permeation Chromatography", *European Journal Lipid Science and Technology*, Vol. 105, pp. 45-48.

16. Krinangkura, K., and Simamaharnnop, R.,

1992, “Continuous Transmethylation of Palm Oil in an Organic Solvent”, *Journal of American Oil Chemists’ Society*, Vol. 69, pp. 166-169.

17. Arzamendi, G., Arguinarena, E., Campo, I.M., and Gandia, L., 2006, “Monitoring of Biodiesel Production: Simultaneous Analysis of the Trasesterification Products Using Size Exclusion Chromatography”, *Chemical Engineering Journal*, Vol. 122, pp. 31-40.

18. Foglia, T.A., Jones, K.C., Nunez, A., Phillips, J.G., and Mittelbach, M., 2004, “Comparison of Chromatographic Methods for the Determination of Bound Glycerol in Biodiesel”, *Chromatographia*, Vol. 60, pp. 305-311.

19. Plank, C., and Lorbeer, E., 1992, “Quality Control of Vegetable Oil Methyl Esters Used as Diesel Fuel Substitutes: Quantitative Determination of Mono-, Di and Triglycerides by Capillary GC”, *Journal of High Resolution Chromatography*, Vol. 16, pp. 609-612.

20. Vicente, G., Martinez, M., and Aracil, J., 2005, “Optimization of Brassica crinata Oil Methanolysis for Biodiesel Production”, *Journal of American Oil Chemists’ Society*, Vol. 82, pp. 899-904.

21. Lee, K.T., Foglia, T.A., and Chang, K.S., 2002, “Production of Alkyl Ester as Biodiesel from Fractionated Lard and Restaurant Grease”, *Journal of American Oil Chemists’ Society*, Vol. 79, pp. 191-195.

22. Bergman, J.G., and Duffy, L.J., 1971, “Solvent Effects in Gel Permeation Chromatography”, *Analytical Chemistry*, Vol. 43, pp. 131-133.

23. Siler-Marinkovic, S., and Tomasevic, A., 1998, “Transesterification of Sunflower Oil in Situ”, *Fuel*, Vol. 77, pp. 1389-1391.

24. Feuge, R.O., and Gros, A.T., 1950, “Modification of Vegetable Oils. IX. Purification of Technical Monoglycerides”, Journal of American Oil Chemists’ Society, Vol. 27, pp. 117-122.

25. Kusdiana, D., and Saka, S., 2001, “Kinetics of Transesterification in Rapeseed Oil to Biodiesel Fuel as Treated in Supercritical Methanol”, *Fuel*, Vol. 80, pp. 693-698.